

エチプロストンの酵素免疫測定法の開発とウシ・ブタの臓器・組織及び牛乳汁中残留分析への応用

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	丸山, 賀子 松本, 真里子 城戸, 靖雅
巻/号	39巻1号
掲載ページ	p. 26-30
発行年月	1998年2月

ノート

エチプロストンの酵素免疫測定法の開発とウシ・ブタの臓器・組織及び牛乳汁中残留分析への応用

(平成9年7月23日受理)

丸山 賀子* 松本真里子* 城戸 靖雅*

Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Etiproston and Its Application to Residue Analysis in Cattle and Swine Tissues and Cows' Milk

Noriko MARUYAMA, Mariko MATSUMOTO and Yasumasa KIDO

(Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology: 3-7-11, Hashimoto-dai, Sagamihara-shi, Kanagawa 229-1132, Japan)

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for etiproston (EP) using horseradish peroxidase (HRP) as a label enzyme was developed and applied for residual assay for EP in cattle and swine tissues and cows' milk. Anti-EP antiserum raised against the antigenic EP-ovalbumin conjugate in rabbit possessed excellent specificity for EP, exhibiting no-cross reactivity with various endogenous prostaglandins. EP was extracted from a sample with methanol. The extract was evaporated to dryness, and the residue was cleaned up on a Sep-Pak C₁₈ cartridge. The extracted EP was determined by ELISA. The average recoveries were 80~99% for cattle tissues and 83~99% for swine tissues. The determination limit was 1.0 ng/g (1 ppb).

(Received July 23, 1997)

Key words: エチプロストン etiproston; 酵素免疫測定法 ELISA; 残留分析 residual analysis

緒 言

畜産分野では畜産動物の疾病の治療、予防や育成の効率化の目的で多数の薬物が使用されている。これら薬物の畜産物への残留は食品衛生上の観点から厳しく規制されている。

プロスタグランジン (PG) は動物の恒常性維持に重要な役割を果たしている物質である。PG が畜産・獣医学領域において家畜の繁殖機能に関係のあることが明らかになり、特に PGF_{2α} をウシの子宮内に注入すると黄体が急速に退行して、発情同期化が可能であることが報告^{1),2)} されてから、PGF_{2α} の類縁物質がつつぎと開発された³⁾。

エチプロストン (etiproston, EP) (Fig. 1) は、PGF_{2α} 類縁合成医薬品で、天然型 PGF_{2α} に比べて強い黄体退行作用と子宮収縮作用を有し、低用量で生理活性を発現

する。EP はトロメタミン塩 (EPT) の形で畜産分野ではブタの分娩誘発、ウシの性周期の同調及びウシの黄体退行遅延に基づく卵巣疾患の治療に有効である。

EP のウシ及びブタにおける常用臨床用量は、1 頭当たりそれぞれ 5 mg 及び 1.7 mg と極めて低用量で薬効を発現し、また、生体組織中には種々の PG 類が共存することから、高感度、高特異的分析法が必要とされている。生体中の PG 類の分析法には、バイオアッセイ、TLC, GC, HPLC, GC/MS, 放射免疫測定法、酵素免疫測定法など多種の分析法が開発されている⁵⁾。本研究で

