

ダイズ PCR 検知法の開発の検討

表1. 加工食品、調味料および食品素材からのダイズの検知結果

食品	PCR法		ELISA法†
	植物*	ダイズ**	μg/g
ちくわ	+	+	48.9
ロースハム	+	+	8.2
食パン	+	+	1.2
豆乳	+	+	10.2
ビスケット	+	+	<2.5
焙煎豆茶	+	+	>250
ポテトチップス	+	+	<2.5
油あげ	-	-	<2.5
レトルト粥	+	+	<2.5
レトルト中華ソース	+	+	<2.5
醤油	+	+	<2.5
味噌	+	+	>250
風味調味料 A	-	-	<2.5
風味調味料 B	+	+	<2.5
大豆レシチン	+	+	<2.5
おからパウダー	+	+	18.5
大豆食物繊維	+	+	<2.5
大豆タンパク加水分解物	+	+	<2.5

+:陽性、 -:陰性

* 植物DNA検知プライマー;CP03-5'/CP03-3'使用

**ダイズDNA検知プライマー;Gym81/Gym82使用

†使用キット:Veratox Quantitative Soy Flour Allergen Testkit (Neogen,USA)

表2. モデル加工食品のダイズ検知結果

食品	無添加		ダイズ添加	
	植物*	ダイズ**	植物*	ダイズ**
イチゴジャム	-	-	-	-
トマトソース	-	-	-	+
コーヒーゼリー	-	-	-	+
ソーセージ	-	-	-	+
鶏肉団子	-	-	-	+
スイートポテト	+	-	+	+
白がゆ	+	-	+	+

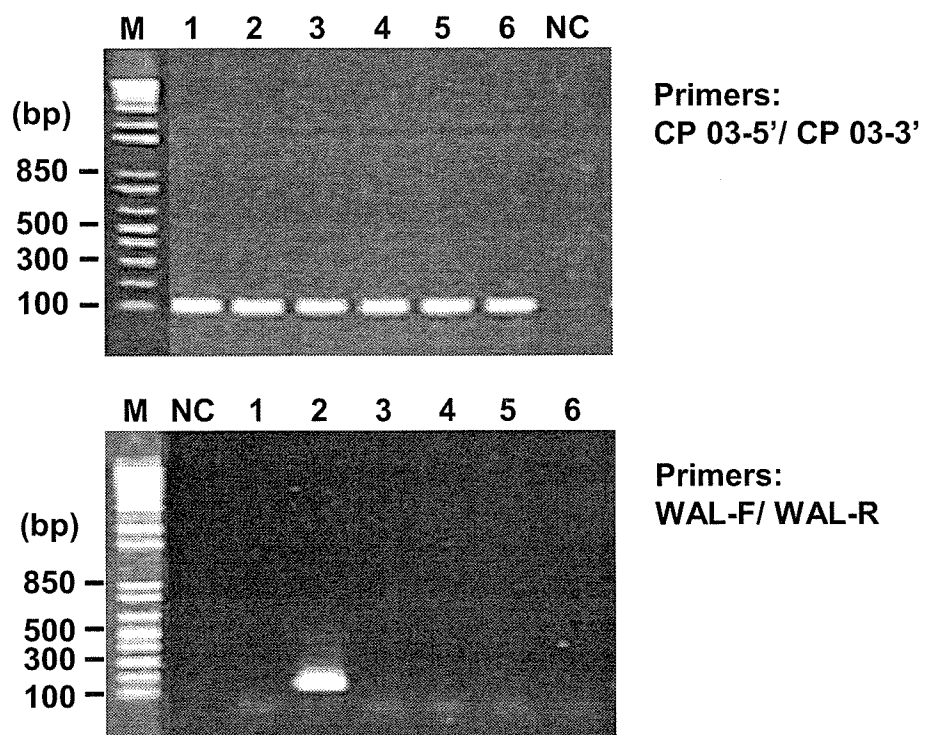
+:陽性、 -:陰性

* 植物DNA検知プライマー:CP03-5'/CP03-3'

**ダイズDNA検知プライマー:Gym81/Gym82

クルミ PCR 検知法開発の検討

図 1A. 植物の交差性の検討



DNA (50 ng); 1: キウイ, 2: クルミ, 3: リンゴ, 4: ヤマイモ, 5: バナナ, 6: ダイズ

図 1B. ナッツ類の交差性の検討

図 1C. 検出感度の検討

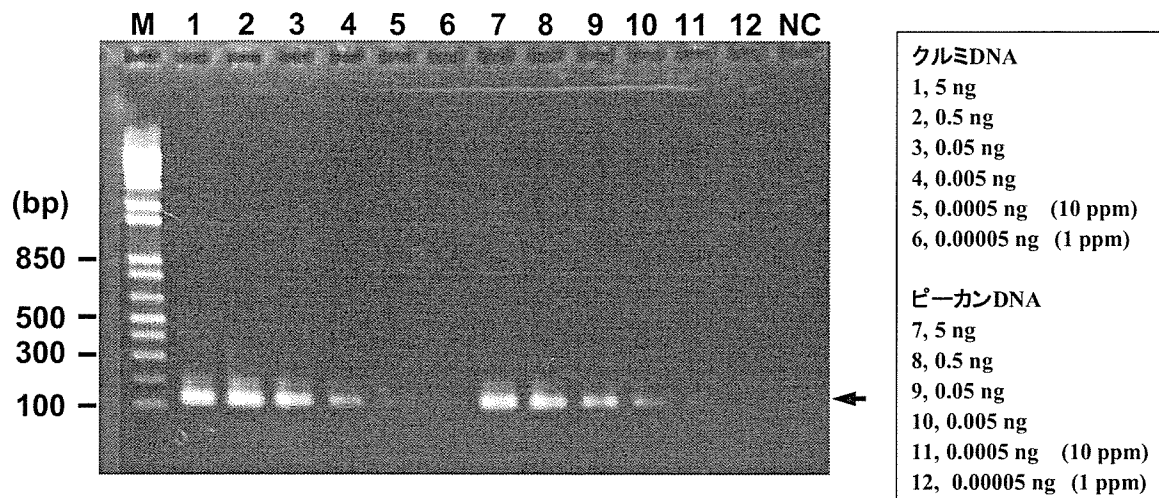
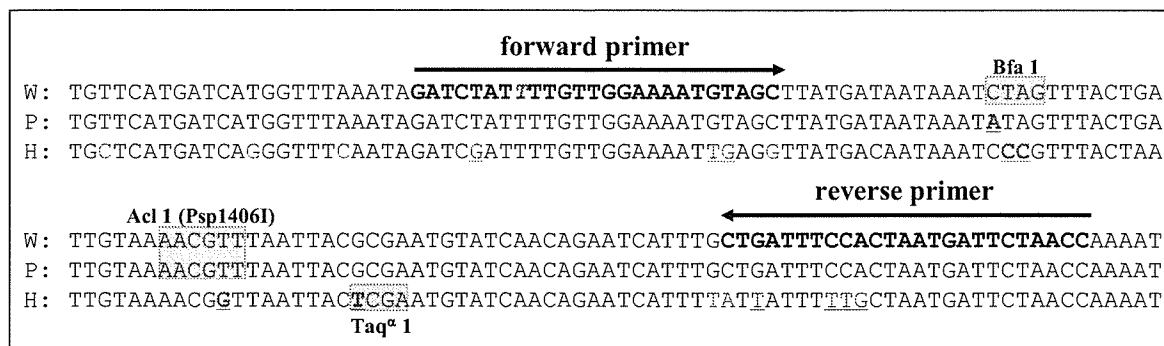


図 2A. クルミ科 matK 遺伝子配列比較



赤:クルミ遺伝子と相違する塩基 T: プライマー配列 A

W : クルミ	遺伝子情報 : Juglans nigra (AF118036), Juglans californica (AF118027)
P : ピーカンナッツ(食用)	遺伝子情報 : Carya illinoensis 本検討で決定
H : ヒッコリー(木材)	遺伝子情報 : Carya tomentosa (AF118039)

