

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 294748

(P2003 - 294748A)

(43)公開日 平成15年10月15日(2003.10.15)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	Q 4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/02		C 0 7 K 16/02	
G 0 1 N 33/543	515	G 0 1 N 33/543	515 A
	545		545 A

審査請求 未請求 請求項の数 9 書面 (全 8 数)

(21)出願番号 特願2002 - 130988(P2002 - 130988)

(22)出願日 平成14年3月28日(2002.3.28)

(71)出願人 000006116

森永製菓株式会社

東京都港区芝5丁目33番1号

(72)発明者 本庄 勉

神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内

(72)発明者 豆越 慎一

神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内

(74)代理人 100062007

弁理士 川口 義雄 (外 5 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 卵成分検査用抗体及び検査方法並びに検査用キット

(57)【要約】

【課題】 卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を迅速且つ正確に検査するための免疫学的方法を提供する。

【解決手段】 卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られた抗体を用いて、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するための抗体であって、該抗体は卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られることを特徴とする、前記抗体。

【請求項2】 前記卵白由来のタンパク質がオボアルブミン及び/又はオボムコイドである請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】 前記哺乳動物がウサギであることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項5】 抗体が抗体フラグメントの形態である請求項1乃至4のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項6】 卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するための方法であって、該方法は請求項1乃至5のいずれか一項に記載の抗体を用いた免疫学的測定を実施することを特徴とする、前記方法。

【請求項7】 卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するためのキットであって、該キットは請求項1乃至5のいずれか一項に記載の抗体を含むことを特徴とする、前記キット。

【請求項8】 サンドウィッチアッセイ法を利用することを特徴とする請求項7に記載のキット。

【請求項9】 E L I S A法を利用することを特徴とする請求項7又は8に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本願発明は、食品へ混入或いは混合された、卵黄を主体とする食品原材料を検査するために用い得る抗体及び当該抗体を利用した検査方法並びに該検査方法に用いるキットに関する。

【0002】

【従来技術】食品の安全性への関心が、近年、益々高まっている。特に食物アレルギーは、重度の場合、重篤な全身性アナフェラキシー（咽頭の水腫、重度の喘息或いは低血圧等）を引き起こし、時には致命的な障害をもたらす場合もあるため、これらの食物アレルギー症状を有する消費者のみならず食品製造業者・監督官庁にとっても食品の安全性を保全する立場から極めて重要な課題である。現在、当該食物アレルギーによる症状の発生を防止する最も有効な方法は、それらの食物アレルギー発症履歴を有するか潜在的に有する対象者がその食物アレルギーと接触することを防止するものであるが、厚生労働省は、当該観点から「アレルギー物質を含む食品については、特定のアレルギー体質を持つ方の健康危害の発生を防止する観点から、食物アレルギーを引き起こすことが明らかになった食品のうち、特に発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高い小麦、そば、卵、乳及び落花生の5品目（以下「特定原材料」という。）を食品

衛生法施行規則（昭和23年厚生省令第23号。以下「規則」という。）別表第5の2に掲げ、これらを含む加工食品については、規則第5条に定めるところにより当該特定原材料を含む旨を記載しなければならない」とし、当該5品目を含む食品に対してそれら原材料を含む旨の表示を製造者に義務づけている。また、消費者の商品選択の幅を不当に狭めることのないよう、当該表示においては、「入っているかもしれません。」「入っている恐れがあります。」などの可能性表示を禁止し、製品への「特定原材料」混入の監視・検査義務を明確にしている。更に、食品を生産する際に、原材料としては使用していないにも関わらず、特定原材料等がごく微量混入（コンタミネーション）してしまう場合にも当該混入が必ず起こり得るならば表示を必要とし、消費者の高度の安全を確保する立場から原則として数 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以上程度の混入についても表示するよう求めている。従って、食品製造業者は、上記施行規則を遵守するのは勿論のこと、更なる消費者の安全と適切な商品選択の機会を提供すべく、自らの製品について十分な監視と検査を行うことが望まれている。

