

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：36403

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K14034

研究課題名（和文）ハラール制度対応に向けた豚由来タンパク質に対する超高感度同時酵素免疫測定法の開発

研究課題名（英文）Development of an ultra-sensitive simultaneous enzyme immunoassay for porcine proteins compatible with the Halal system

研究代表者

沼田 聡 (NUMATA, Satoshi)

高知学園大学・健康科学部・講師

研究者番号：10565857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、イスラム教において禁忌食材とされている豚肉を高感度に検出するため、超高感度酵素免疫測定法を開発することである。抗原として、当初豚血清アルブミン及び豚コラーゲンに着目していたが、豚コラーゲンのペプチド作成が困難のため、豚ミオグロビンに変更した。超高感度酵素免疫測定法の開発には抗原に対してそれぞれ2種類の抗体が必要であるが、2種類の抗原に対する抗体が1種類ずつしか得られず、得られた抗体は、それぞれ酵素標識抗体及び補足用標識抗体に調製し、直接ELISA法にて抗原と酵素標識抗体が反応することを確認したが、完全な超高感度酵素免疫測定法の開発までには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、イスラム教徒にとって禁忌食品である豚肉を誤って摂取しないようにするため、加工食品中の豚由来成分を高感度に検出する新たな手法として、超高感度酵素免疫測定法の開発を試みた。しかし、完全な超高感度酵素免疫測定法の開発までには至らなかった。

今後の課題として残りの抗体を作成し、超高感度酵素免疫測定法の開発を実現するよう試みる。

研究成果の概要（英文）：Pork is considered a contraindicated food in Islam. This study aimed to develop an ultra-sensitive enzyme immunoassay to detect pork with high sensitivity. Porcine serum albumin and porcine myoglobin were selected as antigens. The development of an ultra-sensitive enzyme immunoassay requires two types of antibodies for an antigen. But, only one antibody each for porcine serum albumin and porcine myoglobin could be obtained. Therefore, the ultra-sensitive enzyme immunoassays for porcine serum albumin and porcine myoglobin are unfinished. If we can obtain the remaining antibodies in the future, we believe it will be possible to develop ultra-sensitive enzyme immunoassays for porcine serum albumin and porcine myoglobin.

研究分野：給食経営管理

キーワード：酵素免疫測定法 ハラール制度 豚肉

1. 研究開始当初の背景

近年、イスラム教徒(ムスリム)の人口はその他の主要な宗教に比べ急速に増加しており、2070年頃には、現在最も信者数が多いキリスト教に並ぶと予想されている。ムスリムの増加に伴い、課題の一つとしてあげられるのが「食」に関する課題である。イスラム教にはハラール制度という制度が存在する。ハラール制度とは「イスラム教の禁ずる豚肉やアルコール等の食材を含まない衛生的で安全な食品の基準を定めて、規準適合品に表示をさせ、不適合品の生産、流通、輸入等を制限する制度」とされている。その中で、マレーシアのハラール制度は宗教的に厳密で体系的とされており、マレーシア標準法を根拠とする「ハラール食品の製造、調整、取扱い及び貯蔵に関する一般ガイドライン」及び「ハラール認証を得るための手順書」から成り立っている。

ムスリムの増加によって、より一層我が国や欧米諸国等の急激なイスラム圏への食品市場の参入も増加すると考えられるが、市場へ参入するにあたり、ハラール認証機関からハラール認証を受ける必要がある。ハラール認証は各国内のハラール認証機関が監査し、一定の基準(原材料、加工、流通のプロセス全てにおいて禁忌食材と接触させない)を満たした食品のみに認証マークが付けられるが、この認証に向けての監査過程の中で食品のサンプリングが行われ、サンプリング試料はPCR分析にかけられ、禁忌食材の使用または混入されていないか検査される。しかし、認証取得後に、食肉偽装による豚肉使用や調理器具・機器の洗浄不足により豚由来成分が混入するといったリスク増加の可能性が考えられる。ムスリムは豚由来成分の非摂取を厳格に守っており、誤って摂取させた場合でも国際問題に成り兼ねない。そのため、極微量でも豚由来成分の使用または混入されていないか検査を行う必要がある。