図 2B. PCR断片の制限酵素処理による分別

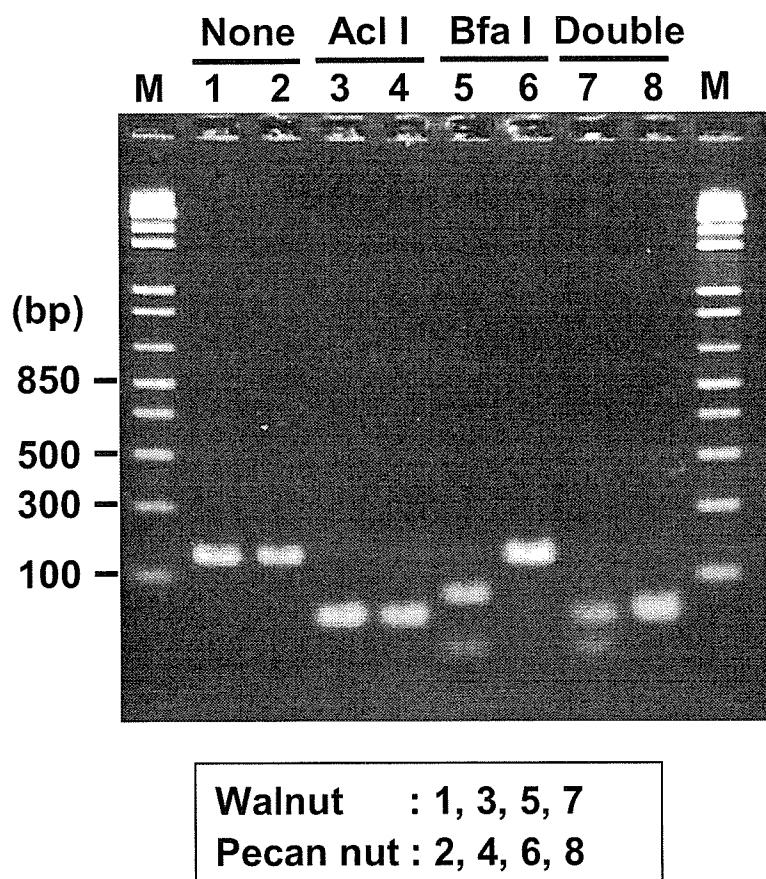


図 3. モデル加工食品での検証結果

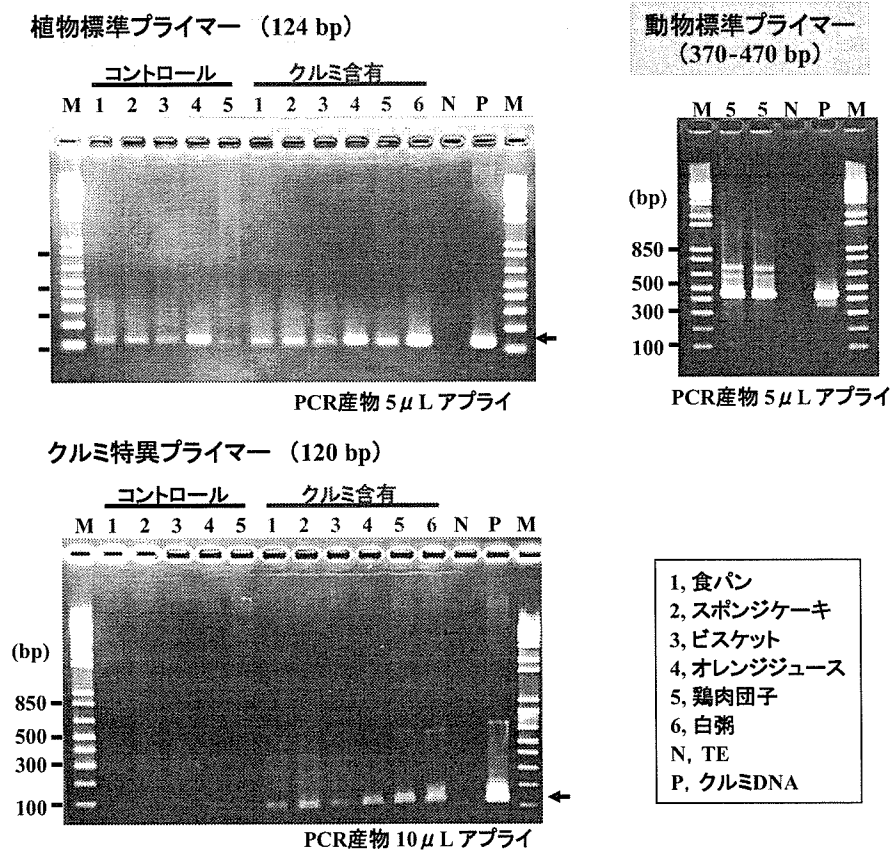


表 1. クルミ PCR 検知用プライマー

Name	Sequence (5'→3')	Specificity	Amplicon
A: CP 03-5'	5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'	Chloroplast DNA /sense	Plants 123 bp
CP 03-3'	5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3'	Chloroplast DNA /antisense	
B: WAL-F	5'-GAT CTA TAT TGT TGG AAA ATG TAG C-3'	chloroplast maturase (matK) gene / sense	Walnut 120 bp
WAL-R	5'-GGT TAG AAT CAT TAG TGG AAA TCA G-3'	chloroplast maturase (matK) gene / antisense	

A, for confirmation of validity of the DNA extracted from plants for polymerase chain reaction.
B, for specific detection of walnut

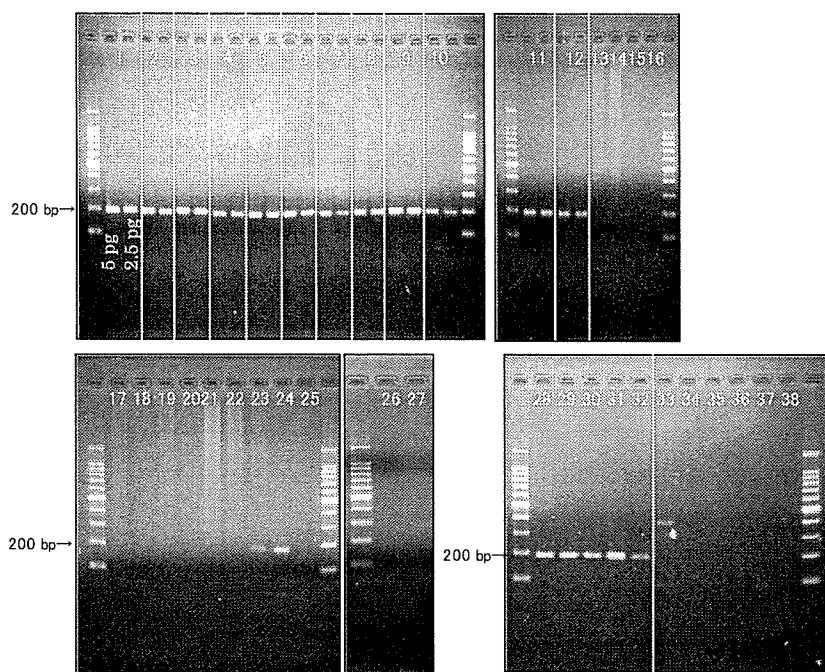
表 2. クルミおよびピーカンナッツの PCR 増幅産物の制限酵素での切断サイズ

Species	Endnuclease			
	None	Acl 1	Bfa 1	Acl 1 and Bfa 1
Walnut	120	59	40	19
		61	80	40
				61
Pecan nut	120	59	120	59
		61		61

エビ PCR 検知法の開発の検討

図1 特異性と感度の検討

No.	サンプル名	200bp 増幅産物
1	クルマエビ	+
2	アカエビ	+
3	サクラエビ	+
4	アマエビ	+
5	シマエビ	+
6	テナガエビ	+
7	アメリカザリガニ	+
8	スキャンピー	+
9	キャーバロプスター	+
10	オマールエビ	+
11	イセエビ	+
12	ウチワエビ	+
13	シヤコ	-
14	オキアミ	-
15	アミ	-
16	H ₂ O	-
17	ダンジネスクラブ	+
18	タラバガニ	-
19	ズワイガニ	-
20	花咲ガニ	-
21	ワタリガニ	+
22	アサヒガニ	-
23	上海ガニ	+
24	シマエビ(陽性コントロール)	+
25	H ₂ O	-
26	アブラガニ	-
27	ケガニ	-
28	鶏団子(10ppm)	+
29	クリームコロッケ(10ppm)	+
30	魚肉ソーセージ(10ppm)	+
31	トマトソース(10ppm)	+
32	FD卵スープ(10ppm)	+
33	鶏団子(0ppm)	-
34	クリームコロッケ(0ppm)	-
35	魚肉ソーセージ(0ppm)	-
36	トマトソース(0ppm)	-
37	FD卵スープ(0ppm)	-
38	H ₂ O	-

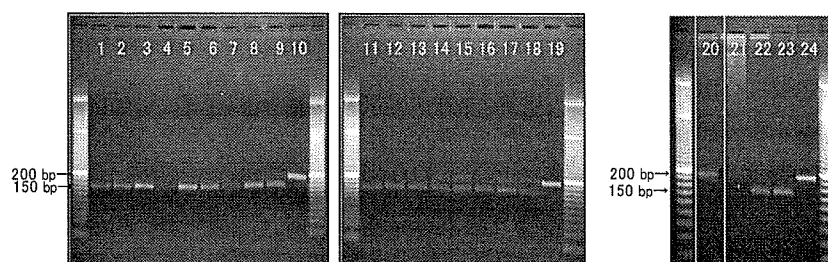


* エビ：5, 2.5 pg DNA、その他：50 ng DNA を使用。

* ダンジネスクラブ、ワタリガニはN数を増やした際に、増幅が確認された。

図2. 制限酵素処理の検討

No.	サンプル名	150bp 消化断片
1	クルマエビ	+
2	アカエビ	+
3	サクラエビ	+
4	アマエビ	+
5	シマエビ	+
6	テナガエビ	+
7	アメリカザリガニ	+
8	スキャンピー	+
9	キャーバロプスター	+
10	クルマエビ(未消化)	-
11	オマールエビ	+
12	イセエビ	+
13	ウチワエビ	+
14	鶏団子(10ppm)	+
15	クリームコロッケ(10ppm)	+
16	魚肉ソーセージ(10ppm)	+
17	トマトソース(10ppm)	+
18	FD卵スープ(10ppm)	+
19	クルマエビ(未消化)	-
20	ダンジネスクラブ	-
21	ワタリガニ	-
22	上海ガニ	+
23	クルマエビ	+
24	クルマエビ(未消化)	-



