

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4597172号
(P4597172)

(45) 発行日 平成22年12月15日(2010.12.15)

(24) 登録日 平成22年10月1日(2010.10.1)

(51) Int.Cl.		F I		
C O 7 K 16/18	(2006.01)	C O 7 K	16/18	Z N A
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	I O 2
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	D
G O 1 N 33/02	(2006.01)	G O 1 N	33/02	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

請求項の数 9 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2007-223224 (P2007-223224)
 (22) 出願日 平成19年8月29日(2007.8.29)
 (65) 公開番号 特開2009-57291 (P2009-57291A)
 (43) 公開日 平成21年3月19日(2009.3.19)
 審査請求日 平成19年8月29日(2007.8.29)

微生物の受託番号 FERM P-21336

(73) 特許権者 591105801
丸大食品株式会社
大阪府高槻市緑町2-1-3
 (73) 特許権者 507290755
成田 宏史
京都府京都市東山区今熊野北日吉町35番
地 京都女子大学家政学部内
 (74) 代理人 100065215
弁理士 三枝 英二
 (74) 代理人 100099988
弁理士 斎藤 健治
 (74) 代理人 100108084
弁理士 中野 睦子
 (74) 代理人 100115484
弁理士 林 雅仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ酸一字表記でmcaqykvlghgのアミノ酸配列からなるペプチドをカコ貝ヘモシアニン(KLH)とコンジュゲートして免疫原として用い、これをマウスへ免疫して得られる、ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体。

【請求項2】

受託番号FERM P-21336のハイブリドーマから製造される、ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体。

【請求項3】

請求項1に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項4】

受託番号FERM P-21336のハイブリドーマ。

【請求項5】

請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を用いた免疫学的測定により、ウシミオグロビンを検出する方法。

【請求項6】

請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を用いた免疫学的測定により、食品中のウシ由来成分を検出する方法。

【請求項7】

免疫学的測定が、E L I S A法又はイムノクロマト法による、請求項5又は6に記載の方

10

20

法。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とする、ウシミオグロビンを検出するためのキット。

【請求項 9】

請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とする、食品中のウシ由来成分を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウシミオグロビン部分ペプチドに対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、当該モノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を用いたウシミオグロビンの検出方法、食品中のウシ由来成分を検出する方法、並びにキットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、食品の安全性への関心が高まっている。特に食物アレルギーについては、重度の場合、致命的な障害をもたらす場合もあるため、食物アレルギー症状を有する消費者のみならず、食品製造業者・監督官庁にとっても、食品の安全性を保全する立場から極めて重要な課題である。現在までに、厚生労働省は、卵、乳、小麦、そば、落花生の5品目（以下「特定原材料」という。）を含む加工食品については、食品衛生法施行規則により、これらの特定原材料を含む旨の表示の義務を製造者に義務づけている。また、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、バナナ、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチンの20品目（以下「特定原材料に準ずるもの」という。）についても、食品衛生法施行規則により、これらを原材料として含む加工食品については、これらを原材料として含む旨を可能な限り表示するよう努めるよう推奨している（非特許文献1）。

【0003】

現在までに特定原材料5品目については、検査法が確立され、食品中に特定原材料を含むか否か、科学的に検証することができるようになっている（特許文献1、2、3、4）。しかし、特定原材料に準ずるもの20品目については十分な研究が行われておらず、科学的検証法の確立には至っていない。20品目のうち、特に牛肉においては、近年BSE問題が社会的な懸念となっていることもあり、簡便な検出方法が待ち望まれていた。

【特許文献1】特開2006-22078

【特許文献2】特開2003-294748

【特許文献3】特開2003-294738

【特許文献4】特開2003-294737

【非特許文献1】厚生労働省医薬局食品保健部企画課長・食品保健部監視安全課長通知、アレルギー物質を含む食品に関する表示について、食企発第2号 食監発第46号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、特に食品中の、牛肉に起因するウシ由来成分を簡便に検出することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

加工食品から特定の食品を検出するには、食品中の指標となるタンパク質に特異的に反応する抗体を用いた免疫学的手法が利用されている。本発明においても、先ず牛肉タンパク質の中から指標となるタンパク質を選択する必要があるが、牛肉の筋原線維タンパク質や筋形質タンパク質のアミノ酸配列は他の畜種との相同性が高く、免疫原として用いた場

10

20

30

40

50

合、多くの畜種との交差性がでる可能性が高い。食品として用いられる主な動物種としてウシ、ブタ、鶏等が挙げられるが、特にブタはウシと近縁の哺乳類であるため、交差性がでる可能性が比較的高く、当該交差性の問題を解決しないと特異的な検出は望めない。さらに、他の畜種との相同性が高いタンパク質を免疫原とした場合、免疫動物が抗原として認識せず、抗体作製ができない可能性もある。

