

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-194443

(P2016-194443A)

(43) 公開日 平成28年11月17日(2016.11.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A D 4 H O 4 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	
CO 7 K 14/765 (2006.01)	CO 7 K 14/765	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2015-74165 (P2015-74165)	(71) 出願人	504233638 株式会社森永生科学研究所 神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16
(22) 出願日	平成27年3月31日 (2015.3.31)	(74) 代理人	100137338 弁理士 辻田 朋子
		(72) 発明者	本庄 勉 神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16号 株式会社森永生科学研究所内
		(72) 発明者	境 雅寿 神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16号 株式会社森永生科学研究所内
		(72) 発明者	油谷 賢一 神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16号 株式会社森永生科学研究所内
		Fターム(参考)	4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 CA40 DA70 EA50 FA10 FA71 GA26

(54) 【発明の名称】 ブタ血清アルブミンの検出方法、検出キット及び抗ブタ血清アルブミン抗体

(57) 【要約】

【課題】 精度の高いブタ血清アルブミンの検出技術を提供する。

【解決手段】 試料中のブタ血清アルブミンの検出方法であって、以下の工程、

(1) 試料中のブタ血清アルブミンを、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒で抽出及び/又は可溶化し、タンパク質溶液を得る工程、

(2) アミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体と、前記工程(1)で得られたタンパク質溶液とを接触させ、前記ブタ血清アルブミンと前記抗体との間で抗原-抗体複合体を形成させる工程、及び

(3) 形成された前記抗原-抗体複合体を検出する工程、

を含むことを特徴とする。

【選択図】 無し

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料中のブタ血清アルブミンの検出方法であって、以下の工程、

(1) 試料中のブタ血清アルブミンを、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒で抽出及び/又は可溶化し、タンパク質溶液を得る工程、

(2) アミノ酸一文字表記で P K F V I E I R G I L A からなるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体と、前記工程(1)で得られたタンパク質溶液とを接触させ、前記ブタ血清アルブミンと前記抗体との間で抗原-抗体複合体を形成させる工程、及び

(3) 形成された前記抗原-抗体複合体を検出する工程、を含むことを特徴とする、検出方法。

10

【請求項 2】

前記工程(2)が、前記抗体と、

(a) 前記工程(1)で得られたタンパク質溶液と、を該溶液が実質的に希釈されることなく接触させるか；或いは

(b) 前記工程(1)で得られたタンパク質溶液を、そのイオン性界面活性剤濃度が 0.03% (W/V) 以下にならない範囲で希釈した希釈液と、を接触させる；

ことにより、前記ブタ血清アルブミンと前記抗体との間で抗原-抗体複合体を形成させる工程である、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 3】

前記工程(2)が固相化された前記抗体に前記タンパク質溶液を接触させる工程であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の検出方法。

20

【請求項 4】

前記試料が食品試料であり、該食品試料に含まれる豚由来組織を検出するために用いられることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の検出方法。

【請求項 5】

試料中のブタ血清アルブミンの検出キットであって、

試料中のブタ血清アルブミンを抽出及び/又は可溶化するための、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒と、

アミノ酸一文字表記で P K F V I E I R G I L A からなるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体と、を含むことを特徴とする、検出キット。

30

【請求項 6】

食品試料中の豚由来組織を検出するために用いられることを特徴とする、請求項 5 に記載の検出キット。

【請求項 7】

変性したブタ血清アルブミンを免疫原として用いて動物(ブタ及びヒトを除く)を免疫する免疫工程を含むことを特徴とする、アミノ酸一文字表記で P K F V I E I R G I L A からなるアミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体の作製方法。

【請求項 8】

前記免疫工程によって免疫された動物から取得した抗血清から、アミノ酸一文字表記で P K F V I E I R G I L A からなるアミノ酸配列を含むペプチドが担持された精製カラムを用いて、前記ペプチドに特異的に結合する抗体を精製する精製工程を含むことを特徴とする、請求項 7 に記載の作製方法。

40

【請求項 9】

前記精製工程の前に、

前記免疫工程によって免疫された動物から取得した抗血清の上清から、変性したブタ血清アルブミンが担持された中間精製カラムを用いて、前記変性したブタ血清アルブミンに特異的に結合する抗体を精製する中間精製工程を含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の作製方法。

【請求項 10】

請求項 7 ~ 9 の何れか一項に記載の作製方法により作製された、アミノ酸一文字表記で P

50

K F V I E I R G I L A からなるアミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体。

【請求項 1 1】

前記抗体が、請求項 1 0 に記載のポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の検出方法。

【請求項 1 2】

前記抗体が、請求項 1 0 に記載の抗体であることを特徴とする、請求項 5 又は 6 に記載の検出キット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は試料中のブタ血清アルブミンを検出するための技術に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、ブランド肉と称して他の食肉の提供を行ったり、牛肉等の比較的高価な肉類に安価な他種の肉類を混入させたりする、いわゆる食品偽装問題が、消費者の関心を集めている。