【0003】ここで、小麦、そば、卵、乳及び落花生の5品目からなる原材料といってもその組成や、形態、製造方法は様でなく、卵を例にとると、該原材料は全卵の他、卵黄と卵白に分離しているものも含み、さらに、生卵を使用している場合は勿論のこと、液卵、粉末卵、凍結卵等も上記特定原材料に相当する。更にこれらの原材料は、引き続き食品加工の段階で変性することもあり、完成した加工食品中に含まれる、これらの多種多様な形態をとりうる食品原材料を少なくとも $10\mu\text{g}/\text{g}$ の感度で検査するのは容易でない。

【0004】このような高度の検査を達成する検査方法としてはPCRを用いた特異的遺伝子の増幅に基づく検査法があげられるが、当該方法は、現在までのところ、熟練した技術と高い費用や比較的長い検査時間を要し、製造現場での迅速且つ簡便な検査という観点から不利益がある。当該検査を実行する際の他の有効な選択肢は、上記食品原材料に由来する成分に対する抗体を利用した免疫学的検査方法である。特に、免疫学的な検査方法はE L I S A法等として広く普及しており、その操作も高度の熟練を必要とせず、精度のよい結果も短時間で得られるので、当該検査の目的には好適である。しかしながら、当該抗体を利用した免疫学的測定方法は、測定対象を抗原に用いて動物を免疫化し、得られた特異的抗体を利用するという原理に基づくため、食品原材料のいずれの成分を抗原として用いるかにより、その測定結果の信頼性が大きく左右される。とりわけ、卵の場合では、食品原材料として卵白を主体とするものと卵黄を主体とするものがあり、食品原材料としてそれらが用いられているか否か、或いはそれらが微量でも混入している可能性があるか否かを的確に検査するには、卵白及び卵黄のう

ちの一種のみを検査したのでは意味がなく、その双方を認識するような抗体、或いは抗体の組み合わせにおいて検査を行う必要がある。

【0005】特公平7-34013号公報「卵蛋白質の定量定性分析方法」には、オボムコイドを指標としたエライザ分析法を使用する加熱肉製品中の卵蛋白質の定量定性分析方法が開示されている。しかしながら、当該方法で分析されているのは卵白蛋白質のみであり、またその効果についても卵白アレルギーの検出に利用することができるものとされるのみで、卵黄成分については言及されてい

ない。

【0006】一般に、多種の食品原料の組成物として定義され得る加工食品において、卵黄成分を免疫学的手法で検査することは困難と考えられてきた。すなわち、卵黄成分の主要なものは筋肉組織から由来することが多いため、卵黄成分を抗原に調製した抗体類は筋肉組織由来の成分とも交差反応性を示す場合が多く、特に筋肉組織に由来する成分の混入が想定される食品においては、正確且つ特異的な検査が困難であると考えられる。このような交差反応に基づく誤判定は、消費者にとっては適切な商品選択の機会が損なわれ、製造者にとっては誤判定による検査の信頼性の低下と、他の長時間を要するような方法の採用といった損失を招き得る。よって、卵黄を主体とするような食品の原材料を正確且つ迅速に検査できる方法の確立が望まれていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を迅速且つ正確に検査するための免疫学的方法を提供する。すなわち、本発明によれば、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するための抗体及び当該抗体を利用した検査方法が提供される。更に、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するための上記抗体を含む検査キットも提供される。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を迅速且つ正確に検査する方法に関し鋭意研究を行ったところ、驚くべきことに、当該卵黄を主体とする成分が、卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られた抗体によって検査できることを見いだした。従って、本発明の第1は、(1)卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するための抗体であって、該抗体は卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られることを特徴とする、前記抗体である。

【0009】上記卵白由来のタンパク質が、精製されたオボアルブミン又はオボムコイドである場合、特に上記検査が好適に行え得た。従って、本発明の第2は、

【0010】(2)前記卵白由来のタンパク質がオボアルブミン及び/又はオボムコイドである上記(1)に記

載の抗体である。

【0011】ウサギは、その飼育・管理等が容易であり、ウサギから得たポリクローナル抗体において上記検査は好適に実施され得る。また、当該抗体のフラグメントも好適に使用し得る。従って、本発明の第3乃至第5は、(3)ポリクローナル抗体であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の抗体、(4)前記哺乳動物がウサギであることを特徴とする上記(1)乃至(3)のいずれかに記載の抗体、および(5)抗体が抗体フラグメントの形態である上記(1)乃至(4)のいずれかに記載の抗体である。

