

イムノアフィニティーカラム-HPLC法によるウシ飼料中ゼアラレノンの測定

江本知朗, 高木光博*, 川村 理

DETERMINATION OF ZEARALENONE IN BOVINE FEEDS BY AN IMMUNOAFFINITY COLUMN-HPLC METHODS

Akio EMOTO, Mitsuhiro TAKAGI* and Osamu KAWAMURA

Abstract

In order to establish an immunoaffinity column-HPLC method for zearalenone (ZEN) in bovine feeds, we experimented. Spiked ZEN and α -zearalenol (ZEL) were extracted with acetonitrile:water (84+16) from bermuda grass and oat hay (sample/solvent ratio =1/10), and mixed feed for the fattening period (sample/solvent ratio =1/4), and were extracted with methanol:water (70+30) from mixed feed for the raising period (sample/solvent ratio =1/4). These extracts were diluted and cleaned-up by the IAC. These recoveries of ZEN and α -ZEL from the feeds were 84.4~98.1% and RSD were 1.4~5.1%. We tested that how many times our IAC can be used for clean-up. The results were that the IAC could be used more than 10 times in bermuda grass and 3 times in the mixed feed for the raising period.

Key words: Zearalenone, α -Zearalenol, Monoclonal antibody, Bovine feeds, 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. しかし, ウシ用飼料のうち牧草などの粗飼料の分析法の報告はほとんど無い. そこで, 本研究では, 牧草などの粗飼料のZEN分析法を確立することを目的として, 既に作製済みのZENに対するモノクローナル抗体を結合させたイムノアフィニティーカラム (IAC)⁽⁴⁾を用い, ウシ用飼料中のZENと α -ゼアラレノール (α -zearalenol, α -ZEL)の測定法について検討した.

材料および方法

材料

ZENと α -ZELはSigma Chemical社製を用いた. 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. ウシ飼料は, 粗飼料としてはバミューダグラスとオーツヘイを濃厚飼料としては育成期用配合飼料と肥育期用配合飼料をそれぞれ用いた. ウシ飼料は粉碎後, 4℃で保存し, 実験に用いた.

ウシ飼料からの抽出

粉碎した粗飼料 (バミューダグラスとオーツヘイ) 5 gを110 mL容のガラス製サンプル瓶に秤取り, アセトニトリル:水 (84+16 v/v)を50 mL加え, 15分間超音波処理を行った後, 30分間約200回/分の速度で振盪抽出した. 抽出液をろ紙 (ADVANTEC No. 2, 125 mm)でろ過した. 抽出液は, 0.01Mリン酸緩衝生理食塩水pH 7.2 (PBS)で20倍希釈し, ガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC GA-55)で濾過後, IACに負荷した.

肥育期用配合飼料の場合は, 粉碎した飼料12.5 gにアセトニトリル:水 (84+16 v/v)を50 mL加え, 粗飼料と同様に抽出, ろ過を行った後, 抽出液をPBSで10倍希

積し、ガラス繊維ろ紙 (ADVANTEC GA-55) で濾過後、IACに負荷した。

育成期用配合飼料の場合は、粉碎した飼料12.5 gを110 mL容のガラス製サンプル瓶に秤取り、メタノール：水 (70+30 v/v) を50 ml加え、以下肥育期用配合飼料と同様に抽出、希釈、ろ過後、IACに負荷した。

IACでのクリーンナップ

抗体とゲルの結合は川村と江本⁽⁴⁾と同様にして行った。抗体を結合させたゲル0.3 ml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) に詰め作製したIACに10 mlのPBSを流速約1 ml/分で流し、平衡化させた後、10 mlの抽出希釈液を負荷した。次に10 mlのPBSで洗浄後、3 mlのメタノールで溶出した。溶出液は、減圧乾固後、250 μ lのアセトニトリル-水 (40+60) に再溶解し、この溶液25 μ lを蛍光HPLCで分析した。使用後のIACは、さらに5 mlのメタノールでIACを洗浄した後、10 mlのPBSで平衡化させた後、0.1% NaN₃を含むPBSに置換して4°Cで保存した。