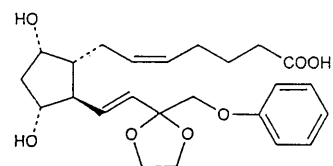
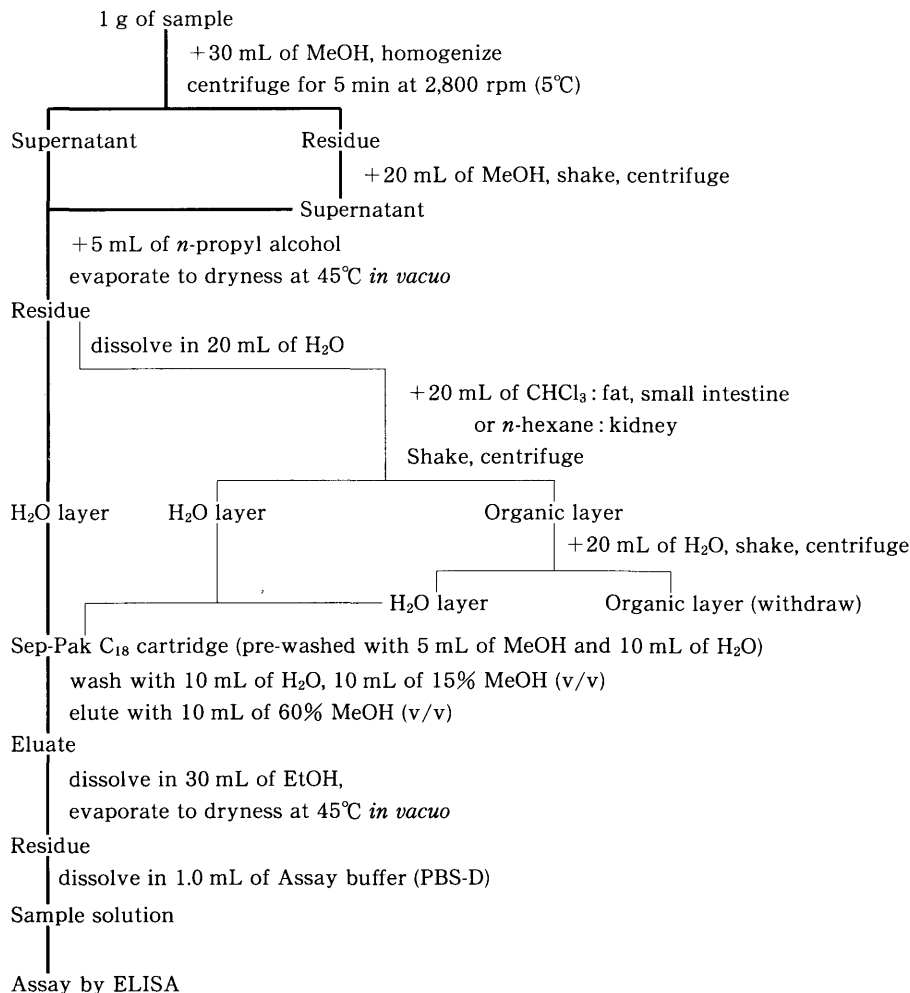


Fig. 1. Structure of etiproston

* (財) 畜産生物科学安全研究所: 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11



Scheme 1. Preparation of sample solution

—: extraction procedure for serum, muscle, liver and milk

—: liquid/liquid extraction for fat, small intestine and kidney

は、ウシ及びブタの臓器・組織、並びにウシの乳汁中の残留分析へ適用し得る高感度、高特異的な EP の酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) を開発し、その残留分析への適用について検討した。

実験方法

1. 試薬及び器具

EPT は三共エール薬品 (株) からの供与品。クロロギ酸イソブチル、トリ-*n*-ブチルアミン、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム・二水和物 (TNBS) は和光純薬工業 (株) 製生化学用試薬。水溶性カルボジイミド (WSC) は同仁化学研究所製生化学用試薬。Freund's complete adjuvant (FCA) は Difco 社製。ヒト血清アルブミン (HSA)、卵白アルブミン (OVA)、牛血

清アルブミン (BSA) は Sigma 社製。カゼインは Merck 社製。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (EIA 用) 及び tetramethylbenzidine peroxidase substrate (TMB) Kit はベーリンガーマンハイム・山内社製。Anti-rabbit IgG-HRP は Amersham 社製。その他の試薬、溶媒類は和光純薬工業 (株) 製試薬特級品。Sep-Pak C₁₈ は Waters 社製。透析チューブは Spectram 社製 Membrane 12-14000。96 穴プレートはコスター社製 3590 EIA プレート。マイクロプレートリーダーはコナ社製 MTP-100。

2. 試液

PBS-A (0.015 mol/L PBS): リン酸水素二ナトリウム 5.80 g, リン酸水素一カリウム 0.53 g, 塩化ナトリウム 26.3 g を精製水に溶かして 3 L とする (pH 7.4)。

PBS-B: 0.0002% Tween 20 含有 0.015 mol/L PBS.

PBS-C: 0.5% カゼイン含有 0.015 mol/L PBS.

PBS-D: 2% (w/v) BSA 含有 0.015 mol/L PBS.

PBS-E: 炭酸ナトリウム 1.59 g, 炭酸水素ナトリウム 2.93 g, アジ化ナトリウム 0.2 g を精製水に溶かして 1 L とする (pH 9.6).

