

アレルギー物質含有検査のウエスタンブロット結果に 画像解析技術を活用するための検討

Investigation of the Use of Image Analysis Technology for Western Blot Results of Tests Containing Allergenic Substances

菅野 陽平 細川 葵 今野 綾乃

Yohei SUGANO, Aoi HOSOKAWA and Ayano KONNO

Key words : western blotting (ウエスタンブロット) ; image analysis (画像解析) ; specific allergenic ingredients (特定原材料) ; ovalbumin (オボアルブミン) ; allergen content test (アレルギー物質含有検査)

緒 言 方 法

加工食品には、食物アレルギーの表示制度により8品目の特定原材料（えび、かに、くるみ、小麦、そば、卵、乳、落花生）の表示が義務づけられている¹⁾。特定原材料表示の正確性を判定するためのアレルギー物質含有検査では、ELISA 法によるスクリーニング検査を行い、特定原材料由来タンパク質が10 $\mu\text{g/g}$ 以上検出された試験品について確認検査を行うこととなっており、乳及び卵に対する確認試験はウエスタンブロット (WB) 法で実施する。WB 法は、抗体を用いて標的タンパク質の有無を検出する手法で、試験品から抽出したタンパク質を電気泳動 (SDS-PAGE) により分離、ゲルからメンブレンへ転写、標的タンパク質に対する一次抗体及び二次抗体等を用いた後、染色によりタンパク質の存在をバンドとして検出する^{2,3)}。アレルギー物質含有検査では、試験品と標準液の各バンドを目視で確認して特定原材料由来タンパク質の有無を判定する⁴⁾。しかし、乳及び卵のアレルゲンには加熱により構造変化や変性を起こしやすいタンパク質があり⁵⁾、これまで WB 法において、食品加工時の加熱等により試験品のバンド幅やその濃淡が変化し、標準液との比較で判定に苦慮した事例が認められた⁶⁾。近年、ゲル電気泳動の結果を画像解析ソフトで処理し、バンドの濃淡を数値化する手法が報告されているが^{7,8)}、本手法を食品中のアレルギー物質含有検査に活用した例は少ない。そこで、特定原材料のタンパク質濃度と WB 結果の画像解析で得られたピーク面積値との相関や、加熱により幅や濃淡が変化したバンドの画像解析に適した解析条件について調査し、アレルギー物質含有検査への画像解析技術の応用の可能性について検討した。

1. 試料及び試料溶液の調製

試料は、QC マテリアル卵（森永生科学研究所）を用いた。QC マテリアル卵を精製水に溶解し、つめ付き 2 mL チューブに分注し、105℃に設定したヒートブロック ALB-310（サイニクス）で加熱した。加熱時間は、0 分（未加熱）、5 分、10 分、30 分、1 時間、1 時間 30 分、2 時間、3 時間の 8 パターンで検討した。加熱後、速やかに放冷し、試料溶液と等量の 2 倍濃度の WB 用抽出液もしくは ELISA 用抽出液を加え、25℃、100 rpm で 12 時間以上振とうし、常温、3,000 × g で 20 分間遠心した上清をそれぞれ WB 用試料溶液、ELISA 用試料溶液とした。

2. ウェスタンブロット

WB は、モリナガ FASPEK 特定原材料ウエスタンブロットキット（森永生科学研究所）に従った。SDS-PAGE には、10%もしくは15%アクリルアミドゲルを用いた。試料溶液 100 μ L にローディングバッファー（富士フイルム和光純薬）200 μ L を加えて、よくかくはんした後、100℃で5分間加熱した。冷却後、アクリルアミドゲルにアプライし、定電流・定電圧電源 BP-550（BIOCRAFT）を用いて 20 mA の定電流で電気泳動（泳動装置：テフコ STC-808）を行った。泳動後、ゲルは PVDF 膜 Hybond-P（アマシャム・バイオサイエンス）に重層し、転写装置 STB-88（テフコ）を用いて PVDF 膜 1 cm² 当たり約 2 mA の電流値で1時間転写を行った。転写した PVDF 膜には、ウエスタンブロットキットの1次抗体溶液（終濃度 0.5 μ g/mL）、2次抗体溶液（VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit（VECTOR））ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体を 10,000 倍に

