

信州大学審査学位論文

飼料の品質にかかわる成分の
分析法に関する研究

平成25年3月

平岡久明

目次

第 1 章 緒言	1
第 2 章 キャピラリー電気泳動法によるサイレージ中の有機酸 と無機陰イオンの同時定量法	9
2. 1. 背景	9
2. 2. 実験	11
2. 3. 結果	16
2. 4. 考察	22
2. 5. 結論	24
第 3 章 飼料中の中性デタージェント繊維の分析法	36
3. 1. 背景	36
3. 2. 実験	38
3. 3. 結果	43
3. 4. 考察	46
3. 5. 結論	48
第 4 章 市販の酵素免疫測定法のキットによる サイレージ中のデオキシニバレノールの定量法	54
4. 1. 背景	54
4. 2. 実験	56
4. 3. 結果	63
4. 4. 考察	67
4. 5. 結論	71
第 5 章 まとめ	79
引用文献	85
謝辞	102

略号

AcDON: acetyldeoxynivalenol (アセチル化したデオキシニバレノール)

3-AcDON: 3-acetyldeoxynivalenol

15-AcDON: 15-acetyldeoxynivalenol

ADF: acid detergent fiber (酸性デタージェント繊維、酸性洗剤溶液で処理した試料中の繊維)

aNDF: NDF with heat-stable α -amylase treatment (耐熱性 α -アミラーゼ処理した中性デタージェント繊維)

aNDFom: aNDF in organic matter (灰分を除いた aNDF)

BGE: background electrolyte (電解質溶液、電気泳動のための泳動用緩衝液)

BGEF: BGE for flush (洗浄用 BGE)

BGEM: BGE for migration (泳動用 BGE)

CE: capillary electrophoresis (キャピラリー電気泳動法)

CTAH: cetyltrimethylammonium hydroxide (水酸化セチルトリメチルアンモニウム)

CZE: capillary zone electrophoresis (キャピラリーゾーン電気泳動法)

DM: dry matter (乾物)

DOM-1: deepoxy-deoxynivalenol (デアポキシ-DON, DON の代謝物)

DON: deoxynivalenol (デオキシニバレノール)

DON-3-glucoside: deoxynivalenol-3- β -D-glucopyranoside (DON-3- β -D-グルコピラノシド)

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay (酵素免疫測定法)

GC: gas chromatography (ガスクロマトグラフィー)

HorRat: Horwitz ratio (共同試験で得られた RSD_R と Horwitz の経験式またはその修正式から導き出された $PRSD_R$ との比)

IC: ion chromatography (イオンクロマトグラフィー)

ISO: International Organization for Standard (国際標準化機構)

LC: high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)

LC-MS: high performance liquid chromatography mass spectrometry (質量分析高速液体クロマトグラフィー)

LOD: limit of detection (検出下限値)

LOQ: limit of quantitation (定量下限値)

MS: mass spectrometer (質量分析計)

MT: migration time (マイグレーションタイム、CEにおける試料の移動時間)

ND: neutral detergent (中性デタージェント)

NDF: neutral detergent fiber (中性デタージェント繊維、ND 溶液で処理した試料中の繊維)

NDR: neutral detergent residue (ND 溶液処理残渣、ND 溶液で処理して得られたものの総称)

OMA: Official Method of Analysis of AOAC International (AOAC International 公認法)

PDC: 2,6-pyridinedicarboxylic acid (2,6-ピリジンジカルボン酸)

PRSD_R: predicted relative reproducibility of standard deviation (経験的な室間相対標準偏差)

RSD: relative standard deviation (相対標準偏差)

RSD_r: relative standard deviation for repeatability (室内相対標準偏差)

RSD_R: relative standard deviation for reproducibility (室間相対標準偏差)

TDN: total digestible nutrients (可消化養分総量)

TN: total nitrogen (全窒素)

VBN: volatile basic nitrogen (揮発性塩基態窒素)

飼料の品質にかかわる成分の分析法に関する研究

第 1 章 緒言

本研究は、国産飼料の利用性を向上させるために、その品質に影響するいくつかの成分について、その分析法を確立し、飼料の品質、その安全性、家畜の健康ひいては食品の安全性の向上に寄与することを目的に行った。

飼料作物を長期保存するための飼料生産の方法には、サイレージ処理と乾燥処理がある。サイレージ処理は飼料作物を嫌氣的に好氣的微生物の生育を抑制して、長期貯蔵できる飼料を生産する方法である (McDonald et al., 1991)。一方、乾燥は飼料作物の水分含有量を 15% 以下にして菌の生育を抑制して、長期貯蔵できる飼料を生産する方法である (Suttie, 2000; Hancock, 2009)。新鮮な飼料作物を家畜に給与出来ない乾期や冬期に利用する飼料の生産方法として、サイレージ処理や乾燥は、その材料である飼料作物の栄養価が最適な時期に収穫して行われる (McDonald et al., 1991; Muck et al., 2003)。乾燥処理による飼料生産は、飼料作物を刈り取り、そのままほ場で天日により飼料作物中の水分を蒸散させた後、ロールベール等に成型して調製する (Suttie, 2000; Hancock, 2009)。乾燥処理の問題は、刈った飼料作物の乾燥中に降雨があると栄養成分の溶脱や土壌の付着による品質の低下を招くこと、また、高温多湿な地域においては飼料作物の乾燥が難しいことである ('t Mannetje, 2000)。一方、サイレージ生産は、乾燥とは異なり、材料を刈った後にほ場で水分を蒸散させる作業が無く、収穫した高水分の飼料作物を気密性の高い状態でサイロに詰め込んで調製する (McDonald et al., 1991; Rooke and Hatfield, 2003)。そのため、サイレージ処理では降雨による栄養成分

の溶脱や土壌の付着を軽減でき、嫌氣的条件による貯蔵のためカビや好気性の変敗菌の生育を抑制出来る。このことから、サイレージ処理は、乾燥処理と比較して収穫時の降水や湿度の影響を受けにくく、これらの影響による栄養価の低下や可食部の減少による飼料価値の損失が少ない。従って、飼料作物の収穫時期に降水量の多い、あるいは湿度の高い地域においては、サイレージ処理は乾燥処理よりも効率的に貯蔵性のある飼料を生産することができる。サイレージは降水や湿度の影響を受けにくく、効率的な飼料生産が出来るため、反芻動物の飼料として多くの国で利用されている (McDonald et al., 1991; Muck et al., 2003)。我が国は、飼料作物の収穫時期である 6~9 月に降水量が多く気温も高い。そのため、冬期のための飼料生産は、降水や湿度の影響を受ける乾燥処理よりも、嫌氣的にサイロに貯蔵するサイレージ処理の方が適している。また、ホールクロップとして飼料に利用されるトウモロコシのような長大作物は、乾燥処理が難しいため、サイレージに調製されている。これらのことから、飼料作物を嫌氣的条件下で乳酸菌の発酵を促進し、その発酵によって得られた乳酸によって乳酸菌以外の微生物の活性を抑制した発酵飼料であるサイレージ (McDonald and Whittenbury, 1973; McDonald et al., 1973) は、国産飼料として重要である。

他方、我が国の農業生産は、国民の食生活の変化に対応出来なかったことから、食品や飼料の輸入量が増加し、食料自給率が低下した (森田, 2006)。この状況を改善するため政府は、世界的な穀物の供給量の不足や食料安全保障 (FAO, 2008; 服部, 2010) の観点から食料自給率を向上させるための目標を示した (農林水産省, 2010)。その中で、飼料自給率は、平成 20 年度の 26 % (粗飼料 78 %, 濃厚飼料 11 %) から、平成 32 年度には 38 % (粗飼料 100 %, 濃厚飼料 19 %) に向上させる目標が定められた (農林水産省, 2010)。この目標を達成するため、飼料生産量を増加させるためのいくつかの取り組みが全国的に行われ、飼料自給率の向上

に繋がることを期待されている。具体的な取り組みは、細断型ロールペーラーによる省力的なトウモロコシサイレージ生産（志藤ら, 2006; 志藤ら, 2010）、休耕田と耕種農家の労働力を有効に利用した稲サイレージ生産（稲垣, 2003; 高橋ら, 2009）、及び、コントラクターによる効率性の高い組織的な飼料生産（稲垣, 2003; 高橋ら, 2009）である。しかしながら、生産量が増加したサイレージの利用の促進を計らなければ、いずれ生産量は減少し飼料自給率は向上しない。飼料の利用性を向上させるためには、その品質を評価して、優れた面あるいは劣っている面を明らかにすることが不可欠である。

一方、飼料の品質を評価することは、乳牛の代謝あるいは乳生産に必要な栄養を供給するためにも重要である（Bauman and Currie, 1980; Kolver and Muller, 1998; Roche et al., 2009）。乳牛の効率的な飼養管理のためには、乳牛の成育ステージあるいは乳生産量に適した飼料設計に基づいて、飼料の給与が行われる必要がある（NRC, 2001; 農研機構, 2006）。このことは、家畜の健康を維持して効率的に畜産物の生産性を向上させるためには、適切な飼養管理に基づいた飼料設計が必要であり、そのためには飼料の品質評価が必要であることを示している。

飼料の品質は、飼料の有する栄養価と安全性に関与する成分で表される（Seglar, 2003; Kan and Meijer, 2007; 杉浦, 2008）。サイレージの場合にはこれらの成分だけでなく、栄養成分を維持するための発酵品質に関与する成分（大山, 1971; McDonald et al., 1991）も重要である。飼料としての栄養に関与する主な成分は、蛋白質、脂肪、及び、炭水化物である（NRC, 2001; 農研機構, 2006）。炭水化物はさらに可溶性糖類、澱粉、中性デタージェント繊維（NDF: neutral detergent fiber）、及び、酸性デタージェント繊維（ADF: acid detergent fiber）に分類される（NRC, 2001; 農研機構, 2006）。これらの栄養以外にアミノ酸、ミネラル、ビタミンなどもある（NRC, 2001; 農研機構, 2006）。飼料の有するエネルギーを示す可消化養

分総量 (TDN: total digestible nutrients) を算出するためには、粗蛋白質、粗脂肪、粗繊維、及び、可溶性無窒素物の量とこれらの消化率を求める必要がある (NRC, 2001; 農研機構, 2006)。これらのうち、蛋白質は、可溶性蛋白質、分解性蛋白質、非分解性蛋白質、及び、結合性蛋白質に分類され、搾乳牛への飼料の給与では乳量に応じたこれらの蛋白質のバランスが重要となる (Ruiz et al., 2002; Fox et al., 2004; Lanzas et al., 2007)。反芻動物の特徴は、単胃動物が利用することが難しいセルロースなどの繊維質を、共生関係にあるルーメン微生物の発酵を利用して、消化・吸収できるルーメンの機能を有することである (板橋, 1998; 牛田, 1998; 牛田, 2004)。この繊維を消化・吸収するためのルーメンの機能が低下すると反芻動物は健康を損なうことになる (元井, 1998)。従って、反芻動物の健康を維持するためには、反芻動物が利用できる繊維の供給量を管理する必要がある (Van Soest and Wine, 1967; 浅野、日野, 2004a)。しかしながら、飼料中の繊維の指標となる粗繊維は、反芻動物に利用できる飼料中の繊維を表していない (Robertson and Van Soest, 1981; Uden et al., 2005)。そのため、反芻動物が利用できる飼料中の繊維を評価するために ADF や NDF の分析法が開発されてきた (Van Soest and Wine, 1967; Van Soest, 1973; Van Soest et al., 1991)。

サイレージの発酵品質は、サイレージ発酵によって生成した乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、及び、吉草酸などの有機酸の構成比と量によって決定する (McDonald et al., 1991)。これらの有機酸生成に関与する微生物は乳酸菌、酪酸菌、エンテロバクテリア、真菌、リステリア菌、酢酸菌、及び、プロピオン酸菌である (McDonald et al., 1991)。良質のサイレージは、サイレージ材料の有する栄養価を損失することなく有しており、家畜の嗜好性も高い (Weiss et al., 2003)。良質なサイレージを生産し材料の栄養価を維持するためには、サイレージの貯蔵状態の管理指標となる発酵品質を把握することが重要となる (McDonald et al., 1991;

Savoie and Jofriet, 2003)。サイレージの発酵品質の評価には、各有機酸の含有量を測定する方法や pH 値、全窒素 (TN: total nitrogen) に対する揮発性塩基態窒素 (VBN: volatile basic nitrogen) の割合 (VBN/TN) を測定する方法、官能試験法などがある (Seglar, 2003)。

飼料の安全性に関与する成分としては、重金属、硝酸態窒素、カビ毒、農薬などがある (Wright and Davison, 1964; 農林水産省, 1988; Kan and Meijer, 2007)。重金属は土壌や大気中に存在し、それらが飼料作物を汚染する (Li et al., 2005)。特に問題となる重金属は鉛とカドミウムであり、ヒトや動物の肝臓や腎臓に蓄積して毒性を示す (Nicholson et al., 1999; Li et al., 2005; Kan and Meijer, 2007)。硝酸態窒素は、古くから飼料作物の有害物質として報告されており、家畜のメトヘモグロビン血症の原因物質である (Wright and Davison, 1964; Davison et al., 1965; Nicholson, 2007)。カビ毒は、主にアスペルギルス、フザリウム、ペニシリウム属のカビが産生する人畜に有害な二次代謝物であり、ヒトや家畜で種々の被害が報告されている (Lynch, 1972; Driehuis et al., 2008)。このカビ毒には、一部のアスペルギルス属のカビが産生するアフラトキシン類や、一部のフザリウム属のカビが産生するデオキシニバレノール (DON: deoxynivalenol) などのトリコテセン系カビ毒などがある (宇田川, 2004)。これらの有害な成分を含む飼料を除去すること、及び、患畜の原因を究明することは、家畜の健康管理のために重要なことである。そのためには飼料の品質を評価することが不可欠である。

飼料の品質に影響する成分を評価するための分析法は、食品や飼料の分野における分析法集である Official Methods Analysis of AOAC International (OMA) の "Feed" の項目や International Organization for Standard (ISO) の Standards catalogue の "65.120: Animal feeding stuffs" に収載されている。これらは OMA や ISO として利用され、収載されている分析法は共同試験によって妥当性が確認されている (AOAC

International, 2005b; ISO, 2010)。しかし、これらの中に、飼料の品質に影響するすべての成分の分析法が記載されている訳ではない。また、これらの OMA や ISO の中には、試料の前処理に労力と時間を必要とするため、分析結果を得るために多くの時間を必要とする方法もある。我が国の飼料分析の公定法である飼料分析基準（農林水産省, 2008）は、主に配合飼料、及び、その原料の安全性を検査する目的で策定されている。従って、飼料分析基準には国内生産が主となるサイレージなどの品質に関与する成分についての分析法の記載は少ない。そのため、我が国の飼料生産にとって重要なサイレージを主体とする飼料の品質を評価するための分析法が求められている。飼料設計で利用するための分析方法は、迅速で精度の高いことが要求される。そのためには、従来の分析法よりも効率的な分析が可能であり、分析法の妥当性が確認されていることが必要である。

本研究では、飼料の品質に影響する成分の中から、発酵品質に関与する成分、栄養に関与する成分、及び、安全性に関与する成分について、それぞれを迅速、高精度に定量するための分析法を検討した。具体的には、発酵品質に関与する成分からサイレージの発酵により生成する「有機酸」、栄養に関与する成分から反芻動物の健康を維持するために必要な繊維である「NDF」を選定した。安全性に関与する成分からは、メトヘモグロビン血症の原因物質である「硝酸態窒素」と、嘔吐の原因であり乳からその代謝物と共に検出報告のあるカビ毒の DON の 2 成分を検討した。分析法の開発に際しては、精度を維持した上でより迅速な品質の評価のために従来の方法よりも効率的な操作によって分析時間を短縮すること、及び、分析精度を評価するために共同試験によって分析法の妥当性を確認することを重視した。

第 2 章の「キャピラリー電気泳動法によるサイレージ中の有機酸と無機陰イオンの同時定量法」では、キャピラリーゾーン電気泳動法（CZE:

capillary zone electrophoresis) による分離と間接吸光度法による検出を利用して、9種の有機酸（ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、*n*-占草酸、*iso*-占草酸、*n*-カプロン酸、乳酸、クエン酸）、及び、3種の無機陰イオン（亜硝酸、硝酸、塩素）の総計12成分の同時定量を可能にした。この分析法は、これまでに別個に行われてきた、有用性の面の強い有機酸と、有害性の面の強い硝酸態窒素を同時に分析することで、労力の削減と分析時間の短縮をすると共に、試薬の消費量を軽減した。

第3章の「飼料中の中性デタージェント繊維の分析法」では、AOAC法（AOAC International, 2005c）をベースに α -アミラーゼの添加時期を含む分析条件の変更により、澱粉の糊化、及び、ろ過の困難さを軽減すると共に分析時間を大幅に短縮した。

第4章の「市販の酵素免疫測定法のキットによるサイレージ中のデオキシニバレノールの定量法」では、酵素免疫測定法（ELISA: enzyme linked immunosorbent assay）によるDONの分析の問題であるDONの過大評価をカートリッジカラムによる前処理によって軽減した。これにより、高速液体クロマトグラフィー（LC: high performance liquid chromatography）などの機器分析と比較して短時間で分析結果が得られ、生産現場に近い場所で測定できるDONのELISAによる分析を可能とした。

分析法の妥当性確認のための共同試験は、第2章の「キャピラリー電気泳動法によるサイレージ中の有機酸と無機陰イオンの同時定量法」では5試験室、第3章の「飼料中の中性デタージェント繊維の分析法」では15試験室、第4章の「市販の酵素免疫測定法のキットによるサイレージ中のデオキシニバレノールの定量法」では10試験室で行った。

第5章では、まとめとして第2～4章で開発した分析法の検討内容の要約を示すと共に今後の展望を示した。この研究で開発した分析法は、いずれも従来の方法と比較して、分析時間が短く、共同試験によって妥当性が確認されたため、その利用性は高い。今後、飼料の品質に影響する

成分の分析法には、一層の分析時間の短縮と妥当性確認が求められる。そして、これらの検討を踏まえて開発された分析法によって成分を評価された飼料は、飼料設計で利用され、家畜の健康を維持しその生産を向上させる。その意味で、本研究は、国産飼料の利用性の向上だけでなく、家畜の健康、畜産物の品質の向上ひいては食品の安全性に寄与する重要な成果である。

第2章 キャピラリー電気泳動法によるサイレージ中の有機酸と無機陰イオンの同時定量法

2.1. 背景

サイレージの品質は、サイレージ生産に関与した微生物の影響を受ける (McDonald et al., 1991)。飼料作物を詰めた直後のサイロでは酸素が存在している。そのため、好気性微生物がサイロ内の酸素を利用して、飼料作物中の可溶性糖類やアミノ酸を、二酸化炭素、酢酸やアンモニアに分解し (McDonald and Whittenbury, 1973)、クエン酸を乳酸、ギ酸又は酢酸に分解する (Hirst and Ramstad, 1957; Playne et al., 1967)。サイロ内の酸素が消費されて嫌気的狀態になると好気性微生物の増殖は抑制され、嫌気的條件を好む乳酸菌の増殖が始まる (McDonald et al., 1991)。しかしながら、サイレージの貯蔵中に酸素曝露が起これると、乳酸菌に代わり好気性微生物が生育し、乳酸や栄養素が消費され飼料の価値が低下する (McDonald et al., 1973)。サイレージの品質に影響する有機酸は、主に乳酸、酢酸、酪酸、及び、占草酸である (McDonald et al., 1991)。またサイレージの品質低下をまねく酪酸菌の生育を抑制するためにサイレージ添加剤として使用する有機酸は、ギ酸あるいはプロピオン酸である (McDonald et al., 1991)。従って、サイレージ中の有機酸を分析し有機酸の構成を知ること、その発酵状態を知ることができる。

飼料作物中の硝酸態窒素は、古くから飼料中に含まれる有害物質として認知され、硝酸塩中毒症として知られているメトヘモグロビン血症の原因物質である (Wright and Davison, 1964; Davison et al., 1965)。サイレージ中の硝酸態窒素の存在は材料である飼料作物に依存し、飼料作物は土壌から硝酸態窒素を栄養源として吸収している (Bradley et al., 1940; Nicholson, 2007)。特に、植物は成長期に窒素源の吸収が活発であり、成

長期にある植物を収穫した場合には、同化出来ていない余剰の硝酸態窒素が植物体内に多く存在している (Bradley et al., 1940)。また、過剰施肥下で栽培された飼料作物でも、成長期での収穫と同様に植物体内に多量の硝酸態窒素が存在している場合がある (Bradley et al., 1940)。牛が中毒死する可能性のある硝酸態窒素の濃度は、乾燥牧草中で 0.2 % であることが報告されている (Bradley et al., 1940; 宮崎, 1977; Nicholson, 2007)。我が国においても、0.2 % 以上の硝酸態窒素が飼料作物 (宮崎, 1977) や輸入の乾燥牧草 (農林水産省, 2007) から検出されている。また硝酸態窒素は、サイレージ生産の過程でアンモニアに還元され (Hasan and Hall, 1975)、VBN としてサイレージ中に存在している。

有機酸 (Wada et al., 1984; Cherchi et al., 1994; Qiu, 1999; Pérez-Ruiz et al., 2004) や無機陰イオン類 (Pereira et al., 2008; Vanatta, 2008; Hsu et al., 2009) は、LC あるいはイオンクロマトグラフィー (IC: ion chromatography) で多く分析されている。これらの方法の定量精度は優れているが、分離効率を向上させるために、固相抽出、液々抽出、誘導体化など種々の前処理が必要である (Wada et al., 1984; Hsu et al., 2009)。近年、電解質溶液 (BGE: background electrolyte) に 2,6-ピリジンジカルボン酸 (PDC: 2,6-pyridinedicarboxylic acid) を用いた CZE による分離と間接吸光度法による検出を利用した、無機陰イオンと有機酸の同時定量法が報告された (Soga and Ross, 1997)。この方法を用いた海産物やアルコール飲料中の有機酸と無機陰イオンの同時分析は、Soga and Ross (1999a,b)、Soga and Imaizumi (2001) によって報告されている。

PDC を BGE として用いた CZE による分析方法 (Soga and Ross, 1999a,b; Soga and Imaizumi, 2001) を、サイレージ中の有機酸と無機陰イオンの成分の分析に適用するための検討を行った。CZE における分離条件として BGE の PDC 濃度と pH の検討を行い、簡易な前処理による 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンを同時に定量する方法を開発した。また、本法

の妥当性を確認するために、5 試験室による共同試験を行った。

2. 2. 実験

2. 2. 1. 試料及び試薬の調製

2. 2. 1. 1. 試料

サイレージ試料は、独立行政法人家畜改良センターで生産された 5 種類の原料草（イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、ハイブリッドライグラス、チモシー、トウモロコシ）を用いて調製した。原料草をそれぞれ 1~3 cm に細断し良く混合した後、原料草毎にポリエチレン製のパックに約 300 g を入れた。次にこのパック中の空気を真空ポンプで除いて密閉し、3 ヶ月間室温で暗所に保存してサイレージ試料を調製した。分析法の妥当性確認のための共同試験と実用性の検討に用いたサイレージ試料は、北海道と福島県の農家で生産されたものを用いた。

2. 2. 1. 2. 試薬

試薬は試薬特級、又は、カルボン酸分析用試薬を用いた。抽出には、水道水を純水製造装置（RFD240NA; アドバンテック, 東京）で処理した水（精製水）を用いた。標準液の調製、試料の希釈及び BGE の調製には、精製水を超純水製造装置（Milli-Q purification system; Millipore, Bedford, MA, USA）で処理した水（高度精製水）を用いた。

ギ酸、酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*iso*-酪酸、*n*-占草酸、*iso*-占草酸、*n*-カプロン酸、乳酸のナトリウム塩、クエン酸一水和物、フマル酸、*DL*-リンゴ酸、及び、*L*-酒石酸は関東化学製（東京）を、亜硝酸カリウム、硝酸カリウム、塩化ナトリウム、硫酸、炭酸カルシウム、リン酸ナトリウム十二水和物、ホウ酸ナトリウム十水和物、及び、ケイ酸カルシウム

