

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4280225号
(P4280225)

(45) 発行日 平成21年6月17日(2009.6.17)

(24) 登録日 平成21年3月19日(2009.3.19)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
CO 7 K 16/18	(2006.01)	CO 7 K 16/18	

請求項の数 23 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2004-327558 (P2004-327558)	(73) 特許権者	000006116
(22) 出願日	平成16年11月11日(2004.11.11)		森永製菓株式会社
(65) 公開番号	特開2005-164583 (P2005-164583A)		東京都港区芝5丁目33番1号
(43) 公開日	平成17年6月23日(2005.6.23)	(74) 代理人	100062007
審査請求日	平成19年3月8日(2007.3.8)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	特願2003-382067 (P2003-382067)	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成15年11月12日(2003.11.12)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		(73) 特許権者	504001978
			独立行政法人農林水産消費安全技術センター
			埼玉県さいたま市中央区新都心2-1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被加熱処理動物性組織由来原料検出試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中に存在する、少なくとも100 を超える温度で加熱処理された動物性組織由来の原料の存在を検出するための試薬であって、該試薬は、少なくとも100 を超える温度で加熱処理した血清アルブミンに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントを含むことを特徴とする、前記試薬。

【請求項2】

前記動物性組織由来の原料が、120 以上の温度で加熱処理された原料である、請求項1に記載の試薬。

【請求項3】

前記動物性組織由来の原料が、130 以上の温度で加熱処理された原料である、請求項1に記載の試薬。

【請求項4】

前記動物性組織由来の原料が、加熱処理と同時に加圧処理された原料である、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の試薬。

【請求項5】

前記動物性組織由来の原料が、肉骨粉である、請求項4に記載の試薬。

【請求項6】

前記試料が缶詰食品である、請求項1乃至4のいずれか一項に記載の試薬。

【請求項7】

10

20

前記試料が家畜用飼料である、請求項 5 に記載の試薬。

【請求項 8】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントが、120 以上の温度で加熱処理した血清アルブミンに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の試薬。

【請求項 9】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントが、更に加圧処理した血清アルブミンに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 8 に記載の試薬。

【請求項 10】

前記試薬がキットの形態である、請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の試薬。

10

【請求項 11】

試料中に存在する、少なくとも 100 を超える温度で加熱処理された動物性組織由来の原料の存在を検出するための方法であって、該方法は、

(1) 少なくとも 100 を超える温度で加熱処理した血清アルブミンに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントと前記試料を接触させて、該試料中の熱変性血清アルブミンと該抗体またはその抗原結合性フラグメントとの特異的複合体を形成し、

(2) 形成された前記複合体の存在および/またはその存在量を同定することを含む、前記方法。

【請求項 12】

前記動物性組織由来の原料が、120 以上の温度で加熱処理された原料である、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記動物性組織由来の原料が、130 以上の温度で加熱処理された原料である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記動物性組織由来の原料が、加熱処理と同時に加圧処理された原料である、請求項 11 乃至 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記動物性組織由来の原料が、肉骨粉である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記試料が缶詰食品である、請求項 11 乃至 14 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記試料が家畜用飼料である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントが、120 以上の温度で加熱処理した血清アルブミンに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 11 乃至 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントが、更に加圧処理した血清アルブミンに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 20】

少なくとも 100 を超える温度で加熱処理した血清アルブミンに対する抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 21】

更に加圧処理した血清アルブミンに対する請求項 20 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 22】

前記加熱処理および加圧処理が、121 で 30 分間のオートクレーブ処理である、請求項 21 に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 23】

50

ポリクローナルである、請求項 20 乃至 22 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の加熱処理または加熱加圧処理された動物性組織由来原料の検出に関する。

【背景技術】

【0002】

牛、豚、鶏に代表される動物の組織由来のタンパク質等は、食品や家畜飼料における重要な栄養源として広く用いられている。近年、食品の安全性に対する消費者の関心が急速に高まる中で、これら動物性組織由来原料の食品への混入を厳重に監視する必要が生じてきた。なかでも、ウシ海綿状脳症（BSE）のヒトに対する感染のリスクは重大な問題であり、EU 科学運営委員会は、「食物経路によるウシ海綿状脳症（BSE）へのヒトの曝露リスク（HER）に関する科学運営委員会の意見」（1999年12月10日採択）と題する報告の中で、「BSEと変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の関連を示す疫学的・病理学的・分子生物学的な確たる証拠を得ている。」とし、特に、BSE 感染牛からの肉骨粉の家畜飼料への使用について言及している。つまり、大半の可食部分を取り去った後の骨や、それに付着している少量の肉、筋等については、133 以上の高温での加熱加圧で処理し、肉骨粉とした後に家畜飼料等に再利用されてきており、一方で、BSE 臨床徴候を発現した牛（潜伏期間の終わりの段階で）の BSE 感染負荷のほとんどは、主に中枢神経系組織（脳、脊髄など）にあることが認められることから、当該肉骨粉の家畜飼料への使用が重大な関心を集めていたのである。これを受けて、EU では、EU 農相理事会特別会合において、域内では、2001年1月1日からの肉骨粉の家畜飼料への使用禁止が合意されている。また、我が国でも、BSE の国内における確認を受けて、平成13年10月からは肉骨粉の輸入、国内における製造・出荷を一時全面停止した。これらを受けて、各自治体や関連業界等には、牛用飼料への動物由来タンパク質（肉骨粉を含む）の混入防止等に関する指針等が示され、肉骨粉等の家畜飼料への混入の検査への関心が高まっている。