【0012】上記抗体の利用は、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入の正確且つ迅速な検査を可能とする。従って、本発明の第6は、(6)卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するための方法であって、該方法は上記(1)乃至(5)のいずれかに記載の抗体を用いた免疫学的測定を実施することを特徴とする、前記方法である。

【0013】上記抗体はキットの形で検査に用いることができ、当該キットは、サンドウィッチアッセイ法を利用してELISA法を応用した形態となすことにより、更に検査者の利便性に供することができる。従って、本発明の第7乃至第9は、(7)卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査するためのキットであって、該キットは上記(1)乃至(5)のいずれかに記載の抗体を含むことを特徴とする、前記キットであり、(8)サンドウィッチアッセイ法を利用することを特徴とする上記(7)に記載のキットであり、及び(9)ELISA法を利用することを特徴とする上記(7)又は(8)に記載のキットである。

【0014】これらの抗体、検査方法及び検査キットによれば、食品への卵黄を主体とする食品原材料の混入を正確に測定することができ、消費者にとってはその商品選択の幅を不必要に束縛されることなく信頼性の高い情報を得ることが可能になり、製造者にとっても自己の製品の安全性確保と、検査の効率化を図ることができる。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明により検査される対象となる、食品に混入或いは混合された「卵黄を主体とする食品原材料」には、全卵より卵殻、卵白及びカラザを食品工業的な手法により積極的に除去して得られたものの他、それを加熱、乾燥、抽出或いは酵素処理して得られたもの、更には、広く卵黄レシチン等のように卵黄に含有される成分を何らかの方法で精製・抽出したのも含まれる。また、原材料の主成分自体は他の品目由来、例えば乳や小麦、その他天然物又はその抽出物、或いは合成品であるような食品原材料であって、副成分としての卵由来の成分は当該原材料の助剤、安定剤、賦形剤、乳化剤、或いはいわゆるキャリアーオーバー等として存在する場合においても、当該卵由来の成分が上記で定義され

た意味において「卵黄を主体とする」ものである限りにおいて、当該原材料も本明細書にいう「卵黄を主体とする食品原材料」に含まれる。上記「卵黄を主体とする食品原材料」の例としては、乾燥卵黄や、粉末カスタードクリーム、粉末マヨネーズ、酵素消化レシチン等があげられるがこれらに限定されない。検体としての食品はあらゆる範疇のものを含み、その生産・製造の過程で上記「卵黄を主体とする食品原材料」が積極的に混合されるもの他、意図しているか否かに関わらず「卵黄を主体とする食品原材料」が、例えば製造工程におけるコンタ

ミネーションや他の食品原料からのキャリアオーバー等により混入する可能性のあるものも含まれ、その加工の程度や加工方法は問わない。
 【0016】本発明は、卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られる抗体を用いて、上記卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を検査することを特徴とする。哺乳動物の免疫化に用いる卵白由来のタンパク質の例としては、オボアルブミン、オボムコイド、オボグロブリン、コンアルブミン及びリゾチームがあげられるが、オボアルブミン及びオボムコイドが好ましい。十分に精製された当該オボアルブミンやオボムコイドは容易に入手することが可能であり、例えば、オボアルブミンについては、生化学工業株式会社より「Egg Albumin, 5x Cryst. (Chicken)」の商品名で市販されており、また、オボムコイドについては、ナカライテスク社より「トリプシンインヒビター (from chicken Egg White)」として入手することができる。

【0017】本発明に用いる抗体は、上記のようにして得られた卵白タンパク質を抗原に用いて免疫した哺乳動物からの抗血清を使用して調製する。抗原の調製、免疫動物への投与及び当該動物からの抗血清の採取は当業者にとって周知のいずれのプロトコールをも使用することができ、そのようなプロトコールの最適化も当業者にとって容易であろう。

【0018】免疫動物としては、ヒツジ、ウサギ、サル等も用いられ得るが、ウサギを用いるのが特に有利である。

【0019】具体的に、当該免疫動物からの抗血清は、例えば、アジュバントと共に抗原を免疫動物に皮下注射し、当該皮下投与を適当な間隔（例えば1週間）で所定の回数（例えば5回）繰り返し、最終免疫後に全血を採集して、これを分離することで得ることができる。そのような方法は、例えば、「CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.4章（発行元：John Wiley & Sons, Inc., New York）」等に記載されている。

