

表 2. キウイフルーツ近縁種との交差性結果

品種	μg/g
ゴールドキウイ	検出限界以下
さぬきゴールド	20<
信山	20<
香粋	検出限界以下
一才	20<
マタタビ未熟	3.6
マタタビ完熟	20<
マタタビ虫えい	2.3

表 3. 市販食品の検査結果

品名	μg/g
缶チューハイ	1.0
ドライキウイ	20<
グミ	20<
ヨーグルト	20<
乳酸菌飲料	20<

表 4. List of designed primers for detection of banana.

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'	
B:	BAN-F	5'-TCG TCA CCT ATT GGG ATG C-3'	Chloroplast <i>rbcl</i> gene /sense Banana 186 bp
	BAN-R	5'-GCT TTA ATA AGT GCT TCG GTG-3'	

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

表 5. Investigation of commercial products containing banana

No	Sample	Concentration of template DNA (ng/μL)	PCR	
			CP 03-5'/CP 03-3'	BAN-F/BAN-R
1	Banana puree	<10	+	+
2	Fruits juice	<10	+	+
3	Banana juice	<10	+	+
4	Soy milk with banana puree	20	+	+
5	Banana chip	20	+	+
6	Chocolate with banana powder	20	+	+
7	Yogurt with mixed fruit pieces	20	+	+
8	Soft cookie with dried banana	20	+	+
9	Cereal product	20	+	+

+, positive; -, negative.

表6 バリデーション用試料均一性評価結果

A 大豆検知キット用

	スイートポテト	トマトソース	おしるこ	ソーセージ	白粥
平均 (μg/g)	9.93	9.36	10.94	8.43	10.41
併行 (RSD%)	3.28	3.34	3.28	4.55	2.17
試料間 (RSD%)	0.55	0.00	1.36	0.00	0.00
total (RSD%)	3.32	3.34	3.55	4.55	2.17
F	1.06	0.54	1.34	0.56	0.98
F critical	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39

B くるみ検知キット用

	ビスケット	食パン	ケーキ	ジュース	ゼリー	鶏肉団子	白粥
平均 (μg/g)	9.12	13.17	10.18	10.56	10.30	10.53	12.09
併行 (RSD%)	3.52	1.95	2.55	4.71	1.66	8.32	3.23
試料間 (RSD%)	2.21	2.16	0.70	0.00	0.76	0.00	0.00
total (RSD%)	4.16	2.91	2.64	4.71	1.83	8.32	3.23
F	1.79	3.45	1.15	0.64	1.42	0.34	0.34
F critical	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39

表7 FASTKIT エライザ Ver. II 大豆 バリデーション結果

試料	機関数	添加量 (μg/g)	平均 (μg/g)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
スイートポテト	11	10.0	9.93	99.3	3.9	13.4
トマトソース	11	10.0	9.67	96.7	4.8	13.2
おしるこ	11	10.0	11.36	113.6	2.5	12.9
ソーセージ	11	10.0	9.96	99.6	3.5	10.8
白粥	11	10.0	10.17	101.7	4.8	9.3

表8 モリナガ FASPEK くるみ測定キット バリデーション結果

試料	機関数	添加量 (μg/g)	平均 (μg/g)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
ビスケット	11	10.0	8.1	81.3	4.4	7.1
食パン	12	10.0	11.5	115.1	3.0	7.5
ケーキ	11	10.0	9.6	96.0	3.1	5.8
ジュース	12	10.0	9.9	99.0	5.6	8.5
ゼリー	11	10.0	10.3	103.0	4.3	7.3
鶏肉団子	12	10.0	10.6	105.9	6.0	9.9
白粥	12	10.0	11.9	119.3	5.0	8.3

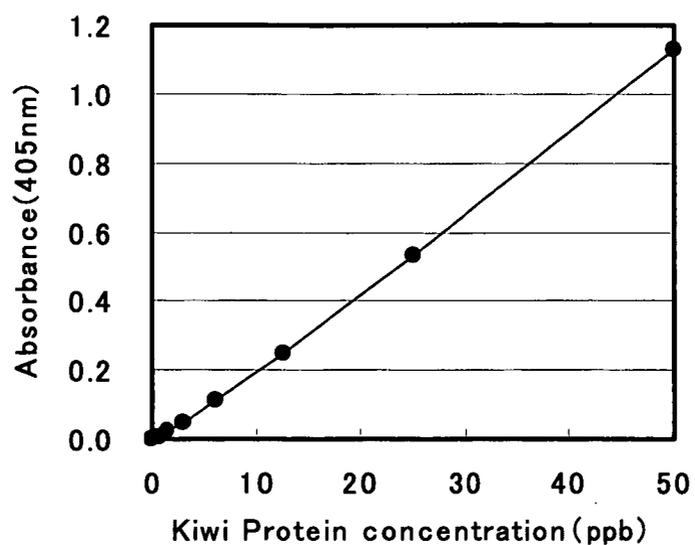
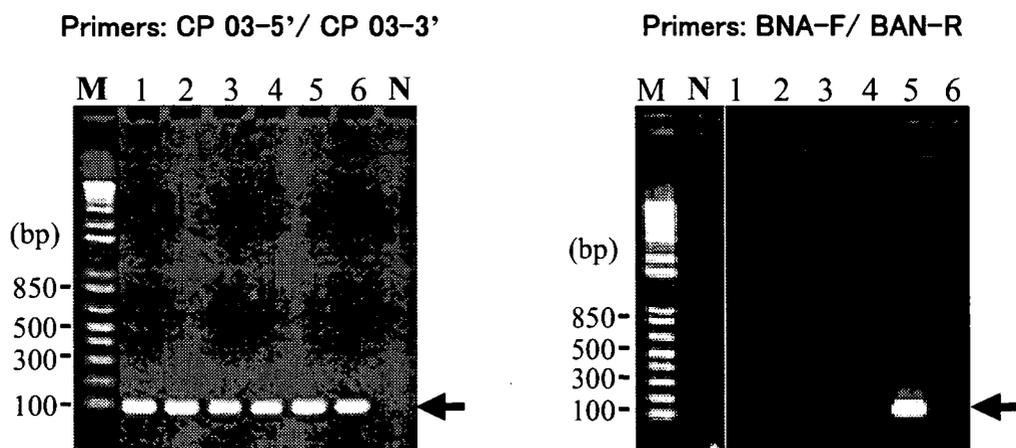


図1. キウイフルーツ検出法 ELISA の標準曲線

図2. Specificity of the polymerase chain reaction method using the primer pair BAN-F/BAN-R.

