

イムノアフィニティーカラム-HPLC法によるウシ尿中のゼアラレノンの測定

川村 理, 江本知朗

DETERMINATION OF ZEARALENONE IN BOVINE URINE
BY AN IMMUNOAFFINITY COLUMN-HPLC METHOD

Osamu KAWAMURA and Akio EMOTO

In order to establish an immunoaffinity column-HPLC method for zearalenone (ZEN) in bovine urine, purified anti-ZEN monoclonal antibody (ZEN.2) was bound to Affi-Gel 10 gel, and the antibody-binding gel was packed into a mini column. When this column was applied with 10 ml of ZEN, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, and β -zearalanol (100 ng/ml in PBS), these recoveries were 100%, 99.0%, 56.3%, 69.9%, and 32.3%, respectively. The recoveries \pm SD (%) from the bovine urine spiked with 0.1, 0.5, and 2.5 ng/ml of ZEN were 99.6 ± 9.7 , 106.2 ± 1.4 , and 107.9 ± 1.7 (n=3), respectively, in our immunoaffinity column-HPLC method.

Key words: Zearalenone, Monoclonal antibody, Bovine urine, Immunoaffinity column

緒 言

ゼアラレノン (zearalenone, ZEN, Fig.1) は, *Fusarium graminearum*などが産生するマイコトキシンで, 高頻

度に麦類やトウモロコシをはじめとする穀類や家畜飼料汚染が報告されている⁽¹⁾. ZENは致死性の急性毒性はそれほど強くないが, 女性ホルモン作用を有し, ZENの混入した飼料を摂取した家畜に過エストロゲン症を引き起

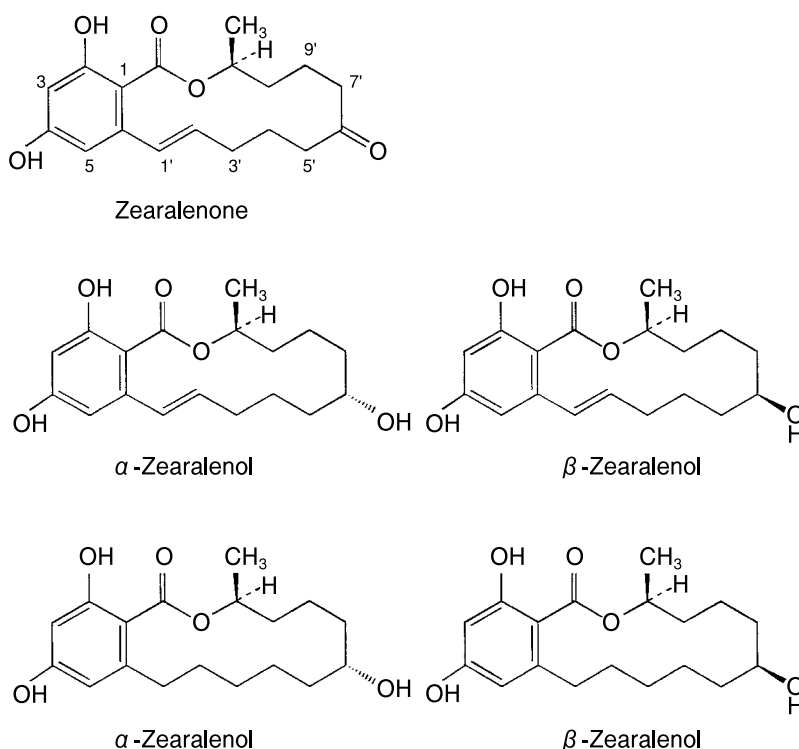


Fig.1 The structures of zearalenone and related compounds

こし、外陰部および乳房の腫れ、子宮肥大、卵巣の変化と不妊症などを引き起こすことが知られている⁽²⁻³⁾。そのため、家畜の繁殖障害の原因物質の1つと考えられている。そこで、本研究では、ZENの家畜の曝露量を明らかにすることを目的として、ZENに対するモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティーカラム(IAC)を製作し、ウシ尿中のZENの測定法の開発を行った。