は和光純薬製（大阪）を使用した。BGE の調製に用いる PDC と水酸化ナトリウムは和光純薬製を、電気浸透流の方向を反転させる水酸化セチルトリメチルアンモニウム溶液（CTAH: cetyltrimethylammonium hydroxide, 250 g/kg in methanol）は東京化成製（東京）を使用した。

有機酸、無機陰イオンの各種標準原液は、高度精製水を用いて酸としての濃度が 2 g/L になるように調製した。使用する混合標準液 A は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*iso*-酪酸、*n*-吉草酸、*iso*-吉草酸、*n*-カプロン酸、乳酸、クエン酸、フマル酸、*DL*-リンゴ酸、酒石酸、亜硝酸、硝酸、及び、塩素の各種標準原液を正確に混合し、高度精製水で希釈して各酸の濃度が 50 mg/L のものを調製した。混合標準液 B は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*iso*-酪酸、*n*-吉草酸、*iso*-吉草酸、*n*-カプロン酸、乳酸、クエン酸、フマル酸、*DL*-リンゴ酸、酒石酸、亜硝酸、硝酸、塩素、硫酸、炭酸、リン酸、ホウ酸、及び、ケイ酸の各種標準原液を正確に混合し、高度精製水で希釈して各酸の濃度が 50 mg/L のものを調製した。混合標準液 C はギ酸、酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*n*-吉草酸、*iso*-吉草酸、*n*-カプロン酸、乳酸、クエン酸、亜硝酸、硝酸、及び、塩素の各種標準原液を正確に混合し、高度精製水で希釈して各酸の濃度が 0、10、25、50、75、及び、100 mg/L のものを調製した。添加回収試験と共同試験の添加用の混合標準液 D は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、*n*-酪酸、*n*-吉草酸、*iso*-吉草酸、*n*-カプロン酸、乳酸、クエン酸、亜硝酸、硝酸、及び、塩素の酸としての濃度がいずれも 2 g/L になるように高度精製水を用いて調製した。

水酸化ナトリウムは、高度精製水に溶かして 1 mol/L と 3 mol/L に調製した。

泳動用 BGE（BGEM: BGE for migration）は、濃度を調製した PDC 水溶液に CTAH（0.5 mmol/L）を加え、水酸化ナトリウム水溶液（3 mol/L）でその pH を調整した。洗浄用 BGE（BGEF: BGE for flush）は、BGEM

と同じ BGE を用いた。

本法と分析値の比較を行った LC による分析は、有機酸については Wada et al. (1984)、硝酸態窒素については Hsu et al. (2009) によりそれぞれ報告された方法に従って行った。

2.2.2. 装置

キャピラリー電気泳動 (CE: capillary electrophoresis) 装置は、Agilent Technologies 製 (Waldbronn, Germany) の Agilent Capillary Electrophoresis System を用いた。CZE は、フューズドシリカキャピラリーカラム (112.5 cm × 50 μm I.D., 有効長 104 cm, Agilent Technologies) で行った。印加電圧 30 kV で、キャピラリー温度は 18 °C に保った。検出はフォトダイオードアレイ検出器で、間接吸収波長 350 nm とリファレンス波長 275 nm で行った。

はじめて用いるカラムは、コンディショニングとして高度精製水で 10 分間、水酸化ナトリウム水溶液 (1 mol/L) で 10 分間、高度精製水で 20 分間、さらに、BGEF で 20 分間洗浄してから使用した。

2.2.3. 電気泳動条件の検討

混合標準液 A を用いて、BGEM の PDC 濃度は 20~40 mmol/L の範囲で 2.5 mmol/L ごとに、pH は 4.6~12.5 の範囲で各成分の分離条件を検討した。またサイレージ中には作物あるいは微生物由来の有機酸などのほかに、土壌や肥料由来の陰イオンが混入する場合がある。これらの無機陰イオンとして、13 種の有機酸と硫酸、炭酸、リン酸、ホウ酸、及び、ケイ酸を含む 8 種の無機陰イオンを含む混合標準液 B を用いて電気泳動条件を検討した。

マイグレーションタイム (MT: migration time) の再現性を向上し、良

好な再現性を得るため、プレコンディショニングの条件を検討した。プレコンディショニング方法の検討は、混合標準液 C (50 mg/L) を用いて、一般的な BGEF のみによるシンプルフラッシュ法と BGEM を用いたコンビネーションフラッシュ法を比較した。シンプルフラッシュ法は BGEF で 7 分間洗浄する方法で、コンビネーションフラッシュ法は BGEF で 3 分間洗浄後に BGEM (陰極側)、及び、BGEM (陽極側) の順で洗浄する方法である。なお、コンビネーションフラッシュ法において、BGEM での洗浄時間は 2、3、及び、5 分間で検討を行った。また、洗浄時間は両極の BGE の容量を同一にするため、同一の時間を行った。BGEM の洗浄時間の違いによるエレクトロフェログラムの各アナライトの MT とピーク面積の比較は、Dunnett の多重比較検定 (Dunnett, 1964; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) で行った。

CZE の最適化された泳動条件における 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの検量線の直線性を検討した。また検出下限値 (LOD: limit of detection) と定量下限値 (LOQ: limit of quantitation) は、それぞれシグナル-ノイズ比 1:3 と 1:10 で算出した。

2. 2. 4. 試料の調製方法の検討

1~3 cm のサイレージ試料 10 g を 300 mL 三角フラスコに入れ、精製水 100 mL を加えて 30 分間振とう抽出 (SR-2DW; タイテック, 埼玉) した後、ろ過 (No. 5A; アドバンテック, 東京) した。ろ液を高度精製水で 10 倍に希釈して、遠心式フィルターユニット (Ultrafree-MC HV 0.45 μ m; Millipore) に入れ 5,000 \times g で 15 分間遠心し、フィルターを通過した試料液を CZE に供した。この結果、エレクトロフェログラムにおいて *n*-占草酸の MT にネガティブピークが検出した。そのため、このネガティブピークを除去するために、陽イオン交換樹脂の Accell Plus CM (Waters,

Milford, MA) と Oasis MCX (Waters) を用いたカートリッジカラムによる処理を検討した。カートリッジカラムの検討は、300 mL 三角フラスコに入れたチモシーサイレージ 10 g に混合標準液 D を 1.5 mL (3.0 g/kg) あるいは 3.0 mL (6.0 g/kg) 添加して行った。添加した試料を、精製水 100 mL で 30 分間振とう抽出した後、ろ過した。そのろ液 5 mL を Accell Plus CM、及び、Oasis MCX カラムにそれぞれ入れ、自然滴下で、その流出液の 0~1 mL、1~2 mL、及び、2~3 mL の各 1 mL ずつの分画から 0.5 mL を分取した。分取した流出液は、高度精製水で 10 倍に希釈して、遠心式フィルターユニットに入れ 5,000 ×g で 15 分間遠心しフィルターを通過した試料液を CZE に供した。試料の抽出時間の検討は、イタリアンライグラスサイレージを用いて、抽出時間 10、20、30、40、50、60 分と 24 時間で行った。24 時間抽出した有機酸と無機陰イオンの分析値と、10-60 分間抽出したそれらの分析値の比較は、Dunnett の多重比較検定 (Dunnett, 1964; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) で行った。

2. 2. 5. 妥当性確認と実用性の検討

添加回収試験は、5 種類のサイレージ (イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス、ハイブリッドライグラス、チモシー、及び、トウモロコシ) を用い、混合標準液 D を各成分の濃度が 3.0 と 6.0 g/kg となるように、2 レベルで添加して行った。試料 10 g を 300 mL の共栓付き三角フラスコに量り取り、混合標準液 D を 1.5 mL (3.0 g/kg) 又は 3.0 mL (6.0 g/kg) 添加し栓をした後、室温の暗所で一昼夜放置してから分析に供した。回収率はあらかじめ測定した非添加の試料の分析値を、添加した試料の測定値から減じたものを添加量で除して算出した。

共同試験は、試料としてペレニアルライグラスサイレージを用いて 5 試験室 (3 飼料検査機関、1 民間会社、1 研究機関) で実施した。分析

は添加と非添加試料をそれぞれ 2 点併行分析で行った。添加は混合標準液 D を用い 7.0 mg/kg とした。回収率はあらかじめ測定した非添加の試料の分析値の平均値を、添加した試料の測定値から減じたものを添加量で除して算出した。

分析値の精度は、室内相対標準偏差 (RSD_r : relative standard deviation for repeatability)、及び、室間相対標準偏差 (RSD_R : relative standard deviation for reproducibility) によって示した。濃度から推定する室間相対標準偏差 ($PRSD_R$: predicted relative reproducibility of standard deviation) は修正された Horwitz の式 (Thompson, 2000; Horwitz and Albert, 2006) を用いて計算した。共同試験による妥当性は RSD_R を $PRSD_R$ で除して算出する HorRat (McClure and Lee, 2003) によって評価した。

次に、この分析法の実用性を確認するために、農家から得た 5 種類のサイレージの分析を行った。また、これらの試料の中から高水分のチモシーとトウモロコシサイレージを用いて、本法の分析値と比較するために LC 法による分析を行った。LC による有機酸、及び、硝酸の分析法は、それぞれ Wada et al. (1984) の方法、及び、Hsu et al. (2009) の方法で行った。Wada et al. (1984) の方法は有機酸をブロモチモールブルーで誘導体化して検出する方法であり、Hsu et al. (2009) の方法は硝酸のイオンペア試薬としてリン酸テトラブチルアンモニウムを用いる方法である。本法と LC 法の分析値の比較は T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) で行った。

これらの検討に使用した分析法の手順は Fig. 2-1 に示した通りである。

2.3. 結果

2.3.1. CZE の分析条件

最適な分離を得るための BGE の pH と PDC 濃度は、混合標準液 A を

用いて検討した。分離への pH の影響は、20 mmol/L の PDC を用いて pH を 4.6~12.5 の範囲で変化させて検討した。硝酸と亜硝酸は pH 5 以下で (Fig. 2-2a)、ギ酸とフマル酸は pH 11.5 以下では分離しなかった (Fig. 2-2b)。硝酸と亜硝酸は pH 12 で分離したが、リンゴ酸と酒石酸は分離せず、*n*-酪酸と *iso*-酪酸もまたこの条件では分離出来なかった (Fig. 2-2c)。しかしながら、*n*-酪酸と *iso*-酪酸はサイレージの品質に同じような効果を与えるため、サイレージの品質を評価する為には分離している必要はない。また、リンゴ酸と酒石酸はサイレージの品質にほとんど影響がない成分である。pH 12.5 のエレクトロフェログラム上のバックグラウンドノイズは、pH 12 のそれらの約 5 倍であった (Fig. 2-2c, d)。

分離のための PDC 濃度の影響は、pH 12 で PDC 濃度を 20~40 mmol/L の範囲で変化させて検討した。サイレージの品質に影響する有機酸と無機陰イオンはこの pH ですべて分離することが出来た。ギ酸、フマル酸とクエン酸の分離は PDC 濃度を 20 から 30 mmol/L に増加させることで改善した (Fig. 2-2c, e, f)。フマル酸 (ピーク 5) とクエン酸 (ピーク 6) は、PDC 濃度が 35 mmol/L 以上で分離しなかった (Fig. 2-2g)。また、サイレージには有機酸だけでなく土壌や堆肥由来の無機陰イオンが含まれている。このため次に、13 種の有機酸と 8 種の無機陰イオンを含む混合標準液 B を、pH 12 の 30 mmol/L PDC に調製した BGE を用いて分析した (Fig. 2-2h)。その結果、リン酸のピーク (ピーク 19) は、リンゴ酸と酒石酸のピーク (ピーク 7, 8) と重なった。しかし、他の無機陰イオンのピーク (ピーク 1, 2, 3, 17, 18, 20, 21) は、有機酸のピークと分離していた。

分析間のカラムの洗浄にシンプルフラッシュ法を用いた場合には、連続分析を行うとすべての陰イオンの検出が早くなり、各ピークの間隔が狭くなった。10 回の連続注入において、塩素の MT は 8.13 から 8.06 分に、*n*-カプロン酸は 17.47 から 17.24 分になった (Table 2-1)。このとき、

プロピオン酸と乳酸の MT の差は 0.03 分、*n*-吉草酸と *iso*-吉草酸の MT の差は 0.05 分となり、干渉する可能性が見いだされた。同様にコンビネーションフラッシュ法を用いた場合にも、すべての陰イオンの検出が早くなった。しかし、10 回の注入による MT の変化は、シンプルフラッシュ法よりもコンビネーションフラッシュ法の方が小さかった。またコンビネーションフラッシュ法を用いた場合のプロピオン酸と乳酸の MT の差は 0.13 分、*n*-吉草酸と *iso*-吉草酸の MT の差は 0.07 分であった (Table 2-1)。このことから、コンビネーションフラッシュ法は、シンプルフラッシュ法よりもアナライト間の分離が良好であった。

コンビネーションフラッシュ法の両極の BGEM による洗浄時間が、9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの MT とピーク面積の相対標準偏差 (RSD: relative standard deviation) に与える影響を検討した。その結果、BGEM による洗浄時間を 2、3 及び 5 分に変えた場合に、これらの MT の RSD はそれぞれ 0.26、0.25 及び 0.25 % 以下となり、そのピーク面積の RSD はそれぞれ 3.7、3.8 及び 3.7 % 以下となった。また Dunnett の多重比較検定 (Dunnett, 1964; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) を用いて、コンビネーションフラッシュ法の BGEM による洗浄時間 5 分をコントロールに、洗浄時間 2 分と 3 分の各アナライトの MT とピーク面積を比較した。その結果、BGEM の洗浄時間 2 分と 5 分の MT の比較から得られた P 値は 0.55~0.99、3 分と 5 分のそれらは 0.36~1.00 であった。また BGEM の洗浄時間 2 分と 5 分のピーク面積の比較から得られた P 値は 0.68~1.00、3 分と 5 分のそれらは 0.56~0.94 であった。よって、コンビネーションフラッシュ法の BGEM の洗浄時間の差による各アナライトの MT とピーク面積に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。従って、分析間のプレコンディショニングのための洗浄は、BGEF の 3 分間の洗浄に続いて陰イオン側及び陽イオン側の BGEM で、共に 2 分間ずつ洗浄するコンビネーションフラッシュ法を用いることとした (Table 2-1)。

CZEにおける検量線の直線性は、混合標準液 C を測定することで確認した。各種陰イオン標準液 0、10、25、50、及び、100.0 mg/L の検量線の決定係数 (R^2) は 0.993~1.000 の範囲となった。本法による塩素、亜硝酸、硝酸、ギ酸、乳酸、酢酸、クエン酸、プロピオン酸、酪酸、*n*-占草酸、*iso*-吉草酸、及び、*n*-カプロン酸の LOD はいずれも 3 mg/L (サイレージ中に 0.3 g/kg) であり、それらの LOQ はいずれも 10 mg/L (サイレージ中に 1.0 g/kg) であった。

2.3.2. 試料の調製方法

抽出時間の検討は、イタリアンライグラスサイレージを用いて行い、その結果を Table 2-2、エレクトロフェログラムを Fig. 2-3 に示した。検出した有機酸と無機陰イオンは酢酸、乳酸、酪酸と塩素であった。24 時間抽出で得られた有機酸と無機陰イオンの分析値と、抽出時間 10、20、30、40、50、60 分のそれらの分析値を Dunnett の多重比較検定 (Dunnett, 1964; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) で比較した。抽出時間 10 分間では酢酸、乳酸と酪酸で、20 分間では酢酸と乳酸で 24 時間抽出したこれらの分析値と有意差 ($P < 0.05$) があった (Table 2-2)。検出したすべての成分において、30 分間より長い時間で抽出した成分の分析値は、24 時間抽出した分析値と有意差 ($P \geq 0.05$) が無かった (Table 2-2)。

Fig. 2-4b に示すように、サイレージ抽出液のエレクトロフェログラム (16.5 分付近) にネガティブピークがあった。このネガティブピークを除去するために、2 種類の陽イオン交換樹脂カラムによる精製を検討した。Oasis MCX カラムの処理では、ネガティブピークを除去することが出来なかった (Fig. 2-4c)。しかし、Accell Plus CM カラムの処理はネガティブピークを除去する効果があった (Fig. 2-4d)。ネガティブピークを弱イオン交換樹脂のカラムで除去できたことから、低極性の物質である

と推定した。また、Accell Plus CM カラムを用いた各陰イオンの回収率は、0~1 mL の分画で 76.8~95.6 %、1~2 mL の分画で 99.2~118.6 %、2~3 mL の分画で 98.5~118.4 % であった。

以上の結果から、サイレージ中の 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンを CZE で分析する方法として以下の方法を設定した (Fig. 2-1)。試料 10 g を精製水 100 mL で 30 分間振とう抽出し、ろ紙でろ過後、ろ液 5 mL を Accell Plus CM カラムに入れ、はじめの 1 mL を捨て、次の 1~2 mL の流出液分画 (1 mL) を採取する。この流出液分画を高度精製水で 10 倍に希釈して、遠心式フィルターユニットに入れて 5,000 ×g で 15 分間遠心し、フィルターを通過した試料液を CE に注入 (50 mbar, 6 秒) する。CZE 分析は、内径 50 μm、長さ 112.5 cm (有効長 104 cm) のフューズドシリカキャピラリーカラムを用い、印加電圧は 30 kV、検出は間接吸収波長 350 nm、リファレンス波長 275 nm で行った。CZE の BGE は、pH 12 の 30 mmol/L PCD (0.5 mmol/L CTAH 溶液を含む) を用い、プレコンディショニング方法は BGEF で 3 分、BGEM (陰極側) 2 分、BGEM (陽極側) 2 分の順で洗浄した。

2.3.3. 妥当性確認及び実用性

添加回収試験は 5 種類のサイレージを用いて、3.0 g/kg と 6.0 g/kg の 2 添加濃度で実施した。その結果の 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの回収率とそれらの RSD を Table 2-3 に示した。2 添加濃度における 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの回収率は 96.1~110.5 % であり、その RSD は 0.4~10.4 % であった (Table 2-3)。

本法の妥当性を確認するための共同試験は、ペレニアルライグラスサイレージを用いて 5 試験室で行い、その結果を Table 2-4 に示した。9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの平均回収率は 93.7~107.9 %、RSD_r は

1.6～4.8 %、 RSD_R は 3.3～8.1 % であった。この共同試験による HorRat は 0.8～1.9 となった (Table 2-4)。Horwitz and Albert (2006) の中で HorRat の経験的な許容範囲は 0.5～2.0 と示されているので、CZE による 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの同時定量法である本法の妥当性は確認された。

この分析法を用いて、農家で生産されたサイレージ 5 種類 10 試料を分析した。その結果とエレクトロフェログラムをそれぞれ Table 2-5 と Fig. 2-5 に示した。検出した有機酸と無機陰イオンの濃度範囲は、ギ酸で LOD 以下 (不検出) ～2.6 g/kg、クエン酸で不検出～1.8 g/kg、酢酸で 0.7～5.5 g/kg、乳酸で不検出～12.3 g/kg、酪酸で不検出～3.4 g/kg、*iso*-吉草酸で不検出～2.4 g/kg、塩素で 2.7～4.4 g/kg、硝酸で不検出～0.9 g/kg であった。それらの RSD はギ酸で 8.3 %、クエン酸で 9.6 %、酢酸で 9.1 %、乳酸で 7.0 %、酪酸で 10.3 %、*iso*-吉草酸で 3.7 %、塩素で 8.7 %、硝酸で 7.9 %であった (Table 2-5)。

開発した CZE による本法の分析値を確認するため、有機酸と無機陰イオンの LC による分析結果の比較を Table 2-6 に示した。本法と LC における各アナライトの検出状況は同じであった。本法では、不検出であったアナライトを除いて、チモシーサイレージ中の有機酸と無機陰イオンの濃度は 0.8～8.4 g/kg、その RSD は 2.7～9.5 % であった。同様にトウモロコシサイレージ中の有機酸と無機陰イオンの濃度は 0.4～12.3 g/kg、その RSD は 2.9～8.7 % であった。LC でも同様に不検出であったアナライトを除いて、チモシーサイレージ中の有機酸と無機陰イオンの濃度は 0.8～8.5 g/kg、その RSD は 1.4～5.4 % であった。同様にトウモロコシサイレージ中の有機酸と無機陰イオンの濃度は 0.4～11.9 g/kg、その RSD は 2.3～5.1 % であった。CZE による本法と LC により検出した各アナライトの分析値を T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) で比較した結果、有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった (Table 2-6)。

2. 4. 考察

2. 4. 1. BGEM の pH と濃度及び洗浄方法

BGE として、PDC を用いた間接吸光度法を利用した検出による CZE は、サイレージ中の有機酸と無機陰イオンの同時分析に有効であった。有機酸と無機陰イオンの同時分析のために最適な BGE の pH は 12 であり、PDC 濃度は 30 mmol/L であった。この条件で、フマル酸は、クエン酸の直前に検出され干渉した。しかし、フマル酸がサイレージから検出されることはまれであり、サイレージの品質にも影響を与えないので、フマル酸を定量出来ないことは大きな問題では無い。従って、本定量法の分析対象成分は、9 種の有機酸（ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、*n*-吉草酸、*iso*-吉草酸、*n*-カプロン酸、クエン酸、乳酸）、及び、3 種の無機陰イオン（亜硝酸、硝酸、塩素）とした。コンビネーションフラッシュ法は、アナライトの MT の変化による誤認を防ぐため、シンプルフラッシュ法よりも効果があることが判り、また BGE の消費を削減するにも有効であった。間接吸光度法を用いた CZE による本法の 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの LOD はいずれも 0.3 g/kg であり、LOQ はいずれも 1.0 g/kg であった。これらの結果は、これまでに報告のあった CZE による分離と、紫外線吸光度法による検出を利用したサイレージ中の酢酸、乳酸と酪酸の分析法（Buchberger et al., 1997）と同等の値であった。本法は、酢酸、乳酸と酪酸だけでなく、サイレージ添加剤として使用されるギ酸やプロピオン酸、不良発酵の指標となる吉草酸、メトヘモグロビン血症の原因となる硝酸態窒素を同時に定量できる。そのため、Buchberger et al. (1997) の CZE による紫外線吸光度法よりも利用性が高いと考えられる。

2.4.2. 抽出時間及び妨害ピークの除去

試料の処理について、Dunnett の多重比較検定の結果から、抽出時間を 30 分間より長くしても、24 時間の抽出と比較して分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) が無いことが判った。従って、本法の抽出時間は 30 分間とした。弱陰イオン交換樹脂のカラム (Accell Plus CM) による抽出液の前処理は、分析の妨害となるエレクトロフェログラム上のネガティブピークを除去することに効果があった。

2.4.3. 開発した分析法の精度と実用性

5 試験室による共同試験の結果、9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの平均回収率は 93.7~107.9 %、 RSD_r は 1.6~4.8 %、 RSD_R は 3.3~8.1 %、HorRat は 0.8~1.9 となり、本法の妥当性が確認された。

サイレージ (チモシーサイレージ 2 種類とトウモロコシサイレージ 2 種類の計 4 試料) を用いて LC による一般的な有機酸分析法 (Wada et al., 1984)、及び、硝酸分析法 (Hsu et al., 2009) と本法の分析値を比較した。その結果、両分析法による各アナライトの分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。また、1 試料当たり、有機酸分析法 (Wada et al., 1984) の分析時間は 30 分間、その溶離液の使用量は 24 mL、硝酸分析法 (Hsu et al., 2009) の分析時間は 20 分間、その溶離液の使用量は 16 mL であった。一方、CZE を用いた本法の分析時間は 27 分間で、分離に用いる溶液は 4.2 mL (BGEM \times 2 + BGEF) であった。更に、この 4.2 mL の BGE で連続 10 回の分析が可能である。従って、LC と比較すると、CZE による本法は効率的に、試薬の消耗を軽減させて 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンを同時に分析することを可能とした。

2.5. 結論

サイレージ中の 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンを同時定量するための CZE を利用した分析法を開発した。サイレージ中の有機酸と無機陰イオンを精製水で抽出し、カートリッジカラム (Accell Plus CM) による前処理をした後、希釈してろ過した。試料液は BGE として 0.5 mmol/L の CTAH を含む pH 12 の PDC 30 mmol/L を用いた CZE によって分析した。添加回収試験による 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの回収率は 96.1~110.5 % であり、その RSD は 0.4~10.4 % であった。5 試験室による共同試験の結果、その HorRat は 0.8~1.9 であり、本法の妥当性が確認された。サイレージ中の 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンの LOD はいずれも 0.3 g/kg、これらの LOQ はいずれも 1.0 g/kg であった。この最適化された分析法は、27 分間で 9 種の有機酸と 3 種の無機陰イオンを測定することが出来た。

本法は、牛のエネルギーや乳脂肪の原料となる有機酸、及び、酸素欠乏による死亡の原因となるメトヘモグロビン血症の原因物質である硝酸態窒素を同時に測定ができる。そのため、本法は効率的なサイレージの品質管理や飼料設計に有効である。

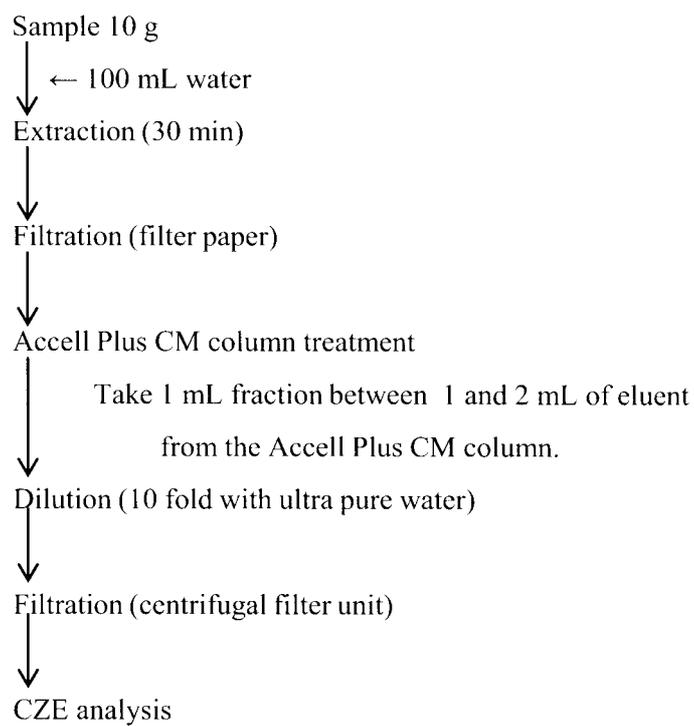


Figure 2-1. Flow charts of developed analysis method.

