

## 2 肉骨粉中のシカ由来たん白質の ELISA キットによる検出法の確立

武田 然也<sup>\*1</sup>, 宮野谷 杏<sup>\*2</sup>, 橋本 仁康<sup>\*3</sup>, 関口 好浩<sup>\*1</sup>, 橋本 亮<sup>\*1</sup>

### Validation Study on Detection Method for Deer Protein in Meat and Bone Meal by ELISA

Zenya TAKEDA<sup>\*1</sup>, Kyo MIYANOYA<sup>\*2</sup>,

Yoshiyasu HASHIMOTO<sup>\*3</sup>, Yoshihiro SEKIGUCHI<sup>\*1</sup> and Sayaka HASHIMOTO<sup>\*1</sup>

(<sup>\*1</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

<sup>\*2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Sapporo Regional Center, FAMIC),

<sup>\*3</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC))

An ELISA method to detect deer protein in meat and bone meal (MBM) was validated. It uses Morinaga Heat-treated Bovine Protein ELISA kit Ver.2 (Morinaga kit Ver.2, Morinaga Institute of Biological Science Inc., Yokohama, Japan) which is listed in the Feed Analysis Standard of Japan for the qualitative detection of bovine protein.

The specificity of the Morinaga kit Ver.2 was assessed by testing deer raw meat, deer meat meal (DMM), wild boar raw meat, wild boar meat meal, bear raw meat, bear meat meal, pork MBM, poultry by-product meal, and pork and poultry MBM respectively. Only samples of deer raw meat and DMM were identified positive. This result indicates that the Morinaga kit Ver.2 is suitable for the detection of deer protein in addition to bovine protein.

The sensitivity of the Morinaga kit Ver.2 was assessed using samples of pork and poultry MBM added with 0.02 %, 0.03 % and 0.05 % of DMM. The LOD of the Morinaga kit Ver.2 was 0.05 % of DMM in pork and poultry MBM.

This method was thus validated for use in the inspection of deer protein in MBM, etc.

Key words: deer protein, ELISA, Morinaga Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit Ver.2, meat and bone meal

キーワード：シカ由来たん白質；ELISA；モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2；肉骨粉

## 1 緒 言

我が国で牛海綿状脳症（BSE）の発生が確認されて以来、飼料原料として利用できる動物由来たん白質は制限されているところであるが<sup>1)</sup>、近年における野生鳥獣による農作物の被害拡大に伴い、イノシシの捕獲頭数が急増し、捕獲された個体の処理が緊急の課題となり、平成 28 年 9 月 20 日より、イノシシを豚と同等とみなし、飼料の原料として利用できるようになった<sup>2)</sup>。

イノシシをと殺、解体処理する獣肉処理施設（食品衛生法に基づく食肉処理業の許可を受けた施設。）の大半は、シカのと殺、解体処理も行っていることから<sup>3)</sup>、イノシシ由来たん白質を飼料の原料として利用するに当たっては、農林水産大臣の確認手続<sup>4)</sup>の下で、伝達性海綿状脳症の発生の

<sup>\*1</sup> 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

<sup>\*2</sup> 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 札幌センター

<sup>\*3</sup> 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 神戸センター

予防の観点から飼料の原料としての利用が禁止されているシカ残さとの分別管理を徹底することが重要となる。この分別管理が適切に行われていることを確認するためには、イノシシを原料とする肉骨粉等にシカ由来たん白質が混入していないことを確認するための試験方法を確立する必要がある。その試験方法としては、たん白質を検出する ELISA 法とポリメラーゼ連鎖反応を利用し DNA を検出する試験法が考えられた。

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」（以下「モリナガキット Ver.2」という。）は、ウシミオグロビンに対するモノクローナル抗体を用いた市販キットであり<sup>5)</sup>、牛由来たん白質の検出に用いられるキットとして飼料分析基準<sup>6)</sup>に定められている。ウシミオグロビンのアミノ酸配列について、National Center for Biotechnology Information の相同性検索プログラム<sup>7)</sup>を用いて相同性検索を行ったところ、シカ由来のミオグロビンのアミノ酸配列と相同性が極めて高かったことから、モリナガキット Ver.2 はシカ由来たん白質の検出にも利用できると考えられた。