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カラムオープン、RF-10ADXL蛍光検出器を使用した。カラムは、粗飼料 (バミューダグラスとオーツヘイ) と肥育期用配合飼料では、Cosmosil Packed Column 5C18-AR-II (粒子径5 μ m, 内径4.6mm, 長さ250 mm) ナカライテスク (株) 社製を用い、育成期用配合飼料では、Capcell Pak C₈DD (粒子径5 μ m, 内径4.6mm, 長さ250 mm) 資生堂 (株) 製を用いた。カラム温度は40°C, 移動相はアセトニトリル-水 (40+60 v/v), 蛍光波長は、励起波長274 nm, 蛍光波長440 nm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と α -ZELの標準品1~100 ng/mlの範囲で良好な直線の検量線を得た。

添加回収実験

各粗飼料5 g又は濃厚飼料12.5 gを110 mL容のガラス製スクリー管瓶に秤取り、これにZENと α -ZELの濃度がそれぞれ100, 500および2,500 μ g/kgになるように調整したメタノール溶液を各100 μ Lを添加した。添加後、口をキムワイプで覆い、遮光してドラフト内で一晚 (12~16時間) 静置し、メタノールを蒸発させた後、抽出、クリーンナップを行ったのち、HPLCで定量した。

IACの再使用回数の検討

IACの再使用回数を検討するために、3 mlのメタノー

ールで溶出した後、さらに5 mlのメタノールでIACを洗浄し、10 mlのPBSを流し平衡化させた後、10 mlの抽出希釈液を負荷し、PBSで洗浄後、3 mlのメタノールで溶出した。この操作を10回繰り返して、溶出液中のZENと α -ZELの濃度を測定することで評価した。

結果及び考察

添加回収実験

粗飼料 (バミューダグラスとオーツヘイ) の場合は、多機能カラムを用いる方法⁽⁵⁾の抽出法を適用したが、試料と抽出溶媒比1:4では、すべての抽出溶媒を粗飼料が吸収し、抽出液をほとんど回収できなかった。粗飼料と抽出溶媒比1:10で行ない、その抽出液をPBSで20倍希釈し、IACでクリーンナップを行い、溶出液を減圧乾固後、再溶解しHPLCを行った。その結果、ZENと α -ZEL未添加試料のクロマトグラムでは、いずれもZENと α -ZELのリテンションタイム付近には、妨害ピークは認められなかった (Fig. 1 BとD) が、オーツヘイでは、 α -ZEL 13.2 ng/gの自然汚染が確認された。そこで、添加回数実験を行った結果 (Table 1), ZENと α -ZELをそれぞれ、100, 500および2,500 ng/g添加した場合の回収率は、ZENで83.3~92.5%, α -ZELで86.6~98.2%であり、RSDは、いずれも場合も4%以下であり、ほぼ良好であった。また、粗飼料 (バミューダグラスとオーツヘイ) でのZENと α -ZELの検出限界 (S/N>3) は共に10 ng/gであり、定量限界 (S/N>10) は共に50 ng/gであった。

濃厚飼料のうち肥育期用配合飼料の場合は、多機能カラムを用いる方法⁽⁵⁾の抽出法をそのまま適用した。ZENと α -ZEL未添加試料のクロマトグラムでは、いずれもZENと α -ZELのリテンションタイム付近には、妨害ピークは認められなかった (Fig. 1 F) が、定量限界以下であったが、ZEN 2.4と α -ZEL 4.4 ng/gの自然汚染を確認した。添加回収の結果 (Table 1), ZENと α -ZELの回収率は、それぞれ、85.6~92.5%と85.2~95.2%でRSDは、いずれも場合も6%以下であり、ほぼ良好であった。肥育期用配合飼料でのZENと α -ZELの検出限界 (S/N>3) は2 ng/gであり、定量限界 (S/N>10) は10 ng/gであった。