特に、食品表示とは異なる種の肉類が食品に混入している場合、混入した肉類にアレルギーのある消費者や、宗教上、慣習上の理由で混入した肉類を食べることができない消費者への影響は計り知れない。

20

このような問題を解決するために、特定のタンパク質を免疫学的に検出することで、特定の種の肉類が食品に混入していないか検査する方法が提案されている。

【0003】

特許文献 1 には、豚生肉から抽出された抽出物である豚生肉中に含まれる 50 k D (分子量 50,000) 付近の蛋白質を動物に免疫することで得られる抗体を検出抗体とするイムノクロマトグラフィー検出法が開示されている。

特許文献 1 には、かかるイムノクロマトグラフィー検出法によれば、加熱加工食品中の豚肉由来蛋白質を特異的に検出できることが記載されている。

また特許文献 1 には、豚トロポニン I に対する抗体を用いた場合であっても、同様の結果を得ることができることが記載されている。

30

【0004】

特許文献 2 には、筋肉に含まれるタンパク質であるウシミオグロビンにおいて、種間の相同性が低い領域に特異的に結合する抗ペプチド抗体を用いることで、ブタやトリのミオグロビンとの交差反応性を示さず、ウシミオグロビンを特異的に検出できることが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開 2011 - 169755 号公報

40

【特許文献 2】特開 2009 - 57291 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

特許文献 1 は筋収縮を担うタンパク質である豚トロポニン I に対する抗体を用いることで、加工食品に含まれる豚肉を特異的に検出できることが示唆されている。

すなわち、特許文献 1 及び 2 は筋肉タンパク質を検出することで、食品試料中に含まれる特定の種の肉類を検出する技術を開示している。

したがって、筋肉タンパク質が存在しない、または筋肉タンパク質の存在量が少ない組織が食品に混入している場合には、これを検出することができない。

50

【 0 0 0 7 】

このような状況に鑑み、本発明の解決しようとする課題は、従来技術よりも精度の高い豚由来の組織の検出技術を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明者は、いかなる組織であっても血液によって酸素や栄養素の授受が行われていることに着目し、血清に多く含まれるタンパク質を抗原とする検出抗体を用いることを着想した。

しかし、血清に含まれるタンパク質の50～60%を占める血清アルブミンは種間の相同性が高いため、他種の血清アルブミンとの交差反応性を防ぐことが難しく、ブタ血清アルブミンを特異的に検出することが困難である。

また、ブタ血清アルブミンのアミノ酸配列のうち、他種との相同性の低いC末端領域は疎水性が高く分子内に埋没しているため、当該領域を認識部位とした検出抗体によってブタ血清アルブミンを検出することが困難であるという問題があった。

【 0 0 0 9 】

このような状況下、鋭意研究努力により本発明者は、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒でブタ血清アルブミンを抽出又は可溶化したタンパク質溶液に対して、ブタ血清アルブミンのC末端のアミノ酸配列に特異的に結合する検出抗体を適用することにより、極めて高い特異的をもってブタ血清アルブミンを検出することができることを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 1 0 】

すなわち、上記課題を解決する本発明は、試料中のブタ血清アルブミンの検出方法であって、以下の工程、

(1) 試料中のブタ血清アルブミンを、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒で抽出及び/又は可溶化し、タンパク質溶液を得る工程、

(2) アミノ酸一文字表記でPKFVEIRGILAからなるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体と、前記工程(1)で得られたタンパク質溶液とを接触させ、前記ブタ血清アルブミンと前記抗体との間で抗原-抗体複合体を形成させる工程、及び

(3) 形成された前記抗原-抗体複合体を検出する工程、を含むことを特徴とする、検出方法である。

【 0 0 1 1 】

本発明の検出方法は、他種の血清アルブミンとの交差反応性をほとんど示すことがなく、試料に含まれたブタ血清アルブミンを特異的に検出することができる。

【 0 0 1 2 】

また、本発明の好ましい形態では、前記工程(2)が、前記抗体と、

(a) 前記工程(1)で得られたタンパク質溶液と、を該溶液が実質的に希釈されることなく接触させるか；或いは

(b) 前記工程(1)で得られたタンパク質溶液を、そのイオン性界面活性剤濃度が0.03%(W/V)以下にならない範囲で希釈した希釈液と、を接触させる；

ことにより、前記ブタ血清アルブミンと前記抗体との間で抗原-抗体複合体を形成させる工程である。

前記(a)又は(b)に示す方法により、タンパク質溶液と前記抗体を接触させることによって、ブタ血清アルブミンの検出感度を向上させることができる。

【 0 0 1 3 】

本発明の好ましい形態では、前記工程(2)が固相化された前記抗体に前記タンパク質溶液を接触させる工程である。

このような形態の本発明によれば、試料に含まれるブタ血清アルブミンを定量的に検出することができる。

【 0 0 1 4 】

本発明の検出方法は、食品試料に含まれる豚由来組織を検出するために用いることが好ま

10

20

30

40

50

しい。

本発明の方法によれば、筋肉、脂、消化器官、循環器官、骨組織、脳など様々な種類の豚由来組織からブタ血清アルブミンを検出することが可能であるため、高精度で漏れのほとんど無い食品検査を実施することが可能である。