【0003】

また、近年、食品の安全性に対する消費者の関心の1つとして、食品アレルギーがあげられる。食品アレルギーとして代表的なものは、卵、牛乳、小麦、そば、落花生などであるが、牛、豚、鶏肉、或いは血清タンパク質に対するアレルギーも重要である。

【0004】

特許文献1は、このような食物アレルギーの免疫学的検出について記載している。当該公開公報には、アレルギー患者からの血清プール内に、加熱卵抗原に対して反応する抗体と非加熱卵抗原に対して反応する抗体が存在していたことが記載され、これは、加熱性動物タンパク質を特異的なアレルギーとするアレルギー患者が存在することを意味する。そして、当該公報は、ELISA などの免疫学的手法において、加熱性動物タンパク質をも検出するための抗体の必要性を認め、120 で30分間のオートクレーブ処理を行った卵のアレルゲン分画（オボアルブミン、オボムコイド、リゾチーム、トランスフェリンを含む混合物）を免疫原にして免疫した動物からの抗体が、非加熱卵抗原と加熱卵抗原を、ほぼ同等の感度で検出できることも示し、そのような高温加熱処理を行った変性タンパク質を免疫原にして得た抗体の使用が、非加熱および加熱タンパク質の両者の同時検出を可能にすることから、食品アレルギーの検査に好ましいことを記述する。

【0005】

しかしながら、別の観点から見れば、当該公報では、加熱性動物タンパク質を免疫源として得た抗体が、当該加熱性動物タンパク質のみならず、非加熱性の動物タンパク質をも非特異的に認識してしまい得ること、すなわち、両者の間での高い交差反応性の存在を示しているのである。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

つまり、上記のような、加熱性動物タンパク質と非加熱性動物タンパク質とに対する抗体の交差反応性は、肉骨粉の混入や、加熱性動物タンパク質アレルギー患者のためのアレルギーの免疫学的検査にとって好ましいものではない。すなわち、肉骨粉は、BSEとの関係等から、133以上の高温での加熱加圧で処理して用いられるので、そのように高温加熱処理された動物組織のみを特異的に検出して、当該肉骨粉の存在を正しく同定することが必要である。そうでないと、加熱性動物タンパク質と非加熱性動物タンパク質とに対する抗体の交差反応性は、当該抗体を用いた免疫学的手法による検査において、本来、検査の対象ではない非加熱動物組織、つまり肉骨粉ではない原料さえも検出して、検査の擬陽性判定を招き、ひいては、本来、排除する必要のない、肉骨粉を含まない飼料等をも不適格として、家畜飼料業者や肥育家の損失を招く。

10

【 0 0 0 7 】

また、加熱性動物タンパク質アレルギーの免疫学的検査においても、それと同時に非加熱性動物タンパク質を検出したのでは、検査の擬陽性判定の結果として、本来、非加熱性動物タンパク質は摂取できる筈のアレルギー患者の食品選択の余地を不当に奪うことになるのである。

【特許文献1】特開2003-155297号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

従って、本発明は、加熱性動物タンパク質のみを特異的に認識し、非加熱性動物タンパク質には交差反応性を示さない抗体による、試料中の加熱処理された動物性組織由来原料の存在を検出するための、免疫学的手法を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者等は、血清アルブミンを加熱して変性したタンパク質を免疫原として免疫した動物からの抗体が、加熱変性した血清アルブミンを特異的に認識し、非加熱の血清アルブミンに対しては交差反応性を示さないことを見出した。これは、加熱性動物タンパク質を免疫源として得た抗体が、当該加熱性動物タンパク質のみならず、非加熱性の動物タンパク質をも非特異的に認識してしまい得ること、すなわち、両者の間での高い交差反応性の存在を示す先行技術に照らして、驚嘆すべき結果であった。

30

【 0 0 1 0 】

特に、本発明者等は、そのような抗体を、ポリクローナル抗体としても調製できることを見出した。理論に拘束されることは好まないが、これは、血清アルブミンの熱に対する、ハプテン提示等をも含み得る免疫学的挙動が、他の動物性タンパク質と異なることを示唆し、また、血清アルブミンにおいては、そのような加熱性動物タンパク質に対する特異的抗体の調製が容易であることを示している。

【 0 0 1 1 】

更に、血清アルブミンは、加熱加圧処理後でも不溶化しないことが判明し、これは、本発明に更なる有利性を与える。

40

【 0 0 1 2 】

特に、血清アルブミンは、血清タンパク質として肉骨粉をも含む動物性組織由来原料に遍在しているものであるから、それは、極めて多種の形態の当該原料を網羅し得る。

【 0 0 1 3 】

従って、本発明者等は、ここに、当該熱変性した血清アルブミンを指標とした、試料中での加熱処理された動物性組織由来原料の存在を検出する新規な方法を提供し、その発明の第一の側面は；

