

7 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

関口 好浩*, 草間 豊子*

Assessment of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit Detecting Ruminant Protein in Pork Meat and Bone Meals

Yoshihiro SEKIGUCHI* and Toyoko KUSAMA*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

After the detection of the first case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in 2001, the use of animal protein for production of animal feed was prohibited in Japan. However, since April 2005 the use of meat and bone meal (MBM) of pig origin (pork MBM) and MBM of pig and chicken origin (pork and chicken MBM) has been allowed for the production of some animal feeds. The Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC) is engaged in the analysis of feed samples for presence of animal protein using three methods: polymerase chain reaction (PCR) method that detects animal origin DNA; microscopic method that detects MBM directly; and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) methods that detect animal origin protein. Commercially available ELISA kits use polyclonal antibodies and detect milk and dairy products, which are not prohibited materials. Considering the fact that most pork MBM contains milk and/or dairy products, an ELISA kit that is capable of detecting bovine MBM only and not milk and dairy products was required. We assessed ELISA Technologies' MELISA-TEK, a commercially available ELISA kit that is claimed to be capable of detecting only bovine MBM (and not milk and dairy products). Specificity of MELISA-TEK was assessed by testing 45 feed materials. Good specificity was obtained. MELISA-TEK detected bovine meat meal contained 0.15% in a pork MBM and in a chicken meal respectively. A collaborative study was conducted in 16 laboratories using pork MBM and chicken meal containing bovine meat meal. All laboratories detected bovine meat meal contained 0.15% in pork MBM and in chicken meal.

Key words: 牛海綿状脳症 bovine spongiform encephalopathy ; 飼料 feed ; 酵素免疫測定法 ELISA ; モノクローナル抗体 monoclonal antibody ; メライザキット MELISA-TEK ; 反すう動物由来たん白質 ruminant protein ; 牛肉骨粉 bovine meat and bone meal ; 豚肉骨粉 pork meat and bone meal ; チキンミール chicken meal

1 緒 言

日本での牛海綿状脳症 (BSE) の発生により, 飼料に用いることのできる動物由来たん白質は種類が限られているところだが, 平成 17 年 4 月 1 日より豚肉骨粉及び豚・鶏原料混合肉骨粉が豚, 鶏及びうずら用の飼料として使用できるようになった^{1), 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

飼料中の動物由来たん白質の検出法としては、試料を顕微鏡で直接観察する顕微鏡鑑定、動物由来 DNA を検出する PCR 法及び動物由来たん白質を検出する酵素免疫測定法 (ELISA) の 3 つが定められている。ELISA については、平成 18 年 3 月までは ELISA Technologies 製「ELISA-TEK 加工肉種判別キット (牛)」(ELISA-TEK) 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」(モリナガキット) のポリクローナル抗体を用いた二つの定性用キットが定められていた³⁾。牛由来たん白質であっても、乳製品については飼料利用が認められているため、代用乳など乳製品を含んだ飼料で飼育された豚がと畜された場合、消化管内に乳製品が残留する可能性がある。これを原料とした豚肉骨粉等を ELISA-TEK 又はモリナガキットで分析すると、牛由来たん白質が検出されることがあり、乳製品には反応しない ELISA キットが必要となった。

ELISA Technologies 製「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEEDS」(メライザキット) は、骨格筋中の Troponin I (TnI) と特異的に反応するモノクローナル抗体を用いている定性用キットである⁴⁾。そのため乳、血液、ゼラチン等には反応せず、反すう動物由来肉骨粉のみを検出できると期待されたことから、豚肉骨粉等への適用の可否を検討することとなった。

今回、飼料原料等 45 点を用いて、メライザキットの特異性を確認するとともに、ELISA-TEK とモリナガキットとの比較を行った。また、豚肉骨粉等中の牛肉骨粉の検出下限を調べた。