【0015】

また、本発明は、試料中のブタ血清アルブミンの検出キットであって、試料中のブタ血清アルブミンを抽出及び/又は可溶化するための、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒と、アミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体と、を含むことを特徴とする、検出キットにも関する。

10

【0016】

本発明の検査キットは、他種の血清アルブミンとの交差反応性をほとんど示すことがなく、試料に含まれたブタ血清アルブミンを特異的に検出することができる。

【0017】

本発明の検査キットは、食品試料に含まれる豚由来組織を検出するために用いることが好ましい。

本発明の検査キットによれば、筋肉、脂、消化器官、循環器官、骨組織、脳など様々な種類の豚由来組織からブタ血清アルブミンを検出することが可能であるため、高精度で漏れのほとんど無い食品検査を実施することが可能である。

【0018】

本発明は、変性したブタ血清アルブミンを免疫原として用いて動物（ブタ及びヒトを除く）を免疫する免疫工程を含むことを特徴とする、アミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体の作製方法にもある。

20

本発明の作製方法によれば、他種の血清アルブミンとの交差反応をほとんど示さない、特異性の極めて高い抗ブタ血清アルブミンポリクローナル抗体を容易に作製することができる。

【0019】

本発明の好ましい形態では、前記免疫工程によって免疫された動物から取得した抗血清から、アミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列を含むペプチドが担持された精製カラムを用いて、前記ペプチドに特異的に結合する抗体を精製する精製工程を含む。

30

このような精製カラムを用いることによって、ポリクローナル抗体の精製純度を容易に向上させることができる。

【0020】

本発明の好ましい形態では、前記精製工程の前に、前記免疫工程によって免疫された動物から取得した抗血清の上清から、変性したブタ血清アルブミンが担持された中間精製カラムを用いて、前記変性したブタ血清アルブミンに特異的に結合する抗体を精製する中間精製工程を含む。

このような中間精製カラムを用いることによって、ポリクローナル抗体の精製純度をより向上させることができる。

40

【0021】

また、本発明は上述の本発明の抗体の作製方法で作製されたアミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体にも関する。

本発明のポリクローナル抗体は、他種の血清アルブミンとの交差反応をほとんど示さずに、ブタ血清アルブミンを特異的に検出することができる。

【0022】

本発明の検出方法においては、上述の本発明のポリクローナル抗体を用いることが好ましい。

50

このような形態の本発明によれば、より高精度、高感度なブタ血清アルブミンの検出方法を提供することができる。

【0023】

本発明の検査キットにおいては、上述の本発明のポリクローナル抗体を用いることが好ましい。

このような形態の本発明によれば、より高精度、高感度なブタ血清アルブミンの検出キットを提供することができる。

【発明の効果】

【0024】

本発明によれば、他種の血清アルブミンとの交差反応性をほとんど示すことなく、高い特異性をもってブタ血清アルブミンを検出することができる検出方法、検査キット及びポリクローナル抗体を提供することができる。すなわち、本発明によれば、高い精度をもって試料中の豚肉由来の組織を検出することができる。

また、本発明の抗体の作製方法によれば、前記ポリクローナル抗体を容易に作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】実施例で構築したELISA測定系によって作成した検量線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

< 1 > 本発明の検出方法

本発明の検出方法は、試料中のブタ血清アルブミンを検出する方法であり、工程(1)から工程(3)の3つの工程を含むことを特徴とする。以下、各工程について詳述する。

【0027】

[工程(1)]

工程(1)は、本発明の検出方法は、試料中のブタ血清アルブミンを、イオン性界面活性剤を含む水性溶媒で抽出及び/又は可溶化し、タンパク質溶液を得る工程である。

【0028】

工程(1)の目的は、ブタ血清アルブミンを含むタンパク質溶液を得ることと、該溶液中のブタ血清アルブミンを変性させることにある。

溶液中のブタ血清アルブミンを変性させ、分子内に埋没しているC末端側のアミノ酸配列を露出させることにより、工程(2)における抗原-抗体反応を可能にする。

【0029】

ここで水性溶媒とは、純水；塩化ナトリウム、塩化カリウムおよび重炭酸ナトリウム等の塩溶液；生化学分野で通常用いられる各種緩衝液、例えばリン酸緩衝液、Tris-塩酸緩衝液およびクエン酸緩衝液；水酸化ナトリウム或いは塩酸等でpHを調節したアルカリ性溶液或いは酸性溶液等を基本とした溶媒を意味する。

