

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-242408

(P2011-242408A)

(43) 公開日 平成23年12月1日(2011.12.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	2 G O 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q	4 C O 7 6
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/48 N	4 C O 8 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/68	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Q	
審査請求 有 請求項の数 8 書面 (全 8 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-180944 (P2011-180944)	(71) 出願人	596042453
(22) 出願日	平成23年8月4日 (2011.8.4)		コラーゲン技術研修会有限会社
(62) 分割の表示	特願2005-29727 (P2005-29727)		東京都清瀬市上清戸 1-10-1
	の分割	(72) 発明者	横山 司甫
原出願日	平成8年2月21日 (1996.2.21)		東京都東久留米市氷川台 2-13-19
		Fターム(参考)	2G045 AA25 AA29 BB03 CA25 CB09 CB17 DA36 FA18 FB01 FB03 FB05 FB07 4C076 AA54 AA64 EE42H 4C085 AA03 BB11 CC05 CC21 EE01 GG01

(54) 【発明の名称】 抗ゼラチン抗体の測定法

(57) 【要約】

【目的】本発明は、

イ、血液中の抗ゼラチン抗体、そのアレルゲンとなるゼラチン動物種及びその分画を測定する方法と試薬

ロ、特定動物のみから得られるゼラチンと、これを添加した食品・薬剤に関する物である。

【構成】以下の通り、構成する。

イ、血液中の抗ゼラチン抗体とその由来動物種を免疫反応を用いて測定する方法とその試薬

ロ、血液中の抗特定分画ゼラチン抗体を免疫反応を用いて測定する方法とその試薬

ハ、ゼラチンを用いた皮内反応法とその注射剤

ニ、ゼラチンを用いたパッチ反応法とその試薬

ホ、食品・薬剤中のゼラチンの存在とその由来動物種を測定する方法とその試薬

ヘ、特定動物由来のゼラチンとこれを添加した食品・薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゼラチンアレルギーのアレルゲンが特定されているゼラチンアレルギー者において、同アレルゲンを含まないゼラチンを含有するゼラチンアレルギー者用の医薬品。

【請求項 2】

請求項 1 のアレルゲンを含まないゼラチンを含有するゼラチンアレルギー者用の医薬品用ふけい剤又は医薬品用カプセル。

【請求項 3】

請求項 1 のアレルゲンを含まないゼラチンを含有するゼラチンアレルギー者用の培地。

【請求項 4】

請求項 1 のアレルゲンを含まないゼラチンを含有するゼラチンアレルギー者用の医薬品用の培地。

【請求項 5】

請求項 1 のアレルゲンがウシ由来ゼラチン α 2 分画であり、同アレルゲンを含まないウシゼラチン含有の医薬品。

【請求項 6】

請求項 1 のアレルゲンがウシ由来ゼラチン α 2 分画であり、同アレルゲンを含まないウシゼラチン含有の医薬品用ふけい剤又は医薬品用カプセル。

【請求項 7】

請求項 1 のアレルゲンがウシ由来ゼラチン α 2 分画であり、同アレルゲンを含まないウシゼラチン含有の医薬品用の培地。

【請求項 8】

請求項 1 のアレルゲンがウシ由来ゼラチンであり、同アレルゲンを含まないニワトリゼラチン含有のワクチン又は医薬品用カプセル。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

【0001】

本発明は、

イ、血液中の抗ゼラチン抗体、そのアレルゲンとなるゼラチン動物種及びその分画を測定する方法と試薬

ロ、特定動物のみから得られるゼラチンと、これを添加した食品・薬剤に関する物である。

【背景技術】

【0002】

従来、ゼラチンアレルギー者を発見するには、反応を起こした食品や薬剤の共通成分を推定いくのが一般的で、時間を要した。又、専門医にゼラチンアレルギー者と診断されても、ゼラチンは、様々な食品や薬剤に微量ずつ含まれているのでどの食品を避けるべきか不明で、又ゼラチンアレルギー者用の食品もない。

更にゼラチンアレルギー者は、一般に用いられる薬剤、例えば疾病予防の為に当然投与されるべき必要なワクチンも、ゼラチンを含む為、時には避けなくてはならなかった。

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明者は、長い間、ゼラチンアレルギー者の簡便な発見方法、食品・薬剤中の微量ゼラチンの検出方法、及びゼラチンアレルギー者用の食品・薬剤の研究に努めた。

