

報 文

免疫拡散法による混合肉の定量

川 端 省 三*，出 来 三 男**

免疫学的方法を用いて、混合生鮮肉の混合割合を肉種別に定量する方法を検討した。抗体として肉種に特異的に反応する抗グロブリン画分 (IgG) を用い、牛肉、羊肉、豚肉及びこれらの混合肉に2倍量の水を加えて磨碎し、遠心分離後、上澄液をろ過して得たろ液を検体 (抗原) とした。

一定量の抗体を溶解したアガロースゲルを支持板とし、支持板に設けた穴に検体 (抗原) の一定量を注入し、抗原を拡散させると、輪状の沈降層を生ずる。検体の注入量と沈降層の輪の大きさとの間には対応関係があり、肉種別に検量線を作成することができた。

実験条件について検討した結果、アガロース濃度は0.5%，拡散時間は40時間、抗体濃度は Miles - Yeda 社製の Anti Porcine IgG で 0.025% が最適であることを知った。

1 緒 言

関税率表第2類に分類される生鮮肉のうち、牛の肉（くず肉を含む）は、輸入制度上非自由化品目であり、他の生鮮畜肉類とは取扱いを異にしている。輸入される畜肉類には、小塊状、ミンチ状あるいはスライスされた状態で輸入されるものが多く、外観から肉種を知ることが困難なことがある。とくに動物種の異なる肉を混合して輸入される場合、輸入制度の適用及び関税率表分類にあたって、肉種の混合割合を確認する必要がある。

肉種の鑑別、定量方法としては、ポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法¹⁾²⁾³⁾が有効であるが、肉種によっては泳動像が類似し、定量の精度が良くない場合がある。また、この方法では、3種以上の肉種が混合された肉では各肉種を分離定量することは極めて困難である。

免疫学的方法は操作が簡便であり、これまで生鮮肉の肉種の鑑別方法として用いられてきた⁴⁾。この方法は肉種に特異的な数種の抗体を必要とするが、定性方法としては精度が高い。A. R. Hayden は、家兔につく

らせた鶏に対する抗血清を用いて、寒天ゲル拡散法により、ビーフソーセージに混入した1%レベルの鶏肉を同定している⁵⁾⁶⁾。

これまで行われてきた免疫学的肉種の鑑別は、抗原と抗体を寒天ゲルの支持板に別々に注入し、両者が交差して生ずる沈降線を確認するものであり、定性的確認にとどまっていた。筆者らは、肉抽出液（蛋白質）が寒天ゲル中で拡散し、その拡散の程度は抽出液中の蛋白質濃度に依存していることから、拡散の程度を抗原抗体反応による沈降線で確認し、特異的な蛋白質を同定する方法を試みた。その結果、寒天ゲルの支持板全体に抗体を溶解し、抗原を含む肉の抽出液を拡散させると、輪状の沈降線を生じ、肉の抽出液の注入量と輪の大きさとの間には一定の関係があり、混合肉の混合割合を肉種別に定量することができたので報告する。

2 実験方法

2・1 抗体

抗体は Miles - Yeda 社製の次のものを用いた。

Anti Porcine IgG (Lyophilized) prepared in rabbit.

Anti Sheep IgG (Lyophilized) prepared in rabbit.

* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

** 大蔵省関税局輸入課 100 東京都千代田区霞ヶ関 3-1-1

Anti Bovine IgG (Lyophilized) prepared in rabbit.