CZE: capillary zone electrophoresis

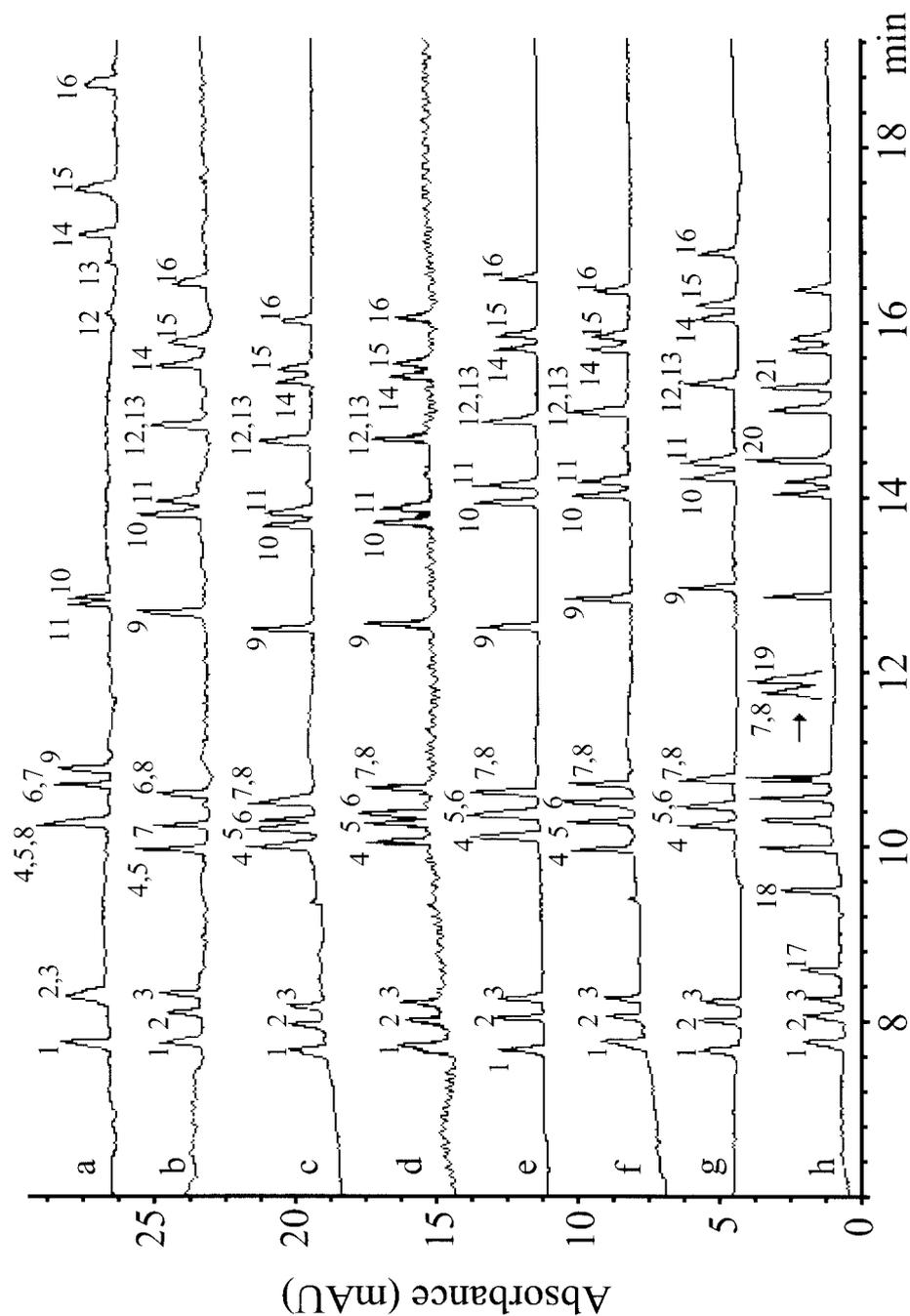


Figure 2-2. Effects of pH and PDC concentration in BGE for separation of organic acids and inorganic anions

Analytical conditions; column: fused-silica 112.5 cm \times 50 μ m I. D. (effective length: 104 cm), Ion mode: negative, Voltage: 30 kV, Sample injection: 6 seconds at 50 mbar, Column temperature: 18 $^{\circ}$ C, Detection: 350 nm, Reference: 275 nm

Samples; a, b, c, d, e, f and g used standard solution A, h used standard solution B.

a: pH 5.0, PDC 20 mmol/L; b: pH 11.5, PDC 20 mmol/L; c: pH 12.0, PDC 20 mmol/L; d: pH 12.5, PDC 20 mmol/L;

e: pH 12.0, PDC 25 mmol/L; f and h: pH 12.0, PDC 30 mmol/L; g: pH 12.0, PDC 35 mmol/L.

Peaks; 1: chloride, 2: nitrite, 3: nitrate, 4: formate, 5: fumarate, 6 citrate, 7: tartrate, 8: malate, 9: acetate, 10: propionate,

11: lactate, 12: *n*-butyrate, 13: *iso*-butyrate, 14: *n*-valerate, 15: *iso*-valerate, 16: *n*-hexanoate, 17: sulfate, 18: carbonate,

19: phosphate, 20: borate, 21: silicate

PDC: 2, 6-pyridinedicarboxylic acid, BGE: background electrolyte

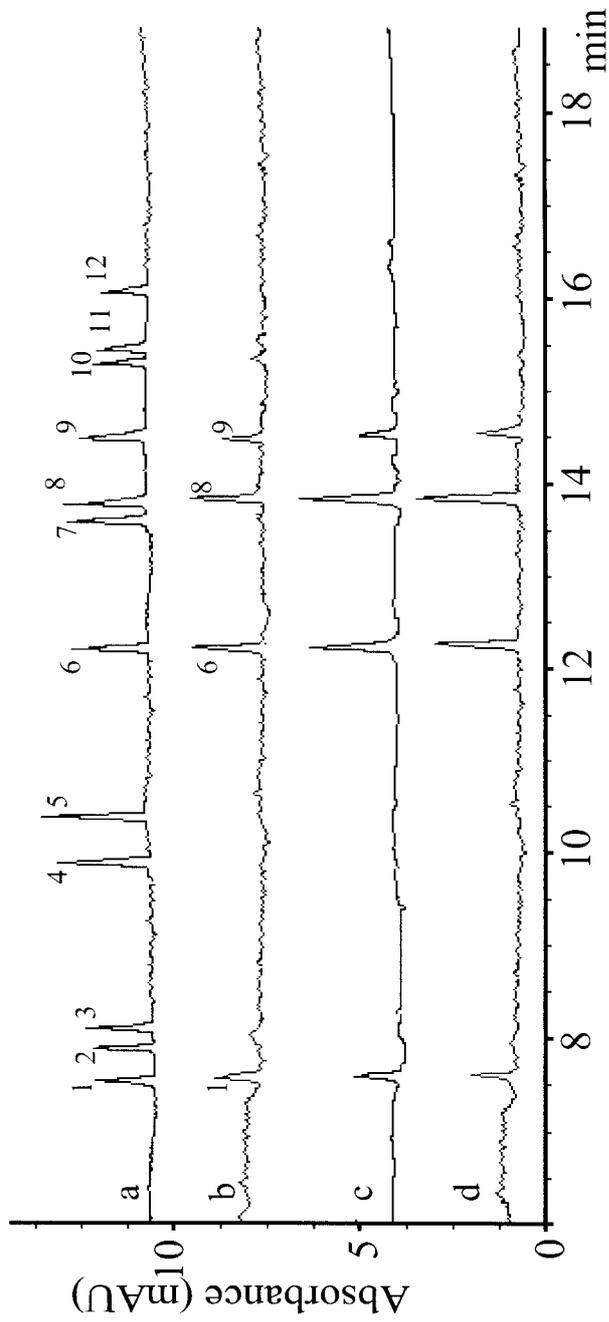


Figure 2-3. Effect of extraction time

a: Standard solution C (50 mg/L)

b: 10 min

c: 30 min

d: 24 h

Peak; 1: chloride, 2: nitrite, 3: nitrate, 4: formate, 5: citrate, 6: acetate, 7: propionate, 8: lactate, 9: butyrate, 10: *n*-valerate, 11: *iso*-valerate, 12: *n*-hexanoate

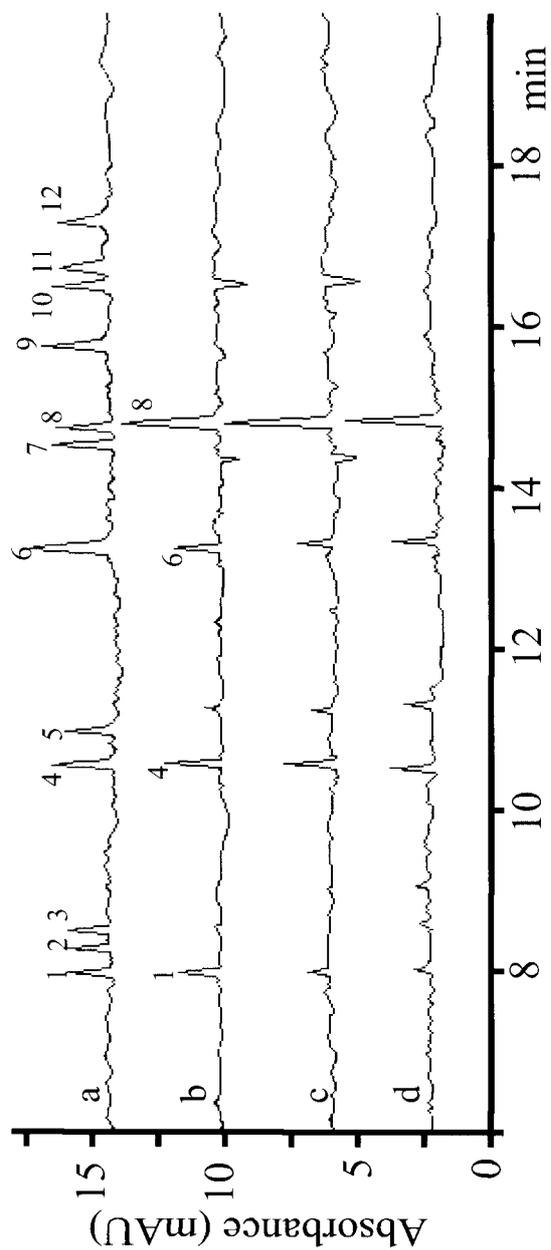


Figure 2-4. Effects of cartridge column use for electropherogram

a: Standard solution C (50 mg/L)

b: Corn silage without column clean-up

c: Corn silage treated with Oasis MCX column.

d: Corn silage treated with Accell Plus CM column.

Peak; 1: chloride, 2: nitrite, 3: nitrate, 4: formate, 5: citrate, 6: acetate, 7: propionate, 8: lactate, 9: butyrate, 10: *n*-valerate, 11: *iso*-valerate, 12: *n*-hexanoate

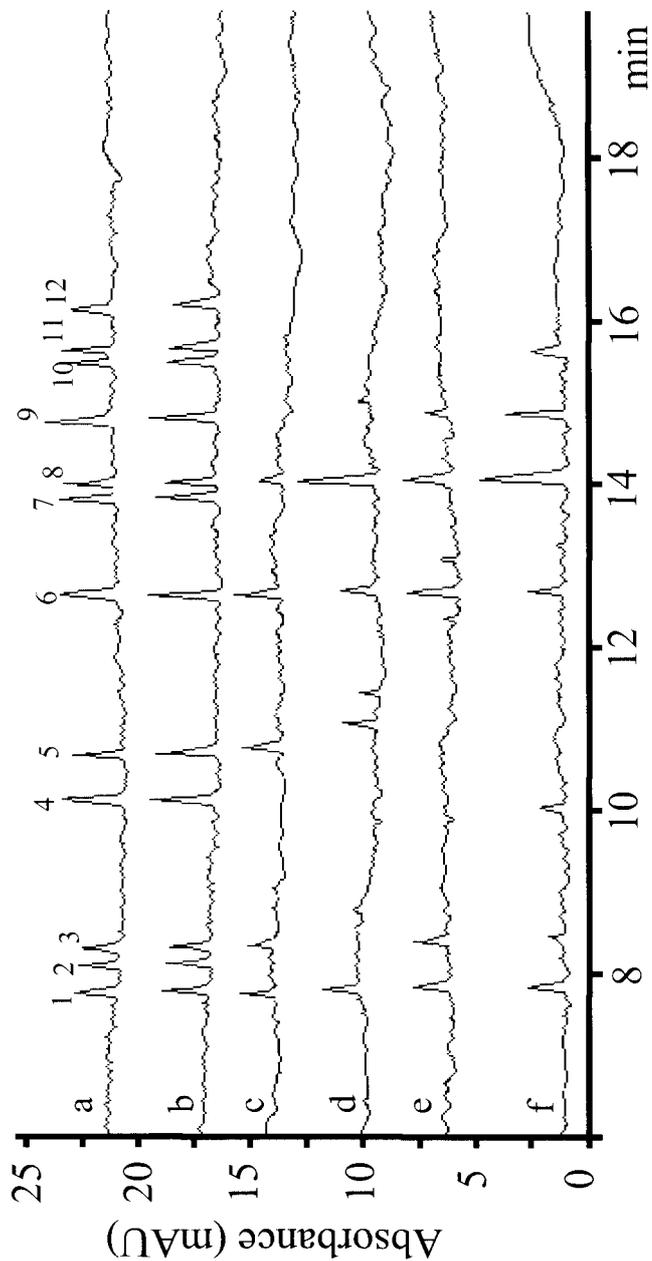


Figure 2-5. Electropherogram of silage samples

a: Standard solution C (50 mg/L)

b: Corn silage with spiked standards C (6.0 g/kg)

c: Timothy silage (one month old)

d: Timothy silage (three months old)

e: Corn silage (one month old)

f: Corn silage (nine months old)

Peak; 1: chloride, 2: nitrite, 3: nitrate, 4: formate, 5: citrate, 6: acetate,

7: propionate, 8: lactate, 9: butyrate, 10: *n*-valerate, 11: *iso*-valerate, 12: *n*-hexanoate

Table 2-1. Examination of flushing methods for migration time

Anions	Column Preconditions					
	Flush with BGEF ^a			Flush with BGEM ^b		
	Drift range of MT (min)	Drift range (min)	Drift range of MT (min)	Drift range of MT (min)	Drift range (min)	Drift range (min)
Chloride	8.06 – 8.13	0.07	8.05 – 8.12			0.06
Nitrite	8.39 – 8.47	0.08	8.39 – 8.44			0.06
Nitrate	8.61 – 8.69	0.07	8.61 – 8.67			0.06
Formate	10.56 – 10.69	0.13	10.58 – 10.62			0.04
Citrate	10.98 – 11.11	0.13	10.99 – 11.03			0.04
Acetate	13.31 – 13.45	0.15	13.30 – 13.34			0.04
Propionate	14.61 – 14.81	0.20	14.63 – 14.68			0.05
Butyrate	15.73 – 15.91	0.18	15.70 – 15.78			0.07
<i>n</i> -Valerate	16.50 – 16.70	0.20	16.47 – 16.55			0.08
<i>iso</i> -Valerate	16.65 – 16.86	0.21	16.62 – 16.71			0.08
<i>n</i> -Hexanoate	17.24 – 17.47	0.24	17.23 – 17.31			0.09

a: A simple flush method with BGEF for 7 min

b: A combination flush method with 3 min BGEF followed by 2 min BGEM from both anode side and cathode side.

BGEF: background electrolyte for flush

BGEM: background electrolyte for migration

MT: migration time

Table 2-2. Examination for extraction time

Anion	10 min		20 min		30 min		40 min		50 min		60 min		24 hours	
	Average (g/kg [†]) (%)	RSD (%)	Average (g/kg [†]) (%)	RSD (%)	Average (g/kg [†]) (%)	RSD (%)	Average (g/kg [†]) (%)	RSD (%)	Average (g/kg [†]) (%)	RSD (%)	Average (g/kg [†]) (%)	RSD (%)	Average (g/kg [†]) (%)	RSD (%)
Chloride	2.0	3.4	2.1	3.4	2.1	1.4	2.1	1.2	2.1	2.4	2.2	5.8	2.1	1.5
P values	0.41		0.96		1.00		1.00		0.99		0.91			
Recovery %	94.4		98.7		101.9		101.1		99.5		104.5		100	
Acetate	7.8	1.0	7.9	3.4	8.5	1.5	8.3	3.3	8.4	0.7	8.4	3.0	8.5	1.4
P values	0.03*		0.04*		0.97		0.99		0.99		1.00			
Recovery %	91.4		92.5		99.7		97.2		99.4		98.3		100	
Lactate	8.2	2.9	8.3	2.2	9.4	2.6	9.0	2.1	9.2	0.5	9.4	4.2	9.4	2.5
P values	0.02*		0.02*		0.93		0.84		0.97		1.00			
Recovery %	86.8		88.1		99.7		95.7		97.6		100.5		100	
Butyrate	2.0	2.0	2.2	3.0	2.4	0.3	2.2	4.1	2.4	4.8	2.3	1.2	2.3	3.1
P values	2.1×10 ⁻³ *		0.18		0.95		0.80		0.89		1.00			
Recovery %	87.3		97.7		103.5		96.3		104.0		101.5		100	

This examination was carried out three times per a sample.

P values were provided by comparison of analytical values from extractions between 24 hours and 10-60 min using Dunnett test (Dunnett, 1964).

*Significant difference ($P < 0.05$) of analytical values from extractions between 24 hours and 10-60 min

Recovery was calculated as ratio for extraction amounts of 24 hours extraction.

†: wet base

RSD: relative standard deviation

Table 2-3. Result of recovery test for 9 organic acids and 3 inorganic anions

Anion	Spike Level (g/kg [†])	Timothy		Italian ryegrass		Perennial ryegrass		Hybrid ryegrass		Corn		Average	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Formate	3.0	110.5	8.5	108.8	2.1	106.3	4.2	108.9	4.7	109.0	8.8	106.8	4.9
	6.0	108.6	0.6	103.1	5.3	102.2	5.9	105.8	3.1	105.6	0.4		
Acetate	3.0	105.4	6.1	105.3	5.6	102.7	6.6	101.6	3.1	103.8	5.1	105.1	4.0
	6.0	107.0	2.5	106.6	4.1	105.6	1.0	103.9	4.1	104.2	4.6		
Propionate	3.0	105.2	3.6	105.0	6.0	106.5	1.0	102.9	3.2	102.1	2.7	102.1	4.1
	6.0	97.6	2.1	97.7	1.5	100.5	1.2	97.8	1.9	102.3	5.6		
Butyrate	3.0	105.5	1.6	104.1	3.1	105.3	3.3	103.9	5.4	101.0	2.7	103.6	3.5
	6.0	104.1	1.1	106.4	4.2	99.2	4.0	105.8	0.6	103.0	5.2		
<i>n</i> -Valerate	3.0	104.4	2.2	99.3	2.1	101.7	4.0	104.9	3.1	107.0	0.9	102.4	3.3
	6.0	100.3	3.2	103.3	4.5	100.8	2.5	102.9	2.5	102.8	4.0		
<i>iso</i> -Valerate	3.0	104.7	2.3	103.5	5.5	107.9	3.9	105.8	10.4	103.6	4.0	103.1	4.9
	6.0	99.2	2.5	102.5	5.5	101.1	4.3	101.4	4.7	102.5	5.2		
<i>n</i> -Hexanoate	3.0	101.1	6.2	101.7	6.5	100.9	3.6	102.5	3.5	109.4	1.4	103.7	4.4
	6.0	102.3	1.2	108.2	1.3	101.8	4.7	106.4	3.0	104.3	6.1		
Lactate	3.0	104.2	5.9	106.6	2.8	106.5	2.3	103.1	5.9	101.8	3.7	101.5	4.7
	6.0	97.1	2.1	97.2	0.5	99.7	4.3	96.1	1.0	98.9	2.5		
Citrate	3.0	103.2	7.2	101.0	5.3	106.1	8.2	109.4	4.8	105.2	3.6	102.3	5.3
	6.0	97.6	1.5	99.3	3.8	104.5	5.4	102.1	5.1	101.4	3.1		
Nitrite	3.0	106.7	7.1	101.1	2.8	102.1	3.7	104.8	3.4	102.3	6.7	103.7	3.9
	6.0	104.5	3.7	105.6	2.0	104.1	2.9	107.3	1.1	103.5	4.1		
Nitrate	3.0	102.0	1.7	99.0	3.0	104.0	0.6	103.7	1.0	109.6	5.0	101.5	4.1
	6.0	100.3	2.8	100.4	1.9	99.1	3.4	99.3	4.9	98.0	3.4		
Chloride	3.0	110.5	3.2	104.6	6.3	103.8	4.0	101.9	5.7	99.9	4.0	105.6	4.1
	6.0	108.9	1.1	103.5	0.7	106.6	1.0	106.9	2.0	106.9	2.8		

For this recovery test, 3.0 and 6.0 mg/kg of 9 organic acids and 3 inorganic anions were spiked in silage samples and analyzed. Recovery shown was the average of three independent experiments and RSD was calculated from three experiments.

