調 査 ・ 資 料

肉種鑑別に用いる寒天ゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法) の反応条件の検討

西條頼廣* 嵯峨晴世* 平田一郎*

Studies on Reactive Conditions for the Discrimination of Animal Species of Meat by Agar Gel Diffusion Test

Yorihiro SAIJO, Haruyo SAGA and Ichiro HIRATA

(Laboratory of Pathogenic Microbiology and Serological Test of Infectious Disease,
Tama Branch, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health:
25-16, 3-chome, Shibasaki-cho, Tachikawa City, Tokyo)

結 言

従来、肉種鑑別用寒天ゲル内沈降反応には pH 8.6 の sodium veronal と veronal の組み合わせの緩衝液 (Culliford¹⁾, 村上²⁾), あるいはホウ酸緩衝食塩水 (小沢³⁾) などが用いられていた。実験者によって使用する緩衝液の性状が異なっているが、なぜ異なった緩衝液を使用する必要があるのか、その理由の説明が明確でなかった。著者らは必要に迫られ、これらの緩衝液について追試したところ、必ずしも満足を得ることが出来なかった。従来発表されている Ouchterlony 法による肉種鑑別以外の材料に関する抗原抽出溶媒、ゲル作製緩衝液、寒天の銘柄による影響、および反応促進物質などにつき比較検討を行った。

実験材料および方法

1) 抗肉免疫血清

日本食肉加工協会より分与された、抗ブタ、ウシなど 6 種類および当所村上一博士より分与された抗肉免疫血清を用い、参考品として Burroughs Wellcome 社の製品を用いた。

2) 緩 衝 液

緩衝液は表-1 に示すように pH 6.8 の 0.85% 食塩水、pH 8.6 の sodium veronal-veronal 緩衝液 (Culliford¹⁾), pH 8.6 の sodium veronal (Na veronal)-HCl 緩衝液 (Crowle⁴⁾, Graber⁵⁾), pH 8.2 のホウ酸緩衝食塩水 (小沢³⁾) を用い、寒天ゲルを作製し、また肉

表-1. 使用した緩衝液の組成

Sodium veronal-HCl 緩衝液 (pH 8.6)	
Sodium veronal 0.1 M	8.71 ml
HCl 0.1 N	1.29 ml
Sodium veronal-veronal 緩衝液 (pH 8.6) (culliford)	
Sodium veronal	7,006 g
Veronal	1,106 g
蒸留脱イオン水	2,000 ml
(乳酸カルシウム	1,024 g)
ホウ酸緩衝0.85%食塩水 (pH 8.2)	
ホウ酸	18.54 g
0.5 N NaOH	100 ml
蒸留脱イオン水を加えて 1,000 ml とし、0.85% 食塩水に 5% の割合に添加し、pH を 8.2 とする。	

エキスの抽出に用いた。

3) 寒天の銘柄

品質の検討を行った寒天は、Difco 社製の bacto agar, special agar noble, agar purified ならびに Oxoid 社製の agar No. 1, 3, ion agar, および I. D. agar で pH 8.6 の Na veronal-HCl 緩衝液に 1.2% の割合に溶解したものについて実験を行った。

4) ゲル内沈降反応促進物質

Na veronal-HCl, pH 8.6 の緩衝液で作った 1.2% bacto agar ゲルに、CdCl₂ (和光), Cd(NO₃)₂ (和光),

* 東京都立衛生研究所多摩支所病理細菌研究室：立川市柴崎町 3-16-25

表-2. 肉種鑑別寒天ゲル内沈降反応における緩衝液の影響
(生肉, 豚牛あいびき)

抗原抽出液 寒天ゲル緩衝液	0.85% 食塩水	Na veronal-HCl (pH 8.6)	Na veronal-veronal (pH 8.6)	ホウ酸緩衝液 0.85% 食塩水 (pH 8.2)
0.85% 食塩水	肉エキス 抗豚 抗牛
Na veronal-HCl (pH 8.6) CdSO ₄ 添加
Na veronal-veronal (pH 8.6)
Na veronal-veronal 乳酸カルシウム (pH 8.6)
ホウ酸緩衝液 0.85% 食塩水 (pH 8.2)

表-3. 肉種鑑別寒天ゲル内沈降反応における緩衝液の影響
(加工品, ウィンナーソーセージ)