【0020】本発明の抗体は、それらを含む上記抗血清の形態としても使用できるが、当該抗血清からIgG画分または特異的ポリクローナル抗体を精製し使用す

ることが便利である。当該IgG画分または特異的ポリクローナル抗体は、例えばサンドウィッチ法を利用した免疫学的アッセイにおいて、そのままキャプチャー側の固相化抗体として使用することができ、また、放射性物質、金コロイドなどの着色粒子或いは酵素で標識すれば検出側の標識抗体として使用することができる。そのような固相化抗体や標識抗体も本発明の抗体に含まれる。IgG画分等の精製や抗体の標識の方法としては当業者にとって周知のいかなる方法も採用することができ、例えば、夫々、「CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、第2.7章（発行元：John Wiley & Sons, Inc., New York）」記載の方法や、「J. Biochem. vol. 11、395~399頁（1979年）」、「J. Biochem., vol. 14、41~57頁（1982年）」、「Immunofluorescence and Related Techniques (Elsevier/North Holland Biomedical Press、215~225頁（1978年）」記載の方法を利用することができる。

【0021】更に、本発明の抗体として、上記のようなIgG画分または特異的ポリクローナル抗体の他、それらの抗体を酵素消化処理して得られるような当該抗体の反応性フラグメントも用いることもできる。当該抗体フラグメントの例には、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、F(v)フラグメント、H鎖モノマー又はダイマー、L鎖モノマー又はダイマー、1個のH鎖及び1個のL鎖からなるダイマー等が含まれる。該フラグメントは、例えばペプシンやパイン等のプロテアーゼにより完全な抗体を消化するか、消化後、必要に応じて還元剤で処理することにより得ることができる。H鎖及びL鎖モノマーは、完全な抗体をジチオスレイトール等の還元剤で処理した後、精製した鎖状体を分離することにより得ることもできる。

【0022】上記の抗体又は抗体フラグメントを用いて、本発明の、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入が検査され得る。理論に拘束されることは好まず、またその詳細は明らかでないが、本発明の卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得た抗体は、卵黄成分に存在する、卵白由来タンパク質と卵黄成分との共通又は類似のエピトープを認識するのかもしれない。或いは、卵白由来のタンパク質と卵黄成分とが、通常の商品加工条件下では不可分の複合体を形成しており、これが卵黄成分を主体とする食品原材料の検出に有利に作用している可能性もある。なお、本発明の抗体作製に用いた卵白由来タンパク質は十分且つ慎重に精製されたものであり、また、得られた抗体は筋肉組織由来の成分とも交差反応しないことから、抗原として用いた当該卵白由来タンパク質に実質量の卵黄成分が混入してい

たと考えることはできない。

【0023】本発明の検査は、試料として食品の抽出液を用いるのが好適である。すなわち、検体の食品を当業者に公知の抽出用溶媒、例えば任意に界面活性剤を含むリン酸緩衝液等に浸漬し、市販のホモジェナイザー或いは超音波震動器を用いて所定時間処理することによりその成分を十分に抽出した後、不溶物を遠心分離等の手段を用いて除去して試料用の食品抽出液を得ることができる。次いで、当該抽出液は本発明の抗体と接触させられ、その特異的結合反応を検出することにより免疫学的測定が行われる。なお、食品が液状であれば、特別な抽出操作が必要とされないことはいうまでもない。

【0024】免疫学的測定の例としては、いわゆる競合アッセイ法やサンドウィッチアッセイ法があげられるが、試薬の調製の便等を考慮してサンドウィッチ法が好ましい。当該サンドウィッチアッセイの一例では、本発明の1の抗体或いは抗体の一部がウェル底面などの固相のコーティングに用いられてキャプチャー側抗体を提供し、その他の抗体或いは抗体のもう一方の一部が放射性物質や着色粒子又は酵素で標識されて検出側抗体を提供する。キャプチャー側抗体を有するウェル内に上記試料用の食品抽出液が添加され、所定時間インキュベートされた後、該抽出液をウェルから取り除き、好適な緩衝液等によりウェル内を十分に洗浄後、検出側の抗体がウェルに添加される。所定のインキュベーションの後、ウェル内を洗浄し、キャプチャー側抗体 - 測定対象物 - 検出側抗体複合体の生成を検出する。検出は、検出側抗体に標識された標識物質の性質に依存し、放射性標識であれば放射線量が、着色粒子標識であれば発色量や吸光度が、また酵素標識(ELISA法)であれば、更に適当な基質をウェルに添加し、所定のインキュベーション後の吸光度が検出される。なお、上記ELISA法で酵素標識に用いる酵素に特に制限はなく、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼやアルカリ性フォスファターゼ等の酵素が有利に使用される。西洋ワサビペルオキシダーゼで標識する場合は、当該酵素の基質として3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン等がその基質として利用可能である。アルカリ性フォスファターゼを使用する場合は、基質としてp-ニトロフェニル燐酸が基質としてあげられる。上記の免疫学的測定結果に基づき、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入が検査され得る。