材料および方法

材料

ZEN, α -ゼアラレノール (α -zearalenol, α -ZEL), β -ゼアラレノール (β -zearalenol, β -ZEL), β -ゼアララノール (β -zearalanol, β -ZAL) はSigma Chemical社製を, α -ゼアララノール (α -zearalanol, α -ZAL) は和光純薬社製を, アフィゲル10はBio-Rad社製を, hybridoma-SFMはインビトロジェン社製をそれぞれ用いた。HPLCの移動相は和光純薬社製のHPLC用試薬を, その他の試薬は特級又は同等品を用いた。ウシ尿は鹿児島大学農学部 高木光博博士より入手し, -20°C で凍結保存し, 使用時に解凍し実験に用いた。

抗ZEN抗体の大量生産

抗ZENモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(ZEN.2)⁽⁴⁾を, 無血清培地であるhybridoma-SFM培地(ベンジルペニシリン100 unit/ml, ストレプトマイシン100 $\mu\text{g/ml}$ を含む)に数日間かけて馴化した後, 大量培養(5.5L)を行った。培養上清を回収した後, 硫酸を40%飽和になるように加え, 4°C で16時間ゆっくりと攪拌し硫酸分画を行った。8,000 \times gで30分間遠心し, 抗体画分を得た。抗体は少量のダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解後, 1LのPBSに対して, 4回透析した。透析後, 280nmの吸光度から抗体濃度を算出し, SDS-PAGEを行い, 純度を確認した。

抗ZEN抗体とイムノアフィニティー担体との結合

精製した抗ZEN抗体とイムノアフィニティー担体(アフィゲル10)を添付されたプロトコールに従って結合させた。すなわち, アフィゲル10(10ml)をG3ガラスフィルター上に移し, 保存液を吸引ろ過後, 純水(10ml)で3回洗浄した。洗浄したアフィゲル10に10mlの精製抗ZEN抗体(39mg)を加え, 室温で2時間ゆっくり攪拌しながら反応させた。反応後, G3ガラスフィルター上に移し, 吸引ろ過を行った。アフィゲル10の未反応部位のブロッキングを行うために, 1Mエタノールアミン-塩酸緩衝液(pH 8.0)10mlを加え, 室温で1

時間ゆっくり攪拌しながら反応させた。反応後, G3ガラスフィルター上に移し, 吸引ろ過を行った後, 10mlのPBSで10回洗浄した。抗体を結合させたゲルは0.01% NaN_3 を含むPBSに懸濁し, 4°C で保存した。

IACの基本的特性

抗体を結合させたゲル0.3mlをプラスチック製のミニカラム(ムロマックカラムS, 室町化学工業)に詰め, 10mlのPBSを流し平衡化させたIACを用い, 以下の実験を行い, 基本的特性を調べた。

まず, ZENが0.5及び2.5 ng/mlになるように調製したPBSを10mlをIACに負荷し, 10mlのPBSで洗浄後, 3mlのメタノールで溶出した。溶出液は, 減圧乾固後, 250 μl のアセトニトリル-水(50+50)に再溶解し, この溶液50 μl を蛍光検出器付きHPLCで分析した。

次に, ZEN, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, または β -ZALが100 ng/mlになるように調製したPBSを10mlをIACに負荷し, 上記と同様に操作を行い, ZENの関連化合物との反応性を調べた。

HPLC

いずれも島津製作所製で, LC-10ADvpポンプ, SIL-10ADvpオートインジェクター, CTO-10ADvpカラムオーブン, RF-10ADXL蛍光検出器を使用した。カラムは, Cosmosil Packed Column 5 C18-AR-II(粒子径5 μm , 内径4.6mm, 長さ250mm)ナカライテスク(株)社製を用い, カラム温度は 40°C , 移動相はアセトニトリル-水(50+50), 蛍光検出器(励起波長274nm, 蛍光波長440nm), 注入量は50 μl で行った。なお, ガードカラムは使用しなかった。この条件で, ZEN標準品1~100 ng/mlの範囲で良好な直線の検量線を得た。