厚生労働科学研究費補助金(食品の安心安全確保推進研究事業)
食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究
分担研究報告書

果実類の検出法開発に関する研究

分担研究者 松田りえ子 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部)
協力研究者 秋元政信, 加藤重城 (プリマハム株式会社 基礎研究所)
田口大夢, 渡辺聡, 平尾宜司 (ハウス食品株式会社)
森山達哉 (近畿大学 農学部)
穂山浩, 酒井信夫 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部)

研究要旨 特定原材料に準ずる20品目の一つであるキウイフルーツの検知法として, [1] キウイフルーツアクチニジンに対するELISA系の構築, [2] PCRによるキウイフルーツの検知法を検討し, バナナの検知法開発の基礎検討として, [3] 主要アレルゲンを精製した。[1] 前年度に作製した抗未変性アクチニジンモノクローナル抗体を用いて, 検知範囲の異なる2種類のサンドイッチELISAと, イムノクロマトキットを構築した。[2] 前年度までに開発してきたキウイフルーツPCR検知法が, 擬似混入試料中のキウイフルーツタンパク質10 micro g/g (w/w)相当の未加熱キウイフルーツや, 実際に市販されている製品中のキウイフルーツやサルナシを検知できる性能を有することを確認した。また, [3] バナナの試験法の確立を指向し, 検知ターゲット分子として33-35 kDaのキチナーゼを精製するとともに, そのIgE結合性を確認した。

A. 研究目的

表示が推奨されている20品目に含まれる果実類のキウイフルーツ及びバナナの検知法の開発を目的とした。

B. 研究方法

[1] キウイフルーツ定量検知法

1) 未変性アクチニジン(以下, N-ACT)認識モノクローナル抗体(以下MAb)の利用: 平成17年度までに確立した8株の抗N-ACT MAbについて全て腹水からの精製を完了させ, $8 \times 7 = 56$ 通りのN-ACT検出のための組み合わせを検討し, サンドイッチELISAおよびイムノクロマトキットを構築した。それぞれの組み合わせについては, 19種類の食品, 18種類の果物との交差性をサンドイッチELISAおよびイムノクロマトキットにより確認した。また, $63^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{分}$, $80^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{分}$, $100^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{分}$ でキウイフルーツ粗タンパク質溶液を加熱し, 検出率への影響を調べた。

2) 変性アクチニジン(以下, D-ACT)認識MAbの作製と利用: キウイフルーツ粗タンパク質よりModel 491 Prep Cell(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株))を用いて

各画分を分取し, 蒸留水で透析後, 凍結乾燥によりD-ACTを得た。供試動物として, 6週齢のBALB/cマウス5尾を用い, 初回免疫の後, 2週間の間隔で3回追加免疫を行った。D-ACTに対する抗体価が最も上がった個体に対して, 尾部静脈よりD-ACTの追加免疫を行なった。静脈注射より4日後にKöhlerとMilstein¹⁾に従いMAbの作製を行なった。無菌的に脾臓を摘出し, 脾臓細胞を調製後, ミエローマ細胞(P3X63Ag8.653)と融合後, 限界希釈法によりクローニングを行ない抗D-ACT抗体産生ハイブリドーマを作製した。マウス腹水法により腹水を得た後, Protein Gカラムで精製し, ビオチン標識を行なった。ビオチン標識抗体を二次抗体としたサンドイッチELISAによりMAbの組み合わせを検討した。

3) キウイフルーツ標準品作製方法の検討: キウイフルーツ(ヘイワード種)に2倍量の冷水を加えホモジナイズ後, 凍結乾燥粉末を得た。凍結乾燥粉末1gに, 0.5% SDS, 2%メルカプトエタノールおよび0.5 M NaClを含む0.1 M Tris-HCl (pH 8.6)を19 ml加え, 抽出を行った。抽出条件は, 16時間室温にて振とう抽出する際, ①そのまま, ②Pastorello et al.²⁾に従いプロテア

ーゼインヒビターの E-64 を 2・g/ml 添加, ③E-64 を 10・g/ml 添加とした。また, 温度及び時間を変更し, ④沸騰水中で 1 時間加熱抽出の計 4 条件とし, 抽出後のタンパク質組成を SDS-PAGE で比較した。

[2] キウイフルーツ定性検知法

平成 17 年度までに, キウイフルーツ PCR 検知法として「キウイフルーツ, サルナシ, キウイフルーツとサルナシの交配種, マタタビ」(食用として流通しているマタタビ属植物全て)を検知する方法(キウイフルーツ PCR 検知法 I)と, そこからマタタビを除いた「キウイフルーツ, サルナシ, キウイフルーツとサルナシの交配種」を検知する方法(キウイフルーツ PCR 検知法 II)を開発してきた。これら 2 つの方法により, 擬似混入ヨーグルトならびに市販製品の分析を行なった。擬似混入ヨーグルトは, 市販ヨーグルトにキウイフルーツタンパク質 10 micro g/g (w/w)相当のキウイフルーツ果肉のフリーズドライ粉末を添加して調製した。市販製品は, キウイフルーツまたはサルナシの表示のある試料として, ドライフルーツミックス入りシリアル, キウイフルーツ入りクッキー, ドライキウイフルーツ, 果物香料入りグミキャンディー, キウイフルーツジャム, サルナシジャム, 100%キウイフルーツジュース, ミックスフルーツジュース, 10%サルナシジュース, ミックスフルーツ果肉入りヨーグルト, キウイフルーツ果肉入りヨーグルトの 11 種類, 表示のない試料として, ドライフルーツ入りシリアル, グレープフルーツジャム入りクッキー, 果物・野菜ジュースの 3 種類を購入した。これらの試料から DNA を抽出し, 2 組のキウイフルーツ PCR 検知用プライマーを用いて PCR を行なった。なお使用した DNA 試料は, 別途, 植物共通に存在する遺伝子配列を増幅する PCR で増幅産物が得られるかを確認した。

[3] バナナ抗原精製

バナナからタンパク質を抽出し, 電気泳動にて分離し主要なバンドに相当するタンパク質を N 末端アミノ酸分析により同定した。このうち, 33-35 kDa に相当するタンパク質がバナナアレルゲンとしてすでに知られているキチナーゼであり, その IgE 結合性をイムノブロットング法で解析した。これをバナナ検知タ

ーゲット分子とすることを目的に, キチンを用いたアフィニティー精製を試みた。

C. 研究結果

[1] キウイフルーツ定量検知法

1) N-ACT 認識 MAb の利用: 56 通りの組み合わせの中から, キウイフルーツのみ検出する組み合わせと, キウイフルーツと同属のサルナシも検出する組み合わせの 2 種類を選択し, サンドイッチ ELISA と, イムノクロマトキットを構築した。また, コーヒー豆, ブラックペッパーとの交差性については, ブロッキング剤の検討により擬陽性反応はなくなり, キウイフルーツ属以外の食品との交差性は認められなかった。しかし, 加熱による検出率の影響を確認したところ, いずれの組み合わせでも 63°C・30 分で 60%, 80°C・30 分で 20%, 100°C・30 分で 5%の検出率となり, 加熱温度が高くなるに従い検出率が低下した。(Fig. 1)

2) D-ACT 認識 MAb の作製と利用: D-ACT 認識 MAb を 18 種類確立した。18 × 17 = 342 通りの組み合わせの中から, サンドイッチ ELISA で 0.5% SDS および 2% メルカプトエタノールで変性させたアクチニジンを検出可能な 63 通りの組み合わせが得られた。一部の組み合わせについては, 各種食品との交差性を調べ, キウイフルーツに特異的であった。

3) キウイフルーツ標準品作製方法の検討: 各条件で抽出したタンパク質を SDS-PAGE で確認したところ, ①そのまま 16 時間室温にて振とう抽出では, アクチニジン以外のタンパク質は消失していた。②E-64 を 2・g/ml 加えた場合にも, アクチニジン以外は消失していた。③E-64 を 10・g/ml 加えた場合には, 16 時間後でも全てのタンパク質が残存していた。④沸騰水中で 1 時間加熱抽出を行った場合にも, 全てのタンパク質は, ③と同様に残存していた。(Fig. 2)

