

称号及び氏名	博士（獣医学）	琴浦 聡
学位授与の日付	平成24年2月20日	
論文名	ウシミオグロビン特異的抗体を用いた食品中の牛肉タンパク質の評価法に関する研究	
論文審査委員	主査	小崎 俊司
	副査	児玉 洋
	副査	松尾 三郎

論文要旨

背景

食物アレルギー患者がアレルギー性のタンパク質(アレルゲン)を含む食品を誤って喫食することによる健康危害が報告されている。このような事故を未然に防ぐために、厚生労働省は、2000年に健康危害を引き起こす恐れのある食品24品目を指定し、アレルゲンを含む加工食品に係る表示制度を通知した。症例数が多く、重篤度の高い5品目(卵、牛乳、小麦、そば、落花生)については、2001年から特定原材料として表示の義務付けおよびアレルゲン検査方法を定めた。残りの19品目(あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン)は表示推奨品目として設定されたが、今後の疫学調査の進捗により必要に応じた制度改正を行うため、表示義務品目として指定される可能性がある。さらに厚生労働省は、表示推奨品目を表示義務化することを視野に入れて、まずはそれぞれのアレルゲン検査方法を確立・評価し、標準化するためのプロジェクト(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)を発足している。

肉類の中で牛肉はアレルゲン性が高く、牛乳においては血清アルブミンと免疫グロブリンが主要なアレルゲンとして知られている。実際、牛乳アレルギー患者が牛肉を喫食してアトピー性皮膚炎を発症する事例も報告されている。牛肉アレルギー患者以外にも宗教問題、菜食主

義、BSEの忌避といった理由により牛肉の喫食を避ける者もいる。消費者が安心して安全な食品を選択できるためには、正確で適切な表示が必要とされるが、そのためには牛肉の混入を特異的で簡便に検出できる技術の構築が重要である。アメリカ農務省と農林水産消費安全技術センターで推奨されている市販の牛肉判別 ELISA キットは、牛肉が 1% (牛肉タンパク質として約 0.2%) 配合されている対象検体から牛肉タンパク質を検出できるが、アレルギー検査方法に求められる検出感度 (10 μ g 牛肉タンパク質/g 食品; 0.001%) よりも非常に低いため、アレルギー検査方法として利用できない。本研究では、ウシミオグロビンに対する特異抗体の調製を試み、アレルギー検査方法に求められる特異性と検出感度を十分に満たす新たな評価法を確立し、牛肉のアレルギー検査方法への適用性について検討した。

第1章 ウシミオグロビン特異的ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA の構築

抗体作製のタンパク抗原として、他の家畜・家禽とはアミノ酸配列の相同性が低いウシミオグロビン (Mb) を選択した。ウシ Mb の精製は牛モモ肉の水抽出液を硫酸分画した後、イオン交換クロマトグラフィーを用いて行った。食品は様々な工程を経て製造されるため、ウシ Mb は変性していることが多い。変性状態のウシ Mb を認識する抗体を得るために、精製ウシ Mb に 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加し、95°C、10 分間加熱した変性 Mb (Denatured Mb; D-Mb) を抗原とした。さらに、ブタとトリの Mb に交差性の低い抗体を得ることを目的に、ウシ Mb のアミノ酸配列から、ブタ Mb と 5 残基、トリ Mb と 6 残基が異なる 10 残基のアミノ酸配列を選択し、N 末端にシステインを付加した合成ペプチド A (C - A⁸⁴ - E⁸⁵ - V⁸⁶ - K⁸⁷ - H⁸⁸ - L⁸⁹ - A⁹⁰ - E⁹¹ - S⁹² - H⁹³ - A⁹⁴ - N⁹⁵) をカコ貝ヘモシアニン (KLH) に結合させた抗原ペプチドを作製した。これらの抗原をそれぞれウサギに免疫して抗血清を得た後、D-Mb 結合アフィニティーカラムで各ポリクローナル抗体を精製した (抗 D-Mb pAb、抗ペプチド A pAb)。競合 ELISA において、抗 D-Mb pAb は D-Mb と未変性ウシ Mb (Native Mb; N-Mb) とは反応したが、ペプチド A とは反応しなかった。抗ペプチド A pAb は、抗原としたペプチド A のほか、D-Mb と N-Mb と反応が認められた。得られた抗体間の交差性をウェスタンブロットで調べた結果、抗 D-Mb pAb はブタ Mb と交差反応を示したが、抗ペプチド A pAb はウシ Mb を特異的に認識することが確認できた。それぞれの抗体をプレート固相化ならびに市販の酵素 (HRP) 標識化キットを用いて標識抗体を作製し、サンドイッチ ELISA における最適な抗体の組み合わせを検討した。抗 D-Mb pAb を固相抗体および HRP 標識抗体として用いたサンドイッチ ELISA では、ブタ Mb と交差反応がみられた。抗ペプチド A pAb を固相抗体、抗 D-ウシ Mb pAb を HRP 標識抗体としたサンドイッチ ELISA (pAb-ELISA) はウシ Mb を特異的に検出できた。