抗原抽出液 寒天ゲル緩衝液	0.85% 食塩水	Na veronal-HCl (pH 8.6)	Na veronal-veronal (pH 8.6)	ホウ酸緩衝液 0.85% 食塩水 (pH 8.2)
0.85% 食塩水	肉エキス 抗豚 抗牛
Na veronal-HCl (pH 8.6) CdSO ₄ 添加
Na veronal-veronal (pH 8.6)
Na veronal-veronal 乳酸カルシウム (pH 8.6)
ホウ酸緩衝液 0.85% 食塩水 (pH 8.2)

表-4. 寒天ゲル内沈降反応におよぼす寒天銘柄の影響

寒 天 の 銘 柄	分 離 能	鮮 明 度
Bacto agar (Difco)	良 好	良 好
Special agar noble (Difco)	Bacto agar に劣る	Bacto agar に劣る
Purified agar (Difco)	適当でない	適当でない
Agar No. 1 (Oxid)	Bacto agar に劣る	Bacto agar に劣る
Agar No. 3 (Oxid)	沈殿が出来るので観察困難	
Ion agar (Oxid)	適当でない	適当でない
I. D. agar (Oxid)	適当でない	適当でない

表-5. 寒天ゲル内沈降反応促進物質の影響

最終濃度 反応促進物質	0.05%	0.005%	0.0005%	0.00005%
CdCl ₂	卅	—	—	—
Cd(NO ₃) ₂	卅	—	—	—
CdSO ₄	卅	—	—	—
NiCl ₂	+	—	—	—
Ni(NO ₃) ₂	+	—	—	—
NiSO ₄	+	—	—	—
LaCl ₃	—	—	—	—
La(NO ₃) ₃	—	—	—	—
La ₂ (SO ₄) ₃	—	—	—	—

表-6. 寒天ゲル内沈降反応促進物質と pH の関係

緩衝液の種類		Na veronal—HCl														Na veronal— veronal	Na vero.—vero. 乳酸カルシウム
pH	緩 衝 液	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2	8.4	8.6	8.8	9.0	8.6	8.6
	Agar plate	5.4	5.4	5.6	5.6	6.0	6.6	6.8	6.8	7.8	8.0	8.0	8.2	8.2	8.4	8.0	8.2
促 進 効 果		+	+	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—

図 1 CdSO₄ 添加による寒天ゲル内沈降反応の感度上昇効果 (生豚肉と抗豚肉血清)
備考: 中心部は抗血清, 周囲は豚肉エキス

CdSO₄ (和光), NiCl₂ (和光), Ni(NO₃)₂ (関東化), NiSO₄ (関東化), LaCl₃ (和光), La(NO₃)₃ (和光), および La₂(SO₄)₃ (三津和化学) を添加して沈降反応の促進効果の有無を検討した。

以下の実験には、すべてスライドガラス上に寒天ゲルの薄層を作るマイクロメソッドを用いた。反応系の距離は約 4 mm とし、湿箱に入れ、室温に放置し、4 および 24 時間後に成績の判定を行った。

実験成績

実験 I) 肉種鑑別寒天ゲル内沈降反応に及ぼす緩衝液と肉エキス抽出液の影響

肉種鑑別寒天ゲル内沈降反応 (Ouchterlony 法) に及

表-7. CdSO_4 添加 Bacto Agar (pH 8.6) の保存性 (加熱による変性)

Agar plate の状態 加熱条件	色 調	透 明 度	沈降帯の鮮明度	沈降帯の分離能
調製直後のもの	薄い黄かっ色	透 明	良 好	良 好
CdSO_4 添加後 100°, 15分加熱 1 回目	変 化 な し	変 化 な し	良 好	良 好
CdSO_4 添加後 100°, 15分加熱 2 回目	変 化 な し	変 化 な し	良 好	良 好
CdSO_4 添加後 100°, 15分加熱 3 回目	変 化 な し	変 化 な し	良 好	良 好
CdSO_4 添加後 100°, 15分加熱 4 回目	変 化 な し	変 化 な し	良 好	良 好
CdSO_4 添加後 100°, 15分加熱 5 回目	混 濁	混 濁	不 良	不 良