[2] キウイフルーツ定性検知法

2 組のキウイフルーツ PCR 検知用プライマーを用いて PCR を行なった結果, キウイフルーツタンパク質 10 micro g/g (w/w)相当の未加熱キウイフルーツ果肉のフリーズドライ粉末を含有する擬似混入ヨーグルトから, それぞれ標的サイズの増幅産物が得られた。市

販製品については、ヨーグルト、クッキー、シリアル以外の製品からのDNA収量は低く、抽出法のスケールアップなどの改良を行なっても20 ng/ μ l未満の濃度のDNAしか得られないものもあった。得られた抽出DNA溶液をPCRの鋳型として、2組のキウイフルーツPCR検知用プライマーを用いてPCRを行なった結果、キウイフルーツまたはサルナシ表示のある11製品中8製品で標的サイズの増幅産物が得られた。増幅産物の得られなかった3製品のうち、ドライキウイフルーツについては、試料の表面を洗浄することで、標的サイズの増幅産物が得られるようになった。また、キウイフルーツジャムは、スケールアップした抽出法で得たDNA溶液をPCRの鋳型とすることで、標的サイズの増幅産物が得られるようになった。着色料[果汁(オレンジ、リンゴ、キウイフルーツ由来)]と表示されていたグミキャンディーについては、抽出法をスケールアップしても増幅産物は得られなかった。キウイフルーツ表示のない3製品については、予想通り、キウイフルーツPCR検知法で標的サイズの増幅産物は得られなかった。(Table 1)

[3] バナナ抗原精製

バナナから酸性条件下で抽出された主要なタンパク質バンドとして、33-35 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 15 kDaなどのバンドが得られた。これらのタンパク質のN末端アミノ酸配列を解析し帰属を試みたところ、33-35 kDaはキチナーゼ、30 kDaはグルカナーゼ、20 kDaはソーマチンライクプロテイン、15 kDaはレクチンであった。バナナ患者血清によるIgE結合性では、33-35 kDaのキチナーゼと20 kDaのソーマチンライクプロテインが比較的強い結合性を示した。キチナーゼに関してはキチンに特異的に結合し、強酸条件下で溶出することが明らかとなった。得られた標品の純度は85%程度で、まだ一部20 kDaの混入が認められたが、免疫源としては使用可能と思われた。(Fig. 3, 4)

D. 考察

[1] キウイフルーツ定量検知法

N-ACT 認識 MAb を用いたサンドイッチ ELISA では、未加熱であれば、感度良く、また特異的にキウイ

フルーツを検知できるが、加熱により検出感度は低下することから、加工食品の検知法としては適していないものと考えられた。しかし、イムノクロマトキットは、キウイフルーツを扱う食品加工工程の検査に利用できるものと考えられた。

D-ACT 認識 MAb を用いたサンドイッチ ELISA では、63通りの組み合わせが得られており、この中から、検出感度、加熱温度、特異性などから、キウイフルーツ検知法に最適な組み合わせを選択していく予定である。

キウイフルーツの標準品については、アクチニジンがシステインプロテアーゼであることから、メルカプトエタノールを含む溶液中では、タンパク質分解活性が高くなったものと考えられた。そのため、Pastorello et al.²⁾が報告した、キウイフルーツのタンパク質の分解が抑制できたとするE-64を2 micro g/ml加えても、アクチニジン以外のキウイフルーツのタンパク質が全て分解されており、E-64の添加濃度は10 micro g/ml必要であると考えられた。しかし、E-64をこの濃度で抽出液に加えることは、コスト的に非常に問題であり、キウイフルーツからの標準品の調製には加熱による抽出が望ましいと考えられた。

[2] キウイフルーツ定性検知法

キウイフルーツPCR検知法により、擬似混入ヨーグルト中のキウイフルーツタンパク質10 micro g/g (w/w)相当の未加熱キウイフルーツを検知できたことから、同法がキウイフルーツの確定試験に必要な感度を有するものと推測された。また、実際に市販されているキウイフルーツまたはサルナシの表示のある製品に含まれるキウイフルーツやサルナシも、唯一グミキャンディーを除き、検知できることが確認できた。グミキャンディーについては、着色料[果汁(オレンジ、リンゴ、キウイフルーツ由来)]、と表示されていたが、使用量が検知下限よりも少ないために検知できなかったものと考えられる。今後は、各種加工工程を経た擬似混入試料でバリデーションを行なうことが必要である。また、市販製品からのDNA抽出において、牛乳、乳酸菌などのマトリックス由来のDNAを多く含有すると考えられるヨーグルト、小麦由来のDNAを多く

含むクッキー、シリアル製品ではDNA収量が高かったが、ジュース、ジャム、ドライフルーツなどでは予想以上にDNA収量が低かった。今後、同検知法のバリデーションを進める上で、キウイフルーツなどの果物からのDNA抽出法の改良・検討が必要となる可能性も考えられる。

[3] バナナ抗原精製

バナナのアレルゲンタンパク質としてすでに知られているキチナーゼはキチンを用いてアフィニティー精製が可能であり、また実際に患者血清 IgE によって認識された。よってこの分子をバナナ検知ターゲット分子の有力な候補としても良いと思われた。純度に関してはもう少し向上させることが好ましいと考えられた。

来年度は精製したバナナ抗原を免疫源としてモノクローナル抗体調製を行い、バナナ検知法の確立を行う予定である。

E. 結論

[1] キウイフルーツ定量検知法

- 1) N-ACT 認識 MAb を用いて、キウイフルーツのみ検出、あるいは同属のサルナシも検出可能なサンドイッチ ELISA ならびにイムノクロマトキットを構築した。
- 2) 構築したサンドイッチ ELISA およびイムノクロマトキットには 19 種類の食品、18 種類の果物で交差性が認められなかった。
- 3) 加熱による検出率の影響を確認したところ、63°C・30 分で 60%、80°C・30 分で 20%、100°C・30 分で 5% の検出率となり、加工食品の検知法としては適していないものと考えられた。
- 4) 加工食品検査用として、新たに D-ACT 認識 MAb を 18 種類確立し、サンドイッチ ELISA 系で 63 通りの有効な組み合わせが得られた。
- 5) キウイフルーツ標準品の作製方法としては、アクチニジンがプロテアーゼであるため、抽出時のタンパク質の分解を防ぐには高濃度のプロテインインヒビターの添加、あるいは加熱処理が有効であった。

[2] キウイフルーツ定性検知法

平成17年度までに開発してきたキウイフルーツ

PCR検知法が、擬似混入ヨーグルト中のキウイフルーツタンパク質10 ppm(w/w)相当の未加熱キウイフルーツや、実際に市販されている製品中のキウイフルーツやサルナシを検知できる性能を有することを確認できた。今後は、バリデーション用の擬似混入試料を複数作製して、同キウイフルーツPCR検知法のバリデーションを進める。

[3] バナナ抗原精製

バナナ検知ターゲット分子として33-35 kDaのキチナーゼを精製するとともに、そのIgE結合性を確認した。来年度は精製したバナナ抗原を免疫源としてモノクローナル抗体調製を行い、バナナ検知法の確立を行う予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. R. Matsuda, Y. Yoshioka, H. Akiyama, K. Aburatani, Y. Watanabe, T. Matsumoto, N. Morishita, H. Sato, T. Mishima, R. Gamo, Y. Kihira, and T. Maitani. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods. *JAOAC*, **89**, 1600-1608 (2006).
2. H. Taguchi, S. Watanabe, T. Hirao, H. Akiyama, S. Sakai, T. Watanabe, R. Matsuda, A. Urisu, and T. Maitani. Specific Detection of Potentially Allergenic Kiwifruit in Foods Using Polymerase Chain Reaction, *J. Agric. Food Chem*, in press.

学会発表

1. 秋元政信, 加藤重城, 八木敬広, 酒井信夫, 松田りえ子, 穂山浩, 米谷民雄. ELISA によるキウイ検出方法について. 第92回 日本食品衛生学会学術講演会, 愛知, 2006年10月.
2. 田口大夢, 渡辺 聡, 平尾宜司, 穂山浩, 渡邊敬浩, 松田りえ子, 米谷民雄. PCR法を用いたキウイの定性検知法について. 日本食品化学学会第12回学術大会, 名古屋, 2006年6月.