【課題を解決するための手段】

【0004】

その結果、本発明者は、ゼラチンアレルギー者の簡便な発見方法として、下記 1、2、3、4 を確立した。

【0005】

1 血液中の抗ゼラチン抗体とその由来動物種を免疫反応を用いて測定する方法とその試

10

20

30

40

50

薬。

ヒト血清中の抗ゼラチン抗体を、酵素免疫反応 (E L I S A) で測定する時、どの種のゼラチンと交叉するか知る為、あらかじめ動物種が明確なゼラチンを、種別にプレートにコートする事、及び抗ゼラチン抗体として、I g E を捕捉する為、第二抗体として、抗ヒト I g E 抗体を用いる測定法及びその試薬。

つまり、試薬として、1) 各種動物由来のゼラチンをコートしたプレート、2) 酵素標識抗ヒト I g E 抗体、3) 発色基質 (T M B , 過酸化水素)、4) 反応停止液 (硫酸) を用い、一般の酵素免疫反応によりヒト血清を検体として測定する。

【0006】

もちろん、免疫反応として、酵素免疫反応に限定されず、R I A , 免疫発光法、凝集反応他を含み、酵素標識の抗体としては、ポリクローナル又はモノクローナル抗体を問わず、又それを放射性物質、発光物質で標識した物、無標識物でも良い。

プレートをゼラチンでコートする時、プレート毎に動物種を変えても良いが、同一プレートの穴毎にかえて、パネルにする方が望ましい。同一検体と複数のゼラチンとの反応を、一目で観察できるからである。又、動物種毎にプレートや穴に、マークや色をつければ識別しやすい。

用いるゼラチンの動物種としては、ウシ、ブタ、ニワトリ、羊、鮭、タコ等、又これに限定されない。

単に、ゼラチン抗体を検出するなら、プレートにコートするゼラチンは、複数種を混合したもので良いが、それでは、避けるべきゼラチンの動物種までは明確に成らない。更に第二抗体は、抗ヒト I g E 抗体に限定されず、抗ヒトイムノグロブリン抗体でも良いが、抗ヒト I g E 抗体の方が望ましい。

【0007】

2 血液中の抗特定分画ゼラチン抗体を免疫反応を用いて測定する方法と試薬。

各動物種のゼラチンを電気泳動で分画した後、この各分画を採取し、前述「1」と同様に、プレートにコートする。他は前述「1」と同様の試薬と測定法である。これにより、抗ゼラチン抗体と反応する動物種のみならず、反応するゼラチンの分画まで確定できる。

【0008】

3 ゼラチンを用いた皮内注射法とその注射剤各動物種由来の微量のゼラチンを、例えばウシ、ニワトリ、サケの、 $1 \mu\text{g} \sim 0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$ を各別個のリン酸バッファーに溶解し、その $0.1 \text{ ml} \sim 0.01 \text{ ml}$ を皮内注射し、その部位に発赤を生じる時にどの動物種由来のゼラチンに陽性かを判定できる。

この時、ゼラチンは、前述「2」の電気泳動分画を用いれば、より適格にアレルゲンを推定できる。

ゼラチンの注射量は、濃度 $0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$ の液を、 0.01 ml 投与で、充分であるが、これに限定されない。溶解液は、リン酸バッファーが望ましいが、それ自身が反応に影響を与えないものであれば、代用できる。

【0009】

4 ゼラチンを用いたパッチ反応法とその試薬。

各種動物由来の、例えばウシ、ニワトリ、鮭由来の微量のゼラチン、例えば $1 \text{ mg} \sim 0.5 \mu\text{g} / \text{平方 cm}$ を各別個のパッチに付着させ、これを、通常のパッチ試験と同様、背部に貼り、その部位に発赤を生じる時、どの動物由来のゼラチンに陽性かを判定できる。

この時、ゼラチンは、前述「2」の電気泳動分画を用いれば、より適格にアレルゲンを推定できる。

【0010】

従来ゼラチンアレルギーと称されていた人が、全ての動物由来のゼラチンに反応するものではなく、ウシ由来のみに反応することを発見した。又、特定分画としてウシ由来 $\alpha 2$ のみと反応した。他方各種市販ゼラチンを調べたところその由来は全てウシであった。ウシがゼラチンの原料として繁用されるから、いわゆるゼラチンアレルギー者は、ウシ由来のゼラチンのみに反応するのである。

10

20

30

40

50

ゼラチンとしてブタが汎用されれば、ゼラチンアレルギー者のアレルギーは、ブタゼラチンに特定される可能性を示す。

これは、「ゼラチンはコラーゲンの変性したものであり、コラーゲンは構造上動物種差がないから、どの動物由来のゼラチンも一緒だろう。だから、ゼラチンアレルギー者は、全ての動物由来のゼラチンに反応するはずだ。」という一般の思い込みを否定するものであった。

