

令和元年度 成績概要書

課題コード（研究区分）：3101-214592（経常（一般）研究）

1. 研究課題名と成果の要点

- 1) 研究成果名：とうもろこしサイレージ中デオキシニバレノール濃度の簡易スクリーニング法
(研究課題名：とうもろこしサイレージ中デオキシニバレノール濃度の簡易スクリーニング法の開発)
- 2) キーワード：とうもろこしサイレージ, デオキシニバレノール, イムノクロマトキット, スクリーニング
- 3) 成果の要約：とうもろこしサイレージ生試料に水を加え、ジュースミキサーで攪拌後にろ紙でろ過したろ液を用いて、市販の定量および定性イムノクロマトキットによりデオキシニバレノール濃度を評価できる。抽出から測定までの所要時間は13~15分/点であり、約18時間の乾燥処理を要する従来の簡易測定法に比べ極めて迅速である。

2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名：畜試・基盤研究部・飼料環境G・湊 啓子
- 2) 共同研究機関（協力機関）：(十勝, 釧路, 根室農業改良普及センター)
- 3) 研究期間：平成29~令和元年度(2017~2019年度)

4. 研究概要

1) 研究の背景

デオキシニバレノール(DON)は、麦やとうもろこしに赤かび病を起こす病原菌が主に産生するかび毒であり、牛用飼料原料の中では、とうもろこしサイレージ(CS)から高頻度で検出され、稀に高濃度汚染が生じることが明らかとなっている。飼料中DON濃度には管理基準*(反芻動物用飼料:4mg/kg現物, その他家畜等及び家禽用飼料:1mg/kg現物)が設定されているが、生産現場で簡易迅速にDON汚染レベルを把握する手段はない。畜産試験場ではH19指導参考事項においてCS乾燥粉砕物を用いて市販ELISA(酵素免疫測定法)キットによりDONの簡易測定が可能であることを示し、汚染実態のモニタリングに活用している。しかし、この手法はELISA操作の煩雑性や試料の乾燥に一晚を要する等の点から生産現場での利用は困難であり、より簡便なスクリーニング法の開発が求められている。

*管理基準：事業者のGMP等の工程管理による有害物質の低減対策の効果を確認するための指標。家畜等の健康または畜産物を介した人の健康保護を前提に、合理的に到達可能な範囲で出来る限り低く設定されている。

2) 研究の目的

市販イムノクロマトキットを活用し、CS生試料(生CS)を用いたDON簡易迅速検査法を確立する。

5. 研究内容

1) 生CSを用いたDON分析のための抽出条件の検討

- ・ねらい：生CSからDON分析に適用可能な抽出液を得るための調製法(生CS抽出法)を確立する。
- ・試験項目等：慣行法(乾燥粉砕試料から抽出, H19指導参考)と生CSから調製した抽出液で、定量ELISAキット(Veratox for DON 5/5 (Neogen社))によるDON分析値を比較。ろ液pH(6~8)、ジュースミキサー(以後、ミキサー)の回転数(最高回転数1.0万, 1.7万rpm)および固液比(1:4, 1:5, 1:6)の影響を検討。

2) 生CSを用いたDON分析における市販イムノクロマトキットの適用性

- ・ねらい：イムノクロマトキットに対する生CS抽出法の適用性を確認し、検査手順を構築する。
- ・試験項目等：定量キット(QuickScan DON Flex (ENVIROLOGIX社, 以後DON Flex)), 定性キット(RIDA QUICK DON (R-Biopharm社, 以後RIDA))。添加回収試験(DON:1.0, 4.0mg/kg添加)および液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)での分析値との比較試験。