【0030】

また、水性溶媒は、タンパク質の溶解度や抽出効率を追加的に向上させる補助成分として、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)のようなキレート化合物、ホスホリパーゼのような酵素類およびHLB価調節のために非イオン性界面活性剤を含んでいてもよい。

【0031】

また、水性溶媒は、抽出中或いは保存中の溶液内でのタンパク質の分解を制御するためのプロテアーゼ阻害剤や、微生物の繁殖を防止するアジ化ナトリウムなどの抗菌性物質、アスコルビン酸等の酸化防止剤を含んでいてもよい。

【0032】

さらに水性溶媒は、工程(2)における抗原-抗体反応を実行不能にしない範囲でグリセロールやエタノール等の極性有機溶媒を含んでいてもよい。

【0033】

また、水性溶媒は、2-メルカプトエタノールやジチオスレイトール(DTT)、シア

10

20

30

40

50

ノ水ホウ素化ナトリウム (S C B H)、ジメチルアミンボラン (D M A B)、水ホウ素化ナトリウム (S B H)、亜硫酸ナトリウムやシステインに代表される還元剤を含んでいてもよい。

【 0 0 3 4 】

水性溶媒に含まれるイオン性界面活性剤は、タンパク質の溶解度や抽出効率を実質的に向上させ得るものであれば公知のいずれのものを用いてもかまわない。

好適には、イオン性界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、ラウリルサルコシナトリウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルピリジニウムおよびそれらの混合物から成る群より選択される。

特に、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) が好適なイオン性界面活性剤として挙げられる。

【 0 0 3 5 】

水性溶媒におけるイオン性界面活性剤の濃度は、ブタ血清アルブミンの実質的な可溶化や抽出を達成できる濃度であれば、いかなる濃度でもかまわないが、通常は、0.1% (W / V) 以上であり、0.3% (W / V) 以上、また0.5% (W / V) 以上、さらには10% (W / V) 程度であってもよい。

【 0 0 3 6 】

また、水性溶媒におけるイオン性界面活性剤の濃度は、好ましくは0.1~10% (W / V) であり、より好ましくは0.3~5% (W / V) であり、さらに好ましくは0.5

~1% (W / V) である。
イオン性界面活性剤の濃度を前記範囲とすることによって、効率的に試料からブタ血清アルブミンを抽出することができ、また、工程 (2) における抗原 - 抗体反応の効率を向上させることができる。

【 0 0 3 7 】

工程 (1) においては、公知の方法により試料中のブタ血清アルブミンを抽出及び / 又は可溶化することでタンパク質溶液を取得することができる。

具体的には、試料を含む水性溶媒をホモゲナイザーや超音波破碎機、すり鉢などで処理し、得られた懸濁液を遠心分離し、上清を回収することで、タンパク質溶液を得ることができる。

【 0 0 3 8 】

本発明においては、試料を含む水性溶媒をホモゲナイザーや超音波破碎機、すり鉢などで処理した後に、加熱することも好ましい。加熱によってブタ血清アルブミンの抽出効率及び溶解効率を向上させることができる。

【 0 0 3 9 】

また、試料が固形物又は半固形物である場合には、あらかじめミキサー等で試料を破碎し、ミンチ状やペースト状にすることが、ブタ血清アルブミンの抽出効率及び溶解効率の観点から好ましい。

【 0 0 4 0 】

[工程 (2)]

工程 (2) は、アミノ酸一文字表記で P K F V I E I R G I L A からなるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体と、前記工程 (1) で得られたタンパク質溶液とを接触させ、前記ブタ血清アルブミンと前記抗体との間で抗原 - 抗体複合体を形成させる工程である。

【 0 0 4 1 】

工程 (2) にあつては、タンパク質溶液を希釈し、イオン性界面活性剤の濃度を下げる必要は無い。試料からブタ血清アルブミンを抽出することができるほど高濃度のイオン性界面活性剤の存在下であっても、ブタ血清アルブミンと前記抗体の抗原 - 抗体反応は起こる。

【 0 0 4 2 】

工程 (2) においては、工程 (1) で得られたタンパク質溶液を実質的に希釈すること

10

20

30

40

50

なく前記抗体と接触させることが好ましい(a)。

または、イオン性界面活性剤濃度が0.03%(W/V)以下にならない範囲で希釈したタンパク質溶液と前記抗体を接触させることが好ましい(b)。

【0043】

上述の通り、工程(2)における抗原-抗体反応は、高濃度のイオン性界面活性剤の存在下であっても起こる。

また、イオン性界面活性剤によってブタ血清アルブミンの変性状態を維持することができるため、上記(a)又は(b)の形態で工程(2)を実施することによって、より高感度にブタ血清アルブミンを検出することが可能となる。