CdSO_4 は最終濃度 0.05% になるように、寒天ゲルを調製して 60° に冷却したのち添加した。

ばす緩衝液と抗原 (肉エキス) 抽出液の影響について、0.85% 食塩水, Na veronal—HCl pH 8.6, Na veronal—veronal pH 8.6, およびホウ酸緩衝 0.85% 食塩水 pH 8.2 を用い、それぞれ抗原および寒天ゲルを作り、沈降帯の生成速度、本数、分離度、および鮮明度について調べたところ、表-2 ならびに 3 に示すように抗原抽出液としては、0.85% 食塩水が生肉および加工品 (ウインナーソーセージ) ともに良好な成績を示した。

また、寒天ゲル製作用緩衝液については、生肉および加工品ともに Na veronal—HCl が最も良好な成績を示し、0.85% 食塩水, Na veronal—veronal pH 8.6 および乳酸カルシウム添加のもの、ならびにホウ酸緩衝 0.85% 食塩水 pH 8.2 はかなり劣っていた。

実験 II) 寒天の銘柄による影響

従来、肉種鑑別寒天ゲル内沈降反応に用いる寒天としては、Culliford の指定している Oxoid 社の ion agar および小沢、村上らの用いている Difco の special agar noble がある。著者はこのほかゲル内沈降反応に用いられると思われる前述 5 銘柄の寒天を含め計 7 種類の寒天について、沈降帯の分離能および鮮明度について優劣を比較検討したところ表-4 のような結果を得た。

すなわち、bacto agar (Difco) が最も良好で、沈降帯の出現速度、鮮明度、および分離度の点で群を抜き、ロット間のバラツキも少なく、special agar noble (Difco) がこれに次いで良好であった。

実験 III) 肉種鑑別ゲル内沈降反応促進物質の検討

肉種鑑別ゲル内沈降反応を促進する物質として CdCl_2 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, CdSO_4 , NiCl_2 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, NiSO_4 , LaCl_3 , $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, および $\text{La}(\text{SO}_4)_3$ が有効であるかどうかを調べたところ表-5 のような結果を得た。すなわち、 CdSO_4 が最も効果が大であり、その濃度は 0.05% が適当で、それ以下では効果が認められなかった。 CdCl_2 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ がこれに次いで効果が認められた。 NiCl_2 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, NiSO_4 , LaCl_3 , $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, および

$\text{La}_2(\text{SO}_4)_3$ には肉種鑑別の場合、促進効果があまり顕著に認められないようであった。ただし、この促進効果は表-6 に示すように Na veronal—HCl 寒天ゲルにおいてのみ認められ、Na veronal—veronal および乳酸カルシウム添加の寒天ゲルにおいては認められなかった。また、その感度上昇の効果は図-1 に示すように 2~4 倍程度であり、 CdSO_4 無添加のものでは 1 本しか沈降帯の出ない場合でも、 CdSO_4 を添加すると明確に 2 本の沈降帯を認めることができるようになる。

また、寒天ゲルの pH 変化が反応促進効果に及ぼす影響を調べるため、Na veronal—HCl 緩衝液で pH 6.4~9.0 の寒天プレートを作り、ゲル内沈降反応を行った。その結果、表-6 に示すように、pH 6.4~6.8 では弱い反応 (+) が続き pH 7.0 に達すると中程度 (++) になり、pH 8.0 まで続いた。pH 8.2 になると (+++) になり pH 8.4 と続き、pH 8.6 で最高に達し pH 8.8 を越えると沈降帯は認められなくなった。

実験 IV) CdSO_4 添加 bacto agar gel pH 8.6 の 100° 加熱による変性

CdSO_4 を添加した bacto agar gel の保存性を 100° 加熱の回数によって調べたところ表-7 に示すとおりであった。

すなわち、100°, 15分加熱溶解試験では、連続毎日の場合、4 回目までは著変を示さないことが多く、5 回目になると微細な沈殿を生じ、混濁をきたし使用不能になる。また、5~10° の冷蔵庫に保存しても 3 週間ぐらいで沈殿を生ずることが認められた。

総括と考察

肉種鑑別が Ouchterlony 法で行われるようになったのは Culliford¹⁾ の報告以来のことで、その術式については、あまり詳細な報告がない。このことは、肉種鑑別 Ouchterlony 法の術式に関しては、従来のいわゆるゲル内沈降反応そのままの踏しゅうであったと考えられる。著者は、新規に肉種鑑別を行う必要に迫られ、実際