フリーズドライした牛肉粉末に抽出溶液 (0.5% SDS、2%メルカプトエタノール含有 PBS、pH7.4) を加え、一晚振とうして得られた牛肉標準タンパク質を用いて pAb-ELISA の標準曲線を作成し、ブランク溶液吸光値の平均値 (μ) と標準偏差値 (σ) から検出限界 ($\mu \pm 3\sigma$) を算出し

たところ、29.4 ng 牛肉タンパク質/ml であった。豚肉もしくは鶏肉に対する牛肉の混合比率(10～0.01% w/w)と加熱処理(未加熱、80℃・30 分間加熱、120℃・30 分間加熱)の異なるモデル食品を作製し、加熱条件が牛肉タンパク質の検出に及ぼす影響を調べた。加熱モデル食品から抽出されたタンパク質量は未加熱に比べて低かったが、牛肉を 10～0.1%混合した種々のモデル食品からも牛肉タンパク質の検出が可能であった。さらに、pAb-ELISA の市販食品への適用性を調べたところ、他のタンパク質と交差反応を示すことなく牛肉タンパク質を特異的に検出できた。これらの結果は、本法が表示を反映した検査成績を得ることに適した方法であることを示している。

第2章 ウシミオグロビン特異的モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA の構築

ウシ Mb 特異的モノクローナル抗体を作製するために、ペプチド A に加え、ブタ Mb と 3 残基、トリ Mb と 4 残基が異なる 142 番目のメチオニンから C 末端 153 番目のグリシンまでの合成ペプチドを調製した。その際、143 番目のアラニンをシステインに置換した(M¹⁴² - C¹⁴³ - A¹⁴⁴ - E¹⁴⁵ - Y¹⁴⁶ - K¹⁴⁷ - V¹⁴⁸ - L¹⁴⁹ - G¹⁵⁰ - F¹⁵¹ - H¹⁵² - G¹⁵³; ペプチド B)。KLH-ペプチド A、KLH-ペプチド B、および D-Mb をマウスに免疫し、常法に従い抗体産生ハイブリドーマを確立した。最終的に腹水からプロテイン G カラムを用いて各モノクローナル抗体(抗ペプチド A mAb、抗ペプチド B mAb、抗 D-Mb mAb)を精製した。

