

ELISA 法による生乳中のモネンシン残留試験法の検討

1. 目的

モネンシンは、*Streptomyces cinnamonensis* が産生するポリエーテル系のイオノフォア抗生物質であり、一般にナトリウム塩として使用される。

海外では家きん（鶏、七面鳥及びうずら）や反すう動物（牛、羊及び山羊）のкокシジウム症の治療、牛のケトーシスや鼓脹症の管理に使用される。牛及び羊の成長促進を目的とした飼料添加物としても使用される。国内では、モネンシンナトリウムが飼料添加物として指定されており、牛、鶏及びうずらに使用されている。

ポジティブリスト制度（PL）における乳のモネンシン残留基準値は 2ppb であり、公定法としては液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）法が用いられる。本法は、残留基準値レベルの濃度まで正確に測定可能であるが、検査に対応できる試験所は限られており、道内に民間機関は存在しない。また、結果が得られるまでに通常、数日間を要するため、現場においては不測の事態に対応可能な迅速な検査体制が求められている。そこで、高額な装置を必要とせず短時間に結果を得ることができる市販の ELISA キットによる生乳の残留検査法を検討したので報告する。

2. 方法

(1) 使用キット

- 1) キット名：MaxSignal モネンシン ELISA テストキット（BIOO Scientific inc. 米国）
- 2) 測定原理：ELISA（競合）法
- 3) 検出限界：飼料・鶏肉 6～60ppb ※1)

※1) ELISA キットの検出限界値は 0.2ppb であるが、試料調製時における希釈効果により、6ppb（30 倍）～60ppb（300 倍）となる。希釈を工夫することで、さらに低い検出限界値を得られる可能性がある。

(2) 試験用試料の調製

メーカーが提供する検査成績書に正確な純度の記載があるモネンシンナトリウム試薬（生化学用、和光純薬）を 0.1mg 単位で計り取り、少量のメタノールで溶解後、30%（v/v）メタノール水で希釈し試験用原液を調製した。試験用原液を生乳で正確に希釈し、0.5～8ppb 濃度に調製し ELISA テストに供した。

(3) 試料調製（前処理）条件の検討

当該キットは、ELISA テストを行う前段階として、試料中のモネンシンを抽出するための試料調製（前処理）工程が必要である。

キットの分析対象は飼料ならびに鶏肉用となっているため、生乳試料の前処理方法について検討を行った。キットマニュアルによる飼料・鶏肉からのモネンシン抽出方法は表 1

に示すとおりであり、手順の初期段階において固形試料をホモジナイズした後、メタノールを用いてモネンシンの抽出を行う。生乳試料は液体であるため、標準プロトコール手順①～④のパートについて表2に示す条件の検討を行った。なお、抽出後の手順については、キットマニュアルに従った。

表1 飼料・鶏肉試料の試料調製標準プロトコール

処理手順
① サンプルをホモジナイズする
② 15ml 試験管に、①を0.5g入れる
③ ②にメタノール7.5mlを加え、15分間振蕩、もしくは3分間最大スピードでVortexする
④ 室温（20-25°C）、4000g、10分間遠心分離する
⑤ 新しい2ml チューブに上澄み液を1.0ml取り、モネンシン洗剤250mg加える
⑥ 0.5分間激しくVortexし、少なくとも室温に5分間おく
⑦ 室温、14000g、2分間、サンプルを遠心分離する
⑧ 2ml チューブに上澄み液500 μ L取り、60°Cのエヴァポレーターで蒸発乾固させる
⑨ モネンシンサンプルバッファー1000 μ L加え、1分間Vortexする。
⑩ ELISA試験に、100 μ L使用する

表2 生乳試料からのモネンシン抽出条件

条件	モネンシン抽出条件	Vortex	試料採取	その他
条件1	1.5ml チューブに生乳1.5ml分注	なし	脱脂層1ml	
条件2	1.5ml チューブに生乳0.75ml + 30%メタノール0.75mlを分注	最大スピード, 3分間	脂肪層と沈殿物の中間層から1ml	
条件3	1.5ml チューブに生乳0.75ml + 100%メタノール0.75mlを分注	〃	〃	
条件4	1.5ml チューブに生乳0.75ml + 60%メタノール0.75mlを分注	〃	〃	
条件5	〃	〃	〃	サンプルバッファー添加後のVortex時間を約15分間に延長 ※2)

※2) キットマニュアルに記載されている「1分間 Vortex」では、エバポレーター乾燥後のチューブ内の乾固物が完全に溶解しない。そこで、完全溶解させるため Vortex 時間を約 15 分間に延長した。

(4) 試験用試料調製の妥当性確認

今回実施した試験結果の妥当性確認のため、方法(2)において調製した 5ppb 試験用試料について、日本食品分析センターにモネンシン濃度の測定を依頼した。測定方法は LC/MS/MS 法であり、検出限界値は 2ppb であった。

3. 結果および考察

日本食品分析センターに依頼したモネンシン濃度 5ppb 調製試料の分析結果は 4ppb とほぼ理論値と一致し、今回実施した試験結果の妥当性を確認することができた。当該センターにおける定量値 4ppb を理論値 5ppb で除した値を補正係数として各濃度の実際値を求め、以下の検討に用いた。

