報 文

ラサロシドおよびセンジュラマイシンのモノクローナル抗体による
酵素免疫測定法およびイムノクロマトグラフ法の開発

(平成 15 年 7 月 25 日受理)

渡辺 博夫*[†] 佐竹 敦子* 城戸 靖雅* 辻 章夫*Development of Monoclonal-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
and Immunochromatographic Assay for Lasalocid and SemduramicinHiroo WATANABE[†], Atsuko SATAKE, Yasumasa KIDO and Akio TSUJI(Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology: 3-7-11, Hashimotodai,
Sagamihara, Kanagawa 229-1132, Japan; [†] Corresponding author)

Monoclonal antibodies (MAbs) against lasalocid and semduramicin were prepared using keyhole limpet hemocyanin conjugates for the immunization of mice. With these MAbs, we developed quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods for lasalocid and semduramicin. The ELISAs were quantitative in the ranges of 0.1–50 ng/mL for lasalocid and 0.05–12.5 ng/mL for semduramicin, and showed 50% inhibition concentrations of 1.2 ng/mL for lasalocid and 0.5 ng/mL for semduramicin. The coefficient of variations (CV%) of lasalocid were 0.3–4.4% for intra-assay and 0.5–5.1% for inter-assay and those of semduramicin were 0.1–4.6% for intra-assay and 0.3–5.2% for inter-assay. The detection limits for lasalocid and semduramicin were 10 ng/g and 5 ng/g in chicken liver and muscle, respectively. Based on the immunochromatographic method, rapid test kits for lasalocid and semduramicin were also developed. With these kits, the detection limits of lasalocid were 50 ng/mL for standard solution and 125 ng/g for chicken muscle, and those of semduramicin were 10 ng/mL for standard solution and 100 ng/g for chicken muscle.

(Received July 25, 2003)

Key words: ラサロシド lasalocid; センジュラマイシン semduramicin; モノクローナル抗体 monoclonal antibody; 酵素免疫測定法 ELISA; イムノクロマトグラフ法 immunochromatographic method

緒 言

ポリエーテル系抗生物質ラサロシドおよびセンジュラマイシンは、抗菌作用とコクシジウム症予防作用があり、ニワトリの飼料添加物として使用されている。これらポリエーテル系抗生物質の特徴は構造内にエーテル結合を含む5員環および6員環を持ち (Fig. 1), 種々の金属とキレート形成して容易に環状構造をとり、生体膜において金属イオンの能動輸送を促進することが知られている。

ラサロシドおよびセンジュラマイシンなどポリエーテル系抗生物質の測定法としては微生物学的測定法^{1)~4)}, HPLC^{5)~8)}, LC/MS^{9)~12)} および酵素免疫測定法 (ELISA 法)^{13)~18)} など多種の分析法が報告されている。ポリクローナル抗体によるラサロシドの ELISA 法¹³⁾が報告されているが、センジュラマイシンの ELISA 法は報告

されていない。本研究では、ラサロシドおよびセンジュラマイシンのモノクローナル抗体を作製し、ニワトリ肝臓および筋肉中の残留分析へ適用し得る高感度、高特異的 ELISA 法を開発するとともに、イムノクロマトグラフ法を応用した簡易分析キットを開発した。

実験方法

1. 試薬および器具

ラサロシドナトリウム (LLC) およびオボアルブミン (OVA) はシグマ・アルドリッチ・ジャパン (株), センジュラマイシンナトリウム (SDM) は (独) 東京肥飼料検査所, *N*-ヒドロキシコハク酸イミドおよびペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体は和光純薬工業 (株), 塩酸 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) および *N*-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸 (CHES) は (株) 同仁化学研究所, 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリールホスフェイトはシグマ社製, フロイント完

[†] 連絡先

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

Lasalocid

Semduramicin

Fig. 1. Structures of lasalocid and semduramicin

全アジュバント (FCA), フロイント不完全アジュバント (FICA), 寒天および酵母エキスはディフコ社, ブロックエースは大日本製薬(株), ヘモシアニン (KLH) はピラス社, ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) およびアルカリホスファターゼ (ALP) はロシュ・ダイアグノスティックス(株), HRP 酵素活性測定キットおよび ALP 酵素活性測定キットはバイオラドラボラトリーズ(株), マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット, プロテイン A カラムおよび Sephadex G-25 はアマシャム・ファルマシア・バイオテック(株), 抗マウス IgG 抗体 (Affinity Pure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)) はジャクソンイムノリサーチ社, TLC プレート (シリカゲル 60, 20×20 cm) はメルク・ジャパン(株), Sep-Pak Silica カートリッジは日本ウォーターズ(株), 96 ウェルマイクロプレートおよびトリプチンケースペプトンはベクトン・ディッキンソン社からそれぞれ購入した。また, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 は農林水産省動物医薬品検査所から購入した。その他の試薬は和光純薬工業(株)製試薬特級を用いた。マイクロプレートリーダーはラボシステムズ社製, プレートウォッシャーはワラック社製を用いた。イムノクロマトグラフキットのデバイスは富士レビオ(株)より提供された。