試料中に存在する、少なくとも100を超える温度で加熱処理された動物性組織由来の原料の存在を検出するための方法であって、該方法は、

(1) 少なくとも100を超える温度で加熱処理した血清アルブミンに対する抗体また

50

はその抗原結合性フラグメントと前記試料を接触させて、該試料中の熱変性血清アルブミンと該抗体またはその抗原結合性フラグメントとの特異的複合体を形成し、

(2) 形成された前記複合体の存在および/またはその存在量を同定することを含む、前記方法である。

【0014】

本発明の、加熱処理した血清アルブミンに対する抗体は、缶詰の製造時に通常用いられる121 前後や、肉骨粉の製造時に用いられる130 以上の温度で加熱処理または加熱加圧処理された動物性組織由来原料の測定においても極めて良好な結果を与える。

【0015】

前記抗体は、少なくとも100 以上、好適には、120 以上で加熱処理した血清アルブミンを免疫原として動物を免疫することで得られる。より好適には、加圧処理を併用し、例えば121 で数乃至数十分程度、典型的には30分程度のオートクレーブ処理した血清アルブミンが免疫原として用い得る。

【0016】

かくして、缶詰等の高温加熱処理食品や、肉骨粉等の混入を検査すべき家畜飼料における、擬陽性判定を与えぬ、極めて信頼性の高い免疫学的手法による検査が提供される。

【0017】

また、本発明の別の側面は、上記の検査に用いる抗体またはその抗原結合性フラグメント、当該抗体を含む試薬或いはキットをも提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本明細書において、「動物性組織由来の原料」の用語は、血清アルブミンを含有する任意の動物組織、例えば、筋肉や骨、皮膚組織、血液に由来する原料を含み得る。筋肉組織は、食品における主要な成分となり得ることから興味深く、また、肉骨粉も特に興味深い本発明の対象である。本発明の重要な側面の1つは、当該肉骨粉のような、高温で加熱処理された動物性組織由来原料を特異的に認識し、高温加熱処理されていない動物性組織由来の原料をそれらと区別し得ることにある。従って、本明細書にいう高温加熱処理、あるいは高温での加熱処理とは、当該動物性組織を認識する抗体の特異性に影響を与え得る加熱条件による処理を意味し、少なくとも100 を超える加熱処理に代表される、食品の加熱加工や殺菌の際に適用されるような温度処理を指す。例えば、適切な加圧処理を伴ってよい、缶詰食品等の殺菌時の処理条件である121 や、肉骨粉製造時の133 以上の温度があげられる。なお、当該動物性組織由来の原料は、加熱処理以外の任意の追加処理を受けていてよく、例えば、破碎、粉碎、乾燥、各種酵素処理、塩への浸漬、防腐処理等の、食品或いは飼料製造時に用いられ得る任意の追加処理を単独でまたは組み合わせて施されていてよい。

【0019】

本発明における試料として好適なものの中には、前記動物性組織由来の原料が意図的に配合され得る、或いは意図しないで混入し得る、食品、医薬、家畜飼料があげられるが、これに限定されない。特に、家畜飼料中の肉骨粉等の検出は、本発明の重要な課題の一つである。

【0020】

本発明では、血清アルブミンを少なくとも100 以上で加熱して、当該熱変性タンパク質を抗体作製の際の免疫原として用いる。当該熱変性タンパク質を免疫原として用いて得た抗血清アルブミン抗体の典型的な利点は、先に述べた。各種の血清アルブミンが容易に入手可能であり、また多くのものについて市販されている。例えば、牛血清アルブミンは、利用可能な実験用試薬として、和光純薬工業(株)(例えば、Cat. No. 014-15134)等から購入してよい。また、試薬として入手できない場合においても、血清アルブミンの血清からの調製方法自体は公知であり、当該公知のいかなる方法に基づいても、任意の動物由来の血清アルブミンを容易に自家調製し得る。次いで、該血清アルブミンの加熱処理による変性は、実験室的に用い得る任意の加熱手段により達成できる。例

10

20

30

40

50

えば、任意の加熱器により、各種動物由来の血清アルブミンを、乾式、或いは湿式で、100 を超える温度まで昇温し、実質的な時間、該温度に保持すればよい。好ましくは、市販のオートクレーブを用いて、溶液状態の血清アルブミンを加熱処理または加熱加圧処理すればよく、例えば、121 で40分、または135 で30分間、オートクレーブ処理すればよい。

【0021】

本発明では、上記のような手法で熱変性した血清アルブミンを免疫原として、当該熱変性した血清アルブミンに対する抗血清或いは抗体を調製する。具体的に、当該免疫動物からの抗血清は、例えば、アジュバントを含む前記免疫原を免疫動物に皮下注射し、当該皮下投与を適当な間隔（例えば1週間）で所定の回数（例えば5回）繰り返し、最終免疫後に全血を採集して、これを分離することで得ることができる。そのような方法は、例えば、CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.4章（発行元：John Wiley & Sons, Inc., New York）等に記載されている。次いで、前記抗血清からのポリクローナル抗体の精製は、動物の免疫に用いた熱変性血清アルブミンまたはその部分ペプチドをクロマトグラフィー用の樹脂、例えば、CNBr活性化セファロースやHiTrap NHS-activated（ともにAmersham Pharmacia社製）に共有結合で固相化し、該固相化樹脂に上記抗血清を供して当該抗血清中の抗体を特異的に樹脂上に吸着させ、ついで、該樹脂上に吸着した抗体を適切な緩衝液やカオトロピックイオン等を用いて溶出させて回収することでも達成できるが、これに限定されない。