【0044】

ここで、「接触させる」とは、タンパク質溶液中のブタ血清アルブミンと前記抗体の抗原-抗体反応を可能にすることができればその形態は限定されない。

【0045】

本発明の検出方法を免疫沈降法の形態とする場合には、工程(2)において、タンパク質溶液に前記抗体を含む水溶液を添加することで、ブタ血清アルブミンと抗体の抗原-抗体複合体を形成する。

すなわち、タンパク質溶液に抗体溶液を添加することで抗原-抗体複合体を形成した後に、ビーズに担持された、前記抗体を認識する二次抗体をさらに添加することによって、該抗原-抗体複合体を回収し、ウエスタンブロットなどで検出することができる。

【0046】

本発明の検出方法をサンドイッチ法又は競合法の形態とする場合には、工程(2)において、タンパク質溶液を固相化された前記抗体に接触させることで抗原-抗体複合体を形成することができる。

すなわち、プレートのウェルの底辺に前記抗体を固相化し、該ウェルにタンパク質溶液を分注することによって、工程(2)を実施することができる。

このような実施の形態の本発明によれば、試料中のブタ血清アルブミンを定量的に検出することができる。

【0047】

工程(2)において用いる抗体は、アミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体である。

該アミノ酸配列は、種間での相同性の低いブタ血清アルブミンのC末端側のアミノ酸配列である。

【0048】

該アミノ酸配列は、通常ブタ血清アルブミンの分子内に埋没しているため、該アミノ酸配列を抗原部位とする検出抗体によってブタ血清アルブミンを検出することは不可能である。

しかし、工程(1)によって得られるタンパク質溶液に含まれるブタ血清アルブミンは、イオン性界面活性剤により変性され、前記アミノ酸配列が露出している状態となっている。

そして、驚くべきことに、ブタ血清アルブミンを変性させるほどの高濃度のイオン性界面活性剤の存在下であっても、前記アミノ酸配列と前記抗体は抗原-抗体複合体を形成することができる。

【0049】

前記抗体としては、前記アミノ酸配列を認識することができればモノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。

【0050】

前記アミノ酸配列に特異的に結合する抗体は、前記アミノ酸配列を有するペプチドをキャリアタンパク質にコンジュゲートして、これを免疫原として動物に免疫することで得られるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いてもよい。

【0051】

10

20

30

40

50

本発明の好ましい実施の形態では、後述する本発明の作製方法により作製されるポリクローナル抗体を用いる。

このような実施の形態の本発明によれば、より高精度、高感度なブタ血清アルブミンの検出方法を提供することができる。

【0052】

抗原 - 抗体複合体の形成に関しては、従来 of 免疫学的な検出方法における抗原 - 抗体反応と同様の条件のもと達成することができる。

【0053】

[工程(3)]

工程(3)は、工程(2)で形成された前記抗原 - 抗体複合体を検出する工程である。抗原 - 抗体複合体の検出は当業者に周知のいずれの方法によってもよい。

【0054】

具体的には、本発明の検出方法を免疫沈降法の形態とする場合には、沈降した抗原 - 抗体複合体をウエスタンブロット法によって検出することができる。

【0055】

また、前記抗体を固相化して、本発明の検出方法をサンドイッチ法又は競合法の形態とする場合には、抗原 - 抗体複合体を、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)又は免疫クロマトグラフィー法(IC)によって検出することができる。

【0056】

なお、競合法によって検出されるシグナルは、試料から抽出されたブタ血清アルブミンと前記抗体との抗原 - 抗体複合体に由来するものではないが、標識された抗原のシグナルの減弱により、該抗原 - 抗体複合体を間接的に検出することができる。そのため、競合法の形態である検出方法も、本発明の範囲に含まれることは言うまでも無い。

【0057】

本発明の検出方法は、好ましくはELISA法とする。このような実施の形態の本発明によれば、試料中のブタ血清アルブミンを定量的に検出することが可能である。

【0058】

本発明の検出方法は、食品試料に含まれる豚由来組織の検出のために用いることが特に有効である。

血液が通っていない組織は存在しないことから、血清アルブミンはあらゆる組織に存在するといっても過言ではない。

したがって、ブタ血清アルブミンを標的とする本発明の検出方法によれば、豚のどのような組織が食品中に混入していたとしても、これを検出することが可能である。

なお、ここで言う「豚由来組織」は、筋肉、脂、消化器官、循環器官、骨組織、脳など、豚の組織すべてを含む。

【0059】

<2>本発明の検査キット

本発明の検査キットは、上述の本発明の検出方法を実現するためのものである。したがって、本発明の検査キットについては、本発明の検出方法の実施の形態に用いられる抗体及び各試薬を含む。

【0060】

本発明の検査キットは、特に好ましくはELISAキットの形態とすることが好ましい。

このような実施の形態の検査キットによれば、簡便にブタ血清アルブミンの定量的な検出を行うことができる。

本発明の検査キットをELISAキットの形態とする場合には、前記抗体を固相化するためのプレートをさらに含んでも良い。

【0061】

<3>本発明の抗体の作製方法

10

20

30

40

50

[免疫工程]