【0025】本発明の検査方法は、本発明の抗体を含むキットを用いて容易に実施することができる。サンドウィッチ法に基づくELISA用キットの例では、キャプチャー用としての本発明の抗体からなる試薬と、検出用としての酵素標識した本発明の抗体からなる試薬及び適切な酵素基質がキットに含まれ得る。洗浄用の緩衝液や、ウェルへの非特異的吸着を抑制するブロッキング用試薬等が更に含まれてもよい。そのようなキットの構成及びその製造方法は当業者にとって公知であろう。

【0026】以下、本発明を実施例により更に詳しく説明するが、本実施例は本発明を何ら限定するものではない。

【0027】

【実施例】実施例1：抗体の調製

オボアルブミン及びオボムコイドを用いて、本発明の卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られる抗体を調製した。哺乳動物の免疫に用いたオボアルブミンは、生化学工業株式会社から市販されている「Egg Albumin 5x Cryst. (Chicken)」を用いた。当該オボアルブミンによりフロイントのアジュバントを用いてエマルジョンを作製し、当該エマルジョンをウサギの皮下に注射して免疫した。免疫は、一回あたり1mgのオボアルブミンが投与されるように行い、一週間おきに5回投与を行った。最終免疫終了の一週間後に、免疫したウサギの全血を採集し、血清を調製した。得られたウサギ血清を、オボアルブミンを固相化したHiTrap NHS-activated (Amersham Pharmacia社製)のカラムに通じ、当該カラムに吸着された抗体を0.1M Gly-HCl (pH 2.7)により溶出することで、抗オボアルブミン抗体を回収した。

【0028】オボムコイドは、ナカライテスク社より「トリプシンインヒビター (from chicken Egg White)」として市販されているものを用いた。抗オボムコイド抗体は、オボアルブミンと同様にウサギを免疫してその血清を得、当該血清を、オボムコイドが固相化されたカラムに通ずることにより回収して調製した。

【0029】実施例2：卵黄を主体とする食品原材料の分析

a) 分析方法

上記により得られた抗オボアルブミン抗体或いは抗オボムコイド抗体を用いて、以下の手順によりサンドウィッチアッセイを実施した。まず、抗オボアルブミン抗体を用いる場合は、実施例1で得られた抗オボアルブミン抗体を炭酸緩衝液(pH 9.6)に溶解した後、該溶液をマイクロプレートの各ウェルに100µlずつ分注し、ついで、該マイクロプレートを常温で2時間静置することにより抗オボアルブミン抗体の固相化を行った。更に、各ウェル内を洗浄液(0.05% Tween 20 / PBS)で洗浄後、ブロッキング溶液(0.1% BSA / PBS)の200µlをウェルに分注し、常温で2時間静置した。静置後、ブロッキング溶液をウェルから取り除き、ウェルを乾燥して、キャプチャー側としての抗オボアルブミン抗体によるウェルのコーティングを完了した。標識抗体も抗オボアルブミン抗体を用いてナカネ法により作成した。すなわち、実施例1で得られた抗オボアルブミン抗体を炭酸水素ナトリウム溶液(pH 9.6)に溶解し、抗体と同重量の活性化PODを該溶

液に添加して、遮光下で、抗体と活性化PODのカップリング反応を行った。水素化ホウ素ナトリウムを添加して反応を停止させ、得られた標識抗体を緩衝液に対して透析して、検出側の酵素標識抗体を得た。

【0030】抗オボムコイド抗体を用いる場合も、上記抗オボアルブミン抗体の場合と同様にして、キャプチャー側抗体によるウェルのコーティングと検出側の酵素標識抗体を作製した。