【 0 0 0 6 】

そこで、本発明者らは、指標とするタンパク質には肉タンパク質の中でも畜種によるアミノ酸配列相同性が低いミオグロビンを選択した。ウシとマウスにおけるミオグロビンのアミノ酸配列相同性はやや低いものの、力価が上がりやすく、アジュバンドの変更や免疫回数など様々な改善を行った。その結果、ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体を作製できた。ウシミオグロビンに対するポリクローナル抗体は、ウサギに免疫して得られた抗血清より調製した。その反応性を検討したところ、いずれの抗体もウシミオグロビンを認識することを見いだした。また、さらに他の畜種、特に食肉加工において使用頻度の高い豚肉と鶏肉との交差反応性をなくすのを目的に、ブタとトリのミオグロビンとアミノ酸配列が異なる部位を検索し、アミノ酸1文字表記で、aevkhlaeshan（配列番号1）及びaqykvlgfghg（配列番号2）のアミノ酸配列を有するペプチドを見いだした。さらに、当該アミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体を作製し、これらの抗体が高い特異性及び反応性を有することを見いだした。また、上記のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を用いた免疫学的測定により牛肉タンパク質を特異的に検出できることを見だし、本発明を完成させた。

【 0 0 0 7 】

よって、本発明は、以下の項1～9の、例えば様々な加工条件の食品中のウシミオグロビンと、高い反応性を有するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、当該抗体を用いてタンパク質抽出溶液からウシミオグロビンを高感度かつ特異的に検出する方法、並びに該抗体を備えるキットを提供する。

項1．aevkhlaeshan（配列番号1）又はaqykvlgfghg（配列番号2）のアミノ酸配列を有するペプチドを用いて得られる、ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体。

項2．受託番号FERM P-21336のハイブリドーマから製造される、ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体。

項3．請求項1に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

項4．受託番号FERM P-21336のハイブリドーマ。

項5．aevkhlaeshan（配列番号1）又はaqykvlgfghg（配列番号2）のアミノ酸配列を有するペプチドを用いて得られる、ウシミオグロビンに対するポリクローナル抗体。

項6．請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体及び/又は請求項5に記載のポリクローナル抗体を用いた免疫学的測定により、ウシミオグロビンを検出する方法。

項7．請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体及び/又は請求項5に記載のポリクローナル抗体を用いた免疫学的測定により、食品中のウシ由来成分を検出する方法。

項8．免疫学的測定が、E L I S A法又はイムノクロマト法による、請求項6又は7に記載の方法。

項9．請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体及び/又は請求項5に記載のポリクローナル抗体を含むことを特徴とする、ウシミオグロビンを検出するためのキット。

項10．請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体及び/又は請求項5に記載のポリクローナル抗体を含むことを特徴とする、食品中のウシ由来成分を検出するためのキット。

【 0 0 0 8 】

本発明の抗体は、aevkhlaeshan（配列番号1）又はaqykvlgfghg（配列番号2）のアミノ酸配列を有するペプチドを用いて得られるモノクローナル抗体であり、好ましくは、受託番号FERM P-21336のハイブリドーマ（当該ハイブリドーマは、受託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許微生物寄託センターに、平成19年8月10日に受託された）が産生するモノクローナル抗体である。

【 0 0 0 9 】

本発明の抗体は、また、aevkhlaeshan（配列番号 1）又はaqykvlgfghg（配列番号 2）のアミノ酸配列を有するペプチドを用いて得られるポリクローナル抗体である。

【 0 0 1 0 】

これらの本発明の抗体は、ウシミオグロビンに対し、高い反応性及び特異性を有する。本発明の抗体は、また、加熱及び化学薬品等による変性処理を加えた抽出物に含まれるウシミオグロビンに対しても、高い反応性及び特異性を有する。

【 0 0 1 1 】

本発明のハイブリドーマは、aevkhlaeshan（配列番号 1）又はaqykvlgfghg（配列番号 2）のアミノ酸配列を有するペプチドを用いて得られるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであり、好ましくは受託番号FERM_P-21336のハイブリドーマである。

10

【 0 0 1 2 】

本発明の抗体及びハイブリドーマは、以下のようにして製造される。

【 0 0 1 3 】

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、aevkhlaeshan（配列番号 1）又はaqykvlgfghg（配列番号 2）のアミノ酸配列を有するペプチドを、動物に免疫して得られたハイブリドーマから産生され、好ましくは、受託番号FERM_P-21336のハイブリドーマから産生される。

【 0 0 1 4 】

また、本発明のポリクローナル抗体は、例えば、aevkhlaeshan（配列番号 1）又はaqykvlgfghg（配列番号 2）のアミノ酸配列を有するペプチドを動物に免疫し、得られた抗血清より調製される。

20

【 0 0 1 5 】

また、本発明のハイブリドーマは、例えば、aevkhlaeshan（配列番号 1）又はaqykvlgfghg（配列番号 2）のアミノ酸配列を有するペプチドを、動物に免疫して得られる、上記本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであり、特に好ましくは受託番号FERM_P-21336のハイブリドーマである。