さらに、メライザキットの再現精度等を明らかにするため、16 試験室による共通試料を用いた共同試験を実施した結果、良好な結果が得られたのでその概要を報告する。

2 実験方法

2.1 メライザキット

「MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEEDS」(ELISA Technologies 製) を使用した。

1) 構成

- i 抽出液用バッファー塩 (1 L/包×3 包)
- ii 特定動物種の筋肉組織コントロール (10%) (牛, 豚, 羊各 4 mL)
- iii 抗体固着マイクロウェルモジュール (8 ウェル/ストリップ×12 ストリップ)
- iv 洗浄液用 10 倍濃縮液 (100 mL)
- v ビオチン付抗特定動物種抗体 (2 mL×3)
- vi アビジン-酵素複合体液 (6 mL)
- vii TMB 溶液 (6 mL)
- viii 反応停止液 (6 mL)

キットに添付されている試薬等を Fig. 1 に示した。



Fig. 1 Components of MELISA-TEK (ELISA Technologies, Inc.)

2.2 試料

検討に用いた飼料原料及び配混合飼料は、飼料製造業者から入手し、とうもろこし、大麦等の粒状の飼料原料及び配混合飼料は試料約 150 g をミルサーで粒径 1 mm 程度になるまで粉碎し、その他のものは調製せずに用いた。牛由来のものを除く試料は、豚肉骨粉等にあつては反すう動物由来 DNA が含まれていないことを、それ以外のものにあつては牛由来 DNA が含まれていないことを PCR 法により確認したものをを用いた。

共同試験に用いた共通試料は以下のように調製した。牛肉を細かく刻み、オートクレーブで 133°C, 3 気圧で 30 分間加熱処理した。オートクレーブ処理した牛肉を遠心分離して油分を除去した後、80°C で乾燥しミルサーで粉碎したものを牛肉粉とした。牛由来原料が含まれていない豚肉骨粉及びチキンミールをマトリックスとして選び、これらに牛肉粉を 0.15% 及び 0.75% になるように乳鉢で混合した。2 種類 3 濃度 (0%, 0.15% 及び 0.75%) の共通試料をそれぞれ 250 g 程度調製し、各試料を最低一回分析できる量ずつ小分けした。小分けした試料およそ 50 個の内 8 個を均一性確認用としてランダムに抜き出した。抜き出した試料を MELISA-TEK で反すう動物由来たん白質の有無を確認したところ、牛肉粉添加試料についてはすべて陽性であり、無添加試料についてはすべて陰性であったので、均一性については問題がないとして、各試料をそれぞれランダムに 2 点ずつ各試験室に配布した。

牛肉骨粉添加試料は、オーストラリア産牛肉骨粉を粒径 1 mm まで粉碎したものを乳鉢で豚肉骨粉と混合して使用した。

2.2 試薬

1) ELISA Technologies 製 MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEEDS

i 抽出液

キットに添付されている抽出液用バッファー塩 1 包を蒸留水 1 L に溶かして抽出液とした。

ii 陰性コントロール液

キットに添付されている特定動物種の筋肉組織コントロール (10%) (豚) を用いた。

iii 0.05%及び1%陽性コントロール液

キットに添付されている特定動物種の筋肉組織コントロール (10%) (牛) 100 μ L と抽出液 900 μ L を混合して 1%陽性コントロール液とし, 1%陽性コントロール液 50 μ L と陰性コントロール液 950 μ L とを混合して 0.05%陽性コントロール液とした.

iv 抗体固相化モジュール

キットに添付されている抗体固着マイクロウェルモジュールを用いた.

v 洗浄液

キットに添付されている洗浄液用 10 倍濃縮液 100 mL と蒸留水 900 mL とを混合して洗浄液とした.

vi ビオチン化抗体液

キットに添付されているビオチン付抗特定動物種抗体を用いた.

vii アビジン酵素複合体液

キットに添付されているアビジン-酵素複合体液を用いた.

viii 基質 TMB 液

キットに添付されている 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) ELISA Technologies 製 ELISA-TEK 加工肉種判別キット (牛)

3) 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

4) Advanced ImmunoChemical 製 Troponin I, bovine skeletal muscle

0.01 mol/L 塩酸で 5 μ g/mL に調製した後, マイクロピペットにより抽出液で段階希釈を行った.