3. 抗 EP-抗血清の調製

3.1 免疫原の合成

免疫原は EP を混合酸無水物法及び水溶性カルボジミド法により担体タンパク (OVA, HSA) に結合させて 4 種の免疫原を合成した⁶⁾. 混合酸無水物法により調製した免疫原はトリニトロベンゼンスルホン酸法⁷⁾により抗原分子の結合数を測定し, 20~40個/タンパク分子の EP が導入されていることを確認した.

3.2 免疫及び抗血清の調製

免疫には, 家兎 (日本白色種, 雄, 3.5~4.0 kg) を用い, 常法により免疫して抗血清を調製した.

3.3 抗体価の測定

先に合成した免疫原を PBS-E に 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように溶解し, 96 穴プレートに 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注した後, 4°C で 1 夜静置した. プレートは, PBS-B で洗浄した後, PBS-C を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 分注し, 室温で 60 分間放置してブロックした後, PBS-B で洗浄して固相化抗原プレートを作製した. これに PBS-A で段階希釈した抗血清を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注して 90 分間反応させた. 反応終了後, プレートを洗浄し, 0.001% Anti-rabbit IgG-HRP PBS-A 希釈液を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えて 90 分間反応させた. 反応終了後, 洗浄し, これに TMB 溶液を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えて酵素反応を開始させ, 約 5 分後に 1.75 mol/L 硫酸を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えて酵素反応を停止させて 415 nm の吸光度を測定した. 抗体価は, 吸光度が最大値の 50% の点の希釈度とした.

4. HRP 標識エチプロストン (HRP-EP) の調製

EPT 44 mg, HRP 20 mg を 0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5) 2.5 mL に氷冷下で懸濁させ, これに精製水 2.5 mL に溶解した水溶性カルボジミド 810 mg をかくはんしながら滴下した後, 4°C で 3 日間かくはんして反応を完結させた. 反応液は 0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) に対して 3 日間透析した. 次に, 終濃度として 0.5% BSA, 0.01% カナマイシンを添加し, 凍結して保存した.

5. 試料溶液の調製

試料溶液の調製は, Scheme 1 に示す.

血清, 乳汁, 筋肉, 肝臓はメタノール抽出後, Sep-Pak C₁₈ カラムを用いて分離精製した.

脂肪, 小腸は, メタノール抽出後, クロロホルム-水の液-液分配操作を加えた. 腎試料では, クロロホルムの代わりに *n*-ヘキサンを用いた.

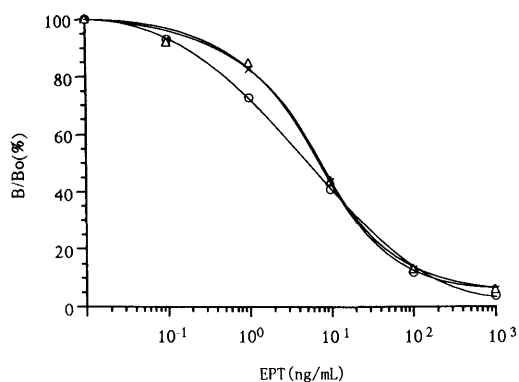


Fig. 2. Standard curves of etiproston

- : standard solution with 0.015 mol/L PBS containing 2% BSA (w/v)
- ×—: standard solution for serum
- △—: standard solution for milk

6. EPT 標準液の調製

5 と同様に操作して得た EPT 無投与の対照試料抽出液を標準液希釈用溶液とした. EPT 標準品の一定量を PBS-D に溶解して調製した標準原液 (約 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を上記の標準液希釈用溶液で段階希釈して, 各試料ごとに 1.0~1,000 ng/mL の EPT 標準液を用時調製した.

7. ELISA

抗 EP-抗血清を PBS-E で 3,000 倍に希釈し, これをプレートの各ウェルに 50 μL ずつ分注した後, 5°C で 1 夜静置してコーティングした. プレートを PBS-B で洗浄した後, PBS-C を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注して室温に 60 分間放置し, ブロックした. PBS-B で洗浄した後, 標準液, 陰性コントロール及び試料溶液を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注して, 120 分間反応させた後, 0.0002% HRP-EP-PBS-A 溶液 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加え, 更に 30 分間反応させた. 反応終了後, 洗浄した後 TMB 溶液を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注して酵素反応を行い, 約 5 分後に 1.75 mol/L 硫酸を 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えて酵素反応を停止させ, 各ウェルの吸光度 (415 nm) を測定した.