希釈したもの)、アルカリホスファターゼ標識アビジン-
ピオチン溶液 (VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit
(VECTOR))、検出試薬 (Alkaline Phosphatase Substrate
Kit IV <BCIP/NBT> (VECTOR)) を順次反応させ、免
疫染色を行った。

3. ELISA

ELISA は、FASPEK エライザ II 卵 (卵白アルブミ
ン) (森永生科学研究所) (以下、モリナガと略) 及び
FASTKIT エライザ Ver.III 卵 (日本ハム) (以下、日ハ
ムと略) を用いて行った。試料から調製した試料溶液を検
体希釈液で 20 倍に希釈し、ELISA 法用 96 穴マイクロ
プレートに負荷した。1 次抗体、2 次抗体、発色基質などを
順次反応させ、マイクロプレートリーダー MTP-310Lab
(コロナ電機) にて主波長 450 nm、副波長 630 nm で吸
光度測定を行い、データ解析用ソフト SF6 を用いて、4 係数
Logistic 解析により特定原材料由来タンパク質含有量を算
出した。

4. WB 結果の画像解析

WB 結果の画像は、PIXUS TS8030 (キヤノン) のスキャ
ナを用い、IJ Scan Utility で 600 dpi の PNG 形式で取り込
んだ。画像の解析は、ImageJ 1.52a (NIH)^{9, 10)} を用いた。

結果及び考察

標準液濃度と画像解析により得られたピーク面積値と
の関係を確認するため、標準液 (0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、
10 $\mu\text{g/mL}$) のバンドの画像解析を行い、ピーク面積値を
算出した (Fig.1)。その結果、標準液のバンドの濃淡と
ピーク面積値の大小に一致する傾向が認められたものの、
0.5 $\mu\text{g/mL}$ 標準液のピーク面積値 (2,432.6) に対し、1.0 $\mu\text{g/mL}$
標準液のピーク面積値 (4,456.0) はほぼ 2 倍であったが、
10 $\mu\text{g/mL}$ 標準液のピーク面積値 (16,148.9) は 6.6 倍程度
であり、実際の濃度より低いピーク面積値を示した。これ
は、10 $\mu\text{g/mL}$ と高濃度であったためにバンドの染色が飽
和状態になりつつあり、実際の濃度よりもピーク面積値が
低く算出されたためと考えられた。

そこで、標準液濃度とピーク面積値の間に直線性が認

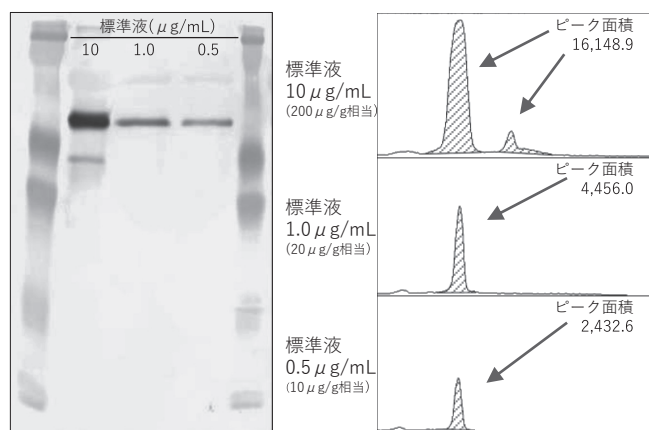
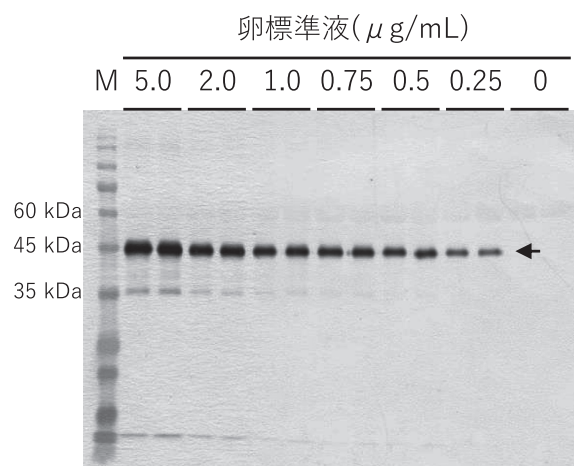


