

技術レポート**2 飼料中の牛由来たん白質検出法における「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」の検討**武田 然也^{*1}, 橋本 仁康^{*2}, 山本 貴之^{*3}**Assessment of Morinaga ELISA Kit Ver.2 Detecting Bovine Protein in Feeds**Zenya TAKEDA^{*1}, Yoshiyasu HASHIMOTO^{*2} and Takayuki YAMAMOTO^{*3}<sup>(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department,
(Now Nagoya Regional Center),</sup>^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department^{*3} Morinaga Institute of Biological Science, Inc.)**1 緒 言**

日本で牛海綿状脳症（BSE）の発生が確認されて以来、BSE の感染拡大を防止するために、動物性たん白質の飼料への利用が規制され、対象家畜の種類により利用できる動物性たん白質原料の種類が規定されている^{1),2)}。このため、飼料分析基準³⁾では、検出方法として、顕微鏡鑑定法、PCR 法及び ELISA 法の 3 つを用い、各試験法の結果を総合的に判断して判定を行っている。これらの試験法のうち、ELISA 法では、市販の動物種別たん白質検出キットである ELISA Technologies 製「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEED」（以下「メライザキット」という。）と森永生科学研究所製「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」（以下「モリナガキット」という。）が定められている³⁾。ただしこれらのキットは、反応性の違いから、検査の対象飼料の適用範囲が限られているため（Table 1）、適用範囲の拡大が求められてきたところである。

森永生科学研究所で新たに開発された「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」（以下「モリナガキット Ver.2」という。）は、骨格筋中のウシミオグロビンと特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた定性試験キットである（Table 2）。そのため、植物性飼料原料、乳製品、牛以外の動物由来たん白質には反応しないことが期待されたことから、各種飼料への適用の可否を検討し、動物由来たん白質検出法としての有用性を確認することとした。

今回、モリナガキット Ver.2 の有用性を確認するために、配合飼料 3 点、植物性飼料原料 22 点及び動物性飼料原料 37 点を用いた特異性確認試験、6 点の配合飼料及び飼料原料中の牛肉骨粉の検出下限の検討及びキットの安定性に関する検討を行ったのでその概要を報告する。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 同名古屋センター^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部^{*3} 株式会社森永生科学研究所

Table 1 Applicability of three ELISA kits

Feed	(A/NA : Applicable/Not Applicable)		
	Analysis		
	Bovine	Bovine	Ruminant
	Morinaga Ver.2	Morinaga ^{a)}	MELISA ^{b)}
Formula feed	A	A	NA
Fish meal	A	A	NA
Poultry by-product meal, blood meal	Poultry	A	NA
	Swine or horse	NA	A
Pork MBM ^{c)}	A	NA	A
Pork and chicken MBM	A	NA	A

a) Morinaga ELISA kit against a heat-treated bovine protein is a product of Morinaga Institute of Biological Science, Inc.

b) MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEED is a product of ELISA Technologies, Inc.

c) Pork meat and bone meal

Table 2 Comparison of characteristic of three ELISA kits

	Morinaga Ver.2	Morinaga	MELISA
Antibody	Mouse anti-bovine myoglobin monoclonal antibody	Rabbit anti-135 °C bovine serum albumin antibody	Troponin I monoclonal antibody
Positive control	High and low concentration positive controls	Dilute positive control by ×2, ×4, ×8, and ×16	Dilute 10 % positive control by 1 % and 0.05 %
Extraction solution	Mercaptoethanol additive-free	3.1 % mercaptoethanol additive	EDTA supplemented PBS
Extraction	50 mL tube Shake with shaker	Homogenize with food processor	Erlenmeyer flask Shake with shaker
Reaction time	First reaction 1 hour	First reaction 2 hours	First reaction 20 minutes
	Second reaction 1 hour	Second reaction 30 minutes	Second reaction 20 minutes
	Enzyme reaction 20 minutes	Enzyme reaction 10 minutes	Third reaction 20 minutes Enzyme reaction 20 minutes
Determination (cutoff point)	Absorbance value of low concentration positive control	(Absorbance value of negative control) ×2	(Absorbance value of negative control) ×2