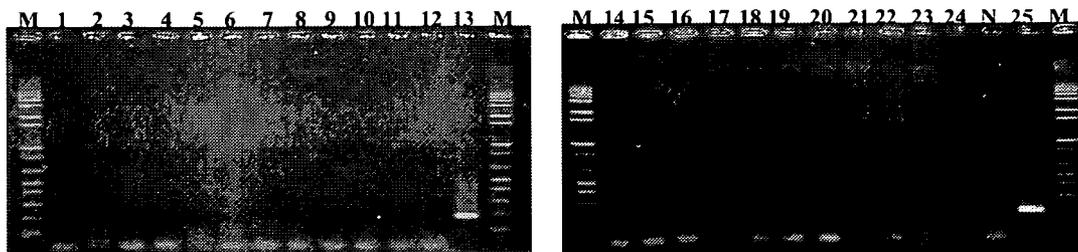
A.



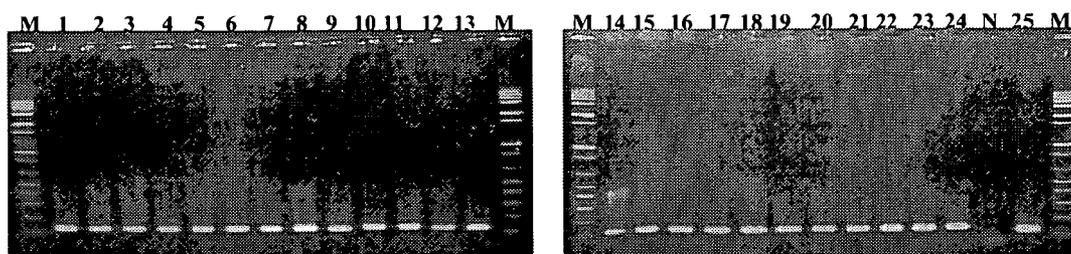
M: DNA marker, N, no-template control.
1: kiwifruit, 2: walnut, 3: apple, 4: yam, 5: banana, 6: soybean

図 2 B.

バナナ特異プライマー (186bp)



植物標準プライマー (120bp)



抽出DNA由来魚介類			
1, リンゴ	6, すもも	11, みかん	16, ブルーベリー
2, 洋ナシ	7, アズ	12, イチジク	17, ラズベリー
3, ナシ	8, うめ	13, モンキーバナナ	18, ジューンベリー
4, カキ	9, さくらんぼ	14, キウイ	19, イチゴ
5, もも	10, オレンジ	15, ブドウ	20, メロン
			21, アボカド
			22, パパイア
			23, パイナップル
			24, マンゴー
			25, バナナ

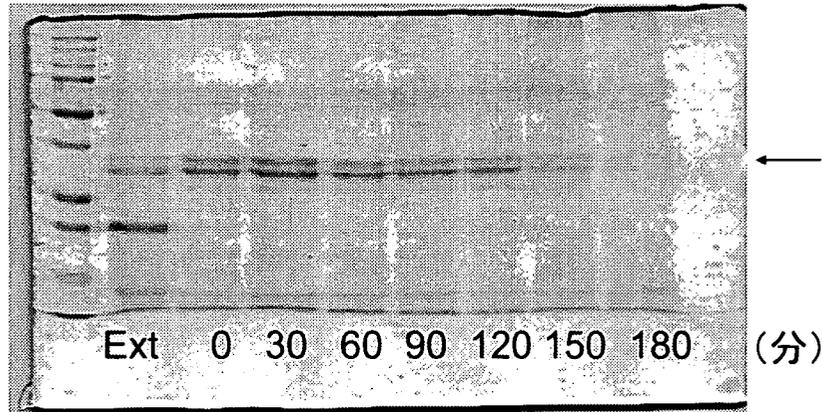
図. 3 Sensitivity of the specific detection method for banana.



. M: DNA marker, N: no-template control.
 1: 5 fg, 2: 50 fg, 3: 500 fg, 4: 5 pg, 5: 50 pg, 6: 500 pg, 7: 5 ng, 8: 50 ng

図4. 精製キチナーゼの熱安定性

エッペンチューブに20 μ lづつサンプル(約0.5mg/ml)を入れ、80°Cで湯煎し、各時間ごとに取り出し、サンプル調整した。

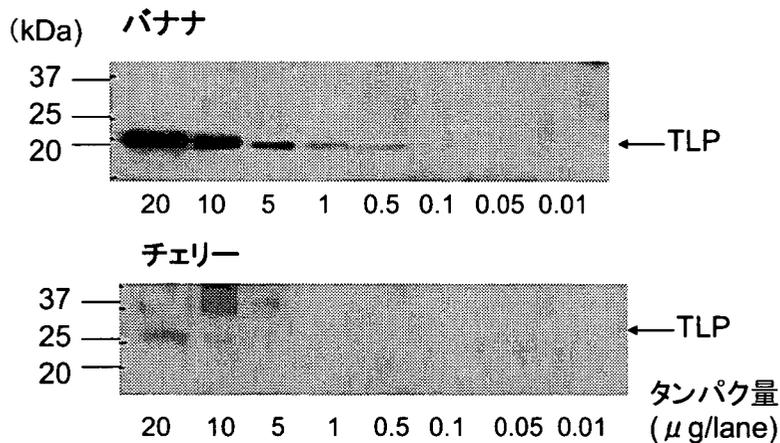


加熱120分までは安定に存在した。

図5. 抗バナナソーマチンライクプロテイン抗体の特異性確認

ウエスタンブロッティングの結果

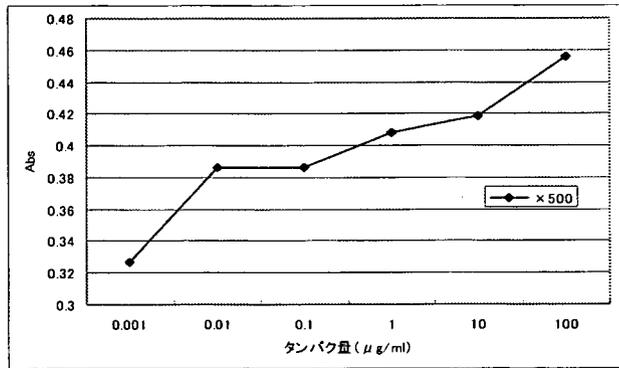
- ・1次抗体: 抗バナナ TLP \rightarrow \times 1000希釈
- ・2次抗体: 抗ウサギIgG-HRP標識 \rightarrow \times 400希釈



この抗体はバナナのTLPに反応性を示したが、チェリーのTLPにはあまり反応しなかった。よってバナナに特異性が認められた。

図6. ビオチン-抗バナナTLP抗体を用いた バナナサンドイッチELISA法による検出

- ・固相化抗体: 抗バナナ α PTN抗体 $\rightarrow 10 \mu\text{g/l}$ にPBSで希釈
- ・サンプル : バナナ抽出物(タンパク1mg/ml) $\rightarrow \times 10^1 \sim 7$ 希釈
- ・2次抗体 : ビオチン-抗バナナTLP抗体 $\rightarrow \times 500$ 希釈
- ・HRP抗体 : HRP-ストレプトアビジン $\rightarrow \times 5000$ 希釈



