

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：84407

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2021

課題番号：18H06408・19K21487

研究課題名(和文)牛肉、豚肉、および鶏肉の同時定量法の開発～特定原材料の一斉分析に向けて～

研究課題名(英文) Multiplex determination of meat species for beef, pork, and chicken in meat products: Toward simultaneous analysis of food allergens

研究代表者

山崎 朋美 (Yamasaki, Tomomi)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・研究員

研究者番号：30827275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛、豚及び鶏ミオグロビン(Mb)にそれぞれ異なる反応性を示すモノクローナル抗体が得られた。得られた抗体を用いて、既存の測定法と比べより実用的な豚肉測定法となるサンドイッチELISAを構築した。本ELISAは、牛Mb、鶏Mb、羊肉、ヤギ肉と交差反応せず、豚Mbを定量的に測定でき、牛肉に添加した1%(w/w)の豚肉を検出できた。また、豚肉添加後に加熱調理した場合でも同様の感度で豚肉を検出できた。さらに、得られた抗体および市販の抗体を表面プラズモン共鳴(SPR)測定装置に適用、条件検討し、SPRイムノセンサを構築した。本イムノセンサは、牛肉、豚肉及び鶏肉を同時に定量可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、食肉偽装対策や原材料表示を監視するために食品中の豚肉量を測定するイムノアッセイがいくつか開発されているが、食品の調理・加工によるタンパク質の変性や抽出効率の低下の影響を受けるため、正確な測定が困難だった。本研究で構築したELISAはこの問題を克服し、生肉及び加熱調理肉中の豚肉を正確に定量でき、食肉製品の認証や誤表示の防止への利用が期待できる。さらにイムノセンサ構築を含め得られた成果は、食肉の分析に限らず、他のアレルギー原因食品の分析にも応用可能である。将来的に特定原材料の一斉分析法開発への道を拓くと共に、食肉に関する宗教や信条により課せられる食品選別法の開発に役立つ知見を提供できる。

研究成果の概要(英文)：Monoclonal antibodies showing different reactivity to beef, pork and chicken myoglobin (Mb) were obtained. The obtained antibodies were used to construct a sandwich ELISA, which is a more practical pork determination method compared to conventional methods. This ELISA did not cross-react with beef Mb, chicken Mb, lamb, or goat meat, and was able to quantitatively measure pork Mb and detect 1% (w/w) pork added to beef. It was also able to detect pork with similar sensitivity when cooked after pork addition. Furthermore, the obtained and commercially available antibodies were applied to a surface plasmon resonance (SPR) measurement instrument to construct an SPR immunosensor. It was suggested that this immunosensor was capable of simultaneously quantifying beef, pork, and chicken.

研究分野：食品衛生、食品化学、食品分析

キーワード：サンドイッチELISA モノクローナル抗体 イムノセンサ 表面プラズモン共鳴 特定原材料 食品認証
食品表示 ハラル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの原因食品の混入や誤食による事故を防ぐためには、加工食品中の原因食品の存在を消費者に伝える適切な原材料の表示が必要である。国内では、食物アレルギーの患者数が多いまたは症状の重症度が高い7食品(特定原材料)の表示が義務づけられ、さらに一定数の患者が認められる21食品の表示が推奨されている。また、アレルギーなどの健康上の理由以外にも、宗教や信条により特定の食品の摂取が回避される場合がある。アレルギーや特定の宗教・信条を持つ消費者が安心して食品を選択するためには、表示の信頼性を担保する方法、つまり、原材料を適正に確認する測定法が必要である。酵素免疫測定法(ELISA法)は、抗体を用いて特定のタンパク質を特異的に高感度かつ高精度に定量する方法であり、特定原材料検査やアレルギー対応にも利用されている。しかし、ELISA法は原材料を個別に定量できるが、複数の原材料を同時に定量することは困難である。加工食品は、複数の原材料から製造されるため、製造工程における意図せぬ食品の混入を迅速に発見し、事故を早期に食い止めるためには、複数の原材料を同時に定量(いわゆる一斉分析)できる方法が有効である。