Fig. 1 ウエスタンブロット結果の画像解析

められる範囲を確認するため、標準液濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ から
5.0 $\mu\text{g/mL}$ までの 7 段階のバンドについて画像解析を行っ
た (Fig.2)。その結果、標準液濃度が高くなるに従い、ピー
ク面積値も増加したが、高濃度ではピーク面積値の増加が
鈍化する傾向を確認した。そこで、標準液濃度とピーク面
積値に直線性が認められる範囲を検討したところ、標準液
濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ から 0.75 $\mu\text{g/mL}$ の範囲 (特定原材料由来
タンパク質に換算して 0 $\mu\text{g/g}$ から 15 $\mu\text{g/g}$ 相当量) で良
好な直線性が認められた。特定原材料混入の判断基準とな

A



B

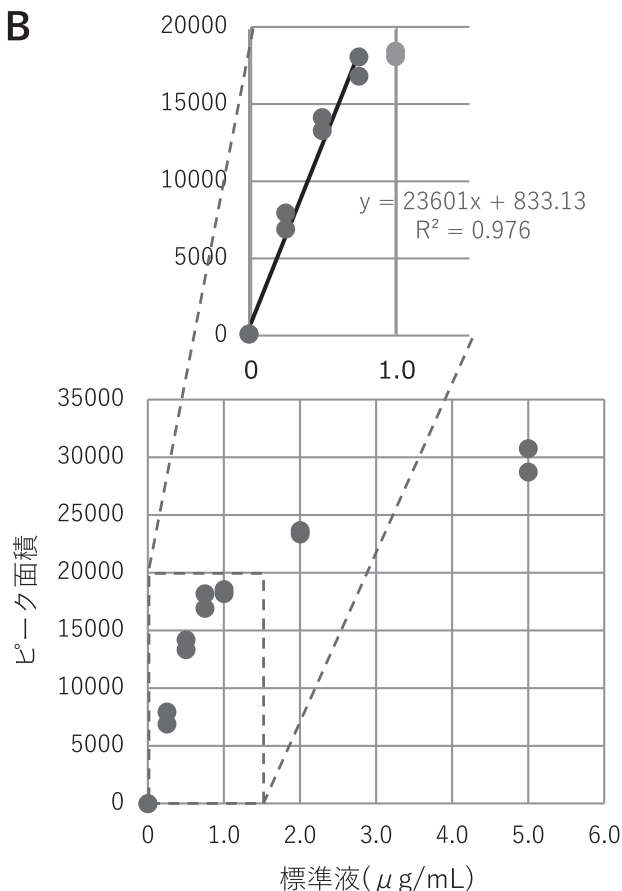


Fig. 2 標準液濃度と画像解析結果の関係

A 段階希釈した標準液の WB 結果
B 標準液濃度とピーク面積の関係と 0.25~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 標準液範囲の
拡大グラフ