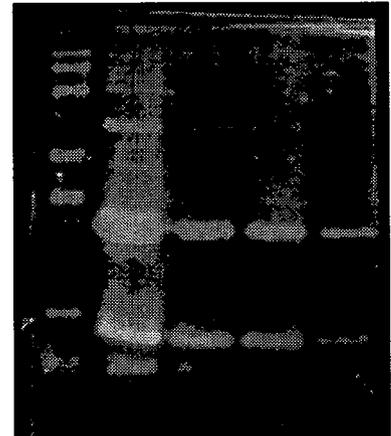
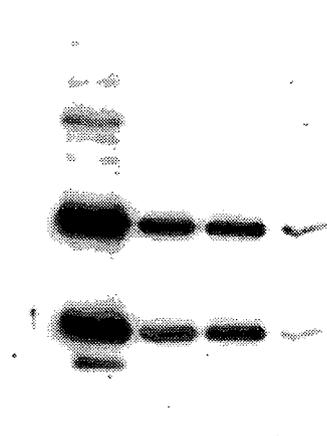
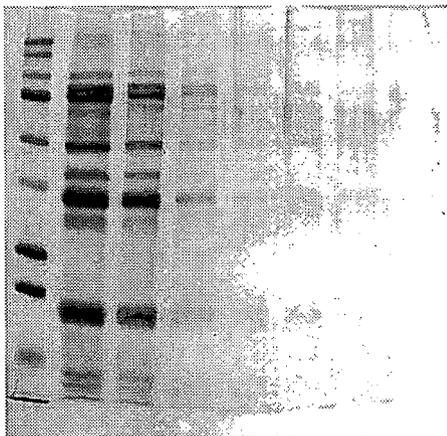
ビオチン-アビジンシステムによるサンドイッチELISA系の構築を試みた。

図7. アレルゲンの近赤外蛍光検出 (大豆アレルゲンの検出)

タンパク質染色(CBB染色)

化学発光検出(ECL)

近赤外蛍光検出



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)
柴田治樹、土井啓利(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タンパク質を検出するために必要な特異的抗体を得る目的で、ターゲットとして豚肉ではブタアルブミンを、牛肉ではウシミオグロビンおよびその部分ペプチドを、ゼラチンではウシゼラチンを選択し、それらを動物に免疫して得られた抗体を用いて、検出系の確立を試みた。豚肉および牛肉の検出系では、他の動物種との交叉反応を低減するために吸収操作を行うなどの改良を行った。しかし、加熱肉への反応性が弱いことなどの問題点が明らかになった。一方、ゼラチンでは、感度・特異性とともにより良い検出系が確立された。また、食肉に含まれる DNA を検出するための PCR 測定系を確立した。鶏肉では、16s ミトコンドリア 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、さまざまな鶏品種由来 DNA を検出でき、かつ、鶏以外の食用鳥類や哺乳動物由来のものと同様に識別できる測定系が確立された。さらに、チトクロム b 上に作成したプライマーおよび TaqMan プローブ配列を用い、鶏肉・豚肉・牛肉・羊肉・馬肉を迅速かつ定量的に検出することが可能な Real-Time PCR 法を確立した。

A. 研究目的

食品中に含まれるアレルギー物質について、特定のタンパク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タンパク質の免疫をほぼ昨年度に終えたので、今年度は得られた抗体を用いて測定系の構築を試みた。また、遺伝子増幅法(PCR 法)について、鶏肉の測定系を確立するとともに、新たに鶏肉・豚肉・牛肉・羊肉・馬肉を迅速かつ定量的に検出することが可能な Real-Time PCR 法について検討することとした。

B. 研究方法

以下に、免疫学的手法について PCR 法の順、また、豚肉 ELISA、牛肉 ELISA、ゼラチン ELISA、鶏肉 PCR、豚肉リアルタイム PCR の順にて記載した。

(豚肉 ELISA)

豚肉に含まれるタンパク質の中から検出タ

ーゲットとして数種類の候補を選定し、ウサギを用いたポリクローナル抗体の作成を試み、得られた抗体による ELISA 系の構築を試みてきた。その中から血清アルブミンが最も好ましい検出ターゲットであると判定し、豚肉中の血清アルブミンをサンドイッチ ELISA 法で定量する方法を検討した。

豚血清アルブミンに対する抗体の作成

血清アルブミンを PBS 中で、1%の SDS および 0.1%のメルカプトエタノール (ME) で変性し、TiterMax アジュバントとともにニュージーランド白色種のウサギに繰り返し免疫し、力価の高い抗血清を採取した。

抗アルブミン特異抗体のアフィニティー精製

Actigel ALD に変性処理したブタ血清アルブミンをカップリングしたものをカラムに充填し、抗血清を流して特異抗体を結合後、洗浄し、グリシン塩酸緩衝液 pH2.5 で溶出し、直ちにトリスで中和した。この抗体を固相化抗体として使用した。

抗体の酵素標識

抗血清から HiTrap Protein G カラムで IgG を精製し、pH4.5 の酢酸緩衝液中でペプシンで

分解した。これにメルカプトエチルアミンを加えて還元し、抗体分子を Fab' の形にした後、抗原カラムでアフィニティー精製した。マレイミド基を導入したペルオキシダーゼを加えて結合し、Superdex 200HR カラムでゲルろ過精製し酵素標識抗体とした。

ELISA 系の構築

特異抗体を炭酸重炭酸緩衝液 pH9.6 で 400ng/ml に希釈し、ELISA プレートに 0.1ml 加えて、4℃で一晩固相化した。

ブロッキング剤は動物由来のタンパク質を含有していない日本油脂製のブロッキング試薬 N101 を使用した。

次いで、豚肉タンパク質標準品と検体抽出液を加えて 37℃2 時間反応させ、洗浄後、酵素標識抗体を加え、室温で 2 時間反応させた。

発色は Pierce 社の 1-Step UltraTMB 基質を用い、硫酸で反応停止した後、吸光度を測定した。

抗体の吸収処理

抗ブタアルブミン血清が他の動物タンパク質と交差するのを低減するため、吸収処理を行った。ウシ・ヒツジ・ウマの血清タンパクを変性した後、Actigel ALD にカップリングして、カラムに充填し、抗血清を繰り返し通過させ、交差する抗体成分を吸収除去した。吸収前後の抗体の交差性を、各種の肉タンパク質の Western Blot で判定した。

加熱した豚赤肉の検出

ミンチした豚赤肉を 30g ずつポリ袋に真空パックし、60-121℃の温度で 20 分間加熱した。SDS・ME 入りの抽出液でタンパク質を抽出して ELISA を行い、豚肉タンパク質を定量した。

各種食肉との交差性

ミンチした豚・牛・鶏・羊・馬の生肉からタンパク質を抽出して ELISA を行い、交差性を調べた。

各種食品との交差性

肉以外の魚介類や野菜、果物、香辛料など様々な食品からタンパク質を抽出し、ELISA を行い、交差性を調べた。

(牛肉 ELISA)