2. 試 液

PBS: KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, NaCl 8 g および Na₂HPO₄ 1.15 g を精製水に溶解して 1 L にした。

HRP用緩衝液: 0.05% Tween 20 および 25% ブロックエース含有 PBS

ALP用緩衝液: 0.05% Tween 20, 1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L ZnCl₂ および 25% ブロックエース含有 75 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)

洗浄液: 0.05% Tween 20 含有生理食塩水

展開溶液: 1 mol/L MgCl₂ 含有 0.1 mol/L CHES-HCl (pH 10.2)

3. 抗ラサロシドおよび抗センジュラマイシンモノクローナル抗体の調製

3.1 免疫原および固相用抗原の調製

免疫原は前報^{17), 18)}に準じて活性エステル法により合成した。すなわち, LLC または SDM 各 50 mg, *N*-ヒドロキシコハク酸イミド 7.5 mg および EDC 12.5 mg をジメチルホルムアミド 1 mL に溶解後, 室温で 23 時間かくはんした。この反応液を水 1 mL に溶解した KLH 50 mg に加えてかくはん後, 0.4 mol/L NaOH 溶液で pH 9 に調整した。室温で 6 時間かくはん後, 水 3 L に対して 3 回透析した後, 凍結乾燥して免疫原を調製した。

固相用抗原は KLH の代わりに OVA を用い, 同様の方法で調製した。

3.2 HRP および ALP 標識抗原の調製

HRP 標識抗原は活性エステル法により合成した。すなわち, LLC または SDM 各 1 mg, *N*-ヒドロキシコハク酸イミド 500 μg および EDC 500 μg をジメチルホルムアミド 1 mL に溶解後, 室温で 8 時間かくはんした。この反応液を PBS 1 mL に溶解した HRP 10 mg に加えてかくはんした。室温で 14 時間かくはん後, PBS であらかじめ平衡化した Sephadex G-25 カラム (25×2.5 cm i.d.) で分画し, 各分画の HRP 酵素活性は HRP 酵素活性測定キットを用いて測定し, また, HRP 標識抗原の抗原抗体反応性は, 4 の ELISA 法により, LLC または SDM の添加濃度 0 ng と 1 ng の OD 値の差として求めた。両測定値の共に高い画分を ELISA 法に使用した。

ALP 標識抗原は 1 mmol/L MgCl₂ および 0.1 mmol/L ZnCl₂ 含有 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) であらかじめ平衡化した Sephadex G-25 カラム (25×2.5 cm i.d.) で分画し, 以下, HRP 標識抗原の場合と同様に処理して調製した。

3.3 免疫

調製した免疫原を PBS にけん濁し (2 mg/mL), FCA との等量混合エマルジョンを調製後, BALB/c マウス (メス 8 週齢) に腹腔内投与した (300 μg/匹)。2 回目以降は FCA の代わりに FICA を用い, 2 週間ごとに 4 回追加免疫を行った。最終免疫は 3.4 の細胞融合の 3 日前にアジュバントを加えずに同量の免疫原を腹腔内投与した。

3.4 ハイブリドーマ細胞の調製¹⁹⁾

ポリエチレングリコール法によりマウス脾細胞と P3X 63Ag8U.1 (P3U1) ミエローマ細胞とを融合し, HAT 選択培地で培養後, 抗原を固相化した 96 ウェルマイクロプレートを用いた ELISA によりスクリーニングを行い陽性反応を示したハイブリドーマ細胞を 2 回連続してクローニングし, 目的とする株を確立した。モノクローナル抗体のアイソタイプはマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキットを用いて行った。さらに, このハイブリドーマ