つまり、ゼラチンは、構造上、機能上、由来動物の種差はないが、アレルギー反応のような免疫上の違いを示すと言う事である。

本発明者は、以上の発明と発見から、更に下記 5・6 の発明を完成した。

【0011】

5 食品・薬剤中のゼラチンの存在と、その由来動物種を免疫反応を用いて測定する方法と試薬。

例えば、食品や薬剤、具体的には、ケーキやワクチン中のゼラチンの存在と、その由来動物種を知る為、サンドイッチ法による酵素免疫反応 (ELISA) で測定する時、サンドイッチ法の一方又は両方を、特定動物種のゼラチンにのみ反応する抗ゼラチン抗体を用いることを特長とする測定法及びその試薬である。

試薬としては、1) 特定動物種のゼラチンに反応する抗ゼラチン抗体をコートしたプレート、2) 特定動物種のゼラチンに反応する酵素標識抗体、3) 発色基質 (TMB、過酸化水素)、4) 反応停止液 (硫酸) を用い一般の酵素免疫反応により、食品又は薬剤を検体として測定する。

食品や薬剤が直接検体として用い難い形状の時は、これを強酸 (又はアルカリ) で処理すれば、ゼラチンが抽出されるので、強酸 (又はアルカリ) を除き、適当な緩衝液、例えばリン酸バッファーに溶解させて検体とする。

免疫反応としては、酵素免疫反応のみでなく、RIA、免疫発光法、凝集反応他を含み、サンドイッチ法で使用する抗体はポリクローナル又はモノクローナル抗体を問わず、又、それを、酵素、放射性物質、発光物質で標識したものでも良い。特定動物種としては、ウシ、ブタ、ニワトリ、鮭に限定されない。

【0012】

6 特定動物由来のゼラチンとこれを含む食品、薬剤。

特定動物由来のゼラチンを得るには、ゼラチン製造時には、単一動物種のみを扱い、得られたゼラチンを他種のものとは混合しない。用いるゼラチンの動物種としては、ウシ、ブタ、ニワトリ、羊、鮭、タコなど、これに限定されない。

ウシゼラチンは、その骨を原料とし、強酸 (強アルカリ)、脱灰の処理で製するが、他の動物でも、例えば、ブタ、羊、ニワトリでも同様に可能で有る。

動物でも、魚類は、例えば鮭は、皮を用いる。軟体類は、例えばタコ、イカは、そのまま用いる。又、ウシ、ブタ、羊、ニワトリは、皮も利用できる。

皮を原料とする時は、真皮のみを用いる事が望ましい。軟体類や皮からの場合、強酸 (強アルカリ) に漬け、加熱することで抽出される。

ゼラチンの製法は、本法に限定されず、例えば、コラーゲンを製し、これを、加熱変性させても良い。

【0013】

7 特定動物由来のゼラチンを含む食品及び又は薬剤。

前述の各種由来のゼラチンを、従来の原料不明のゼラチンに代えて、食品や薬剤に加えれば、特定動物由来のゼラチンを含む食品・薬剤が得られる。特定動物由来のゼラチンを、できるだけ多くそろえることは、将来、ウシ以外の動物ゼラチンにアレルギーが現れた時に、有用である。

食品に加えるゼラチンは、その食味の点から他の材料に代え難い。例えば、ゼラチンゼリーや、煮凝である。

薬剤に加えるゼラチンは、薬剤の安定化の為に代え難い。例えば、ワクチンやカプセルである。ワクチンに、代用物質としてウシ血清アルブミンやヒト血清アルブミンを加える事

10

20

30

40

50

は、抗原性、安全性で問題がある。

又、ワクチンは、時に、ゼラチンを培地として用い、ふけい剤として用いる。

これらの時、一般に用いられるゼラチンに代えて、特定動物種、例えば、ニワトリ由来のゼラチンを使用すれば、従来製していたものと同じ食品や薬剤が、同じ製法で得られ、同じ効果を得られ、ウシゼラチンアレルギー者は安心して利用できる。

【実施例 1】

【0014】

ゼラチンアレルギー患者血清中の抗ゼラチン抗体とその由来動物種を測定した。

健常者血清を対照とし、次の試薬で酵素免疫反応を行った。

試薬 1、ウシ（タイプ I コラーゲン型）ゼラチン、ニワトリ（タイプ I コラーゲン型）ゼラチン、鮭由来ゼラチンを各 0.5 μ g / 穴をコートしたマイクロプレート