2.3 装置及び器具

- | | |
|----------------------|---|
| 1) ミルサー | : 岩谷産業製 IFM-300DG |
| 2) オートクレーブ | : アルプ製 IT-2322 |
| 3) 乾燥機 | : 東洋製作所製 FC-612 |
| 4) 振とう機 | : タイテック製 RECIPRO SHAKER SR-2W |
| 5) 遠心分離器 | : トミー精工製 MX-300 |
| 6) マイクロプレートリーダー | : TECAN 製 Sunrise Rainbow Thermo |
| 7) 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 |
| 8) シングルチャンネルマイクロピペット | : BIOHIT 製 m1000 (100~1000 μ L) |
| 9) 8 チャンネルマイクロピペット | : Eppendorf 製 Research M (30~300 μ L) |

2.4 試験方法

1) メライザキットの試験方法

i 抽出

分析試料約 150 g をミルサーで粉砕した後, その 5.0 g を量って三角フラスコに入れ, 抽出液 50 mL を加え 20 分間振り混ぜて抽出した. これを水浴中で 15 分間加熱した後放冷し, 3,300 rpm (1,000 \times g) で 5 分間遠心分離し, ろ紙 (5 種 A) でろ過した. ろ液をさらに 10,500 rpm (10,000 \times g) で 10 分間遠心分離し, 上澄み液を ELISA 操作に供する試料溶液とした.

ii ELISA 操作

試料溶液, 0.05%及び 1%陽性コントロール液, 陰性コントロール液及び抽出液 (ブランク液とした.) 各 100 μL を, 抗体固相化モジュールにそれぞれ 2 ウェルずつ入れ, 室温で 20 分間反応させた. ウェル内の液を完全に除去し, 洗浄液 300 μL を各ウェルに加えて 4 回洗浄した.

次に, ビオチン化抗体液 50 μL ずつを各ウェルに加えて, 室温で 20 分間反応させた後, ウェル内の液を完全に除去し, 洗浄液 300 μL を各ウェルに加えて 4 回洗浄した.

次に, アビジン酵素複合体液 50 μL ずつを各ウェルに加えて, 室温で 20 分間反応させた後, ウェル内の液を完全に除去し, 洗浄液 300 μL を各ウェルに加えて 8 回洗浄した.

次に, 基質 TMB 液 50 μL ずつを各ウェルに加えて, 室温で 20 分間反応させた後, 反応停止液 50 μL ずつを各ウェルに加えて酵素反応を停止させて, 15 分以内に各ウェルの 450 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, 各ウェルの吸光度値からブランク液の吸光度の平均値を差し引いた値を測定値とした.

iii 試験成立条件

1%陽性コントロール液の測定値の平均値が 1.000 以上であり, 陰性コントロール液の測定値の平均値が 0.100 未満であり, かつ 0.05%陽性コントロール液の測定値の標準偏差が 0.100 以下である場合に試験成立とした.