細胞を培養し、マウス腹腔内に移植後、モノクローナル抗体を大量調製し、プロテイン A カラムにより精製した。

3.5 抗体価の測定およびスクリーニング

固相用抗原を固相化した 96 ウェルマイクロプレート ($1 \mu\text{g}/\text{ウェル}$) にマウス血清または培地上清の希釈溶液を $50 \mu\text{L}$ 加え、 37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄液で 3 回洗浄後、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 PBS 溶液 ($0.16 \mu\text{g}/\text{mL}$) $100 \mu\text{L}$ を添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄液で 3 回洗浄後、HRP 酵素活性測定キットの基質溶液を $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 30 分間反応させた後、 0.5 mol/L H_2SO_4 $100 \mu\text{L}$ を加えて反応を停止させ、 450 nm の吸光度を測定し、横軸に希釈溶液の希釈度を取り、吸光度をプロットした。原液の吸光度の 50% の点の希釈度を抗体価とした。

4. 酵素免疫測定法 (ELISA)

4.1 標準液による検量線

マイクロプレートの各ウェルに抗マウス IgG 抗体 PBS 溶液 ($10 \mu\text{g}$ IgG/mL) を $100 \mu\text{L}$ ずつ加えて 1 夜 4°C 放置して固相化した後、1%ゼラチン溶液をウェル当たり $300 \mu\text{L}$ ずつ分注して 1 夜 4°C 放置してブロッキングを行った。プレートを 3 回洗浄後、HRP 用緩衝液で希釈したモノクローナル抗体希釈液 (LLC 抗体: $100 \text{ ng}/\text{mL}$, SDM 抗体: $600 \text{ ng}/\text{mL}$) $50 \mu\text{L}$, HRP 用緩衝液で調製した標準原液 ($50 \text{ ng}/\text{mL}$) から調製した 2 倍希釈系列溶液 (LLC: $0.05 \sim 50 \text{ ng}/\text{mL}$, SDM: $0.025 \sim 50 \text{ ng}/\text{mL}$) を $100 \mu\text{L}$ および HRP 標識抗原希釈液 (HRP 用緩衝液で HRP-LLC: $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$, HRP-SDM: $3.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈) $50 \mu\text{L}$ ずつを加え、 37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄液で 3 回洗浄後、HRP 酵素活性測定キットの基質溶液を $100 \mu\text{L}$ ずつ加えて、 37°C で 30 分間反応させた後、 0.5 mol/L H_2SO_4 $100 \mu\text{L}$ を加えて、反応を停止させ、 450 nm の吸光度を測定した。

4.2 試料溶液の調製および定量

ニワトリ筋肉または肝臓 1 g に 80%メタノール 10 mL を加えてホモジナイズし、遠心分離して得た上清 $100 \mu\text{L}$ に HRP 用緩衝液 $900 \mu\text{L}$ を加えて希釈し、試料溶液とした。試料溶液 $100 \mu\text{L}$ について 4.1 に準じて操作し、標準液による検量線から LLC または SDM の量を求めた。

5. 添加回収試験

LLC および SDM をそれぞれメタノールに溶解して標準原液 ($1,000 \mu\text{g}/\text{mL}$) を調製し、次いで HRP 用緩衝液で希釈して $0.8, 1.6, 3.2$ および $6.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ の LLC 標準溶液および $0.5, 1, 2, 4$ および $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ の SDM 標準溶液を調製した。

LLC および SDM 無添加飼料で飼育したニワトリの肝臓または筋肉各 1 g にこれら標準溶液を $50 \mu\text{L}$ ずつ加え、さらに、80%メタノール 10 mL を添加してホモジナイズし、遠心分離後、その上清 $100 \mu\text{L}$ を HRP 用緩衝液 $900 \mu\text{L}$ で希釈して試料溶液とし、ELISA で測定を行った。

6. バイオオートグラフ法

Bacillus stearothermophilus var. *calidolactis* C-953 を用い、厚生省法⁴⁾に準じたバイオオートグラフ法により測定を行った。

7. イムノクロマトグラフ法^{17), 18)}

7.1 イムノクロマトグラフキットの作製

イムノクロマトグラフは Fig. 2 に示すように基質展開液部 (A), サンプルスポット部 (B), 発色部 (C) および吸収部 (D) から構成されている。基質展開液部 (A) は、展開溶液 $300 \mu\text{L}$ を含む展開溶液槽および 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリールホスフェイト $100 \mu\text{g}$ を点着したガラス繊維 ($20 \times 5 \text{ mm}$) から構成されている。サンプルスポット部 (B) はスポンジ ($9 \times 6 \text{ mm}$) に ALP 標識抗原 ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$) $5 \mu\text{L}$ を固相化して作製した。発色部 (C) は調製したモノクローナル抗体 (700 ng IgG/膜) をニトロセルロース膜