本発明の作製方法は、変性したブタ血清アルブミンを免疫原として用いて動物（ブタ及びヒトを除く）を免疫する免疫工程を含む。

このように、変性したブタ血清アルブミンを免疫原とすることによって、ブタ血清アルブミンのC末端配列であるアミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体を容易に得ることができる。

【 0 0 6 2 】

免疫原とする変性したブタ血清アルブミンは、精製したブタ血清アルブミンに対して、加熱処理、SDS等のイオン性界面活性剤による処理、また、イオン性界面活性剤と2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールや亜硫酸ナトリウム等の還元剤を併用した処理を加えることによって得ることができる。

精製したブタ血清アルブミンを好ましくは100以上、より好ましくは120以上、さらに好ましくは130以上に加熱することによって変性させたものを免疫原とすることが好ましい。

【 0 0 6 3 】

このようにして得られた変性したブタ血清アルブミンの動物への投与、及び抗血清の取得は、当業者にとって周知のいずれのプロトコールをも使用することができる。

免疫する動物（以下、免疫動物）としては、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ等を例示することができる。

【 0 0 6 4 】

[精製工程]

前記抗血清の精製は、アミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列を含むペプチドが担持された精製カラムを用いることで行うことができる（精製工程）。

具体的には、前記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 (Amersham Pharmacia社製)に共有結合で固相化し、該固相化樹脂に前記抗血清を供する。そして、該抗血清中に含まれる前記アミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体を樹脂上に吸着させ、ついで、該樹脂上に吸着した前記ポリクローナル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る。

このような精製工程を行うことによって、前記ポリクローナル抗体の精製純度を容易に向上させることができる。

【 0 0 6 5 】

[中間精製工程]

本発明においては、前記精製工程の前に、変性したブタ血清アルブミンが担持された中間精製カラムを用いた中間精製工程を行うことが好ましい。中間精製カラムによる精製は、前記精製カラムによるポリクローナル抗体の精製と同様に行うことができる。

精製工程の前に中間精製工程を行うことによって、前記ポリクローナル抗体の精製純度をより向上させることができる。

【 0 0 6 6 】

アミノ酸一文字表記でPKFVIEIRGILAからなるアミノ酸配列は、ブタ血清アルブミンの全607アミノ酸残基のうちたった12アミノ酸残基である。また、ブタ血清アルブミンを変性させることで該アミノ酸配列が免疫原性を獲得することは全く知られていなかった。

本発明の作製方法によれば、変性したブタ血清アルブミンを免疫することで、前記アミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体を容易に作製することができる。

【 0 0 6 7 】

< 4 > 本発明のポリクローナル抗体

本発明の作製方法により作製されたポリクローナル抗体は、他種の血清アルブミンとの交差反応をほとんど示さずに、ブタ血清アルブミンを特異的に検出することができる。

10

20

30

40

50

【0068】

本発明のポリクローナル抗体の認識部位は、通常ブタ血清アルブミンの分子中に埋もれている。したがって、本発明のポリクローナル抗体を使用する際には、試料中のブタ血清アルブミンを変性させることが必要である。

【0069】

ウエスタンブロットにおいては、試料をイオン性界面活性剤及び還元剤の存在下で加熱し、タンパク質を変性させることが一般的である。そのため、本発明のポリクローナル抗体は、ウエスタンブロット法に適用することが好ましい。

【0070】

また、本発明のポリクローナル抗体は、上述した本発明の検出方法及び検出キットに適用することが特に好ましい。

本発明のポリクローナル抗体は、ブタ血清アルブミンに対する特異性が極めて高いため、本発明の検出方法及び検出キットに適用することにより、より高精度、高感度なブタ血清アルブミンの検査技術を実現することができる。

【実施例】

【0071】

< 1 > 中間精製カラムと精製カラムの作製

以下の方法で中間精製カラムと精製カラムを作製した。

150 mM NaCl、0.6% SDS、0.1 M Na_2SO_3 を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に精製ブタ血清アルブミンを 10 mg/ml の濃度で溶解し、沸騰水中に 10 分間浸漬した後、流水で冷却した。

このようにして得た変性したブタ血清アルブミン 25 mg を 5 mg/ml 樹脂の濃度で 5 ml のクロマトグラフィー用の樹脂に結合して、中間精製カラムを作製した。

【0072】

また、ブタ血清アルブミン C 末端ペプチド (配列: PKFVIEIRGILA) の N 末端にシステイン残基を結合したペプチドを合成し、このペプチドをシステイン残基のチオール基を介して 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 樹脂の濃度でクロマトグラフィー用の樹脂に結合して、精製カラムを作製した。