【 0 0 1 6 】

免疫に用いられるペプチドは、化学的合成法、微生物等の生物を工場として用いる遺伝子組み換え法、又は無細胞合成系を用いた合成法などにより得られるが、特に化学的合成法が好ましい。

30

【 0 0 1 7 】

ペプチドはそのままでは免疫応答を起こし得ないほどに分子量が小さいので、適当なタンパク質にコンジュゲートされ、免疫原として使用される。使用されるコンジュゲートとしては、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、カコ貝ヘモシアニン（K L H）が挙げられるが、特にカコ貝ヘモシアニン（K L H）が好ましい。

【 0 0 1 8 】

免疫に用いられる動物としては、例えば哺乳動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、サル等が挙げられるが、マウス又はウサギが特に好ましい。

【 0 0 1 9 】

40

本発明のモノクローナル抗体は、例えば配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列を有するペプチドに K L H をコンジュゲートしたものを免疫原としてハイブリドーマを作製した後、ウシミオグロビン、さらに好ましくは変性状態のウシミオグロビンに反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、これが産生するモノクローナル抗体を精製することで得られる。免疫の惹起は、通常 1ng ~ 10mg の量の免疫原を 10 ~ 14 日の日数を開けて 1 ~ 5 回に分けた操作で行うことができる。十分な免疫後、抗体産生能を有する器官（脾臓やリンパ節）を動物から無菌的に摘出し、細胞融合時の親株とする。なお、摘出する器官としては、脾臓が最も好ましい。細胞融合のパートナーとしては、ミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞には、マウス由来、ラット由来、ヒト由来等があるが、マウス由来が好ましい。細胞融合には、ポリエチレングリコールを用いる方法、細胞電気融合法等が挙げられる

50

が、ポリエチレングリコールを用いる方法が簡便で好ましい。細胞融合しなかった脾臓細胞やミエローム細胞とハイブリドーマとの選択は、例えばHATサプリメント（ヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン）を添加した血清培地で培養することで行うことができる。

【0020】

ウシミオグロビンに対する抗体を産生するハイブリドーマの選択は、前述の培養上清を採取し、ウシミオグロビン、さらに好ましくは変性状態のウシミオグロビン、を固相化したEIAプレートでの直接ELISAが好ましい。直接ELISAの結果、強い発色が見られたウェルを選択し、そのウェルの細胞をクローニングに供する。その強く発色した培養上清に対応するハイブリドーマを、ウシミオグロビン、さらに好ましくは変性状態のウシミオグロビンに反応する抗体を産生するハイブリドーマとして選択する。さらに、抗体産生ハイブリドーマを選別し単一化する作業（クローニング）が必要であり、限界希釈法、フィブリンゲル法、セルソーターを用いる方法等があるが限界希釈法が簡便で好ましい。これにより、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを獲得することができる。

10

【0021】

上記方法により得られたハイブリドーマを培養することで、培養上清中にモノクローナル抗体を得ることができる。さらに、大量のモノクローナル抗体を得るには、*in vivo*および*in vitro*による方法があるが、*in vivo*による方法、特にマウス腹水で得る方法が好ましい。培養上清やマウス腹水からのモノクローナル抗体の精製は、硫酸アンモニウム塩析法、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー等により行われるが、精製純度や簡便性を考慮するとアフィニティークロマトグラフィーが最も好ましい。さらに高純度のモノクローナル抗体を得る必要がある場合には、アフィニティークロマトグラフィーの後に最終精製としてゲルろ過クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィー等を行うのが好ましい。

20

【0022】

また、本発明のモノクローナル抗体は、例えばNishinaka, S. et al. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1989;89(4):416-9, Nishinaka, S. et al. *J Vet Med Sci.* 1996 Nov;58(11):1053-6等に記載の方法に従って、IgYを産生する鶏等の鳥類を用いて作製することもできる。

【0023】

本発明のポリクローナル抗体は、例えば配列番号1又は2のアミノ酸配列を有するペプチドをKLHにコンジュゲートしたものを免疫原とし、これらをウサギに免疫して、得られた抗血清より、それぞれのポリクローナル抗体を精製することで得られる。抗血清からの精製は、上記モノクローナル抗体の精製と同様の手法で行うことができる。

30

【0024】

また、本発明のポリクローナル抗体は、例えば特許文献（特開2002-30100）に記載の方法に従って、IgYを産生するアヒル等の鳥類を用いて作製することもできる。

【0025】

本発明の方法は、本発明のモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を使用した免疫学的測定により、ウシミオグロビンを検出する方法に係るものである。免疫学的測定方法としては、ウエスタンブロット法（WB）、酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、化学発光免疫測定法（CLIA）、蛍光免疫測定法（FIA）等、検出系に西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリ性ホスファターゼ（ALP）等の酵素、ヨウ素125等の放射性同位元素（RI）、アクリジニウム化合物等の発光物質あるいはフルオレセインイソチオシアネート等の蛍光物質などを標識した抗体または抗原を用いる測定法等があるが、これらに限定されるものではない。本発明の方法では、特に酵素免疫測定法（EIA）の一種である酵素免疫定量法（ELISA）が好ましく用いられ、特にELISAがより好適である。また、簡便性に優れるイムノクロマト法も好適である。