現在、豚由来成分の検査方法としてはPCR法、ELISA法、イムノクロマト法等がある。PCR法は高感度に豚肉成分を検出することが可能であるが、特別な機器や技術が必要である。イムノクロマト法は安価で非常に短時間(10~15分)で判定できるが、極微量の豚肉成分を判定することは困難である。ELISA法は比較的操作简单で、多数のサンプルを同時に測定することが可能であるが、大きな課題点がある。それは、検出感度が低いという課題である。従来のELISA法は酵素標識抗体が固相に非特異的に吸着しやすいことから、非特異的に吸着した酵素標識抗体由来の酵素活性シグナルも合わせて測定してしまうため、バックグラウンドが高くなり検出感度を悪くしている。

2. 研究の目的

本研究ではイスラム教において禁忌食材とされている豚由来のタンパク質(血清アルブミン及びミオグロビン)に着目し、これらの抗原に対する超高感度酵素免疫測定法(ICT-EIA法)をそれぞれ開発し、2種類の抗原を同時に検出する超高感度同時酵素免疫測定法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

豚血清アルブミンや豚ミオグロビンを対象抗原とする場合に、課題となるのが他種の血清アルブミンやミオグロビンとの交差反応である。加工食品の中には、他種の食肉が混在する場合があるため、確実に対象抗原を検出する必要がある。また、ICT-EIA法は抗原に対して2点の抗体結合部位が必要である。このことから、豚由来の血清アルブミンやミオグロビン及び他種の血清アルブミンやミオグロビンのアミノ酸配列を比較し、比較的相同性の低い部位を2箇所選択し、その部位のペプチドを合成し、それを用いて抗体作成を試みた。

精製PSA-1抗体及び精製Mb-3抗体を用いた酵素(-D-ガラクトシダーゼ)標識抗体の調製後、以下の方法(直接ELISA法)で確認を行なった。タンパク質のジスルフィド結合を開裂し可溶性にするためにSDS及び亜硫酸ナトリウムが含まれた抽出液にて還元処理した豚血清アルブミン、牛血清アルブミン、鶏血清アルブミン、豚ミオグロビンや未処理の豚血清アルブミン、牛血清アルブミン、鶏血清アルブミン、豚ミオグロビンの各種溶液を10, 50, 100, 500, 1000ng/mLになるように希釈し、それぞれの希釈液に固相(ポリスチレンビーズ)を加えて、各種血清アルブミン不溶化固相及び豚ミオグロビン不溶化固相をそれぞれ作成した。これらの固相を酵素標識抗体溶液に加え、120分間反応させた。固相を洗浄して酵素標識抗体の大部分を除去した後、-D-ガラクトシダーゼ活性を0.2mM 4-Methylumbelliferyl -D-galactopyranoside(蛍光基質; 4MUG)を用いて30分で2時間インキュベーションし、酵素反応停止液を加え反応を停止後、蛍光分光光度計(JASCO FP-6300、日本分光)を用いて測定した。なお、励起波長360nm、蛍光波長450nmを用い、蛍光強度は 10^{-8} M 4MUを100として換算した。

ICT-EIA法の操作方法は、2,4-ジニトロフェニル(DNP)化・ビオチン化捕捉用抗体と抗原及び酵素(-D-ガラクトシダーゼ)標識抗体の3者を同時に4分で16~18時間反応させ、免疫複合体を形成させた。この反応液に抗DNP抗体不溶化固相ポリスチレンビーズ(第1固相)を加え、30分間反応させて免疫複合体を捕捉させた。第1固相を洗浄して酵素標識抗体の大部分を除去した後、過剰のDNP-Lys溶液で30分間反応させて免疫複合体のみを第1固相から溶出させ、溶出液にストレプトアビジン不溶化固相ポリスチレンビーズ(第2固相)を加え30分間反応させて転移させた。第2固相の洗浄後に、ビーズ上に転移させた-D-ガラクトシダーゼ活性を0.2mM 4-

Methylumbelliferyl -D-galactopyranoside (蛍光基質; 4MUG)を用いて 30℃ で 20 時間インキュベーションし、酵素反応停止液を加え反応を停止後、蛍光分光光度計 (JASCO FP-6300、日本分光)を用いて測定した。なお、励起波長 360nm、蛍光波長 450nm を用い、蛍光強度は 10^{-8} M 4MU を 100 として換算した。