表面プラズモン共鳴(SPR)を利用したイムノセンサ(SPRイムノセンサ)は、センサチップ表面に固相化した抗体に対して抗原が結合した際に生じる光屈折率の変化を検出する技術である。酵素などの標識が不要であり、リアルタイムに抗原抗体反応を追えるため、迅速分析が可能である。さらに、複数種類の抗体をマイクロアレイ状に固相化することで複数種類の抗原抗体反応を同時に検出できる。

2. 研究の目的

本研究では、国内にて特定原材料に準ずる食品として表示が推奨されており、かつ特定の宗教や信条の観点からも重要である牛肉、豚肉、及び鶏肉を同時定量できる新規イムノセンサの構築を目指した。そこで、牛肉、豚肉、および鶏肉の各々のタンパク質に対するモノクローナル抗体(mAb)の作製、これらの肉を各々定量するサンドイッチELISAの構築、及び同時定量するSPRイムノセンサの構築を行う。

3. 研究の方法

(1)抗原の精製

大阪市内の小売店で購入した牛モモ肉、豚ハツ、鶏ハツを各々フードプロセッサで均質化した。水を加えて攪拌した後ろ過し、各々のろ液から硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィーにより牛、豚、鶏ミオグロビン(Mb)を精製した。3種類のMbを1% SDS存在下で、95℃、10分間加熱し変性Mbを調製した。これらの精製タンパク質は、抗体作製のための免疫原および構築したサンドイッチELISA、SPRイムノセンサにおける検量線作成に用いた。

(2)モノクローナル抗体(mAb)の作製

牛肉、豚肉および鶏肉のマーカーとなる各タンパク質をBALB/cマウスに免疫した。また、これらのタンパク質のアミノ酸配列のうち他の肉腫との相同性が低い配列を含む合成ペプチドを作製し、スカシガイヘモシアニンを結合させ、同様に免疫した。常法に従いハイブリドーマを作製し、各タンパク質に反応するものをスクリーニングした。得られた抗体産生ハイブリドーマは、丸大食品(株)から提供を受けた。ハイブリドーマはBALB/cマウスの腹腔内で増殖させ、腹水からプロテインGを用いてIgGを精製した。

(3)豚肉測定用サンドイッチELISAの構築

得られたmAbを用いて、サンドイッチELISAを構築した。市販の牛肉に豚肉を添加し、添加回収試験を実施した。市販の様々な豚肉を測定し、HPLCによる測定結果と比較した。

(4)SPRイムノセンサの構築

得られたmAbを専用のスポッターを用いてセンサチップに固相化し、SPR測定装置に設置した。精製した各マーカータンパク質を測定し、牛肉、豚肉、および鶏肉の同時定量に向けた検討を行った。センサチップはあらかじめNHSエステルが修飾されたものを使用した。センサチップ及びSPR測定装置は(株)堀場製作所製のCS-HDおよびOpenPlexを使用した。

4. 研究成果

(1)抗原の精製

牛肉、豚肉、鶏肉の検出、定量のマーカーとなるミオグロビンを精製した(図1A、B)。

(2)モノクローナル抗体(mAb)の作製

牛肉、豚肉および鶏肉に対するmAb8種類を調製した。各mAbの牛、豚および鶏ミオグロビンへの反応性をウェスタンブロットで確認した結果、それぞれ異なる反応性を示し(図1B~F)。これらのmAbを組み合わせることで、牛肉、豚肉、及び鶏肉を同時定量できることが示唆された。