40

50

【0026】

本発明のウシミオグロピンを検出する方法は、本発明の抗体と、ウシ由来成分を含む可能性のある組成物を使用する。組成物としては、例えば食品（特に加工食品）、飼料、実験用試薬、化粧品、医薬品、医薬部外品、医療用具等が挙げられる。ウシミオグロピンは、牛肉中に豊富に含まれることから、本発明の検出方法により、例えば食品（特に加工食品）、飼料、実験用試薬、化粧品、医薬品、医薬部外品、医療用具等に含まれる、牛肉に起因するウシ由来成分を検出することも可能である。

【0027】

本発明の方法は、1 ng/ml以上の濃度のウシミオグロピンを検出することが可能である。特に、1 ~ 200 ng/ml、好ましくは1 ~ 100 ng/mlの濃度のウシミオグロピンを検出することが可能である。

10

【0028】

なお、本明細書において、「ウシミオグロピンを検出」とは、「ウシミオグロピンの存在を検出」という意味であり、ウシミオグロピンの部分ペプチドを検出することで、ウシミオグロピンの存在を検出するという意味を含む。

【0029】

一般的に食品からのタンパク質抽出には、水、リン酸緩衝生理食塩水、アルコールなどが用いられる。しかし食品中のタンパク質は様々な加工工程を経ることで変性するため、上記溶媒だけではタンパク質抽出が困難となる場合がある。食品からのタンパク質の抽出効率改善は、上記の溶媒に尿素、SDSなどの界面活性剤、塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤やメルカプトエタノール、ジチオスレイトールなどの還元剤を添加することで達成することができる。そのため、本発明のウシミオグロピンを検出する方法に用いられる、食品からのタンパク質抽出は、上述の変性剤と還元剤（好ましくはSDSとメルカプトエタノール）を添加して12時間以上振盪抽出することにより行われ得る。この抽出処理により、加工条件が異なる食品中のウシミオグロピンは抽出溶液の中で変性状態になり、本発明の抗体を用いたELISAやウエスタンブロット法等の免疫学的手法により食品中のウシミオグロピンを検出することができる。

20

【0030】

本発明の抗体を備えた、ウシミオグロピンを検出するためのキットも、本発明の範囲に含まれる。当該キットは、本発明のモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を備え、好ましくは使用される免疫学的測定法に必要な試薬が必要量備えられたものである。このようなキットとしては、例えば、ELISA法を用いてウシミオグロピン検出を行うためのキットであって、本発明のモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体が、固相吸着用抗体及び/又は検出用標識化抗体として用いられ、当該検出用標識化抗体はHRPにより標識され、その他のELISA法に必要となる試薬（例えばマイクロプレート、抽出溶液、緩衝液等）が備えられたキットが挙げられる。あるいは、毛細管現象により、抗体がメンブレン上を移動する際、検体中の抗原と標識抗体及び補足抗体の3者により抗原抗体反応複合体が形成され、当該標識抗体の標識を確認する測定方法であるイムノクロマト法を用いて、ウシミオグロピン検出を行うためのキットであって、本発明のモノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体が、補足抗体及び/又は検出用標識抗体として用いられ、標識物質としては主には金コロイドが利用される。その他のイムノクロマト法に必要となる試薬（例えばイムノクロマト用テストプレート、抽出溶液、緩衝液等）が備えられたキットが挙げられる。

30

40

【0031】

また、ウシミオグロピンは、牛肉中に豊富に含まれることから、当該キットにより、例えば食品（特に加工食品）、飼料、実験用試薬、化粧品、医薬品、医薬部外品、医療用具等に含まれる、牛肉に起因するウシ由来成分を検出することも可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

以下、本発明を実施例により更に詳しく説明するが、本実施例は本発明を何ら限定する

50

ものではない。なお、以下aevkhlaeshan (配列番号1) のアミノ酸配列を有するペプチドを「ペプチドA」と、また、aqykvlgfhg (配列番号2) のアミノ酸配列を有するペプチドを「ペプチドB」と表記する。