ウシ尿中のZENの測定法の検討

抗原抗体反応は一般的に生理的条件下で最も効率よく行われるが, ウシの尿は, 通常pH7.8~9.0と弱アルカリ性である。そこで, pHを7.2~7.5付近にするために, ウシ尿の1/10容量の0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を加えた。pHを補正したウシ尿にZENを2.5 ng/mlになるように加え, この溶液10mlをIACに負荷し, 洗浄液量を10, 15, および20mlと変化させ, 溶出以降の操作は, 上記と同様にし, IACでクリーンアップを行い, HPLC分析を行い, IACを用いたウシ尿中のZENの測定法について検討した。

添加回収実験

次に, pHを補正したウシ尿にZENを0.1, 0.5, また

は2.5 ng/mlになるように加えた溶液10 mlをIACに負荷し, 20 mlのPBSで洗浄後, 以下, 上記と同様に操作し, HPLC分析し, 添加回収実験を行った.

結果及び考察

抗ZEN抗体の大量生産

ZEN.2抗ZENモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの無血清培地hybridoma-SFM培地(5.5 L)の培養上清から, 硫酸分画後, 37 mg精製抗体を得た. また, この抗体溶液は, SDS-PAGEの結果, 抗体以外の主要なバンドは確認できずIAC作製に十分な精製度を有していた. この方法は, hybridoma-SFM培地の培養上清から1回の硫酸分画でほぼ精製された抗体が得られることから, 一般的に汎用されているマウス腹腔内でハイブリドーマを増殖させ, 腹水から抗体を回収する方法より, 精製操作が簡単で, 時間とコストの面で優れていた.

IACの特異性

まず, IACに0.5及び2.5 ng/mlになるように調製したPBS溶液を負荷し, IACに結合, 溶出し, 減圧乾固後, 250 μ lのアセトニトリル-水(50+50)に再溶解し, HPLC分析を行った結果, それぞれの濃度におけるZENの回収率は, 109.3%と100.8%でほぼ良好であった.そこで, 本IACのZEN関連化合物との反応性を確認するために, ZEN関連化合物100 ng/mlになるように調製したPBS溶液を負荷し, IACを行った. その結果(Table 1), ZENの回収率を100%とした場合, α -ZELは99.0%, β -ZELは56.3%, α -ZALは69.9%, および β -ZALは32.3%であった. 競合的間接ELISAでの交差反応性と比較すると, 反応する順序は同じであるが, IACでは, 全体に反応性は高くなっており, 同時に存在する可能性の高いZEN関連化合物を幅広く結合させることができる. 特に α -ZEL

Table 1. Cross-reactivity of zearalenone analogues in immunoaffinity column-HPLC methods and the indirect competitive ELISA with ZEN.2 antibody.

Analogue	Cross-reactivity (%)	
	Immunoaffinity-HPLC methods	The indirect competitive ELISA
Zearalenone	100.0	100.0
α -Zearalenol	99.0	60.0
β -Zearalenol	56.3	5.7
α -Zearalanol	69.9	7.1
β -Zearalanol	32.3	0.9

はZENとほぼ同様に反応することから, 本IACを用いて, ZENと α -ZELの同時検出が可能であった.

ウシ尿中のZENの測定法の検討

抗原抗体反応は一般的に生理的条件下で最も効率よく行われるが, ウシの尿は, 通常pH7.8~9.0と弱アルカリ性である. そこで, pHを7.2~7.5付近にするために, ウシ尿に加える様々な緩衝液を検討した. その結果, 1/10容量の0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を加えるとpH 7.5になることがわかった. pHを補正したウシ尿にZENを2.5 ng/mlになるように加え, この溶液10 mlをIACに負荷し, 10 mlのPBSで洗浄し, 3 mlのメタノールで溶出し, 減圧乾固後, 225 μ lのアセトニトリル-水(50+50)に再溶解し, HPLC分析を行った. その結果(Fig. 2 B), 6分から20分付近まで大きな夾雑物のピークが出現し, 11.5分付近のZENのピークと重なった. そこで, 洗浄液の量を増やし, 夾雑物のピークの除去が可能か検討した. その結果, 洗浄液15 mlでは, かなりクロマトグラムは改善されたが, まだ十分ではなかった(Fig. 2 C). しかし, 洗浄液20 mlでは, ほぼ夾雑物のピークはなくなり, ZENのピークと重なりは認められなかった(Fig. 2 D).