†: wet base, RSD: relative standard deviation

Table 2-4. Result of collaborative study

Laboratory	Recoveries (%)												Average recoveries (%)	RSD _f (%)	RSD _R (%)	PRSD _R (%)	HorRat
	A ^a		B ^a		C ^a		D ^a		E ^a								
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2							
Anion	112.9	114.3	107.1	100.0	107.1	100.0	104.3	112.9	112.9	112.9	107.1	107.9	4.3	5.0	4.2	1.2	
Formate	110.0	108.6	104.3	92.9	114.3	104.3	102.9	98.6	105.7	104.3	104.3	104.6	4.8	5.8	4.2	1.4	
Acetate	107.1	105.7	97.1	101.4	104.3	97.1	101.4	104.3	105.7	107.1	107.1	103.1	2.8	3.7	4.2	0.9	
Propionate	105.7	100.0	90.0	97.1	94.3	90.0	104.3	108.6	92.9	97.1	97.1	98.0	3.8	6.9	4.2	1.6	
Butyrate	100.0	102.9	90.0	82.9	104.3	100.0	100.0	91.4	102.9	107.1	107.1	98.1	4.2	8.1	4.2	1.9	
<i>n</i> -Valerate	111.4	110.0	97.1	94.3	111.4	108.6	104.3	105.7	97.1	94.3	94.3	103.4	1.6	7.2	4.2	1.7	
<i>iso</i> -Valerate	111.4	114.3	97.1	92.9	100.0	107.1	100.0	105.7	111.4	111.4	111.4	105.1	3.2	7.2	4.2	1.7	
<i>n</i> -Hexanoate	110.0	104.3	90.0	88.6	102.9	104.3	92.9	92.9	105.7	102.9	102.9	99.4	2.1	8.0	4.2	1.9	
Lactate	97.1	94.3	82.9	85.7	95.7	101.4	97.1	91.4	92.9	98.6	98.6	93.7	3.6	6.4	4.3	1.5	
Citrate	92.9	95.7	92.9	97.1	100.0	94.3	108.6	105.7	92.9	87.1	87.1	96.7	3.3	7.0	4.2	1.6	
Nitrite	101.4	102.9	112.9	105.7	101.4	101.4	114.3	114.3	108.6	107.1	107.1	107.0	2.2	5.3	4.2	1.3	
Nitrate	100.0	95.7	97.1	98.6	94.3	97.1	104.3	97.1	102.9	101.4	101.4	98.9	2.9	3.3	4.2	0.8	
Chloride																	

The result of a collaborative study of 7 g/kg spike for 9 organic acids and 3 inorganic acids in perennial ryegrass silage was shown as recoveries, RSD_f, RSD_R and HorRat.

a: Laboratories analyzed same sample as blind duplicate.

RSD_f: Relative standard deviation of repeatability within laboratory

RSD_R: Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

PRSD_R: predicted relative standard deviations of reproducibility (Horwitz and Albert, 2006)

HorRat: ratio of RSD_R for PRSD_R

Table 2-5. Determination of organic acids and inorganic anions in silage from farmers

Samples	Chloride		Nitrate		Formate		Citrate		Acetate		Lactate		Butyrate		iso-Valerate	
	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)	Mean (g/kg) [†]	RSD (%)
Low moisture	Italian	b [‡] 4.4	5.1	N.D.	N.D.	N.D.	0.7	4.7	N.D.	N.D.	0.4	4.7	N.D.	N.D.		
	ryegrass	c [‡] 4.3	3.9	N.D.	N.D.	N.D.	1.7	4.8	N.D.	2.5	2.4	7.6	N.D.	N.D.		
Timothy	b [‡] 3.3	5.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.1	4.6	N.D.	3.0	3.8	N.D.	N.D.	N.D.			
	c [‡] 4.0	5.0	N.D.	N.D.	N.D.	2.1	3.0	N.D.	4.3	1.9	7.3	N.D.	N.D.			
High moisture	Italian	b [‡] 3.4	3.3	N.D.	N.D.	N.D.	2.0	5.3	N.D.	4.7	2.6	N.D.	N.D.			
	ryegrass	c [‡] 2.7	1.4	N.D.	N.D.	N.D.	2.7	1.2	N.D.	8.2	1.4	10.3	N.D.	N.D.		
Timothy	a [‡] 3.8	5.5	0.8	7.9	N.D.	1.8	9.5	N.D.	3.7	4.0	N.D.	N.D.	N.D.			
	c [‡] 3.6	7.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.6	6.2	N.D.	8.4	2.7	N.D.	N.D.			
Corn	a [‡] 4.1	6.1	0.9	3.8	N.D.	1.5	5.6	N.D.	4.5	7.0	1.8	8.4	N.D.	N.D.		
	c [‡] 3.9	8.7	0.4	7.3	2.6	8.3	5.5	6.0	12.3	3.2	3.4	5.0	2.4	3.7		

This examination was carried out three times per a sample.

†: wet base

‡: Storage period;

a: one month old

b: three months old

c: nine months old

N.D.: not detected (less than 0.3 g/kg in silage)

RSD: relative standard deviation

Table 2-6. Comparison of the analytical values between this method and LC methods using silage from farmers

Samples	Nitrate		Formate		Citrate		Acetate		Lactate		Butyrate		iso-Valerate	
	Mean (g/kg [‡])	RSD (%)	Mean (g/kg [‡])	RSD (%)	Mean (g/kg [‡])	RSD (%)	Mean (g/kg [‡])	RSD (%)	Mean (g/kg [‡])	RSD (%)	Mean (g/kg [‡])	RSD (%)	Mean (g/kg [‡])	RSD (%)
This method	Timothy ^x	a [‡] 0.8	7.9	N.D.	1.8	9.5	2.6	9.1	3.7	4.0	N.D.	N.D.	N.D.	
	P values	0.57		0.13		0.26		0.15						
Corn ^y		b [‡] N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.6	6.2	8.4	2.7	N.D.	N.D.	N.D.	
	P values	0.54		0.62		0.96		0.78		0.95				
LC method		b [‡] 0.4	7.3	2.6	8.3	0.6	5.7	5.5	6.0	12.3	3.2	3.4	5.0	2.4
	P values	0.65		0.45		0.84		0.62		0.24		0.18		0.62
Timothy ^x		a [‡] 0.8	1.9	N.D.	2.0	4.9	2.5	5.4	3.7	2.6	N.D.	N.D.	N.D.	
	P values	N.D.		N.D.		N.D.		4.6		4.2		8.5		1.4
Corn ^y		a [‡] 0.9	2.3	N.D.	1.6	3.4	3.1	3.2	4.5	3.2	1.8	3.4	N.D.	
	P values	0.4		3.6		2.6		4.5		5.1		3.5		3.1

This examination was carried out three times per a sample.

P values were provided by comparison of analytical values between this method and LC method using T test (Student, 1908).

No sample had significant difference ($P < 0.05$) in analytical values between this method and LC method.

†: wet base, ‡: Storage period; a: one month old, b: nine months old

x and y: The comparison of analytical values between this method and LC method (organic acid; Wada et al. (1984) and nitrate; Hsu et al. (2009)) using same silage samples was performed.

LC: high performance liquid chromatography

N.D.: not detected (less than 0.3 g/kg in silage)

RSD: relative standard deviation

第3章 飼料中の中性デタージェント繊維の分析法

3.1. 背景

中性デタージェント繊維（NDF）は、反芻動物が利用できるセルロース、ヘミセルロース、及び、リグニンを含む繊維の分画であり、反芻動物の体調を維持するために重要な成分である（Robertson and Van Soest, 1981）。反芻動物は、ルーメンで生成した酢酸などの揮発性脂肪酸（VFA: volatile fatty acid）をエネルギーとして利用し、また乳脂肪の原料としている（Weiss et al., 2003; Vlaeminck et al., 2006）。ルーメンで生成する VFA は、牧草などの繊維質飼料を給与したときには主に酢酸であり、ルーメンの pH は 7.0 付近である（橋爪, 1969; Hino et al., 1991）。一方、澱粉質飼料を給与したときには酢酸に代わり乳酸の生成量が多くなり、ルーメンの pH は低下する（篠崎、菅原, 1961; Hino et al., 1991）。泌乳牛の場合には、乳生産に多くの VFA が必要なため澱粉質を含む濃厚飼料の給与が必要となる（Firkins et al., 2006）。しかし、濃厚飼料を過剰に摂取すると生成した VFA はルーメンの許容量を超え、さらに乳酸の増加はルーメンの pH を低下させる（Russell and Hino, 1985; Colman et al., 2010）。ルーメンの pH が 6 以下になると繊維を分解する微生物の活性が低下するため、反芻動物の特徴である繊維の消化能力が低下する（Russell and Hino, 1985; 浅沼、日野, 2004b）。これにより、牛の食欲は減退して、その乳量や乳脂率は減少し、急性症状の場合には消化器障害をまねくルーメンアシドーシスとなることがある（Russell and Hino, 1985; 浅沼、日野, 2004b; Colman et al., 2010）。牛の健康を維持して安定した乳生産を行うためには、ルーメンの VFA 量と pH の管理が重要となる（Zebeli et al., 2008）。そのために、ルーメン発酵の管理指標として、反芻動物が利用できる繊維である NDF の飼料中の含有量を知ることは乳牛の飼養管理において重要

である (Zebeli et al., 2008)。

NDF の分析法の開発は、1960 年代から Van Soest らによって進められ、1967 年に粗飼料中の総繊維を対象とした分析法が示された (Van Soest and Wine, 1967)。その後、最適な亜硫酸ナトリウムの添加量 (Hintz et al., 1996) や澱粉質飼料への適用のためにアミラーゼを利用した修正法 (Robertson and Van Soest, 1981) が報告された。しかし、この修正法は、アミラーゼによる処理に要する時間が長く、NDF の構成成分のペクチンを加水分解して NDF の量を過少評価することが報告された (Ferreira et al., 1983)。

Mertens は、これらの問題を解決した耐熱性 α -アミラーゼ処理した NDF (aNDF: NDF with heat-stable α -amylase treatment) の分析法の標準化を提案し、2002 年に飼料作物 11 種類を用いた 14 試験室による共同試験を実施しその妥当性を確認した (Mertens, 2002)。その結果、この aNDF の分析法 (Mertens, 2002) は標準化されて OMA に収載された (AOAC International, 2005c)。AOAC International (2005c) の分析法 (AOAC 法) の中で、試料中の灰分を除いた有機物分画中の aNDF は aNDFom と示され、試料中の aNDF と区別して表記することが推奨されている (Uden et al., 2005)。AOAC 法の耐熱性 α -アミラーゼの添加は、試料中の澱粉を除去するため、次のように行っている。1 回目のアミラーゼは、試料の ND 溶液混合物に、加熱開始から 4~5 分経ち ND 溶液が沸騰したところで添加している。2 回目のアミラーゼ添加は、60 分間還流した ND 溶液をフリット式ろつぼによる吸引ろ過後、熱水をそのフリット式ろつぼに容量の半分程度まで満たしたところに添加している。更に、内容物のろ過が難しい時には、3 回目のアミラーゼの添加として、繊維残渣の洗浄に用いる熱水に添加している。また、繊維残渣の乾燥及び灰化条件は、それぞれ 105 °C で 8 時間及び 500 °C で 5 時間 (炭素が無くなるまで) である。

しかしこの AOAC 法には、主に以下の 3 点の問題が残っている。ま

ず、1 回目のアミラーゼ添加においては、添加が遅れた場合に遊離した澱粉が糊化してその除去が難しくなること。つぎに、還流後の ND 溶液のフリット式るつぼでのろ過が困難となる場合があること。また、乾燥、灰化に要する時間を含めて、aNDFom の分析時間が長いことである。

これらの欠点を改善し、より使い易い分析法を目指して、アミラーゼの添加の遅れやろ過の困難さを軽減し、aNDFom の分析を精度良く行うために、アミラーゼの添加方法を検討した。また、分析の所要時間を短縮し効率化を図るため、飼料分析基準（農林水産省, 2008）の粗繊維の乾燥条件（ 135 ± 2 °C で 2 時間）、及び、灰分条件（ 535 ± 15 °C で 2 時間）の aNDFom 分析法への適用性も検討した。

さらにこのアミラーゼの添加時期等を変更した aNDFom の分析法の妥当性を確認するため、乳牛用配合飼料とアルファルファペレットを用いて、15 試験室の共同試験を行った。

3. 2. 実験

3. 2. 1. 試料及び試薬の調製

3. 2. 1. 1. 試料

コーングリッツ、トウモロコシ、マイロ、コーングルテンフィード、大麦、小麦、ライ麦、ごま油かす、しょう油かす、大豆油かす、乳牛用配合飼料、アルファルファペレット、オーチャードグラス、イタリアンライグラス、及び、チモシーは、国内の配合飼料製造業者又は飼料輸入業者から入手したものをを用いた。それらの試料は、粉砕器（ZM 100; Retsch GmbH., Haan, Germany）で 1.0 mm のスクリーンを通過するように粉砕した。油脂分が多い、ごま油かす、しょう油かす、大豆油かすは、試料をフリット式るつぼに採取後、試料が浸かる量のアセトンの入った容器に

入れてラップで覆い、1 昼夜室温で放置して脱脂してから分析した。

妥当性確認試験のための乳牛用配合飼料は配合飼料工場から、アルファアルファペレットは飼料輸入業者から入手したものをを用いた。

3. 2. 1. 2. 試薬

使用した試薬は試薬特級を用いた。使用したすべての水は、水道水を純水製造装置（RFD240NA; アドバンテック）で処理した水（精製水）を用いた。

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物、四ホウ酸ナトリウム十水和物、リン酸水素二ナトリウム、*n*-ドデシル硫酸ナトリウム、トリエチレングリコールは関東化学製を、亜硫酸ナトリウム、ヨウ化カリウム、ヨウ素は和光純薬製を使用した。

ND 溶液は、エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム二水和物 18.6 g、四ホウ酸ナトリウム十水和物 6.8 g、及び、リン酸水素二ナトリウム 4.6 g を量って 1 L の全量フラスコに入れ、水を約 500 mL 加えて溶かした。この液に *n*-ドデシル硫酸ナトリウム 30.0 g、トリエチレングリコール 10 mL、及び、水を約 490 mL 加えて混合した後、更に全量フラスコの標線まで精製水を加えて調製した。

アミラーゼ保存液は、*Bacillus licheniformis* 由来の市販耐熱性 α -アミラーゼ（A3403; Sigma, St Louis, MO, USA）1 mL を 10 mL の褐色全量フラスコに入れ、精製水で希釈し調製した。アミラーゼ使用液は、ND 溶液への添加用として aNDFom の分析時に 1 回の添加量が 2 mL（1 試料当たり 4 mL）となるようにアミラーゼ保存液を精製水で 20 倍に希釈して調製した。ヨウ素溶液は、100 mL の精製水にヨウ化カリウム 2 g とヨウ素 1 g を溶かして調製した。

3. 2. 2. 装置

分析条件の検討には、ビーカーを用いて還流する装置として 6 組の加熱部と冷却器が付いたビーカー還流装置 (CF-6; 三紳工業, 神奈川) を、分析前に精製水 50 mL で 10 分間還流洗浄してから使用した。ろ過に用いたフリット式ろつぼ (pore size 40 to 90 μm , USP2; Foss, Hillerød, Denmark) は、分析の前に次の処理をしてから使用した。フリット式ろつぼを洗剤と熱した精製水で良く洗浄した。次に、洗浄したろつぼを耐圧ビンにシリコン樹脂製ロートアダプター (No. 5; 大洋工業, 東京) で逆さに接続して、上部から精製水を加えて耐圧ビンを引圧にする洗浄操作を 4~5 回行った後、 535 ± 15 °C で 2 時間灰化处理した。

3. 2. 3. アミラーゼの添加条件の検討

aNDFom の分析に必要なアミラーゼの添加総量、添加回数と添加時期を検討した。コーングリッツ 0.5 g を 500 mL のビーカーに量り、ND 溶液 50 mL を加えた。アミラーゼを 1 回のみ添加する実験として、ビーカーを還流装置にセットした直後に個々のビーカーにアミラーゼ保存液 0、25、50、100、250、500、1,000、1,500、2,000、及び、4,000 μL を加えて、シリコン樹脂製のポリスマン (5 × 190 mm, 大洋工業) で攪拌した。これらを 1 時間還流して、ビーカーを還流装置から下ろした。

アミラーゼを 2 回添加する実験として、ビーカーを還流装置にセットした直後にアミラーゼ保存液 0、25、50、100、250、及び、500 μL をそれぞれ添加してポリスマンで攪拌した。これらのビーカーを還流装置で、1 時間還流した後、ビーカーを還流装置から下ろした。次に、ビーカーに加熱開始直後に添加した量と同量のアミラーゼ保存液を加え、軽く振り混ぜた後 60 秒間静置した。ガラス繊維濾紙 (GA-100; アドバンテック) を用い、内容物を 100 mL ビーカーへ移した。ろ液の入ったビーカーを氷

浴中で 5 分間冷却した後、20 °C の恒温槽で常温に戻した。ビーカーを白紙の上に置き、ヨウ素液 0.5 mL をビーカーに加え速やかに攪拌した。その後、90 秒間静置した後 30 秒以内に澱粉の残留の有無を、目視でその溶液の色を観察することで判定した。

3. 2. 4. アミラーゼと亜硫酸ナトリウムの添加効果の検討

添加方法を変更した aNDFom の分析法におけるアミラーゼの添加による澱粉除去効果と亜硫酸ナトリウムの添加による蛋白質除去効果について検討した。この検討には、トウモロコシ、マイロ、コーングルテンフィード、大麦、小麦、ライ麦、ごま油かす、しょう油かす、大豆油かす、アルファルファペレット、乳牛用配合飼料、オーチャードグラス、イタリアンライグラス、チモシーの 14 種類の試料を用いた。検討は各試料についてアミラーゼと亜硫酸ナトリウムの両者を添加する A 処理、アミラーゼのみを添加する B 処理、及び、亜硫酸ナトリウムのみを添加する C 処理で行った。これらの処理による効果は、各処理から得られた ND 溶液処理残渣 (NDR: ND residue) の値から検討した。なお、亜硫酸ナトリウムの添加量は、Hintz et al. (1996) の検討で採用された 0.5 g とした。また同時に本法と AOAC 法による分析値が同等であることを確認するため、AOAC 法に従い同じ 14 種類の試料の分析を行った。A、B と C 処理から得られた NDR の分析値の比較は、Tukey の多重比較検定 (Kramer, 1957; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) で行った。また本法 (A 処理) と AOAC 法の aNDFom の分析値の比較は、T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) で行った。

3. 2. 5. 妥当性確認

共同試験は、試料としてアルファルファペレットと乳牛用配合飼料を

用いて 15 試験室（6 飼料検査機関、5 民間会社、3 研究機関、1 大学）で実施した。共同試験の参加者の使用方法は、ビーカーを用いた還流装置による方法（ビーカー還流法）が 10 試験室、フリット式るつぼを用いた還流装置による方法（るつぼ還流法）が 5 試験室であった。各試験室は、各試料についてブラインド方式で 2 回分析した。Fig. 3-1 に、この試験に用いた分析法（Fig. 3-1A）と AOAC 法（Fig. 3-1B）の手順を示した。

ビーカー還流法は、試料 0.5 g (W_1) を正確に量って 500 mL のビーカーに入れ、亜硫酸ナトリウム 0.5 g と ND 溶液 50 mL を加えた。あらかじめ加熱した還流装置にビーカーをセットして、直ちにアミラーゼ使用液 2 mL をビーカーに加えてポリスマンで攪拌した。内容物の沸騰後、蒸発する水分を精製水で補いながら沸騰する温度で 1 時間還流した。ビーカーを還流装置から下ろし、更にアミラーゼ使用液 2 mL をビーカーに加え、軽く振り混ぜた後 60 秒間静置した。ビーカーの内容物の上澄み液の 30~40 mL をフリット式るつぼ内に移し、ガラス棒（5×150 mm、松浦製作所、東京）で攪拌しながら吸引ろ過した。次に、全てのビーカーの内容物をそのフリット式るつぼに入れて吸引ろ過した。

るつぼ還流法は、試料 0.5 g (W_1) を正確に量って フリット式るつぼに入れ、亜硫酸ナトリウム 0.5 g を加えてあらかじめ加熱した加熱部にセットし、ND 溶液 50 mL を加えた。遅滞なく、アミラーゼ使用液 2 mL を加え、還流装置付属のバックプレッシャー機能で攪拌した後、1 時間還流した。還流装置の加熱を切ってから、フリット式るつぼにアミラーゼ使用液 2 mL を加え、還流装置の付属のバックプレッシャー機能によって軽く攪拌後 60 秒間静置した。フリット式るつぼの内容物を還流装置の吸引ろ過機能によって最小限の吸引によってろ過し、装置から下ろした。

両方法ともに、フリット式るつぼ中の繊維残渣を熱した精製水 40 mL

ずつで 3 回洗浄し、さらにアセトン 20 mL で 4 回洗浄した後、アセトン臭がなくなるまで風乾した。NDR は 135 ± 2 °C で 2 時間乾燥後、 535 ± 15 °C で 2 時間灰化後、デシケーター内で放冷した後、重さを正確に量った。

次式により、aNDFom を算出した。

$$\text{aNDFom (g/kg)} = 1,000 \times (W_2 - W_a - W_3 + W_b) / W_1$$

W_a : 乾燥後のフリット式るつぼの重量 (g)

W_b : 灰化後のフリット式るつぼの重量 (g)

W_1 : 試料採取量 (g)

W_2 : 乾燥後の試料の処理残渣とフリット式るつぼを合わせた重量 (g)

W_3 : 灰化後の試料の処理残渣とフリット式るつぼを合わせた重量 (g)

ビーカー還流法とるつぼ還流法による aNDFom の分析値の比較は、T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) で行った。分析値の精度は、 RSD_r と RSD_R によって示した。濃度から推定する $PRSD_R$ は修正された Horwitz の式 (Thompson, 2000; Horwitz and Albert, 2006) を用いて計算した。共同試験による妥当性は RSD_R を $PRSD_R$ で除して算出する HorRat (McClure and Lee, 2003) によって評価した。

3. 3. 結果

3. 3. 1. アミラーゼの添加条件

アミラーゼを ND 溶液の加熱開始直後の 1 回添加した区では、全ての試料 (アミラーゼ保存液の添加量で 0~4,000 μL) でヨウ素デンプン反応が陽性となった (Table 3-1)。しかし、加熱開始直後と還流終了直後の 2 回に分けて、アミラーゼを添加した区では、200 μL 以上のアミラーゼ保存液 (またはその相当量のアミラーゼ使用液) を添加した試験区 (200、500、1,000 μL 添加区) でヨウ素デンプン反応が陰性となった (Table 3-1)。ま

た、アミラーゼを沸騰前に添加せずに還流を行うと、遊離した澱粉がピーカー又はフリット式るつぼの底部に固まり、その後にアミラーゼを添加しても容易にその澱粉を除去することが出来なかった。

3.3.2. アミラーゼと亜硫酸ナトリウムの添加効果

aNDF の分析におけるアミラーゼと亜硫酸ナトリウムの効果を検討した結果を Table 3-2 に示した。各試料にアミラーゼと亜硫酸ナトリウムを共に添加した A 処理の NDR の分析値は 66~579 g/kg、その RSD は 0.3~3.8 % であった。アミラーゼのみを添加した B 処理の NDR の分析値は 80~595 g/kg、その RSD は 0.1~8.4 % であった。亜硫酸ナトリウムのみを添加した C 処理の NDR の分析値は 70~580 g/kg、その RSD は 1.5~14.1 % であった。

A、B と C 処理による NDR の分析値の比較は、Tukey の多重比較検定 (Kramer, 1957; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) で行った。アミラーゼ存在下で、亜硫酸ナトリウムの添加効果を確認するために、A 処理と B 処理による NDR の分析値を比較した。その結果、トウモロコシ、マイロ、大豆油かす、ごま油かす、しょう油かす、及び、アルファルファペレットで A 処理と B 処理の NDR の分析値に有意差 ($P<0.05$) があった。それらの試料はすべて A 処理 より B 処理の NDR の分析値の方が 7~31 % 程度高かった (Table 3-2)。

亜硫酸ナトリウム存在下で、アミラーゼの添加効果を確認するために、A 処理と C 処理による NDR の分析値を比較した。その結果、トウモロコシ、マイロとしょう油かすで A 処理と C 処理の NDR の分析値に有意差 ($P<0.05$) があった。トウモロコシ、マイロとしょう油かすでは、A 処理より C 処理の NDR の分析値の方が、それぞれ 5、15 と 10 % 程度高かった (Table 3-2)。

アミラーゼと亜硫酸ナトリウムをそれぞれ単独で添加した際の効果を確認するために、B 処理と C 処理による NDR の分析値を比較した。その結果、トウモロコシ、ごま油かす、アルファルファペレット、イタリアンライグラス、及び、チモシーで B 処理と C 処理の NDR の分析値に有意差 ($P < 0.05$) があった。これらの試料では C 処理より B 処理の NDR の分析値の方が 4~18 % 程度高かった (Table 3-2)。