【0033】

実施例1：抗ペプチド抗体の作製

ウシミオグロビンから他の畜種とアミノ酸残基の異なる部分配列を2部位 (ペプチドA、ペプチドB) 選択し (図1)、化学合成法により、ペプチドAのN末端にさらにシステインが付加されたペプチド (アミノ酸一文字表記でcaevkhlaeshanのアミノ酸配列を有するペプチド)、及び、ペプチドBのN末端にさらにメチオニン - システインが付加されたペプチド (アミノ酸一文字表記でmcaqykvlgfhgのアミノ酸配列を有するペプチド) の、2種類 10
の合成ペプチドを作製した。ペプチドA及びペプチドBのN末端に当該アミノ酸を付加したのは、これらのペプチドをカコ貝ヘモシアニン (KLH) にコンジュゲートさせるために、ペプチドにシステイン残基を導入する必要があるためである。モノクローナル抗体の作製においては、これらのペプチドをそれぞれカコ貝ヘモシアニン (KLH) にコンジュゲートしたものを免疫原とし、それぞれの免疫原をBalb/cマウス (雌、8週齢) に免疫した。等量のプロイント完全アジュバントと混和して免疫用エマルジョンを作製し、初回免疫では、このエマルジョンをマウスあたりKLHが50 µgとなるように腹腔内投与した。二次免疫では、初回免疫から2週間後にプロイント不完全アジュバントと混和したエマルジョンをマウスあたりKLHが50 µgとなるように腹腔内投与した。二次免疫から10日目に抗体力価を測定し、十分な抗体力価が得られたマウスについては、二次免疫から2週間後にマウス 20
あたりKLHが50 µgとなるように尾静脈に投与し、最終免疫を行った。

【0034】

最終免疫から2日後に脾臓を無菌的に摘出して脾臓細胞を得、培養していたミエローマ細胞と50%ポリエチレングリコール条件下で細胞融合を行い、ハイブリドーマを作製した。細胞融合後、HATサプリメントを添加した血清培地で約2週間培養してハイブリドーマを選択した後、SDSと加熱処理により変性させたウシミオグロビンを固相化したEIAプレートを用いて培養上清の抗体力価測定を行い、変性ウシミオグロビンに反応する抗体を産生するハイブリドーマの存在するウェルを選択した。

【0035】

変性ウシミオグロビンと反応する抗体を産生するハイブリドーマが存在するウェルの細胞数をカウントした後、クローニング用試薬 (BM condimed H1) を10%添加した血清培地で限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行い、この作業を2回繰り返すことで、変性ウシミオグロビンに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをいくつか得た。最終的に、腹水からアフィニティーク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を精製した。一方、ポリクローナル抗体の作製は、KLHにコンジュゲートしたペプチドA、もしくはBを免疫原として、それぞれの免疫原をウサギに免疫し、得られた抗血清よりそれぞれのポリクローナル抗体をアフィニティークラムで精製することで行った。

【0036】

実施例2：ウシミオグロビンの精製

ウシモモ肉を材料としてミオグロビンの精製を行った。ウシ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。100gを量りとり、2倍量の蒸留水を加えてよく混合し、30分間氷中で攪拌した。4,500 × g、15分間、4 で遠心した後、上清をろ過し、ろ液を肉抽出液とした。肉抽出液に硫酸アンモニウム (硫酸) を濃度が90%となるように加え、1時間氷中で攪拌した。20,000 × g、15分間、4 で遠心した後、上清をろ過し、ろ液のpHを6.85に調整した後、硫酸濃度が95%となるように硫酸を加え、1時間氷中で攪拌した。20,000 × g、15分間、4 で遠心した後、上清を取り除き、沈殿に蒸留水を添加して溶解し、これを粗ミオグロビン画分とした。粗ミオグロビン画分を20mM 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QAEカラム (Toyopearl QAE 550M) にインジェクトし、A液からB液 (20mM Tris-HCl、0.5M NaCl (pH8.3)) のグラジエントをかけ、イオ 50

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後、N末端のアミノ酸配列からウシミオグロビンと同定した。

【0037】

参考例1：変性ウシミオグロビン抗体の作製

サンドイッチELISAでは固相化抗体と標識化抗体でそれぞれエピトープ部分の異なる抗体が必要となる。食品によって程度は異なるが、加工工程を経た食品中のタンパク質は変性しているため、変性タンパク質に反応する抗体が望ましい。実施例2にて精製したウシミオグロビン1mg/mlにSDSを1%となるように加えた後、95℃、10分間加熱処理を行なったものを変性ウシミオグロビンとした。これを免疫原とし、モノクローナル抗体を得るためにBalb/cマウスに免疫した。等量のフロイント完全アジュバントと混和して免疫用エマルジョンを作製し、初回免疫では、このエマルジョンをマウスあたり変性ウシミオグロビンが50μgとなるように腹腔内投与した。二次免疫では、初回免疫から2週間後にフロイント不完全アジュバントと混和したエマルジョンをマウスあたり変性ウシミオグロビンが50μgとなるように腹腔内投与した。二次免疫から10日目に抗体力価を測定し、十分な抗体力価が得られたマウスについては、二次免疫から2週間後にマウスあたり変性ウシミオグロビンが50μgとなるように尾静脈に投与し、最終免疫を行った。

10

【0038】

最終免疫から2日後に脾臓を無菌的に摘出して脾臓細胞を得、培養していたミエローマ細胞と50%ポリエチレングリコール条件下で細胞融合を行い、ハイブリドーマを作製した。細胞融合後、HATサプリメントを添加した血清培地で約2週間培養してハイブリドーマを選択した後、変性ウシミオグロビンを固相化したEIAプレートを用いて培養上清の抗体力価測定を行い、変性ウシミオグロビンに反応する抗体を産生するハイブリドーマの存在するウェルを選択した。変性ウシミオグロビンと反応する抗体を産生するハイブリドーマが存在するウェルの細胞数をカウントした後、クローニング用試薬(BM condensed H1)を10%添加した血清培地で限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行い、この作業を2回繰り返すことで、変性ウシミオグロビンに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをいくつか得た。