濃厚飼料のうち育成期用配合飼料の場合は、肥育期用配合飼料と同様の方法で分析した場合、夾雑物のピークとZENと α -ZELのピークが重なったので、抽出溶媒とHPLCの条件の検討を行った。その結果、メタノール：水 (70+30 v/v) で抽出を行い、HPLCカラムをCapcell Pak C₈DD (粒子径5 μ m, 内径4.6mm, 長さ250 mm)

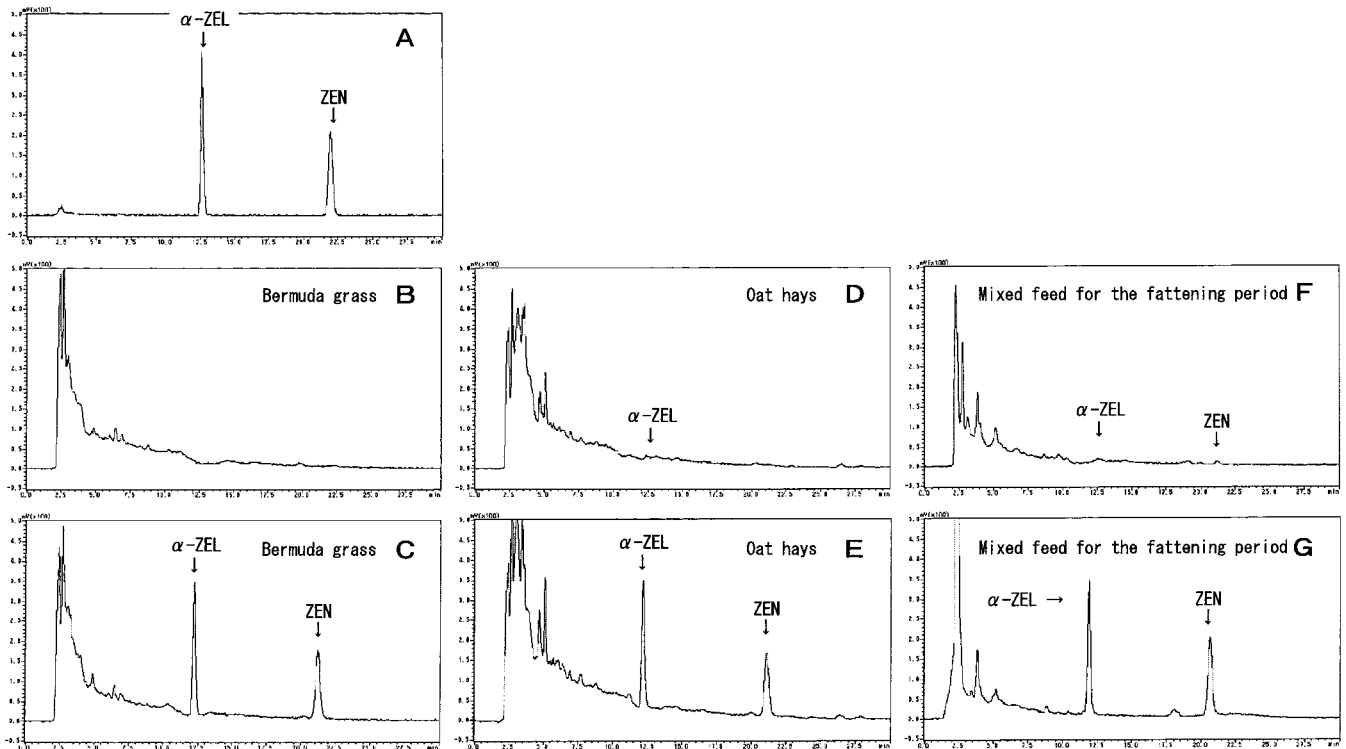


Fig. 1 The HPLC chromatograms of the eluate purified by immunoaffinity column from bermuda grass, oat hay and mixed feed for the fattening period.
 (A) Standard zearalenone (100 ng/ml), (B) bermuda grass, (C) bermuda grass spiked with zearalenone and α -zearelenol (each 500 ng/g), (D) oat hay, (E) oat hay spiked with zearalenone and α -zearelenol (each 500 ng/g), (F) mixed feed for the fattened period, and (G) mixed feed for the fattening period spiked with zearalenone and α -zearelenol (each 100 ng/g).