抗ウシミオグロビンペプチドポリクローナル抗体の作製

ウシミオグロビンから他の畜種とアミノ酸配列の異なる配列を 2 種類 (ペプチド A、ペプ

チド B) 選択・合成した。市販キットを用いて KLH をコンジュゲートした複合体をアジュバンドとともにウサギに免疫し、抗血清を調製した。抗血清より特異的アフィニティーカラムを用いて抗ペプチド A ポリクローナル抗体 (抗ペプチド A pAb) を精製した。

牛肉標準タンパク質の作製

ミンチにした牛肉に等量の蒸留水を加えホモジナイズしたものを凍結乾燥処理した。凍結乾燥品 200mg に対し、0.5% SDS と 2% 2-mercaptoethanol を含む PBS を 20ml 加え、一晩振盪抽出した。遠心後、ろ過したろ液をウシ標準タンパク質とした。なお、豚肉と鶏肉についても同様の処理を行った。

モデル食品と測定サンプルの作製

ミンチにした豚肉もしくは鶏肉に、牛肉を 10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001% となるように混合し、調味料を添加してモデル食品用の練肉を作製した。対照として、牛肉、豚肉および鶏肉 100% の練肉も作製した。加熱区として 80℃・30 分と 120℃・30 分の 2 区を設け、また、対照として未加熱区を設けた。

均一化したモデル食品 2g に対し、0.5% SDS と 2% 2-メルカプトエタノールを含む PBS を添加して一晩室温にて振盪抽出した。遠心後、ろ過したろ液をそれぞれのモデル食品の測定サンプルとした。

モデル食品からの牛肉タンパク質検出・定量

サンドイッチ ELISA は、固相抗体に抗ペプチド A ポリクローナル抗体 (抗ペプチド A pAb)、標識抗体に抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体 (抗 D-ウシミオグロビン pAb) を用いた系 (ポリポリサンドイッチ、検出限界: 約 15ng/ml) と、固相抗体に抗ペプチド B モノクローナル抗体 (抗ペプチド B mAb)、標識抗体に抗変性ウシミオグロビンモノクローナル抗体 (抗 D-ウシミオグロビン mAb) を用いた系 (モノモノサンドイッチ、検出限界: 30ng/ml) の 2 種類を構築した。これらのサンドイッチ ELISA を用いてモデル食品の測定サンプルに含まれる牛肉タンパク質を検出・定量した。

特定原材料と牛肉エキスからの検出

特定原材料である卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目と牛肉エキス 5 種類から、前述の測定サンプルの作製方法と同様の処理により、タンパク質を抽出して測定サンプルを作製した。

さらに、それぞれのサンドイッチ ELISA により測定サンプルに含まれる牛肉タンパク質の検出を行った。

(ゼラチン ELISA)

ゼラチンの部分配列を基にした合成ペプチドおよび畜肉ゼラチンを抗原としていろいろな動物に免疫し、得られたポリクローナル抗体を用いて ELISA の系を開発し、特異性の高い測定系の構築を試みた。非特異反応、交差反応等で反応してしまう食材に関しては、抗体の吸収操作で反応性の低減を試みた。

(鶏肉 PCR)

プライマー

トリ 16S ミトコンドリア DNA 領域より 102bp の領域を増幅するトリ特異的なプライマー (16S-3) を使用した。また、真核生物特異的なプライマーは、Allmann ら (1993) の報告に従って作製した。

試料

異なる品種の鶏肉 (ブロイラー、名古屋コーチン、軍鶏および比内地鶏)、鶏以外の食用鳥類肉 (鶉、鴨および七面鳥)、その他食品原材料 (鳥類以外の食肉、鶏卵、魚介類および穀類)、また応用例として鶏肉を使用した市販加工食品 (揚げ物、缶詰、レトルト、顆粒スープ) を使用した。

モデル食品の作製

鶏肉モデル食品は、アセトンで脱脂後凍結乾燥させた鶏肉粉末を、同様の処理をした豚肉粉末に、タンパク質含量レベルで 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% および 0.0001% の比率で混合させて作製した。混合粉末は蒸留水に溶解し、煮沸 (100℃, 20 分) およびオートクレーブ (120℃, 20 分) 処理した。

DNA 抽出

検体をミルサーで粉碎後、2g ずつ採取した。ゲノム DNA は、Genomic-tip 20/G キット (QIAGEN) を用い、製品マニュアルに従って抽出を行った。

PCR 反応

PCR 反応は、Ex Taq HS (タカラバイオ) を酵素として使用し、反応液はサーマルサイクラーを用いて 95℃ 3 分間の処理後、95℃ 30 秒、69℃ 30 秒、72℃ 30 秒の反応を 40 サイクル繰り返し行って行った。PCR 反応産物は、2% アガロースゲルを用いた電気泳動により確認した。

(豚肉リアルタイム PCR)

リアルタイム PCR 法については鶏肉・豚肉・牛肉・羊肉・馬肉について検討を加えたが、ここでは豚肉についてのみ記述することとした。

Real-Time PCR 系の構築

前年度までに報告した従来法 PCR の豚肉検出用 Primer (チトクロム b 上に作成したもの) をベースにして、Applied Biosystems 社の協力を得て、Real-Time PCR の TaqMan MGB Probe を作成した。配列は以下の通りである。

Forward Primer:

5' -CTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3

Reverse Primer:

5' -CGTTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-3' TaqMan

MGB Probe:

5' -(FAM)-ACAGCTTTCTCATCAGTTAC-(NFQ) (MGB) -3'

Real-Time PCR による豚 DNA の検出

ブタ肝臓から mtDNA Extractor CT Kit でミトコンドリア DNA を抽出し、1ng/μl の濃度から 10 倍ずつ段階的に希釈し、Real-Time PCR を 40 サイクルまで行った。

Real-Time PCR による餃子中の豚肉の検出

餃子の具に豚肉を 10% の濃度から 10 倍ずつ段階的に量を減らして添加し、加熱して餃子を調製した。フードプロセッサーで均一にした後、Genomic-Tip 20/G (Qiagen) により DNA を抽出した。DNA の濃度を 10ng/μl に調整し、Real-Time PCR を行った。

C. 研究結果

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

(豚肉 ELISA)

ELISA の感度

ブタアルブミンに対する抗体を用いた ELISA では、豚肉タンパク質として 0-400ng/ml の濃度で検量線が描け、検出感度は 6.25ng/ml であった (図 1)。

加熱した豚赤肉からの検出

豚赤肉を各種の温度で加熱すると、温度が上昇するのに従い、ELISA の測定値は低下した。特に 121℃ で加熱することにより著しく低下した。

各種食肉との交差性

各種の食肉を測定した結果、牛肉、羊肉、馬肉に、アレルギー物質の検出としては無視できないレベルの交差が見られた。鶏肉では交差が少なかった。

抗体の吸収処理

抗血清をウシ、ヒツジ、ウマの血清タンパク質で吸収すると、Western Blot では、未吸収の場合と比べて、アルブミンのバンドがほとんど見えなくなった。しかし、吸収後の抗血清を用いて作成した ELISA 系で各種動物を測定すると、ウマでは交差が減少したが、ウシ、ヒツジでは減少が見られず、特異性は改善されなかった。