20

【0039】

最終的に、腹水からアフィニティーカラムを用いて抗変性ウシミオグロビンモノクローナル抗体を精製した。一方、ポリクローナル抗体の作製については、変性ウシミオグロビンをウサギに免疫し、得られた抗血清よりポリクローナル抗体をアフィニティーカラムで精製した。

30

【0040】

実施例3：ウシミオグロビンの免疫学的測定による検出

ウエスタンブロット

得られた抗ペプチド抗体の特異性を評価するために、ウエスタンブロットを行なった。ウシモモ肉、ブタモモ肉、トリモモ肉の肉抽出タンパク質は次のように調製した。すなわち、ウシモモ肉、ブタモモ肉およびトリモモ肉を、それぞれ脂肪を取り除き、ミンチにして十分に混合した。100gを量りとり、2倍量の蒸留水を加えてホモジナイズした後、凍結乾燥することでそれぞれの肉乾燥粉末を得た。それぞれの肉乾燥粉末400mgにタンパク質抽出溶液(PBS(pH7.2)、0.5%SDS、2%メルカプトエタノール、)20mlを加えて12時間以上振盪抽出し、20,000×g、15分遠心した上清をそれぞれの肉抽出タンパク質とした。また、ブタミオグロビン、トリミオグロビンは前記ウシミオグロビンの精製法と同様にして精製した。タンパク質濃度測定後、肉抽出タンパク質は1mg/ml、各種ミオグロビンは100μg/mlとなるように調製し、サンプルバッファー(0.125M Tris-HCl(pH6.8)、10%メルカプトエタノール、4%SDS、10%シュークロース、0.004%Bromophenol Blue)と等量で混合し、95℃、10分間加熱処理したものを泳動用サンプルとした。

40

【0041】

SDS-PAGEはLaemmliの方法(Laemmli UK, Nature, 1970;227:332-337)に従い、アクリルアミド濃度15%の分離ゲルと4.5%の濃縮ゲルを用いて行った。それぞれの肉抽出タン

50

パク質を10 μ g/レーン、およびそれぞれのミオグロビンを1 μ g/レーンとなるようにゲルにアプライした。SDS-PAGE電気泳動した分離ゲルから、セミドライ式のブロッティング装置を用いタンパク質をPVDF膜に転写した。タンパク質を転写した膜は、Tween PBS (0.137M NaCl、2.7mM KCl、8.1mM Na₂HPO₄ · 12H₂O、1.5mM KH₂PO₄、0.1% Tween) に浸し、4で一晚静置してブロッキングを行った。ブロッキング後、適当に希釈した抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体、抗ペプチドAポリクローナル抗体、抗ペプチドBモノクローナル抗体を1時間振盪しながら反応させた。Tween PBSで洗浄後、二次抗体として適当に希釈したALP標識抗マウスIgG、もしくはALP標識抗ウサギIgGを用い、1時間振盪しながら反応させた。Tween PBSで洗浄後、0.1M Tris-HCl(pH9.5)で15分間平衡化した後、Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV (Vecter社製、BCIP/NBT基質)を用いて発色させた。

10

【0042】

これらの泳動像(CBB染色)を図2-1に、抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体、抗ペプチドAポリクローナル抗体、抗ペプチドBモノクローナル抗体を1次抗体に用いたウエスタンブロットの結果をそれぞれ図2-2、2-3、2-4に示す。抗ペプチドAポリクローナル抗体と抗ペプチドBモノクローナル抗体は、ウシミオグロビンにだけ反応し、ブタとトリのミオグロビンとは交差反応を示さなかった。一方、抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体は、トリミオグロビンとは反応しなかったが、ブタミオグロビンとの交差反応が認められた。すなわち、ウシミオグロビンに対するポリクローナル抗体に比べ、本発明の抗体はより高い特異性を有することが証明された。

20

【0043】

サンドイッチELISA

得られた抗体をそれぞれプレートに固相化、およびHRP酵素標識化を行い、変性ウシミオグロビンを標準タンパク質としたサンドイッチELISAの組み合わせを調査した。さらに、ブタとトリのミオグロビンとの交差性を調査した。固相化抗体は、0.1Mリン酸ナトリウム(pH7.2)で5 μ g/mlに調製して、EIAプレートに100 μ l分注後、4で一晚静置し、プレートに吸着させた。その後、ブロッキング溶液を260 μ l加え、37で90分間静置した。洗浄後、前述の条件で変性させたウシ、ブタ、トリのミオグロビンを200ng/mlから2倍希釈して作製した変性ミオグロビンの標準溶液を100 μ lずつ各ウェルに加えた後、室温で1時間静置した。洗浄後、二次抗体として適当に希釈した標識化抗体を100 μ l加えて、室温で1時間静置し、固相化抗体と反応した変性ミオグロビンに反応させた。洗浄後、TMB酵素基質を100 μ l添加し、室温で10分間反応させた後、1M硫酸を50 μ l添加して酵素反応を停止させ、450nmの吸光度を測定した。