G. 知的財産権の登録

1. 特許出願 特願 2006-270089
2. 特願 2006-183458 号(発明の名称 キウイフルーツ検出用プライマーセット), 特願 2006-83585 号の国内優先権に基づく出願

H. 参考文献

- 1) G. Köhler and C. Milstein (1975) Nature 256, 495-497
- 2) Pastorello EA, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, Ispano M, Incorvaia C, Giuffrida MG, Ortolani C (1998) J Allergy Clin Immunol 101, 531-537

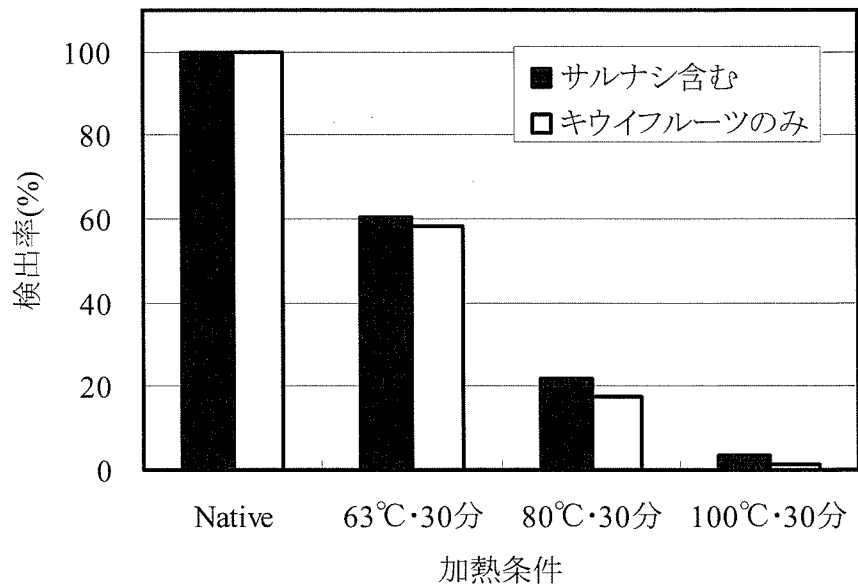


Fig.1 キウイフルーツタンパク質の加熱温度と検出率の変化

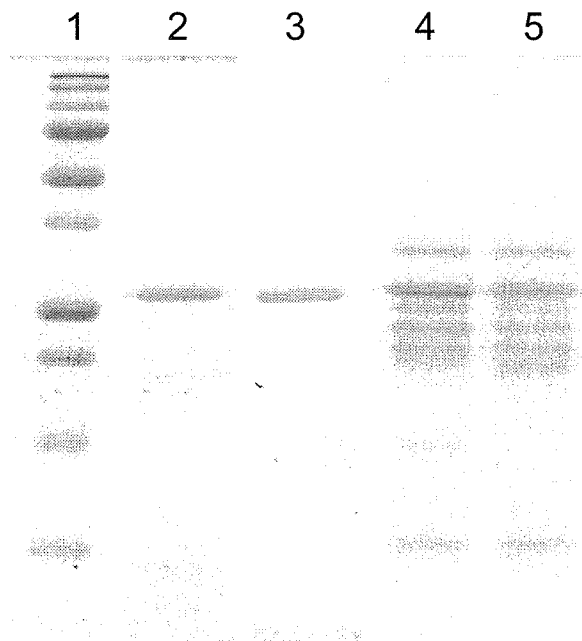


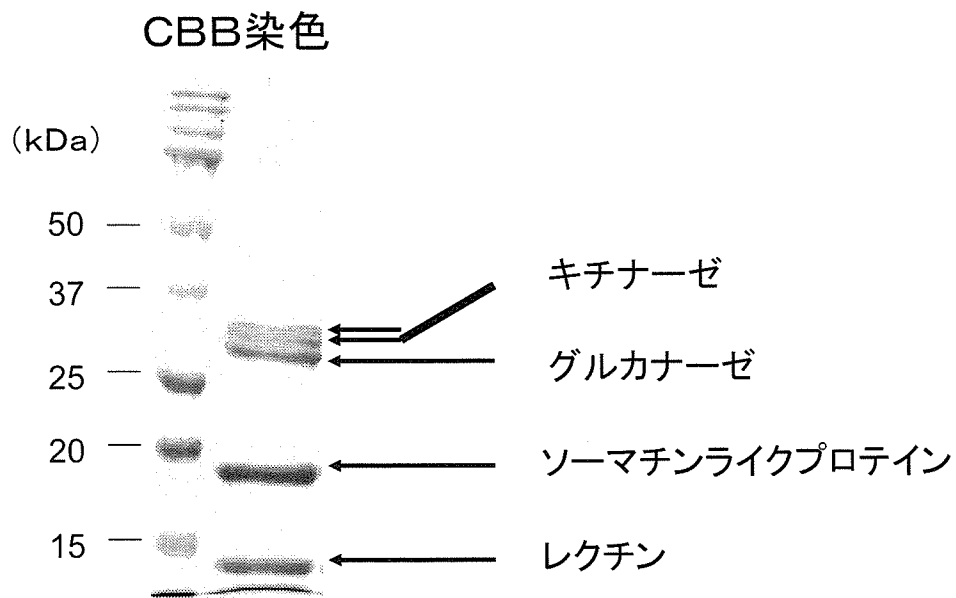
Fig.2 各条件で抽出後のキウイフルーツタンパク質の SDS-PAGE 結果

レーン1:分子量マーカー, レーン2:①室温 16 時間抽出, レーン3:②室温 16 時間抽出(E-64 2・g/ml),
 レーン4:③室温 16 時間抽出(E-64 10・g/ml), レーン5:④沸騰水中 1 時間抽出.

Table 1 擬似混入試料及び市販品の特異性確認

サンプル	鑄型DNA濃度 (ng/μL)	標的サイズの増幅産物の有無*		
		植物共通 PCR検出法	キウイフルーツ PCR検出法 I	キウイフルーツ PCR検出法 II
擬似混入試料				
擬似混入ヨーグルト	20	+	+	+
キウイフルーツまたはサルナシの表示のある試料				
ドライフルーツミックス入りシリアル	20	+	+	+
キウイフルーツ入りクッキー	20	+	+	+
ドライキウイフルーツ (通常⇒洗浄)	<10 ⇒ <10	+	- ⇒ +	- ⇒ +
果物香料入りグミキャンディー (1倍⇒10倍抽出)	<10 ⇒ <10	+	- ⇒ ±	-
キウイフルーツジャム (1倍⇒10倍抽出)	<10 ⇒ 20	+	- ⇒ +	- ⇒ +
サルナシジャム	<10	+	+	+
100%キウイフルーツジュース	<10	±	+	+
ミックスフルーツジュース	11	+	+	+
10%サルナシジュース	<10	+	+	+
ミックスフルーツ果肉入りヨーグルト	20	+	+	+
キウイフルーツ果肉入りヨーグルト	20	+	+	+
表示のない試料				
ドライフルーツ入りシリアル	20	+	-	-
グレープフルーツジャム入りクッキー	20	+	-	-
果物 野菜ジュース	15	+	-	-

* n=2で実施し、結果は+:2/2、±:1/2、-:0/2で表示した。



PVDF膜に転写し、ポンソーSにて染色後、エドマン分析によってN末端アミノ酸配列を決定しホモロジーサーチを行った。

Fig. 3 バナナ主要タンパク質の帰属・同定

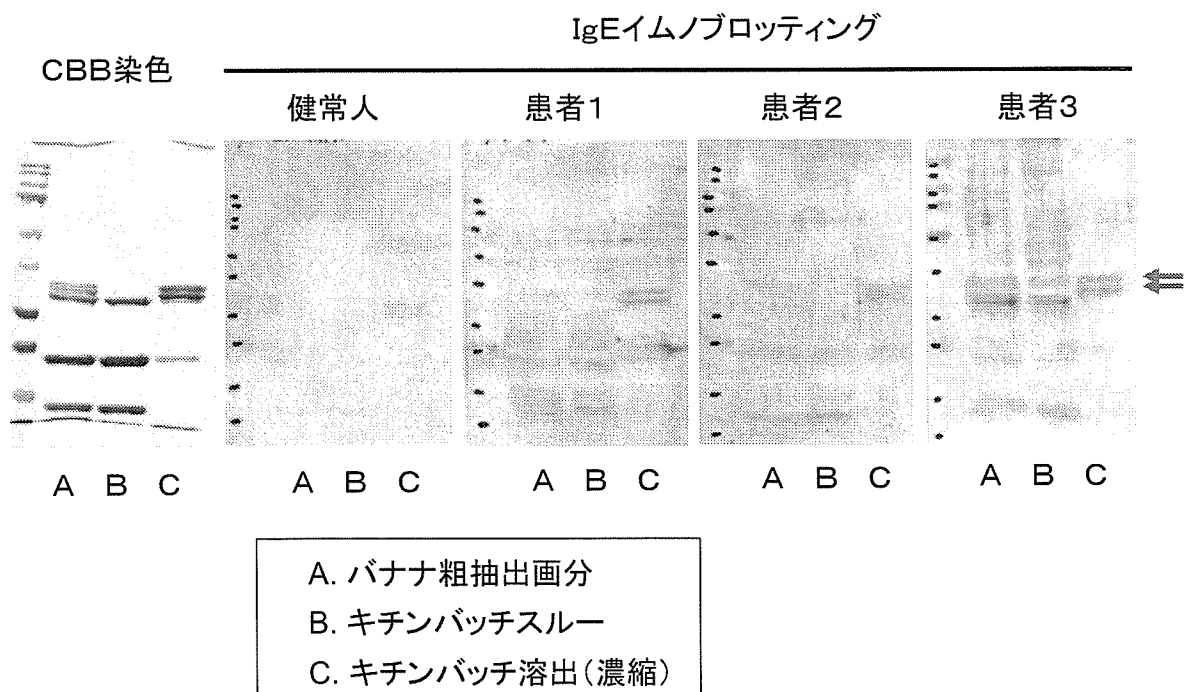


Fig. 4 バナナキチナーゼの精製と患者血清によるIgEイムノブロットイング

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究
分担研究報告書

食肉中に含まれるアレルギー物質の検査法開発研究

分担研究者 田辺創一(広島大学大学院生物圏科学研究科)