Fig. 2. Schematic diagram of immunochromatographic assay kit

A: Substrate (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) and developing solution part, B: Sample spotting part (ALP-conjugate absorbed part), C: Color development part (Immobilized monoclonal antibody), D: Absorption part

(50×5 mm)に固相化して作製した。吸収部(D)は吸収パッド(15×10 mm)から構成されている。

7.2 測定法

ニワトリ肝臓または筋肉2 gにALP用緩衝液5 mLを加え、ホモジナイズ、遠心分離後、その上清を試料溶液とした。試料溶液25 μ Lを簡易分析キットのB部に滴下し、A部を押すことにより測定を開始した。測定開始20分後、発色部(C)の発色度を標準溶液の発色度と比較し、目視判定を行った。

結果および考察

1. 免疫原の合成およびモノクローナル抗体の作製

LLCおよびSDMはN-ヒドロキシコハク酸を用いた活性エステル法によりKLHに結合させてそれぞれの免疫原を合成した。調製した免疫原を用い、BALB/cマウスを免疫してモノクローナル抗体を作製した。すなわち、ポリエチレングリコール法により脾細胞とミエローマ細胞P3X63Ag8U.1(P3U1)を細胞融合した後、クローニングを繰り返し、目的とするハイブリドーマを選択した。LLCについては培養上清の抗体価は600、腹水より得られたモノクローナル抗体の抗体価は15,000、アイソタイプは λ 鎖を有するIgG1であった。また、SDMについては培養上清の抗体価は180、腹水より得られたモノクローナル抗体の抗体価は25,000、アイソタイプは κ 鎖を有するIgG1であった。

2. 検量線

抗マウスIgG抗体を固相化した96ウェルマイクロプレートを用いる第2抗体固相法によるELISAを開発した。Fig. 3にHRP標識体を用いるELISAの標準溶液の検量線を示す。LLCについては定量範囲0.1~50 ng/mL、50%阻害濃度は1.2 ng/mL、検出限界は0.1 ng/mLであった。SDMについては定量範囲0.05~12.5 ng/mL、50%阻害濃度は0.5 ng/mL、検出限界は0.05 ng/mLであった。また、各濃度での繰り返しの日内変動およ

Fig. 3. ELISA standard curves of LLC and SDM
B: OD in the presence of LLC or SDM, B₀: OD in the absence of LLC or SDM

び日間変動(CV%)は、LLCでは0.3~4.4% (n=8) および0.5~5.1% (n=3), SDMでは0.1~4.6% (n=8) および0.3~5.2% (n=3)であり、良好であった。

3. 交差反応性

LLCおよびSDMのHRP標識体を用いるELISAについて交差反応性を検討したところ、他のポリエーテル系抗生物質(モネンシン, サリノマイシン, ナラシン)との交差反応性は0.001%以下であった。また、他の抗生物質(アンピシリン, アビラマイシン, アボバルシン, バシトラシン, セファゾリン, コリスチン, ジヒドロストレプトマイシン, エリスロマイシン, エンロフロキサシン, ノシヘプタイド, オキシテトラサイクリン, ベンジルペニシリン)との交差反応性もすべて0.05%以下であった。

4. ELISAによるニワトリ試料中のLLCおよびSDMの回収試験

HRP標識体を用いるELISA法によるニワトリ肝臓および筋肉中のLLCおよびSDMの回収試験を検討した。LLCおよびSDMのニワトリ筋肉および肝臓試料からの抽出液には10倍量の80%メタノールを用いた。80%メタノール抽出液そのままでは測定できなかった。メタノールおよび試料のマトリックス影響を検討するために、LLCおよびSDM無添加飼料で飼育したニワトリの筋肉および肝臓試料を80%メタノールでホモジナイズし、抽出して得た上清をHRP用緩衝液で10倍希釈した液で調製した標準液による検量線はHRP用緩衝液で調製した標準液による検量線と一致した。したがって、標準液の場合の検出限界(LLCは0.1 ng/mL, SDMは0.05 ng/mL)と抽出比(10倍)ならびに希釈比(10倍)を考慮すると、ニワトリ筋肉および肝臓からのLLCおよびSDMの検出限界は10 ng/gおよび5 ng/gである。