そこで、イノシシを原料とする肉骨粉等からシカ由来原料を検出する試験方法として、モリナガキット Ver.2 を用いた ELISA による方法の適用性を検討したので、その概要を報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

#### 1) シカ生肉及び肉粉

ホンシュウジカ (*Cervus nippon centralis*) のもも肉及びエゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) のロース肉を精肉店より入手し用いた。肉粉はそれぞれの生肉を 1~2 cm 角に切り、133 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌し、105 °C で恒量となるまで乾燥した後、1 mm 程度の粒径になるまでミルサーにより粉砕した。

#### 2) イノシシ生肉及び肉粉

イノシシのもも肉を精肉店より入手し用いた。肉粉は生肉を 1~2 cm 角に切り、133 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌し、105 °C で恒量となるまで乾燥した後、目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーにより粉砕した。

#### 3) クマ生肉及び肉粉

ツキノワグマのもも肉を精肉店より入手し用いた。肉粉は生肉を 1~2 cm 角に切り、133 °C で 20 分間、高圧蒸気滅菌し、105 °C で恒量となるまで乾燥した後、目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーにより粉砕した。

#### 4) 豚肉骨粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉

豚肉骨粉及びチキンミールは、国内の飼料製造業者より入手したものを目開き 1 mm のふるいを通るまでミルサーにより粉砕したものとした。原料混合肉骨粉は、粉砕した豚肉骨粉とチキンミールを等量混合して調製した。

#### 5) シカ肉粉添加試料

シカ肉粉とイノシシ肉粉を乳鉢で混合し、10 %シカ肉粉添加試料を調製した。10 %シカ肉粉添加試料をさらに原料混合肉骨粉で段階希釈し、0.02 %、0.03 %、0.05 %、0.1 %、0.5 %及び 1 %シカ肉粉添加試料を調製した。

## 2.2 試薬

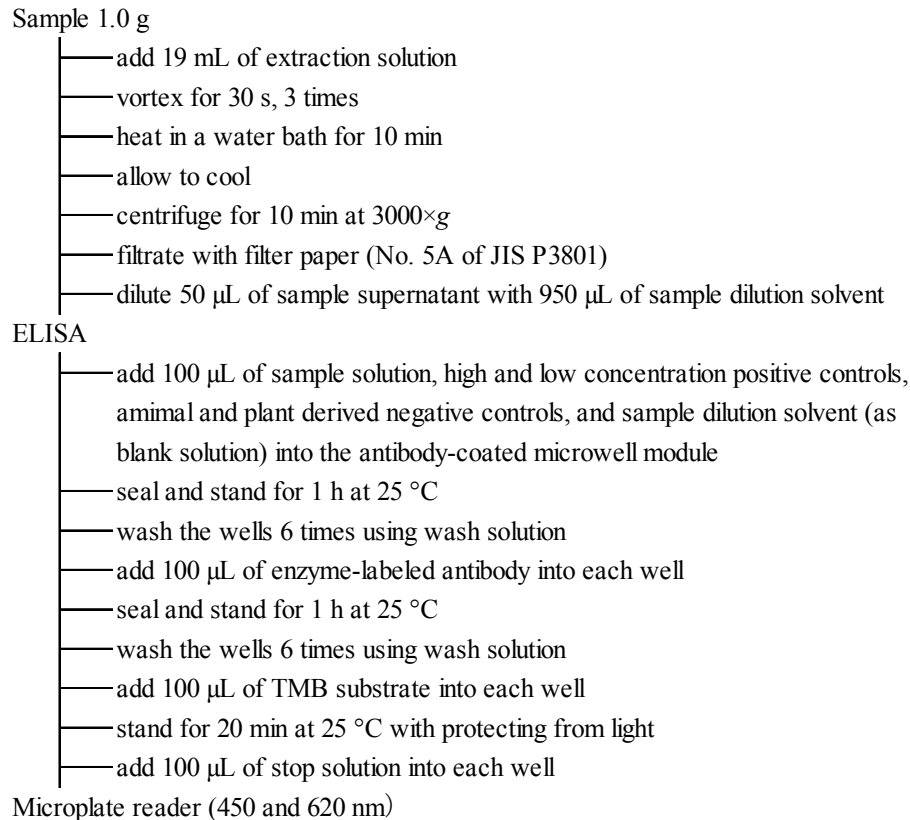
- 1) ELISA キット モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2 森永生科学研究所製
- 2) 抽出溶媒 ELISA キットに付属の抽出溶媒濃縮液 A 液 100 mL, 抽出溶媒濃縮液 B 液 100 mL 及び抽出溶媒濃縮液 C 液 100 mL を混合し, 蒸留水を加えて 1000 mL とした.
- 3) 洗浄液 ELISA キットに付属の洗浄液 (20 倍濃縮液) 50 mL に蒸留水を加えて 1000 mL とした.
- 4) 検体希釈液 ELISA キットに付属の検体希釈液 (10 倍濃縮液) 5 mL に蒸留水を加えて 50 mL とした.
- 5) 高濃度陽性対照液, 低濃度陽性対照液, 動物由来陰性対照液, 植物由来陰性対照液, 抗体固相化モジュール, 酵素標識抗体溶液, 酵素基質溶液及び反応停止液は, ELISA キットに付属のものを用いた.

