

卵白アルブミン測定キットの比較検討

真子俊博

福岡市保健環境研究所 保健科学部門

Study of Sandwich Enzyme Immunoassay for the Quantitative Analysis in Egg Protein

Toshihiro MAKO

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

要旨

入手可能な卵白アルブミン測定 ELISA キットを用いて比較検討した結果、測定感度や特異性は国産、外産メーカーとも大きな差はみられなかったが、操作性では外産メーカーがすぐれていた。

Key Words : 卵白タンパク Egg white protein ,ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ,

はじめに

ELISA 法は操作が簡単で、特異性・感度もいいことから抗原、抗体、タンパクなどのほか、最近では農薬やダイオキシンなどの測定キットも開発されるようになってきている¹⁾。本来は多数の検体処理に適する方法として開発され、特異性、感度、再現性のなどにより臨床検査などでは広く用いられている。さらに、酵素抗体法を利用した手法²⁾などに応用されてきた。また、色々な吸収剤や酵素抗体反応などサンドイッチ ELISA 法が考案されるにともなって、感度や特異性の向上により色々な測定キットが開発されている。

今回、入手可能な卵白アルブミン測定 ELISA キットを用いて、卵のタンパクによる測定感度や特異性などを調査したので、その結果について報告する。

実験方法

卵アルブミンの測定材料は加工食品と生卵の卵蛋白、半熟卵の卵蛋白、完熟卵の卵蛋白を用いて、各キットで測定を行った。

測定キットは国内の2社と外国製品で国内で入手可能な1社の3社を用いた。

生卵、半熟卵、固ゆで卵は卵黄が入らないように卵蛋

白を取りだし、生理食塩水で10倍に希釈したのちホモジナイザーで十分に混合し検査材料とした。各キット付属の希釈液を用いて 10^{-2} から 10^{-9} に希釈し、加工食品は各キットに添付されている説明書の通りに検体を採取して検査を行った。

吸光度の測定では主波長 450nm と副波長 630nm の2波長で測定した。

実験結果

表1に各卵蛋白における ELISA キットの測定結果を示した。表からも明らかのように生の状態が検出感度が高く、ゆでた卵蛋白の10000倍の検出感度であった。メーカーによる検出感度の差は国内メーカー2社のうち1社では明らかに10倍ほど感度の差があった。各メーカーでは外国産のメーカーが検出感度が高く、生卵蛋白では100万倍希釈においても検出が可能であった。

表2に各メーカーの操作性の比較表を示した。各メーカーともサンドイッチ ELISA 法による抗原検出法であるが、洗浄やステップ数や操作時間に大きな差が見られた。R社とM社ではステップ数や洗浄回数がほぼ同定なため約2時間で結果をだせるが、N社ではステップ数が多く、時間も3.3時間と1時間以上の差があった。

考 察

タンパク質の測定で最もよく用いられる手法に ELISA 法がある。ELISA 法は抗体か抗原をプレートウェル底に固定し、その後ウェル内で抗原抗体反応を行う手法で、感度や操作性がよいことから検査に用いられている。しかし、非特異性の問題があり食品中のタンパク測定には不向きとされていた。

今回、卵白アルブミンを測定するキットについて比較を行ったところ、特異性や感度はほとんど差がみられなかったが、操作性に若干の差がみられた。

ELISA 法は半定量が基本である。抗原抗体反応自体定量が可能な方法もあるが、ELISA 法は酵素による感度アップのために定量には不向きであると言われる。それは抗体自信が持つ非特異反応などによる擬陽性、擬陰性を完全には排除できず、さらに可視光を使った測定機器であることから測定幅が狭いなどの問題点がある。今回使用した各キットは卵アルブミンの標準品を希釈することで定量が可能であるとなっている。濃度は 1 ppm から 100ppm 濃度の範囲となっているが、検量線はおおきく S 次状の状態を示した。低濃度の部分では検量線がかなり傾いており、この部分での定量は正確性を欠くものと思われる。さらに、測定濃度も 100ppm で頭うちとなり、 10^2 オーダーの範囲内での測定である。それだけに、この濃度範囲を著しく越える物では、現実の濃度が不明となることを知っておく必要がある。抗原抗体反応はそれ自体単純な手法であるが、濃度による反応は地帯反応や過剰反応を起こすことから、各濃度に適した方法を採用してきた。それだけに、ELISA 法による定量には多くの問題がある。すなわち、数%のオーダーから ppm のオーダーを比較するには感度が良すぎてカバーできないと思われる。

各キットの操作性については卵白アルブミンの標準液を各濃度（7 濃度）に希釈するようになっているが、外国産メーカーでは濃度調整された各標準液（5 濃度）を使用するため、希釈の操作が不要である。この希釈操作は検量線用標準品であるため希釈調整する操作は慎重にならざるをえないことから、国産メーカーも濃度調整した標準品の開発が望まれる。また、全体の操作性では大きな差は認められなかったが、国産メーカー 1 社が終了時間に差があった。2 社は 2 時間前後で判定可能であるが、1 社では 3.3 時間と 1 時間以上の開きがあり、感度が同等であることから改善の必要があるものと思われる。