筋肉および肝臓試料からの試料溶液の調製は、試料を10倍量の80%メタノールで抽出し、HRP用緩衝液で10倍希釈することにした。筋肉および肝臓へのLLC 40, 80, 160, 320 ng/gおよびSDM 50, 100, 200, 400 ng/g添加した試料からの回収率および日内・日間変動はTable 1およびTable 2に示すように良好であった。

5. 微生物学的測定法との相関性

LLCおよびSDMを添加したニワトリ試料(LLC: 40~320 ng/g, SDM: 50~400 ng/g)について微生物学的測定法(バイオオートグラフ法)⁴⁾とELISA法で測定し、両方法の相関性を検討した。微生物学的測定法では妨害物質の除去のため抽出液をクリーンアップ後に測定を行った。一方、ELISAは抽出液を希釈して測定を行った。その結果、Table 3に示すように良好な相関性を得ることができた。

6. 簡易分析キットによるニワトリ肝臓および筋肉中のLLCおよびSDMの検出

HRP酵素活性測定の基質には、発色剤とともに過酸化水素を必要とするため測定直前に基質溶液を調製しなければならない。また、発色後の褪色がはやい。したがって、

Table 1. Recoveries of LLC and SDM from Chicken Liver Samples

LLC (ng/g)		40	80	160	320
Intra-assay	Recovery (%)	99.5	91.5	93.1	83.1
	C.V. (%) ($n=5$)	1.1	8.8	9.6	5.7
Inter-assay	Recovery (%)	94.0	88.8	91.1	83.3
	C.V. (%) ($n=3$)	11.4	10.6	9.6	7.6
SDM (ng/g)		50	100	200	400
Intra-assay	Recovery (%)	82.4	74.0	79.0	78.5
	C.V. (%) ($n=5$)	11.9	5.0	6.9	10.0
Inter-assay	Recovery (%)	79.9	76.4	79.0	80.2
	C.V. (%) ($n=3$)	12.6	8.4	6.4	8.8

Table 2. Recoveries of LLC and SDM from Chicken Muscle Samples

LLC (ng/g)		40	80	160	320
Intra-assay	Recovery (%)	106	93.0	80.0	79.4
	C.V. (%) ($n=5$)	3.2	9.8	8.6	7.7
Inter-assay	Recovery (%)	99.3	98.3	90.2	86.4
	C.V. (%) ($n=3$)	8.7	10.7	11.2	8.9
SDM (ng/g)		50	100	200	400
Intra-assay	Recovery (%)	78.8	86.8	82.0	80.5
	C.V. (%) ($n=5$)	3.4	8.3	9.2	5.6
Inter-assay	Recovery (%)	79.2	81.5	78.7	78.7
	C.V. (%) ($n=3$)	9.6	9.3	9.1	6.5

Table 3. Correlations between Bioautography and Proposed ELISA in the Assay of Chicken Liver and Muscle Samples

Sample			Regression equation	r^2	n
LLC	Chicken	Liver	$y = -1.1 + 1.10x$	0.93	20
		Muscle	$y = 5.3 + 1.00x$	0.97	20
SDM	Chicken	Liver	$y = 12.0 + 0.83x$	0.97	20
		Muscle	$y = 12.2 + 0.80x$	0.96	20

x: Bioautography, y: ELISA

Table 4. Detection Limits of LLC and SDM by Immunochromatographic Method

LLC	Added amounts of LLC*					
	0	1	10	50	125	250
Buffer solution	+++	+++	++	—	—	—
Chicken muscle extract	+++	+++	+++	++	—	—
SDM	Added amounts of SDM*					
	0	1	10	50	100	200
Buffer solution	+++	+++	+++	—	—	—
Chicken muscle extract	+++	+++	+++	++	—	—

*Buffer solution: ng/mL, Chicken muscle extract: ng/g
+++ Deep blue, ++ Blue, + Light blue, — No coloration

簡易分析キットの試薬には適合しない。そこで ALP を標識酵素とする LLC および SDM の ELISA 法を検討した。検出感度、再現性共に良好であったので、ALP を標識酵素に用いる LLC および SDM のイムノクロマトグラフ法の簡易分析キットを開発した。本キットによる LLC および SDM の標準液による検出限界は Table 4 に示すように LLC および SDM 共に 50 ng/mL であった。ニワトリ肝臓および筋肉中の LLC および SDM の検出について検討

した。肝臓は酵素反応が阻害されて測定できなかった。筋肉試料では Table 4 に示すように LLC は 50 ng/g と 125 ng/g の間で識別できた。SDM は 50 ng/g と 100 ng/g の間で識別できたので、検出限界はそれぞれ 125 ng/g および 100 ng/g である。いずれも ELISA に比べて検出感度はかなり低かったが、簡易分析キットとして半定量的判定は可能である。