この方法により、第 1 固相に非特異的に吸着した酵素標識抗体を残すため、バックグラウンドを一層完全に除去することができるようになり、高感度化が達成される。

4. 研究成果

(1) 豚血清アルブミンに対するポリクローナル抗体の作成

豚血清アルブミンのペプチドとして、2 箇所のアミノ酸配列を選択した (PSA-1: K³¹⁷-R³¹⁸-D³¹⁹-E³²⁰-L³²¹-P³²²-A³²³-D³²⁴-L³²⁵-N³²⁶)、(PSA-2: K⁵⁹⁷-F⁵⁹⁸-V⁵⁹⁹-I⁶⁰⁰-E⁶⁰¹-I⁶⁰²-R⁶⁰³-G⁶⁰⁴-I⁶⁰⁵-L⁶⁰⁶-A⁶⁰⁷)。これらのペプチドの N 末端にシステインを追加し、ペプチド合成及び抗体作成を外部委託した。PSA-1 に対しては、ウサギに免疫を行い、十分な抗体量を得られたことからアフィニティー精製を行い、最終的に精製 PSA-1 抗体を得た。PSA-2 に対しては、複数回にわたりウサギに免疫を行ったが、抗体を得ることができなかった。

(2) 豚ミオグロビンに対するポリクローナル抗体の作成

豚ミオグロビンのペプチドとして、3 箇所のアミノ酸配列を選択した (Mb-1: E¹¹⁰-A¹¹¹-I¹¹²-I¹¹³-Q¹¹⁴-V¹¹⁵-L¹¹⁶-Q¹¹⁷-S¹¹⁸-K¹¹⁹)、(Mb-2: E⁸⁴-A⁸⁵-E⁸⁶-L⁸⁷-T⁸⁸-P⁸⁹-L⁹⁰-A⁹¹-Q⁹²-S⁹³)、(Mb-3: D¹⁴²-M¹⁴³-A¹⁴⁴-A¹⁴⁵-K¹⁴⁶-Y¹⁴⁷-K¹⁴⁸-E¹⁴⁹-L¹⁵⁰)。これらのペプチドの N 末端にシステインを追加し、ペプチド合成及び抗体作成を外部委託した。Mb-3 に対しては、ウサギに免疫を行い、十分な抗体量を得られたことからアフィニティー精製を行い、最終的に精製 Mb-3 抗体を得た。Mb-1 及び Mb-2 に対しては、ウサギに免疫を行ったが、抗体を得ることができなかった。

(3) 豚血清アルブミンに対する精製抗体を用いた標識抗体の調製

精製 PSA-1 抗体を用いて捕捉用標識抗体および酵素標識抗体の調製を行った。精製 PSA-1 抗体をペプシン消化後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて F(ab')₂ 分画を得た。F(ab')₂ を還元し、半量を DNP 化・ビオチン化 BSA と反応させて捕捉用標識抗体を調製した。残りの半量は、-D-ガラクトシダーゼと反応させて酵素標識抗体を調製した。

(4) 豚ミオグロビンに対する精製抗体を用いた標識抗体の調製

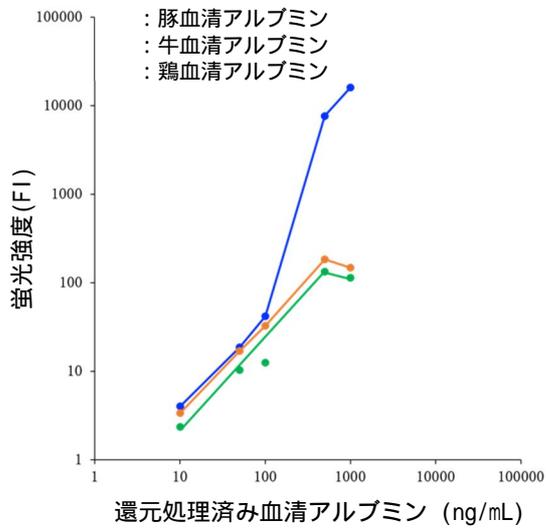
精製 Mb-3 抗体を用いて捕捉用標識抗体および酵素標識抗体の調製を行った。精製 Mb-3 抗体をペプシン消化後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて F(ab')₂ 分画を得た。F(ab')₂ を還元し、半量を DNP 化・ビオチン化 BSA と反応させて捕捉用標識抗体を調製した。残りの半量は、-D-ガラクトシダーゼと反応させて酵素標識抗体を調製した。