各種食品との交差性

魚介類、野菜、果物、穀類、香辛料などの食肉以外の様々な食品について、タンパク質を抽出して ELISA を行ったが、すべて検出限界以下であった。

(牛肉 ELISA)

抗ウシミオグロビンペプチドポリクローナル抗体の作製

ウシミオグロビンに対する反応性を競合 ELISA で調査したところ、ペプチド A との反応性だけでなく、ミオグロビンとの反応性もあり、未変性よりも変性状態のミオグロビンとの反応がやや高い傾向があった。また、抗ペプチド A pAb の交差性をウエスタンブロットで調査した結果、ブタとトリのミオグロビンだけでなく、ミオグロビン以外の牛肉タンパク質とも反応しなかった。

牛肉標準タンパク質の作製

いずれの標準タンパク質においても約 20kDa 付近にミオグロビンのバンドを確認でき、それぞれのタンパク質濃度は、ウシ標準タンパク質は 8.388mg/ml、ブタ標準タンパク質は 9.903mg/ml、トリ標準タンパク質は 11.176mg/ml であった。

モデル食品と測定サンプルの作製

ポリポリサンドイッチによるモデル食品からの牛肉タンパク質の定量結果を表 1 に示した。牛肉 100% のモデル食品の定量値を 100 とした場合の各牛肉混合区の定量値はほぼ安定していた。なお、ベースとした豚肉と鶏肉の違いはなく、いずれのモデル食品からもほぼ同程度に検出可能であった。未加熱区のモデル食品では牛肉を 0.01% 混合したモデル食品

まで定量できたが、各加熱区のモデル食品は牛肉を 0.1% 混合したモデル食品までの定量であった。

モノモノサンドイッチによるモデル食品からの牛肉タンパク質の定量結果を表 2 に示した。牛肉 100% のモデル食品の定量値を 100 とした場合の各牛肉混合区の定量値はほぼ安定していた。なお、ベースとした豚肉と鶏肉の違いはなく、いずれのモデル食品からもほぼ同程度に検出可能であった。未加熱区のモデル食品では、ポリポリサンドイッチと同様に、牛肉を 0.01% 混合したモデル食品まで定量できた。

特定原材料と牛肉エキスからの検出

ポリポリサンドイッチとモノモノサンドイッチのいずれにおいても、特定原材料 5 品目から牛肉タンパク質は検出されなかった。牛肉エキスにおいては、ポリポリサンドイッチの定量値よりモノモノサンドイッチによる定量値が高かった。さらに、モノモノサンドイッチに用いている 2 種類の抗体 (抗ペプチド B mAb、抗 D-ウシミオグロビン mAb) と牛肉エキスの反応性をウエスタンブロットにより調査した結果、抗ペプチド B mAb はミオグロビンと同じ位置のバンドとの反応がみられた。

(ゼラチン ELISA)

昨年までの研究で、サカナゼラチンの反応性が検出限界以下で一番反応性の高いブタアルカリ処理ゼラチンとの反応性も 170% 程度にまで押さえることが出来た抗合成ペプチド抗体を用いた測定系の開発ができた。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できなかった。そこで、抗体作製動物を変更することにより、反応性が変化しないかの検討を行った。その結果、抗ウシアルカリ処理ゼラチン抗体に各種の吸収操作を加えることにより測定系が組めることが判明した (図 2)。本測定系では今まで問題であった加熱した頭足類 (イカ、タコ) との反応性も他の魚介類と同等のレベルにまで低減することに成功した (表 3)。また、加熱した畜肉との反応性も大幅に低下した。その他に食品材料 154 種類測定したが、問題となるような反応性を示す食材は見あたらなかった。これらの結果より、本測定系はゼラチン特異的測定系として利用可能であると判断した。

(鶏肉 PCR)

各食肉およびその他の原材料由来の DNA との反応性

4種のトリ品種（ブロイラー、名古屋コーチン、軍鶏および比内地鶏）由来 DNA のみ増幅が認められた。トリ以外の食用鳥類や、哺乳動物由来の DNA は増幅が見られなかった(図3)。魚介類および穀類由来 DNA は増幅が見られなかった。

モデル食品および市販の鶏肉含有食品との反応性

いずれの処理区でも 0.001%(10 ppm)以上の鶏肉粉末を含むモデル加工食品由来の DNA から、鶏肉特異的検出が可能であった(図4)。市販食品では、レトルト、揚げ物および缶詰由来の DNA からは鶏肉特異的検出が可能であった(図5)。

(豚肉リアルタイム PCR)

豚肉・鶏肉・牛肉・羊肉および馬肉を迅速かつ定量的に検出することが可能な Real-Time PCR 法を確立した。チトクロム b 上に作成したプライマーおよび TaqMan プローブ配列を用いることによって、特異的な検出が可能となった。小麦 DNA をマトリックスとして肉 DNA の検出感度を求めたところ、0.001% (100 fg/ μ l) まで定量が可能であり、良好な検量線 (R^2 値が 0.994-0.999) が作成された。豚肉に関しては、さらに以下の結果を得た。

豚 DNA の検出

ブタ DNA を段階的に希釈して Real-Time PCR を行った結果を図6に示した。10fg の豚 DNA が検出可能で、非常に感度が高かった。

餃子中の豚肉の検出

豚肉の添加量を変えて調製した餃子からの検出を Real-Time PCR で行った結果を図6に示す。豚肉として 10ppm の添加でも検出が可能であった。

D. 考察

(豚肉 ELISA)

豚肉検出用の ELISA では前年度までターゲットタンパク質としてミオグロビンとアルブミンを候補にしてきたが、ミオグロビンを検出する ELISA は他の動物との高い交差があり、豚肉を特異的に検出することは困難と判断し、アルブミンを検出する ELISA に絞って開発を

進めた。

アルブミンはウサギに免疫して、高力価の抗体が得られやすく、肉に含まれるタンパク質の中では、アミノ酸配列の種間差が大きいので、交差は低い方であった。しかし、他の畜肉との交差がまったく無いわけではないため、交差する他の動物の血清で吸収を試みた。吸収した抗体を用いても ELISA では交差は低減しなかったが、Western Blot では非特異的なバンドは消失したので、Western Blot による豚肉タンパク質の検出という手段は可能であると考えられる。

豚肉の加熱により ELISA の検出感度は低下するが 100℃までの加熱であれば、検出が可能である。121℃で加熱すると検出感度は大幅に低下するが、熱によってタンパク質の構造が大きく変化したと考えられる。

(牛肉 ELISA)