【0022】

また、本発明の抗体をモノクローナル抗体として得る場合は、当業者に既知の手法を用いて、熱変性血清アルブミンで免疫した実験動物、好ましくはマウス・ラット・ハムスターなどのげっ歯類動物の脾細胞とミエロマ細胞株等の細胞融合用のペアレントセルを融合させ、得られたハイブリドーマの中から好適なものを選択してクローン化し、次いで、その融合細胞を生体外または生体内で培養し、この培養混合物より特異性の高いモノクローナル抗体を採取する。

【0023】

また、本発明では、上記の抗体を酵素消化処理して得られるような当該抗体の抗原結合性フラグメントを用いてもよい。当該フラグメントの例には、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、F(v)フラグメント、H鎖モノマー又はダイマー、L鎖モノマー又はダイマー、1個のH鎖および1個のL鎖からなるダイマー等が含まれる。該フラグメントは、例えばペプシンやパイン等のプロテアーゼにより完全な抗体を消化するか、消化後、必要に応じて還元剤で処理することにより得ることができる。H鎖およびL鎖モノマーは、完全な抗体をジチオスレイトール等の還元剤で処理した後、精製した鎖状体を分離することにより得ることもできる。

【0024】

本発明による加熱処理された動物性組織由来の原料の検出は、当該原料中の加熱変性された血清アルブミンの存在を指標として、上記抗体類による免疫学的手法に基づくアッセイにより達成される。当該手法の1つである一般的なサンドウィッチアッセイを例にとれば、上記抗体類が検出のために標識されてよい。例えば、それらを放射性物質、金コロイドなどの着色粒子、蛍光または化学発光標識、或いは酵素（ELISA用）で標識すれば検出抗体として使用することができる。抗体の標識の方法としては当業者にとって周知のいかなる方法も採用することができ、例えば、「J. Biochem. vol. 11, 395~399頁（1979年）」、「J. Biochem. vol. 14, 41~57頁（1982年）」、「Immunofluorescence and Related Techniques（Elsevier/North Holland Biomedical Press, 215~225頁（1978年））」記載の方法を利用することができる。なお、競合アッセイにおいては、前記熱変性した血清アルブミン自体が標識され得、当該標識方法も当業者に周知である。

【0025】

また、サンドウィッチアッセイや競合アッセイにおいては、上記の抗体類が固体支持体に固相化されることが好ましく、当該抗体類は、例えば、炭酸緩衝液（pH 8.6前後）にそれらを溶解し、該溶液をマイクロプレートのウェルに添加して所定時間インキュベートすることで固相化できる。当該アッセイによる検出/測定は、上記の抗体類と熱変性された血清アルブミンとの免疫複合体を検出することで行なわれる。食品或いは家畜飼料を試料としたサンドウィッチアッセイでは、上記の抗体類がウェル底面などの固相のコーティングに用いられてキャプチャー側抗体を提供し、もう一方の抗体が放射性物質や着色粒子又は酵素で標識されて検出側抗体を提供する。キャプチャー側抗体を有するウェル内に試料としての食品/家畜飼料或いはその希釈液が添加され、所定時間インキュベートされた後、該試料液がウェルから取り除かれ、好適な緩衝液等によりウェル内を十分に洗浄後、検出側の抗体がウェルに添加される。所定のインキュベーションの後、ウェル内を洗浄し、キャプチャー側抗体-測定対象物-検出側抗体複合体の生成を検出する。検出は、検出側抗体に標識された標識物質の性質に依存し、放射性標識であれば放射線量が、着色粒子標識であれば発色量や吸光度が、また酵素標識（ELISA法）であれば、更に適当な基質をウェルに添加し、所定のインキュベーション後の吸光度が検出される。なお、ELISA法の例において、用いる酵素には特に制限がなく、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性フォスファターゼ等の酵素が有利に使用される。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識する場合は、当該酵素の基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン等がその基質として利用可能である。アルカリ性フォスファターゼを使用する場合は、基質としてp-ニトロフェニル燐酸が基質としてあげられる。なお、競合アッセイでは、上記標識抗体の代わりに標識された熱変性血清アルブミンまたはその免疫学的等価物を使用され、該物質と試料中の被検物質との特異的抗体結合に関する競合が測定される。

10

20

【0026】

従って、本発明の抗体類は、それらを含む試薬の形態で供給されることが有利である。該試薬には、それ自体当業者に周知の、適切な緩衝剤、安定剤、保存料等が添加されてよく、溶液状であっても、凍結状態であっても、或いは凍結乾燥状態であっても差し支えない。更に、本発明のアッセイは、上記の抗体或いは試薬を含むキットを用いて容易に実施することもできる。サンドウィッチ法に基づくELISA用キットの例では、キャプチャー用としての抗体からなる試薬と、検出用としての酵素標識した抗体からなる試薬及び適切な酵素基質がキットに含まれ得る。洗浄用の緩衝液や、ウェルへの非特異的吸着を抑制するブロッキング用試薬等が更に含まれてもよい。そのようなキットの構成及びその製造方法は当業者にとって公知であろう。更に、該キットは、いわゆるイムノクロマトの形態で使用することも可能である。そのようなイムノクロマトの製造方法は、例えば、特開平2-132375号公報に記載されている。