これらの抗体は、それぞれ、実験に用いた試料の豚肉、羊肉及び牛肉の抽出液に対して、通常の免疫拡散法により、特異的に抗原抗体反応を行うことを確認した。

2・2 試料及び検体の調製

実験に用いた肉は、市販の牛、豚及び羊の生肉で冷凍したものを用いた。

これらの肉は、それぞれ別々に細断し、肉種ごとに約10gを秤り取り、正確に2倍量の脱イオン水を加えてシルバーソン万能型ホモジナイザーを用いて磨碎した。磨碎物を3050×Gで10分間遠心分離し、固体脂肪分を除去するため、その上澄液を東洋ろ紙No.2を用いてろ過し、ろ液を免疫拡散における検体（抗原）とした。混合肉の調製は細断した肉種ごとの一定量を秤り取り、十分に均質混合した。この混合肉を冷蔵庫内に一週間放置した後、上記と同様に検体を調製した。

2・3 操作

2・3・1 肉種鑑別用支持体の作成

シゲマ社製のアガロースに脱イオン水を加えて湯浴上で加温溶解し、1%のゲル溶液を作った。このとき、防腐剤として約0.01%のアジ化ナトリウムを加えた。シャーレにゲルを流し込み、直ちに細断した直径0.47mmのガラス棒を垂直に立て、ゲルを固化させた。ゲルの固化後ガラス棒を抜き取り、得られた穴を検体及び抗体の注入部とした。ゲルの厚さは約2mmである。

2・3・2 定量用支持板の作成

約0.01%のアジ化ナトリウムを添加した0.5~1%のアガロースゲル溶液を作り、ゲル溶液が37℃になるまで冷却したのち、これに一定量の抗体を加えて十分混合した。その一定量をすばやくシャーレに流し込み、厚さ3.5mmのゲルを作った。ゲルの固化前に2・3・1と同様に行って得られた穴を検体の注入部とした。このようにして作った検体の注入部には最大40μlの検体を注入することができる。

2・3・3 免疫拡散反応

支持板の注入部に、抗体又は検体の一定量をマイク

ロピペットで正確に注入し、30℃の定温器に入れて免疫拡散反応を行った。

3 結果及び考察

3・1 肉種の鑑別

検体（抗原）として牛肉と羊肉を混合したものの水抽出物を用いた場合の交叉図をFig 1に示した。拡散時間は40時間である。検体は牛又は羊の抗体に対して、

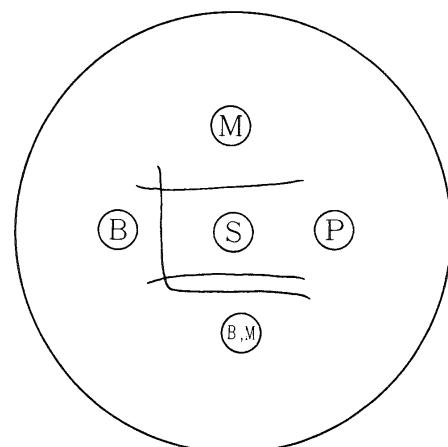


Fig 1 Precipitin pattern resulting from antigen-antibody reaction

Antigen: (S) extract of beef and mutton mixtures.

Antibodies: (M) anti sheep IgG, (B) anti bovine IgG, (P) anti porcine IgG.

Conditions: 1% - agarose gel, 2mm thickness, diffusion for 40 hrs at 37℃.

それぞれ単一の沈降線を生じ、牛及び羊の混合抗体に対しては2本の沈降線を生じた。対応する肉種間の沈降線については融合する現象が見られた。また、豚の抗体に対して、牛肉及び羊肉の水抽出物は沈降線を全く示さなかった。牛及び羊の混合肉について、混合抗体を用いた場合、2本の沈降線を示すが、抗原に近い沈降線は羊肉のものに対応し、抗体に近い沈降線は牛のものに相当している。この現象は、それぞれ、牛肉抗原と羊肉抗原のアガロースゲル中における拡散速