(5) 豚血清アルブミンに対する酵素標識抗体の確認

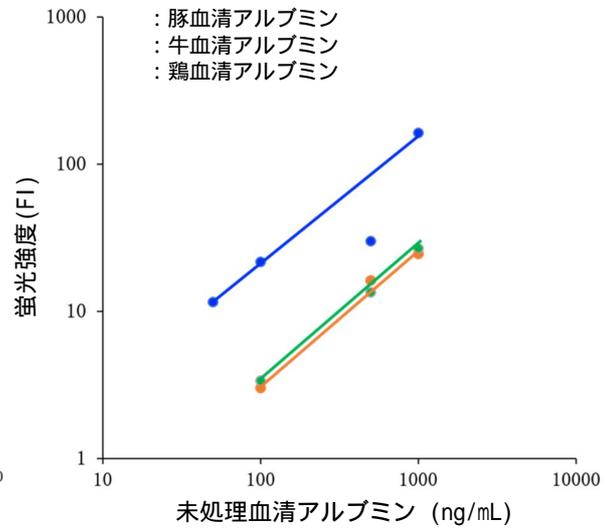
酵素標識抗体を用いて検量線及び特異性の確認を行なった。検量線では、還元処理した各種血清アルブミンでは、牛血清アルブミン、鶏血清アルブミンでは、濃度依存的に蛍光強度の上昇が見られたが、豚血清アルブミンでは、高濃度域で急激な蛍光強度の上昇が見られたため、濃度依存的な上昇は見られなかった (図 1)。また、未処理の各種血清アルブミンでは、それぞれ濃度依存的に蛍光強度が上昇する傾向が見られた (図 2)。今回は、固相に各種血清アルブミンを直接固相化させているので、固相化にムラが生じた可能性がある。血清アルブミン抗体を固相化させた固相を作成し、サンドイッチ ELISA 法で再度確認する必要がある。特異性では、還元処理を行なった牛血清アルブミン、鶏血清アルブミンにおいて高濃度域で若干の反応が見られた (図 1)。

(6) 豚ミオグロビンに対する酵素標識抗体の確認

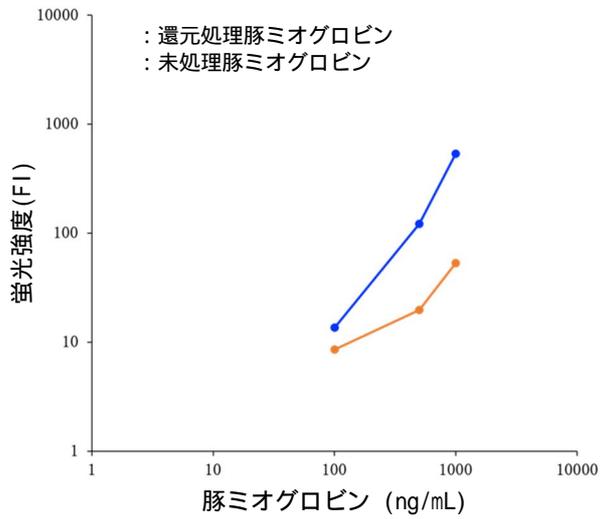
酵素標識抗体を用いて検量線の確認を行なった。還元処理した豚ミオグロビンは、濃度依存的に蛍光強度の上昇は見られなかった (図 3)。また、未処理の豚ミオグロビンにおいても、濃度依存的に蛍光強度の上昇は見られなかった (図 3)。上記と同様にミオグロビン抗体を固相化させた固相を作成し、サンドイッチ ELISA 法で再度確認する必要がある。



還元処理済み血清アルブミン (ng/mL)
 図 1. 還元処理を行なった各種血清アルブミンの検量線及び特異性



未処理血清アルブミン (ng/mL)
 図 2. 未処理の各種血清アルブミンの検量線及び特異性



豚ミオグロビン (ng/mL)
 図 3. 還元処理及び未処理の豚ミオグロビンの検量線

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------