協力研究者

成田宏史(京都女子大学家政学部)

本庄勉、柴田治樹(株式会社森永生科学研究所)

松本貴之、藤村達也(日本ハム株式会社中央研究所)

佐藤雅彦(伊藤ハム株式会社中央研究所)

琴浦聡(丸大食品株式会社中央研究所)

研究要旨:食品に含まれる食肉蛋白質を検出するために必要な特異的抗体を得る目的で、ターゲットとして鶏肉では鶏トロポニンTおよび鶏肉抽出物を、豚肉では豚アルブミンおよび豚ミオグロビンを、牛肉では牛ミオグロビンをおよびその部分ペプチドを選択し、それらを動物に免疫し、抗体作製を行った。得られた抗体価はいずれも高くなかったが、特に豚肉検出系においては発光基質を用いることにより感度が向上した。ゼラチンでは畜肉ゼラチンそのものおよび患者 IgE 結合エピトープを含む部分ペプチドを免疫して、得られた抗体について検討した結果、畜肉ゼラチンとは反応するがサカナゼラチンとは反応しない ELISA 系の開発、および確認法としてのウエスタンブロット法の開発に成功した。今後ポリクローナル・モノクローナル抗体や抗ペプチド抗体を適宜組み合わせることによって、特異的な測定系を構築できるものと考えられた。また、豚肉および牛肉に含まれるDNAを検出するためのPCR測定系を確立した。牛肉では、牛ミトコンドリア 16s リボソーム DNA 領域をターゲットとするプライマーを用いて検討した結果、豚・鶏・羊肉との識別が可能であった。豚肉では、豚ミトコンドリアシトクロム b 領域の DNA をターゲットとするプライマーF2/R1を用いて検討したところ、モデル食品(餃子)系において100ppbまで検出可能であり、牛・鶏・羊・馬肉との交叉性は認められなかった。

A. 研究目的

食品中に含まれるアレルギー物質について、特定の蛋白質や核酸成分をターゲットとし、ELISA 法などにより定性、定量的に検証できる科学的検知法を開発することを目的とする。本研究では、食肉類、即ち、鶏肉、豚肉、牛肉、ゼラチンに関してELISA系で測定するためのターゲット蛋白質の選択をほぼ昨年度に終えたので、今年度は抗体作製および測定系の構築を試みた。また、遺伝子増幅法(PCR 法)について、昨年度設計したプライマーをもとに、豚肉および牛肉測定系の確立を試みた。

B. 研究方法

以下に、免疫学的手法ついでPCR法の順、また、鶏肉、豚肉、牛肉、ゼラチンの順にて記載した。
鶏肉抽出物に対する抗体の作製

脂肪分を除去した鶏肉をミンチ状にし、PBS に懸濁した。懸濁液を遠心分離し、上清を集めた。上清は、それぞれ未加熱処理、加熱処理(100℃、30 分)およびオートクレーブ処理(120℃、15 分)を行い、処理した溶液をウサギに免疫して、抗体を得た。

ELISA 法による鶏肉検出抗体のスクリーニング

各抗体について、加熱鶏肉抽出物および未加熱鶏肉抽出物を抗原としたサンドイッチ ELISA 系を用いて検量線を作成した。また、牛肉、豚肉、鶏卵、牛乳、そば、小麦、落花生抽出物を用いて同様にサンドイッチ ELISA 反応を行い、交差性について調べた。

鶏トロポニン T 合成ペプチドに対する抗体の作製

データベースから鶏、七面鳥、牛、豚および人のトロポニン T 配列を検索し、相同性の検索を行った。その結果、鶏に特異的と思われる領域より合成ペプ

チド(DETKAPGEGEGDRE)を作製し、ウサギに免疫し、抗体を作製した。

豚肉蛋白質に対する抗体の作成

豚肉に含まれる蛋白質の中から検出ターゲットとして血清アルブミンとミオグロビンを選択した。これらをSDSとメルカプトエタノール(ME)で変性させたのち、アジュバントとともにウサギに繰り返し免疫した。また、豚肉の凍結乾燥粉末から1%SDS・0.1%MEを含むPBSで抽出した混合蛋白質についてもウサギに免疫した。

豚アルブミンおよび豚ミオグロビンのELISA

アルブミンおよびミオグロビンを結合したゲルで、抗血清から特異抗体をアフィニティー精製し、固相化用抗体(1次抗体)とした。また、この抗体をペプシン分解・還元してFab'とし、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を結合して2次抗体とした。これらの抗体を用いて、Sandwich ELISAを構築し、抗原蛋白質そのものおよび、SDS-ME抽出した標準豚肉蛋白質について測定を行った。

豚肉測定ELISA系の改善

豚肉蛋白質を高感度に測定するため、

- ① 使用する抗体の増量
 - ② 発色増強剤 Can Get Signal(東洋紡)の使用
 - ③ 発色基質の比較検討
 - ④ 発光基質の使用
- について検討した。

牛ミオグロビンの精製

牛モモ肉を材料としてミオグロビンの精製を行った。モモ肉から脂肪を取り除き、ミンチにして十分に混合した。50gを量りとり、2倍量の蒸留水を加えてよく混合し、30分間・氷冷しながら振とうした。4500×g、4℃、15分間遠心した後、上清をろ過し、ろ液を肉抽出液とした。肉抽出液に硫安濃度が90%となるように加え、1時間・氷冷しながら攪拌した。20,000×g、4℃、15分間遠心した後、上清をろ過し、ろ液をpH6.85に調整して1時間・氷冷しながら攪拌した。最後に、20,000×g、4℃、15分間遠心し、沈殿を少量の蒸留水で溶解したものを硫安沈殿画分とした。

硫安沈殿画分を50mM Tris-HCl (pH8.3)(A液)に置換した後、同じバッファーで平衡化したDEAEカラム(Toyopearl DEAE 650M)にインジェクトし、A液からB液(50mM Tris-HCl、0.5M NaCl (pH8.3))のグラ

ジエントをかけ、イオン強度により分離し、ピークのみられた画分を分取した。分取した画分は電気泳動でバンドの分子量と純度を確認して、ウシミオグロビン画分を得た。

抗牛ミオグロビンペプチドモノクローナル抗体の作製

牛ミオグロビンから他の畜種とアミノ酸残基の異なる配列を2部位選択し、合成ペプチドを2種類(ペプチドA、ペプチドB)作製した。KLHにコンジュゲートしたものを免疫原とし、マウスに免疫した。その後の方法は常法に従い、最終的に、腹水からアフィニティーカラムを用いて抗ペプチドAモノクローナル抗体と抗ペプチドBモノクローナル抗体(以下、抗ペプチドA抗体、抗ペプチドB抗体)を精製した。

抗変性牛ミオグロビンモノクローナル抗体の作製

牛ミオグロビン溶液にSDSを1%となるように添加し、95℃・10分間加熱処理したものを変性ミオグロビンとした。変性ミオグロビンを免疫原とし、マウスに免疫した。その後の方法は常法に従った。

抗変性牛ミオグロビンポリクローナル抗体の作製

抗変性牛ミオグロビンポリクローナル抗体を作製するために、変性ミオグロビンを免疫した。得られた抗血清から、変性ミオグロビンをリガンドとしたアフィニティーカラムを用いて変性ミオグロビンに反応する抗体(以下、ポリクローナル抗体)を精製した。

ゼラチンおよび部分ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製とELISA

ゼラチンの部分配列を基にした合成ペプチドおよび牛ゼラチンを抗原として得られたポリクローナル抗体を用いてELISAの系を開発した。本系を用いて、各種食品の反応性を調査した。交差反応性を示す食品に関してはウエスタンブロット法で測り分けを試みた。

豚肉検出用プライマーの各種動物肉との交差性

豚のシトクロムbのDNAをターゲットとするプライマー対F2/R1を用いた。6種類の動物肉(豚・牛・鶏・羊・馬・猪)の赤肉から、mtDNA Extractor CT KitでミトコンドリアDNAを抽出した。豚肉検出用に設計したプライマー組F2/R1を用いて、PCRは94℃で4分間保持した後、94℃-0.5分、50℃-0.5分、72℃-1分を1サイクルとし、37サイクルの反応を行った。増幅産物は2%アガロースゲルで電気泳動し、EtBrで