6. 成果概要

- 1)-(1)蒸留水を抽出液として用い、ミキサーで3分間攪拌後にガーゼとろ紙(No.5A)でろ過したろ液のpHを6~8に調整することで、生CSから慣行法と同等のDON分析値が得られた(表1)。
- 1)-(2)回転数の異なる2種類のミキサーで抽出して得られたDON分析値に差は見られなかった(表1)。また、固液比1:5以上では、生産現場で調製されるCSの乾物率の上限値付近の試料(試料4:風乾物率49%)を用いても、ミキサーは十分に回転し慣行法と同等のDON分析値が得られた(表1)。以上をまとめ、生CSを用いたDON分析のための生CS抽出法を図1の①~⑥に示した。
- 2)-(1)供試イムノクロマトキットでは、両キットともにキット付属バッファー(抽出液)との混合によりpH調整がなされるため、生CSから得られた抽出液のpH調整は不要であった。
- 2)-(2)生CS抽出法(図1:①~⑤)をDON Flexに適用したところ、添加回収試験での平均回収率は84~105%、相対標準偏差は3.7~5.6%となり良好な回収率と精度を示した。また、自然汚染CS中DON濃度の分析値は、LC-MS/MSでの分析値と概ね近似した値を示した(図2)。以上より、生CS抽出法はDON Flexを用いたDON分析に適用可能であることが明らかとなった。
- 2)-(3)定性キット付属の抽出液を用いて、生CS抽出法(図1:①~⑤)のろ液を管理基準に合わせた2段階のスクリーニングレベルに希釈して反応に供したところ、テストラインが明瞭に現れたものを陽性と判定することでDON汚染レベルを正しく判定できた(表2)。本試験で構築した検査手順を図1に示した。なお、抽出液に水道水(遊離塩素1.0ppm含有)を用いても表2と同じ判定結果が得られた。
- 2)-(4)CS原料草3点(DON:0.2, 1.3, 8.2mg/kg現物)で図1の手法の適用性が確認された(データ略)。
- 2)-(5)1検体当たりの分析所要時間は、前処理(計量~ろ液採取)が約8分、測定がDON Flexでは約5分、RIDAでは約7分であり、約18時間の乾燥処理を要する従来の簡易測定法に比べ極めて迅速であった。キットの単価(税抜, 参考価格)は、DON Flexは960円/検体、RIDAは1,700円/検体であった。

< 具体的なデータ >

表 1 とうもろこしサイレーン生試料(生 CS)を用いた DON 分析¹⁾における抽出条件の影響

検討項目	抽出比率(固液比)	ミキサー回転数(rpm)	pH ²⁾	試料No.	1	2	3	4	5
				風乾物率	38%	31%	34%	49%	43%
				慣行法DON分析値 ³⁾	2.1	4.7	3.2	3.2	3.4
				DON分析値の慣行法比(% ⁴⁾)					
pH	1:4(生CS 100g+蒸留水(DW) 400ml)	17,000	4(無調整)	137	114	125	-	-	
			6	96	100	100	-	-	
			7	95	96	98	-	-	
			8	99	101	103	-	-	
回転数	1:4	17,000	-	-	-	83	103		
		10,000	-	-	-	86	98		
固液比率	1:5(生CS 100g+DW 500ml)	17,000	7	-	-	-	95	100	
	1:6(生CS 100g+DW 600ml)		-	-	-	94	104		

¹⁾ 各2反復で3分間攪拌後にガーゼとろ紙(No.5A)でろ過、ろ液のpHを7に調整(6N-NaOHを滴下)して定量キット(Veratox for DON 5/5)に供試。

²⁾ 定量キットに供試したろ液のpH(6N-NaOHにより調整)。³⁾ 慣行法:生CSを60℃で一晩乾燥(100g×2反復)した試料5gに蒸留水50mlを加え、3分間振とう後にろ紙でろ過、他は¹⁾と同様。単位:mg/kg 風乾物。⁴⁾ 生CS分析値/慣行法分析値