2 実験方法

2.1 試料

供試した飼料原料及び配合飼料は、飼料製造業者から入手した。とうもろこし、大麦等の粒状の飼料及び配合飼料は、検査試料約 150 g をミルサーで粒径 1 mm 程度になるまで粉砕した。その他の検査試料は調製せずに用いた。豚肉骨粉等は、反すう動物由来 DNA が含まれていないこと、それ以外の試料は、牛由来 DNA が含まれていないことを PCR 法により確認したものを用いた。

2.2 試薬

1) 森永生科学研究所製「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」

i) 抽出液

キットに添付されている 10 倍濃縮抽出液 A 液 100 mL, 10 倍濃縮抽出液 B 液 100 mL 及び 10 倍濃縮抽出液 C 液 100 mL と精製水 700 mL とを混合して抽出液とした。

ii) 検体希釈液

キットに添付されている 10 倍濃縮検体希釈液 5 mL に蒸留水を加え 50 mL とした。

iii) 動物由来及び植物由来陰性対照液

キットに添付されている陰性対照溶液 I (特定動物種の筋肉組織対照液 (豚モモ肉 5 mg/mL 相当)) 及び陰性対照溶液 II (植物組織対照液 (植物配合飼料 5 mg/mL 相当)) を用いた。

iv) 高濃度及び低濃度陽性対照液

キットに添付されている高濃度標準品 (特定動物種の筋肉組織対照液 (牛モモ肉 50 µg/mL 相当)) 及び低濃度標準品 (特定動物種の筋肉組織対照液 (牛モモ肉 3 µg/mL 相当)) を用いた。

v) 抗体固相化モジュール

キットに添付されている抗体固相化プレートを用いた。

vi) 洗浄液

キットに添付されている 20 倍濃縮洗浄液 50 mL と蒸留水 950 mL とを混合して洗浄液とした。

vii) 酵素標識抗体溶液

キットに添付されている酵素標識抗体溶液を用いた。

viii) 酵素基質溶液

キットに添付されている酵素基質溶液 (TMB 溶液) を用いた。

ix) 反応停止液

キットに添付されている反応停止液を用いた。

2) 森永生科学研究所製「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」

3) ELISA Technologies 製「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEED」

2.3 装置及び器具

1) 粉砕器：岩谷産業製 IFM-300DG

2) 振とう機：Scientific Industries 製 VORTEX-GENIE2

3) 遠心分離器：BECKMAN 製 Allegra 6 centrifuge

4) マイクロプレートリーダー：TECAN 製 Sunrise Rainbow Thermo

5) プレートウォッシャー：ファスマック製 簡易型 96 穴プレート洗浄器

6) シングルチャンネルマイクロピペット：BIOHIT 製 m1000 (100~1000 µL)

7) 8 チャンネルマイクロピペット：Eppendorf 製 Research M (30~300 µL)

2.4 試験方法

1) モリナガキット Ver.2

キットの説明書に記載された手順に従い試験を行った。内容は以下のとおりである。

i) 抽出

試料 1.0 g を量って 50 mL の遠心チューブに入れ、抽出液 19 mL を加え振とう機を用いて 30 秒間激しく攪はんした後 10 秒間静置した。この攪はん操作を繰り返し 3 回行った後、沸騰水浴中で 10 分間加熱した後放冷し、3,000×g で 10 分間遠心分離し、上清みをろ紙 (5 種 A) でろ過した。このろ液 50 µL をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) に入れ検体希釈液 950 µL

を加えて振り混ぜ、ELISA 操作に供する試料溶液とした。

ii) ELISA 操作

試料溶液、高濃度及び低濃度陽性対照液、動物由来及び植物由来陰性対照液及び検体希釈液（ブランク用）各 100 μ L を、抗体固相化モジュールにそれぞれ 2 ウェルずつ入れ、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、室温で 1 時間反応させた。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 μ L を加えて 6 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルに酵素標識抗体溶液 100 μ L ずつを加え、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、室温で 1 時間反応させた。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 μ L を加えて 6 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルに酵素基質溶液 100 μ L ずつを加え、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、遮光し室温で 20 分間反応させた。更に各ウェルに反応停止液 100 μ L ずつを加え、酵素反応を停止させた。30 分以内に各ウェルの 450 nm 及び 620 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度値から 620 nm の吸光度値を差し引いた値を測定値とした。