染色した。

豚肉検出用プライマーと各種食品との交差性

きのこ類、魚介類、豆類、野菜類、果物類等(53種類)のDNAについて豚肉用プライマーとの交差性がないかを調べた。各種食品からDNAを抽出し、これをテンプレートとして、豚肉検出用プライマーF2/R1で、上記と同条件でPCRを行った。

加熱した豚肉からのPCR検出

豚肉をミンチして100℃で10分間ボイル、120℃で10分間オートクレーブ、また豚肉の4ミリ厚のスライスで160℃で焼き加熱、170℃の油で揚げ加熱の条件で各々加熱調理をした。DNAを抽出し、プライマー組F2/R1を使い、37サイクルでPCRを行った。

小麦DNAマトリクス中での豚DNAの検出

小麦粉からDNAを抽出して10ng/μLになるようにTE bufferで調整したものを、豚DNAの希釈液とした。豚DNAを10ng/μLから10倍ずつ段階的に小麦DNA溶液で希釈し、その1μLをテンプレートとして用いて37サイクルでPCRを行った。

モデル加工食品中の豚肉の検出

豚肉を含むモデル加工食品として餃子を選んだ。豚肉ミンチを9倍量の水とホモジナイズし希釈して餃子に添加し、豚肉として10%から1ppbまで含むように試料を調製した。加熱調理後、フードプロセッサーで均一にカッティングし、その200mgからDNAを抽出し、プライマー組F2/R1を使い、37サイクルでPCRを行った。

牛肉検出用プライマーの設計

牛ミトコンドリア16SリボゾームDNA領域からの97bpのDNA断片を増幅することが出来るプライマーをそれぞれ設計した

牛肉測定PCR評価のためのサンプルの処理およびDNA抽出

牛肉、羊肉、豚肉および鶏肉から、各肉の脂肪分を極力除去した後に、ミルサーにかけてミンチ状にした。

豚肉ミンチに牛肉ミンチを100%、10%、1%、0.1%、0.01%、0.001%および0.0001%になるようにそれぞれ添加し、十分に攪拌した。各混合物より、未処理区および加熱変性区(100℃で10分)を作製した。

4種類の肉をミンチ状にした材料およびミンチ混合物から2gずつを採取して、イオン交換樹脂タイプ

のキット(QIAGEN Genomic-Tip 20/G)を用いてDNA抽出、精製を行った。その他食品(とうもろこし、そら豆、グリーンピース、昆布、あさり、はまぐり、カレイ、タイ、サケ、タラ)および市販の加工食品(牛乳、牛肉コロッケ、牛肉缶詰、レトルト牛カレー、モッツァレラチーズ、ロックフォールチーズ、シェーブルチーズ)については、それぞれミルサーを用いて粉碎後、2gずつを採取して、イオン交換樹脂タイプキット(QIAGEN Genomic-Tip 20/G)を用いてDNA抽出、精製を行った。

牛肉DNA検出のためのPCR反応

PCR反応はEx Taq HS kit (Takara)を用いて行った。反応液として、添付バッファーにdNTP溶液(0.2mM each)、センスプライマー(0.4 μM)、アンチセンスプライマー(0.4 μM)、Ex Taq HS(0.75U)に適当量の鋳型DNAを加えたものを使用した。反応条件は、98℃で3分熱処理した後、98℃で30秒、70℃で30秒、72℃で30秒を38サイクル繰り返し、72℃で7分間処理したものを使用した。

C. 研究結果

以下に、免疫学的手法についてPCR法の順、また、鶏肉、豚肉、牛肉、ゼラチンの順にて記載した。

鶏肉標準に対する抗体の反応性

各抗体について、検量線作成を行ったところ、未加熱上清を免疫した抗体(CMS-1抗体)を用いてELISA系については、加熱、未加熱抗原ともに1.5ng/mLから50ng/mLまでの範囲で検出が可能であった(図1)。また、CMS-1抗体について交差性を検討したところ、鶏卵に強い交差が見られた。他にそばにもわずかに交差が見られた。

鶏トロポニンT合成ペプチドに対する抗体の反応性

現在までのところ、高い力価をもつものが得られていない。

豚肉蛋白質に対する抗体の作成

血清アルブミンを変性してウサギに免疫した結果、高い抗体価の抗血清が得られた。ミオグロビンを変性してウサギに免疫した結果、抗血清が得られたが、抗体価はアルブミンと比べて10分の1程度にとどまった。また、豚肉蛋白質混合物を免疫した場合は、抗体はできるものの、抗体価は低いものであった。

豚アルブミンおよび豚ミオグロビンのELISA

Tetramethylbenzidine(TMB)を基質として抗豚アルブミン抗体で ELISA を行うと、アルブミンそのものの検出限界は 0.625ng/ml であったが、豚肉蛋白質全体を測定すると、検出限界は 31.2ng/ml であった。同様に、ミオグロビン抗体で ELISA を行うと、ミオグロビンそのものの検出限界は 0.312ng/ml であったが、豚肉蛋白質全体を測定すると、検出限界は 31.2ng/ml であった。

豚肉測定 ELISA 系の改善

ELISA でプレートに固相化する抗体濃度を、400ng/ml から、800ng/ml、1200ng/ml と増加させたが、吸光度は増加しなかった。また HRP 標識抗体も、HRP 濃度として 200ng/ml から 400ng/ml、600ng/ml と増加させたが、吸光度は増加しなかった。抗体は抗原カラムでアフィニティー精製したものを使用しており、1 次抗体、2 次抗体とも測定に十分な濃度に達していると考えられた。

ELISA 用感度向上試薬である Can Get Signal(東洋紡社製)を用いて、測定感度が向上するか試験した。アルブミンでは、この試薬を使うと、ブランクが強く発色してしまい測定不能となった。アルブミン抗体と反応する成分が Can Get Signal 中に含まれていると考えられる。ミオグロビンでは、測定感度はやや低下する現象が見られた。今回の ELISA では感度向上効果はみられなかった。

ELISA の発色基質として Tetramethylbenzidine (TMB)と o-Phenylenediamine(OPD)は感度が高く、よく用いられているので、この両者を今回の ELISA で比較した。その結果、アルブミン、ミオグロビンとも、両方の基質の間に大きな差はなかったが、OPD の方が、ブランクの吸光度が低かった。

2 次抗体の標識酵素 HRP に対応した発光基質を用いて ELISA を実施した。Pierce 社の Super Signal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate を用いると感度が大きく上昇し、アルブミン抗体による ELISA で豚肉蛋白質を測定すると、1.56ng/ml が検出できた(図2)。感度は発色基質を用いたときと比べて 20 倍向上した。

牛ミオグロビンの精製

牛モモ肉から得られた硫酸沈殿画分を DEAE カラムにかけると、ほぼ単一のピークがみられた。このピークを分取して電気泳動したところ、約 21kDa に

単一のバンドがみられ分子量からミオグロビンが相当した(図3)。ミオグロビンは硫酸濃度 90%でも沈殿しなかったが、等電点である pH6.85 に調整することで沈殿した。この方法では、ほとんどの夾雑蛋白質は硫酸沈殿で除かれているので、DEAE カラムで精製することで高純度のウシミオグロビンを調製できた。

抗牛ミオグロビンペプチドモノクローナル抗体の作製

抗ペプチド A 抗体として得られたのは 3 種類(1H9、3C9、4B5)であり、いずれもペプチド A と強く反応性したが、変性ミオグロビンとはほとんど反応しなかった。一方、抗ペプチド B 抗体は 3 種類(10B、11H、1D)得られ、これらはペプチド B だけでなく変性ミオグロビンにも反応した(図4)。ブタミオグロビンとウマミオグロビンとの交差性を調査するためにウエスタンブロットを行った結果、11H がウシミオグロビンにのみ反応し特異性が確認できたので、サンドイッチ ELISA に用いることとした。

抗変性牛ミオグロビンポリクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体とウシモモ肉、ブタハツ肉、トリハツ肉、ウシミオグロビン、ウマミオグロビンとの反応性を確認するためにウエスタンブロットを行った結果、ウシモモ肉とブタハツ肉のミオグロビンと思われる約 21kDa のバンドとウシミオグロビン、ウマミオグロビンと反応した。しかし、トリハツ肉ではミオグロビンと思われる約 21kDa のバンドとは反応しなかった。

牛肉測定サンドイッチ ELISA 系

抗ペプチド A 抗体とポリクローナル抗体の組み合わせでは、サンドイッチ ELISA が成立しなかった。ポリクローナル抗体同士の組み合わせでは、約 0.4ng/ml までの検出感度が得られたが、ブタとウマのミオグロビンにも反応した。一方、プレート固相化抗体にポリクローナル抗体、二次抗体に抗ペプチド B 抗体を用いた組み合わせでは、全体的な吸光度は低かったが、約 1ng/ml の検出感度が得られ、また、未変性より変性のミオグロビンで高い感度が得られた(図5)。ブタミオグロビンとウマミオグロビンでは、いずれも検量線を描くことはできなかった。