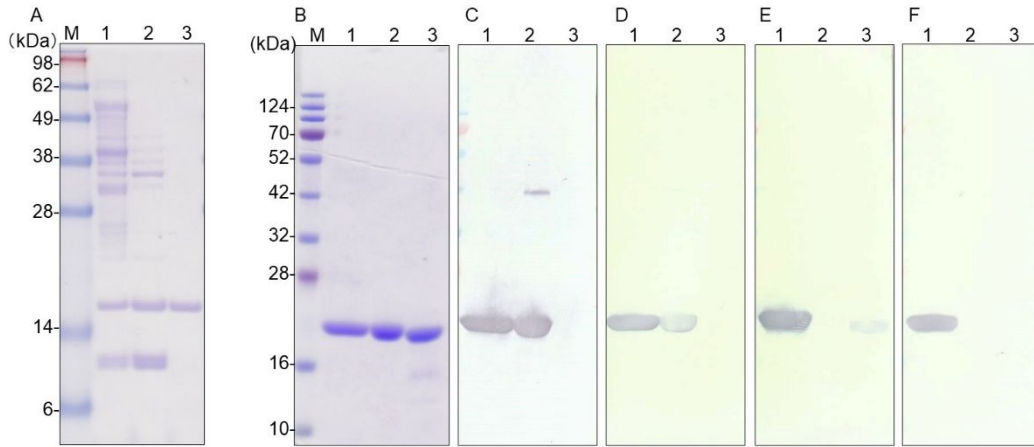


図1. ミオグロビン(Mb)を精製したときの各工程で得られた画分のアクリルアミド電気泳動 (A) と精製した牛、豚及び鶏 Mb (B) とモノクローナル抗体(mAb) 6D (C)、6G (D)、5C (E)、9C (F) のウェスタンブロットによる反応性. A: レーン M: マーカー、1: 豚ハツに水を加えホモジナイズ後に得られたる液、2: 硫酸分画の Mb 画分、3: 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製 Mb. B~F: レーン M: マーカー、1: 精製豚 Mb、2: 精製牛 Mb、3: 精製鶏 Mb. 他 4 つの mAb については省略する。

(3) 豚肉測定用サンドイッチ ELISA の構築

サンドイッチ ELISA は、タンパク質の定量において信頼性が高いため、SPR イムノセンサ構築の際のリファレンスとなる。得られた mAb 5C 及び 6D を用いてサンドイッチ ELISA を構築した。本 ELISA は、牛 Mb、鶏 Mb、羊肉、ヤギ肉と交差反応せず、豚 Mb を定量的に測定できた(図 2)。本 ELISA における豚 Mb の 50% 効果濃度は 90 ng/mL であり、牛肉に添加した 1% (w/w) の豚肉を検出できた。また、添加後に加熱調理した場合でも同様の感度で豚肉を検出できた(表 1)。また、脂肪の多いバラ肉を含むさまざまな部位の Mb を定量的に測定でき、HPLC で得られた測定値とも高い相関が得られた(図 3)。従来のハラール対応のために開発された豚肉検出用 ELISA は、食品の調理・加工によるタンパク質の変性や抽出効率の低下の影響を受けるため、正確な測定が困難だった。本 ELISA はこの問題を克服し、生肉及び加熱調理肉中の豚肉を正確に定量できた。構築した本 ELISA は、食肉製品の認証や誤表示の防止への利用が期待できる。