iii) 試験の成立条件

以下の条件を全て満たした場合とした。

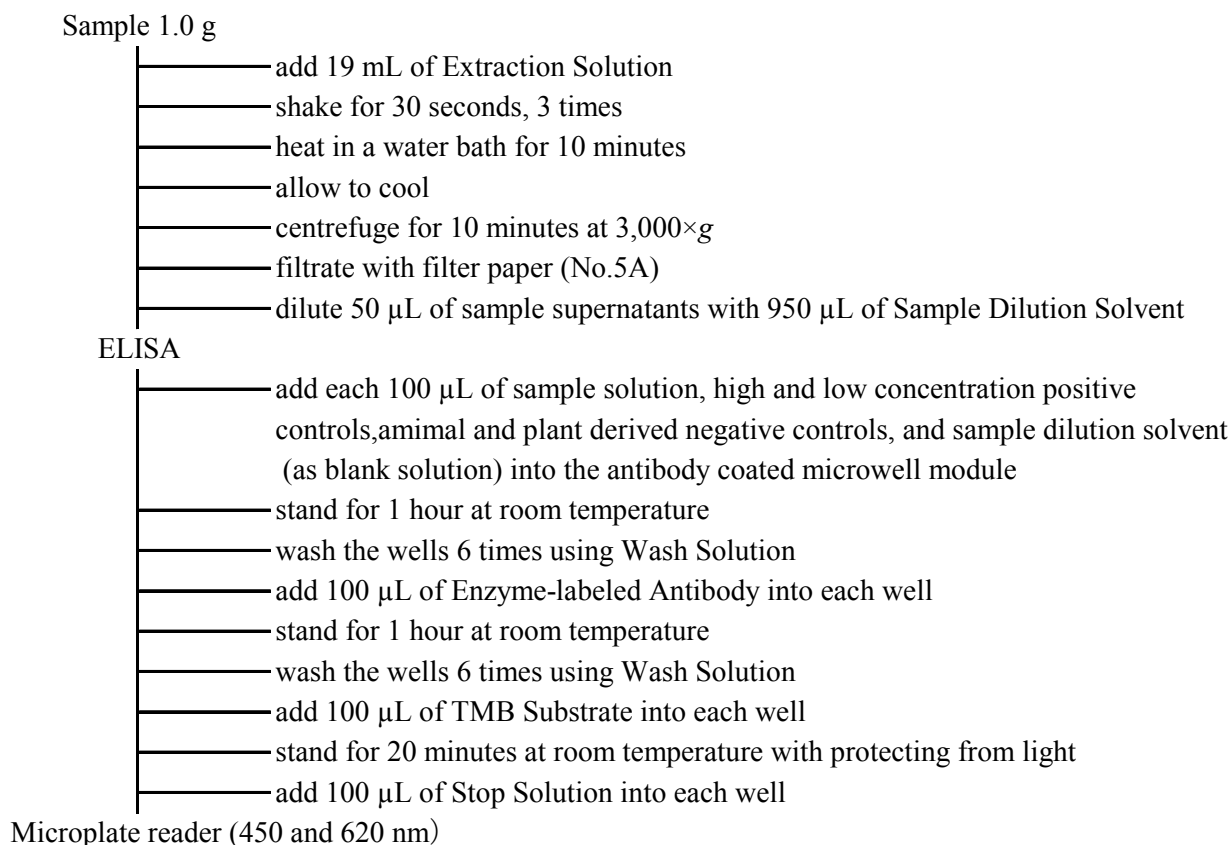
- ・測定されたブランクの測定値が 0.08 以下であり、かつ高濃度陽性対照液の測定値が 0.8 以上 1.6 以下であること。
- ・測定された動物由来及び植物由来陰性対照液の測定度が 0.08 以下であること。

iv) 判定

低濃度陽性対照液の測定値を陽性判定基準値とした。試料溶液の測定値が陽性判定基準値以上であった場合、当該試料は陽性と判定し、それ以外を陰性と判定した。

2) モリナガキット及びメライザキット

平成 22 年 6 月 4 日付けで一部改正された飼料分析基準に記載されている³⁾、ELISA による飼料中の動物由来たん白質の検出法に基づき実施した。



Scheme 1 Procedure of Morinaga Ver.2 assay

3 結果及び考察

3.1 特異性の検討

配合飼料 3 点, 植物性飼料原料 22 点及び動物性飼料原料 37 点を用いて, モリナガキット Ver.2 の反応性を検討するとともに, 現行の飼料分析基準に記載されている 2 つのキットとの比較を行った (Table 3) .