Table 1 Recoveries of zearalenone and α -zearelenol from bovine feeds by immunoaffinity column-HPLC methods (n=3).

Bovine feeds	Zearalenone and α -zearelenol added (ng/g)	Zearalenone			α -Zearelenol		
		Fond \pm SD (ng/g)	Recovery \pm SD (%)	RSD (%)	Fond \pm SD (ng/g)	Recovery \pm SD (%)	RSD (%)
Bermuda grass	0	ND*			ND		
	100	88.5 \pm 1.6	88.5 \pm 1.6	1.8	86.6 \pm 2.5	86.6 \pm 2.5	2.9
	500	462.4 \pm 14.3	92.5 \pm 2.9	3.1	471.2 \pm 11.6	94.2 \pm 2.3	2.5
	2,500	2220.4 \pm 46.2	88.8 \pm 1.8	2.1	2351.2 \pm 38.4	94.0 \pm 1.5	1.6
Oat hay	0	ND			13.2 \pm 3.8		28.7
	100	84.4 \pm 1.4	84.4 \pm 1.4	1.6	111.4 \pm 2.8	98.2 \pm 2.8	2.9
	500	426.1 \pm 6.0	85.2 \pm 1.2	1.4	468.6 \pm 2.1	91.1 \pm 0.4	0.5
	2,500	2081.4 \pm 69.6	83.3 \pm 2.8	3.3	2261.6 \pm 64.4	89.9 \pm 2.6	2.9
Mixed feed for the fattening period	0	2.4 \pm 0.9		38.0	4.4 \pm 1.2		26.5
	100	88.0 \pm 4.1	85.6 \pm 4.1	4.8	95.9 \pm 4.1	91.6 \pm 4.1	4.5
	500	464.8 \pm 6.6	92.5 \pm 1.3	1.4	480.2 \pm 14.8	95.2 \pm 3.0	3.1
	2,500	2361.1 \pm 111.4	89.9 \pm 4.5	5.0	2343.2 \pm 107.4	85.2 \pm 4.3	5.1
Mixed feed for the raising period	0	ND		8.9	ND		
	100	96.3 \pm 3.3	92.1 \pm 3.3	3.6	95.3 \pm 3.4	95.3 \pm 3.4	3.6
	500	433.0 \pm 12.6	85.8 \pm 2.5	2.9	440.8 \pm 2.7	88.2 \pm 0.5	0.6
	2,500	2399.8 \pm 107.2	95.8 \pm 4.3	4.5	2453.3 \pm 55.7	98.1 \pm 2.2	2.3

ND* ; Not detected

資生堂(株)を用いることで、ほぼ満足できるクロマトグラムを得た(Fig. 2)。添加回収の結果、ZENと α -ZELの回収率は、それぞれ、85.8~95.8%と88.2~98.1%でRSDは、いずれも場合も4%以下であり、ほぼ良好であった(Table 1)。育成期用配合飼料でのZENと α -ZELの検出限界(S/N>3)は、それぞれ50と30 ng/gであり、定量限界(S/N>10)はそれぞれ150と100 ng/g他の検体より、やや大きい値であった。飼料中のZENの暫定基準値1,000 ng/gの約1/10まで定量可能なので、飼料中の測定に使用できる方法である。