30

【0027】

更に説明せずとも、これまでの説明を与えられた当業者は、本発明を十分に活用し得る。以下、説明のみの目的で実施例を与える。

【実施例1】

【0028】

比較例：熱変性していない牛血清アルブミンに対する抗体の使用

CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.4章（発行元：John Wiley & Sons, Inc., New York）のプロトコールに準じて、未変性牛血清アルブミンをウサギに免疫して抗血清を得た。未変性牛血清アルブミンを樹脂に固相化してカラムに充填し、これに得られた抗血清を通して未変性牛血清アルブミンに対する抗体を吸着させた。150mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液（pH 7.2）で十分に洗浄した後、0.1MのGlycine-HCl緩衝液（pH 2.3）で溶出し、未変性牛血清アルブミンに対する特異抗体を溶出した。溶出したフラクションは直ちにTris-HCl緩衝液（pH 8.6）を用いて中和した。この特異抗体をELISA用マイクロプレートにコートした。また、同じ抗体をNaK

40

50

ane法によりペルオキシダーゼで標識した。試料として、未変性牛血清アルブミン及び135で、30分間オートクレーブ処理した牛血清アルブミンを用いて反応性を検討した。酵素免疫測定系(ELISA)検出の結果は、図1に示す。

【0029】

図1から、熱変性しない(未変性)牛血清アルブミンに対する抗体は、当該未変性の牛血清アルブミンに対するのと比較した場合、135で、30分間オートクレーブ処理した牛血清アルブミン試料に対して約百分の一の反応性しか示さなかった。

【実施例2】

【0030】

実施例：熱変性牛血清アルブミンに対する抗体の使用

牛血清アルブミン(和光純薬工業(株)製、Cat.No.014-15134)を水に1%となるように溶解し、135で30分間、オートクレーブ処理したものを免疫原として、実施例1と同様に、ウサギに免疫し、抗血清を得た。同様のオートクレーブ処理した牛血清アルブミンを樹脂に固相化してカラムに充填し、これに得られた抗血清を通して熱変性牛血清アルブミンに対する抗体を吸着させた。150mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)で十分に洗浄した後、0.1M Glycine-HCl緩衝液(pH2.3)で溶出し、高温加熱処理熱変性牛血清アルブミンに対する特異抗体を溶出した。溶出したフラクションは直ちにTris-HCl緩衝液(pH8.6)を用いて中和した。この特異抗体をELISA用マイクロプレートにコートした。また、同じ抗体をNakane法によりペルオキシダーゼで標識した。未変性牛血清アルブミン及び135で、30分間オートクレーブ処理した牛血清アルブミンを試料として用いて反応性を検討した。ELISAでの検出結果は図2に示す。

【0031】

上記比較例による未変性牛血清アルブミンに対する抗体に比べ、本発明の熱変性牛血清アルブミンに対する抗体は、高温加熱処理した牛血清アルブミンに対して高い反応性および特異性を示したことから、当該高温加熱処理した牛血清アルブミンの特異的検出に利用可能であることが示された。

【実施例3】

【0032】

実施例：牛肉骨粉の検出

牛肉骨粉を10倍量の0.5%-Tween 20、20mMの2-メルカプトエタノール、150mMのNaClおよび1mg/mlのオボアルブミンを含む20mMのTris-HCl(pH7.4)で抽出して抽出液を作製し、その希釈液を実施例2で得た抗体を用いたELISAで測定した。結果を表1に示す。

【0033】

【表1】

表1：牛肉骨粉の検出

抽出液希釈倍率(倍)	吸光度(450/630nm)
1000	0.483
2000	0.301
4000	0.178
8000	0.082
16000	0.048
32000	0.030
ブランク	0.018

表1からわかるように、抽出液を8000倍に希釈してもブランク値の倍以上の吸光度があり、十分な検出が可能であった。

【実施例 4】

【0034】

比較例：市販キットによる家畜飼料中の牛肉骨粉の検出

市販 E L I S A - T E K (E L I S A T e c h n o l o g y I n c .) の加工肉種判別キット (B E E F 用) を用いて牛肉骨粉重量比で 0 . 1 % から 1 % 含有する植物性配合飼料を、該キットに添付してある説明書に準じた方法で抽出し、これをキットの説明書通りに測定したところ表 2 の結果が得られ、1 % の牛肉骨粉を含むものでも、牛肉骨粉を含まない植物性配合飼料の測定値との間に差が認められず、検出することが出来なかった。