3.3.3. 本法と AOAC 法の分析値の比較

本法の分析値と比較するため、14 種類の試料を AOAC 法によって分析を行った結果、aNDFom の分析値は 64~569 g/kg、その RSD は 0.4~4.0 % であった (Table 3-2)。T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) の結果、本法 (A 処理) と AOAC 法による aNDFom の分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった (Table 3-2)。

3.3.4. 妥当性確認の結果

本法の妥当性を確認するために、共同試験をアルファルファペレットと乳牛用配合飼料を用いて 15 試験室で行い、その結果を Table 3-3 に示した。ビーカー還流法によるアルファルファペレットの aNDFom の分析値は 387 g/kg、その RSD_r は 1.0 % であり、乳牛用配合飼料の aNDFom の分析値は 145 g/kg、その RSD_r は 2.7 % であった。るつぼ還流法によるアルファルファペレットの aNDFom の分析値は 390 g/kg、その RSD_r は 1.6 % であり、乳牛用配合飼料の aNDFom の分析値は 144 g/kg、その RSD_r は 3.3 % であった。T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) でビーカー還流法とるつぼ還流法による aNDFom の分析値を比較した結果、P 値はアルファルファペレットで 0.32、乳牛用配合飼料で 0.56 であり、両方法による分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。

アルファルファペレットの aNDFom の分析値は 388 g/kg、その RSD_r は 1.3 %、RSD_R は 1.3 %、HorRat は 0.8 であった。また、乳牛用配合飼料の aNDFom の分析値は 145 g/kg、その RSD_r は 2.9 %、RSD_R は 2.9 %、HorRat は 1.1 となった (Table 3-3)。Horwitz and Albert (2006) の中で HorRat の経験的な許容範囲は 0.5~2.0 と示されているので、AOAC 法をベースにアミラーゼの添加方法、及び、乾燥、灰化条件の変更した本法の妥当性が確認された。

3.4. 考察

3.4.1. アミラーゼの添加時期

アミラーゼを 2 回、加熱開始直後と還流終了直後に添加する方法に変更することにより、aNDFom は問題なく分析することが出来た (Table 3-1)。また、本法では、ND 溶液のろ過時に困難は生じなかったため、洗浄液へのアミラーゼの 3 回目の添加 (AOAC International, 2005c) は行う必要が無かった。

3.4.2. アミラーゼと亜硫酸ナトリウムの必要性

亜硫酸ナトリウムのみを添加した場合、Table 3-2 に示したように、澱粉質飼料中の澱粉の除去は十分では無かった。そのため、NDR の量を過大に評価することになった。しかし、亜硫酸ナトリウムとアミラーゼを共に添加した場合には、ND 溶液中に残存していた澱粉をアミラーゼによって除去することが出来た。また Cherney et al. (1989) は、アミラーゼの添加を単にろ過を容易にする効果であるとし、NDF の分析値に影響を与えないと報告した。この研究においても、14 試料中の 12 試料でアミラーゼの添加は ND 溶液のろ過を容易にし、また aNDFom の分析値の RSD

を小さくすることを示した。しかし、アミラーゼのみを添加した場合には、穀類（トウモロコシ、マイロ、大麦、小麦）や加熱加工した飼料（大豆油かす、ごま油かす、しょう油かす、アルファルファペレット）で澱粉を除去することが難しかった。この結果は、Hintz et al. (1996) が行った亜硫酸ナトリウムの効果を検討した結果と同様であった。この結果、亜硫酸ナトリウムとアミラーゼは、ND 溶液に含まれる試薬以外に、飼料中の aNDFom を測定するために重要な要素であることが確認された。更に、Robertson and Van Soest (1981) は、aNDFom の分析においてアミラーゼ存在下の亜硫酸ナトリウムの効果を示し、亜硫酸ナトリウムのみ又はアミラーゼのみの添加では過大な aNDFom の値となることを示した。これらの aNDFom の分析における亜硫酸ナトリウムとアミラーゼの効果は、本研究においても確認した。また、aNDFom の分析値に対する亜硫酸ナトリウムの効果は、穀類、植物性油かす類や食品加工処理残渣などの試料においても有効であった。

3.4.3. 開発した分析法の精度と実用性

AOAC 法による 14 試料中の aNDFom の分析値は 64~569 g/kg、その RSD は 0.4~4.0 % であり、本法の aNDFom の分析値は 66~579 g/kg、その RSD は 0.3~3.8 % であった (Table 3-2)。本法 (A 処理) と AOAC 法の aNDFom の分析値の T 検定による比較において有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。よって、本法と AOAC 法の分析値は同等の結果を得ることが示された。

15 試験室による共同試験の結果を次に示した。アルファルファペレットの aNDFom の分析値は 388 g/kg、その RSD_r は 1.3 %、 RSD_R は 1.3 %、HorRat は 0.8 であった。乳牛用配合飼料の aNDFom の分析値は 145 g/kg、その RSD_r は 2.9 %、 RSD_R は 2.9 %、HorRat は 1.1 であった。これらの

結果から、本法の妥当性が確認された。また Mertens の共同試験の結果 (Mertens, 2002) は、アルファルファサイレージの aNDFom の RSD_r 、 RSD_R 、HorRat はそれぞれ 2.3 %、2.3 %、1.0 であり、乳牛用配合飼料のそれらはそれぞれ 5.6 %、6.5 %、2.4 であった。共同試験におけるこの 2 つの方法の分析結果の RSD_r 、 RSD_R 、HorRat には差がなく、これらの方法の分析精度は同等であった。

6 試料を分析した時の本法 (Fig. 3-1A) と AOAC 法 (Fig. 3-1B) の所要の分析時間を比較した。その結果、ND 溶液の加熱開始から精製水及びアセトンによる NDR の洗浄操作の前までの分析時間は、本法は 90 分間であるのに対して AOAC 法は 120 分間であった。更に、乾燥及び灰化時間は、本法は共に 2 時間であるのに対して AOAC 法はそれぞれ 8 時間及び 5 時間であった。これらの結果から、AOAC 法を基に行ったアミラーゼの添加方法と乾燥、灰化条件の変更は、aNDFom の分析の問題であった ND 溶液における澱粉の糊化やろ過の困難さを軽減し、分析時間を大幅に短縮する効果があった。

3.5. 結論

aNDFom は、亜硫酸ナトリウム存在下で、アミラーゼを ND 溶液の加熱開始直後と還流終了直後の 2 回添加する方法によって、澱粉の糊化やろ過の問題が無く、精度良く分析することが出来た。また、乾燥、灰化条件の変更は aNDFom の分析時間を画期的に短縮した。

14 種類の試料を用いて、本法と AOAC 法による aNDFom の分析値を比較した結果、有意差 ($P \geq 0.05$) を示した試料は無かった。また 15 試験室による共同試験の結果、その HorRat は 0.8~1.1 であり、本法の妥当性が確認された。

本法は、乳牛の健康管理に重要な飼料の栄養素である aNDFom を高精

度に短時間で測定を行えるため、乳生産のための迅速な飼料設計、及び、家畜の栄養管理に有効である。

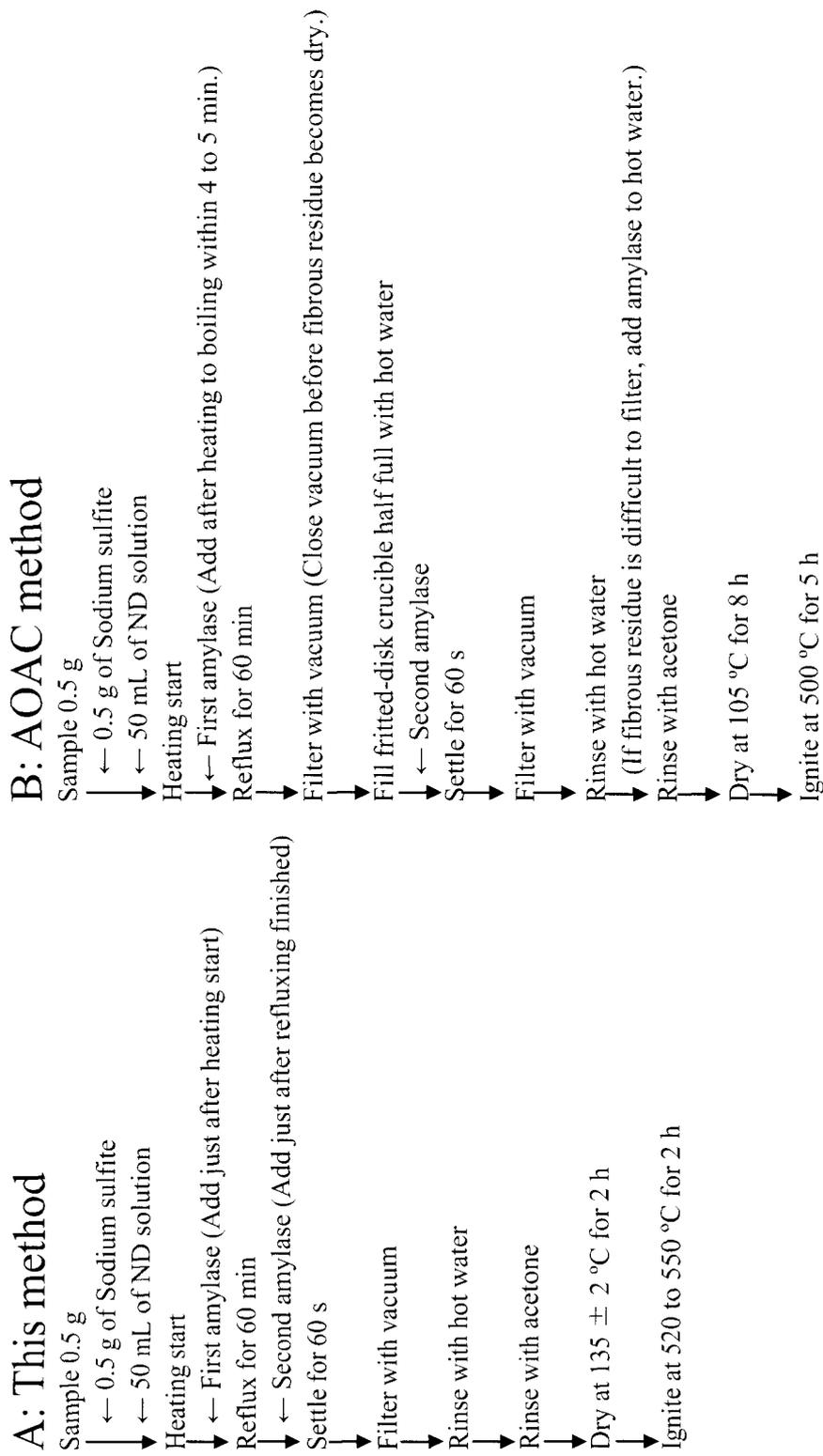


Figure 3-1 . Flow charts of this modified method and AOAC method

AOAC method: AOAC International (2005c)

ND solution: neutral detergent solution

Table 3-1. Examination for amounts, times and timings of amylase addition

Single addition ^a		Twice addition ^b	
Amounts of amylase stock solution (μL)	Presence of starch	Amounts of amylase stock solution (μL)	Presence of starch
0	+	0	+
25	+	50 (25 \times 2)	+
50	+	100 (50 \times 2)	+
100	+	200 (100 \times 2)	-
250	+	500 (250 \times 2)	-
500	+	1000 (500 \times 2)	-
1000	+		
1500	+		
2000	+		
4000	+		

a: Amylase was added just once after boiling.

b: Amylase was added twice, first just after start to heat and second after finish refluxing twice.

+: Purple, pink-amber or amber

-: Pale yellow

ND solution: neutral detergent solution

Table 3-2. Effects of amylase and sodium sulfite use for NDR

Samples	Treatment A		Treatment B		Treatment C		aNDFom*		P values			
	Mean (g/kg)	RSD (%)	Mean (g/kg)	RSD (%)	Mean (g/kg)	RSD (%)	Mean (g/kg)	RSD (%)	P _a	P _b	P _c	P _M
Corn grain	79	2.3 ^{a,b}	88	1.4 ^{a,c}	83	2.2 ^{b,c}	78	3.3	1.8 × 10 ⁻⁴	0.02	0.02	0.53
Milo grain	85	3.2 ^{a,b}	99	7.6 ^{a,b}	98	5.9	84	4.0	0.02	0.02	0.96	0.35
Barley grain	219	2.0	216	5.3	226	7.8	207	2.0	0.94	0.73	0.53	0.06
Wheat grain	103	3.5	115	8.4	103	7.7	99	1.9	0.12	1.00	0.11	0.07
Rye grain	145	2.7	148	4.4	148	4.5	143	2.3	0.65	0.76	0.98	0.24
Soybean meal	66	3.2 ^a	80	5.1 ^a	70	14.1	64	3.1	0.04	0.75	0.41	0.39
Sesame meal	224	3.2 ^a	293	4.9 ^{a,c}	239	3.3 ^c	221	2.9	0.01	0.43	0.03	0.71
Soy sauce cake	315	0.6 ^{a,b}	337	1.6 ^a	346	1.5 ^b	311	1.1	0.03	0.01	0.27	0.49
Corn gluten feed	359	3.2	374	5.4	373	4.8	349	0.7	0.46	0.52	0.99	0.17
Alfalfa pellet	271	2.4 ^a	300	3.6 ^{a,c}	278	3.5 ^c	271	2.1	4.3 × 10 ⁻⁴	0.59	0.02	0.96
Orchard grass	579	3.0	595	2.9	580	2.8	569	2.7	0.43	1.00	0.46	0.29
Timothy	513	0.3	527	0.1 ^c	506	1.6 ^c	508	0.4	0.13	0.39	0.04	0.06
Italian ryegrass	545	0.7	561	0.8 ^c	540	1.5 ^c	535	1.0	0.15	0.63	0.07	0.37
Dairy mixed feed	142	3.8	151	4.6	142	4.3	138	3.0	0.58	0.89	0.35	0.39

This examination was carried out four times per a sample. AOAC method (AOAC International, 2005c) was performed for comparing aNDFom values between AOAC method and this method (Treatment A). Treatment A: NDR (aNDFom) values treated both amylase and sodium sulfite; Treatment B: NDR values treated only amylase; Treatment C: NDR values treated only sodium sulfite. Tukey test (Kramer, 1957) was used to compare NDR values among Treatment A, B and C; T test (Student, 1908) was used to compare aNDFom values between this method and AOAC method. P_a values provided by comparison of NDR values between Treatment A and B; P_b values provided by comparison of NDR values between Treatment A and C; P_c values provided by comparison of NDR values between Treatment B and C; P_M values provided by comparison of NDR values between Treatment A and AOAC method. a: Significant difference (P<0.05) of NDR values between Treatment A and B; b: Significant difference (P<0.05) of NDR values between Treatment A and C; c: Significant difference (P<0.05) of NDR values between Treatment B and C. No sample had significant difference (P<0.05) in aNDFom values between this method (Treatment A) and AOAC method. * aNDFom values of AOAC method. aNDFom: neutral detergent fiber treated with heat stable α-amylase, NDR: neutral detergent residue, RSD: relative standard deviation.

Table 3-3. Result of collaborative study

Laboratory. No.	Alfalfa pellet (g/kg) ^a		Dairy mixed feed (g/kg) ^a	
	1	2	1	2
1	385	392	148	143
2	383	385	148	135
3	386	388	145	140
4	387	386	141	140
5	385	381	142	150
6	380	390	149	144
7	381	386	147	147
8	391	394	146	151
9	390	392	146	147
10	386	388	147	147
11	382	384	146	145
12	384	386	150	148
13	390	389	139	139
14	399	397	148	146
15	397	393	137	139
Mean values (g/kg)	388		145	
RSD _r (%)	1.3		2.9	
RSD _R (%)	1.3		2.9	
PRSD _R (%)	1.6		2.6	
HorRat	0.8		1.1	

The result of a collaborative study was shown as mean values, RSD_r, RSD_R and HorRat.

a: Laboratories analyzed same sample as blind duplicate.

Lab No. 1-10: Conventional apparatus

Lab No, 11-15: Fibertec type apparatus

RSD_r: relative standard deviation for the repeatability within laboratory

RSD_R: Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

PRSD_R: Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation (Horwitz and Albert, 2006)

HorRat: ratio of RSD_R for PRSD_R

第 4 章 市販の酵素免疫測定法のキットによるサイレージ中のデオキシニバレノールの定量法

4. 1. 背景

デオキシニバレノール (DON) は、一部のフザリウム菌属が産生するトリコテセン系カビ毒の 1 つであり、食品や飼料での汚染報告がある (Salay and Zerlotti, 2002; Martins et al., 2008; Schollenberger et al., 2007)。DON を摂取した場合、ヒトでは免疫阻害 (Pestka et al., 2004; Pestka, 2010; Sobrova et al., 2010)、家畜では嘔吐や下痢の原因となる (Ingalls, 1996; Pestka, 2007)。反芻動物において、DON はルーメン内で脱エポキシ化 (Driehuis et al., 2010) され、この代謝物である DON デエポキシド (DOM-1: deepoxy-DON) は、DON と共に乳、尿及び糞便から検出されている (Valenta et al., 2003; Seeling et al., 2006; Zhou et al., 2008)。そのため、飼料の DON 汚染は、家畜の健康ばかりでなく、畜産物の安全性上の問題となり (Fink-Gremmels, 1989; Hollinger and Ekperigin, 1999; Fink-Gremmels, 2008; Zhou et al., 2008)、多くの国において食品や飼料中の DON 規制が行われている (FAO, 2004)。乳牛の主要な飼料であるサイレージ中の DON 含有量を把握し、その摂取量をおさえて、家畜の DON 中毒や乳へのキャリーオーバーを防ぐことは重要である。

DON を産生するフザリウム属菌である *Fusarium graminearum* や *F. culmorum* はトウモロコシやその他の作物の植物病原菌であり、ほ場の作物残渣にはそれらの分生子が多く存在し、次に栽培する作物の汚染の原因となっている (Driehuis et al., 2010)。これらのフザリウム属菌は、サイレージの調製が良好だった場合には検出されていない (Mansfield and Kuldau, 2007)。そのため、良好に調製されたサイレージ中に存在するフザリウム系カビ毒の多くはサイレージ調製前のほ場で産生されていると

考えられている (Mansfield and Kuldau, 2007)。従って、サイレージ中の DON の存在は、原材料がプレハーベストにおいて汚染されていたことが主な原因と考えられる。しかし一方、長い貯蔵期間を経て熟成したサイレージでは、カビ毒の汚染濃度が高くなるという報告がある (Richard et al., 2007; González Pereyra et al., 2008)。これは、サイレージ貯蔵期間中に産生するフザリウム系カビ毒は僅かであるため、マスクされていたカビ毒が遊離して検出されたことが原因であると考えられる (Mansfield and Kuldau, 2007; Driehuis et al., 2010)。

DON の分析は、主にガスクロマトグラフィー (GC: gas chromatography) あるいは LC で行われている (Lattanzio et al., 2009; Turner et al., 2009)。GC では、抽出液中の DON をトリメチルシリル化し、カラムで分離して電子捕獲型検出器、又は、質量分析計 (MS: mass spectrometer) で検出・定量する (Schollenberger et al., 1998; Tanaka et al., 2000; Schothorst and Jekel, 2001)。LC では抽出液を前処理後、紫外吸光度検出器、又は、MS で DON を検出・定量する (Cavaliere et al., 2005; Ren et al., 2007; Böhm et al., 2008)。これらのクロマトグラフィーを用いた方法は、良い分析精度を得るために、分析の前に複雑な試料の処理、及び、機器のメンテナンスを必要とする。そのため、これらの方法は、分析精度が良いが分析時間が長く、コストがかかる。

ELISA は、多くの試料を分析することに適した方法であり、GC や LC を用いる方法と比較して短時間で分析が可能である (Goryacheva et al., 2009)。また、複雑な前処理の必要が無い ELISA 分析は、生産現場に近いところで測定が出来るため、分析結果を迅速に活用できる。そのため、DON の分析を ELISA で行うことが出来れば、問題があるサレージを特定し、給与を中止することが出来、家畜に対する DON 汚染したサイレージの給与リスクを軽減出来る。しかし、ELISA では DON を過大評価するという問題が報告されている (Krska et al., 2007; Zachariasova et al., 2008;

Tangni et al., 2010)。そのため、ELISA を使用するためには、DON の過大評価を引き起こす交差反応の原因について検討し、改善する必要がある。

本研究では、ELISA における DON の過大評価を軽減し、分析精度を向上させるための検討を行った。具体的には、カートリッジカラムを用いた試料の前処理を追加し、市販 ELISA キットによるサイレージ中の DON の分析への適用性を検討した。また、自然汚染試料のトウモロコシサイレージと稲サイレージを用いて、ELISA の前処理としてカートリッジカラムを用いた本法の実用性と交差反応の影響を検討した。さらに ELISA の前処理としてカートリッジカラムを用いた本法の妥当性を確認するため、稲サイレージを 2 試料、トウモロコシサイレージを 2 試料の計 4 試料を用いた 10 試験室による共同試験を実施した。

4. 2. 実験

4. 2. 1. 試料及び試薬の調製

4. 2. 1. 1. 試料

バンカーサイロ (Savoie and Jofriet, 2003) で調製されたトウモロコシサイレージの 6 試料と、ロールラップサイロ (Savoie and Jofriet, 2003) で調製された稲サイレージの 6 試料は、北海道、福島県及び広島県の 6 農家で生産されたものを使用した。試料は、サイロの異なる部位から 1 kg を 5 回抜き取り、計 5 kg を採取しポリ袋に入れ脱気後、 -18°C で試験室へ送った。試料は到着後、 80°C で 24 時間通風乾燥した後、粉砕器 (SM 2000; Retsch GmbH.) で 1.0 mm のスクリーンを通過するように粉砕した。試料は使用時まで 4°C で保存した。水分含有量は 135°C 、2 時間乾燥法 (AOAC international, 2005a) で測定した。稲サイレージの 6 試料中の水

分は 60.2-68.3 %であり、トウモロコシサイレージの 6 試料のそれらは 70.2-80.2 %であった。

またこの研究で使用したすべての試料は、DON と AcDONs の含有量を把握するために、Berthiller et al. (2005b) によって報告された試料の調製法 (Berthiller 法) を用いて分析した。この分析の結果から、添加回収試験には、LC-MS 分析における乾物中 (DM: dry matter) の DON の LOQ (0.05 mg/kg) 未満であり、AcDONs の LOQ (0.04 mg/kg) 未満の試料を DON フリー試料として使用した。また共同試験に用いた自然汚染試料の稲サイレージの 2 試料とトウモロコシサイレージの 2 試料は、それぞれ小分けして、ランダムにコード化した後、4 °C で各参加者に送付した。

4. 2. 1. 2. 試薬

抽出には、水道水を純水製造装置 (RFD240NA; アドバンテック) で処理した水 (精製水) を用いた。標準液の調製及び LC の移動相には、精製水を超純水製造装置 (Milli-Q purification system; Millipore) で処理した水 (高度精製水) を用いた。25 % アンモニア水 (試薬特級)、酢酸アンモニウム (試薬特級)、アセトニトリル (LC 用) は和光純薬製を、DON、3-アセチルデオキシニバレノール (3-AcDON: 3-acetyldeoxynivalenol) 及び 15-アセチルデオキシニバレノール (15-AcDON: 15-acetyldeoxynivalenol) は Sigma 製を使用した。

DON、3-AcDON 及び 15-AcDON の各種標準原液は、高度精製水を用いて 10.0 mg/L に調製した。

保管用混合標準液 (1.0 mg/L) は、DON、3-AcDON、及び、15-AcDON の各種標準原液を正確に混合し、高度精製水で希釈して調製した。

LC-MS 用混合標準液は、保管用混合標準液を正確に高度精製水で希釈して各カビ毒の濃度が 0.05、0.1、0.2、0.4、及び、0.5 mg/L のものを調

製した。交差反応性試験のため DON、3-AcDON 及び 15-AcDON の各種標準液（0.05 mg/L，試料中の濃度として 0.5 mg/kg 相当量）は、各種標準原液を正確に高度精製水で希釈して調製した。