そこで, この条件でウシ尿中のZEN測定は可能と判断し, 添加回収実験を行った. その結果(Table 2), 添加濃度0.1, 0.5, および2.5 ng/mlでの回収率 \pm SDは, それぞれ, 99.6 \pm 9.7, 106.2 \pm 1.4, および107.9 \pm 1.7 (n=3)で, 変動係数(CV, %)は, それぞれ, 9.7, 1.3, および1.6であり, 0.1 ng/ml添加群で若干のバラツキが認められるが, 良好な値であった. 以上の結果から, 本IAC-HPLC法は, 0.1 ng/mlまでのウシ尿中のZENの測定が可能であり, ウシのZEN曝露量測定のための手法として有効な手段となりうると期待できる.

しかしながら, 経口摂取されたZENは, ウシでは, 約1/2が尿中に排泄されるが, その約70%がグルクロン酸抱合体として, 約15%が硫酸抱合体として, 尿中に排泄され, ZEN未抱合体の排泄量は10-15%にしか過ぎない⁽⁵⁾. よって, より正確にZENの排泄量を把握するためには, 今後, 本IACへのZENのグルクロン酸抱合体や硫

Table 2. Recoveries of zearalenone from bovine urine by immunoaffinity column-HPLC methods with ZEN.2 antibody.

Zearalenone added (ng/ml)	Recovery \pm SD (%)	CV (%)
0.1	99.6 \pm 9.7	9.7
0.5	106.2 \pm 1.4	1.3
2.5	107.9 \pm 1.7	1.6