【0035】

なお、表中、試料 A は、肉用牛配合飼料クオリティービーフ後期 (全国酪農業協同組合連合会鹿島飼料工場製) であり、試料 B は、乳用牛飼育用配合飼料くみあい配合飼料乳牛用 17 ペレット (東日本くみあい飼料 (株) 群馬町工業製) である。また、陽性コントロールは、E L I S A - T E K K i t 付属牛標準品、陰性コントロール 1 は、E L I S A - T E K K i t 付属豚標準品、陰性コントロール 2 は、E L I S A - T E K K i t 付属綿羊標準品であり、2 連の試料につき 2 連の測定結果 (4 0 5 / 4 9 2 n m) を示した。

【0036】

【表 2】

表 2 : 市販キットによる家畜飼料中の牛肉骨粉の検出

試料	2 連の測定結果	
試料 A (0% 添加) - 1	0.010	0.011
試料 A (0% 添加) - 2	0.011	0.008
試料 A (0.1% 添加) - 1	0.012	0.011
試料 A (0.1% 添加) - 2	0.014	0.013
試料 A (0.3% 添加) - 1	0.013	0.011
試料 A (0.3% 添加) - 2	0.015	0.016
試料 A (1% 添加) - 1	0.021	0.018
試料 A (1% 添加) - 2	0.022	0.020
試料 B (0% 添加) - 1	0.011	0.012
試料 B (0% 添加) - 2	0.008	0.012
試料 B (0.1% 添加) - 1	0.010	0.013
試料 B (0.1% 添加) - 2	0.011	0.015
試料 B (0.3% 添加) - 1	0.009	0.013
試料 B (0.3% 添加) - 2	0.013	0.014
試料 B (1% 添加) - 1	0.014	0.019
試料 B (1% 添加) - 2	0.015	0.019
陽性コントロール	0.524	0.511
陰性コントロール 1	0.020	0.021
陰性コントロール 2	0.022	0.024

【実施例 5】

【0037】

実施例：本発明の抗体による家畜飼料中の牛肉骨粉の検出

牛肉骨粉を含まない植物性配合飼料と牛肉骨粉重量比で 0 . 1 % と 0 . 3 % 含有する植物性配合飼料を、10 倍量の 0 . 5 % - T w e e n 2 0、20 m M の 2 - メルカプトエタノール、150 m M の N a C l、1 m g / m l のオボアルブミンを含む 20 m M の T r i s - H C l (p H 7 . 4) 中でホモゲナイズし、沸騰湯浴中で 10 分間加熱した後水槽に漬けて室温まで冷却した。800 G で遠心分離後、上清を濾過し、さらに 3000 G で 10 分間遠心分離して得た上清を、高温加熱処理した牛血清アルブミンを抗原として得た

、本発明の抗体を用いたE L I S Aで測定した。結果を表3に示す。

【0038】

表中、試料AおよびBは実施例4に同じ。陽性コントロールは、135 加熱処理牛筋抽出液、陰性コントロールは、乳用牛飼育用配合飼料配合飼料ペレットA号（明治飼糧（株）鹿島工場製）の抽出液であり、2連の試料につき2連の測定結果（450 / 630 nm）を示した。

【0039】

【表3】

表3：本発明の抗体による家畜飼料中の牛肉骨粉の検出

試料	2連の測定結果	
ブランク	0.016	0.019
ブランク	0.017	0.018
ブランク	0.019	0.019
ブランク	0.019	0.019
ブランク	0.019	0.019
試料A (0%添加) - 1	0.027	0.026
試料A (0%添加) - 2	0.026	0.028
試料A (0.1%添加) - 1	0.094	0.101
試料A (0.1%添加) - 2	0.097	0.098
試料A (0.3%添加) - 1	0.261	0.268
試料A (0.3%添加) - 2	0.255	0.258
試料B (0%添加) - 1	0.019	0.022
試料B (0%添加) - 2	0.02	0.023
試料B (0.1%添加) - 1	0.068	0.072
試料B (0.1%添加) - 2	0.07	0.072
試料B (0.3%添加) - 1	0.195	0.199
試料B (0.3%添加) - 2	0.203	0.198
陽性コントロール	0.155	0.157
陰性コントロール	0.025	0.023

濾液を試料とした時の吸光度がブランク値の倍以上であり、十分に検出が可能であった。また、この結果から、熱変性牛血清アルブミンを指標にした検出は、当該牛血清アルブミンが熱変性後も優れた溶解性を維持しており、それによりアッセイの簡略化に好適であることも示された。

【実施例6】

【0040】

実施例：抗熱変性鶏血清アルブミンに対する抗体の使用

鶏血清アルブミン（Inter-cell Technologies, Inc）を0.3 M炭酸水素ナトリウムに5 mg / mlになるように溶解し、135 で30分間オートクレーブ処理したものを免疫原として、実施例1と同様に、ウサギに免疫し、抗血清を得た。同様のオートクレーブ処理した鶏血清アルブミンを樹脂に固相化してカラムに充填し、これに得られた抗血清を通して熱変性鶏血清アルブミンに対する抗体を吸着させた。150 mM塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.2）で十分に洗浄した後、0.1 M Glycine - HCl 緩衝液（pH 2.3）で溶出し、高温加熱処理熱変性鶏血清アルブミンに対する特異抗体を溶出した。溶出したフラクションは直ちに Tris - HCl 緩衝液（pH 8.6）を用いて中和した。この特異抗体をE L I S A用マイクロプレートにコートした。また同じ抗体をNakane法によりペルオキシダーゼで標識した。