アンモニア水溶液は 25 %アンモニア水を高度精製水で希釈してアンモニア濃度が 0.5、1.0、3.0 と 5.0 mol/L のものを調製した。pH 試験のため DON 標準液（0.05 mg/L，試料中の DON として 0.5 mg/kg 相当量）は、DON の標準原液を高度精製水で正確に希釈して、アンモニア水溶液で pH をそれぞれ 6.0、7.0、8.0、9.0、及び、10.0 に調整した。

4. 2. 2. 器具及び装置

抽出液の前処理に使用したカートリッジカラムは、Berthiller et al. (2005b) や Ren et al. (2007) が DON の定量法のための前処理に用いた MycoSep #226 (Romer Labs Inc., Union, MI, USA) をシリンジタイプにした MultiSep #226 (Romer Labs Inc.) を用いた。市販 ELISA キットには Romer Labs 社製の AgraQuant Deoxynivalenol ELISA kit (LOQ: 0.2 mg/kg, 定量範囲: 0.25-5.0 mg/kg, 対象試料: 穀類) を用いた。ELISA による DON の測定は、プレートリーダー (SUNRISE; Tecan Group Ltd., Meilen, Switzerland) を用いて、吸光波長を 450 nm、リファレンス波長を 630 nm に設定して行った。この研究において、ELISA 分析は、MultiSep #226 カラムを用いた試料液の調製を除いて、ELISA キットの使用説明書に従って行った。

LC-MS 分析は、Micromass (Manchester, UK) 製のエレクトロスプレーイオン化 (ESI: electrospray ionization) インターフェイス付き MS (Quattro micro API Mass Analyzer) と Waters (Milford, MA, USA) 製の LC 装置 (Alliance 2695) を用いた。分離には ZORBAX Eclipse XDB カラム (5 µm, 150 mm × 4.6 mm I.D., Agilent Technologies) を 40 °C で用い

た。移動相として 10 mmol/L の酢酸アンモニウムを含有する高度精製水（移動相 A）と、アセトニトリル（移動相 B）を用いた。グラジエントは直線的に、初期組成の 95 % A（5 % B）から 15 分間で 20 % A（80 % B）に、次に 1 分間で 5 % A（95 % B）にして 5 分間保持した。LC の流量は 0.2 mL/min、試料導入量は 10 μ L で行った。DON、3-AcDON、及び、15-AcDON は、Ren et al.（2007）の方法に従って、ESI インターフェイス付き MS の測定条件（コーンガス、溶媒除去ガス、ソース温度、溶媒除去温度）、キャピラリー電圧、コーン電圧とコリジョンエネルギーを設定し、ネガティブイオンモードでそれぞれの酢酸付加イオンとして検出した。DON のプレカーサーとプロダクトイオンはそれぞれ $m/z=295$ と 265 、3-AcDON のそれらは $m/z=337$ と 307 、15-AcDON のそれらは $m/z=337$ と 150 で行った。

4. 2. 3. 前処理法の検討

ELISA 分析のための前処理法の検討のため、MultiSep #226 カラムを用いた LC-MS 分析による 0.5 mg/kg レベルの添加回収試験を次のように行った。試料 10 g を 300 mL 共栓付き三角フラスコに量り取り、DON、3-AcDON、及び、15-AcDON の標準原液をそれぞれ 0.5 mL（0.5 mg/kg）添加し栓をした後、室温の暗所で一昼夜放置してから分析に供した。この試料に精製水 100 mL を加えて 3 分間振とう抽出（SR-2DW; タイテック）した後、ろ過（No. 5A; アドバンテック）した。そのろ液を MultiSep #226 カラムに入れて流出量が 2.0~2.5 mL/min となるように加圧して流出させた（Fig. 4-1）。流出液の 0~10 mL をカラムから流出した順番に 1 mL ずつ順次 5 mL の試験管に分取して、親水性の PTFE メンブランフィルター（0.45 μ m, DISMIC 13HP045AN; アドバンテック）でろ過後、LC-MS 分析に供した。この結果から、DON の分析に最適な MultiSep #226 カラ

ムからの流出分画を決定した。

1.0 mg/kg レベルでの添加回収試験は次のように行った。試料 10 g を 300 mL の共栓付き三角フラスコに量り取り、DON、3-AcDON、及び、15-AcDON の標準原液をそれぞれ 1.0 mL (1.0 mg/kg) 添加した。この試料に精製水を加えて DON を抽出後、ろ過した。そのろ液を MultiSep #226 カラムに入れて流出させた。カラムからの流出液のはじめの 4 mL を廃棄し、次の 2 mL を 5 mL 試験管に採り、メンブランフィルターでろ過した後、LC-MS に供した (Fig. 4-1)。LC-MS 分析による DON、3-AcDON と 15-AcDON の LOQ は、シグナル-ノイズ比 1:10 で算出した。また精製水による 3 分間抽出と、Berthiller 法のアセトニトリルを用いた 90 分間抽出による DON の回収率を、添加回収試験と同じ試料を用いて検討した。

LC-MS 分析で検討した MultiSep #226 カラムからの最適な流出分画を用いて、ELISA による DON の過大評価を軽減出来ることを確認するため、ELISA による DON の添加回収試験を行った。この MultiSep #226 カラム処理有り試料による ELISA (精製有り ELISA) の添加回収試験は、LC-MS 分析の添加回収試験と同じ試料を用いて、DON を 0.5 と 1.0 mg/kg の 2 レベルで添加して行った。LC-MS 分析と精製有り ELISA の DON の分析値の比較と、LC-MS 分析と Berthiller 法の DON の分析値の比較は、T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) で行った。

Berthiller 法による試料の調製は、次のとおりに行った。試料 10 g に 100 mL アセトニトリル/精製水 (84/16, v/v) を加えて 90 分間振とうして DON を抽出した。抽出液をろ過し、そのろ液を MultiSep #226 カラムに入れて流出させた。カラムからの流出液のはじめの 4 mL を分取し、その内の 1.0 mL を 5 mL 試験管に採り、窒素気流下で溶媒を除去した。試験管内の残留物に 10 mmol/L の酢酸アンモニウムを含有する高度精製水/アセトニトリル (95/5, v/v) の混合溶液 1.0 mL に加えて溶かし、メンブラ

ンフィルターでろ過した後、LC-MS に供した。LC-MS の分析条件は、本検討の LC-MS 分析の条件で行った。

4.2.4. サイレージ分析における ELISA の適用性の検討

精製有り ELISA (本法) の LOQ を確認するために、添加回収試験と同じ試料を用いて DON の 0.1、0.2、0.3、及び 0.4 mg/kg レベルの添加回収試験を行った。試料 10 g を 300 mL 共栓付き三角フラスコに量り取り、DON の標準原液をそれぞれ 0.1 mL (0.1 mg/kg)、0.2 mL (0.2 mg/kg)、0.3 mL (0.3 mg/kg)、及び、0.4 mL (0.4 mg/kg) 添加し、本法に従って DON を分析した。LOQ は、ISO (2000) と Fremy and Usleber (2003) に従って、DON の回収率が 50~150 % の範囲であり、その RSD が 10 % 未満である最も低い添加レベルとした。

DON-ELISA キットの 3-AcDON と 15-AcDON の交差反応性を確認するために、DON、3-AcDON と 15-AcDON の各種標準液 (0.05 mg/L, 試料として 0.5 mg/kg 相当量) を ELISA に供した。これらの結果から、DON に対する 3-AcDON と 15-AcDON の交差反応性を Tangni et al. (2010) が報告した方法で算出した。

サイレージ抽出液の MultiSep #226 カラムからの流出分画の pH は、8.5~9.5 の範囲であった。そのため、pH を 6.0~10.0 の範囲に調整した DON 標準液 (0.05 mg/L, 試料中に 0.5 mg/kg 相当量) を ELISA に供した。ELISA 分析における試料液の pH が DON の分析値におよぼす影響を確認するため、pH 6.0 の DON 標準液の分析値をコントロールに、pH 7.0、8.0、9.0 と 10.0 の DON 標準液の分析値について Dunnett の多重比較検定 (Dunnett, 1964; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) を行った。

4. 2. 5. 自然汚染試料による交差反応の検討

自然汚染試料の稲サイレージの 3 試料、トウモロコシサイレージの 3 試料の計 6 試料を用いて、カラム処理無し試料による ELISA（精製無し ELISA）と精製有り ELISA から得られた DON の分析値の比較をした。更に、精製有り ELISA に用いた試料液の一部を LC-MS に供して、DON、3-AcDON、及び、15-AcDON を測定し、ELISA の分析値と比較した。また LC-MS 分析による DON の分析値を確認するため、Berthiller 法で同じ試料を分析した。LC-MS 分析から得られた DON の分析値と、精製有り ELISA、精製無し ELISA、Berthiller 法から得られた DON の分析値の比較は T 検定（Student, 1908; 近藤ら, 2007）で行った。

4. 2. 6. 妥当性確認

共同試験は、試料として自然汚染試料のトウモロコシサイレージの 2 試料、及び、稲サイレージの 2 試料の計 4 試料を用いて、10 試験室（2 飼料検査機関、5 民間会社、3 研究機関）で実施した。各試験室は、各試料についてブラインド方式で 2 回分析した。この試験に用いた分析法のフローチャートを Fig. 4-1 に示した。

ボックスプロット（McGill et al., 1978）は、視覚的に分析結果から外れ値を検出するために用いた。分析値の精度は、 RSD_r と RSD_R によって示した。濃度から推定する $PRSD_R$ は修正された Horwitz の式

（Thompson, 2000; Horwitz and Albert, 2006）を用いて計算した。共同試験による妥当性は RSD_R を $PRSD_R$ で除して算出する HorRat（McClure and Lee, 2003）によって評価した。

4.3. 結果

4.3.1. 試料の調製方法

MultiSep #226 カラムからのそれぞれの流出分画中の DON、3-AcDON、及び、15-AcDON を LC-MS で測定した結果、得られた濃度 (mg/kg) をそれぞれの添加濃度 (mg/kg) で除して百分率の回収率で示した (Table 4-1)。ELISA に供する流出分画は、稲サイレージにおける DON の分析値の RSD が 10 % 以下であり、回収率が 90 % 以上である 4.0 mL 以降の分画で、流出液に着色が見られる 6.0 mL より手前の分画の 2 mL とした。

ELISA によって pH 6.0~10.0 の範囲の DON の標準液 (0.05 mg/L, 試料中の DON として 0.5 mg/kg 相当量) を測定した結果、DON の分析値は 0.046~0.051 mg/L であり、その RSD は 2.2~7.7 % の範囲であった (Table 4-2)。Dunnett の多重比較検定 (Dunnett, 1964; Ihaka and Gentleman, 1996; 青木, 2009) の結果、pH 6.0 の DON 標準液の DON の分析値と、pH 7.0、8.0、9.0、10.0 のそれらと有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった (Table 4-2)。これは pH 6.0~10.0 の範囲の試料液では、ELISA による DON の分析値に差は無く、pH の変化による分析値への影響は少ないことを示した。

4.3.2. 添加回収試験と LOQ

4.3.2.1. ELISA 分析

本法による DON の 0.5 と 1.0 mg/kg レベルにおける添加回収試験の結果を Table 4-3 に示した。稲サイレージの DON の回収率は 113 %、その RSD は 9.0 % であり、トウモロコシサイレージの DON の回収率は 111 %、その RSD は 7.8 % であった。また T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) の結果、精製有り ELISA と LC-MS 分析による DON の分析値に有意差 (P

≥0.05) は無かった (Table 4-3)。本法の LOQ を求めるために行った添加回収試験の結果、DON として 0.1、0.2、0.3 及び 0.4 mg/kg の添加に対して、回収率は 124~207 %、その RSD は 5.3~23.3 %の範囲となった (Table 4-4)。この結果から、RSD が 10 % 以下であり、回収率が 50~150 %の範囲にある添加濃度の最も低い 0.3 mg/kg を本法の LOQ とした (ISO, 2000; Fremy and Usleber, 2003)。この試験の添加レベルの 0.1 及び 0.2 mg/kg で DON の回収率が 150 %を超えて高かった原因は、LOQ 以下の DON の影響、及び、後に述べる試料のマトリックス効果によるものと考えられる (Table 4-4)。

DON-ELISA における 3-AcDON と 15-AcDON の交差反応性試験の結果は、次のとおりであった。DON の分析値とその RSD はそれぞれ 0.5 mg/kg と 2.7 %であった。3-AcDON の分析値とその RSD はそれぞれ 3.6 mg/kg DON 相当と 8.0 %であり、15-AcDON のそれらはそれぞれ 0.2 mg/kg DON 相当及び 9.3 %であった。Tangni et al. (2010) の方法によって算出した DON に対する交差反応性は、3-AcDON が 710 %、15-AcDON が 46%であった。

4.3.2.2. LC-MS 分析

LC-MS 分析による DON、3-AcDON、及び、15-AcDON の 0.5 と 1.0 mg/kg における添加回収試験の結果を Table 4-3 に示した。稲サイレージの DON、3-AcDON と 15-AcDON の回収率はそれぞれ 95、94 と 102 %であり、その RSD は 10.6、7.4 と 9.5 %であった (Table 4-3)。トウモロコシサイレージの DON、3-AcDON と 15-AcDON の回収率はそれぞれ 98、98 と 108 %であり、その RSD は 8.4、9.6 と 8.4 であった (Table 4-3)。LC-MS 分析による DON、3-AcDON と 15-AcDON の LOQ は、それぞれ 0.05、0.02、と 0.10 mg/kg であった。Berthiller 法による DON の回収率は 84~91 %であり、その RSD は 5.2~9.2 %であった (Table 4-3)。また T 検定 (Student,

1908; 近藤ら, 2007) の結果、LC-MS 分析と Berthiller 法による DON の回収率に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった (Table 4-3)。

4. 3. 3. ELISA における前処理の効果と AcDON の影響

自然汚染試料の精製無し ELISA、精製有り ELISA、及び、LC-MS 分析による DON の分析結果を Table 4-5 に示した。精製有り ELISA による DON の分析値は 3.9 mg/kg 以下、その RSD は 13.4 %以下であり、精製無し ELISA による DON の分析値は 7.4 mg/kg 以下、その RSD は 9.6 %以下であった (Table 4-5)。また同様に LC-MS による DON の分析値は 2.9 mg/kg 以下、その RSD は 6.1 %以下であった (Table 4-5)。すべての試料で精製有り ELISA や LC-MS 分析よりも、精製無し ELISA の DON の分析値が高い値を示した。また T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) の結果、LC-MS 分析で不検出であった試料を除いて、稲サイレージでは LC-MS 分析による DON の分析値は、精製有り ELISA の DON の分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) が無く、精製無し ELISA の DON の分析値には有意差 ($P < 0.05$) があった (Table 4-5)。トウモロコシサイレージでも、LC-MS 分析による DON の分析値と、精製無し ELISA の DON の分析値との間には有意差 ($P < 0.05$) があった (Table 4-5)。しかし、トウモロコシサイレージにおける LC-MS 分析と精製有り ELISA による DON の分析値の比較では、試料 No. 2 では有意差 ($P \geq 0.05$) が無く、No. 3 で有意差 ($P < 0.05$) があった (Table 4-5)。これらの結果、試料の抽出液をカートリッジカラム処理することによって、ELISA における DON の分析値は小さくなり、LC-MS 分析による DON の分析値に近い値となることを示した。よって、カートリッジカラムによる抽出液の前処理は、ELISA における DON の過大評価を軽減する効果があることが明らかとなった。

AcDON の影響については、精製有り ELISA による DON の分析値、及

び、LC-MS 分析による DON、3-AcDON、15-AcDON の分析値から確認した (Table 4-5)。LC-MS 分析において、トウモロコシサレージ試料 No. 2 から 15-AcDON を 0.7 mg/kg、No. 3 から 3-AcDON を 0.1 mg/kg 検出した。精製有り ELISA と LC-MS 分析による DON の分析値は、トウモロコシサイレージ試料 No. 2 でそれぞれ 0.6 と 0.5 mg/kg であり、No. 3 でそれぞれ 3.9 と 2.9 mg/kg であった。トウモロコシサイレージ試料 No. 1 では、LC-MS で DON が不検出であり、精製有り ELISA と精製無し ELISA による DON の分析値はそれぞれ 0.4 と 0.9 mg/kg であった。また、AcDON が不検出であった稲サイレージにおいて、精製有り ELISA と LC-MS 分析による DON の分析値はそれぞれ試料 No. 1 では不検出であり、No. 2 で 0.3 と 0.3 mg/kg、No. 3 で 0.4 と 0.5 mg/kg であった。LC-MS 分析で AcDON を検出した試料は、精製有り ELISA においても DON の分析値は高かった。また Berthiller 法による自然汚染試料の不検出試料を除いた DON の分析値は 0.3~2.7 mg/kg、その RSD は 4.9~9.6 % であった (Table 4-5)。T 検定 (Student, 1908; 近藤ら, 2007) の結果、LC-MS 分析と Berthiller 法による DON の分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。

4.3.4. 妥当性確認の結果

本法の妥当性を確認するために、共同試験を稲サイレージの 2 試料とトウモロコシサレージの 2 試料の計 4 試料を用いて 10 試験室で行い、その結果を Table 4-6 に示した。ボックスプロット (McGill et al., 1978) で、稲サイレージの試験室 No. 2 と No. 5 のデータが外れ値となり棄却された (Table 4-6)。その結果、DON の分析値は 1.5~2.3 mg/kg、 RSD_r は 4.1~12.7 %、 RSD_R は 5.4~16.0 % となった。この共同試験による HorRat は 0.5~1.6 となった。Horwitz and Albert (2006) の中で、HorRat の経験的な許容範囲は、0.5~2.0 と示されているので、ELISA に供する試料

液の前処理として MultiSep #226 カラムを用いた本法の妥当性は確認された。

4. 4. 考察

4. 4. 1. 抽出条件の影響

添加回収試験において、水による抽出である LC-MS 分析と抽出にアセトニトリルを用いた Berthiller 法から得られた DON の分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった (Table 4-3)。これは水による 3 分間の抽出とアセトニトリルを抽出液に用いた 90 分間の抽出 (Berthiller et al., 2005b) から同等の結果が得られることを示した。

ELISA に用いる試料液の pH の影響を検討した結果 (Table 4-2)、DON-ELISA キットを用いた最近の研究の穀類試料を用いた分析精度と同等であった (Lupo et al., 2010)。従って、この pH 6.0~10.0 の抽出液は ELISA の精度には影響しないことが示された。

4. 4. 2. ELISA 分析における交差反応の影響

4. 4. 2. 1. 非選択的交差反応

カビ毒の ELISA における過大評価の原因は、非選択的交差反応と選択的交差反応に分類されている (Fremy and Usleber, 2003)。非選択的交差反応は、ELISA キットの仕様書にある対象試料以外の試料を ELISA に供した場合に生じるマトリックス効果により起こる (Fremy and Usleber, 2003)。本法では、穀類を対象試料とした DON 用の ELISA キットを用いてサイレージ中の DON を測定するため、サイレージのマトリックス効果による非選択的交差反応を軽減しなければ、正確に DON を測定することは難しい (Krska et al., 2007; Zachariasova et al., 2008; Tangni et al., 2010)。そのため、本研究では、非選択的交差反応の原因となるマトリックスの

影響を軽減するために、MultiSep #226 カラムを用いた前処理法を検討した。自然汚染試料（稲サイレージ及びトウモロコシサイレージ各々3試料）を用いた検討において、精製無し ELISA と LC-MS 分析による DON の分析値の比較では、すべての試料で LC-MS 分析よりも精製無し ELISA の DON の分析値が高い値を示した。これはマトリックス効果による非選択的交差反応の影響で DON を過大評価していることを示していた

(Table 4-5)。また、精製無し ELISA と精製有り ELISA による DON の分析値の比較において、すべての試料で精製有り ELISA の方が精製無し ELISA による DON の分析値よりも低い値を示した (Table 4-5)。このことは、MultiSep #226 カラム処理によって、試料液中の DON と交差反応する成分が除かれ、マトリックスの影響が軽減したことを示している。また、精製有り ELISA と LC-MS 分析の DON の分析値を比較した。これらの DON の分析値には、LC-MS 分析で DON が不検出となった試料と、トウモロコシサイレージ試料 No. 3 以外の試料において、有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。このことは、AcDON の影響が無ければ、精製有り ELISA と LC-MS 分析による DON の分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) が無いことを示している。

4. 4. 2. 2. 選択的交差反応

選択的交差反応は、アナライトと同じグループに属しており、分子構造が似ている化合物が起こす (Fremy and Usleber, 2003)。選択的交差反応による DON の過大評価の場合には、DON とその化合物は化学的、物理的性質が似ているため、MultiSep #226 カラムによる処理でその化合物を除去することは出来ず、その影響を軽減することは難しい。DON の分析の場合には、選択的交差反応の原因となる化合物として DON と同じ菌で産生される AcDON が報告されている (Krska et al., 2007; Zachariasova et al., 2008; Tangni et al., 2010)。本研究においても、自然汚染試料を用い

た検討 (Table 4-5) において LC-MS で AcDON が検出された試料は、LC-MS よりも ELISA の DON の分析値が高かった。また、この AcDON による ELISA 分析における DON の過大評価については MultiSep #226 カラム処理を用いても軽減することは出来なかった。AcDON は DON のアセチル化によって形成されるが、DON と AcDON の濃度関係は明らかになっていない (Rohweder et al., 2011)。一方、作物中の DON 及び AcDON の検出率や検出濃度は、AcDON の方が DON よりも著しく低いことも報告されている (Hook and Williams, 2004; Berthiller et al., 2005a; Schollenberger et al., 2007)。Table 4-5 に示したように、トウモロコシサイレージ試料 No. 2 と No. 3 の、精製有り ELISA による DON の分析値は、LC-MS 分析による DON の分析値よりも、それぞれ 0.1 と 1.0 mg/kg 高かった。これらのことから、供試した市販の ELISA キットにおいて、3-AcDON 及び 15-AcDON の選択的交差反応による DON の分析値への影響は、自然汚染試料でも確認された。しかし、ELISA による DON の分析における 3-AcDON 及び 15-AcDON の影響は、作物中の 3-AcDON 及び 15-AcDON 含有量が低いことから、DON の定量に大きな影響を与えない。また、ELISA 分析において AcDON の影響で DON を過大評価して家畜の飼料設計を行っても、AcDON と DON の毒性は同等であることが示されている (JECFA, 2011) ことから問題は無い。一方、トウモロコシサイレージ試料 No. 1 は、LC-MS 分析で DON が不検出であるが、精製有り ELISA による DON の分析値は 0.4 mg/kg であった。このことは、MultiSep #226 カラム処理で除去又は軽減できない非選択的交差反応を起こす物質あるいは 3-AcDON もしくは 15-AcDON 以外の DON と選択的交差反応する物質の存在が考えられた (Zachariasova et al., 2008; Lattanzio et al., 2009)。

3-AcDON 及び 15-AcDON の交差反応性は、それぞれ 710 % 及び 46 % であった。この結果は、Tangni et al. (2010) による報告と同等であった。

また 3-AcDON と 15-AcDON に加えて、DON-3-β-D-グルコピラノシド (DON-3-glucoside: DON-3-β-D-glucopyranoside) と DOM-1 は、DON-ELISA キットにおいて交差反応することが報告されている (Tangni et al., 2010)。植物内で形成する DON-3-glucoside (JECFA, 2011) は、トウモロコシ穀類から DON と共に検出されており、その検出量は DON の 10~25 % 程度である (Berthiller et al., 2005a; Berthiller et al., 2009)。また DON-3-glucoside の交差反応性は 52 % であると報告されている (Tangni et al., 2010)。DON-3-glucoside の毒性は明らかになっていない (JECFA, 2011) が、作物中の DON-3-glucoside の存在は AcDON と同様に DON と比較して少ない。従って、DON 用の ELISA における DON-3-glucoside の影響は小さいと考えられる。一方、動物の代謝物から検出される DOM-1 (Yoshizawa et al., 1983) は、自然汚染の植物からは検出せず (Tangni et al., 2011)、サイレージ中にはほとんど存在しないと考えられる。

