

イムノアフィニティーカラム-HPLC法によるウシ尿中ゼアラレノン類とその抱合体の検出法の検討

川村 理, 木下 幸恵, 高木光博*

DETERMINATION OF ZEARALENONES AND THESE CONJUGATES IN BOVINE URINE BY AN IMMUNOAFFINITY COLUMN-HPLC METHODS

Osamu KAWAMURA, Yuki KINOSHITA, and Mitsuhiro TAKAGI*

Abstract

In order to establish an immunoaffinity column (IAC) -HPLC method for zearalenone (ZEN), α -zearalenol (α -ZEL) and these conjugates in bovine urine, we experimented. Glucuronidase and arylsulfatase were added to bovine urine samples. Free ZEN and α -ZEL from these conjugates were cleaned up by the modified IAC methods. After enzyme reaction, a lot of substances, which were interfered with HPLC analysis, were appeared. We modified the IAC methods at the washing step. When PBS containing 30% methanol was used as washing solution, those interfered substances were removed from the enzyme reacted solution. These recoveries of free ZEN and α -ZEL from the urine spiked at 0.4, 1.0, and 2.5 ng/mL of each toxin were 80.8~87.7% and RSD were 2.1~20.4%. The limits of detection (S/N > 10) were 0.49 and 0.31 ng/mL of free ZEN and α -ZEL in bovine urine samples, respectively.

Key words : Zearalenone, α -Zearalenol, glucuronidation, Conjugation of zearalenones, 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. 以前, 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) を作製し, ウシ尿中のZENの測定法の開発を行ったが, 実験に用いたウシ尿中には, 遊離したZENはほとんど存在して

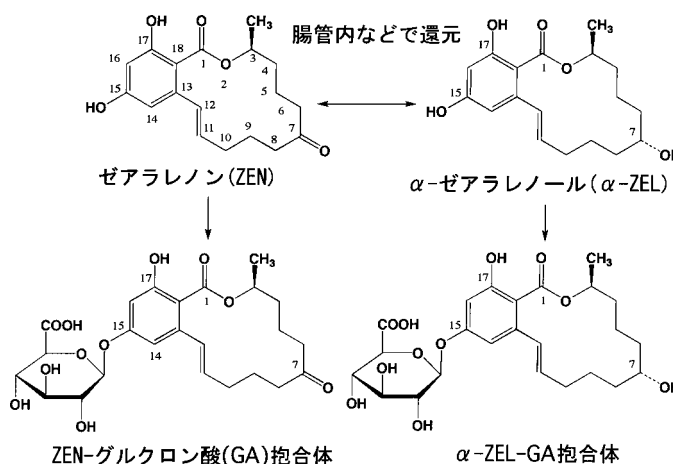


Fig. 1 ゼアラレノン, α -ゼアラレノールとこれらのグルクロン酸抱合体の構造式

* 鹿児島大学農学部 890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元1-21-24

Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Koorimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065

いなかった⁽⁴⁾。ZENはウシ尿中では、グルクロン酸抱合体または硫酸抱合体で存在していることが報告されており⁽⁵⁾ (Fig.1), 本研究では、ウシ尿中のZENと α -ゼアラレノール (α -zearalenol, α -ZEL) 及びそれらの抱合体を検出するために、ウシ尿に脱抱合体酵素 (Glucuronidaseとarylsulfataseの混合液) を加え反応させて脱抱合体し、遊離したZENと α -ZELをIACでクリーンアップ後、HPLCで測定する方法の検討を行った。

材料および方法

材 料

ZENと α -ZELはSigma Chemical社製をGlucuronidaseとarylsulfataseとの混合液はメルク社製をそれぞれ用いた。ZEN.2抗体結合IACは川村と江本の方法⁽⁴⁾に従って作製した。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。ウシ尿は鹿児島県内で採集し、速やかに -18°C で凍結保存したものを用いた。