【0073】

< 2 > 中間精製工程

135 で処理したブタ血清アルブミンを免疫したウサギから得た抗血清を 40,000 $\times g$ で 20 分間遠心分離して上清を得た。

この上清 150 ml を中間精製カラムに 1 ml/min の流速で通じた後、60 ml の PBS で洗浄した。

その後、中間精製カラムに 0.1 M Glycine-HCl 緩衝液 (pH 2.3) を通じることにより、カラムに吸着したポリクローナル抗体を溶出した。

【0074】

溶出液は 0.2 ml の 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6) を含む試験管に 2 ml ずつ分取した。溶出液の各フラクションについて 280 nm の吸光度 (A_{280}) を測定し、 A_{280} が 0.5 以上であったフラクションをプールした。

こうして得られた抗体量は約 70 mg であった ($A_{280} = 1.4 = 1 \text{ mg}/\text{ml}$ とし て計算)。

上記操作を 4 回繰り返し、約 280 mg のポリクローナル抗体を得た。

【0075】

< 3 > 精製工程

中間精製工程で得られたポリクローナル抗体を、精製カラムに通じた後、15 ml の PBS で洗浄した。

その後、精製カラムに 0.1 M Glycine-HCl 緩衝液 (pH 2.3) を通じることにより、カラムに吸着したポリクローナル抗体を溶出した。

【0076】

なお、精製カラムにより吸着されなかったポリクローナル抗体は、抗変性ブタ血清アルブミンポリクローナル抗体として回収した。

【0077】

溶出液は0.05mlの1M Tris-HCl緩衝液(pH8.6)を含む試験管に0.5mlずつ分取した。溶出液の各フラクションについて吸光度を測定し、A280が0.5以上のフラクションをプールした。

このようにして、ブタ血清アルブミンのC末端の前記アミノ酸配列に特異的に結合するポリクローナル抗体を約2mg得た。

【0078】

<4>固相化

精製工程で得られたポリクローナル抗体を50mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)によって1μg/mlに調製し、0.1mlずつ96穴マイクロプレートに分注して室温で2時間静置した。

その後、ウェルから当該抗体溶液を捨て、150mM NaClと0.02% Tween20を含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で洗浄した後、1mg/mlの卵白アルブミンを含む同緩衝液を200μlずつ分注して室温で2時間静置した。このようにして、精製工程で得たポリクローナル抗体が固相化された固相化プレートを作製した。固相化プレートは使用時まで4で保存した。

【0079】

<5>ELISA測定系の構築

中間精製カラムにより吸着されなかった前記抗変性ブタ血清アルブミンポリクローナル抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼで標識し標識抗体を調製した。

【0080】

0.6% SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.05% Tween20、1mg/ml BSAを含む20mM Tris-HCl(pH7.4)に、精製ブタ血清アルブミンを10mg/mlの濃度で溶解し、沸騰水中で10分間加熱して流水中で冷却し、変性したブタ血清アルブミンを含む溶液を得た。

この溶液を150mM NaCl、0.05% Tween20、1mg/ml BSAを含む20mM Tris-HCl(pH7.4)で希釈することで、表1に示す濃度の変性ブタ血清アルブミン標準溶液を調製した。

【0081】

そして、前記標準溶液を用いて、前記標識抗体と前記固相化プレートによるELISA測定を常法により行い、検量線を作成した。すなわち、固相化プレートのウェルに前記標準溶液を分注し静置した。静置後、緩衝液によってウェルを洗浄し、基質溶液をウェルに加え、比色定量を行った。

表1に前記標準溶液における変性ブタ血清アルブミンの濃度と、比色定量の結果を示し、図1に検量線を示す。

【0082】

【表1】

[表1]

変性ブタ血清アルブミン濃度(ng/ml)	0	2	4	8	16	32	64	128
吸光度(450nm-630nm)	0.193	0.238	0.294	0.364	0.458	0.543	0.666	0.807

【0083】

表1と図1に示すように、標準溶液における変性ブタ血清アルブミンの濃度に依存して吸光度が上昇している。この結果は、本実施例で構築したELISA系によれば、ブタ血清アルブミンを定量的に検出できることを示している。

【0084】

<6>交差反応の有無の確認

0.6% SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.05% Tween20、1mg/ml BSAを含む20mM Tris-HCl(pH7.4)でヒト、ウシ、ヒ

10

20

30

40

50

ツジ、ヤギ、ウサギ、ニワトリの精製血清アルブミンを10 mg/mlの濃度で溶解し、沸騰水中で10分間加熱して流水中で冷却し、変性血清アルブミンを含む溶液を得た。

この溶液0.5 mlに9.5 mlの150 mM NaCl、0.05% Tween 20、1 mg/ml BSAを含む20 mM Tris-HCl (pH 7.4)を加えて試料を調製した。この試料の血清アルブミンの濃度は500000 ng/mlである。

【0085】

そして、本実施例で構築したELISA測定系を用いてこの試料を測定し、比色定量の結果を前記検量線に当てはめることで測定値を算出した。

そして、この試料の濃度(500000 ng/ml)に対する前記測定値の割合を計算し、ブタ血清アルブミンに対する交差反応性を算出した。

10

結果を表2に示す。

【0086】

【表2】

[表2]