モリナガキット Ver.2 は, 供試した各飼料原料及び配合飼料すべてが陰性と判定され, 非特異反応は認められなかった. 一部の豚肉骨粉に対し測定値が高い値を示す傾向が見られたが, すべて陰性であった. 他の原料及び配合飼料はブランクの吸光度と同等の測定値を示し, 非特異反応は認められなかった.

メライザキットは, モリナガキット Ver.2 と同様に, 供試した各飼料原料及び配合飼料で非特異反応を示さなかった. しかしながら, メライザキットは豚肉骨粉中の牛肉骨粉に対しては特異性が高いものの⁴⁾, 配合飼料中の牛肉骨粉に対しては特異性が低く, 配合飼料の分析には適当ではないという報告⁵⁾がある. また, モリナガキットで非特異反応を示した一部の植物性飼料原料、牛由来の脱脂粉乳及び乾燥ホエーでは, モリナガキット Ver.2 は非特異反応を示さず, また, 豚及び牛由来のゼラチンについても非特異反応は見られなかった. これらのことから, モリナガキット Ver.2 は, 供試した植物性飼料, 動物性飼料及び配合飼料のうち, 牛肉粉及び牛肉骨粉のみ陽性反応を示し, 飼料中の牛由来たん白質検出に特異性の高いキットであることが示唆された.

Table 3 Specificity of various feed materials and bovine meat and bone meal (bovine MBM) using Morinaga Ver.2 assay

(+/- : Detected/Not detected)

Sample	Morinaga Ver.2	Morinaga	MELISA	Sample	Morinaga Ver.2	Morinaga	MELISA
Corn, flaked	-	-	-	Pork MBM 2	-	+	-
expanded	-	+	-	Pork MBM 3	-	+	-
Barley, flaked	-	-	-	Pork MBM 4	-		
Soybean meal, dehulled	-	-	-	Pork MBM 5	-		
Rapeseed meal	-	+	-	Pork and chicken MBM 1	-	+	-
Beet pulp	-	-	-	Pork and chicken MBM 2	-	+	-
Cotton seed	-	-	-	Pork and chicken MBM 3	-	+	-
Rice bran	-	-	-	Pork and chicken MBM 4	-	+	-
Corn gluten meal	-	-	-	Pork and chicken MBM 5	-	-	-
Corn gluten feed	-	-	-	Pork and chicken MBM 6	-	+	-
Grain sorghum	-	-	-	Pork and chicken MBM 7	-		
Wheat bran	-	-	-	Pork and chicken MBM 8	-		
Cacao husk	-	-	-	Pork and chicken MBM 9	-		
Palm kernel meal	-	-	-	Pork and chicken MBM 10	-		
Brewers grains	-	-	-	Pork and chicken MBM 11	-		
Soy sause cake	-	-	-	Pork and chicken MBM 12	-		
Paprika extract	-	-	-	Pork and chicken MBM 13	-		
toasted soybean flour	-	-	-	Chicken meal 1	-	-	-
Soybean flaked	-	-	-	Chicken meal 2	-	-	-
Rapeseed	-	-	-	Feather meal 1	-	-	-
Soybean curd residue	-	-	-	Feather meal 2	-	-	-
Dextrin	-	-	-	Dried skim milk 1	-	+	-
Formula feed 1	-	-	-	Dried skim milk 2	-		
Formula feed 2	-	-	-	Dried skim milk 3	-		
Formula feed 3	-	-	-	Dried Whey	-	+	-
Crab meal	-	-	-	Gelatin, porcine-derived 1	-		
Fish meal 1	-	-	-	Gelatin, porcine-derived 2	-		
Fish meal 2	-	-	-	Gelatin, bovine-derived 1	-		
Fish meal 3	-	-	-	Gelatin, bovine-derived 2	-		
Shell meal	-	-	-	Bovine MBM 1	+		+
Pork MBM1	-	+	-	Bovine MBM 2	+	+	