30

【0044】

固相化抗体に抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体、標識化抗体に抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体を用いた組み合わせでは、約10ng/mlまでの検量線を引くことができた。ただ、ブタミオグロビンとの交差反応が若干みられた。一般的に、固相化抗体に用いる抗体は特異性が高いものを用いることで交差反応を小さくすることができる。そこで、固相化抗体には抗ペプチド抗体を用いることとし、固相化抗体に抗ペプチドAポリクローナル抗体、標識化抗体に抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体を用いた組み合わせを検討したところ、約5ng/mlまでの検量線を引くことができ、またブタとトリのミオグロビンとの交差反応もみられなかった(図3)。また、固相化抗体及び標識化抗体双方に本発明のモノクローナル抗体を使用することで、さらに感度を上げることが可能であり、約1ng/ml以上の感度でウシミオグロビンを検出することが可能であると考えられる。

40

以上のように、本発明の抗体を用いた免疫学的測定により、特異的かつ高感度にウシミオグロビンを検出可能であることが証明された。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】図1は、各動物のミオグロビンアミノ酸配列のマルチプルアライメントを示す。

【図2】図2は、各動物肉抽出画分及びミオグロビンのSDS-PAGE像(CBB染色

50

)、並びに、抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体、抗ペプチドAポリクローナル抗体及び抗ペプチドBモノクローナル抗体を1次抗体に用いたウエスタンブロットの結果の像を示す。

【図3】図3は、固相化抗体に抗ペプチドAポリクローナル抗体、標識化抗体に抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAの結果を示す。

【図1】

各動物のミオグロビンアミノ酸配列のマルチプルアライメント

ウシ	1	mglsdgewqlvlnawgkveadvaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlkteamkase
ブタ	1	mglsdgewqlvlnvngkveadvaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlksedemkase
ウマ	1	glsdgewqqvlnvngkveadiaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlkteamkase
ヒト	1	mglsdgewqlvlnvngkveadiaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlksedemkase
兎	1	glsdaewqlvlnvngkveadiaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlksedemkase
鼠	1	mglsdgewqlvlnvngkveadiaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlksedemkase
鶏	1	glsdqewqqvltiwigkveadiaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlksedemkase
カモ	1	glsdqewqqvltiwigkveadiaghgqevlir lftghpetlekfdkfkhlksedemkase
鰯	1	adfdavlkcgwgpveadytmgglv lrlfkehpetaqkifpkfagiagadiagnaaisahg

(ペプチドA)

ウシ	61	d k k h g n t v l t a g g i l k k g h e a e v k h a e s h a n k h k i p v k y l e f i s d i i h l h a k h
ブタ	61	d k k h g n t v l t a g g i l k k g h e a e i t p a a s h a t k h k i p v k y l e f i s e i i q v l s k h
ウマ	61	d k k h g t v l t a g g i l k k g h e a e i k p a a s h a t k h k i p v k y l e f i s d i i h l h s h
ヒト	61	d k k h g t v l t a g g i l k k g h e a e i k p a a s h a t k h k i p v k y l e f i s e i i q v l s k h
兎	61	d k k h g n t v l t a g g i l k k g h e a e i k p a a s h a t k h k i p v k y l e f i s e i i j h l h s h
鼠	61	d k k h g t v l t a g g i l k k g h e a e i q p a a s h a t k h k i p v k y l e f i s e i i j e v l k r h
鶏	61	d k k h g t v l t g k i l k q k g h e a e i k p a a t h a t k h k i p v k y l e f i s e i i k v i a e k h
カモ	61	d k k h g t v l t g k i l k q k g h e a e i k p a a t h a t k h k i p v k y l e f i s e i i k v i a e k h
鰯	61	a t v l k l g e i l k a g s h a i i k p a a s h a t k h k i p i n n f k i s e i v l k v m h e k a g i d a g g

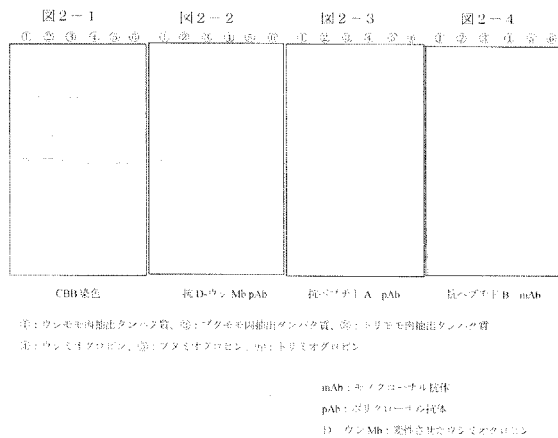
(ペプチドB)