iv 判定

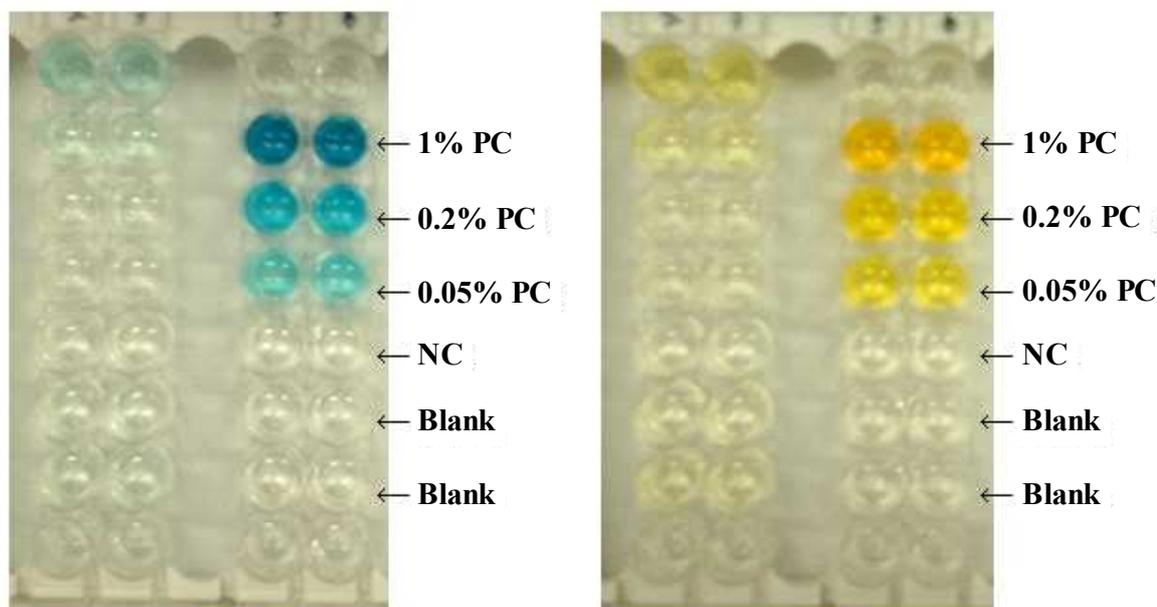
試料溶液の測定値の平均値が 0.100 以上であり, かつ陰性コントロール液の測定値の 2 倍以上であった場合を反すう動物由来たん白質を検出とし, それ以外を不検出と判定した.

試験方法の概要を Scheme に, 反応停止液添加前後の図を参考として Fig. 2 に示した.

2) ELISA-TEK 及びモリナガキットの試験方法

ELISA による飼料中の動物由来たん白質の検出法^{3), 5)} (平成 20 年 4 月 1 日付けで飼料分析基準に収載⁶⁾) に基づき実施した.

なお, 一部の試料において抽出液をすべて吸収してしまい, 試料溶液の採取が困難なものがあつたが, これらについては試料採取量又は抽出液量を変更することにより抽出を行った.



(A) Before adding stop solution

(B) After adding stop solution

Fig. 2 Result of MELISA-TEK

PC : positive control, NC : negative control, Blank : Extraction solution

Sample 5.0 g

- add 50 mL of Extraction Solution
- shake for 20 minutes
- heat in a water bath for 15 minutes
- allow to cool
- centrifuge for 5 minutes at 1,000×g
- filtrate with filter paper (No.5A)
- centrifuge for 10 minutes at 10,000×g

ELISA

- add 100 μ L of sample supernatants, 0.05% and 1% positive controls, negative control and extraction solution (as blank solution) into the antibody coated microwell module
- stand for 20 minutes at room temperature
- wash the wells 4 times using Wash Solution
- add 50 μ L of Biotinylated Secondary Antibody into each well
- stand for 20 minutes at room temperature
- wash the wells 4 times using Wash Solution
- add 50 μ L of Avidin-Peroxidase into each well
- stand for 20 minutes at room temperature
- wash the wells 8 times using Wash Solution
- add 50 μ L of TMB Substrate into each well
- stand for 20 minutes at room temperature
- add 50 μ L of Stop Solution into each well

Microplate reader (450 nm)

Scheme Procedure of MELISA-TEK assay

3 結果及び考察

3.1 特異性確認

植物性飼料原料 22 点, 動物性飼料原料 (反すう動物由来原料を含まないもの) 19 点, 牛用配混合飼料 (反すう動物由来原料を含まないもの) 2 点, 乳製品 2 点及び牛肉骨粉を用いてメライザキットにより試験を行い, その特異性を確認した. また, 同一の試料について ELISA-TEK 及びモリナガキットにより試験を行い比較した結果を Table 1 に示した.