度の差によるものと考えられる。

3・2 沈降帯の生成

Anti Porcine IgG を 0.025% の濃度で、1% アガ

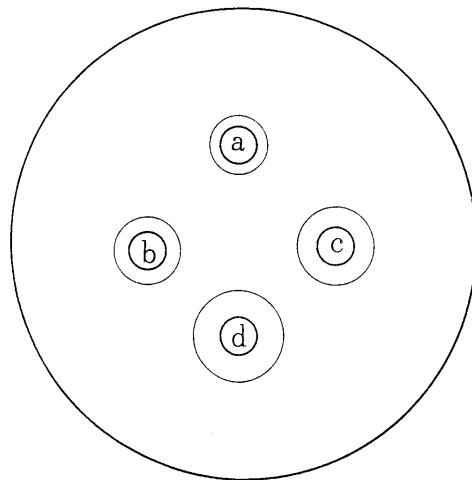


Fig 2 Precipitin pattern resulting from antigen - antibody reaction

Antibody: 0.025% - anti porcine IgG in agarose gel.

Antigen: extract of pork, (a) 0.01ml, (b) 0.02ml, (c) 0.03ml, (d) 0.04ml.

Conditions: 1% - agarose gel, 2mm in thickness, diffusion for 40 hrs at 37°.

ロースゲルに溶解し、豚肉の検体をマイクロピペットで $10 \sim 40 \mu\text{l}$ 注入し、40時間拡散した状態を Fig 2 に示す。沈降帯は検体（抗原）注入部を中心に、リング状に雲のように分布しており、とくにリング外側は濃厚に分布している。また、検体の注入量と沈降帯の輪（以下ゾーンと略記）の大きさとの間には対応関係が認められた。

Fig 1 に示したように、抗体と抗原を交差するように拡散させたときは、拡散した抗原と抗体の濃度が最適条件になったところで沈降線をつくる⁷⁾。Fig 2 の条件では、ゲル全体に一定濃度で抗体が溶解しているので、沈降線の生成は、拡散した抗原の濃度に依存しているものと考えられる。そこで、定量条件を明らかにするため、抗体濃度と沈降帯の分布、アガロースゲ

ル濃度と拡散速度及び拡散時間と沈降帯の分布状況について検討した。

3・3 拡散条件の検討

3・3・1 抗体濃度

抗体として Anti Porcine IgG を用い、豚肉の水抽出液を検体（抗原）として 1% アガロースゲル中の抗体濃度を変え、3・2 と同様に拡散を行った。生じたゾーンの直径をノギスで測定し、この値と注入量との関係をプロットした。Fig 3 に示したように、両者の間に 2 次曲線に近い関係が得られた。曲線を抗体濃度に

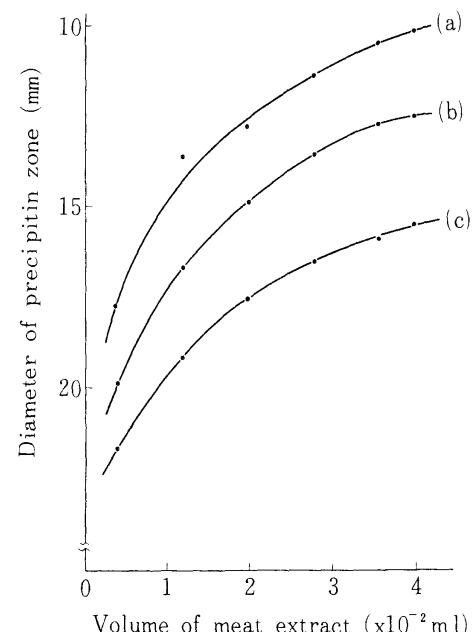


Fig 3 Relationship between the diameter of precipitin zone and the volume of meat extract

Antibody: anti porcine IgG, (a) 0.0125%, (b) 0.025%, (c) 0.05% pork extract.

Antigen: pork extract.

1% - Agarose gel, diffusion for 40 hrs at 37°.