脱抱合体化反応とクリーンアップ

解凍したウシ尿10 mLに0.1 M酢酸緩衝液 (pH 4.2) を1 mL加え、pH 5.5に調整した。この溶液にGlucuronidaseとarylsulfataseとの混合液を100 μL 加え、 37°C で20時間反応させ、脱抱合体を行った。反応液に1 M Na_2HPO_4 を650 μL 加え、pHを7.2~7.4に調整した。また、添加回収実験では、この溶液に2.5 ng/mLになるようにZENと α -ZELを添加した。pH調整した溶液をADVANTEC GA-55でろ過し、ZEN.2抗体結合IACに10 mLを負荷した。IACはPBS 20 mLで洗浄後、メタノール3 mLで溶出し、減圧乾固後、250 μL の $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50, v/v) に再溶解し、20 μL を川村と江本の方法⁽⁴⁾でHPLC分析をした。

HPLCカラムと移動相の検討

上記の方法で、ウシ尿の脱抱合体反応させた溶液をHPLCで測定したが、ZENと α -ZELのピークと重なる夾雑物ピークが存在したので、HPLCカラムと移動相の検討を行った。カラムサイズは、いずれも4.6 mm \times 250 mmのもので、ナカライテクス社のCOSMOSIL C_{18} AR IIとCholester、及び資生堂社製のCAPCELL PAK C_{18} MGと C_8 DDの4種のカラムを用いた。移動相は、 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50, v/v), (45:55), (40:60)と $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (40:58:2) 及び $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (40:10:60) について検討した。

IACでのクリーンアップの洗浄液の検討

HPLCカラムと移動相の検討した結果、COSMOSIL Cholesterカラムと $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (40:10:60) を移動層に用いる組み合わせが良好であったが、尿サンプルによっては、 α -ZELのピークと重なる夾雑物ピークが存在する場合があったので、IACでのクリーンアップの洗浄液について検討した。洗浄液であるPBSにメタノールを0, 10, 20, 30, 40, 50% (v/v) 加えたときのZENと α -ZELの回収率とクロマトグラムから最適洗浄液を決定した。

添加回収実験

pH調整前のウシ尿にZENと α -ZELをそれぞれ、0.4, 1.0と2.5 ng/mLとなるように添加 (n=3) して、上記の通り、脱抱合体反応、IACでのクリーンアップ (30%メタノール含むPBSで洗浄) 後、蛍光検出 (励起波長274 nm, 蛍光波長440 nm) HPLCで定量した。

結果及び考察

HPLCカラムと移動相の検討

以前、直接尿中のZENと α -ZELを測定した場合は、測定を妨害する夾雑物ピークは認められなかった⁽⁴⁾が、脱抱合体反応を 37°C で20時間行った場合は、かなり多くの夾雑物質が生成され、同一条件では測定が困難であった。そこで、HPLCカラムと移動相の検討を行った。まず、COSMOSIL C_{18} AR IIを用い、移動相の組成を変更したが、ZENは測定できても α -ZELと重なる夾雑物ピークとの分離は出来なかった。また、CAPCELL PAK C_{18} MGと C_8 DDカラムを用いたが、同様の結果であった。次に、COSMOSIL Cholesterカラムを用いた場合は、分離能に優れており、 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (40:60) を移動相として用いた場合、ZENとわずかに重なる夾雑物ピークがあるだけであった。そこで、最終的に $\text{CH}_3\text{CN}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (40:10:60) を移動層に用いることで、実験に用いていたウシ尿中のZENと α -ZELと重なる夾雑物ピークとの分離が可能であった。しかし、別の尿検体を用いた場合、 α -ZELと重なる夾雑物ピークが出現した。このことは、HPLCカラムと移動相の変更のみでは、ZENと α -ZELと重なる夾雑物ピークとの分離は困難であることを意味していた。そこで、次に、IACの洗浄液を変えることで、これらの夾雑物の除去の可能か否かを検討した。

IACでのクリーンアップの洗浄液の検討

ZENと α -ZELと重なるピークの夾雑物は、ZENや

α -ZELと同程度の脂溶性がある蛍光を持つ低分子で、これがIACに非特異的に吸着し、溶出に用いたメタノールで外れると考えられたので、クリーンアップの洗浄液にZENと α -ZELが溶出してこない限界までメタノールの含有量を上げれば、これらのIACに非特異的に吸着した夾雑物を洗い流せると仮定した。そこで、まず、洗浄液であるPBSにメタノールを0, 10, 20, 30, 40, 50% (v/v) 加えたときのZENと α -ZELの回収率の変化を調べた。Fig. 2にその結果を示した。ZENと α -ZEL共に、30%メタノールまでは十分にIACに保持され、回収率は90%台を維持していた。しかし、40%メタノールでは、 α -ZELがほぼすべてが、ZENの約40%がIACから溶出してしまった。また、この時のクロマトグラムをFig. 3に示した。メタノールを含まない洗浄液を用いたとき複数の夾雑物ピークは、10%メタノールではかなり減少し、20%メタノールではほぼ完全に消失した。30%メタノールでも20%メタノールの場合とほぼ同程度であった。以上の結果から、20%メタノールを含むPBSを洗浄液に用いることで、十分に夾雑物を除去できることが判明した。