ウシミオグロビン中に対するモノクロナールペプチド抗体作製にあたっては、ウシミオグロビンに対して高い特異性を有するように免疫する合成ペプチドを設計した。この抗体のウシミオグロビンに対する反応性と交差反応性を調査したところ、抗ペプチド B mAb と同様に、ウシミオグロビンに対して高い特異性を示すことがわかった。サンドイッチ ELISA では、固相抗体に特異性の高い抗体を用いることで高い特異性を持つ系を構築できると考えられたため、これら2種類の抗ペプチド抗体を固相抗体とした系、すなわちポリポリサンドイッチ、モノモノサンドイッチを構築した。それぞれの系における検出限界を算出したところ、約 15ng/ml と 30ng/ml となり、現行の特定原材料測定キットでの検出限界 (10ng/ml 未満) は達成できなかった。しかし、ウシ、ブタ、トリの標準タンパク質を用いてこれらの系における交差性を調査したところ、いずれの系においてもブタとトリとの交差反応はみられず、ウシに特異性の高い系であることがわかった。

そこで、実際の食品に含まれる牛肉タンパク質の検出が可能かを確認するために、牛肉の混合比率と加熱条件の異なるモデル食品を作製し、その検証を行った。その結果、いずれの系においても牛肉の混合比率に応じた牛肉タンパク質の定量ができたが、検出感度は加熱により低下した。抗体は変性させたウシミオグロビ

んに反応することから、加熱によってタンパク質が凝集してウシミオグロビンが可溶化せずに測定サンプル中に抽出されてない可能性が考えられた。すなわち、可溶化する条件をさらに検討することで、加熱された食品からも未加熱の食品と同等の感度が得られると考えられる。

牛肉エキスは、牛肉から加熱や酵素処理、他の添加物を加えるなど様々な工程を経て製造されている。そのため、製造工程中に牛肉由来のタンパク質はある程度分解されていると考えられ、電気泳動においても明確なバンドが確認できなかった。しかし、いずれの系でも牛肉エキスから牛肉タンパク質を検出することができ、特にモノモノサンドイッチでは高い定量値が示された。さらに、固相抗体に用いている抗ペプチド B mAb との反応性をウエスタンブロットにより調査したところ、ウシミオグロビンと同じ位置のバンドを検出することができた。このバンドがウシミオグロビンと仮定すると、ウシミオグロビンは様々な加工工程を経た牛肉エキス中でも分解されることなく存在していることになる。結果的に、加熱や酵素処理に対して耐性があると考えられるウシミオグロビンをターゲットタンパク質としたことは、今回の検出法開発で重要な意味を持つと考えられる。

(ゼラチン ELISA)

抗合成ペプチド抗体を用いた測定系では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。畜肉ゼラチン特異的な測定系が開発できていた。しかしながら、その測定系は加熱した頭足類（イカ、タコ）との弱い反応性を消すことが出来なかった。今年度は免疫動物、抗原を変更することにより、加熱した頭足類との反応性を他の魚介類と同等のレベルに低減した畜肉ゼラチン特異的な測定系を開発することが出来た。最終的に測定系の構築に利用したのは、抗ウシアルカリゼラチン抗体である。同じ抗原を用いて一昨年系の構築を試みた際は、サカナゼラチンへの反応性が畜肉ゼラチンへの反応性と同等で断念した経緯がある。しかしながら今回は、抗原は同じでも免疫動物が違ふことにより、抗原認識部位が異なり、反応性の異なる抗体が入手できたことにより、当初の目的であった、畜肉ゼラチン特異的な測定系の構築

が可能となった。

(鶏肉 PCR)

鶏肉特異的なプライマーを用いることで、鶏以外の畜肉だけでなく、鶉、七面鳥や鴨と言った食用鳥類からの識別も可能であった。その他の原材料については、わずかながら鶏卵由来の DNA についても増幅が認められたが、鶏卵中に含まれる DNA 量が非常に微量であることから、混入レベルでは増幅はされないと考えられる。

モデル食品由来の DNA について検討した結果、煮沸およびオートクレーブ処理した食品からでも、10 ppm 以上の鶏肉混入で検出が可能であると考えられた。電気泳動時において、少しプライマーダイマーの存在が見られるが、判定に支障はないと判断した。

(豚肉リアルタイム PCR)

食品に含まれる豚肉・鶏肉・牛肉・羊肉および馬肉を検出することが可能な Real-Time PCR 法を確立した。本方法の感度は、アレルギー物質の検査を行うに十分なものであると同時に、加工食品に混入するミンチ肉の検出に有効であり、食品表示を検証し、消費者の食に対する安心感を保証するものでもあると言える。本法は短時間で結果が得られ、定量性もあり、従来の PCR 法よりも優れていると考えられる。ただし、あまりにも感度が高いので、アレルギー物質の検出では、試料からの DNA 抽出や、反応液の混合などの実験操作に十分な注意が必要である。

E. 結論

豚肉ではブタアルブミンを、牛肉ではウシミオグロビンおよびその部分ペプチドを、ゼラチンではウシゼラチンを選択し、それらを動物に免疫して得られた抗体を用いて、検出系の確立を試みた。豚肉では、検出感度 6.25ng/ml の測定系が構築されたが、牛肉・羊肉・馬肉との交叉が見られること、および、加熱肉との反応が弱いことが問題点として残された。牛肉の検出系でも、加熱肉との反応が弱かった。一方、ゼラチンでは、イカ・タコとの弱い反応性を消すことが可能となり、感度・特異性ともに良好な検出系が確立された。

また、PCR 測定系も確立された。鶏肉では、16s ミトコンドリア DNA 領域をターゲットとするプライマーを用いた。これにより、さまざま

な鶏品種由来 DNA を検出できた。しかも、鶏以外の食用鳥類や哺乳動物由来のものでは増幅バンドが見られず、識別が可能であった。

さらに、チトクロム b 上に作成したプライマーおよび TaqMan プロブ配列を用い、鶏肉・豚肉・牛肉・羊肉・馬肉を迅速かつ定量的に検出することが可能な Real-Time PCR 法を確立した。小麦 DNA をマトリックスとして肉 DNA の検出感度を求めたところ、0.001% (100 fg/ μ l) まで定量が可能であり、良好な検量線 (R^2 値が 0.994-0.999) が作成された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanabe S., Miyauchi E., Muneshige A., Mio K., Sato C., and Sato M. PCR Method of Detecting Pork in Foods for Verification of Allergen Labeling and for Identification of Hidden Pork Ingredient in Processed Foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(7), 1663-1667, 2007.
- 2) Tanabe S., Hase M., Yano T., Sato M., Fujimura T., Akiyama H. A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(12), 3131-3135, 2007.
- 3) Fujimura T, Matsumoto T, Tanabe S, and Morimatsu F. Specific Discrimination of Chicken DNA from Other Poultry DNA in Processed Foods Using the Polymerase Chain Reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press, 2008.

2. 学会発表

- 1) 藤村達也, 松本貴之, 森松文毅, 田辺創一. PCR 法を用いた食品中の鶏肉検知法について, 第 93 回日本食品衛生学会, 東京, 2007 年 5 月.
- 2) Hasegawa T, Fujimura T, Matsumoto T, Morimatsu F, and Tanabe S. Detection Method of Chicken Contained in Processed Foods by

Polymerase Chain Reaction. 53rd

International Congress of Meat Science and Technology, China, 2007 年 8 月.