由来	濃度	測定値	ブタ血清アルブミンに対する交差反応性
	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)
ヒト	500,000	1.534	0.0003
ウシ	500,000	1.534	0.0003
ヒツジ	500,000	19.5	0.002
ヤギ	500,000	7.84	0.001
ウサギ	500,000	0.35	0.00007
ニワトリ	500,000	0.19	0.00004

20

【0087】

表2に示す通り、構築したELISA測定系は、いずれの種の血清アルブミンについても、ブタ血清アルブミンに対する交差反応性が1/50000以下と極めて低い値であった。

この結果は、本実施例で構築したELISA測定系は、他種の血清アルブミンへの交差反応性がほとんど無く、極めて高い特異性をもってブタ血清アルブミンを検出することができることを示している。

30

【0088】

<7> 食品試料からのブタ血清アルブミンの検出

脂肪部分を取り除いた豚モモ肉(非加熱のもの、100 で30分加熱したもの、121 で30分加熱したものの3種類)、豚心臓、豚肝臓、豚気管(軟骨)、豚背脂、茹でた豚白モツ(小腸)、そして、牛もも肉、鶏胸肉、羊肉をそれぞれミキサーでミンチした。

それぞれのミンチ肉1 gに19 mlの0.6% SDS、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、1 mM を含む20 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)を加えてホモゲナイズし、沸騰した湯で10分間加熱処理した。これを流水で冷却し、20 で20分間、20,000 x gで遠心分離し、上清を分収した。

40

そして、本実施例で構築したELISA測定系でこの上清を測定し、ブタ血清アルブミンの含有量を定量した。結果を表3に示す。

【0089】

【表3】

[表3]

No.	試料	ブタ血清アルブミン の含有量 (ng/g 試料)
1	豚もも肉(非加熱)	1,030,000
2	豚もも肉(100°C, 30分)	801,000
3	豚もも肉(121°C, 30分)	248,000
4	豚肝臓	831,000
5	豚心臓	1,500,000
6	豚小腸(ポイル)	1,550
7	豚背脂	532,000
8	豚軟骨	1,220,000
9	牛もも肉	<2
10	羊肉	<2
11	鶏胸肉	<2

10

【0090】

表3に示すように、いずれの豚由来の試料からもブタ血清アルブミンが検出された。

この結果は、本実施例で構築したELISA測定系によれば、食品試料等に豚由来のいずれの組織が混入していたとしても、これを検出できることを示している。

【0091】

また、表3に示すように、牛もも肉、羊肉、そして鶏胸肉からは、ブタ血清アルブミンが存在することを示す測定値が得られなかった。

20

この結果は、本実施例で構築したELISA測定系は、牛肉や鶏肉など豚肉以外の肉類には交差反応性を示さないため、これらの肉類に豚由来組織が混入している場合であっても、極めて高い特異性をもってこれを検出することができることを示している。

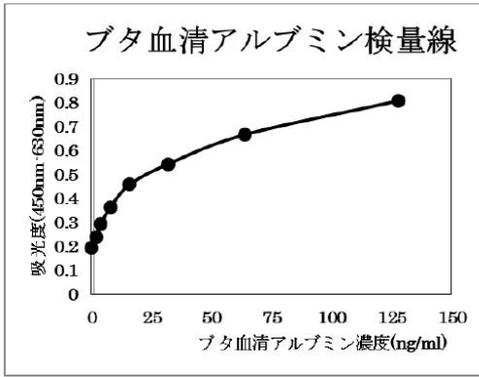
【産業上の利用可能性】

【0092】

本発明は食品試料に含まれた豚由来組織を検出するための検査キットに応用することができる。特にイスラム教のハラールに対応する食品であるか否かの検査に応用することができる。

30

【 図 1 】



专利名称(译)	检测猪血清白蛋白的方法，检测试剂盒和抗猪血清白蛋白抗体		
公开(公告)号	JP2016194443A	公开(公告)日	2016-11-17
申请号	JP2015074165	申请日	2015-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所		
[标]发明人	本庄勉 境雅寿 油谷賢一		
发明人	本庄 勉 境 雅寿 油谷 賢一		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K14/765		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K16/18 C07K14/765 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/DA70 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/FA71 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种高度准确的猪血清白蛋白检测技术。一种检测样品中猪血清白蛋白的方法，该方法包括：(1)用含有离子表面活性剂的水性溶剂提取和/或溶解样品中的猪血清白蛋白，得到蛋白质溶液，(2)使与单字母氨基酸编码的PKFVIEIRGILA组成的氨基酸序列特异性结合的抗体与上述步骤(1)中得到的蛋白质溶液接触，形成抗体复合物，和(3)检测形成的抗原-抗体复合物，它的特点是包括。【选择图表】无