

学 位 論 文 要 旨

加工食品中における鶏卵および牛乳検出のための ELISA キットの  
開発に関する研究

Studies on the Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
Kits for the Detection of Chicken Egg and Cow's Milk Protein in  
Processed Foods

加藤 重城

Shigeki KATO

平成 26 年度

2014

食物アレルギー患者は増加傾向にあり、社会的な関心も高い。我が国では、アレルギー物質による健康被害を未然に防ぐため、2002年以降、厚生労働省通知（食安発 1011002 号、以下、通知）により特定原材料として 7 品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）の表示が義務付けられた。一方で、食品表示を検証するための定量検査法として Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（以下、ELISA）が通知で示され、すでに開発されている 2 種の ELISA キットが通知法として指定されている。これらの ELISA キットは、ポリクローナル抗体（以下、PAb）または PAb とモノクローナル抗体（以下、MAb）の組み合わせで構築されており、これまでに MAb のみで構築された ELISA キットはない。様々な原材料を混合して製造される加工食品から、特定原材料のみを正確に検出するためには、高い特異性を有する抗体が不可欠である。一般的に MAb は PAb に比べ特異性が高いため、MAb のみで ELISA キットが構築できれば、特異性に優れた新たな検査特性を有するキットの開発が可能と考えた。そこで、本研究では食物アレルギーの原因物質として 60%以上を占める卵と乳を対象に、MAb を使用した新たな ELISA キットの開発を試みた。

さらに、ELISA キットを開発する上では、通知法に指定された抽出方法に対応することが求められる。通知法には、加工食品から特定原材料を効率良く抽出する方法として、ドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDS）と 2-メルカプトエタノール（以下、2-ME）を含有した抽出液を用いる方法が指定されている。これは、加熱や加圧により変性した加工食品中の特定原材料タンパク質を SDS と 2-ME で変性して抽出することにより、食品の種類や加工度を選ばず、混入

量を正確に測定できることが特徴である。そのため、SDS と 2-ME で変性したタンパク質を検出できる MAb を作製するため、免疫抗原として未変性および還元カルボキシメチル化（以下、RCM 化）タンパク質を選択し、SDS と 2-ME で変性したタンパク質を検出可能な MAb の選択と ELISA キットの構築を検討した。

第 1 章では、鶏卵白のオボアルブミン（以下、OVA）に対する MAb を作製し、鶏卵検出用 ELISA キットの構築を試みた。未変性または RCM 化 OVA を免疫抗原として 23 種類の MAb を作製し、SDS と 2-ME で変性した鶏卵白を検出可能な MAb の組み合わせが 85 通り認められ、通知法の抽出方法に対応が可能であった。また、いずれも RCM 化 OVA を免疫抗原として作製した MAb の組み合わせであったことから、免疫抗原の RCM 化が適切な選択であったと考えられた。しかしながら、1 対の MAb の組み合わせではアヒルまたはウズラの卵に対する感度が不足していたため、プレート固相抗体に 2 種類、酵素標識抗体に 2 種類の MAb を用いたところ、鶏卵と同等の検出感度は得られなかったが、アヒルとウズラの卵も検出が可能であったことから、この MAb の組み合わせで鶏卵検出用 ELISA キットを構築した。測定可能な鶏卵タンパク質濃度は 0.8~50.0 ng/mL（食品試料換算で 0.3~20.0 µg/g）であり、通知法の ELISA キットと同等の検出感度を有していた。鶏卵タンパク質を 10.0 µg/g 添加した 5 種類のモデル加工食品での添加回収試験の結果、回収率は 73.6~118.0% であり、通知の添加回収試験の基準である 50%以上、150%以下を満たしていたことから、食品成分の影響を受けず正確な測定が可能であった。さらに、鶏、アヒルおよびウズラの卵以外の食品には交差反応を示さず特異性が高かったことから、MAb の特異性が大きく影響

していると考えられた。構築した鶏卵検出用 ELISA キットは、加工食品中の鶏卵タンパク質量の正確な測定が可能であり、極めて特異性が高く通知法と同等の測定が可能であることが認められた。

第2章では、牛乳の  $\beta$ -ラクトグロブリン（以下、 $\beta$ -LG）を選択し、前述の鶏卵検出用 ELISA キットと同様に、通知法の抽出方法に対応した牛乳検出用 ELISA キットの開発を試みた。未変性または RCM 化  $\beta$ -LG を免疫抗原として 38 種類の MAb が得られ、SDS と 2-ME で変性した牛乳タンパク質を検出可能な MAb の組み合わせが 151 通り認められたが、1 対の MAb の組み合わせでは検出感度が不足していた。そこで、プレート固相抗体に、未変性  $\beta$ -LG および RCM 化  $\beta$ -LG 抗原から得られた MAb を 1 種ずつ混合して組み合わせ、酵素標識抗体に 1 種を使用したところ、通知法と同等の検出感度が得られたため、この MAb の組み合わせで牛乳検出用 ELISA キットを構築した。このことから、特性の異なる MAb を組み合わせることで検出感度の向上が認められたと考えられた。測定可能な牛乳タンパク質濃度は 0.8~50.0 ng/mL (食品試料換算で 0.3~20.0  $\mu$ g/g) であり、通知法の ELISA キットと同等の検出感度を有していた。牛乳タンパク質を 10.0  $\mu$ g/g 添加した 5 種類のモデル加工食品での添加回収試験の結果、回収率は 61.1~77.9% であり、50% 以上、150% 以下の基準を満たしていたことから、加工食品中の牛乳タンパク質量の正確な測定が可能であると考えられた。また、山羊乳および羊乳以外の食品には交差反応を示さなかったことから、MAb の特異性が大きく影響していると考えられた。さらに、構築した牛乳検出用 ELISA キットと通知法を併用することで、牛乳の原材料表示を漏れなく検証するために利用できることが認められ、新たな検査特性を有する牛乳

検出用 ELISA キットの提供が可能であると考えられた。

第 3 章では、第 1 章と第 2 章で構築した ELISA キットを、アレルギー ELISA 卵（以下、AE-Egg）とアレルギー ELISA 牛乳（以下、AE-Milk）として製品化し、外部機関での試験室間バリデーションによる性能評価を実施した。これは、多数の試験室が共通の試料を分析し、その結果を統計的に解析することで検査キットの検査精度を評価する方法である。定量検査法の場合、試験室数 8 以上、試料数 5 以上という規定が通知のガイドラインに定められているため、試験室数 14 機関、試料数 5（5 種類のモデル加工食品）を設定し試験を実施した。その結果、回収率は AE-Egg で 61.6～89.3%、AE-Milk で 52.1～67.0% であり、基準である 50% 以上、150% 以下を満たしていた。また、室間再現性は AE-Egg で 3.7～5.7%、AE-Milk で 6.8～10.5% であり、基準である 25% 以下を満たしていた。このことから、AE-Egg と AE-Milk は、加工食品中の鶏卵および牛乳タンパク質を検出するための ELISA キットとして正確な測定が可能であり、検査精度が高いことが認められた。

本研究では、複数の MAbs を組み合わせた鶏卵および牛乳検出用 ELISA キットを新たに開発し、試験室間バリデーションでの性能評価により定量検査法の評価基準を満たすことを確認した。現在、本キットは通知の基準を満たすキットとして認められ既に販売を開始しており、地方自治体や保健所などの行政機関、ならびに食品事業者などで幅広く使用されている。また、その他の特定原材料についても、MAbs を活用した新たな ELISA キットの開発を進めている。本キットが特定原材料表示の検証に利用され、食物アレルギー患者の健康被害防止に大いに貢献するものと期待される。