メライザキットでは, 植物性飼料原料並びに魚粉, 豚肉骨粉及びチキンミール等の反すう動物以外の動物性飼料原料は, すべて陰性であった. また, 牛肉骨粉で反すう動物由来たん白質が検出されたが, 乳製品である脱脂粉乳及び乾燥ホエーについては検出されず, 骨格筋由来のモノクローナル抗体による特異性の高さが確認できた.

ELISA-TEK では, マイロで偽陽性となり, 乳製品のうちの乾燥ホエーが陽性であった. モリナガキットは偽陽性となる試料が多く, エクспанダー処理トウモロコシ, ナタネ, ナタネ油かす及び豚由来の飼料原料 (豚肉粉, 豚肉骨粉及び鶏・豚原料混合肉骨粉) 12 点ではすべて偽陽性であった. また, 飼料に使用可能な乳製品はいずれも検出された.

したがって, 各種飼料に対する特異性はメライザキットが最も良く, 豚肉骨粉中の反すう動物由来たん白質の検出には, メライザキットを用いることが適当と考えられた.

3.2 検出下限

メライザキットの検出下限を調べるため, 豚肉骨粉及びチキンミールにそれぞれ牛肉粉を 0.15%及び 0.75%添加した試料を調製し, メライザキットで試験を行った. その結果は Table 2 のとおりであった.

豚肉骨粉及びチキンミールのどちらについても 0.15%以上の牛肉粉を検出できた. 牛肉粉 0.15%添加試料の O.D.は, メライザキットのカットオフ値 (反すう動物由来たん白質検出の判定基準となる閾値で 0.1.) と比べると豚肉骨粉が 0.394, チキンミールが 1.566 とかなり高い値であることから, 0.15%よりも低い牛肉粉添加量でも検出可能と考えられた. なお, 牛肉粉添加量が同じでも豚肉骨粉に比べチキンミールの方が, O.D.が高い結果が得られたが, これについてはマトリックスの影響によるものと考えられた.

Table 1 Specificity of various feed materials and bovine meat and bone meal (bovine MBM) using MELISA-TEK assay¹⁾

		(+/- : Detected/Not detected)					
No.	Sample	MELISA-TEK		ELISA-TEK ²⁾		Morinaga ³⁾	
		Result	O.D. ⁴⁾	Result	O.D. ⁵⁾	Result	O.D. ⁶⁾
1	Corn, flaked	-	-0.003	-	0.022	-	0.024
2	expanded	-	0.025	-	0.029	+	0.098
3	Barley, flaked	-	-0.002	-	0.021	-	0.028
4	Wheat bran	-	-0.002	-	0.026	-	0.014
5	Rapeseed	-	0.001	-	0.021	+	0.055
6	Rapeseed meal	-	0.004	-	0.022	+	0.165
7	Soybean meal, dehulled	-	0.000	-	0.022	-	0.029
8	Soy sauce cake	-	0.002	-	0.023	-	0.025
9	Toasted soybean flour	-	0.002	-	0.022	-	0.016
10	Soybean, flaked	-	0.001	-	0.022	-	0.017
11	Soybean curd residue	-	-0.003	-	0.019	-	0.019
12	Beet pulp	-	0.000	-	0.021	-	0.029
13	Cotton seed	-	0.011	-	0.040	-	0.025
14	Rice bran	-	0.003	-	0.040	-	0.029
15	Corn gluten meal	-	0.000	-	0.023	-	0.047
16	Gluten feed	-	0.001	-	0.022	-	0.020
17	Grain sorghum	-	0.001	+	0.149	-	0.012
18	Cacao husk	-	-0.003	-	0.022	-	0.023
19	Palm kernel meal	-	0.002	-	0.023	-	0.019
20	Dry brewers grain	-	0.001	-	0.023	-	0.017
21	Paprika extract	-	0.000	-	0.020	-	0.021
22	Dextrin	-	-0.002	-	0.017	-	0.018
23	Mixed feed	-	-0.001	-	0.017	-	0.021
24	Formula feed	-	0.000	-	0.021	-	0.013
25	Crab meal	-	0.000	-	0.018	-	0.015
26	Fish meal	-	-0.001	-	0.017	-	0.019
27	Shell meal	-	-0.001	-	0.021	-	0.018
28	Pork meat meal	-	-0.002	-	0.021	+	0.055
29	Pork MBM 1	-	0.025	-	0.022	+	0.086
30	2	-	-0.004	-	0.019	+	0.042
31	3	-	0.022	-	0.023	+	0.080
32	4	-	0.011	-	0.023	+	0.141
33	Pork and chicken meal	-	-0.003	-	0.022	+	0.045
34	Pork and chicken MBM 1	-	-0.005	-	0.022	+	0.053
35	2	-	-0.005	-	0.018	+	0.042
36	3	-	-0.005	-	0.020	+	0.080
37	4	-	0.003	-	0.022	+	0.141
38	5	-	0.053	-	0.024	+	0.154
39	6	-	-0.001	-	0.021	+	0.075
40	Chicken meal 1	-	-0.001	-	0.022	-	0.031
41	2	-	-0.001	-	0.022	-	0.026
42	Feather meal 1	-	0.002	-	0.028	-	0.043
43	2	-	-0.002	-	0.021	-	0.044
44	Dried skim milk	-	0.000	-	0.110	+	0.695
45	Dried whey	-	-0.001	+	0.240	+	1.155
46	Bovine MBM	+	1.198	+	0.355	+	1.607