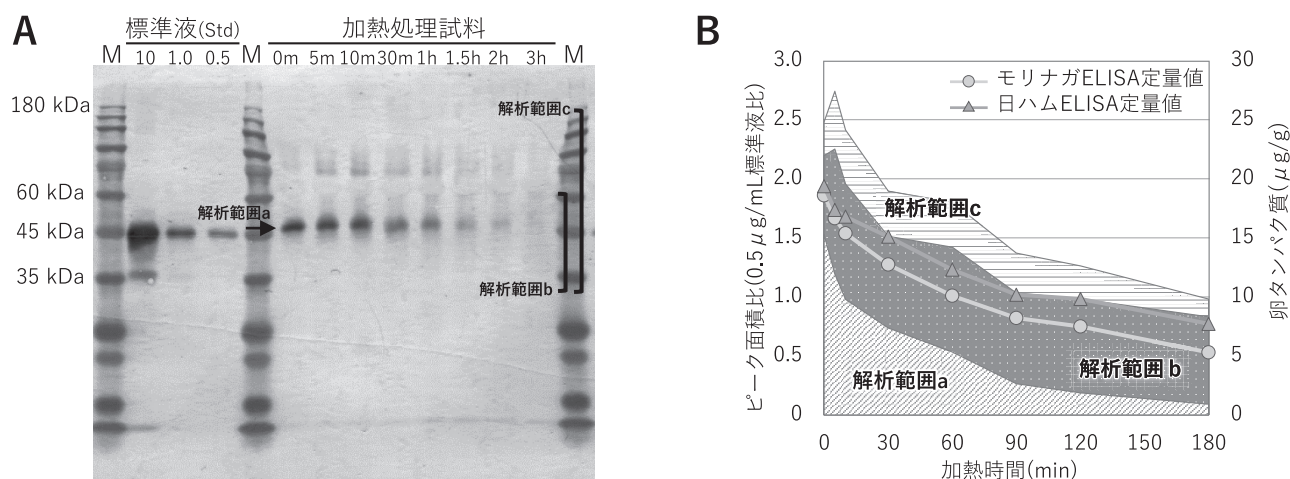


Fig. 3 加熱処理試料の WB 結果の画像解析と ELISA 定量値の関係

A 抗オボアルブミン抗体を用いた WB 結果と画像解析の解析範囲

B 各解析範囲のピーク面積比（面グラフ）と ELISA 定量値（折れ線グラフ）の経時変化

る特定原材料由来タンパク質量 $10 \mu\text{g/g}$ はこの範囲に入っており、実際の判定に関しては標準液のピーク面積値と比較すること（すなわちピーク面積比を用いること）で、特定原材料由来タンパク質量の推定が可能と考えられた。

次に、加熱による特定原材料由来タンパク質の変化が画像解析に与える影響を確認するため、卵の含有量 ($19 \mu\text{g/g}$) が既知の試料を 100°C で加熱し、WB 法でのバンドの変化を経時的に確認した (Fig.3A)。卵の主要な特定原材料由来タンパク質であるオボアルブミンは、加熱により WB のバンドが幅広くなることが報告されているが¹¹⁾、今回の検討ではより細かく経時変化を解析した。その結果、オボアルブミンのバンドは、加熱時間が長くなるに従い一群に見える範囲で幅広になっており、目視で一連と認められたバンドを画像解析した結果でもベースライン間の一連のピークとして認識された (Fig.4)。さらにバンドの濃さも薄くなる傾向が認められた。そこで、このように幅広となったバンドの画像解析に適した解析範囲を決定するため、オボアルブミンの分子量とされる 50 kDa 付近¹⁾ のバンド中心部（解析範囲 a）、オボアルブミンのバンドが加熱により幅広に変化した一群と見える範囲、すなわち 30 kDa から 60 kDa 付近のバンド部分（解析範囲 b）、さらに広範囲に

