

成績概要書 (2008年1月作成)

課題分類:

研究課題: デオキシニバレノールの現地検出を目的とした簡易測定技術
(牛赤カビ中毒症制御のためのデオキシニバレノール現地検出技術の開発)

担当部署: 畜試 基盤研究部 病態生理科

協力分担: フロンティア研究所

予算区分: 外部資金 (JST シーズ発掘試験)

研究期間: 2007年度 (平成19年度)

1. 目的

乳牛の疾病発生や生産阻害の原因として懸念されているカビ毒デオキシニバレノール(DON)について、生産者や普及指導員などが酪農現場で実施できる簡易なDON測定技術の開発を目指し、特別な操作や分析機器を必要としない酵素免疫測定法(ELISA)を検討する。

2. 方法

1) 簡易測定技術開発のためのデオキシニバレノール抗体の作製

- (1) ELISA 間接法による免疫動物の血清中 DON 抗体の測定
- (2) DON 検出のための作製抗体を用いた ELISA 競合法の検討

2) イムノスティックを用いた簡易測定技術の検討

イムノスティックと作製抗体を用いて簡易化した ELISA 競合法による DON 検出の検討

3. 成績の概要

- 1) -(1) DON を実験動物 10 頭に免疫し、ELISA 間接法により血清中 DON 抗体を検出したところ、血清希釈 10,000 倍で吸光度 0.2 以上となる高力価の抗体が 7 頭に産生された(表 1)。
- 1) -(2) 作製抗体を用いた ELISA 競合法によって DON 検出を試みたところ、高力価抗体 7 頭中 3 頭の抗体では、検出する DON 濃度が高くなると、吸光度は DON 濃度に関連して減少した(図 1)。これら 3 頭の抗体は 10ppb までの DON 濃度を検出できる高感度の抗体であると考えられた。残りの高力価抗体産生の 4 頭および非産生の 3 頭計 7 頭の抗体では DON 濃度に関連した吸光度の変化を認めず、DON 検出に不適と考えられた(図 1)。
- 2) 簡易測定技術として、作製した高感度 DON 抗体を貼り付けたイムノスティック(図 2)によって、ELISA 競合法(図 3)を実施したところ、反応液の発色を目視することで 0、40 および 80ppb の DON 濃度を判別することが可能であった(図 4)。

以上より、カビ毒 DON について、酵素免疫測定法に利用できる高感度の抗体を作製した。また、この抗体はイムノスティックによる簡易な DON 測定に利用できることが判明した。

表1. ELISA間接法によるDON抗体産生成績

免疫頭数	高力価1)	
	産生頭数	非産生頭数
10	7	3

1) 血清希釈10,000倍で吸光度0.2以上の抗体
 DON: デオキシニバレノール
 ELISA: 酵素免疫測定法

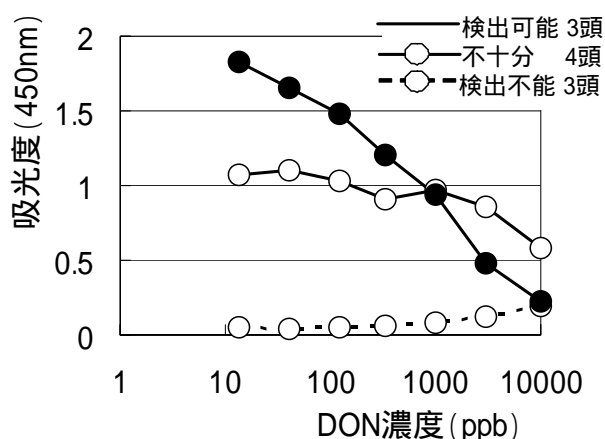


図1. 作製抗体を用いたELISA競合法によるDON検出の検討

ELISA: 酵素免疫測定法
 DON: デオキシニバレノール

- 検出可能: ELISA間接法で血清希釈10000倍で吸光度0.2以上あり、ELISA競合法でDON検出を可能とした抗体
- 不十分: ELISA間接法で血清希釈10000倍で吸光度0.2以上あり、ELISA競合法でDON検出を不十分とした抗体
- 検出不能: ELISA間接法で血清希釈10000倍で吸光度0.2未満で、ELISA競合法でDONを検出不能とした抗体

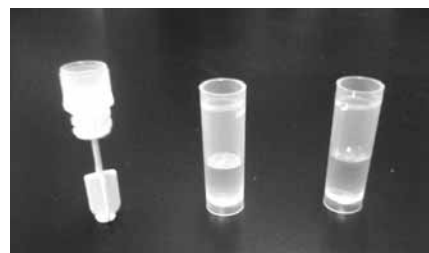


図2. イムノスティック器材

左: DON抗体を貼付したイムノスティック
 中: 酵素結合DONを含む検体チューブ
 右: 酵素で発色する基質を含む基質チューブ

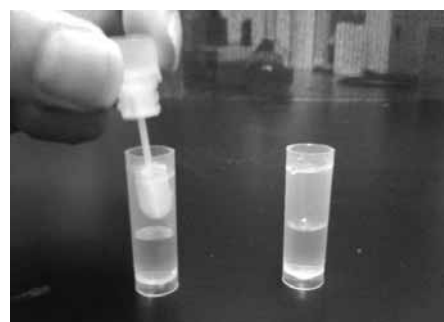


図3. DON簡易測定技術の操作

イムノスティックを検体チューブと基質チューブに、それぞれ10分ずつ入れた後、基質チューブの発色を目視する。

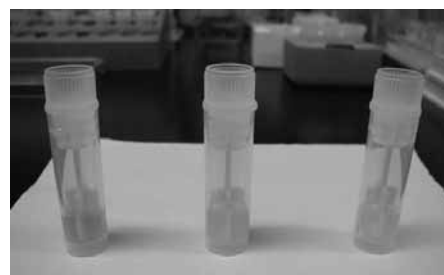


図4. 簡易測定技術によるDONの検出

検体中DONが多いほど、発色しなくなる。

DON濃度 左: 0 ppb、中: 40 ppb、右: 80 ppb

4. 成果の活用面と留意点

- 1) 酪農現場で実施できるDON簡易測定キット開発の基礎技術として活用される。

5. 残された問題とその対応

- 1) 飼料サンプルによる実証