ついて比較すると、濃度が低いときでは、抗原の拡散が早くゾーンは大きくなっている。また、ゾーンは検体(抗原)の注入量が多いほど増加している。抗体濃度を4倍にした場合、拡散速度は約40%低下している。したがって、定量においては、抗体濃度を低くするほど良いが、抗体濃度が0.0125%の場合、沈降帯が薄く、直径の測定に難点があった。抗体濃度は0.025%程度が良好と考えられる。

3・3・2 ゲル濃度と拡散時間

Anti Porcine IgG の濃度を0.025%とし、0.5%及び1%のアガロースゲルを用いて、豚肉の水抽出液を検体(抗原)とし、3・3・1と同様に拡散を行った。Fig 4に示したように、ゲル濃度が1%のときでは、0.5%のときに比べてゾーンの直径は小さい。ゲル密度と分子ふるいの関係からゲル濃度を0.5%にした場合、沈降帯の判別が最も良好であった。また、ゲル濃度0.4%以下では、ゲルの凝固性が弱く、実験が困難であった。したがって、今後の実験におけるアガロース濃度は0.5%とした。

Fig 5は拡散時間とゾーンの直径との関係を、同一ゲル板を用いて検討した結果を示したものである。18

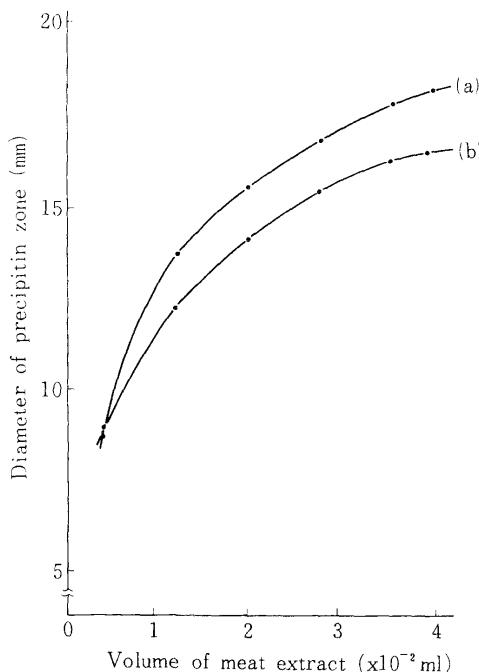


Fig 4 Relationship between the diameter of precipitin zone and the volume of meat extract

Agarose gel: (a) 0.5%, (b) 1%.

Diffusion for 40 hrs at 37°.

Antibody: antiporcine IgG 0.025%.

Antigen: pork extract.

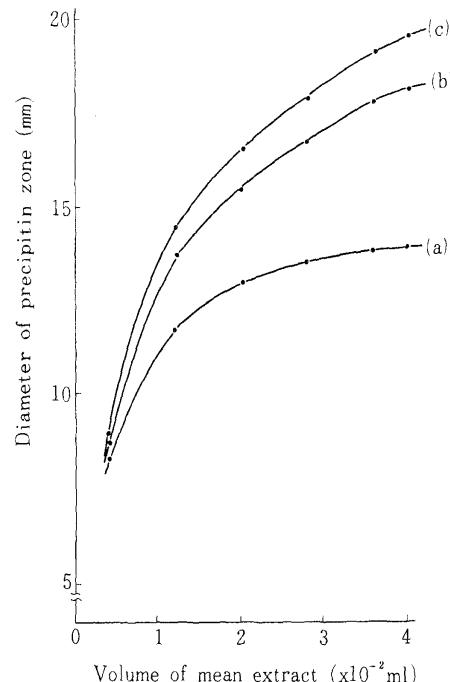


Fig 5 Relationship between the diameter of precipitin zone and the volume of meat extract

Diffusion time (hrs at 37°): (a) 18, (b) 42, (c) 68.

Antibody: anti porcine IgG, 0.025% in 0.5% agarose gel.

Antigen: pork extract.

