

特定原材料（卵）検査におけるウエスタン ブロット法の改良

真子俊博

福岡市保健環境研究所 保健科学部門

Improvement of Method Western Blot Method in Egg Protein

Toshihiro MAKU

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要旨

ウエスタンブロット法においては加熱加工品からの卵タンパクの確認検査は困難である。加熱加工品では加熱により卵タンパクが不溶・変性タンパクになり、そのため電気泳動上で一つのバンドだけでなく部分変性したタンパクのバンドにより、WB膜上では複数のバンドとして認めらる。

そこで、変性タンパクの除去を目的にハイドロキシアパタイトカラムを用いたところ、きわめて簡易な手法で除くことができ、WB法上で単一なバンドとして確認できることから、加熱加工品の卵タンパクの確認試験の前処理に適した方法と思われた。

Key Words：卵白タンパク Egg white protein, アレルギー Allergen, ウエスタンブロット
法 Western blot method

I はじめに

特定原材料の検査においては ELISA 法によるスクリーニング検査を行ったのちに、確認検査を実施することになっている。確認検査は通常 PCR 法がよく用いられているが、牛乳や卵については PCR 法が実施困難なためタンパク質の確認に用いられるウエスタンブロット法（以下、WB法と略記）が採用されている。

WB法は古くからタンパクの確認検査や同定検査に用いられているが、感度がやや低く用いる抗体の精製度により大きく成績が左右されるなどの問題点も多い。当所では以前より特定原材料の検査を実施しているが、卵の検査において確認検査であるWB法に試料の前処理が必要なことを指摘してきた。

今回、WB法を行う試料について簡易精製処理を行うことで検査が容易になったので、その結果を報告する。

II 実験方法

材料は卵製品（ダシ巻き、茶碗蒸し、キンシ卵、カステラ）を用い 2.0 g 秤量後、PBS で 40 倍に希釈した。3000rpm, 20 分間遠心したのち濾紙で濾過したものを試験液として用いた。

SDS-PAGE, WB法は通知法に従ったが、SDS-PAGE は最後に蒸留水で洗浄後 Lory 法により染色を行った。

試料の簡易精製はハイドロキシアパタイトカラムを用いた。0.01M リン酸緩衝液（pH 7.2）で平衡化したカラムへ試料液を通し、同液で洗浄後 0.25M, 0.1M, 0.075M, 0.05M のリン酸緩衝液（pH 7.2）で溶出して各フラクションを回収した。回収した各溶液は原液の要領まで限外濾過濃縮を行った。

III 実験結果

図1に各溶液の SDS-PAGE で泳動し、タンパク染色を行った染色像を示した。ほとんどの検体で数本のタンパクのバンドが確認されている。図2にWB法の結果を示した。加熱されている検体ではWB法で複数のバンド

が確認され、卵白アルブミンのバンドの上下も共染されていた。

No1 から No3 までの加熱加工品では卵白アルブミンのバンド以外にも上下に数本のバンドが染色されてい

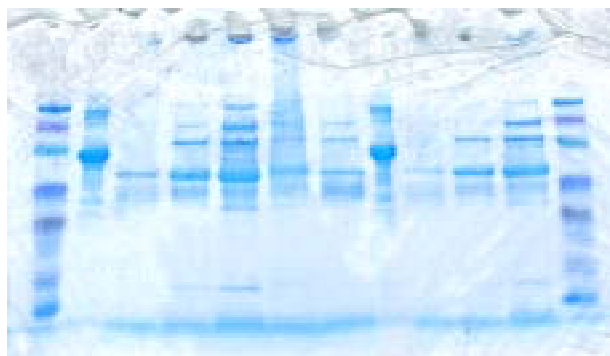


図1 卵加工品における SDS-PAGE 泳動像
(Lor y法による染色)