4.4.3. 開発した分析法の精度

10 実験室による共同試験を行った結果、DON の分析値は 1.5~2.3 mg/kg、 RSD_f は 4.1~12.7 %、 RSD_R は 7.6~23.4 %、HorRat は 0.5~1.6 であり、本法の妥当性が確認された。

共同試験からの稲サイレージの RSD_f は 12.1~12.7 %、 RSD_R は 18.9~23.4 % であり、トウモロコシサイレージの RSD_f は 4.1~6.7 %、 RSD_R は 7.6~12.1 % であった。稲サイレージの RSD_f と RSD_R は、トウモロコシサイレージのそれらより大きな値を示している。また、LC-MS 分析では、稲サイレージからは AcDON は検出されなかった。これらのことから、稲サイレージの DON の分析値の RSD がトウモロコシのそれらより高くなった要因は、マトリックス効果による非選択的交差反応の影響によっ

て分析の再現精度が低下したものと考えられる。しかし、稲サイレージ中の DON の分析値の再現性が低いことが原因で、2 試験室において共に 2 試料のデータが棄却される可能性は少ない。稲サイレージの分析における MultiSep #226 カラムからの流出分画について、データが棄却された 2 試験室は「有色で不透明」、その他の試験室は「有色で透明」とコメントしていた。これらのコメントから、2 試験室における稲サイレージのデータ棄却の原因は、MultiSep #226 カラムによる処理が不十分でありサイレージのマトリックス効果の軽減が出来なかったためと考えられた。

4. 5. 結論

サイレージ中の DON を、生産現場に近いところで定量し、迅速にその分析結果を飼料設計に反映することが可能な市販 ELISA キットを利用した分析法を開発した。ELISA による DON の分析の問題である交差反応の影響を、MultiSep #226 カラムによる抽出液の精製によって、軽減し、分析精度を改善した。自然汚染試料を用いて、DON の ELISA 分析における非選択的交差反応と選択的交差反応の影響を、MultiSep #226 カラムを用いた精製有り ELISA、精製無し ELISA 及び LC-MS 分析による DON の分析値から明らかにした。その結果、MultiSep #226 カラムによる前処理によって非選択的交差反応の影響による DON の過大評価を軽減することが出来た。また AcDON は、選択的交差反応によって、DON の過大評価の原因となっていることを確認した。

10 実験室による自然汚染試料を用いた共同試験を行った結果、その HorRat は 0.5~1.6 であり、本法の妥当性が確認された。これにより、MultiSep #226 カラムによる試料の前処理を併用した市販 ELISA キットによる DON の分析を稲及びトウモロコシサイレージに適用出来ることを示した。

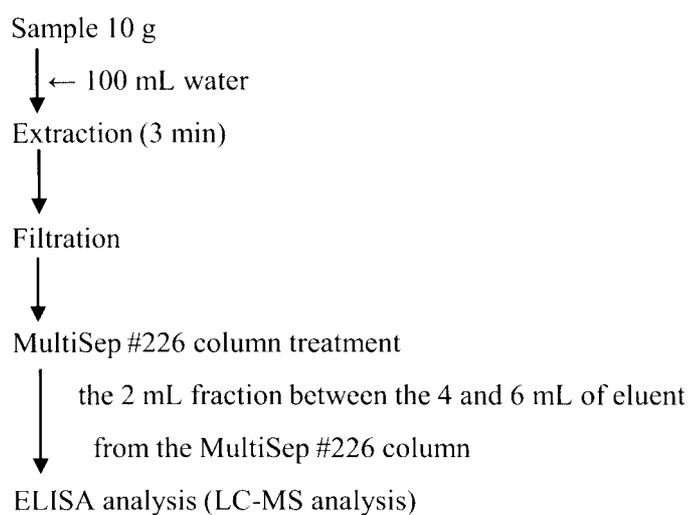


Figure 4-1. Flow charts of developed analysis method

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

LC-MS: high performance liquid chromatography mass spectrometer

Table 4-1. Recovery of DON, 3-AcDON and 15-AcDON in different eluent fractions from a MultiSep #226 column

Eluent fraction* (mL)	Rice silage						Corn silage					
	DON (%) ^a		3-AcDON (%) ^a		15-AcDON (%) ^a		DON (%) ^a		3-AcDON (%) ^a		15-AcDON (%) ^a	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0-1	76	72	54	62	72	65	68	72	48	53	61	58
1-2	90	120	65	78	85	76	100	94	65	72	66	75
2-3	70	98	76	88	73	82	84	88	70	82	77	87
3-4	80	88	85	90	80	88	90	94	85	92	90	103
4-5	94	86	88	93	90	105	88	94	91	88	110	115
5-6	101	89	92	106	110	108	98	106	92	105	115	98
6-7	105	112	99	115	115	123	111	120	108	101	98	113
7-8	108	115	103	118	105	112	121	108	105	102	122	106
8-9	115	85	120	115	118	121	105	95	115	108	118	109
9-10	122	109	125	120	115	126	125	118	105	116	129	105

a: This examination was carried out twice per an eluent fraction.

* Approximately 15 mL of the silage extract was applied to a MultiSep #226 column, and passed the column.

* Consecutive 10 mL of eluent fractions which passed the column were collected in 1 mL fractions.

Recovery was calculated by dividing the mycotoxin concentration in a 1 mL eluent fraction of silage extract.

DON: deoxynivalenol

3-AcDON: 3-acetyldeoxynivalenol

15-AcDON: 15-acetyldeoxynivalenol

Table 4-2. Result of the pH test for the DON-ELISA analysis

pH	DON values (mg/L)	RSD (%)	P values
6.0	0.048	2.2	
7.0	0.046	4.4	0.76
8.0	0.051	2.5	0.26
9.0	0.051	7.7	0.35
10.0	0.048	2.2	0.78

This examination was performed with preparing a 0.05 mg/L DON standard solution (equivalent 0.5 mg/kg DON in sample) at pH 6.0-10.0, and was carried out four times per a pH.

P values were provided by comparison of DON value between pH 6.0 and pH 7.0-10.0 using Dunnett test (Dunnett, 1964).

These were no significant difference ($P < 0.05$) in DON values from the DON standard solution between pH 6.0 and pH 7.0-10.0.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

DON: deoxynivalenol

RSD: relative standard deviation

Table 4-3. Result of recovery test for DON, 3-AcDON and 15-AcDON

Methods	Mycotoxins ^a	Rice silage				Corn silage			
		0.5 mg/kg		1.0 mg/kg		0.5 mg/kg		1.0 mg/kg	
		Recovery (%)	RSD (%)						
ELISA with cleanup	DON	119	9.8	107	1.8	117	7.0	106	4.3
	P values	0.06		0.09		0.07		0.30	
LC-MS analysis	DON	93	7.1	96	14.0	97	7.8	98	11.7
	3-AcDON	95	8.2	93	6.5	94	8.0	101	11.2
	15-AcDON	103	8.8	101	10.2	110	7.3	106	9.4
Berthiller method	DON	91	9.2	87	7.9	84	6.6	89	5.2
	P values	0.61		0.20		0.16		0.22	

For ELISA analysis and Berthiller method (Berthiller et al., 2005b), 0.5 and 1.0 mg/kg of DON were used to spike in silage samples.

For LC-MS analysis, 0.5 and 1.0 mg/kg of DON, 3-AcDON, and 15-AcDON were used to spike silage samples.

Recovery shown was the average of four independent experiments and RSD was calculated from four experiments.

P values were provided by comparison of DON value from LC-MS analysis using T test (Student, 1908).

No sample had significant difference ($P < 0.05$) in DON values between LC-MS analysis and ELISA with cleanup, and between LC-MS analysis and Berthiller method.

a: Spike level

DON: deoxynivalenol, 3-AcDON: 3-acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON: 15-acetyldeoxynivalenol

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

LC-MS: high performance liquid chromatography mass spectrometer

RSD: relative standard deviation

Table 4-4. Result of a recovery test for LOQ of ELISA

Spike level of DON (mg/kg)	Rice silage (%) ^a		Corn silage (%) ^a		Average (%)	RSD (%)
	1	2	1	2		
0.1	186	211	177	254	207	16.6
0.2	126	162	211	141	160	23.3
0.3	133	125	119	132	127	5.3
0.4	126	133	116	124	125	5.4

a: This examination was carried out twice per a sample.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

DON: deoxynivalenol

LOQ: limit of quantitation

RSD: relative standard deviation

Table 4-5. Determination of DON, 3-AcDON and 15-AcDON in silage samples

Method	ELISA				LC-MS analysis ^a			Berthiller method	
	with cleanup ^b		without cleanup ^c		DON	3-AcDON		15-AcDON	
Samples	mean values (mg/kg of DM)	RSD (%)	mean values (mg/kg of DM)	RSD (%)	mean values (mg/kg of DM)	mean values (mg/kg of DM)	RSD (%)	mean values (mg/kg of DM)	RSD (%)
Rice silage	No.1 N.D. ^d		0.3	9.6	N.D. ^e	N.D. ^f	N.D. ^g	N.D. ^h	
	No.2 0.3	9.8	0.4	4.1	N.D. ^f	N.D. ^g	N.D. ^h	0.3	6.7
	P values	0.67	9.5×10 ⁻¹⁰ *					1.00	
	No.3 0.4	2.3	1.4	1.9	N.D. ^f	N.D. ^g	N.D. ^h	0.5	9.6
	P values	0.48	5.5×10 ⁻¹⁰ *					0.56	
Corn silage	No.1 0.4	13.2	0.9	8.6	N.D. ^e	N.D. ^f	N.D. ^g	N.D. ^h	
	No.2 0.6	13.4	1.5	5.4	0.5	N.D. ^f	0.2	0.4	4.9
	P values	0.50	3.4×10 ⁻⁷ *					0.67	
	No.3 3.9	4.0	7.4	3.7	2.9	0.1	N.D. ^g	2.7	8.0
	P values	2.2×10 ⁻⁵ *	5.8×10 ⁻⁸ *					0.76	

This examination was carried out four times per a sample.

Berthiller method (Berthiller et al., 2005b) was performed for comparing DON values between Berthiller method and ELISA with cleanup, or LC-MS analysis. a and b used same solutions which cleaned up by MultiSep #226 column. c: The same extract with no cleanup

d: < 0.3 mg/kg, e and h: < 0.05 mg/kg, f: < 0.03 mg/kg, g: < 0.10 mg/kg

P values were provided by comparison of DON value from LC-MS analysis using T test (Student, 1908).

* These were significant difference ($P < 0.05$) in DON values between LC-MS analysis and ELISA.

No sample had significant difference in DON values between LC-MS analysis and Berthiller method.

N.D.: not detected, DON: deoxynivalenol, 3-AcDON: 3-acetyldeoxynivalenol, 15-AcDON: 15-acetyldeoxynivalenol, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

LC-MS: high performance liquid chromatography mass spectrometer, DM: dry matter, RSD: relative standard deviation

Table 4-6. Results of the collaborative study

Laboratory No.	DON content (mg/kg of DM) in sample							
	Rice silage				Corn silage			
	sample A ^a		sample B ^a		sample A ^a		sample B ^a	
	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1.9	1.8	2.7	2.5	1.9	1.9	2.5	2.4
2	3.0 ^b	2.9 ^b	4.6 ^b	4.0 ^b	1.7	1.7	2.6	2.5
3	1.7	1.7	2.5	2.1	1.5	1.4	2.1	2.1
4	1.4	1.7	2.2	1.6	1.6	1.7	2.2	2.3
5	3.6 ^b	2.8 ^b	5.5 ^b	5.8 ^b	1.8	1.9	2.3	2.2
6	1.2	1.3	1.9	1.9	1.6	1.6	2.4	2.2
7	1.3	1.5	2.1	2.1	1.7	1.8	2.2	2.4
8	2.0	1.5	2.4	1.7	2.1	1.7	2.7	2.5
9	1.4	1.2	2.1	2.0	1.7	1.6	2.4	2.2
10	1.0	1.2	2.2	1.9	1.6	1.5	2.3	2.3
Mean values (mg/kg of DM)	1.5		2.1		1.7		2.3	
RSD _r (%)	12.1		12.7		6.7		4.1	
RSD _R (%)	23.4		18.9		12.1		7.6	
PRSD _R (%)	15.1		14.3		14.8		14.1	
HorRat	1.6		1.3		0.8		0.5	

The result of a collaborative study of naturally contaminated samples was shown as mean values, RSD_r, RSD_R and HorRat.

a: Laboratories analyzed same sample as blind duplicate

b: Outliers identified by the box plots (McGill et al., 1978)

DON: deoxynivalenol

DM: dry matter

RSD_r: Relative standard deviation of repeatability within laboratory

RSD_R: relative standard deviation of reproducibility between laboratories

PRSD_R: predicted relative standard deviations of reproducibility (Horwitz and Albert, 2006)

HorRat: ratio of RSD_R for PRSD_R

第5章 まとめ

我が国の飼料生産は、飼料作物の収穫適期に降水が多く、湿度が高いことから、サイレージとして収穫、調製する方法が適している。一方、畜産農家では高齢化あるいは後継者難のため、飼料を生産する労働力が不足している。そのため、稲あるいはトウモロコシを用いたサイレージの生産を維持・向上させるために、タワーサイロ、バンカーサイロなどに、収穫した飼料作物を詰め込む作業の無い、省力的なサイレージ生産のための取り組みが行われている。これらの技術開発、耕畜連携やコントラクターによる飼料生産によって、我が国の飼料生産基盤は、トウモロコシサイレージの生産量の維持、及び、稲サイレージの生産量の増大により拡大している。これらの飼料を有効に利用するためには、迅速な飼料評価による飼料設計によって、家畜の健康を管理してその生産性を向上させることが重要である。

本研究では、国産飼料の有効利用を促進して家畜の健康とその生産性を向上させるため、飼料の品質に影響する成分の分析法を検討した。分析法開発の対象とした成分は、1) 有機酸、2) NDF、3) 硝酸態窒素、4) DON の4項目である。有機酸は、飼料作物の栄養を維持して長期貯蔵を可能にするサイレージの発酵品質の指標となっている。NDF は、反芻動物のルーメン発酵を管理するために必要な繊維である。硝酸態窒素は、家畜の健康に有害な影響を与えるメトヘモグロビン血症の原因物質である。DON は、嘔吐の原因物質であり、乳からその代謝物であるDOM-1と共に検出報告のあるトリコテセン系カビ毒である。飼料の品質評価は、主に飼料設計や家畜の健康管理に利用するため、短時間で分析結果が得られることと、分析精度が高いことが要求される。そのため、本研究における分析法の開発は、従来の方法よりも短い時間で分析結果が得られること、分析精度を評価するために共同試験によって分析法の

妥当性を確認することを重視した。

第2章では、これまでに LC あるいは IC を用いて別個に分析されていた、サイレージ中の発酵品質を表す成分である有機酸と、メトヘモグロビン血症の原因となる成分である硝酸態窒素を同時に定量する方法を検討した。その結果、海産物やアルコール飲料中の有機酸と無機陰イオンの CZE による分析法 (Soga and Ross, 1999a,b; Soga and Imaizumi, 2001) をベースに、サイレージ中のこれらの成分の同時分析法を開発した。CZE による分析に重要な BGE は、PDC と CTAH を用いた方法を検討し、有機酸と無機陰イオンの分離を行うための最適な BGE の PDC 濃度、pH 条件を決定した。MT の再現性を向上させて良好な再現精度を得るためのプレコンディショニング条件は、シンプルフラッシュ法とコンビネーションフラッシュ法を比較して検討し、各アナライト間の分離が良好で、MT が安定したコンビネーションフラッシュ法を採用することとした。定量を妨害するネガティブピークの影響は、2 種類の市販の陽イオン交換樹脂を検討し、弱陽イオン交換カラムの Accell Plus CM で除去できることを見いだした。CZE 法を利用した本法と一般的な LC 法を利用した有機酸 (Wada et al., 1984)、あるいは硝酸態窒素 (Hsu et al., 2009) の分析法による分析値を、2 種類のサイレージを用いて比較した。その結果、両法によって検出した有機酸、硝酸態窒素の分析値に有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。また、CZE で有機酸と硝酸態窒素を同時定量する本法は、これらの成分を別個に分析していた LC による分析法よりも分析時間が約半分で同等の結果が得られ、試料の前処理も大幅に簡素化された。開発した分析法の妥当性を確認するため、5 試験室による共同試験を行った。共同試験から得られた RSD_r は 1.6~4.8 %、 RSD_R は 3.3~8.1 %、HorRat は 0.8~1.9 であり、その妥当性が確認された。

この分析法は、我が国の飼料分析の公定法である飼料分析基準に「サイレージ中の有機酸及び無機イオンの同時定量法」として採用されてい

る。また、本法は ELSEVIER 社から発行されている Animal Feed Science and Technology に論文として掲載された (Hiraoka et al., 2010)。

第 3 章では、これまでの AOAC 法の問題点であった 1 回目のアミラーゼ添加後の澱粉の糊化、ろ過の困難さ、及び、分析時間の長さを、改善するための検討を行った。検討は、AOAC 法をベースにアミラーゼの添加総量、添加回数、添加の時期、及び、乾燥、灰化の方法について行い、これらの条件を変更した分析法を開発した。更に、NDF の分析におけるアミラーゼ、及び、亜硫酸ナトリウムの添加効果を解明した。試料中の澱粉を効率的に除去するための ND 溶液中への最適なアミラーゼの添加条件は、次のとおりであった。アミラーゼは加熱開始直後と還流終了直後の 2 回に別けて、アミラーゼ保存液としてそれぞれ 100 μ L を添加した。また、この改良した添加方法では、AOAC 法にある、NDR のろ過を補助する洗浄水へのアミラーゼの 3 回目の添加は必要無いことを確認した。NDR の乾燥、灰化条件は、分析時間を短縮するため飼料分析基準の粗繊維 (農林水産省, 2008) の乾燥、灰化条件を適用した。アミラーゼの添加、及び、乾燥、灰化条件を変更した本法と AOAC 法の分析値を、14 種類の試料を用いて比較したところ、有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。また、乾燥、灰化条件の修正によって、本法は AOAC 法よりも大幅に分析時間を短縮することが出来た。また、aNDFom の分析におけるアミラーゼや亜硫酸ナトリウムの添加効果を検討した結果は次のとおりであった。アミラーゼのみ、あるいは、亜硫酸ナトリウムのみを添加した場合には、前者は穀類や加熱加工飼料で、後者は澱粉質飼料において澱粉を除去することが難しくなる。従って、これらの試薬の単独の添加では aNDFom を過大評価することとなり、aNDFom の分析では亜硫酸ナトリウムとアミラーゼを併用する必要があることを明らかにした。開発した分析法の妥当性を確認するため、15 試験室による共同試験を行った。共同試験から得られた RSD_r は 1.3~2.9 %、 RSD_R は 1.3~2.9 %、HorRat

は 0.8~1.1 であり、その妥当性が確認された。

この分析法は、我が国の飼料分析の公定法である飼料分析基準に「飼料中の中性デタージェント繊維の定量法」として採用された。また、本法は日本畜産学会の欧文誌である *Animal Science Journal* に論文として掲載された (Hiraoka et al., 2012)。

第 4 章では、これまで GC あるいは LC を用いて分析されていたサイレージ中の DON を、主に穀類の分析に利用されている ELISA キットで定量するための検討を行った。ELISA によるサイレージ中の DON の分析の問題点である過大評価の原因を検討し、この影響を軽減して、DON を簡易、迅速に定量するための方法を開発した。ELISA 分析における DON の過大評価を軽減するために、GC あるいは LC において試料液の前処理として利用されている MultiSep #226 カラムによる試料抽出液の精製を検討した。その結果、MultiSep #226 カラムの流出分画の 4~6 mL の 2 mL が、処理液に着色が無く最適な分画であることを見いだした。またこの処理液は pH 8.5~9.5 となるため、ELISA に供する試料液の pH 6.0~10.0 の範囲は、DON の分析値に影響をおよぼさないことを明らかにした。本法の MultiSep #226 カラム処理は、ELISA における試料由来の非選択的交差反応を軽減し、3-AcDON、15-AcDON による選択的交差反応の影響を明らかにした。開発した前処理方法を含む ELISA と LC-MS による DON の分析値の比較において有意差 ($P \geq 0.05$) は無かった。また本法の分析時間は 2 時間程度であり、DON の分析に ELISA キットを利用することで、LC-MS による分析方法と比較して、分析時間を半分以下に短縮することが出来た。開発した分析法の妥当性を確認するために共同試験を 10 試験室で行った。共同試験から得られた RSD_F は 4.1~12.7 %、 RSD_R は 7.6~23.4 %、HorRat は 0.5~1.6 であり、その妥当性が確認された。

この第 4 章で開発した分析法は、独立行政法人農業・食品産業技術総

合研究機構動物衛生研究所のウェブサイトで「ELISA キットによるサイレンジ中デオキシニバレノール分析法」として公開されている（動衛研，2008）。また、本法は Springer 社から発行されている Mycotoxin Research に論文として受理されている（Hiraoka et al., in press）。

飼料の品質に影響する成分の分析法は、飼料の利用性を向上させるために、飼料設計に利用出来ることが重要である。そのためには、分析時間の短縮、従来法との分析値の比較、共同試験による分析法の妥当性確認などが必要となる。これらの検討をすることによって、迅速で信頼性の高い分析値が得られる分析法を構築することが可能となる。これらの検討から開発された分析法は、国内生産飼料の効率的な利用のために飼料設計で要求される有用な成分、あるいは、家畜に対する有害な成分を、精度良く、迅速に定量することが可能である。家畜の診断においては、患畜が摂取した栄養成分あるいは有害物質を精度良く迅速に定量して、患畜に不足した栄養を補い、あるいは、有害物質を特定して治療を補助し、家畜の健康を回復することが可能となる。また有害物質を含む同じ飼料を給与されていた他の家畜への給与を中止し、有害物質による被害を削減又は防止出来る。さらに飼料中の有害物質の含有量を把握し家畜への給与を制限することは、家畜の健康だけでなく畜産物への有害物質のキャリーオーバーを未然に防ぐことに繋がる。

本研究によって開発した分析法は、1) 発酵品質の指標となる有機酸とメトヘモグロビン血症の原因物質である硝酸態窒素を同時に分析する方法、2) 反芻動物の健康を維持するためのルーメン微生物の管理に必要な aNDFom を過大評価すること無く分析する方法、3) 家畜の嘔吐や体重、乳量の低下の原因であり搾乳牛の乳からその代謝物である DOM-1 と共に検出報告のある DON を市販 ELISA キットで分析する方法である。これらの成分については、従来分析法と同等以上の分析精度で、分析時間が短く、試薬の消費量が少ないため、多くの試料を分析することが

可能となった。そのため、飼料関係業務に従事する者の分析に係る、労力、時間、コストを軽減した。しかしながら、飼料の品質に影響する成分は、先に述べたように、栄養成分である蛋白質、炭水化物、脂肪、アミノ酸、ミネラル、及び、有害物質である重金属、カビ毒、農薬など、多くの成分がある。特に、今後、期待される飼養管理は、家畜の健康を維持してその生産性を更に向上させることである。そのためには、反芻動物の消化・吸収メカニズムに適した蛋白質や脂肪などの栄養成分や、DON と共に国産農産物から検出報告のあるフザリウム系カビ毒などの有害物質の、飼料中の含有量を知ることが重要となる。これらを対象とした分析法の中には、分析時間が長く、分析法の妥当性確認が行われていないものも多く含まれている。そのため、これらの成分においても、分析時間の短縮と妥当性を確認した分析法の開発が求められている。以上のように本研究は、我が国の畜産分野における国産飼料の品質に関する分野の研究・開発全般において、重要な成果となっている。今後、この研究で取り上げた飼料の品質に影響する成分の分析法は、国産飼料を有効に利用するため、飼料設計で活用される。更にこれらの利用性の高い分析法は、飼料の安全性、品質のサーベイ、家畜の健康管理、家畜の治療、あるいは、食品の安全性のための重要な要素として活用される。そのため、これらの飼料の品質に影響する成分を測定するための分析法の開発にあっては、本研究で開発した分析法と同様に、効率性が高く使いやすい分析法の開発と、開発した分析法の妥当性確認が望まれる。これらの成分の分析法の開発によって、一層の飼料の効率的な利用が促進され、家畜の健康とその生産性の向上が期待できる。

引用文献

- AOAC International, 2005a. AOAC Official Method 950.15 Moisture in feed. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC International, 2005b. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC International, 2005c. AOAC Official Method 2002.04 Amylase-treated neutral detergent fibre in feeds-refluxing in beakers or crucible method. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Bauman, D.E. and Currie, W.B., 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science* 63; 1514-1529.
- Berthiller, F., Dall'asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., Adam, G. and Schuhmacher, R., 2009. Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D-glucoside in wheat and maize. *Food Additives and Contaminants* 26; 507-511.
- Berthiller, F., Dall'Asta, C., Schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G. and Krska, R., 2005a. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53; 3421-3425.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G. and Krska, R., 2005b. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as

- well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1062; 209-216.
- Böhm, C., Cichna-Markl, M., Brenn-Struckhoffova, Z. and Razzazi-Fazeli, E., 2008. Development of a selective sample clean-up method based on immuno-ultrafiltration for the determination of deoxynivalenol in maize. *Journal of Chromatography A* 1202; 111-117.
- Bradley, W.B., Eppson, H.F. and Beath, O.A., 1940. Livestock poisoning by oat hay and other plants containing nitrate. University of Wyoming Agricultural Experiment Station Bulletin 241; 3-20.
- Buchberger, W., Klampfl, C.W., Eibensteiner, F. and Buchgraber, K., 1997. Determination of fermenting acids in silage by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 766; 197-203.
- Cavaliere, C., D'Ascenzo, G., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R. and Laganà, A., 2005. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. *Food Chemistry* 92; 559-568.
- Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C. and Cabras, P., 1994. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *Journal of Chromatography A* 669; 59-64.
- Cherney, D.J.R., Patterson, J.A. and Cherney, J.H., 1989. Use of 2-ethoxyethanol and α -amylase in the neutral detergent fiber method of feed analysis. *Journal of Dairy Science* 72; 3079-3084.
- Colman, E., Fokkink, W.B., Craninx, M., Newbold, J.R., De Baets, B. and Fievez, V., 2010. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. *Journal of Dairy Science* 93; 4759-4773.