8. 検量線

EPT 標準原液を PBS-D を用いて段階希釈して調製した EPT 標準液及び 6 に従って調製した試料抽出溶液添加標準液について, 7 に従って測定し, 検量線を作成してその差異を比較した. 検量線の代表例を Fig. 2 に示す.

9. 添加回収試験

各臓器・組織 1 g に EPT 10 ng 相当量の標準 EPT 溶液を添加し, 5 及び 7 に従って操作して EP を測定し, 回収率を求めた.

Table 1. Antibody Titer

Immunogen	Solid-phase	Antibody titer
EP-OVA-Mixed anhydride	EP-HSA-Carbodiimide	$10^{3.8} \sim 10^{4.2}$
EP-OVA-Carbodiimide	EP-HSA-Mixed anhydride	$10^{4.6} \sim 10^{5.4}$
EP-HSA-Mixed anhydride	EP-OVA-Carbodiimide	$10^{4.1} \sim 10^{4.6}$
EP-HSA-Carbodiimide	EP-OVA-Mixed anhydride	$10^{3.2} \sim 10^{4.0}$

Table 2. Interassay Precision of ELISA for EPT

EPT (ng/mL)	Cattle						Swine			
	Serum		Milk		Muscle		Serum		Muscle	
	\bar{X}	C.V. %	\bar{X}	C.V. %	\bar{X}	C.V. %	\bar{X}	C.V. %	\bar{X}	C.V. %
0.1	94	1.7	97	2.1	95	3.5	89	6.4	92	4.8
1.0	79	7.2	84	3.2	82	3.8	77	6.0	76	6.0
10.0	43	7.0	45	5.8	46	5.2	42	6.9	44	6.0
100.0	13	11.5	14	7.9	14	18.6	14	4.3	13	13.0
1000.0	4	25.0	4	27.5	4	32.5	4	35.0	3	13.3

\bar{X} : mean value of B/B₀ %, C.V. %: coefficient of variation (%), n=5

結果及び考察

PG 類のラジオイムノアッセイ及び酵素イムノアッセイは多数報告されている⁵⁾が、EP のイムノアッセイの報告はない。

1. 免疫原及び抗血清の調製

免疫原は、担体タンパクに OVA 及び HSA を選び、混合酸無水物法及びカルボジミド法により EP を結合させ 4 種の免疫原を合成した。調製した 4 種の抗血清と 4 種の固相化抗原の組み合わせによる抗体価の測定値を Table 1 に示す。抗体価は $10^{3.2} \sim 10^{5.4}$ であり、いずれも免疫測定法に適用可能な抗血清であった。それらの中で EP をカルボジミド法で OVA に結合させた免疫原を用いて調製した抗血清が最も高い抗体価を示した。

2. ELISA

抗原固相法、第一抗体固相法、第二抗体固相法により ELISA の測定システムを検討した結果、第一抗体固相法が最も高感度であった。また、抗血清は、先に記したように、カルボジミド法により調製した EP-OVA を免疫原とした抗血清が高い抗体価を示したが、第一抗体固相法による検量線は、混合酸無水物法で調製した EP-OVA を免疫原とした抗血清が最も高い感度を示したので、この抗血清を使用することとした。

血清、乳汁、臓器抽出液など生体試料の酵素イムノアッセイによる分析では、抗原-抗体反応や酵素反応に対し、生体由来物質による種々の影響があることが多い。本法について BSA 含有緩衝液により調製した EPT 標準液と血清又は乳汁抽出物を添加した標準液について検量線を比較した。Fig. 2 から明らかなように緩衝液

Table 3. Cross-reactivity of Anti-EP Antiserum

Prostaglandins	Cross-reactivity (50%)
Etiproston	100.0
F1 α	<0.1
F2 α	<0.1
A1	<0.1
A2	<0.1
B1	<0.1
B2	<0.1
E1	<0.1
E2	<0.1