時間の拡散では、検体（抗原）の注入量が $20 \mu\text{l}$ までは、注入量に応じてゾーンの大きさは増しているが、 $20 \mu\text{l}$ 以上ではゾーンの大きさはほぼ一定になり、注入量による影響は小さい。しかし、42時間又は68時間の拡散条件では、 $20 \mu\text{l}$ 以上の検体注入量においても、検体（抗原）の注入量を増すとゾーンの直径も増加しており、また、ゾーンの鮮明度にも差がなかった。そこで分析時間の短縮を図るうえから、今後の測定は約40時間の拡散の後行った。

3・4 検量線の作成

3・3で検討した実験条件は豚肉の場合であるが、羊肉及び牛肉の場合も、豚肉の場合と全く同様な関係が認められた。

検量線の作成は、先に求めた拡散の最適条件、即ち、アガロース濃度 0.5%，拡散時間 40 時間、抗体濃度 0.025% で行った。各肉種について、それぞれ4枚のゲル板を作り、検体の $5 \sim 30 \mu\text{l}$ を注入し、拡散して得たゾーンの直径をノギスで測定した。

得られた検量線を Fig 6 に示す。各測定点は4枚のゲル板から求めた値の平均である。

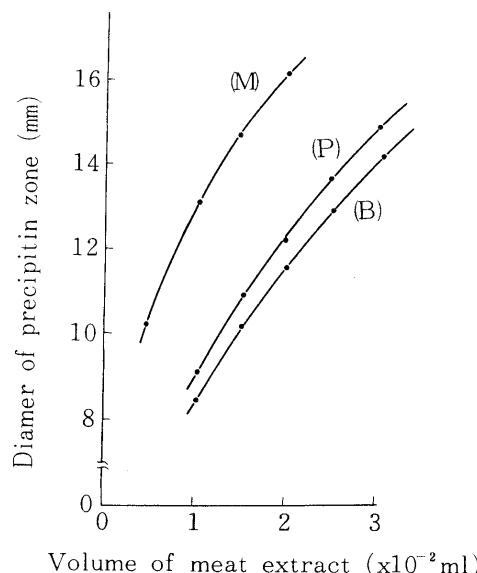


Fig 6 Calibration curves

Meat extract: (M) mutton, (P) pork, (B) beef.

Conditions are same as cited in Fig 4.

Fig 6 における豚肉の測定値を Table 1 に示した。測定値の標準偏差は 0.4 以下、変動係数は 4% 以下であり、この条件で混合肉の混合割合を推測することができた。

Table 1 Observed values (Pork)

Volume of extract ($\times 10^{-4} \text{ ml}$)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Diameter of precipitin zone (mm)	8.5	10.1	12.0	12.5	14.1
(mm)	8.6	10.2	11.4	12.9	13.9
	8.8	10.0	12.4	12.9	14.7
	8.3	9.9	12.2	12.7	13.7
\bar{x}	8.6	10.1	12.0	12.7	14.1
S. D.	0.2	0.1	0.4	0.2	0.4
C. V. (%)	2.4	1.3	3.6	1.4	3.1
$\ell_1 \sim \ell_2$	8.1~9.0	9.8~10.3	11.1~12.9	12.3~13.2	13.2~15.3

S. D. : standard deviation

C. V. : coefficient of variation

3・5 混合肉の定量

3・4で作成した検量線を用いて、実際に調製した混合肉の肉種別混合割合を求めた。検液（抗原）の調製は、検量線作成に用いた各肉種 100% のものと全く同様に行つた。定量分析は、3・4で作成した4枚のゲル板を用い、検液 $40 \mu\text{l}$ を注入し、同一条件で同時に行つた。結果は4つの測定値の平均である。

同じ検液（抗原）を用いて、ポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法により混合割合を求め、本法の結果と比較した。ポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法の実験条件は、前法³⁾と全く同様にして行つた。検液（抗原）の調製方法も本法と全く同じである。これらの結果を Table 2 に示した。

Table 2 Analysis of mixed meat

Ratio of meat mixed (%)	Found (%)	
	This method	E. P. *
Pork (50)	49	40
Beef (50)	51	60
Pork (30)	33	38
Beef (70)	67	62
Pork (70)	67	79
Beef (30)	33	21
Pork (50)	42	—
Beef (25)	30	—
Mutton (25)	28	—

* Method of Electrophoresis³⁾.