試薬 2、HRP 標識抗ヒト IgE 抗体（ラット由来ポリクローナル）

試薬 3、TMB 試薬（TMB 0.1%，過酸化水素 0.02%，0.1 M クエン酸緩衝液）

試薬 4、反応停止液（0.5 M 硫酸）

検体は、リン酸緩衝液で 100 倍に希釈し、100 μ l / 穴を用いた。

測定方法：試薬 1 に検体 100 μ l / 穴 → 2 時間インキュベーション及び洗浄 → 試薬 2、100 μ l / 穴 → 1 時間インキュベーションおよび洗浄 → 試薬 3、100 μ l → 30 分インキュベーション → 試薬 4、50 μ l → 測定（吸光度 450 nm）

結果：検体中には、抗ウシゼラチン抗体が認められたが、抗ニワトリゼラチン抗体、抗鮭ゼラチン抗体は認められなかった。よって、このゼラチンアレルギー患者は、ウシゼラチンアレルギーで、ウシゼラチンのみ避ければ良い。又、本法は、血清中の抗ゼラチン抗体の存在とその由来動物種を測定する方法となり得る。

【実施例 2】

【0015】

ウシ由来ゼラチンを電気泳動により分画した。この分画の中から、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ を、「実施例 2」の「試薬 1」を置き換え「実施例 2」と同様の実験を行った。

結果：検体中の抗ウシ由来ゼラチン抗体は $\alpha 2$ 分画にのみ反応し、 $\alpha 1$ 分画とは反応しなかった。よって、このゼラチンアレルギー患者は、ウシ $\alpha 2$ 分画のみがアレルギーで、ウシ由来ゼラチンを食品や薬剤に用いる時、 $\alpha 2$ 分画を除いて用いれば良い。

【実施例 3】

【0016】

ゼラチンアレルギー者にウシ由来ゼラチン、ニワトリ由来ゼラチン、サケ由来ゼラチンの各 0.001 μ g / 10 μ l リン酸バッファーを皮内注射した。

又、日をあらため、これらの注射薬を、同量、同一人に皮下注射した。

結果：皮内注射後、ウシ由来ゼラチンのみ、翌日に発赤を示し、ニワトリ及びサケ由来ゼラチンは発赤を観察されなかった。皮下注射についても、異常がなかった。

よって、ゼラチンを用いた皮内注射反応法は、ゼラチンアレルギー患者の発見と、そのゼラチン由来種を明確にする。又、非ウシ由来ゼラチンを含む注射薬剤はウシゼラチンアレルギー者に安全に投与し得る。

【実施例 4】

【0017】

ゼラチンアレルギー患者の背部に、ウシ由来ゼラチン、ニワトリ由来ゼラチン、サケ由来ゼラチンの 100 μ g / 9 平方ミリメートルのガーゼをしっかりと貼り付けた。

結果：付着後、ウシ由来ゼラチンのみが、2 日後赤色斑を示し、ニワトリ及びサケ由来ゼラチンには赤色斑が観察されなかった。よって、ゼラチンを用いたパッチ反応法は、ゼラチンアレルギー患者の発見と、そのアレルギー由来種を明確にする。

【実施例 5】

【0018】

食品及び薬剤のゼラチンの存在とその由来動物を測定した。ゼラチンを大量に含む水菓子

10

20

30

40

50

及びMMRWakuchinを検体とし、次の試薬で酵素免疫反応を行った。

対象検体には、ウシゼラチン、ニワトリゼラチン（共にタイプIコラーゲン型）を使用した。

試薬1、抗ウシ（タイプIコラーゲン型）ゼラチン抗体、抗ニワトリ（タイプIコラーゲン型）ゼラチン抗体を各0.5 µg / 穴をコートしたマイクロプレート

試薬2-1、HRP標識抗ウシ（タイプIコラーゲン型）ゼラチン抗体

試薬2-2、HRP標識抗ニワトリ（タイプIコラーゲン型）ゼラチン抗体

試薬3、TMB試薬（TMB 0.1%，過酸化水素 0.02%，0.1 M クエン酸緩衝液）

試薬4、反応停止液（0.5 M 硫酸）

10

検体は、リン酸緩衝液に溶解させ、100 µl / 穴を用いた。

測定方法：試薬1に検体100 µl / 穴→2時間インキュベーション及び洗浄→試薬2-1、2-2、各100 µl / 穴→1時間インキュベーションおよび洗浄→試薬3、100 µl →30分インキュベーション→試薬4、50 µl →測定（吸光度450 nm）し、OD値の高さで判定。