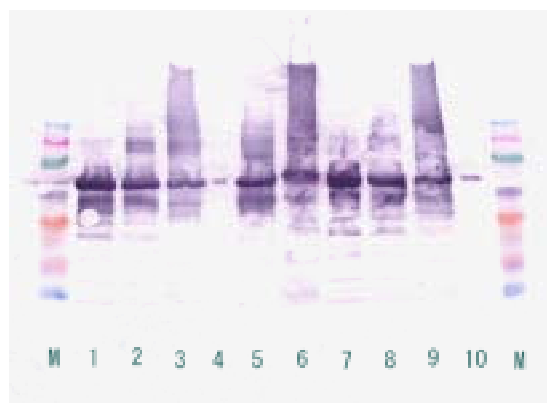


図2 卵加工品のウエスタンブロット像

1～3 加熱加工品, 4 未加熱製品, 5～9 加熱加工品
10 ハイドロキシアパタイトカラムで簡易精製したフ
ラクション濃縮液

た。No4 の非加熱の茶碗むし液では1本のバンドだけで膜にも染色跡は見られなかった。No10 のハイドロキシアパタイトカラム処理で分種した溶液では1本のバンドのみであった。

IV 考 察

タンパクの検出や確認は以前より免疫学的な手法が用いられ、ゲル内沈降反応、HA、PHA、RPHA 法などが考案されてきた。EILSA 法も免疫学的な手法を採用しており、感度を高めるためにアビジンやビオチンなどの酵素反応を組み合わせることで現在では 0.5ng/ml の感度を出せるまでになっている。一方、WB法は抗原タンパクの内容確認として現在でも広く用いられ、1次抗体や2次

抗体にモノクローナル抗体などを用い、さらに蛍光を採用するなどで感度や特異性を高めている。

通知法¹⁾に記載されている WB 法は原法に近く、しかも ELISA 法に使用の抗体と同一の抗体を WB 法の1次抗体として用いている。本来、ELISA 法で陽性の検体をウエスタンブロット法で確認する場合には異なるメーカーの抗体を使用するなどして特異性を高くするのであるが、ELISA 法の同一メーカーの抗体使用となっている。しかも、この抗体はポリクローナル抗体であり確認検査で使用するにはやや問題と考えられる。今回の加熱加工品における WB 法ではこの抗体使用のために、複数のバンドが出現しており判定がやや不明瞭になった。これは、非加熱の卵白アルブミンでは1本のバンドとして確認されるものの、加熱された卵白アルブミンは熱による変成で分子量の変化などが生じ、抗原性は残っている変成卵白アルブミンが複数のバンドとして現れているものと思われる。

最終の確認検査において複数のバンドとして認識されることは、成績上でも大きな問題が生じる。当所では以前より卵のWB法では何らかの前処理が必要なことを指摘し、等電点電気泳動による前処理が有効なことを報告してきた。

しかし、等電点電気泳動による方法は高額な機器が必要で、再現性などの問題点もあり、簡易な手法が求められていた。今回、ハイドロキシアパタイトカラムを用いた簡易精製により単一バンドとして認められる前処理が可能であった。ハイドロキシアパタイトはパックドカラムとして入手可能²⁾でリン酸緩衝液に平衡化後検体溶液をアプライし、塩類の濃度高配により溶出して濃度 0.1M 濃度で溶出されるピークを分取するというものである。その後限外濾過などにより濃縮を行って試料液とする。本方法は手軽に実施可能であることから、加熱加工品などの検体で有効な方法と考えている。

また、WB法において通知法に記載されている一次抗体濃度はやや高いと思われ、1/10 量濃度にした場合でもオボアルブミンのバンドは明瞭に確認され、他の非特異バンドが薄くなるため判定が容易となった。今後、一次抗体の濃度やさらなる簡易精製法の検討を行っていく予定である。

文 献

- 1) 厚生労働省通知法(平成14年11月, 食発第1106001号)(別添1), 特定原材料(卵, 乳, こむぎ, そば, 落花生)の検査方法
- 2) バイオラッド ライフサイエンス事業本部カタログ P52～58, 2004