オボアルブミンのバンドとは別群と考えられた 75 kDa 以上の高分子バンドを含む 30 kDa 以上のバンド全体（解析範囲 c）についてそれぞれピーク面積値を算出し、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 標準液（特定原材料由来タンパク質量 $10 \mu\text{g/g}$ 相当）に対するピーク面積比でグラフを作成した (Fig.3B 面グラフ)。加えて、加熱試料に対する ELISA による特定原材料由来タンパク質の定量結果を先のグラフ上にプロットし (Fig.3B 折れ線グラフ)、各解析範囲のピーク面積比と ELISA 定量値の経時的な変化を確認した。その結果、ピーク面積比及び ELISA 定量値は、いずれの解析範囲においても加熱時間が長くなるに従い共に減少した。これまでの報告でも、加熱によるオボアルブミンの構造変化によりアレルゲン性が減少することが知られており¹¹⁻¹³⁾、このピーク面積比と ELISA 定量値の結果は既報と同じ傾向を示していた。さらに、解析範囲の違いによるピーク面積比と ELISA 定量値を比較したところ、ELISA 定量値 (Fig.3B 折れ線グラフ) に対し、解析範囲 a のピーク面積比は低く、また解析範囲 c のピーク面積比は高い値を示したのに対し、解析範囲 b のピーク面積比が ELISA 定量値と最もよい一致を示した。このことから、オボアルブミンのバンドを画像解析してピーク面積比を求めるには、一群のバンドと認められる解析範囲 b を用いることが適していると考えられた。そこで、以後の画像解析は解析範囲 b の範囲で行うこととした。

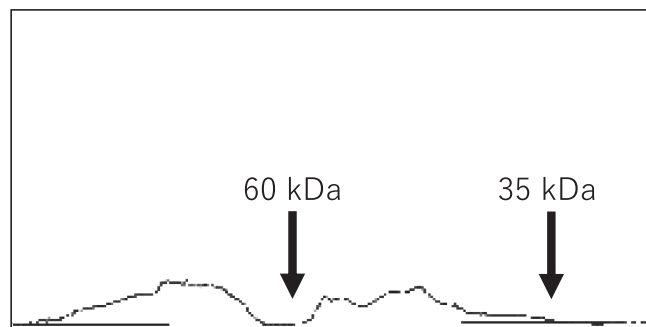


Fig.4 卵加熱試料の画像解析例

加熱温度 100°C 、加熱時間 1 時間 30 分

次に、WB の染色の違いが画像解析結果に与える影響について検討するため、3 種類の染色パターン（染色時間 30 秒の薄い染色、染色時間 1 分 30 秒の通常の染色、染色時間 3 分 30 秒の濃い染色）で WB を行い (Fig.5A)、得られたバンドから画像解析によりピーク面積比を算出した (Fig.5B 棒グラフ)。また、ELISA により得られた卵の特定原材料由来タンパク質の定量結果もプロットした (Fig.5B 折れ線グラフ)。その結果、加熱時間が短い鮮明なバンドでは染色間の差はほとんどなかったが、加熱時間