IACの再使用回数の検討

IACの再使用ができれば、分析コストの低減ができ

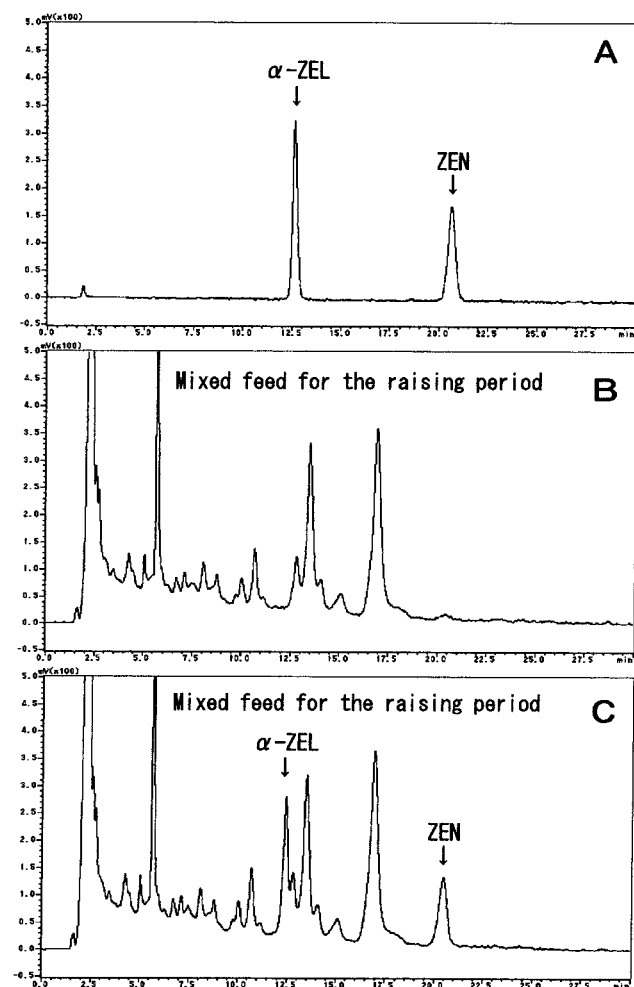


Fig. 2 The HPLC chromatograms of the eluate purified by immunoaffinity column from mixed feed for the raising period.

(A) Standard zearalenone and α -zearelenol (each 100 ng/ml), (B) mixed feed for the raising period, and (C) mixed feed for the raising period spiked with zearalenone and α -zearelenol (each 100 ng/g).

る、そこで、各試料を何回まで連続しようできるかについて検討した。粗飼料の場合はバミューダグラスについて、濃厚飼料の場合は育成期用配合飼料について、10回までの連続再使用回数し、回収率とクロマトグラムの変化を調べた。バミューダグラスの場合は、500 ng/g添加した試料を連続IACでクリンナップを行ったが、10回目までZENと α -ZELの回収率はともにほぼ一定であり、また、連続再使用10回目のクロマトグラムは、1回目とほぼ同様であった(Fig. 3 AとB)。このことから少なくとも10回までは、粗飼料中のZENと α -ZELの測定に本IACは使用可能と考えられた。育成期用配合飼料の場合は、ZENは10回目まで80%以上の回収率が維持されたが、 α -ZELでは、4回目以降、回収率は80%以下であった(Fig. 4 A)。また、連続使用10回目のクロマトグラム(Fig. 4 B)では、全体に夾雑物ピークが大きくなり、特に12分付近の α -ZELのピークと夾雑物ピークは重なっていた。以上のことから、育成期用配合飼料の場合は、ZENと α -ZELの同時測定の場合は、3回以内まで、ZENのみの測定の場合は10回目で連続使用が可能であると考えられた。以上の結果から、本IAC-HPLC法は、50~150 ng/gまでのウシ飼料中のZENと α -ZELの測