にやってみると必ずしも文献のとおりに適確に反応が現れなかった。その原因を確かめるため、過去に発表された主な術式について再検討を行った。

我々の実験結果は Culliford¹⁾, 村上²⁾らの所見と異なり、肉種鑑別用寒天ゲル製作用の緩衝液としては、Na veronal と veronal の組み合わせよりもむしろ Na veronal と塩酸の組み合わせによる pH 8.6 の緩衝液が、沈降帯の生成速度、本数、鮮明度などにおいて最適であった。このことは、肉種鑑別のゲル内沈降反応においても、Argaman⁶⁾が Mycoplasma で行った実験結果および Graber²⁾の説が、当てはまり、0.85%食塩水、Na veronal—HCl, Na veronal—veronal, およびホウ酸緩衝0.85%食塩水で抽出したいずれの抗原とも、他の緩衝液で作製したゲルに比べ、比較的良好な反応を示した。

Special agar (Difco)^{2), 3)}あるいは、Culliford¹⁾の推奨した Oxoid の ion agar などは必ずしも適当とは考えられず、Difco の bacto agar が最適でロット間の差もほとんど認められなかった。

ゲル内沈降反応の促進物質の検討は Crowle⁴⁾, Argaman⁶⁾らによって行われ尽くされた感があるが、肉種鑑別の場合については未知であった。我々の実験では従来、促進効果の認められているもの、必ずしも有効とはいいいにくく、肉種鑑別の場合には CdSO₄ が最も効果のあることが確認された。

その濃度は0.05%が適当で、Crowle⁴⁾の報告にある0.05%以下の濃度においては肉種鑑別の場合、促進効果が認められなかった。また、興味のあることには、Na veronal と塩酸の組み合わせ緩衝液で作ったゲルでは促進効果が認められながら、Na veronal と veronal の組み合わせ緩衝液で作ったゲルでは促進効果が認められなかったことである。

なお、この促進物質は特に弱力価の抗血清、例えば、吸収ずみの抗牛肉血清の場合には好適であるが、抗原力価の高い血清の場合、反応時間が長くなると沈降帯が、ハロを出し、太く不鮮明になるため、分離度が悪くなり

反応系(タンパク質, 糖, あるいは脂質など)の数量推定には適さなくなる。

結 論

1) 肉種鑑別寒天ゲル内沈降反応における肉エキスの抽出には、生肉および加工品ともに0.85%食塩水が適当であった。

2) 肉種鑑別用寒天ゲルの作製には、従来用いられていた Na veronal—veronal pH 8.6 よりも Na veronal—HCl pH 8.6 の方がよい結果を示した。

3) 肉種鑑別用寒天ゲル作製には、従来賞用されていた Difco の special agar noble よりも bacto agar の方が沈降帯生成速度、本数、分離度、および鮮明度が良好であった。

4) 肉種鑑別用ゲル内沈降反応促進物質としては、CdSO₄ が適当で寒天ゲルに最終濃度0.05%の割合に添加することによって促進効果を示した。ただし、促進効果が認められたのは Na veronal—HCl 緩衝寒天ゲルにおいてのみであり、Na veronal—veronal 系の寒天ゲルにおいては認められなかった。

5) CdSO₄ は使用の都度寒天ゲルに添加した方が安全である。寒天ゲルに添加したまま、保存することは不適当と考えられる。

なお、本論文の要旨は日本食品衛生学会第23回学術講演会において発表した。

終わりに当たり、抗肉血清を分与して下さった日本食肉加工協会小沢総一郎氏に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Culliford B. J.: Nature, 201, 1092 (1964).
- 2) 村上 一他: モダンメディア, 16, 204 (1970).
- 3) 小沢総一郎他: 日本畜産学会誌, 40, 357 (1969).
- 4) Crowle, A. J.: J. Immunology, 81, 194 (1958).
- 5) Graber, P.: In Immunological Methods. Ed. by Ackroyd, J. F., p. 79, Oxford: Blackwell Scientific Publications (1964).
- 6) Argaman, M.: J. Gen-Microbiol., 55, 45 (1969).