## 2.3 装置及び器具

- 1) ミルサー : IFM-300DG 岩谷産業製
- 2) 振とう機 : VORTEX-GENIE2 Scientific Industries 製
- 3) 遠心分離機 : 5500 久保田製作所製
- 4) マイクロプレートリーダー : Sunrise Rainbow Thermo TECAN 製
- 5) プレートウォッシャー : 簡易型 96 穴プレート洗浄器 ファスマック製
- 6) 8 チャンネルピストン式ピペット : Research M (30~300  $\mu$ L) Eppendorf 製

## 2.4 試験方法

飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)に記載されている方法に基づき実施した。試験法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Procedure of Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit (Morinaga kit Ver.2) assay

### 3 結果及び考察

#### 3.1 特異性試験

シカ肉、イノシシ肉、クマ肉、豚肉骨粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉を用いてモリナガキット Ver.2 の反応性を確認した。シカについては、種類による反応性の違いがないことを確認するため、日本で食肉処理される主なシカの種類として、ホンシュウジカ及びエゾシカの2種類のシカ肉を用いて試験を行った。また、イノシシと同じ施設で解体・食肉処理を行う可能性のある動物としては、シカの他にクマも考えられたため、クマ肉についても試験を行った。その結果は Table 1 のとおり、イノシシ生肉及び肉粉、クマ生肉及びクマ肉粉、豚肉骨粉、チキンミール並びに原料混合肉骨粉についてはいずれも陰性と判定された。ホンシュウジカ及びエゾシカ由来の生肉及び肉粉については、いずれも陽性と判定され、シカの種類による反応性の違いは見られなかった。このことから、モリナガキット Ver.2 はシカ由来たん白質の検出にも適用できることが確認された。

Table 1 Specificity tests of Morinaga kit Ver.2<sup>a)</sup> assay for various animal meat and meal

Sample	O.D. <sup>d)</sup>		Number of samples (Detected <sup>e)</sup> / Tested)
	Min	Max	
Boar raw meat	0.010	0.012	0/2
Boar meat meal	0.022	0.024	0/2
Bear raw meat	0.011	0.029	0/2
Bear meat meal	0.023	0.034	0/2
Pork MBM <sup>b)</sup>	0.015	0.015	0/2
Poultry by-product meal	0.007	0.008	0/2
Pork and poultry MBM <sup>c)</sup>	0.010	0.011	0/2
Deer meat ( <i>Cervus nippon centralis</i> )	0.460	0.500	2/2
Deer meat meal ( <i>Cervus nippon centralis</i> )	3.531	3.535	2/2
Deer meat ( <i>Cervus nippon yesoensis</i> )	0.474	0.507	2/2
Deer meat meal ( <i>Cervus nippon yesoensis</i> )	3.525	3.561	2/2

a) Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit (Morinaga Institute of Biological Science Inc., Yokohama, Japan)

b) Meat and bone meal

c) Pork and poultry MBM was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

d) Difference between absorbance at 450 nm and 620 nm

e) Cut-off value is mean O.D. of the low positive control. The values were 0.064 to 0.086 in these tests.

