

(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2015-78875

(P2015-78875A)

(43) 公開日 平成27年4月23日(2015.4.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Q
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	A
<b>GO 1 N 33/535 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/535	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2013-215533 (P2013-215533)	(71) 出願人	390000527
(22) 出願日	平成25年10月16日 (2013.10.16)		住化エンバイロメンタルサイエンス株式会社 大阪府大阪市中央区道修町二丁目2番8号
		(72) 発明者	江口 英範 兵庫県西宮市津門飯田町2番123号 住化エンビロサイエンス株式会社内
		(72) 発明者	乾 圭一郎 兵庫県西宮市津門飯田町2番123号 住化エンビロサイエンス株式会社内

(54) 【発明の名称】 食品中のアレルギー測定方法

(57) 【要約】

【課題】

食品、特に乾燥状態にある粉末状の食品中に存在するアレルギー量を簡便に測定する方法を提供すること、あるいはアレルギーを簡便に測定することによって食品が安全であることを確認することを目的とする。

【解決手段】

食品、特に乾燥状態にある粉末状の食品として小麦粉、お好み焼き粉、てんぷら粉等に含有されるアレルギーを、環境測定に使用するアレルギー簡易測定キットを使用して測定する。また食品工場における品質管理のために、食品にアレルギーが混入していないかどうかを簡便に測定する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

食品中に存在するアレルギー量を、簡易測定キットを用いて測定することを特徴とするアレルギー測定方法

## 【請求項 2】

食品が、乾燥状態にある粉末状であることを特徴とする請求項 1 に記載のアレルギー測定方法。

## 【請求項 3】

アレルギーがダニアレルギーであることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載のアレルギー測定方法。

## 【請求項 4】

アレルギーの測定方法が、該アレルギーに対するモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法を利用するものであることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のアレルギー測定方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、食品、特に乾燥状態にあって粉末状である小麦粉等の食品に含まれるアレルギー量を簡易に測定する方法に関する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

喘息やアトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎等のアレルギー性疾患は多くの人々が悩まされているものであり、特に近年では増加する傾向となっている。これらのアレルギー性疾患の原因となっているのは環境中に存在する種々のアレルギーであり、それらの中でも屋内に棲息するダニ、ペット動物のフケ、花粉、カビは代表的な吸入性アレルギーとして、良く知られている。特に家屋内に生息する塵性ダニであるヒョウヒダニ類はアレルギーの発生源として大きな問題となっている。ヒョウヒダニ類は畳、絨毯、寝具、カーテン等の家屋内の繊維製品、あるいは屋外においても電車や自動車等の移動車両の座席シート生地等が生育の温床となる。

30

## 【0003】

ヒョウヒダニ類の中でも、コナヒョウヒダニ (*Dermatophagoides farinae*) とヤケヒョウヒダニ (*Dermatophagoides pteronyssinus*) は代表的な種であり、これらのダニの死骸や糞が強いアレルギー物質となる。

## 【0004】

これらのダニは上述のように、室内等の環境中に繁殖するものであるが、ダニは餌が存在する場所であればあらゆる場所に棲息するため、保存された食物に混入した場合には爆発的に増殖する可能性がある。このようにダニに汚染された食物を、汚染されていることを知らずに食べた場合に重大な健康被害を起こす危険性がある。

40

## 【0005】

例えば最近では、開封して保存しておいたお好み焼き粉にダニが混入し、時間の経過とともにダニが増殖しその結果お好み焼き粉に大量のダニアレルギーに汚染されることとなり、このお好み焼き粉を調理して食べたためにアナフィラキシーショックを起こすという事故例が報告されている。例えば、第 6 2 回日本アレルギー学会秋季学術大会において、お好み焼き粉に繁殖したチリダニ類によって即時型アレルギー発作を起こした事例が報告され、この報告ではお好み焼き粉 1 g 中に、ダニアレルギーである Der 1 と Der 2 が大量に検出されたことが示されている。

50

## 【0006】

このように、ダニは小麦粉、お好み焼き粉、てんぷら粉等の乾燥状態にある粉末状の食品に混入した場合、栄養分が豊富であることからダニの繁殖に非常に適した環境にあるため、ダニが爆発的に繁殖し増殖する可能性がある。このような粉末状の食品にダニが大量に繁殖した場合、ダニの虫体由来のアレルゲンであるDer 2とダニの糞由来であるアレルゲンDer 1が共に大量に食品中に混入することとなり、誤ってこのような汚染された食品を調理して食べた場合重大な健康被害を起こす。従って食品において、ダニの混入によりダニが繁殖していることを簡易に測定することができれば、健康被害の恐れを低減させることができる。

## 【0007】

また、小麦粉、お好み焼き粉、てんぷら粉等の乾燥状態にある粉末状の食品の製造工場においても、ダニの混入の恐れが全くないとは言えず、ダニによる汚染が起こっていないことを確認することを品質管理試験のひとつとして組み入れることが考えられる。このような品質管理を行う場合はダニアレルゲンが混入していないことを確認することが目的であるので、複雑な操作が必要な酵素免疫測定法を用いるよりも、簡易なダニアレルゲンの測定方法を利用する方が簡便である。