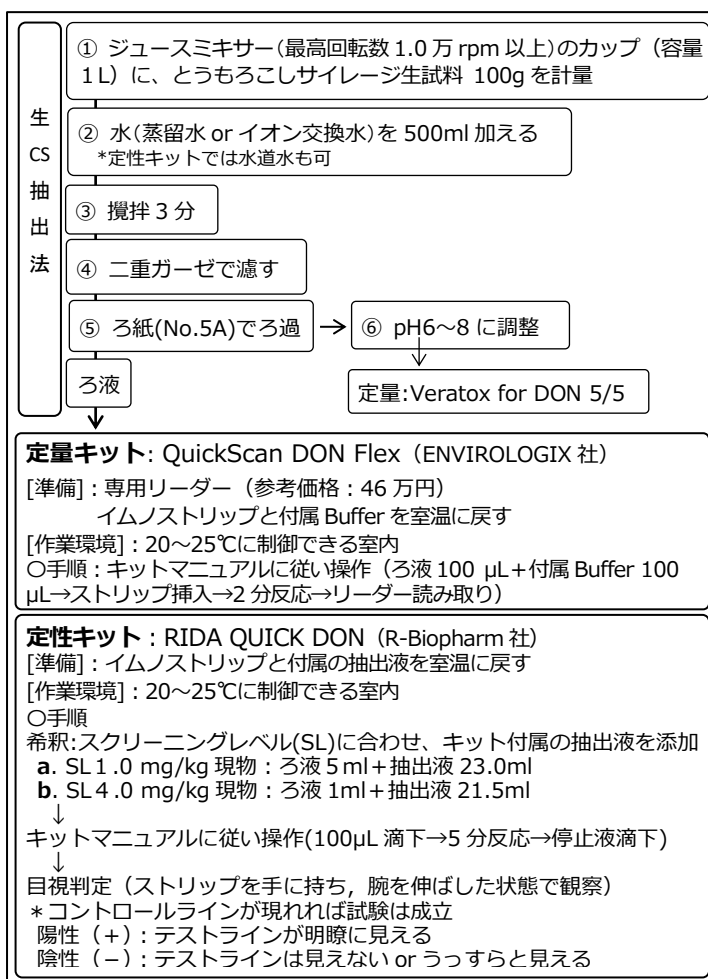


図 1 とうもろこしサイレーン生試料を用いた DON 濃度の簡易スクリーニング法

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- (1) TMR センター等の生産現場における自主検査および分析センター等での迅速検査に活用できる。
- (2) 管理基準を超えた飼料は、TMR や総給与飼料中の濃度が管理基準値を超えないように配合割合を調整する。
- (3) 本試験で供試した以外の市販キットへの適用に当たっては妥当性を確認する必要がある。

2) 残された問題とその対応 なし

8. 研究成果の発表等 なし

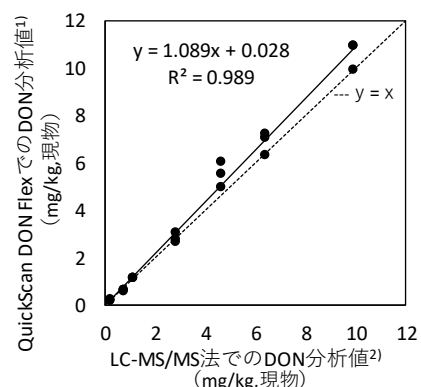


図 2 生CS抽出法を用いた QuickScan DON Flex での DON 分析値と LC-MS/MS での分析値の関係

¹⁾ 図1の生CS抽出法(①~⑤)により各3反復で抽出してキットに供試。²⁾乾燥粉碎試料を飼料分析基準に基づいた変法で分析(日本動物特殊診断株式会社)。

表 2 定性キット(RIDA QUICK DON)によるとうもろこしサイレーン中 DON 濃度のスクリーニング

試料 No.	DON濃度 (mg/kg 現物) ¹⁾	スクリーニングレベル(SL)							
		1.0mg/kg現物 (図1:希釈a)				4.0mg/kg現物 (図1:希釈b)			
		A	B	C	D	A	B	C	D
6	0.2	- ²⁾	-	-	-	nt	nt	nt	nt
7	0.7	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt
8	1.0	+ ³⁾	+	+	+	-	-	-	-
9	2.8	+	+	+	+	-	-	-	-
10	4.6	+	+	+	+	+	+	+	+
11	6.4	nt ⁴⁾	nt	nt	nt	+	+	+	+
12	9.9	nt	nt	nt	nt	+	+	+	+

¹⁾ LC-MS/MS 法での分析値。²⁾ 陰性(SL未満)。³⁾ 陽性(SL以上)。

⁴⁾ 未実施