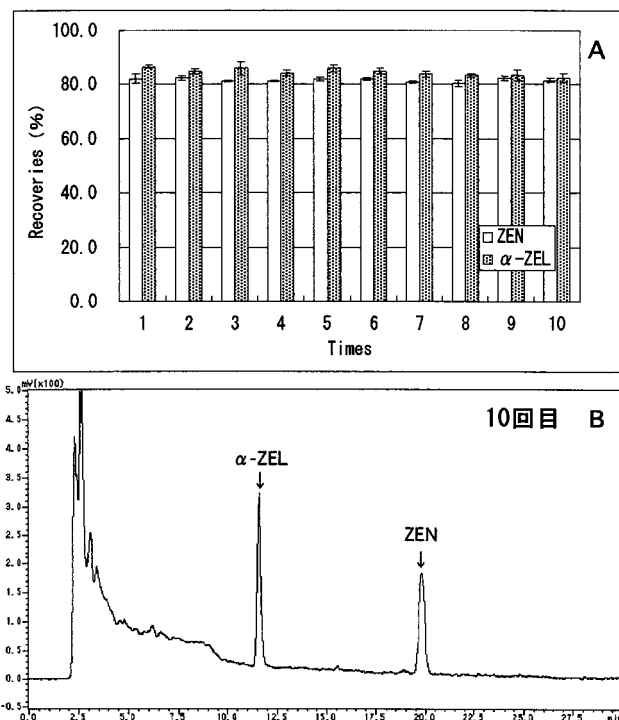


Fig. 3 Recoveries of zearalenone and α -zearelenol from bermuda grass spiked with zearalenone and α -zearelenol (each 500 ng/g) by immunoaffinity column-HPLC methods, when the same immunoaffinity column was repeatedly used (A), and the HPLC chromatogram of 10 times repeatedly used (B).

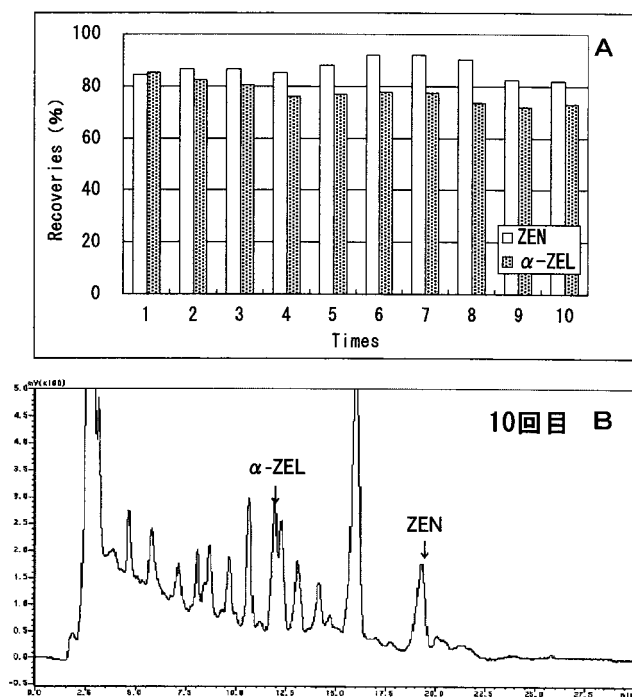


Fig. 4 Recoveries of zearalenone and α -zearalenol from mixed feed for the raising period spiked with zearalenone and α -zearalenol (each 100 ng/g) by immunoaffinity column-HPLC methods, when the same immunoaffinity column was repeatedly used (A) and the HPLC chromatogram of 10 times repeatedly used (B).

定が可能であり、操作も簡便で、再使用が可能なこと、毒性の強い有機溶媒も使用しないので、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。

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) を用いたウシ飼料中のゼアラレノン (ZEN) の測定法の開発を行った。諸条件を検討した結果、粗飼料 (バミューダグラスとオーツヘイ) では、試料と抽出溶媒比 1 : 10 で、肥育期用配合飼料は、試料と抽出溶媒比 1 : 4 でアセトニトリル : 水 (84 + 16 v/v) で、育成期用配合飼料の場合は、試料と抽出溶媒比 1 : 4 でメタノール : 水 (70 + 30 v/v) で抽出を行った後、抽出液を希釈後、IAC でクリーンアップを行い、蛍光HPLCで定量した。100, 500 および 2,500 ng/g のZENと α -ゼアラレノールを添加し回収実験を行った結果、バミューダグラス、オーツヘイ、肥育期用配合飼料及び育成期用配合飼料での回収率は、83.3~98.2%でRSDは1.4~5.1%でほぼ良好であった。また、IACの連続再使用について検討した結果、バミューダグラスでは10回以上、育成期用配合飼料で3回までの再使用が可能であることを確認した。

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, 江本知朗 : 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, 香川大学農学部学術報告 **59**, 93-97 (2007).
- (5) ゼアラレノン試験法 (参考法), 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 理化学編 2005, pp595-598, 財団法人食品衛生協会 (2005).

(2007年10月31日受理)