- 3) 佐藤雅彦, 宗重明美, 沼田正寛, 田辺創一. ELISA 法を用いた食品中の豚肉タンパク質の検出法, 第 54 回日本食品科学工学会, 福岡, 2007 年 9 月.
- 4) 琴浦聡, 中村美幸, 村上友貴絵, 三明清隆, 杉山雅昭, 田辺創一, 成田宏史. ウシミオグロビンに反応する抗体を用いたサンドイッチ ELISA の構築, 第 54 回日本食品科学工学会, 福岡, 2007 年 9 月.
- 5) 土井啓利, 渡邊恵理子, 柴田治樹, 田辺創一. ELISA 法による食品中のゼラチン検出法の開発について, 第 94 回日本食品衛生学会, 静岡, 2007 年 10 月.
- 6) 中村美幸, 琴浦聡, 田辺創一, 成田宏史. 免疫学的手法によるウシ・ブタ・トリ肉の判別. 2008 年度日本農芸化学会, 愛知, 2008 年 3 月.
- 7) 琴浦聡, 中村美幸, 村上友貴絵, 三明清隆, 杉山雅昭, 成田宏史. サンドイッチ ELISA を用いた食品中の牛肉タンパク質の検出. 第 49 回日本食肉研究会, 茨城, 2008 年 3 月.
- 8) 藤村達也, 松本貴之, 森松文毅. PCR 法を用いた食品中の鶏肉および牛肉検知法について. 第 49 回日本食肉研究会, 茨城, 2008 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 藤村達也, 松本貴之. 特願 2007-219110. 試料中の牛由来成分の検出方法.
- 2) 琴浦聡, 三明清隆, 杉山雅昭, 成田宏史. 特願 2007-223224. ウシミオグロビン部分ペプチドに対する抗体、及び当該抗体を用いた検査方法並びに検査用キット
- 3) 佐藤雅彦, 宗重明美, 田辺創一, 佐藤主税, 三尾和弘. 特願 2007-267550, 加工食品中のブタ肉の検出方法.

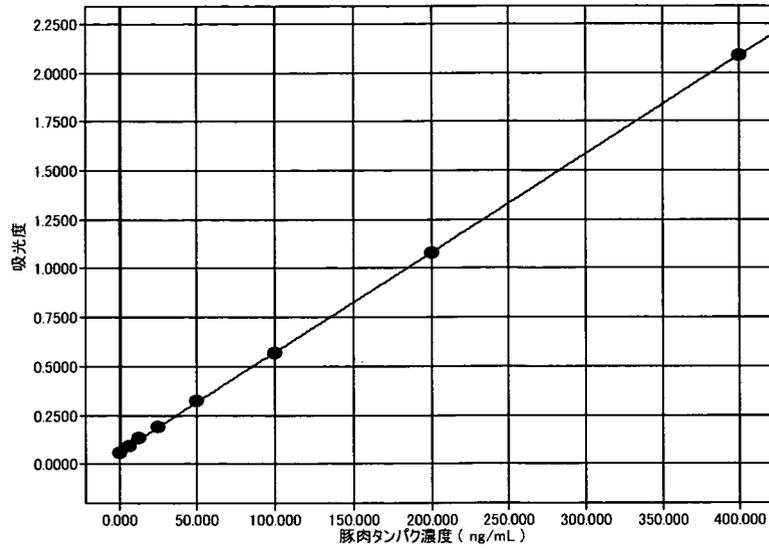


図1 豚肉タンパク質検出 ELISA の検量線

表1 ポリポリサンドイッチを用いた豚ベースモデル食品に含まれる牛肉タンパク質の定量

サンプル	未加熱区		80°C・30分間加熱区		120°C・30分間加熱区	
	牛肉タンパク質濃度(mg/ml)	B100の濃度を100とした場合	牛肉タンパク質濃度(mg/ml)	B100の濃度を100とした場合	牛肉タンパク質濃度(mg/ml)	B100の濃度を100とした場合
B100	10.826	100.00	3.878	100.00	0.612	100.00
B10	0.957	8.84	0.461	11.88	0.107	17.41
B1	0.112	1.03	0.037	0.96	0.007	1.16
B0.1	0.009	0.09	0.003	0.07	0.0002	0.19
B0.01	0.001	0.01	-	-	-	-
P100	- ¹⁾	-	-	-	-	-

1): 検出限界未満

表2 モノモノサンドイッチを用いた豚ベースモデル食品に含まれる牛肉タンパク質の定量

サンプル	牛肉タンパク質濃度(mg/ml)	B100の濃度を100とした場合
B100	10.367	100.00
B10	0.846	8.16
B1	0.115	1.11
B0.1	0.014	0.14
B0.01	0.002	0.02
P100	- ¹⁾	-

1) 検出限界未満

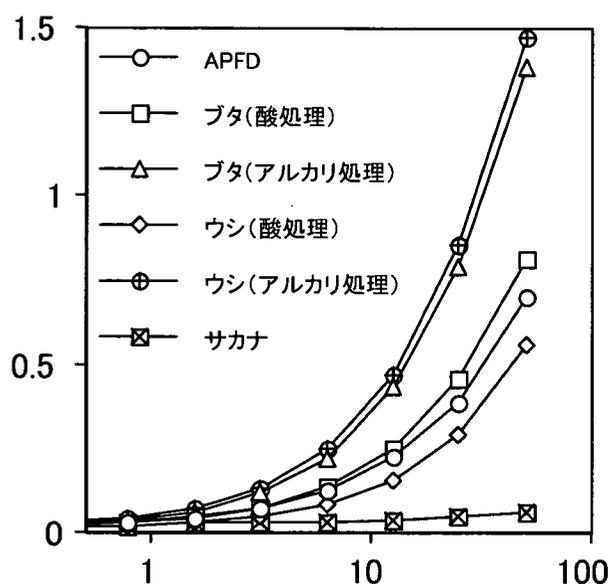


図2 抗ウシアルカリ処理ゼラチン抗体での反応性
 APFD: ブタ(酸処理)凍結乾燥品を100%としたときの相対値

表3 抗ウシアルカリ処理ゼラチン抗体での測定例

サンプル (生)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	サンプル (加熱)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)
サバ	N.D.	サバ	N.D.
サケ	0.6	サケ	N.D.
カツオ	N.D.	カツオ	2.4
マグロ	N.D.	マグロ	3.2
スルメイカ	N.D.	スルメイカ	4.8
ミズダコ	N.D.	ミズダコ	2.1
エビ	N.D.	エビ	N.D.
カニ	N.D.	カニ	N.D.
アサリ	N.D.	アサリ	N.D.
ホタテ	N.D.	ホタテ	0.8
たらこ	N.D.	たらこ	N.D.
ししゃも(卵)	N.D.	ししゃも(卵)	N.D.