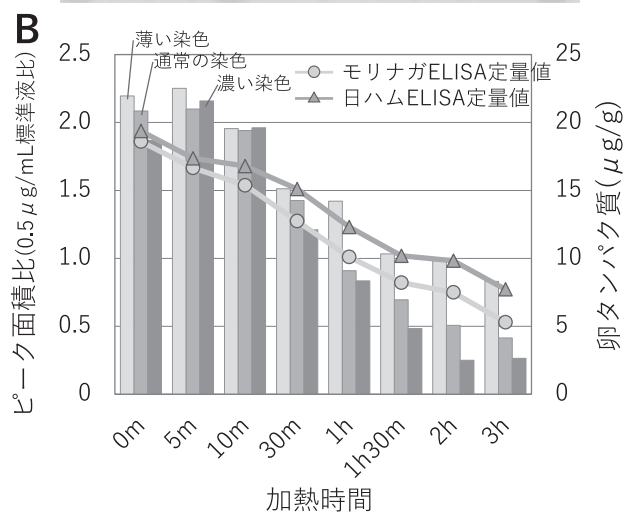
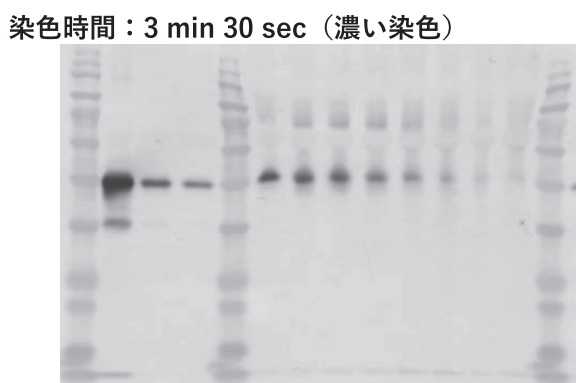
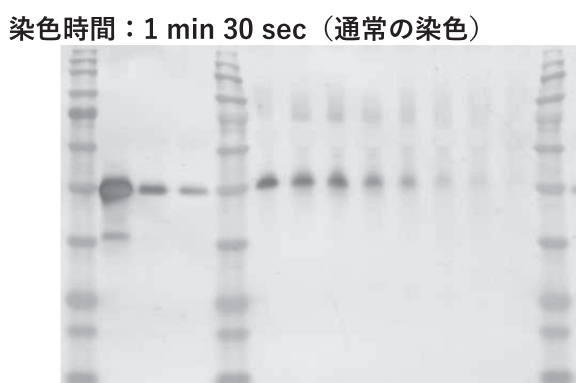
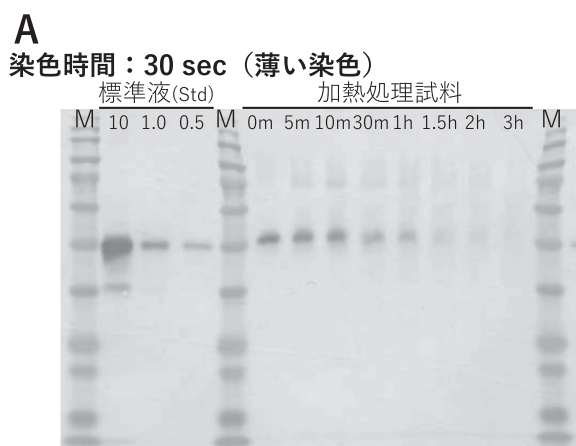
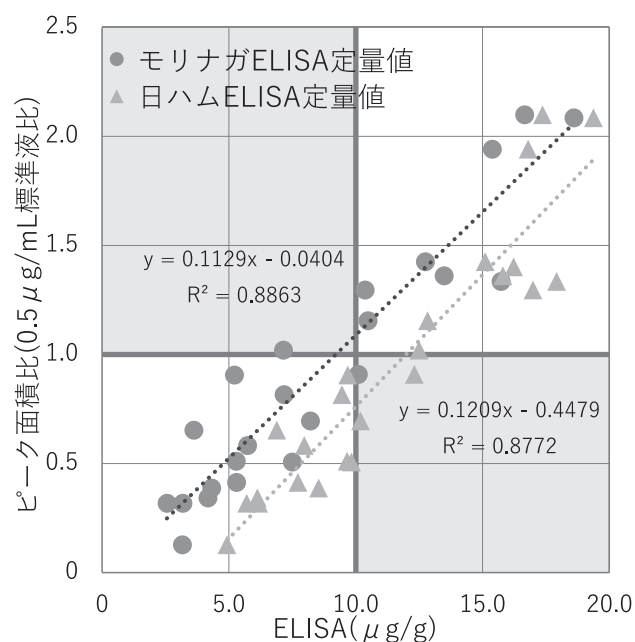


Fig. 5 標準液濃度と画像解析結果の関係

- A 染色時間の差による WB 結果の違い
B 染色時間の差によるピーク面積比の違い（棒グラフ）と ELISA 定量値（折れ線グラフ）

1 時間を超えると染色間のピーク面積比の差が顕著になる傾向が認められた。また、ELISA 定量値とは染色時間 30 秒の薄い染色が最もよい一致を示していた。これは、染色によるバックグラウンドが低く、バンドとの色調の差を効率よく検出されているためと考えた。しかしながら、一般的に加工食品の加熱時間は 30 分以内が大半であり、そのような加熱時間では染色間のピーク面積比に大きな差は認められなかった点、そしてアレルギー物質含有検査の WB による確認検査では、目視によるバンドの有無で判定を行うことが第一である点から、染色時間 30 秒の薄い染色よりも通常の染色（染色時間 1 分 30 秒）のバンドの方が明瞭であり、検査に適していると考えられた。しかし、30 分以上の長時間加熱を要する食品（豚骨スープや煮物など長時間の加熱を要する加工食品など）の場合には、染色時間 30 秒の薄い染色が最も良い一致を示していたことから、加工条件によっては薄い染色を適用することが有効な場合があることも示唆された。