測定感度では各メーカーとも大きな差はみられなかつ

た。国産メーカー 1 社が若干低い傾向がみられたが、用いている抗体が卵白アルブミンだけでなく変成アルブミンやオボムコイドなども検知する抗体のためにこのような傾向がみられたと思われる。卵の主要成分は卵白アルブミンでその他オボムコイド、リゾチームなどが含まれている。さらに、卵は加熱により大きく変成を受ける。特に卵白アルブミンは加熱により不溶性タンパクとなる。今回の実験においても、卵白の非加熱では 100 万倍前後まで検知可能であったが、半熟、完熟と加熱するに従って 10 万倍、1 万倍と低下していた。卵白の測定には加熱により卵白アルブミンの濃度が著しく低下することを考えておく必要がある。

ELISA 法は抗原抗体反応を利用した検出法であるため、用いる抗体や抗原の種類および精製度により特異性が大きく影響を受ける。抗原の反応基が少ないほど得意性が高くなり非特異反応が低くなっていく。最近ではモノクロナール抗体を利用したキットにより非特異反応が 0.1 % 以下となるなど特異性が極めて高くなっている。このため、従来より行われてきたタンパクの確認検査であるウエスタンブロット法などの確認検査が不要となっている。

今回検討した ELISA キットでは用いられている抗体に各社色々な物を使用している。使用する抗体は用いるタンパクの精製度により特異性が異なり、より特異性を追求する場合には精製タンパクの使用と共に抗体の精製が必要となってくる。しかし、通常的手法ではアフィニティ処理による抗体を用いても 0.5 % 前後の非特異反応がでてしまう。さらに、卵タンパクでは加熱により検出率が変化するため、卵タンパクの測定時では本来の定量ができない。このように、卵タンパクの測定にはその製品による加工度の違いにも注意が必要である。

最後に、各メーカーの ELISA キットの検出感度は国内メーカーでは 100 と 10 μ g/ml であるのに対し、外国メーカーでは 1 μ g/ml であった。さらに、キットの操作性も外国メーカーがすぐれていた。

文 献

- 1) 前川真人：イムノアッセイの測定原理とその特徴，臨床検査，47(13)，1611～1118，2003
- 2) 上田雄幹：疾病診断への新しい免疫学的手法，食品衛生研究，32(5)，21～33，1992
- 3) 武田久雄：標識抗体法，臨床検査，25(9)，975～982，1981

表1 各 ELISA キットの検出感度の反応性

		メーカー		
		国産 N 社	国産 M 社	外産産 R 社
卵白 (生)	× 100	3.628 (++)	1.875 (++)	3.460 (++)
	× 1000	2.954 (++)	1.808 (++)	3.480 (++)
	× 10000	1.819 (+)	1.704 (+)	3.515 (++)
	× 100000	0.0867 (±)	1.007 (+)	2.011 (++)
	× 1000000	0.022 (-)	0.152 (+)	0.212 (+)
	× 10000000	0.022 (-)	0.038 (-)	0.071 (±)
	× 100000000	0.020 (-)	0.020 (-)	0.007 (-)
	× 1000000000	0.022 (-)	0.018 (-)	0.009 (-)
卵白 (加熱) × 100	× 1000	0.305 (+)	0.401 (+)	0.372 (+)
	× 10000	0.023 (-)	0.092 (±)	0.161 (+)
	× 100000	0.027 (-)	0.039 (-)	0.068 (±)
	× 1000000	0.026 (-)	0.022 (-)	0.017 (-)
	× 10000000	0.023 (-)	0.015 (-)	0.007 (-)
半熟卵蛋白 × 100	× 1000	3.18 (++)	2.723 (++)	3.88 (++)
	× 10000	2.77 (++)	2.566 (++)	3.956 (++)
	× 100000	1.87 (+)	2.207 (++)	2.852 (++)
	× 1000000	0.065 (±)	0.104 (+)	0.333 (+)
	× 10000000	0.022 (-)	0.038 (-)	0.093 (+)
	× 100000000	0.021 (-)	0.015 (-)	0.046 (-)
× 1000000000	0.020 (-)	0.013 (-)	0.025 (-)	

表2 各キットの操作性の比較

	国産 N 社	国産 M 社	外国産 R 社
検体希釈液	10 倍	20 倍	10 倍
洗浄液	10 倍	20 倍	20 倍
1 次抗体の調整	使用事 100 倍	無	使用事 10 倍
2 次抗体の調整	使用事 100 倍	無	無
STD の調整	希釈操作 (7 点)	希釈操作 (7 点)	無調整
前処理の操作	希釈液で 10 倍	無	5 倍希釈
洗浄数	3 回	2 回	2 回
洗浄回数	5 回	6 回	3 回
洗浄液量	250 μ l	300 μ l	250 μ l
使用液調整	標準的	標準的	溶解に時間がかかる
前処理時間	25 分	15 分	30 分
操作ステップ	6 回	4 回	5 回
操作方法	口過後希釈	口過後そのまま使用	口過後希釈
最終検体希釈倍数	100 倍	20 倍	100 倍
標準液	希釈して使用	希釈して使用	そのまま使用可能
操作時間	3.3 時間	1.9 時間	2 時間
感度	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