Table 2 の本法による定量結果は、各肉種の定量値の和が 100 になるように按分計算を行っている。二種混合肉についてはおおむね良好な結果が得られたが、三種混合肉については実際の混合割合との差異がやや大きかった。この原因としては、肉をホモジナイズ及び遠心分離したとき得られる上澄液の量が肉種によって異っており、混合肉においては、各肉種の抗原の抽出量に影響を及ぼすことが考えられる。この点については今後検討することとしたい。

ポクアクリルアミドゲル薄層電気泳動法による定量は、豚肉と牛肉の場合、泳動像が互いに類似しており、定量精度が良くないことは既に報告されているとおりである³⁾。

4 総 括

免疫拡散法は、操作が簡単であり、特別な機器を必要とせず、精度良く肉種の確認をすることができます。この方法を用いて、混合肉の肉種の混合割合を求める方法を検討した。

アガロースゲルに抗体を溶解し、ゲルに設けた穴に肉の水抽出液を注入して拡散を行うと、抗原抗体反応による沈降線が輪状に生じる。肉の抽出液の注入量と、沈降線の輪の大きさとの間には一定の関係があり、肉種別に検量線を作ることができた。拡散条件は、アガロース濃度 0.5% 拡散時間約 10 時間 抗体濃度は Miles - Yeda 社製 IgG の場合 0.025% が良好であった。沈降帯の直径の測定値の変動係数は 4% 以下であった。

おわりに、本研究の機会を与えて下さいました当所第 2 分析中込室長に感謝致します。

文 献

- 1) 加藤時信、出来三男：本誌、No. 17, 17 (1977).
- 2) 加藤時信、出来三男：本誌、No. 18, 59 (1978).
- 3) 加藤時信、川端省三、出来三男：本誌、No. 19, 57 (1979).
- 4) 出来三男：本誌、No. 19, 21 (1979).
- 5) A. R. Hayden : *J. Food Sci.*, 42, 1189 (1977).
- 6) A. R. Hayden : *J. Food Sci.*, 43, 476 (1978).
- 7) T. Takai : "Plasma proteins", Igaku Shoin (1969).

Quantitative Determination of Meat Species in Fresh Meat Mixtures by Antigen - Antibody Reaction

Shozo KAWABATA* and Mitsuo DEKI**

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance,
531 Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, 271 Japan.

** Import Division of Customs and Tariff Bureau,
3 - 1 - 1 kasumigaseki, Chiyoda - ku, Tokyo, 100 Japan.

A new method for quantitative determination of meat species in fresh meat mixtures has been developed by antigen - antibody reaction.

The antibodies used were anti bovine IgG (rabbit serum), anti porcine IgG (rabbit serum) and anti sheep IgG (rabbit serum) which were produced by Miles - Yeda Ltd. The antigen of pork, mutton, beef or these mixtures were prepared as follows: the meats homogenized in 2 volumes of water were centrifuged at 3050 xG for 10 minutes and the supernatants were filtrated.

The antigen - antibody reactions were carried out in the IgG solution dissolved in agarose gel. The antigens in the meat extract were diffused from the wells on agarose gel. The precipitin lines were shown as the ring zones around the wells after the diffusion of the antigens. The calibration curves of each meat were obtained by the plot of the diameter of the zones vs. the volumes of meat extracts charged in the wells. The experimental conditions used were as follows: the concentration of agarose gel, 0.5%, the diffusion times, 40 hrs, the concentration of antibody in agarose gel, 0.025%.

- Recieved Sept. 10, 1979 -