ゼラチンおよび部分ペプチドに対するポリクローナル抗体の作製と ELISA

まず、畜肉ゼラチンとサカナゼラチンを分別する

方法の開発を行った。

昨年度報告したように、抗ウシゼラチン抗体を用いた測定系は、ほぼ一様にどのゼラチンとも高い反応性を示したので、本抗体を用いてすべてのゼラチンを検出し、その後、サカナゼラチン特異的測定系で分別測定するという系を試みた。

抗サカナゼラチン抗体を用いた測定系は他のゼラチンとの反応性が低かったが、特異的に測定するまでには至らなかった。

また、2-メルカプトエタノールとSDS存在下での測定を試みたところ、抗ウシゼラチン抗体を用いた測定系では、ゼラチンとの反応性は変化が少なかったが、魚類の反応性が大きく増加した。

抗合成ペプチド抗体を用いた測定系はサカナゼラチンをほとんど認識しない(0.5%)一方、アルカリ処理ブタゼラチンとは高い反応性(209%)を示した(図6)。しかし、本抗体を用いて2-メルカプトエタノールとSDS存在下での測定を試みたところ、サカナゼラチンの反応性が986%と大きく増加した。その結果、魚類の反応性が大きく増加した。

上記の結果をふまえ、抗合成ペプチド抗体を用いたNativeな条件下で、サカナゼラチンを分別する系を確立することとした。

抗合成ペプチド抗体を用いた測定系に各種の吸収操作を施し測定系に改良を加え、サカナゼラチンの反応性を検出限界以下にまでおさえることに成功した。また、アルカリ処理ブタゼラチンとの高い反応性も1.5倍程度にまで改良できた(図7)。しかしながら、加熱した頭足類(イカ、タコ)との弱い反応性を消すことが出来なかった。そこで、ウエスタンブロット法でそれらを分別することを試み、加熱した頭足類とは反応しない検出系を開発した。

PCR法による豚肉DNAの検出

PCRの結果、牛・鶏・羊・馬肉では、豚検出用プライマーとの交差性は見られなかったが、猪肉では、豚と同じ130bpのバンドが検出された(図8)。

きのこ類、魚介類、豆類、野菜類、果物類等のDNAについて検査したところ、各食品素材においていずれも豚検出用プライマーとの交差は見られなかった。

加熱した豚肉について試験した結果、すべての加熱条件において、豚検出用プライマーでDNAの

増幅が確認された。

小麦DNAマトリクス中で豚DNAの検出を試みたところ、豚ミトコンドリアDNAとして1pgまで検出が確認された。

モデル加工食品中として餃子に豚肉を混合して感度を検討した。その結果、餃子に添加された10%から100ppbまでの豚肉がPCRによって検出できた(図9)。

PCR法による牛肉DNAの検出

牛肉混合物(加熱・非加熱)サンプルより抽出したDNAについてPCR反応を行った結果、未加熱サンプルで0.01%、加熱サンプルで0.001%の牛肉混合物から牛特異的バンドの増幅が認められた(図10)。

肉サンプルおよびその他の食品サンプルより抽出したDNAについてPCR反応を行った結果、牛肉、牛乳およびヨーグルトからは牛特異的バンドの増幅が認められた。それ以外の検体からは増幅反応は見られなかった(図11)。

市販の加工食品より抽出したDNAについてPCR反応を行った結果、モッツアレラチーズ(水牛由来)、レトルト牛カレー、牛肉缶詰、牛肉コロッケからは牛特異的バンドの増幅が認められた。牛以外の動物の乳より作るチーズ(ロックフォール(羊)およびシェーブル(山羊))からは特異的バンドの増幅は認められなかった。

D. 考察

免疫学的手法を用いて食肉類の存在を検出するためには、特異的検出が可能なモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体が必要であり、そのためには第一段階として、ターゲットとなる蛋白質を選択することが必須である。ターゲット蛋白質の条件としては、加熱などの食品加工を経ても安定度の高いもの、および、構造の違いが畜種間でより大きいものの2つが主として挙げられる。また、検出感度を考慮すると、食肉中の含量が多い方が好ましい。なお、本検出系は当該食品および蛋白質の検出を試みるものであり、必ずしもアレルゲンを検出することが目的ではないことから、ターゲット蛋白質の条件としてアレルゲンである必要はないと判断した。このような考えのもと、ターゲット蛋白質の選択をほぼ昨年度に終えたので、今年度は抗体作製および測定系の

確立を試みた。

鶏肉抽出物を免疫した抗体を用いて ELISA 系については、加熱、未加熱抗原ともに 1.5ng/mL から 50ng/mL までの範囲で検出が可能であったが、鶏卵に強い交差が見られた。この交差は、吸収処理を行ったものの、消しきれなかった。

また、鶏肉を加熱変性しても残存している比較的含量の多い成分として、約 32kDa の蛋白質(トロポニン T)に着目した。トロポニン T は牛や豚との相同性が比較的低い蛋白質であるため、鶏特異的な抗原として利用可能であると判断した。鶏に特異的と思われる領域より合成ペプチド(DETKAPGEGGEGDRE)を作製し、ウサギに免疫し、抗体を作製した。しかし、現在までのところ、高い力価をもつものが得られていない。これらのことを総合すると、鶏肉 ELISA 測定系に関しては、免疫原について再考する必要があると考えられた。

豚血清アルブミンを変性してウサギに免疫した結果、高い抗体価の抗血清が得られた。豚ミオグロビンを変性してウサギに免疫した結果、抗血清が得られたが、抗体価はアルブミンと比べて 10 分の 1 程度にとどまった。豚とウサギの間で、これらの蛋白質の構成アミノ酸配列の相同性から、抗体のでき方に差が生じると考えられた。また、豚肉蛋白質混合物を免疫した場合は、抗体はできるものの、抗体価は低いものであった。豚肉の主要な蛋白質はウサギと配列が近似しており、抗体ができにくい、抗原性が弱いと考えられた。

豚血清アルブミンあるいは豚ミオグロビンに対するこれらの抗体を用い、TMB を発色基質にした場合、免疫した抗原蛋白質そのものは高感度に測定できるが、豚肉蛋白質全体を測定しようとする、他の蛋白質に希釈されて、検出感度は 100 分の 1 程度に低下した。豚肉蛋白質として 10ppm を検出するためには、より高感度な測定系が求められた。そこで、次に豚肉測定 ELISA 系の改善を試みた。

プレート固相化抗体や HRP 標識抗体の濃度を上昇させたが、吸光度は増加しなかった。ELISA 用感度向上試薬である Can Get Signal を用いたが、感度向上効果はみられなかった。ELISA の発色基質として TMB と OPD を比較したが、両方の基質の間に大きな差はなかった。しかし、発光基質を用いて

ELISA を実施したところ、アルブミン抗体による ELISA で豚肉蛋白質を 1.56ng/ml まで検出でき、通常の発色基質を用いたときと比べて感度が 20 倍向上した。このレベルまで測定できれば、豚肉についてアレルギー物質の検査法としては十分な感度であると考えられた。

牛肉では、測定のためのターゲット蛋白質としてミオグロビンを選択した。ミオグロビンは多くの筋原線維蛋白質と異なり、畜種によってアミノ酸配列がやや異なる。しかし、ミオグロビンを免疫した抗体ではまだ交差性の問題が憂慮されたので、ミオグロビンを免疫して得られる抗体だけでなく、牛ミオグロビンに特異的なアミノ酸配列を 2 部位選択し、抗ペプチド抗体を作製することで特異性の高い検出系を構築することとした。

ポリクローナル抗体の交差性を調査するためにウエスタンブロットしたところ、馬ミオグロビンと豚ミオグロビンと思われるバンドと反応したが、鶏ミオグロビンと思われるバンドとは反応しなかった。牛ミオグロビンと豚ミオグロビン、および馬ミオグロビンのアミノ酸残基相同率は 88.9%、鶏ミオグロビンとは 73.8% である。抗原認識部位が哺乳類と鳥類で異なっている鳥類のミオグロビンとは交差反応しないことが考えられるが、豚と馬だけでなく、他の哺乳類とは交差する可能性が高いので、ポリクローナル抗体同士のサンドイッチ ELISA は本検出系には不適であると考えられる。

プレート固相化抗体にポリクローナル抗体、二次抗体に抗ペプチド B 抗体を用いた組み合わせでは、未変性より変性のミオグロビンで高い感度が得られ、また、ブタとウマのミオグロビンとは反応しなかった。加工食品の蛋白質は、ある程度変性している可能性が高い。これらの蛋白質を抽出する際には変性剤と還元剤の使用が考えられる。したがって、変性ミオグロビンでの感度が高く、特異性も高いというこの組み合わせの特質は、目的とする検出系に適していると考えられる。しかし、全体的な吸光度は低いなど、なお課題が残された。

牛肉 ELISA 測定系に関しては、今後、プレート固相化抗体にポリクローナル抗体、二次抗体に抗ペプチド B 抗体を用いた組み合わせの改良を行うとともに、現在樹立中の抗変性ミオグロビンモノクローナ