【0041】

未変性鶏血清アルブミンおよび135 で、30分間オートクレーブ処理した熱変性鶏血清アルブミンを試料として用いて反応性を検討した。E L I S Aでの検出結果は図3に

示す。

【0042】

上記実施例において、熱変性鶏血清アルブミンに対する抗体は、高温加熱処理した鶏血清アルブミンに対して高い反応性および特異性を示したことから、当該高温加熱処理した鶏血清アルブミンの特異的検出に利用可能であることが示された。

【実施例7】

【0043】

実施例：鶏肉骨粉の検出

鶏肉骨粉を10倍量の0.5% - Tween 20、20mMの2-メルカプトエタノール、150mMのNaClおよび0.5mg/mlのオボアルブミンを含む20mMのTris-HCl (pH7.4)で抽出して抽出液を作製し、その希釈液を実施例6で得た抗体を用いたELISAで測定した。結果を表4に示す。

【表4】

表4:鶏肉骨粉の検出

抽出液希釈倍率(倍)	吸光度(450/630nm)
1000	0.362
2000	0.231
4000	0.156
8000	0.113
ブランク	0.061

表4からわかるように、抽出液を8000倍に希釈してもブランク値の約2倍の吸光度があり、十分な検出が可能であった。

【実施例8】

【0044】

実施例：本発明の抗体による家畜飼料中の鶏肉骨粉の検出

鶏肉骨粉を含まない植物飼料および魚粉に、重量比で0.025%、0.05%、0.1%になるように鶏肉骨粉（東伯町農業協同組合 東伯チキンセンターレンダリング工場製）を添加した。これら飼料を0.5% - Tween 20、20mMの2-メルカプトエタノール、150mMのNaClおよび0.5mg/mlのオボアルブミンを含む20mMのTris-HCl (pH7.4)でホモジナイズし、沸騰湯浴中で10分間加熱した後水槽につけて室温まで冷却した。800Gで遠心分離後、上清を濾過し、さらに3000Gで10分間遠心して得た上清を、高温加熱処理した鶏血清アルブミンを抗原として得た、本発明の抗体を用いたELISAで測定した。結果を表5に示す。

【0045】

【表5】

表5：本発明の抗体による家畜飼料中の鶏肉骨粉の検出

試料	2連の測定結果	
ブランク	0.063	0.058
ブランク	0.062	0.058
試料A (0%添加)	0.054	0.052
試料A (0.025%添加)	0.095	0.095
試料A (0.05%添加)	0.122	0.120
試料A (0.1%添加)	0.141	0.132
試料B (0%添加)	0.044	0.041
試料B (0.025%添加)	0.075	0.073
試料B (0.05%添加)	0.132	0.126
試料B (0.1%添加)	0.187	0.191
陽性コントロール	0.220	0.219
陰性コントロール	0.045	0.042

10

表中、試料Aは乳用牛飼育用配合飼料ペレットA号（明治飼糧（株）鹿島工場製）、試料Bは魚粉、陰性コントロールは、乳用牛飼育用配合飼料ペレットA号（明治飼糧（株）鹿島工場製）の抽出液、陽性コントロールは鶏肉骨粉抽出液であり、各試料につき2連の測定結果（450nm / 630nm）を示した。鶏肉骨粉無添加の飼料に対して、植物飼料では0.025%、魚粉では0.05%の混入量で十分に検出が可能であった。

20

【実施例9】

【0046】

実施例：本発明の抗体での牛・豚肉骨粉に対する交差反応性の検討

上記実施例6で得られた、高温加熱処理した鶏血清アルブミンに対する抗体の、各種（牛、鶏、豚）肉骨粉に対する反応性を検討した。各種（牛、鶏、豚）肉骨粉を10倍量の0.5% - Tween 20、20mMの2-メルカプトエタノール、150mMのNaClおよび0.5mg/mlのオボアルブミンを含む20mMのTris-HCl (pH 7.4) でホモジナイズし、沸騰湯浴中で10分間加熱した後水槽につけて室温まで冷却した。800Gで遠心分離後、上清を濾過し、さらに3000Gで10分間遠心して得た上清を、高温加熱処理した鶏血清アルブミンを抗原として得た、本発明の抗体を用いたELISAで測定した。結果を表6に示す。

30

【0047】

【表6】

表6：本発明の抗体での牛・豚肉骨粉に対する交差反応性の検討

抽出液	鶏肉骨粉	
抽出液希釈倍率(倍)	2連の測定結果	
ブランク	0.086	0.075
4000	0.160	0.172
2000	0.212	0.243
1000	0.320	0.349

抽出液	牛肉骨粉	
抽出液希釈倍率(倍)	2連の測定結果	
ブランク	0.067	0.078
4000	0.084	0.086
2000	0.096	0.082
1000	0.080	0.070

抽出液	豚肉骨粉	
抽出液希釈倍率(倍)	2連の測定結果	
ブランク	0.084	0.072
4000	0.083	0.075
2000	0.078	0.077
1000	0.070	0.076

鶏肉骨粉では、4000倍希釈までブランクの2倍以上の吸光度があった。それに対し、牛肉骨粉や豚骨粉では1000倍希釈であっても、ブランク値程度の吸光度を示すのみであった。