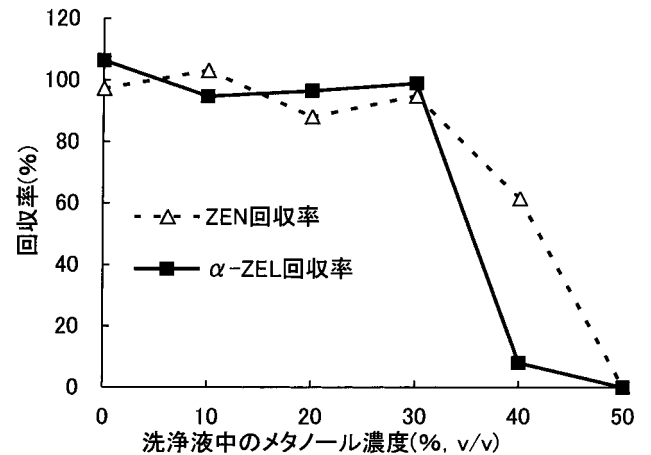


Fig. 2 イムノアフィニティーカラムの洗浄液のメタノール含有量を変えたときのZEN及び α -ZELの回収率
PBSにZENと α -ZELをそれぞれ2.5 ng/mLになるように添加した溶液を10 mLカラムに負荷し、メタノールを0から50% (v/v) 含むPBS 20 mLで洗浄した後、3 mLのメタノールで溶出後、HPLCで分析した。