1) n=2 (No. 1~43), n=1 (No. 44~46).

2) Product of ELISA Technologies, Inc.

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

4) Cut-off value is O.D. 0.1.

5) Cut-off values are O.D. 0.126 for No. 1~10 and 12~21, 0.160 for No. 5, 42 and 43, 0.151 for 22~41, 0.144 for No.44 and 45, 0.082 for No. 46.

6) Cut-off values are O.D. 0.066 for No. 1~3, 6, 7, and 12~15, 0.034 for No. 4, 8, 9 and 16~21, 0.032 for No. 5, 10~11 and 22~27, 0.027 for No. 28~31, 33~36, 0.075 for No. 32, 37~43, 0.075 for No. 44~46.

7) Equivalent to a concentration of 1% bovine MBM in a sample.

8) Equivalent to a concentration of 10% bovine MBM in a sample.

Table 2 Results of MELISA-TEK assay on Pork MBM and Chicken Meal containing Bovine Meat Meal at different levels¹⁾

Contamination level of bovine meat meal	(+/ -: Detected/Not detected)					
	Pork MBM			Chicken Meal		
	Result	Mean O.D.	S.D. ²⁾	Result	Mean O.D.	S.D. ²⁾
0%	-	-0.001	0.001	-	0.001	0.003
0.15%	+	0.394	0.041	+	1.566	0.166
0.75%	+	2.249	0.197	+	3.487	0.045

1) $n=8$

2) Standard Deviation

3.3 共同試験

メライザキットによる試験法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。豚肉骨粉及びチキンミールに牛肉粉を 0.15%及び 0.75%添加した試料及び無添加試料を用い、協同飼料株式会社品質保証部、財団法人食品環境検査協会東京事業所、財団法人日本食品分析センター千歳研究所、財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター、社団法人日本科学飼料協会、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、日本配合飼料株式会社中央研究所、農林水産省動物検疫所、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所及び同福岡事務所（現 同福岡センター）の 16 試験室において、本法に従って共同試験を実施した。

その結果は Table 3 のとおりで、すべての試験室がすべての試料について反すう動物由来たん白質の有無を正しく判定でき、特異性、感度、Accordance 及び Concordance はすべて 100%、COR もすべて 1 という良い結果が得られた。