3.2 検出下限

肉用牛肥育用配合飼料，脱脂粉乳として20%相当量を添加した肉用牛肥育用配合飼料，魚粉，原料混合肉骨粉2種類及び豚肉骨粉を用い，それぞれに牛肉骨粉を0.05%及び0.1%添加した試料を調製して検出下限の検討を行った（Table 4）。各試料の吸光度を陽性対照溶液（低濃度標準品）の測定値（=0.084）と比較すると，牛肉骨粉を添加した試料について，全ての濃度で牛由来たん白質が検出（=陽性判定）可能であった。

脱脂粉乳に牛肉骨粉を添加し添加試験を実施したところ、牛肉骨粉として 0.1 % 添加した時、牛由来たん白質を検出できなかった。そのため、実際の流通飼料の配合割合を考慮し、脱脂粉乳として 20 % 相当量を添加した肉用牛肥育用配合飼料を調製し、これを乳製品試料として牛肉骨粉を添加し添加試験を行った。その結果、牛肉骨粉を 0.05 % 添加した試料で牛由来たん白質を検出可能であった。しかしながら、飼料原料の製造方法及び配合飼料中の原料の混合条件等により測定値が異なること、また、試験室による試料の測定値のばらつきを考慮すると、当該キットの検出下限は 0.1 % と考えられた。現行のキットの検出下限は、メライザキットでは牛肉粉として 0.15 %⁴⁾、モリナガキットでは牛肉骨粉として 0.1 %⁶⁾ であり、当該キットは現行のキットとほぼ同等の検出感度であることが示された。

Table 4 Results of Morinaga Ver.2 assay on six samples of feed containing bovine MBM at different levels

Sample	Contamination level of bovine MBM		
	0 %	0.05 %	0.10 %
	O.D. ^{a)}	O.D.	O.D.
Formula feed	0.016	0.143	0.243
Formula feed contained with 20 % dried skim milk	0.014	0.126	0.280
Fish meal	0.025	0.102	0.182
Pork and chicken MBM 1	0.036	0.115	0.207
Pork and chicken MBM 2	0.030	0.104	0.192
Pork MBM	0.051	0.109	0.187

a) Subtracted value of absorbance at 620 nm from absorbance at 450 nm

3.3 再現性に関する検討

検体希釈液を抗体固相化モジュールの 6 ウェル、高濃度陽性対照液を 4 ウェル、低濃度陽性対照液を 6 ウェル、豚肉骨粉の試料溶液を 64 ウェル、牛肉骨粉を 0.1 % 添加した豚肉骨粉の試料溶液を 16 ウェルに分注したプレートを 5 枚用いて同時再現性試験を行った (Table 5)。

高濃度陽性対照液、低濃度対照液及び牛肉骨粉を 0.1 % 添加した豚肉骨粉については全て陽性を示し、それぞれの全測定値に対する変動係数は 10 % 以下であり、また、豚肉骨粉は全て陰性を示し、その全測定値に対する変動係数は 15 % であった。このことから、当該キットのウェル間及びプレート間での測定値のばらつきは小さく、再現性の高さが示された。

Table 5 Within-run reproducibility of Morinaga Ver.2 using 60 strips of antibody coated microwell module

	Number of wells	O.D. ^{a)}	RSD ^{b)} (%)
Blank	30	0.011	37
Low concentration positive control	24	0.117	5.9
High concentration positive control	20	1.428	4.3
Pork MBM	320	0.034	15
Pork MBM containing 0.1 % bovine MB	80	0.195	3.6

a) Subtracted value of absorbance at 620 nm from absorbance at 450 nm

b) Relative Standard Deviation

3.4 安定性に関する検討

4 °C で 1 週間, 3 週間, 1 ヶ月間及び 2 ヶ月間保存したモリナガキット Ver.2 の, 陽性及び陰性対照液, 並びに添加試験で用いた牛肉骨粉無添加及び 0.1 % 添加した飼料に対する反応性について検討を行った (Table 6) .

保存期間に係わらず全てのキットで, 低濃度及び高濃度陽性対照溶液の測定値はそれぞれ $\pm 10\%$ 以内であり, 測定値は安定していた. また, 牛肉骨粉無添加の試料は全て陰性, 0.1 % 添加した試料は全て陽性を示し, それぞれの試料について各期間の測定値も大きなばらつきは見られなかった. これにより, 当該キットの 2 ヶ月間における高い安定性が示された. 今後, 期間を延長し, 保存による安定性の検討を行う予定である.