- Davison, K.L., McEntee, K. and Wright, M.J., 1965. Responses in pregnant ewes fed forages containing various levels of nitrate. *Journal of Dairy Science* 48; 968-977.
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M. and te Giffel, M.C., 2008. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *Journal of Dairy Science* 91; 4261-4271.
- Driehuis, F., Te Giffel, M.C., van Egmond, H.P., Fremy, J.M. and Blüthgen, A., 2010. Feed-associated mycotoxins in the dairy chain: occurrence and control. Bulletin 444. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.
- Dunnett, C.W., 1964. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20; 482-491.
- Ferreira, A.M., Kerstens, J. and Gast, C.H., 1983. The study of several modifications of the neutral detergent fibre procedure. *Animal Feed Science and Technology* 9; 19-28.
- Fink-Gremmels, J., 1989. The significance of mycotoxin assimilation for meat animals. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 96; 360-363.
- Fink-Gremmels, J., 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal* 176; 84-92.
- Firkins, J.L., Hristov, A.N., Hall, M.B., Varga, G.A. and St-Pierre, N.R., 2006. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89; E31-E51.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2004. *FAO Food and Nutrition Paper 81: worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2008. *High-level conference on world food security: the challenges of climate change and bioenergy*,

- HLC/08/INF/3. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Fox, D.G., Tedeschi, L.O., Tylutki, T.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., Chase, L.E., Pell, A.N. and Overton, T.R., 2004. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science and Technology* 112; 29-78.
- Fremy, J.M. and Usleber, E., 2003. Policy on characterization of antibodies used in immunochemical methods of analysis for mycotoxins and phycotoxins. *Journal of AOAC International* 86; 868-871.
- González Pereyra, M.L., Alonso, V.A., Sager, R., Morlaco, M.B., Magnoli, C.E., Astoreca, A.L., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M., Dalcero, A.M. and Cavaglieri, L.R., 2008. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology* 104; 1034-1041.
- Goryacheva, I.Yu., Rusanova, T.Yu., Burmistrova, N.A. and De Saeger, S., 2009. Immunochemical methods for the determination of mycotoxins. *Journal of Analytical Chemistry* 64; 768-785.
- Hancock, D., 2009. Common questions about hay moisture. The University of Georgia, Athens, GA. available at:
http://www.caes.uga.edu/commodities/fieldcrops/forages/Ga_Cat_Arc/2009/GC0904.pdf. Accessed 12 April 2012.
- Hasan, S.M. and Hall, J.B., 1975. The physiological function of nitrate reduction in *Clostridium perfringens*. *Journal of General Microbiology* 87; 120-128.
- Hino, T., Miyazaki, K. and Kuroda, S., 1991. Role of extracellular acetate in the fermentation of glucose by a ruminal bacterium. *Journal of General and Applied Microbiology* 37; 121-129.

- Hintz, R.W., Mertens, D.R. and Albrecht, K.A., 1996. Effects of sodium sulfite on recovery and composition of detergent fiber and lignin. *Journal of AOAC International* 79; 16-22.
- Hiraoka, H., Ishikuro, E. and Goto, T., 2010. Simultaneous analysis of organic acids and inorganic anions in silage by capillary electrophoresis. *Animal Feed Science and Technology* 161; 58-66.
- Hiraoka, H., Fukunaka, R., Ishikuro, E., Enishi, O. and Goto, T., 2012. Improvement and validation of the method to determine neutral detergent fiber in feed. *Animal Science Journal* 83; 690-695.
- Hiraoka, H., Yamamoto, K., Mori, Y., Asao, N., Fukunaka, R., Deguchi, K., Iida, K., Miyazaki, S. and Goto, T., Modified use of a commercial ELISA kit for deoxynivalenol determination in rice and corn silage. *Mycotoxin Research* DOI: 10.1007/s12550-012-0155-6.
- Hirst, E.L. and Ramstad, S., 1957. Changes in organic acid content of perennial rye-grass during conservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 8; 727-732.
- Hollinger, K. and Ekperigin, H.E., 1999. Mycotoxicosis in food producing animals. *The veterinary clinics of North America. Food Animal Practice* 15; 133-165.
- Hook, S. and Williams, R., 2004. HGCA (The Home-Grown Cereals Authority) Project Report 354: investigating the possible relationship between pink grains and *Fusarium* mycotoxins in 2004 harvest feed wheat. The Home-Grown Cereals Authority, London, UK.
- Horwitz, W. and Albert, R., 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International* 89; 1095-1109.
- Hsu, J., Arcot, J. and Lee, N.A., 2009. Nitrate and nitrite quantification from

- cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chemistry* 115; 334-339.
- Ihaka, R. and Gentleman, R., 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5; 299-314. available at: <http://www.R-project.org>. Accessed 2 November 2012.
- Ingalls, J.R., 1996. Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 60; 297-300.
- International Organization for Standardization (ISO), 2000. ISO 15089: water quality-guidelines for selective immunoassays for the determination of plant treatment and pesticide agents. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Organization for Standardization (ISO), 2010. ISO 21748: guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2011. Safety evaluation of certain contaminants in food; Prepared by the Seventy-second meeting of JECFA. WHO Food Additives Series 63, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Kan, C.A. and Meijer, G.A.L., 2007. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 133; 84-108.
- Kolver, E.S. and Muller, L.D., 1998. Performance and nutrient intake of high producing holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science* 81; 1403-1411.
- Kramer, C.Y., 1957. Extension of multiple range tests to group correlated adjusted Means. *Biometrics* 13; 13-18.

- Krska, R., Welzig, E. and Boudra, H., 2007. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Animal Feed Science and Technology* 137; 241-264
- Lanzas, C., Tedeschi, L.O., Seo, S. and Fox, D.G., 2007. Evaluation of protein fractionation systems used in formulating rations for dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 90; 507-521.
- Lattanzio, V.M.T., Pascale, M. and Visconti, A., 2009. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28; 758-768.
- Li, Y., McCrory, D.F., Powell, J.M., Saam, H. and Jackson-Smith, D., 2005. A survey of selected heavy metal concentrations in Wisconsin dairy feeds. *Journal of Dairy Science* 88; 2911-2922.
- Lupo, A., Roebuck, C., Settimo, K., Quain, A., Kennedy, J. and Abouzied, M., 2010. Validation study of a rapid ELISA for detection of deoxynivalenol in wheat, barley, malted barley, corn, oats, and rice. *Performance Tested Method 090901. Journal of AOAC International* 93; 600-610.
- Lynch, G.P., 1972. Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 55; 1243-1255.
- Mansfield, M.A. and Kuldau, G.A., 2007. Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage. *Mycologia* 99; 269-278.
- Martins, H.M., Almeida, I., Marques, M.F. and Guerra, M.M., 2008. Fumonisin and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 46; 2585-2587.
- McClure, F.D. and Lee, J.K., 2003. Computation of HORRAT values. *Journal of AOAC International* 86; 1056-1058.
- McDonald, P., Henderson, A.R. and Ralton, I., 1973. Energy changes during

- ensilage. *Journal of the science of food and agriculture* 24; 827-834.
- McDonald, P., Henderson, N. and Heron, S., 1991. *The Biochemistry of Silage*, 2nd ed., Scholium International, New York.
- McDonald, P. and Whittenbury, R., 1973. The ensilage process. In: Butler, G.W. and Bailey, R.W. (eds), *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, vol. 3. Academic Press, London, pp. 33-60.
- McGill, R., Tukey, J.W. and Larsen, W.A., 1978. Variations of box plots. *The American Statistician* 32; 12-16.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International* 85; 1217-1240.
- Muck, R.E., Moser, L.E. and Pitt, R.E., 2003. Postharvest factors affecting ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R. and Harrison, J. (eds), *Silage Science and Technology*, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. Wisconsin. pp. 251-304.
- National Research Council (NRC), 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle* 7th rev. ed., Board on Agriculture and Natural Resources National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- Nicholson, F.A., Chambers, B.J., Williams, J.R. and Unwin, R.J., 1999. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource Technology* 70; 23-31.
- Nicholson, S.S., 2007. Nitrate and nitrite accumulating plants. In: Gupta, R.C. (ed), *Veterinary Toxicology*, Elsevier Inc., San Diego, CA, pp. 876-879.
- Pereira, J.S.F., Diehl, L.O., Duarte, F.A., Santos, M.F.P., Guimarães, R.C.L., Dressler, V.L. and Flores, É.M.M., 2008. Chloride determination by ion chromatography in petroleum coke after digestion by

- microwave-induced combustion. *Journal of Chromatography A* 1213; 249-252.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Tomás, V. and Martín, J., 2004. High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A* 1026; 57-64.
- Pestka, J.J., 2007. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137; 283-298.
- Pestka, J.J., 2010. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin Journal* 3; 323-347.
- Pestka, J.J., Zhou, H.R., Moon, Y. and Chung, Y.J., 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters* 153; 61-73.
- Playne, M.J., Stirling, A.C. and McDonald, P., 1967. Changes in organic acid composition during incubation of aseptically-grown grass. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 18; 19-20.
- Qiu, J., 1999. Statistics aided optimization for high-performance liquid chromatographic analysis of organic acids in tobacco. *Journal of Chromatography A* 859; 153-158.
- Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H. and Wang, Z., 2007. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1143; 48-64.
- Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P. and

- Garon, D., 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology* 45; 2420-2425.
- Robertson, J.B. and Van Soest, P.J., 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: James, W.P.T. and Theander, O. (eds), *The Analysis of Dietary Fiber in Food*. Marcel Dekker, New York. pp. 123-158.
- Roche, J.R., Friggens, N.C., Kay, J.k., Fisher, M.W., Stafford, K.J. and Berry, D.P., 2009. Invited review: body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* 92; 5769-5801.
- Rohweder, D., Valenta, H., Sondermann, S., Schollenberger, M., Drochner, W., Pahlow, G., Döll, S. and Dänicke, S., 2011. Effect of different storage conditions on the mycotoxin contamination of *Fusarium culmorum*-infected and non-infected wheat straw. *Mycotoxin Research* 27; 145-153.
- Rooke, J.A. and Hatfield, R.D., 2003. Biochemistry of ensiling. In: Buxton, D.R., Muck, R. and Harrison, J. (eds) *Silage Science and Technology*, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. Wisconsin. pp. 95-140.
- Ruiz, R., Tedeschi, L.O., Marini, J.C., Fox, D.G., Pell, A.N., Jarvis, G. and Russell, J.B., 2002. The effect of a ruminal nitrogen (N) deficiency in dairy cows: evaluation of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System ruminal N deficiency adjustment. *Journal of Dairy Science* 85; 2986-2999.
- Russell, J.B. and Hino, T., 1985. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *Journal of Dairy Science* 68; 1712-1721.

- Salay, E. and Zerlotti, A.M., 2002. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control* 13; 87-92.
- Savoie, P. and Jofriet, J.C., 2003. Silage storage. In: Buxton, D.R., Muck, R. and Harrison, J. (eds), *Silage Science and Technology*, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. Wisconsin. pp. 405-468.
- Schollenberger, M., Lauber, U., Jara, H.T., Suchy, S., Drochner, W. and Müller, H.-M., 1998. Determination of eight trichothecenes by gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 815; 123-132.
- Schollenberger, M., Müller, H.-M., Rüfle, M., Terry-Jara, H., Suchy, S., Plank, S. and Drochner, W., 2007. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in soy food marketed in Germany. *International Journal of Food Microbiology* 113; 142-146.
- Schothorst, R.C. and Jekel, A.A., 2001. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionisation detection. *Food Chemistry* 73; 111-117.
- Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E. and Flachowsky, G., 2006. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Additives and Contaminants* 23; 1008-1020.
- Seglar, B., 2003. Fermentation analysis and silage quality testing. *The Proceedings of the Minnesota Dairy Health Conference*; College of

Veterinary Medicine, University of Minnesota. Minnesota. available at: http://www.cvm.umn.edu/dairy/prod/groups/cvm/@pub/@cvm/documents/asset/cvm_22260.pdf. Accessed 16 April 2012.

Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L. and Kizek, R., 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology* 3; 94-99.

Soga, T. and Ross, G.A., 1997. Capillary electrophoretic determination of inorganic and organic anions using 2,6-pyridinedicarboxylic acid: effect of electrolyte's complexing ability. *Journal of Chromatography A* 767; 223-230.

Soga, T. and Ross, G.A., 1999a. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 834; 65-71.

Soga, T. and Ross, G.A., 1999b. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 837; 231-239.

Soga, T. and Imaizumi, M., 2001. Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis* 22; 3418-3425.

Student, 1908. The probable error of a mean. *Biometrika* 6; 1-25.

Suttie, J.M., 2000. Hay and straw conservation - for small-scale farming and pastoral conditions. FAO (Food and Agriculture Organization) Plant Production and Protection Series No. 29. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y. and Ueno, Y., 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and

zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry.

Journal of Chromatography A 882; 23-28.

Tangni, E.K., Motte, J.C., Callebaut, A. and Pussemier, L., 2010.

Cross-reactivity of antibodies in some commercial deoxynivalenol test kits against some fusariotoxins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58; 12625-12633.

Thompson, M., 2000. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. The Analyst 125; 385-386.

’t Mannetje, L., 2000. Silage making in the tropics with particular emphasis on smallholders. FAO (Food and Agriculture Organization) Plant Production and Protection Series No. 161. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Turner, N.W., Subrahmanyam, S. and Piletsky, S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. Analytica Chimica Acta 632; 168-180.

Uden, P., Robinson, P.H. and Wiseman, J., 2005. Editorial: use of detergent system terminology and criteria for submission of manuscripts on new, or revised, analytical methods as well as descriptive information on feed analysis and/or variability. Animal Feed Science and Technology 118; 181-186.

Valenta, H., Dänicke, S. and Döll, S., 2003. Analysis of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in animal tissues by liquid chromatography after clean-up with an immunoaffinity column. Mycotoxin Research 19; 51-55.

Vanatta, L.E., 2008. Ion-chromatographic determination of seven common anions in electronic-grade, water-miscible solvents. Journal of

- Chromatography A 1213; 70-76.
- Van Soest, P.J., 1973. Collaborative study of acid-detergent fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 56; 781-784.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74; 3583-3597.
- Van Soest, P.J. and Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 50; 50-55.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Tamminga, S., Dewhurst, R.J., van Vuuren, A., De Brabander, D. and Demeyer, D., 2006. Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *Journal of Dairy Science* 89; 3954-3964.
- Wada, A., Bonoshita, M., Tanaka, Y. and Hibi, K., 1984. A study of a reaction system for organic acid analysis using a pH indicator as post-column reagent. *Journal of Chromatography* 291; 111-118.
- Weiss, W.P., Chambertain, D.G. and Hunt, C.W., 2003. Feeding silages. In: Buxton, D.R., Muck, R. and Harrison, J. (eds), *Silage Science and Technology*, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. Wisconsin. pp. 469-504.
- Wright, M.J. and Davison, K.L., 1964. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. *Advances in Agronomy* 16; 197-247.
- Yoshizawa, T., Takeda, H. and Ohi, T., 1983. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agricultural and Biological Chemistry* 47; 2133-2135.
- Zachariasova, M., Hajslova, J., Kostelanska, M., Poustka, J., Krplova, A., Cuhra, P. and Hochel, I., 2008. Deoxynivalenol and its conjugates in

beer: a critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 625; 77-86.

Zebeli, Q., Dijkstra, J., Tafaj, M., Steingass, H., Ametaj, B.N. and Drochner, W., 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal of Dairy Science* 91; 2046-2066.

Zhou, T., He, J. and Gong, J., 2008. Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotoxin Journal* 1; 23-30.

青木 繁伸, 2009. Rによる統計解析. オーム社. 東京.

浅沼 成人, 日野 常男, 2004a. ルーメン微生物の発酵とエネルギー代謝の調節. 小野寺 良次 (監修), 板橋 久雄 (編), 新ルーメンの世界: 微生物生態と代謝制御. 農山漁村文化協会, 東京. pp. 454-532.

浅沼 成人, 日野 常男, 2004b. 乳酸利用の増強によるルーメンアシドーシスおよびメタン生成の抑制. *日本畜産学会報* 75; 543-550.

板橋 久雄, 1998. ルーメンにおける消化. 佐々木 康之 (監修), 小原 嘉昭 (編), 反芻動物の栄養生理学. 農山漁村文化協会, 東京. pp. 87-112.

稲垣 純一, 2003. 稲発酵粗飼料による耕畜連携システムの構築に関する研究. *日本畜産学会報* 74; 251-260.

牛田 一成, 1998. 糖質の消化と発酵. 佐々木 康之 (監修), 小原 嘉昭 (編), 反芻動物の栄養生理学. 農山漁村文化協会, 東京. pp. 137-149.

牛田 一成, 2004. 繊維質の分解. 小野寺 良次 (監修), 板橋 久雄 (編), 新ルーメンの世界: 微生物生態と代謝制御. 農山漁村文化協会, 東京. pp. 316-324.

- 宇田川 俊一, 2004. 食品のカビ 1 基礎編: 食品のカビ汚染と危害. 幸書房, 東京. pp. 83-110.
- 大山 嘉信, 1971. サイレージ発酵に関連する諸問題. 日本畜産学会報 42; 301-317.
- 近藤 宏, 末吉 正成, 村田 真樹, 淵上 美喜, 2007. 検定. 上田 太一郎 (監修), Excel でかんたん統計分析-「分析ツール」を使いこなそう!. オーム社. 東京. pp 37-76.
- 志藤 博克, 高橋 仁康, 山本 哲久, 関澤 啓朗, 2006. 細断型ロールペーラ導入農家における収穫調製作業の省力効果. 日本草地学会誌 52; 144-145.
- 志藤 博克, 橋 保宏, 川出 哲生, 高橋 仁康, 岡嶋 弘, 北中 敬久, 正田 幹彦, 古田 東司, 和田 俊郎, 安藤 和登, 2010. 汎用型飼料収穫機の開発とトウモロコシ収穫調製作業体系の構築. 日本草地学会誌 56; 187-193.
- 篠崎 謙, 菅原 伯, 1961. 第一胃内揮発性脂肪酸の生成におよぼす各種飼料の影響. 日本畜産学会報 32; 153-158.
- 杉浦 勝明, 2008. わが国における飼料の安全確保の変遷, 現状と今後の課題. 日本畜産学会報 79; 445-458.
- 高橋 敏能, 吉田 宣夫, 松山 裕城, 2009. 日本における肉用牛と乳用牛における稲発酵粗飼料の利用, および山形県における飼料イネの利用事例. 日本畜産学会報 80; 381-385.
- 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 (動衛研), 2008. ELISA キットによるサイレージ中デオキシニバレノール分析法. 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所, 茨城. available at:
http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_poisoning/manual/myco-elisa.html. Accessed 5 February 2013.

- 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構），2006. 日本飼養標準・乳牛（2006年版）. 社団法人 中央畜産会，東京.
- 農林水産省，1988. 飼料の有害物質の指導基準の制定について：農林水産省畜産局長通知 63 畜 B 第 2050 号. 農林水産省，東京.
- 農林水産省，2007. 輸入乾牧草の安全性確保について：農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課長通知 19 消安第 1297 号. 農林水産省，東京.
- 農林水産省，2008. 飼料分析基準の制定について. 農林水産省消費・安全局長通知 19 消安第 14729 号. 農林水産省，東京.
- 農林水産省，2010. 食料・農業・農村基本計画. 農林水産省基本政策. 農林水産省，東京. available at:
http://www.maff.go.jp/j/keikaku/k_aratana/pdf/kihon_keikaku_22.pdf.
Accessed 16 April 2012.
- 橋爪 徳三，1969. 乳牛のエネルギー代謝の諸問題. 日本畜産学会報 40; 221-228.
- 服部 信司，2010. 穀物価格高騰の背景—アメリカにおけるエタノール生産へのトウモロコシの大量使用. 財団法人 日本農業研究所（編），バイオマス燃料の意義と展望. 財団法人 日本農業研究所. 東京. pp. 174-192.
- 宮崎 昭，1977. 飼料中の硝酸塩が反すう動物に及ぼす影響に関する研究. 日本畜産学会報 48; 53-61.
- 元井 葎子，1998. 代謝障害. 佐々木 康之（監修），小原 嘉昭（編），反芻動物の栄養生理学. 農山漁村文化協会，東京. pp. 393-418.
- 森田 倫子，2006. 調査と情報 546: 食料自給率問題；数値向上に向けた施策と課題. 国立国会図書館，東京.

謝辞

本論文の作成中、共同研究者としても協力いただいた妻・理絵、と子供たち（大卓、大知）の協力について感謝いたします。本論文の作成に当たり多方面にわたる支援をいただきました独立行政法人 農林水産消費安全技術センター 神戸センターの職員の皆様に感謝いたします。

本論文のもととなる論文の実験計画、共同試験についてご指導いただいた独立行政法人 肥飼料検査所 本部 飼料鑑定第一課長 石黒 瑛一博士（現 社団法人 日本科学飼料協会 科学飼料研究センター）に感謝いたします。また、共同研究者として協力いただいた、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所、同機構 畜産草地研究所、地方独立行政法人 北海道立総合研究機構 畜産試験場、独立行政法人 農林水産消費安全技術センターの関係各位に感謝いたします。また、分析法の妥当性確認における共同試験でお世話になりました、アジレント・テクノロジー株式会社、国立医薬品食品衛生研究所、十勝農業協同組合連合会、全国農業協同組合連合会、全国酪農業共同組合連合会、独立行政法人 家畜改良センター、財団法人 日本食品分析センター、日本大学生物資源科学部、フォス・ジャパン株式会社の関係各位に感謝いたします。

本論文の作成について副査としてご指導いただいた信州大学大学院農学研究科教授 藤田 智之先生、農学部 食料生産科学科教授 神 勝紀先生、同附属アルプス圏フィールド科学教育研究センター教授 濱野 光市先生、国立大学法人 京都大学大学院 農学研究科教授 松井 徹先生に感謝いたします。最後に信州大学大学院総合工学系研究科在学中からご指導をいただき、本論文の作成についても丁寧にご指導、ご助言をいただいた信州大学 農学部 応用生命科学科教授 後藤 哲久先生に感謝いたします。