検出下限の検討では 0.15%より低い牛肉粉添加量でも検出可能と考えられたが、牛肉粉 0.15%添加豚肉骨粉では 16 試験室の O.D.の最小値が 0.103 とカットオフ値 (0.1) よりわずかに大きい値であったことから、試験室間のバラツキも考慮したメライザキットの検出下限は 0.15%程度と考えられた。

なお、Accordance, Concordance 及び COR は、Langton により提唱された定性分析の共同分析結果の新たな精度指標⁷⁾であり、Accordance が試験室内の結果の一致度を、Concordance が試験室間の一致度を意味し、それぞれ定量分析における室内繰返し精度と室間再現精度にあたる。Accordance 及び Concordance は 100%に近いほど精度が高く、COR は Accordance 及び Concordance が定性分析の感度により影響を受けやすいことから、それに影響を受けにくい指標となっており、1 に近い値ほど精度が高い。

参考のため、各試験室で使用したプレートウォッシャーとプレートリーダーの機種等を Table 4 に示した。

Table 3 Collaborative study results of MELISA-TEK assay

(+/-: Detected/Not detected)

Lab. No.	Contamination level of bovine meat meal					
	Pork meat and bone meal			Chicken meal		
	0%	0.15%	0.75%	0%	0.15%	0.75%
1	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
2	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
3	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
4	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
5	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
6	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
7	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
8	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
9	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
10	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
11	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
12	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
13	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
14	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
15	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
16	-, -	+, +	+, +	-, -	+, +	+, +
Specificity (%)	100	—	—	100	—	—
Sensitivity (%)	—	100	100	—	100	100
Accordance (%)	100	100	100	100	100	100
Concordance (%)	100	100	100	100	100	100
COR	1	1	1	1	1	1
O.D. Mean	0.002	0.250	1.195	-0.001	0.908	2.637
Min	-0.011	0.103	0.548	-0.010	0.211	0.930
Max	0.016	0.622	2.266	0.006	1.608	3.547

Table 4 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Plate washer	Microplate reader
1	— ^{*1}	Molecular Devices Vmax KINETIC MICROPLATE READER
2	— ^{*2}	Nalge Nunc International IMMUNO-MINI NJ-2300
3	— ^{*2}	TOSOH MPR-A4i
4	— ^{*2}	BIO-RAD Benchmark Plus
5	— ^{*2}	BIO-RAD Model 550
6	— ^{*2}	BIO-RAD Benchmark Plus
7	BIO-RAD Immunowash Model 1575	TECAN SUNRISE RAINBOW
8	TRICONTINENT MultiWash II	Molecular Devices VERSA max
9	BIO-RAD Immunowash Model 1575	BIO-RAD Model 550
10	— ^{*2}	Thermo Labsystems Multiskan JX and COLONA ELECTRIC MTP-120
11	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
12	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
13	— ^{*3}	TECAN SUNRISE RAINBOW THERMO
14	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
15	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC
16	Thermo labsystems Wellwash 4MK2	TECAN SUNRISE CLASSIC

^{*1} Wash using a washing bottle.

^{*2} Wash using a multichannel micropipette.

^{*3} Wash using a multichannel dispenser.

3.4 流通豚肉骨粉中の牛肉骨粉の検出

メライザキットは、Myers らにより配合飼料中の牛肉骨粉について評価がなされており、感度が低いと報告されている⁸⁾。そこで、国内各種の動物質性飼料（反すう動物由来原料を含まないもの）を用い、牛肉骨粉での検出感度を調べた。豚肉骨粉、原料混合肉骨粉（豚肉骨粉とチキンミールを混合したもの）、チキンミール及びフェザーミールに、それぞれ牛肉骨粉を 0.25%、0.5%及び 1%添加した試料を調製し、メライザキットで試験を行った。