Table 6 Reactivity to positive and negative controls and six samples of feed using Morinaga Ver.2 stored for up to two months

(+/- : Detected/Not detected)

Sample	Contaminati on level of bovine MBM	Passed time										
		0		1 week		3 weeks		1 month		2 months		
		O.D. ^{a)}	O.D. Result	O.D. Result	O.D. Result	O.D. Result	O.D. Result	O.D. Result	O.D. Result			
Blank		0.015	0.021			0.017		0.021			0.024	
Low concentration positive control		0.104	0.116			0.107		0.106			0.107	
High concentration positive control		1.318	1.334			1.278		1.237			1.228	
Negative control (pork)		0.017	0.025			0.020		0.024			0.024	
Negative control (plant)		0.020	0.024			0.019		0.023			0.024	
Formula feed	0 %		0.020	-		0.016	-	0.021	-		0.021	-
	0.10 %		0.215	+		0.190	+	0.206	+		0.247	+
Formula feed contained with 20 % dried skim milk	0 %		0.022	-		0.019	-	0.020	-		0.020	-
	0.10 %		0.169	+		0.155	+	0.163	+		0.197	+
Fish meal	0 %		0.026	-		0.025	-	0.028	-		0.027	-
	0.10 %		0.203	+		0.192	+	0.203	+		0.239	+
Pork and chicken MBM 1	0 %		0.037	-		0.032	-	0.034	-		0.037	-
	0.10 %		0.215	+		0.194	+	0.207	+		0.238	+
Pork and chicken MBM 2	0 %		0.026	-		0.021	-	0.023	-		0.025	-
	0.10 %		0.193	+		0.181	+	0.191	+		0.220	+
Pork MBM	0 %		0.045	-		0.043	-	0.043	-		0.047	-
	0.10 %		0.200	+		0.182	+	0.184	+		0.221	+

a) Subtracted value of absorbance at 620 nm from absorbance at 450 nm

4 まとめ

モリナガキット Ver.2 による飼料中の牛由来たん白質の検出法について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 植物性飼料、動物性飼料及び配合飼料を用いて反応性を検討したところ、牛由来たん白質を特異的に検出することが確認された。
- 2) 肉用牛肥育用配合飼料、脱脂粉乳として 20 %相当量を添加した肉用牛肥育用配合飼料、魚粉、原料混合肉骨粉 2 点及び豚肉骨粉に牛肉骨粉を添加した試料を用いて、当該キットの検出下限を検討したところ、牛肉骨粉の検出下限は 0.1 %であり、現行のキットとほぼ同等の検出感度であった。
- 3) 抗体固相化モジュールを 5 プレート相当量用いて、高濃度及び低濃度陽性対照液、豚肉骨粉並びに牛肉骨粉を 0.1 %添加した豚肉骨粉の試料溶液について同時再現性試験を行ったところ、それぞれの測定値に大きなばらつきは見られず、高い再現性が示された。
- 4) 陽性及び陰性対照液、並びに添加試験で用いた牛肉骨粉無添加及び 0.1 %添加した飼料に対する、モリナガキット Ver.2 の各保存期間における反応性を確認したところ、2 ヶ月間におけるそれぞれの試料の測定値は一定しており、当該キットの安定性が示された。

謝 辞

本検討におきまして、ご協力いただきました株式会社森永生科学研究所の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について，平成 17 年 3 月 11 日，16 消安第 9573 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づく動物由来たん白質及び動物性油脂の農林水産大臣の確認手続について」の一部改正について，平成 22 年 3 月 1 日，21 消安第 12077 号 (2010).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 4) 関口好浩，草間豊子：メライザキットによる飼料中の反すう動物由来たん白質の検出法，飼料研究報告，33，78-90 (2008).
- 5) M. J. Myers, *et al.*, Assessment of two enzyme-linked immunosorbent assay tests marketed for detection of ruminant proteins in finished feed, *J. Food Prot.*, 70(3), 692-699 (2007).
- 6) 日比野洋：「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット」を用いた飼料中の牛由来たん白質の検出法，飼料研究報告，29，181-188 (2004).