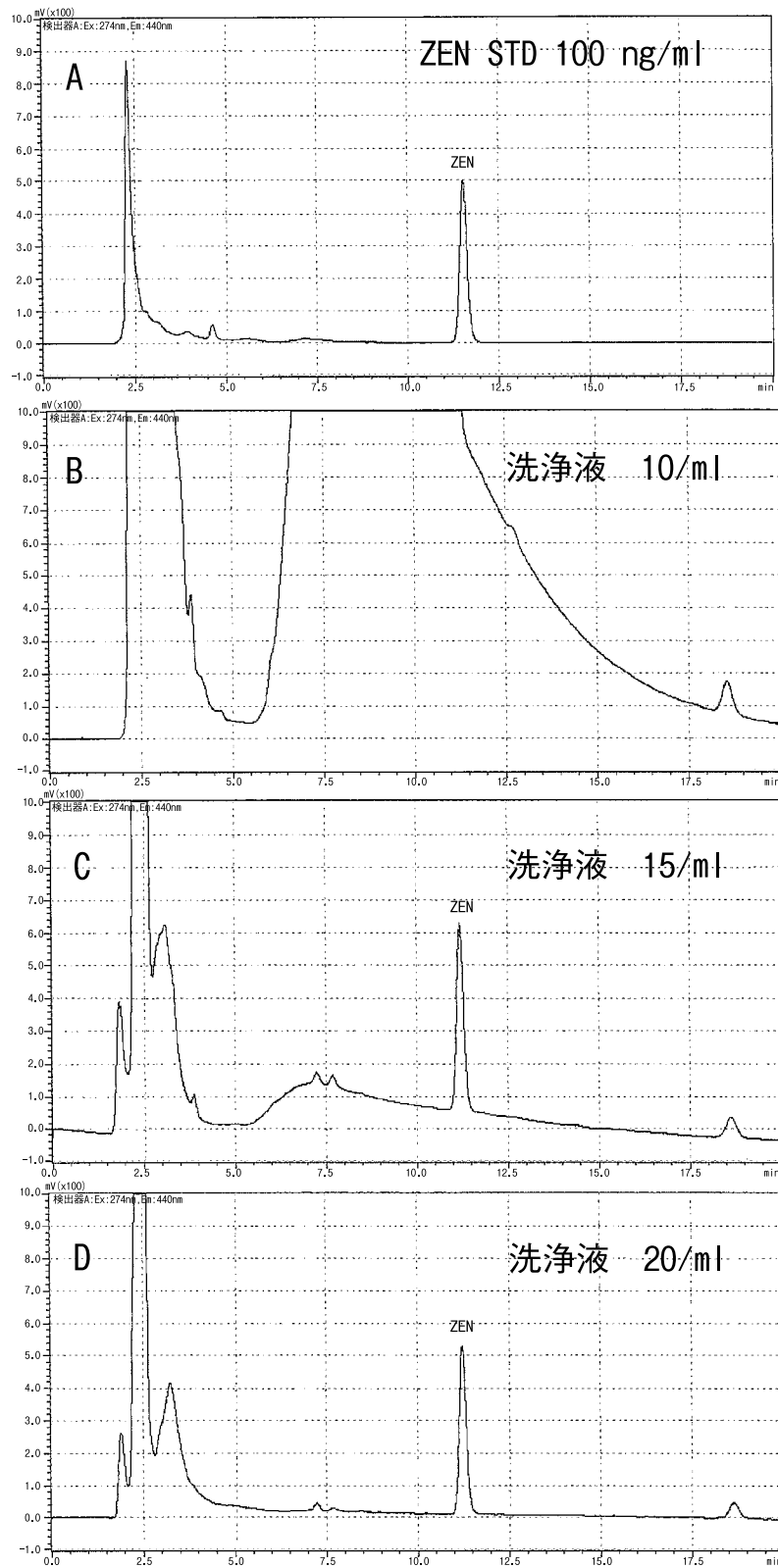


Fig.2 The HPLC chromatograms of the eluate purified by immunoaffinity column from bovine urine spiked with zearalenone (2.5 ng/ml)
(A) Standard zearalenone (100 ng/ml) , (B) Washing with 10 ml of PBS, (C) 15 ml of PBS, and (D) 20 ml of PBS.

酸抱合体の結合の有無や β -グルコシダーゼとサルファターゼで処理し、抱合体をはずした後に、ZENを測定する方法の検討を行う必要がある。

要 約

抗ZENモノクローナル抗体 (ZEN.2) を結合したイムノアフィニティーカラム (IAC) を作製し、ウシ尿中のゼアラレノン (ZEN) の測定法の開発を行った。作製したIACは、100 ng/mlのZENと α -ゼアラレノールとほぼ

100%結合し、 β -ゼアラレノール、 α -ゼアララノール、および β -ゼアララノールとそれぞれ56.3%, 69.9%, および32.3%の交差反応性を示した。確立したIAC-HPLC法で添加回収実験を行った結果、0.1, 0.5, および2.5 ng/mlとなるようにZENを添加した、ウシ尿からの回収率 \pm SDは、それぞれ、 99.6 ± 9.7 , 106.2 ± 1.4 , および 107.9 ± 1.7 (n=3) で、変動係数 (CV, %) は、それぞれ、9.7, 1.3, および1.6であり、0.1 ng/ml添加群で若干のパラッキが認められるが、良好な値であった。

引 用 文 献

- (1) PLACINTA, C. M., D' MELLO, J. P. F., and MACDONALD, A. M. C. : A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci. and Technol.*, **78**, 21-37 (1999).
- (2) D' MELLO, J. P. F., PLACINTA, C. M., and MACDONALD, A. M. C. : *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Sci. and Technol.*, **80**, 183-205 (1999).
- (3) CONKOVA, E., LAČLAKOVA, A., KOVAC, G., and SEIDEL, H. : Fusarialtoxins and their role in animal diseases. *The Veterinary J.*, **165**, 214-220 (2003).
- (4) 川村 理, 江本知郎 : ゼアラレノンに対するモノクローナル抗体の作製, *香川大学農学部学術報告* **58**, 7-12 (2006).
- (5) MIROCHA, C.J., PATHRE, S.V., and ROBISON T.S.: Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **19**, 25-30 (1980).

(2006年10月31日受理)