### 3.2 感度試験

原料混合肉骨粉にホンシュウジカ肉粉又はエゾシカ肉粉をそれぞれ 0.02 %、0.03 %及び 0.05 %添加した試料を用いて、感度試験を実施した。その結果は Table 2 のとおり、0.05 %シカ肉粉添加試料については全て陽性と判定された。0.03 %シカ肉粉添加試料については、ホンシュウジカ肉粉添加試料では全て陽性と判定されたが、エゾシカ肉粉添加試料ではおよそ半数が陰性と判定された。全般的にエゾシカ肉粉添加試料がホンシュウジカ肉粉添加試料と比較して測定値が低い傾向を示したが、これは、用いたホンシュウジカ肉及びエゾシカ肉がそれぞれもも肉及びロース肉であり、各肉粉に含まれる脂肪分に違いがあることから、試料中のたん白質含量の差が測定値に影響したと考えられた。イノシシを解体・食肉処理を行う過程で混入する可能性があるシカ由来たん白質は、シカの様々な部位に由来することが考えられる。シカ肉の部位等により測定値にばらつきがあることを考慮すると、シカ肉粉としての検出下限は 0.05 %程度と推定された。

Table 2 Sensitivity tests of Morinaga kit Ver.2<sup>a)</sup> assay for detection of DMM<sup>b)</sup> contained in pork and poultry MBM<sup>c)</sup>

Sample	Spiked level of DMM	O.D. <sup>d)</sup>		Number of samples (Detected <sup>e)</sup> / Tested)
		Min	Max	
Pork and poultry MBM containing DMM ( <i>Cervus nippon centralis</i> )	0.02 %	0.035	0.088	10/20
	0.03 %	0.060	0.117	20/20
	0.05 %	0.103	0.182	20/20
Pork and poultry MBM containing DMM ( <i>Cervus nippon yessoensis</i> )	0.02 %	0.040	0.065	2/20
	0.03 %	0.052	0.084	11/20
	0.05 %	0.075	0.163	20/20

a) Heat-treated Bovine Protein ELISA Kit (Morinaga Institute of Biological Science Inc., Yokohama, Japan)

b) Deer meat meal

c) Pork and poultry MBM (meat and bone meal) was prepared by mixing equal amounts of pork MBM and poultry by-product meal.

d) Difference between absorbance at 450 nm and 620 nm

e) Cut-off value is mean O.D. of the low positive control. The values were 0.047 to 0.084 in these tests.

#### 4 まとめ

肉骨粉中のシカ由来たん白質の検出法について、モリナガキット Ver.2 を用いた ELISA 法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、次の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) シカ肉、イノシシ肉、クマ肉、豚肉骨粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉を用いて当該キットの反応性を確認したところ、シカ肉由来の試料のみが陽性と判定された。
- 2) シカ肉粉を添加した原料混合肉骨粉を用いて感度試験を行った結果、検出下限はシカ肉粉として 0.05 %程度であった。

#### 文 献

- 1) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 2) 農林水産省令：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，平成 28 年 9 月 20 日，農林水産省令第 60 号 (2016).
- 3) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長通知：野生鳥獣肉の衛生管理等に関する実態調査の結果について，平成 28 年 9 月 21 日，生食監発 0921 第 1 号 (2016).
- 4) 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，平成 17 年 3 月 11 日，16 消安第 9574 号 (2005).
- 5) Takayuki Yamamoto, Masatoshi Kato, Kiwamu Endo, Satoshi Kotoura and Zenya Takeda: Detection of ruminant meat and bone meal in feeds by sandwich ELISA with monoclonal antibodies, The Journal of Veterinary Medical Science, 77 (12), 1605-1609 (2015).

- 
- 6) 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).
  - 7) National Center for Biotechnology Information: Basic Local Alignment Search Tool,  
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, cited 18 Dec. 2017