結果：検体中には、ウシ由来ゼラチンが認められたが、ニワトリ由来ゼラチンは認められなかった。よって、本法は、食品・薬剤中のゼラチンの存在とその由来動物種を測定する方法となり得る。

【実施例6】

【0019】

20

ゼラチンアレルギー者に、ウシ由来ゼラチン、ニワトリ由来ゼラチン、サケ由来ゼラチン各0.03%含有0.01 M クエン酸水10 mlを口くう内に20秒間含ませ、吐き出させた後、観察した。

結果：ウシ由来ゼラチンの時のみ、口くう内に発赤が見られたが、ニワトリ由来ゼラチン及びサケ由来ゼラチンの時には、口くう内に変化は見られなかった。

よって、非ウシ由来ゼラチンを用いた食品や内服薬剤はウシゼラチンアレルギー者に使用できる。

【実施例7】

【0020】

鮭由来ゼラチン、ニワトリ皮膚由来ゼラチンを、別々に、温湯で希釈した出汁に加え、加熱した後、冷却し、鮭由来ゼラチンとニワトリ由来ゼラチンの煮凝を得た。ウシゼラチンアレルギー者に、各10 gを、食してもらったが、まったく変化はなかった。

これにより、単一動物由来のゼラチンを加えた食品が得られる事、非ウシゼラチン添加の食品を、ウシゼラチンアレルギー者は、食することができることが明らかである。

【実施例8】

【0021】

ニワトリ由来ゼラチンを3%濃度に、0.01 M 酢酸に溶解させた後、乾燥させて、シート状にした。このシートで、乳糖100 mgを包み、ウシゼラチンアレルギー者に、内服してもらったが、まったく変化は見られなかった。

これにより、非ウシ由来のゼラチンは、ウシゼラチンアレルギー者に、カプセルとして使用できる。

【発明の効果】

【0022】

従来、ゼラチンアレルギーは、卵、牛乳、そば等の食物アレルギーと同様切実な問題であった。卵、牛乳、そばは、その食品を食べなければ済むが、ゼラチンは、そのままの形の事はなく、安定剤として薬剤に、食感剤として食品に、又その他の理由で、多くの食品、薬剤に含まれている。しかし含有を明示されていることは少ない。

それ故、薬剤や食品で、異常反応を示した時、主成分以外のゼラチンが原因であることを特定することは困難であった。又、ゼラチンがアレルゲンと判明しても、避けるべき食品は不明であった。治療上、予防上、必要な薬剤を使用するのに不安であった。

50

本発明は、このような状況を憂慮し、ゼラチンアレルギー者を見つけだし、アレルギーとなる動物種のゼラチン及びその分画を特定し、避けるべき食品、薬剤を示すことを可能にし、更に彼等の為に必要な食品と薬剤の供給を可能にした。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

A 6 1 K 9/48 (2006.01)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)

F I

A 6 1 K 47/42
A 6 1 K 9/48
A 6 1 K 39/00

テーマコード (参考)

G

专利名称(译)	抗明胶抗体的测定方法		
公开(公告)号	JP2011242408A	公开(公告)日	2011-12-01
申请号	JP2011180944	申请日	2011-08-04
申请(专利权)人(译)	胶原蛋白技术研讨会有限公司		
[标]发明人	横山司甫		
发明人	横山 司甫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N33/68 G01N33/50 A61K47/42 A61K9/48 A61K39/00		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.Q G01N33/48.N G01N33/68 G01N33/50.Q A61K47/42 A61K9/48 A61K39/00. G		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/BB03 2G045/CA25 2G045/CB09 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA18 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 4C076/AA54 4C076/AA64 4C076/EE42H 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC05 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/GG01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供测量血液中抗明胶抗体的方法和试剂，明胶动物物种及其作为过敏原的部分，以及仅从特定动物获得的明胶技术和添加的食品/药物与此相同。ŽSOLUTION：测定抗明胶抗体的方法包括：用免疫反应测定血液中抗明胶抗体及其原始动物种类的方法和试剂;用免疫反应测定血液中抗特异性分数明胶抗体的方法和试剂;使用明胶及其注射药物的皮内反应方法;使用明胶及其试剂的贴剂反应方法;用于测量食品/药品中明胶存在的方法和试剂及其原始动物种类;明胶来自特定的动物，食物/药物也加入其中。Ž