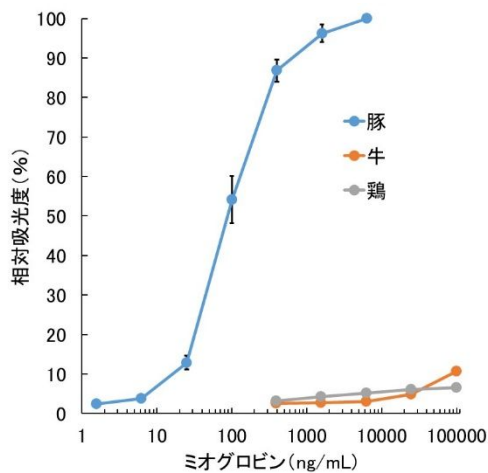


図 2. 構築したサンドイッチ ELISA の豚、牛及び鶏ミオグロビンへの反応性

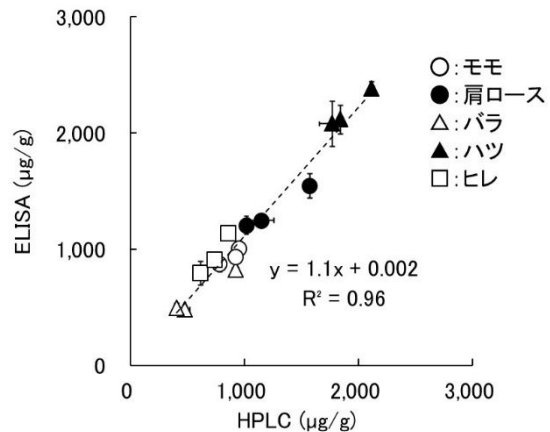


図 3. 構築したサンドイッチ ELISA と HPLC との様々な豚肉中のミオグロビン測定値の比較

表 1. 豚モモ肉または豚ハツを添加した牛モモ肉中の豚ミオグロビンのサンドイッチ ELISA による測定値

豚 (%) ^b	豚モモ				豚ハツ			
	生		加熱 ^a		生		加熱 ^a	
	Mb (µg/g) ^c	CV (%) ^d	Mb (µg/g) ^c	CV (%) ^d	Mb (µg/g) ^c	CV (%) ^d	Mb (µg/g) ^c	CV (%) ^d
100	868	7.1	927	15.9	2081	9.3	2299	17.2
10	98	0.9	112	11.7	202	4.6	236	12.9
1	12	5.2	17	1.2	27	3.4	32	5.2
0.1	n.d. ^e	-	n.d. ^e	-	n.d. ^e	-	n.d. ^e	-

a: 豚肉を添加後に 120 で 20 分加熱調理したもの. b: 試料中の豚肉添加量の割合. c: 3 回繰り返し測定した豚ミオグロビンの平均値. d: 3 回繰り返し測定の変動係数 (coefficient of variations). e: n.d., 検出下限未満

(4)SPR イムノセンサの構築

得られた mAb8 種類及び市販抗体 6 種類をセンサチップに固相化した(図 4)。センサチップはあらかじめ NHS エステルが修飾されたものを使用した。センサチップへ抗体を固定化する際の抗体濃度を検討した結果、本研究では 1 mg/mL が適していると考えられた。構築したイムノセンサにおいて mAb 5C、6D、6G、11E、11H が各々異なる反応性で牛、豚および鶏 Mb に反応した(図 5)。これら 5 種類の抗体を用いることで、牛肉、豚肉および鶏肉を同時定量できると考えられる。今後、構築したイムノセンサについて、実サンプルを用いて実用性を評価・検討する。

本研究で得られた成果は、食肉の分析に限らず、他のアレルギー原因食品の分析にも応用可能である。そのため、将来的な目標である特定原材料の一斉分析法開発への道を拓くと共に、食肉に関連する宗教や信条により課せられる食品選別法の開発に役立つ情報を提供できる。また、原材料を正確に確認する方法の確保は、意図せぬ食品の混入予防やクレームへの適切な対応にも繋がる。

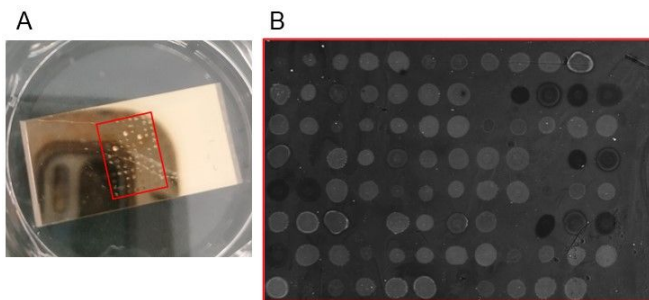


図 4. 抗体が固相化されたセンサチップ (A) と表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定装置による抗体を固相化した範囲 (赤色四角) の SPR イメージング画像 (B). 使用した装置は、赤色四角で囲ったセンサチップ表面の屈折率変化をイメージングできる。