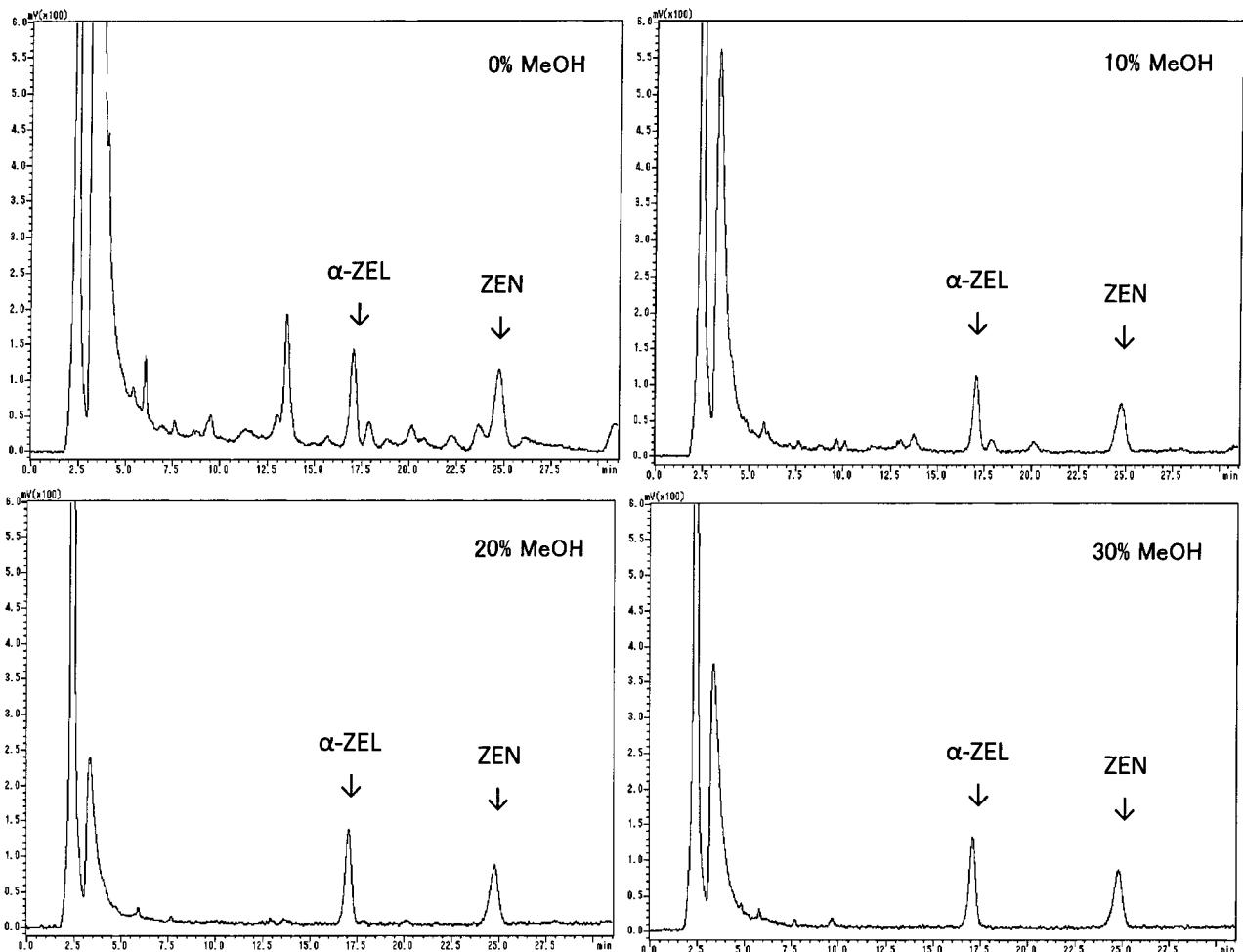


Fig. 3 イムノアフィニティーカラムの洗浄液のメタノール含有量を変えたときのクロマトグラムの比較

Table 1 ウシ尿へのZEN及び α -ZEL添加回収実験 (n=3)

ZEN及び α -ZEL 添加濃度 ng/mL	ZEN			α -ZEL		
	検出量 ng/mL	回収率 \pm SD (%)	RSD (%)	検出量 ng/mL	回収率 \pm SD (%)	RSD (%)
0.4	0.35	87.7 \pm 17.7	20.4	0.33	81.7 \pm 6.8	8.7
1.0	0.82	82.2 \pm 1.7	2.1	0.87	87.2 \pm 7.4	8.5
2.5	2.05	82.1 \pm 5.2	6.4	2.02	80.8 \pm 5.6	4.2

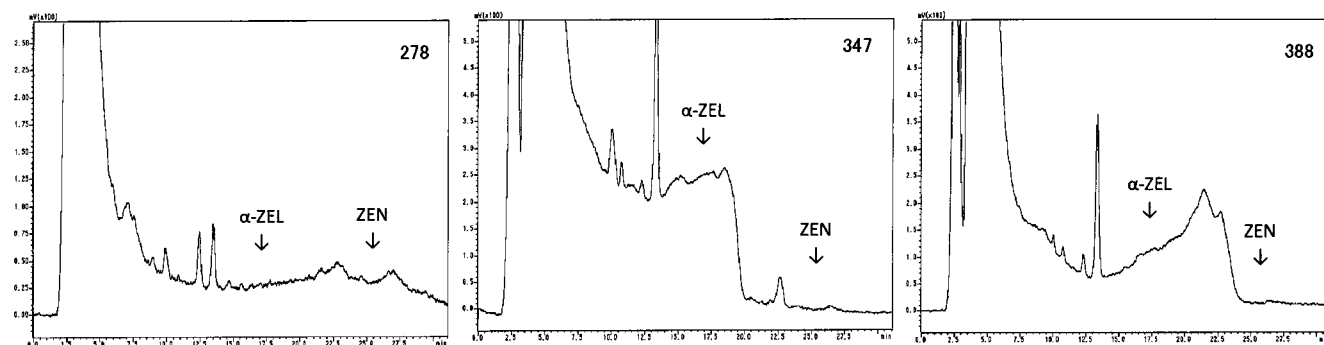


Fig. 4 本法で、分析不能であったウシ尿検体のクロマトグラム

しかし、30%メタノールを含むPBSを用いた場合もほぼ同様の結果であったので、夾雑物質を多く含む尿検体がある可能性も考慮して、30%メタノールを含むPBSを洗浄液に用いることとした。