ペプチド A およびペプチド B に対して、それぞれ 3 種類の mAb が得られた。抗ペプチド A mAb はいずれも競合 ELISA で D-Mb と N-Mb に反応しなかった。一方、すべての抗ペプチド B mAb はいずれも D-Mb および N-Mb と反応した。各抗ペプチド B mAb のブタおよびトリ Mb に対する交差反応を調べるためにウエスタンブロットを行った。3 種類の mAb の内、mAb 11H のみがウシ Mb に特異的に反応した。D-Mb に対して 5 種類の mAb が得られ、その内、mAb 11E が N-Mb よりも D-Mb と強く反応することを競合 ELISA で確認した。抗ペプチド B mAb 11H を固相抗体、抗 D-Mb mAb 11E を HRP 標識抗体、もしくはビオチン標識抗体として調製し、それぞれの ELISA の感度を評価した。その結果、ビオチン標識抗体を用いた方法が、高い検出感度を得ることがわかった。この mAb-ELISA の検出限界は、9.5 ng 牛肉タンパク質/ml であり pAb-ELISA よりも優れた方法であると考えられた。

第3章 MAb-ELISA を用いた市販加工食品からの牛肉タンパク質の検出

MAb-ELISA を用いてモデル食品からの牛肉タンパク質の検出を試みたところ、PAb-ELISA とは異なり加熱処理の影響を受けず、牛肉を 0.01%混合したモデル食品から牛肉タンパク質を検出できた。これは固相抗体 mAb 11H が結合する C 末端領域が加熱処理に対して安定で

あることを示唆している。また、本法を市販食品に含まれる牛肉タンパク質の検出に適用したところ、他のタンパク質と交差せず、表示と適合する牛肉タンパク質の特異的検出が可能であった。さらに本法と市販の牛肉判別 ELISA キットと比較しながら、6種類の牛肉エキスと牛肉エキスをを使用した市販食品に含まれる牛肉タンパク質の検出を試みた。MAb-ELISA は供試したすべての食品から牛肉タンパク質を検出できたが、市販 ELISA ではいずれの食品からも牛肉タンパク質を検出できなかった。これらの結果から、開発した mAb-ELISA は食品加工処理の影響を受けずに牛肉タンパク質を特異的に検出できるだけでなく、市販 ELISA よりも高い検出感度を有する実用的な方法であると考えられた。

総括

本研究では、ウシ Mb に特異的な抗体を調製し、ウシ Mb を特異的に検出するサンドイッチ ELISA を構築し、以下のことを明らかにした。

1. ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA (pAb-ELISA) は、ウシ Mb の特異的な検出が可能であったが、食品の加熱条件に影響を受けることがわかった。
2. モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA (mAb-ELISA) は、加熱条件に影響されずに牛肉タンパク質を特異的に検出できた。固相抗体として使用した mAb 11H は加熱処理に対して安定な領域を認識していることが示唆された。
3. MAb-ELISA の検出感度は、市販の牛肉判別キットより優れ、実用性に富んだ方法であると考えられた。

本成績は、牛肉のアレルゲン検査方法に求められる特異性と検出感度を十分に満たす検出方法であることを示し、牛肉アレルギー患者の健康被害防止のために有用な検出技術として利用されることが期待される。

審査結果の要旨

食物アレルギー患者がアレルギー性のタンパク質（アレルゲン）を含む食品を誤って喫食することによる健康危害が報告されている。このような事故を未然に防ぐために、厚生労働省は、重篤度の高い 5 品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）については特定原材料として表示の義務付けおよびアレルゲン検査方法を定めているが、残りの 19 品目（あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン）は表示推奨品目として設定されている。しかし、これらの品目は今後の疫学調査の進捗によ

り必要に応じた制度改正を行うため、表示義務品目として指定される可能性がある。牛肉はアレルギー性が高く、牛乳アレルギー患者においても牛肉を喫食してアトピー性皮膚炎を発症する事例も報告されている。牛肉は宗教問題、菜食主義、**BSE**の忌避といった理由で喫食を避ける者もいる。消費者が安心して安全な食品を選択できるためには、正確で適切な表示が必要とされるが、そのためには牛肉の混入を特異的で簡便に検出できる技術の構築が重要である。現在、アメリカ農務省と農林水産消費安全技術センターで推奨されている市販の牛肉判別 **ELISA** キットは、検査で求められる検出感度 (**10 μ g** 牛肉タンパク質/g 食品) よりも非常に低いため、アレルギー検査方法として利用できない。本研究では、ウシミオグロビンに対する特異抗体の調製を試み、検査法に求められる特異性と検出感度を十分に満たす新たな評価法を確立し、牛肉のアレルギー検査方法への適用性について検討した。