【0031】上記キャプチャー側抗体及び検出側抗体を用いるサンドウィッチアッセイは以下の手順で行った。すなわち、上記キャプチャー側抗体が固相化されたウェルに100μlの標準溶液または試料溶液を添加し、常温で正確に1時間静置して反応を行わせた。反応後、各ウェルを洗浄液(0.05% Tween20/PBS)で洗浄し、ついで、酵素標識抗体溶液の100μlを該ウェルに分注した。分注後、常温で正確に30分間静置して反応を進行させ、その後ウェルを上記の洗浄液で洗浄し、ついで、100μlの酵素基質(TMB)溶液を各ウェルに添加した。常温、遮光下で正確に10分間静置して酵素-基質反応を行わせ、該反応を、100μlの反応停止液(1N 硫酸)をウェルに添加することにより停止させた。その後、各ウェルの吸光度を測定した。

【0032】b) 試料溶液の調製方法

表1: 抗オボアルブミン抗体を用いた分析例

試料溶液の希釈倍率	乾燥卵黄		マヨネーズ	
	A450 (平均値*)	判定	A450 (平均値*)	判定
x10000000	0.019	-	0.01	-
x1000000	0.02	-	0.015	-
x100000	0.033	+**	0.055	+****
x10000	0.186	+***	0.512	+*****
x1000	1.534	+	2.494	+
x100	2.63	+	2.682	+
x10	2.706	+	2.715	+
x1	2.716	+	2.722	+

* : 2連の平均値
 ** : 鶏卵タンパク質換算量=1.577 ng/ml
 *** : 鶏卵タンパク質換算量=14.04 ng/ml
 **** : 鶏卵タンパク質換算量=4.217 ng/ml
 ***** : 鶏卵タンパク質換算量=32.881 ng/ml

【表2】

*本発明の抗体を用いた食品および食品原材料の分析の実施例および比較例においては、以下の方法により検体となる食品等からの試料溶液を調製した。すなわち、まず、検体となる食品(或いは食品原材料)を、それが均一となるように市販のミキサーで、充分、粉碎、或いは混合した。ミキサーでの処理後、検体を2g秤取りし、これに40mlの検体希釈液(PBS)を加え、ついで、市販のホモゲナイザーを用いて30秒間攪拌した。当該攪拌操作を3回繰り返した後、得られた液を3,000xgで10分間遠心分離し、上清を分取した。該上清をろ紙により濾過して試料溶液とした。

【0033】c) 食品原材料および食品の分析への応用上記のa)およびb)に記載の方法に従って、市販の乾燥卵黄(キューピー株式会社製、食品原材料)およびマヨネーズ(キューピー株式会社製、原材料名:食用植物油、卵黄、醸造酢、食塩、調味料(アミノ酸)、香辛料)について、本発明の抗体を用いて分析を行った。抗オボアルブミン抗体を用いた場合の結果を表1に、抗オボムコイド抗体を用いた場合の結果を表2に、各々、示す。また、各々の抗体において、鶏卵タンパク質を標準試料として測定した結果を、参考として、表3に示す。

【0034】

【表1】

表2: 抗オボムコイド抗体を用いた分析例

試料溶液の希釈倍率	乾燥卵黄		マヨネーズ	
	A450 (平均値*)	判定	A450 (平均値*)	判定
x10000000	0.014	-	0.015	-
x1000000	0.014	-	0.022	-
x100000	0.032	-	0.079	+***
x10000	0.229	+**	0.566	+****
x1000	1.629	+	2.622	+
x100	2.72	+	2.732	+
x10	2.688	+	2.701	+
x1	2.701	+	2.71	+

* : 2連の平均値

** : 鶏卵タンパク質換算量=12.108ng/ml

*** : 鶏卵タンパク質換算量=3.781ng/ml

**** : 鶏卵タンパク質換算量=27.891ng/ml

【表3】

表3: 標準試料の測定値

鶏卵タンパク質濃度 (ng/ml) *	A450 (平均値**)	鶏卵タンパク質濃度 (ng/ml) ***	A450 (平均値**)
0	0.013	0	0.017
1	0.023	1	0.039
2	0.038	2	0.072
4	0.063	4	0.097
8	0.124	8	0.171
16	0.229	16	0.321
32	0.469	32	0.613
64	0.943	64	1.135