ウシ	121	psdfgadaqaamska e l f r n d a a q y k v l g f h g (154)
ブタ	121	pgdfgadaqaamska e l f r n d a a y k e l g f g (154) 88.9%
ウマ	121	pgdfgadaqaamtka e l f r n d i a a y k e l g f g (153) 88.9%
ヒト	121	pgdfgadaqaamnka e l f r k d a s n y k e l g f g (154) 85.0%
兎	121	psdfgadaqaamska e l f r n i a a y k e l g f g (153) 86.9%
鼠	121	sgdfgadaqaamska e l f r n i a a y k e l g f g (154) 79.2%
鶏	121	aadfgadsqaamkka e l f r n d m a s k y k e l g f g (153) 73.8%
カモ	121	sadfgadsqaamkka e l f r n d m a s k y k e l g f g (153) 72.5%
鰯	121	q a l r n v m i i a d l e a n y k e l g f g (146)

NCBI code ウシ: P02192、ブタ: P02189、ウマ: P02185、ヒト: P02144、兎: P02170、鼠: NP_038621、鶏: P02197、カモ: Q7L2M2、鰯: P02205

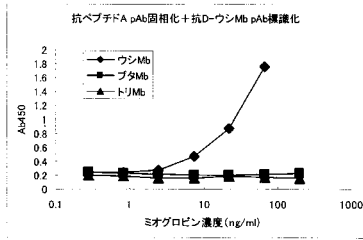
【図2】

本発明の抗体と肉抽出タンパク質及びミオグロビンの反応性の検討 (ウエスタンブロット法)



【 図 3 】

サンドイッチ ELISA における検量線と交差反応性



固相化抗体：抗ペプチド A ポリクローナル抗体
標識化抗体：抗変性ウシミオグロビンポリクローナル抗体

【 配列表 】

0004597172000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 琴浦 聡
大阪府高槻市緑町2-1-3 丸大食品株式会社中央研究所内
- (72)発明者 三明 清隆
大阪府高槻市緑町2-1-3 丸大食品株式会社中央研究所内
- (72)発明者 杉山 雅昭
大阪府高槻市緑町2-1-3 丸大食品株式会社中央研究所内
- (72)発明者 成田 宏史
京都府京都市東山区今熊野北日吉町3-5番地 京都女子大学家政学部内

審査官 名和 大輔

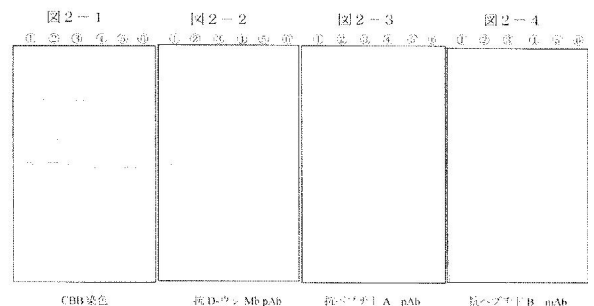
- (56)参考文献 特開平11-140098(JP,A)
特表2003-503040(JP,A)
Meat Sci.,1996,42(3),p.239-49
Mol Immunol.,1986,23(12),p.1289-99
Mol Immunol.,1986,23(6),p.603-10
- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
C07K 16/18
CAplus/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	针对牛肌红蛋白部分肽的抗体，使用所述抗体和测试试剂盒的测试方法		
公开(公告)号	JP4597172B2	公开(公告)日	2010-12-15
申请号	JP2007223224	申请日	2007-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	丸大食品株式会社 成田弘		
申请(专利权)人(译)	丸大食品株式会社 成田弘		
当前申请(专利权)人(译)	丸大食品株式会社 成田弘		
[标]发明人	琴浦 聡 三明清隆 杉山雅昭 成田宏史		
发明人	琴浦 聡 三明清隆 杉山 雅昭 成田 宏史		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/02 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N5/00.102 G01N33/53.D G01N33/02 C12P21/08 C12N5/00.B C12N5/16		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BD39 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	斋藤健治 睦野 林正人		
其他公开文献	JP2009057291A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(经修改) 要解决的问题：提供一种方便地检测可归因于食品中的牛肉的牛原产成分的方法。单克隆抗体和对牛肌红蛋白具有高反应性和特异性的多克隆抗体，使用产生单克隆抗体的杂交瘤和抗体从蛋白质提取液中高灵敏度和特异地检测牛肌红蛋白的方法，以及包含所述抗体的试剂盒。上述方法通过ELISA或免疫层析法进行免疫测定。点域

本発明の抗体と肉抽出タンパク質及びミオグロビンの反応性の検討
(ウエスタンブロット法)



①：ウシモノ肉抽出タンパク質、②：ブタモノ肉抽出タンパク質、③：ヒトモノ肉抽出タンパク質
④：ウシミオグロビン、⑤：ブタミオグロビン、⑥：ヒトミオグロビン

mAb：モノクローナル抗体
pAb：ポリクローナル抗体
D：ウシMb；要検査体のウシミオグロビン