添加回収実験

ZENや α -ZELのグルクロン酸および硫酸抱合体を入手できなかったため、pH調整前のウシ尿にZENと α -ZELをそれぞれ、0.4、1.0と2.5 ng/mLとなるように添加 (n=3) して、上記の通り、脱抱合体反応、IACでのクリーンアップ後、蛍光検出HPLCで定量することで、この測定系を評価した。その結果 (Table 1)、0.4 ng/mLを添加した場合のCV値はZENで20.4%とやや大きかったが、回収率は80.8~87.7%でCV値も10%以下であり、概ね良好な値であった。

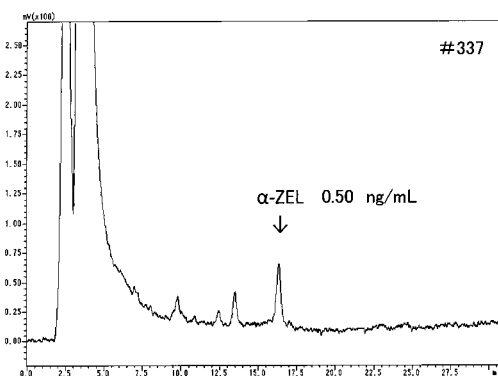
また、ZEN及び α -ZELを添加していないZENと α -ZELのピーク間 (15~28分) のノイズを測定し、ZENと α -ZELの検量線からS/N=3及びS/N=10となるZEN及び α -ZELのそれぞれの濃度を算出し、S/N=3となる濃度を検出限界、S/N=10となる濃度を定量限界とした。その結果、ZENの検出限界及び定量限界は、それぞれ0.090 ng/mL及び0.49 ng/mLであり、 α -ZELの検出限界及び定量限界は、それぞれ0.075 ng/mL及び0.31 ng/mLであった。

尿検体の分析

上記の方法で、研究室に保存してあった尿11検体の分

析を行った。その結果、そのうち3検体の尿では、蛍光HPLC分析を妨害する大きなピークが存在し (Fig. 4) 分析不能であった。これらの検体は、解凍時やpH調整時に比較的多くの沈殿物を生じる傾向があり、採尿時または保存状態に問題があった可能性が示唆され、今後検討しなくてはならない。残り8検体中1検体から0.50 ng/mLの α -ZELを検出した (Fig. 5) が、他の7検体はいずれも陰性であった。

本法は、比較的微量のウシ尿中ZENと α -ZEL及びそれらの抱合体を検出可能な方法を確立した。しかしながら、ウシ尿検体によっては、夾雑物が多く分析不能になるケースがあるので、今後、どのような検体でこのようなことが起こるのか、採尿時または保存状態について、検討を行う必要がある。

Fig. 5 α -ZELが0.50 ng/mL検出された#337の尿のクロマトグラム

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) を用いたウシ尿中のゼアラレノン (ZEN) と α -ゼアラレノール (α -ZEL) 及びそれらの抱合体を検出するために、ウシ尿に脱抱合体酵素 (Glucuronidaseとarylsulfataseの混合液) を加え反応させて脱抱合化し、遊離したZENと α -ZELをIACでクリーンアップ後、HPLCで測定する方法の検討を行った。ウシ尿に脱抱合体酵素で反応させると分析を妨害する夾雑物質を生じたので、HPLCカラムと移動相の検討とIACでのクリーンアップの洗浄液の検討した。その結果、COSMOSIL Cholesterカラムと $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (40:60) を移動相として用い、30%メタノールを含むPBSでIACを洗浄することで、良好な結果を得た。本法で、遊離したZENと α -ZELをそれぞれ0.49と0.31 ng/mLまでの定量が可能であった。また、ウシ尿11検体を本法で分析した結果、3検体の尿では、蛍光HPLC分析を妨害する大きなピークが存在し分析不能であったが、8検体は良好なクロマトグラムであり、うち検体から0.50 ng/mLの α -ZELを検出した。

引 用 文 献

- (1) PLACINTA, C. M., D' MELLO, J. P. F., and MACDONLD, 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., LACLAKOVA, A., KOVAC, G., and SEIDEL, H. : Fusarial toxins 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) MIROCHA, C.J., PATHRE, S.V., and ROBISON, T.S. : Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food and Cosmetics Toxicology*, **19**, 25-30 (1981) .

(2009年10月31日受理)