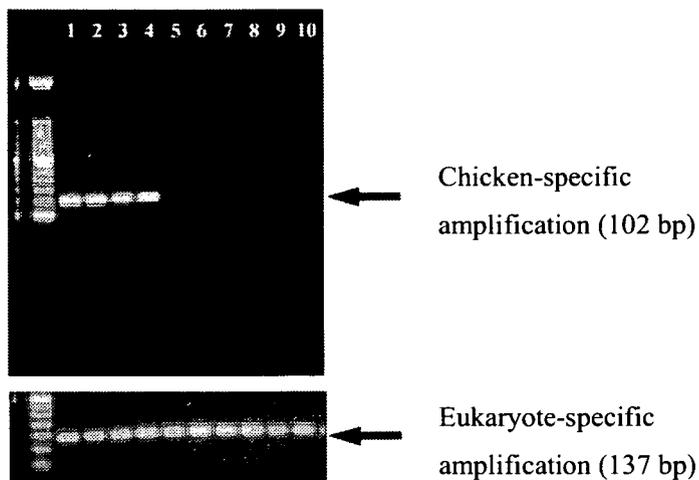


図3 鶏肉 PCR 検出系の各肉類との交差性反応

上図：鶏特異的プライマー、下図：真核生物特異的プライマー

- 1.ブロイラー、2.シャモ、3.名古屋コーチン、4.比内地鶏、
5.鶉、6.七面鳥、7.鴨、8.牛、9.豚、10.羊

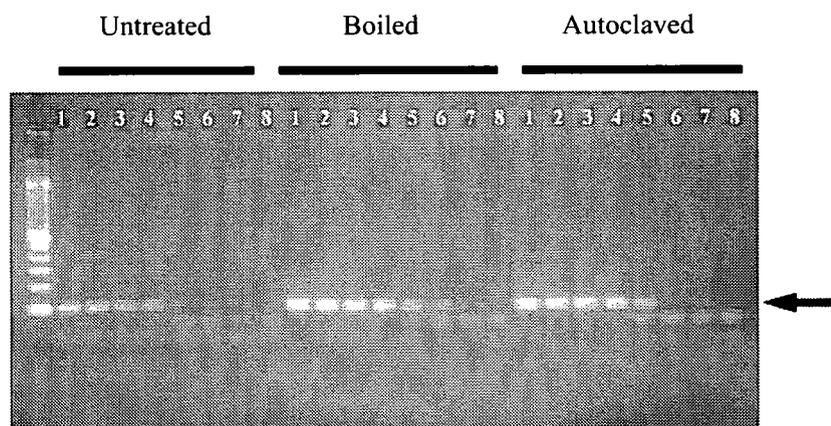


図4 モデル食品由来の DNA の反応性 (鶏肉 PCR 検出系)

1. 100%、2. 10%、3. 1%、4. 0.1%、
5. 0.01%、6. 0.001%、7. 0.0001%、8. 0%

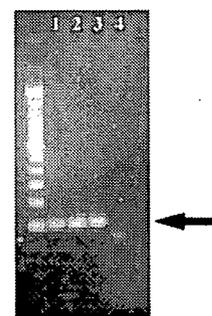


図5 市販の鶏含有製品の反応性 (鶏肉 PCR 検出系)

1. フライドチキン
2. 缶詰
3. レトルトカレー
4. 顆粒スープ

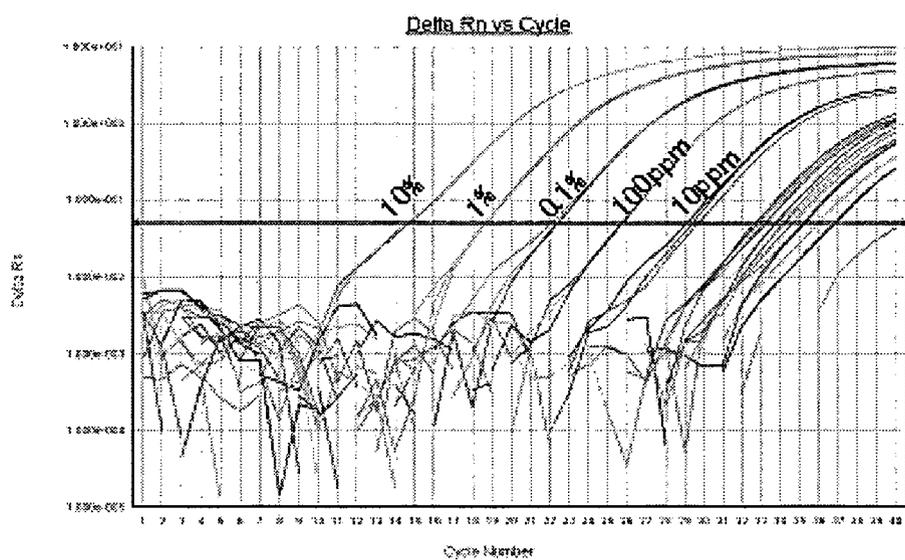


図6 餃子中の豚肉の Real-Time PCR による検出

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuge I, Okumura A, Kondo Y, Itomi S, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Urisu A	lergen-specific T-cell response in patients with phenytoin hypersensitivity; simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution assay	Allergol Int	56	149-155	2007
Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Ohno Y	A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods	J. Agric. Food Chem.	55	9345-9350	2007
Motoyama K, Suma Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K	Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans	J. Agric. Food Chem.	55	985-991	2007
Suma Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Lu Y, Ushio H, Shiomi K	Comparative analysis of barnacle tropomyosin: divergence from decapod tropomyosins and role as a potential allergen	Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.	147	230-236	2007
Yamakawa H, Akiyama H, Endo Y, Miyatake K, Sakata K, Sakai S, Moriyama T, Urisu A, Maitani TA	Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction	Biosci Biotechnol Biochem	71	269-272	2007
Yano, T., Sakai, Y., Uchida, K., Nakao, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., Maitani, T.	Detection of walnuts residues in processed foods by polymerase chain reaction,	Biosci. Biotech. Biochem.,	71	1793-1796	2007
Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., Sakai, S., Toyoda, M., Urisu, A.,	Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction,	Biosci, Biotechnol, and Biochem,	71,	2561-2564	2007
Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Watanabe T, Matsuda R, Urisu A, Maitani T.	Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction.	J Agric Food Chem	55	1649-1655	2007

Tanabe S., Miyauchi E., Muneshige A., Mio K., Sato C. Sato M.	PCR Method of Detecting Pork in Foods for Verification of Allergen Labeling and for Identification of Hidden Pork Ingredient in Processed Foods	Biosci. Biotechnol. Biochem	71 (7)	1663-1667	2007
Tanabe S., Hase M., Yano T., Sato M., Fujimura T., Akiyama H.	A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods	Biosci. Biotechnol. Biochem	71 (12)	3131-3135	2007
Sakai, S., Matsuda, R., Adachi, R., Akiyama, H., Maitani, T., Ohno, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Shiomi, K., Urisu, A.	Interlaboratory Evaluation of two enzyme-linked immunesorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods,	Journal of AOAC International,	91	123-129	2008