* : 抗オボアルブミン抗体に関して

** : 2連の平均値

*** : 抗オボムコイド抗体に関して

なお、表の脚注における「鶏卵タンパク質換算量」は、表3の標準試料の測定値をもとにして算出した。上記表1および2から、本発明の、卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られる抗体を用いることにより、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を精度よく検査できることがわかる。

【0035】d) 比較例

本発明の、卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られる抗体を用いることにより、卵黄を主体とする食品原材料の食品への混入を精度よく検査できることがわかる。

表4: 牛肉および豚肉での分析

	抗オボアルブミン抗体 A450 (2連で実施)	抗オボムコイド抗体 A450 (2連で実施)
牛肉	0.016	0.018
	0.019	0.019
豚肉	0.018	0.013
	0.017	0.017

【表5】

動物の血清から得られる抗体が筋肉組織由来の成分と交差反応性を示さないことを確認するため、上記のa)およびb)に記載の方法に従って、市販の牛肉および豚肉を検体として検査を実施した。結果を表4に示す。また、参考として、標準試料として鶏卵タンパク質を検査した結果を表5に示す。

20 【0036】

【表4】

表5：標準試料の分析

標準試料濃度 (ng/ml)	鶏卵タンパク質* (A450; 2連の平均、括弧内はCV (%))	鶏卵タンパク質** (A450; 2連の平均、括弧内はCV (%))
0	0.014 (0)	0.02 (7)
1	0.032 (27)	0.034 (0)
2	0.048 (18)	0.052 (3)
4	0.069 (6)	0.0785 (6)
8	0.1335 (4)	0.14 (0)
16	0.262 (6)	0.287 (1)
32	0.501 (4)	0.5355 (0)
64	0.9895 (3)	1.017 (2)

*：抗オボアルブミン抗体による

**：抗オボムコイド抗体による

表4から、本発明の、卵白由来のタンパク質により免疫化した哺乳動物の血清から得られる抗体が筋肉組織由来の成分と交差反応性を示さないことがわかる。

【0037】

【発明の効果】本発明の抗体及びそれを用いた測定方法によれば、食品への卵黄を主体とする食品原材料の混入

を正確に測定することができ、消費者にとってはその商品選択の幅を不必要に束縛されることなく信頼性の高い情報を得ることが可能になり、製造者にとっても自己の製品の安全性確保と、検査の効率化を図ることができる。

フロントページの続き

(72)発明者 村岡 嗣朗
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2-1-1
株式会社森永生科学研究所内

(72)発明者 境 雅寿
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2-1-1
株式会社森永生科学研究所内
Fターム(参考) 4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA71
GA26

专利名称(译)	蛋成分检测抗体和检测方法及检测试剂盒		
公开(公告)号	JP2003294748A	公开(公告)日	2003-10-15
申请号	JP2002130988	申请日	2002-03-28
申请(专利权)人(译)	森永有限公司		
[标]发明人	本庄勉 豆越慎一 村岡嗣朗 境雅寿		
发明人	本庄 勉 豆越 慎一 村岡 嗣朗 境 雅寿		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/02 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.Q C07K16/02 G01N33/543.515.A G01N33/543.545.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫学方法，以快速，准确地检查主要由蛋黄组成的食物材料是否被食物污染。 解决方案：使用从哺乳动物血清中获得的抗体进行免疫，该哺乳动物的血清用蛋清衍生的蛋白质进行免疫，检查食物是否被主要由蛋黄组成的食物污染。

表1: 鶏卵タンパク質換算量

試料溶液の希釈倍率	乾燥卵黄		マヨネーズ	
	A450 (平均値*)	判定	A450 (平均値*)	判定
x100000000	0.019	-	0.01	-
x10000000	0.02	-	0.015	-
x1000000	0.033	+**	0.055	+****
x100000	0.186	+***	0.512	+*****
x1000	1.534	+	2.494	+
x100	2.63	+	2.682	+
x10	2.706	+	2.715	+
x1	2.716	+	2.722	+

* : 2連の平均値

** : 鶏卵タンパク質換算量=1.577 ng/ml

*** : 鶏卵タンパク質換算量=14.04 ng/ml

**** : 鶏卵タンパク質換算量=4.217 ng/ml

***** : 鶏卵タンパク質換算量=32.881 ng/ml