試験の結果は Table 5 のとおりであり、6 試料中 1 試料の 0.25%添加試料を除き、すべて検出することができた。したがって、メライザキットは動物性飼料中の牛肉骨粉の検出法としては、検査分析に適用するのに十分な感度を有していると考えられた。

Chen によると、メライザキットに用いられているモノクローナル抗体は 5.0 ng/mL の TnI を検出できると報告されている⁴⁾。試験に用いた牛肉骨粉について、メライザキットで TnI の含有量を測定したところおよそ 50 mg/kg であった。したがって、メライザキットは豚肉骨粉等中 0.1% の牛肉骨粉の検出が可能と推測される。

なお、牛肉粉と比較して牛肉骨粉の検出下限が大きい結果となったのは、骨の含有量が多くなるほど TnI 含有量は減少するためと考えられる。

Table 5 Results of MELISA-TEK assay on six samples of pork MBM containing bovine MBM at different levels

(n=1; +/-: Detected/Not detected)

Kind of pork MBM	Contamination level of bovine MBM							
	0%		0.25%		0.5%		1%	
	Result	O.D.	Result	O.D.	Result	O.D.	Result	O.D.
Pork meat meal	-	0.017	+	0.104	+	0.225	+	0.427
Pork MBM	-	0.060	+	0.180	+	0.324	+	0.544
Pork and chicken MBM 1	-	0.005	-	0.086	+	0.179	+	0.318
2	-	0.010	+	0.133	+	0.240	+	0.476
Chicken meal	-	0.005	+	0.118	+	0.214	+	0.436
Feather meal	-	0.004	+	0.121	+	0.218	+	0.414

4 まとめ

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について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 植物性飼料原料 22 点、反すう動物由来原料を含まない動物性飼料原料 19 点、反すう動物由来原料を含まない牛用配混合飼料 2 点、乳製品 2 点及び牛肉骨粉を用いて試験を行ったところ、乳製品の影響を受けずに牛肉骨粉を特異的に検出することができた。
- 2) 豚肉骨粉及びチキンミールにそれぞれ牛肉粉を 0%、0.15%及び 0.75%添加した試料を用いて検出下限を調べたところ、豚肉骨粉等中の牛肉粉で 0.15%と考えられた。
- 3) 豚肉骨粉及びチキンミールにそれぞれ牛肉粉を 0%、0.15%及び 0.75%添加した試料を用いた共同試験の結果、特異性、感度、Accordance 及び Concordance はすべて 100%、COR もすべて 1 であった。

以上の結果から、メライザキットは豚肉骨粉等の動物性飼料中の反すう動物由来たん白質の検出法として、特異性・検出感度とも検査分析に適用するのに十分な精度を有していると考えられた。

なお、メライザキットは本検討の結果を踏まえて、平成 18 年 3 月 17 日付けで「飼料中の動物由来たん白質の検出法 (その 3)」として制定され⁵⁾、平成 20 年 4 月 1 日には ELISA-TEK 及びモリナガキットと共に飼料分析基準に収載された⁶⁾。

謝 辞

共同試験にご協力をいただいた協同飼料株式会社品質保証部，財団法人食品環境検査協会東京事業所，財団法人日本食品分析センター千歳研究所，財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター，社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター，社団法人日本科学飼料協会，全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，日本配合飼料株式会社中央研究所，農林水産省動物検疫所の各位に感謝の意を表します。

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).
改正 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 17 年 2 月 28 日，農林省令第 15 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).
- 3) 農林水産省生産局長通知：“飼料中の動物由来たん白質等の検出法について”，平成 14 年 4 月 9 日，14 生畜第 181 号 (2002).
- 4) Chen, F. et al.: *Journal of Food Protection*, **67**, 544-549 (2004).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“「飼料中の動物由来たん白質等の検出法について」の改正について”，平成 18 年 3 月 17 日，17 消安第 12305 号 (2006).
- 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) Langton, S.D.: *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 175-181 (2002).
- 8) Michael J. Myers, et al.: *Journal of Food Protection*, **70**, 692-699 (2007).