ま と め

LLC および SDM に対するモノクローナル抗体を調製し、ELISA およびイムノクロマトグラフ法による検出キットを開発した。ELISA では前処理を行わずに従来法であるバイオオートグラフ法に匹敵する感度を得ることができた。また、イムノクロマトグラフ法では感度は低下するものの簡便かつ迅速に測定することが可能であった。

謝 辞

本研究は平成 11 年度生物系特定産業技術研究推進機構（ウルグアイ・ラウンド対策研究開発）による「動物用医薬品の簡易残留スクリーニング法の研究開発」の一環として行った。

文 献

- 1) Heil, K., Peter, F., Cielezsky, V., Thin-layer bioautographic assay for the detection of salinomycin sodium in rabbit tissues. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 997-998 (1984).
- 2) Vanderkop, P. A., MacNeil, J. D., Thin-layer chromatography/bioautography method for detection of monensin in poultry tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 735-738 (1989).
- 3) Vanderkop, P. A., MacNeil, J. D., Separation and detection of monensin and salinomycin by thin-layer chromatography/bioautography. *J. Chromatogr.*, **508**, 386-390 (1990).
- 4) (財)畜産生物科学安全研究所編 “畜水産食品の薬物残留とその分析法” 東京、近代出版、1994、p. 107-118.
- 5) Weiss, G., Felicito, N. R., Kaykaty, M., Chen, G., Caruso, A., Hargroves, E., Crowley, C., MacDonald, A., Tissue residue regulatory method for the determination of lasalocid sodium in cattle liver using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 75-78 (1983).
- 6) Martinez, E. E., Shimoda, W., Liquid chromatographic determination of multiresidue fluorescent derivatives of ionophore compounds, monensin, salinomycin, narasin, and lasalocid, in beef liver tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 637-641 (1986).
- 7) Ericson, J. F., Calcagni, A., Lynch, M. J., Determination of semduramicin sodium in poultry liver by liquid chromatography with vanillin postcolumn derivatization. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **77**, 577-582 (1994).
- 8) Matabudul, D. K., Conway, B., Lumley, I. D., A rapid method for the determination of lasalocid in animal tissues and eggs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by LC-MS-MS. *Analyst*, **125**, 2196-2200 (2000).
- 9) Horii, S., Miyahara, K., Maruyama, T., Confirmation of residual lasalocid sodium in commercial chicken liver by thermospray liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **32**, 30-37 (1991).
- 10) Schneider, R. P., Lynch, M. J., Ericson, J. F., Fouda, H. G., Electrospray ionization mass spectrometry of semduramicin and other polyether ionophores. *Anal. Chem.*, **63**, 1789-1794 (1991).
- 11) Blanchflower, W. J., Kennedy, D. G., Determination of lasalocid in eggs using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analyst*, **120**, 1129-1132 (1995).
- 12) Harris, J. A., Russell, C. A. L., Wilkins, J. P. G., The characterization of ionophore veterinary drugs by HPLC-electrospray MS. *Analyst*, **123**, 2625-2628 (1998).
- 13) Kennedy, D. G., Blanchflower, W. J., O'Dornan, B. C., Development of an ELISA for lasalocid and depletion kinetics of lasalocid residues in poultry. *Food Addit. Contam.*, **12**, 83-92 (1995).
- 14) Kennedy, D. G., Blanchflower, W. J., O'Dornan, B. C., Development of an ELISA for salinomycin and depletion kinetics of salinomycin residues in poultry. *Food Addit. Contam.*, **12**, 93-99 (1997).
- 15) Kennedy, D. G., Blanchflower, W. J., O'Dornan, B. C., Development of an ELISA for maduramicin and determination of the depletion kinetics of maduramicin residues in poultry. *Food Addit. Contam.*, **14**, 27-33 (1997).
- 16) Crooks, S. R. H., Traynor, I. M., Elliott, C. T., McCaughey, W. J., Detection of monensin residues in poultry liver using an enzyme immunoassay. *Analyst*, **122**, 161-163 (1997).
- 17) Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., Tsuji, A., Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assays for monensin. *Analyst*, **124**, 1611-1615 (1999).
- 18) Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., Tsuji, A., Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for salinomycin. *Anal. Chim. Acta*, **437**, 31-38 (2001).
- 19) Kohler, M., Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (London)*, **256**, 495-497 (1975).