生乳試料からのモネンシン抽出条件別に実施した ELISA 検査結果を表 3 に示した。

当該キットの検出限界値は 0.2ppb であり、抽出条件別における理論上の希釈倍率および検出限界値は、条件 1 が 2 倍 : 0.4ppb、条件 2~5 では 4 倍 : 0.8ppb であった。

条件 3 において、モネンシン回収率（検出濃度 / 試料調製濃度・実際値）は、いずれの濃度においても 2 以上を示し、低濃度になるほど高くなる傾向がみられた。回収率が高くなり過ぎた要因として、高濃度のメタノールが固形層と液層間におけるモネンシンの濃度勾配を生じさせたものと考えられた。

条件 4 において、回収率は 0.6~0.8 と十分ではなかったが、各濃度でほぼ一定の値を示した。回収率が低かった要因として、エバポレーターによる蒸発乾固後のチューブ内乾固物が、マニュアル指定の Vortex 条件では溶解しきらなかったためと考えられた。

そこで、条件 5 において Vortex の運転時間を変更し、チューブ内乾固物が完全溶解する約 15 分間とした。この条件における回収率は、PL 基準値 2.0ppb 以上の試料において 0.9~1.0 の範囲であった。一方、キットの理論上の検出限界濃度以下である 0.6ppb 試料において僅かに検出されたが、0.6ppb 未満の試料からは検出されなかった。以上のことから、生乳試料を用いた当該キットによる前処理条件としては、条件 5 が最適であると考えられた。

表3 生乳試料のモネンシン抽出条件別のELISA検査結果

試料調製濃度		モネンシン抽出条件									
①理論値 ※3)	②実際値 ※4)	条件1		条件2		条件3		条件4		条件5	
		検出濃度	回収率 (検出濃度/②)	検出濃度	回収率 (検出濃度/②)	検出濃度	回収率 (検出濃度/②)	検出濃度	回収率 (検出濃度/②)	検出濃度	回収率 (検出濃度/②)
ppb		ppb		ppb		ppb		ppb		ppb	
8.0	6.4	0.5	(0.1)	3.4	(0.5)						
5.0	4.0					7.8	(1.9)	2.5	(0.6)	4.0	(1.0)
4.0	3.2					6.4	(2.0)	2.2	(0.7)	2.9	(0.9)
3.0	2.4					5.6	(2.4)	1.7	(0.7)	2.4	(1.0)
2.5	2.0					4.1	(2.1)	1.7	(0.8)	2.0	(1.0)
2.0	1.6	Low		1.5	(0.9)	4.0	(2.5)	1.1	(0.7)	1.3	(0.8)
1.5	1.2	Low		1.0	(0.8)	3.3	(2.7)	1.0	(0.8)	1.4	(1.1)
1.0	0.8	Low		1.1	(1.4)	2.7	(3.4)	Low		1.2	(1.4)
0.8	0.6							Low		1.1	(1.7)
0.5	0.4							Low		Low	
0.0	0.0							Low		Low	

[空白欄]は未実施を、[Low]は検出限界値以下を示す

※3) 試薬の検査成績書に記載された純度に基づいて調製した理論濃度。

※4) 試料調製濃度①理論値に、補正係数[4ppb(5ppb 調製試料の食品分析センター定量値)]/[5ppb(理論値)]を乗じた値。

表 4 に、条件 5 に基づいてカスタマイズした生乳試料の試料調製プロトコールを示した。

本手順による検査所要時間は、試料前処理の開始から ELISA テストの終了まで約 5 時間である。さらに短時間に結果を得るためには、表 4-処理手順⑧の上澄み液採取量を減らすことで対応可能である。ちなみに、採取量を 200 μl にした場合、蒸発乾固時間は約 1.5 時間に短縮され、検出限界値は PL 基準値の 2ppb となる。

本法は、従来よりも迅速に結果を得ることが可能であるため、生産現場におけるスクリーニング法として有効であると考えられた。

表4 生乳試料の試料調製プロトコール

処理手順
① 1.5ml チューブに試料0.75ml を取り、60%メタノールを0.75ml 入れる
② Vortexで最高速度, 3分間振とう抽出する
③ 室温 (20-25°C)、4000g, 10分間 遠心分離する
④ 新しい1.5ml チューブに、Clean up Mix 250ngを計り取る
⑤ ④の1.5ml チューブに、脱脂上澄み液 (中間部 (沈殿物は取らない)) を1.0ml 取る
⑥ 0.5分間激しくVortexし、少なくとも室温に5分間おく
⑦ 室温、14000g、2分間、⑥を遠心分離する
⑧ 1.5ml チューブに上澄み液500 μ L取り、60°Cエヴァポレーターで 3h蒸発乾固させる
⑨ モネンシンサンプルバッファー1000 μ L加え、約15分間Vortexする 乾固物が完全に溶解していることを確認する
⑩ ELISA試験に、100 μ L使用する

(小坂英次郎)