による標準液の検量線に対して血清又は乳汁抽出物の添加標準液の検量線は完全には一致せず、他の臓器試料についても同様の現象が認められた。したがって、本 ELISA 法では、各臓器・組織中の EP の定量には各臓器・組織から得た抽出液を標準液調製用希釈液とする添加検量線の方式を採用した。Fig. 2 の検量線から明らかなように EPT の検量域は 1~100 ng/mL である。試料採取量 1 g、最終試料溶液 1 mL であるから本法の検量域は 1~100 ng/g である。

3. 再現性及び検出限界

ウシの血清、乳汁、筋肉及びブタの血清、筋肉の標準液について測定日をかえて繰り返し測定し、本法の再現性を検討した。その結果を Table 2 に示す。EP の高濃度では吸光度の測定値が小さくなるため、ばらつきが大きく、したがって、C.V. % も大きくなった。EPT 1.0~100 ng/mL の範囲では良好な C.V. % であった。最小検出量は Table 2 から明らかなように 1.0 ng/mL で

Table 4. Recoveries of EPT from Cattle and Swine Tissues and Milk

Sample	Cattle (n=3)		Swine (n=3)	
	Recovery (%)	C.V. %	Recovery (%)	C.V. %
Serum	97	4.3	83	7.3
Muscle	99	2.3	91	7.7
Fat	89	3.5	81	6.2
Liver	86	8.4	99	2.3
Kidney	85	8.9	89	9.1
Small intestine	80	2.5	87	7.4
Milk	83	2.8	—	—

Addition level of EPT: 10.0 ng/g

の B/B₀% は牛試料では 79~84%, 豚試料では 77, 76% であり, 0 ng/mL の B/B₀% の 100% とは 2σ 以上の有意差であり, 定量限界は 1.0 ng/mL, すなわち 1.0 ng/g (1 ppb) である.

4. 交差反応性

本 ELISA 法の特異性を検討するため生体に存在する代表的な PG 類を選び, 交差反応性を測定した. Table 3 に示すように検討したものはいずれも交差反応はなかった. したがって, 本 ELISA 法は EP に極めて特異的であることが示唆された.

5. EP の抽出法

試料からの EP の抽出法について種々検討し, 血清, 筋肉, 肝臓, 乳汁試料については, Scheme 1 に示すように, メタノール抽出した後, Sep-Pak C₁₈-カートリッジにより EP 画分を採取し, BSA 含有緩衝液に溶解して試料溶液とした. 脂肪及び小腸試料は, 上記の操作に水-クロロホルムの液-液分配抽出による妨害物の除去操作を加えた. また, 腎臓試料では, クロロホルムでは乳化したので *n*-ヘキサンにかえて液-液分配抽出する操作を行った.

6. 添加回収試験

EPT 無投与のウシ及びブタの血清, 筋肉, 脂肪, 肝臓, 腎臓, 小腸及びウシの乳汁に EPT 10 ng/g を添加し, 上記の方法により EPT を定量して回収率を求め

た. その結果, Table 4 に示すように, 試料により回収率は若干異なるが, 牛試料では, 80~99%, 豚試料では, 83~99% であった. なお, 各試料についてそれぞれ 3 回繰り返し測定して C.V. % を求めた. 牛試料では 2.3~8.9%, 豚試料では 2.3~9.1% でありいずれも 10% 以下であった.

本分析法は動物薬の残留分析法のガイドライン (回収率 70% 以上, C.V. % 10% 以下) をクリアする満足すべきものである.

文 献

- 1) Pharris, B. B., Wyngarder, L. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **130**, 92~100 (1969).
- 2) Rowson, L. E. A., Tervit, R., Brand, A.: J. Reprod. Fertil. **29**, 145~150 (1972).
- 3) 中原達夫: 臨床獣医, **2**, 30~40 (1984).
- 4) Skuballa, W., Raduchel, B., Loge, O., Elger, W., Vorbruggen, H.: J. Med. Chem. **21**, 443~447 (1978).
- 5) 山本尚三, 鹿取 信篇: "プロスタグランジン研究法 (上)" p. 57~111 (1986) 東京化学同人.
- 6) Tijessen, P. (石川栄治監訳): "エンザイムイムノアッセイ" p. 256 (1989) 東京化学同人.
- 7) Tijessen, P. (石川栄治監訳): 同上 p. 262 (1989) 東京化学同人.