画像解析に必要な条件が定まったことから、これらを用いた通常の染色による WB 結果の画像解析で得られたピーク面積比と ELISA 定量値の関係を明らかにするため、加熱処理によりバンドが幅広で薄くなった検体を含む 24 検体について、対応するピーク面積比 1.0 と ELISA 定量値 10 $\mu\text{g/g}$ を基準とし、その大小関係を確認した (Fig.6)。その結果、2 種類の ELISA キットによる ELISA 定量値



		ELISA定量値	
		10 >	10 ≤
ピーク面積比	1.0 ≤	1 (2%)	19 (40%)
	1.0 >	25 (52%)	3 (6%)

Fig. 6 ELISA 定量値とピーク面積比の関係

とピーク面積比のプロット合計 48 プロット中、44 プロット (92%) で大小関係が一致し、モリナガの ELISA キットに比べ、日ハムの ELISA キットの ELISA 定量値が若干高くなる傾向が認められたものの、両キット共に ELISA 定量値とピーク面積比に高い相関関係 ($r > 0.9$) が確認された。このことは、幅広で薄くなったバンドであっても標準液とのピーク面積比を解析することで、およそその特定原材料由来タンパク質量を推定できることを示しており、WB の画像解析結果は確認検査の判定の一助になり得ると考えられた。

アレルギー物質含有検査の WB による確認検査では、目視によるバンドの確認が求められている。卵の特定原材料由来タンパク質であるオボアルブミンは、加熱によりバンドが幅広、濃さも薄くなり、場合によっては目視での判定が難しくなる可能性がある。画像解析でバンドを確認するという本アプローチは、そのような確認検査の判定に役立つと考えられた。

文 献

- 1) 消費者庁次長通知消費表第 139 号「食品表示基準について」, 平成 27 年 3 月 30 日
- 2) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(9), 4350-4 (1979)
- 3) Sambrook JF, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, pp.18.60-18.61
- 4) 手島玲子, 安達玲子, 酒井信夫: アレルギー物質, 食品衛生検査指針理化学編 2015 (公益社団法人日本食品衛生協会編), 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京, 2015,

- pp.309-354
- 5) 上野 宏, 中埜 拓: 食物のアレルゲンと β -ラクトグロブリンの抗原改変. *化学と生物*, **54**(5), 335-342 (2016)
 - 6) 兼俊明夫, 林 隆章, 平間祐志, 加藤芳伸, 鈴木智宏, 孝口裕一, 長南隆夫: 平成 20 及び 21 年度における北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査について. *道衛研所報*, **60**, 39-43 (2010)
 - 7) Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ: An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **27**(1), 4-25 (2017)
 - 8) Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y: Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLoS One*, **13**(1), e0191532 (2018)
 - 9) Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 671-675 (2012)
 - 10) Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ: Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**(7), 36-42 (2004)
 - 11) Shin M, Han Y, Ahn K: The Influence of the Time and Temperature of Heat Treatment on the Allergenicity of Egg White Proteins. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **5**(2), 96-101 (2013)
 - 12) Joo K, Kato Y: Assessment of allergenic activity of a heat-coagulated ovalbumin after *in vivo* digestion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**(3), 591-7 (2006)
 - 13) Golias J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozakova H, Srutkova D, Klimesova K, Sotkovsky P, Palova-Jelinkova L, Ferreira F, Tuckova L: Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *PLoS One*, **7**(5), e37156 (2012)