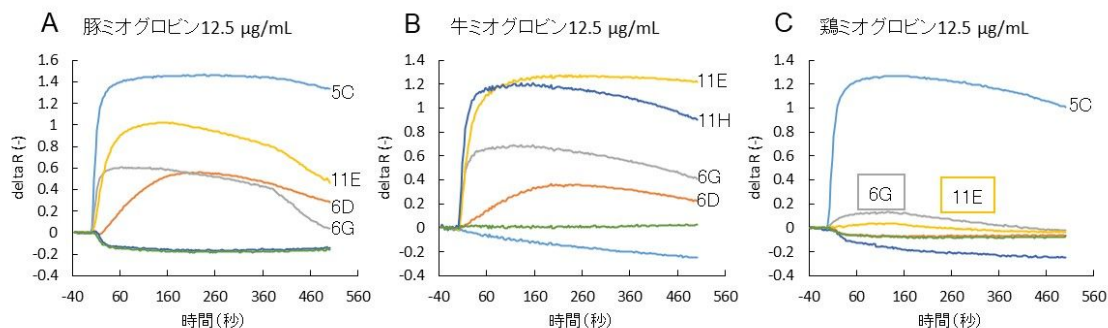


図 5. 構築したイムノセンサの豚 (A)、牛 (B) 及び鶏ミオグロビン (C) への反応性。グラフの右側または上部に各ミオグロビンと反応した抗体名を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamasaki Tomomi, Hirakawa Yuki, Momma Keiko, Yamaguchi Yukie M., Kotoura Satoshi, Miyake Shiro, Narita Hiroshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Pork Determination in Raw and Heated Meats: Combination of Monoclonal Antibodies to Denatured Porcine Myoglobin and Sodium Dodecyl Sulfate Extraction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 136 ~ 142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsfoodscitech.1c00372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 MIYAKE Shiro, HIRAKAWA Yuki, YAMASAKI Tomomi, WATANABE Eiki, HARADA Ayako, IWASA Seiji, NARITA Hiroshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Simultaneous Detection of Six Different Types of Pesticides by an Immunosensor Based on Surface Plasmon Resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 335 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19P333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Eiki, Hirakawa Yuki, Yamasaki Tomomi, Iwasa Seiji, Miyake Shiro	4. 巻 53
2. 論文標題 Immunoassay for Highly Water-Soluble Nitenpyram: Evaluating the Analytical Performance of an Easy-to-Use Screening Method for Agricultural Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Letters	6. 最初と最後の頁 174 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00032719.2019.1642343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyake Shiro, Hirakawa Yuki, Yamasaki Tomomi, Watanabe Eiki, Harada Ayako, Adachi Kayo, Iwasa Seiji, Narita Hiroshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of the fungicide mepanipyrim and its metabolite	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 156 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1584/jpestics.D19-029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MIYAKE Shiro, IRIKURA Daisuke, YAMASAKI Tomomi	4. 巻 35
2. 論文標題 Detection of Mast Cells Expressing c-Kit Using Antibody Covalently Bound to Gelatin Elongated from Surface of Immunosensor Based on Surface Plasmon Resonance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 811~813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19N012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山崎朋美, 平川由紀, 門間敬子, 山口友貴絵, 琴浦聡, 三宅司郎, 成田宏史
2. 発表標題 食肉中の豚肉使用量の評価に向けた豚ミオグロビンに対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAの構築
3. 学会等名 第116回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎朋美 平川由紀 門間敬子 山口友貴絵 琴浦聡 角谷直哉 三宅司郎 成田宏史
2. 発表標題 ブタミオグロビンに特異的なモノクローナル抗体の調製と豚肉検出用サンドイッチELISAの構築
3. 学会等名 食品衛生学会第115回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅司郎, 平川由紀, 山崎朋美, 渡辺栄喜, 原田亜矢子, 岩佐精二, 成田宏史
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴を利用したイムノセンサによる構造の異なる6種類の農薬の同時分析
3. 学会等名 第42回農薬残留分析研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------