【0048】

本発明の高温加熱処理鶏血清アルブミンを抗原とする抗体を用いたELISA測定系は、高温加熱された鶏のみを特異的に検出し、他の動物種には反応しないことから、高い特異性を有していることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0049】

かくして、本発明の抗体類の使用により、缶詰等の高温加熱処理食品や、肉骨粉等の混入を検査すべき家畜飼料における、擬陽性判定を与えず、極めて信頼性の高い且つ簡便な免疫学的手法による検査が実施される。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】熱変性していない牛血清アルブミンに対する抗体（抗未変性牛血清アルブミン抗体）を用いた場合の、各種処理牛血清アルブミンのELISA検出を示す。菱形は、未変性牛血清アルブミンの検出、四角は、100℃までの温度で処理した牛血清アルブミンの検出、三角は135℃で加熱処理した牛血清アルブミンの検出を示す。ELISAによる吸光度（450/630nm）を横軸に示す。

【図2】135℃で熱変性させた牛血清アルブミンに対する抗体（抗熱変性牛血清アルブミン抗体）を用いた場合の、各種処理牛血清アルブミンのELISA検出を示す。菱形は、未変性牛血清アルブミンの検出、四角は、100℃までの温度で処理した牛血清アルブミンの検出、三角は135℃で加熱処理した牛血清アルブミンの検出を示す。ELISAによる吸光度（450/630nm）を横軸に示す。

【図3】135℃で熱変性させた鶏血清アルブミンに対する抗体（熱変性鶏血清アルブミン抗体）を用いた場合の各種処理鶏血清アルブミンのELISA検出を示す。菱形は、未

10

20

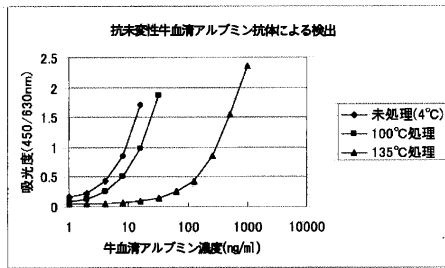
30

40

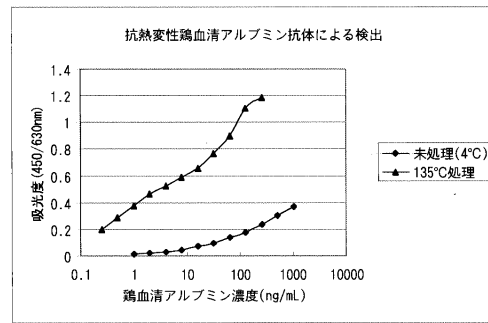
50

変性鶏血清アルブミン検出、三角は135 で加熱処理した鶏血清アルブミンの検出を示す。E L I S Aによる吸光度(450/630nm)を横軸に示す。

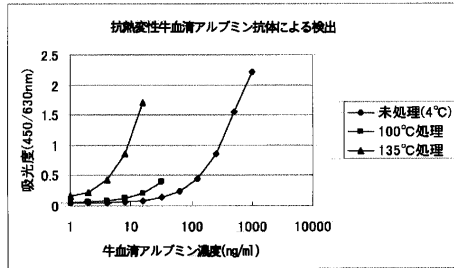
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100062007
弁理士 川口 義雄
- (74)代理人 100114188
弁理士 小野 誠
- (74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
- (74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
- (72)発明者 本庄 勉
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2-1-1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 山本 貴之
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2-1-1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 日比野 洋
埼玉県さいたま市中央区新都心2番地1 さいたま新都心合同庁舎検査棟 独立行政法人 肥飼料
検査所内

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開2003-155297(JP,A)
特開2002-253230(JP,A)
特開平07-260782(JP,A)
特開平10-267930(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/53
C07K

专利名称(译)	被加热处理动物性组织由来原料检出试薬		
公开(公告)号	JP4280225B2	公开(公告)日	2009-06-17
申请号	JP2004327558	申请日	2004-11-11
申请(专利权)人(译)	森永有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	森永有限公司 食品研究所和农资检验中心		
[标]发明人	本庄勉 山本貴之 日比野洋		
发明人	本庄 勉 山本 貴之 日比野 洋		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/18 G01N33/48.A		
F-TERM分类号	2G045/BA01 2G045/BA13 2G045/BB35 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA38 2G045/FB03 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	2003382067 2003-11-12 JP		
其他公开文献	JP2005164583A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过特异性识别可加热的动物蛋白并且不显示与不可加热的动物蛋白的交叉反应性的抗体，在样品中发现热处理或热压动物组织衍生的原料的存在。目的是提供用于检测的免疫学方法 解决方案：使用来自用加热血清白蛋白修饰的蛋白质免疫的动物的抗体或其抗原结合片段进行免疫，优选血清白蛋白作为免疫原在高于至少100°C的温度下加热处理。使用化学方法检测动物组织衍生材料的方法。 [选择图]图2

抽出液希釈倍率 (倍)	吸光度 (450/630nm)
1000	0.483
2000	0.301
4000	0.178
8000	0.082
16000	0.048
32000	0.030
ブランク	0.018