第1章では他の家畜・家禽とのアミノ酸配列の相同性が低いウシミオグロビン (**Mb**) を抗原として調製した。食品は加熱などの工程を経て製造されるため、**SDS** および加熱処理した変性 **Mb (D-Mb)** を作成した。またウシ **Mb** のアミノ酸配列でブタ **Mb** およびトリ **Mb** と特に相同性の低い **12** 残基のアミノ酸からなる合成ペプチド **A** を調製し、これらの抗原に対するウサギポリクローナル抗体 (**pAb**) を作成した。競合 **ELISA** およびウエスタンブロットで各抗体の交差性を確認後、抗ペプチド **A pAb** を固相抗体、抗 **D-Mb pAb** を **HRP** 標識抗体として構築したサンドイッチ **ELISA (pAb-ELISA)** でウシ **Mb** を特異的に検出することができた。フリーズドライ牛肉粉末抽出液を標準タンパク質として検出限界を調べた結果、**29.4 ng** 牛肉タンパク質/ml であった。しかしながら、加熱食品では未加熱食品と較べて検出量は劣っていた。

第2章では、ウシミオグロビン特異的モノクローナル抗体 (**mAb**) を作製し、これを用いたサンドイッチ **ELISA (mAb-ELISA)** の構築を試みた。抗原として **D-Mb**、ペプチド **A** に加えてウシ **Mb** の **C** 末端 **12** 残基のペプチド **B** を使用した。各 **mAb** の反応性を調べた結果、ペプチド **B** に対する **mAb11H** と **D-Mb** に対する **mAb11E** がウシ **Mb** に特異的に反応した。固相抗体として **mAb11H**、ビオチン標識抗体として **mAb11E** を使用した **ELISA** で検出感度が最も高く、その検出限界は **9.5 ng** 牛肉タンパク質/ml であり **pAb-ELISA** よりも優れた方法であると考えられた。

第3章では、**mAb-ELISA** を用いてモデル食品からの牛肉タンパク質の検出を試みたところ、**pAb-ELISA** とは異なり加熱処理の影響を受けず、牛肉を **0.01%** 混合したモデル食品から牛肉タンパク質を検出できた。これは固相抗体 **mAb11H** が認識する **C** 末端領域は加熱処理に対して安定であることを示唆している。本法を市販食品に含まれる牛肉タンパク質の検出に適用したところ、表示と適合した牛肉タンパク質を特異的に検出することができた。さらに **6** 種類の牛肉エキスと牛肉エキスを使用した市販食品に含まれる牛肉タンパク質の検出を市販の牛肉判別 **ELISA** キットと比較した。**mAb-ELISA** はすべての食品から牛肉タンパク質を検出できたが、市販 **ELISA** ではいずれの食品か

らも牛肉タンパク質を検出できなかった。これらの結果から、**mAb-ELISA** は食品加工処理の影響を受けずに牛肉タンパク質を特異的に検出できるだけでなく、市販 **ELISA** よりも高い検出感度を有する実用的な方法であると考えられた。

以上の結果は、消費者から関心の高い牛肉アレルギー検出のために感度および特異性の高い検査法を確立したことで、食の安全性を確保するために重要な課題の一つとなっている食物アレルギーを予防するための有用な手段を提供すると考えられる。本法はすでに実用化に向けた取り組みも行われており、これら一連の成果は、応用獣医学、特に食品衛生学分野に大きく貢献すると考えられ、学力確認試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。