## 【0008】

環境中のアレルゲン量を測定するために簡易な測定キットを用いる方法はこれまで公知であり、いくつかの方法が知られている。しかしながら、簡易な測定キットを利用して食品中のアレルゲン量を測定し、アレルゲン量の管理を行うことに関しては行われていない。

## 【0009】

特開2001-305134号公報には、モノクローナル抗体による抗原抗体反応を利用して環境中のダニアレルゲン量を簡易に測定するためのキットが提案されている。このキットを用いて、カーペット、畳、寝具類、カーテン、ぬいぐるみ、フローリング、ソファ、クッション、カーシート等から試料を採取し、ダニアレルゲンを測定する方法が提案されている。また特開2006-345801号公報にはアレルゲンが有するプロテアーゼ活性を利用して環境中のアレルゲンを測定する方法が提案され、特開平08-285841号公報には家屋内のダスト類を芳香族ジアゾ化合物との呈色反応によって検出する方法が提案されている。しかしこれらのアレルゲン測定方法を用いて食品中のアレルゲンを測定することに関しては記載されていない。一方、特開2013-33062号公報には抗体を利用したELISA法を用いて食品中の特定成分を測定する方法が提案されているが、アレルゲンを測定することに関しては行われていない。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0010】

【特許文献1】特開2001-305134号公報

【特許文献2】特開2006-345801号公報

【特許文献3】特開2013-33062号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0011】

食品、特に乾燥状態にある粉末状の食品について、ダニの繁殖等によりアレルゲンに汚染されていないかどうかを判定するため、アレルゲン量を簡便に測定あるいは分析する方法を提供することが本発明の課題である。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0012】

本発明者らは、このような課題を解決するため鋭意研究を行った結果、環境中に存在するアレルゲンを測定するための簡易測定キットを利用して、食品、特に乾燥状態にある粉末状の食品中のアレルゲン量を測定することが可能であることを見出した。

## 【0013】

すなわち本発明は、(1)食品中に存在するアレルゲン量を、簡易測定キットを用いて測定するアレルゲン測定方法であり、(2)食品が、乾燥状態にある粉末状であるアレルゲン測定方法であり、(3)アレルゲンがダニアレルゲンであるアレルゲン測定方法であり、(4)アレルゲンの測定方法が、該アレルゲンに対するモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法を利用するものであるアレルゲン測定方法である。

【発明の効果】

【0014】

本発明の試験方法を用いることにより、食品中のアレルゲンを簡易に測定することができ、また食品工場においても製品に有害となるアレルゲンが混入していないかどうかを簡易に確認することができ、品質の管理を容易に行うことが可能となる。

10

【発明を実施するための形態】

【0015】

アレルゲンの測定対象とする食品は特に制限されないが、乾燥状態にある粉末状の食品が適している。このような粉末状態の食品材料としては、小麦粉、米粉、蕎麦粉、大麦粉、ライ麦粉、コーンフラワー、コーングリッツ、粟の粉、パン粉、澱粉、とうもろこし粉、緑豆粉、大豆粉、ポテト粉、キャッサバ粉等の粉末状の食品材料が挙げられ、これらの内二種類以上を混合したプレミックスでも差支えない。また糖類、塩、澱粉類、乳化剤、酵素剤等の副原料を必要に応じて配合することにより調製した粉製品でも差支えない。このような粉製品としては、から揚げ粉、お好み焼き粉、天ぷら粉、たこ焼き粉、ベーカリーミックス、菓子ミックス等の小麦粉ミックス製品が挙げられる。

20

【0016】

小麦粉としては、通常食品に用いられるもので、例えば強力粉、準強力粉、中力粉、薄力粉が挙げられ、これらの混合物でも差支えない。澱粉としては、特に限定されないが、例えばコーンスターチ、小麦澱粉、米澱粉、馬鈴薯澱粉、タピオカ澱粉、甘藷澱粉、サゴヤシ澱粉等が挙げられ、これらの澱粉は単独または混合したものでも差支えない。またこれらを原料とする焙焼デキストリン、高度分岐環状デキストリン、酵素変性澱粉、酸分解澱粉、酸化澱粉、エステル化澱粉、エーテル化澱粉、架橋澱粉、アルファー化澱粉または湿熱処理澱粉等の加工澱粉等を用いることも可能である。

【0017】

プレミックスの例としては、天ぷら、フライ、から揚げ等の揚げ物の衣材を製造するためのから揚げ粉、天ぷら粉、お好み焼き粉、ベーカリーミックス、ホットケーキミックス等の焼き物製造用ミックス粉、蒸しパン等の蒸し物用ミックス及びホワイトソース等のソース類を製造するためのソースミックス等が挙げられる。

30

【0018】

これらの粉末状の食品には、種々の添加物として、糖類、調味料、香辛料、色素、甘味料、増粘剤、油脂類、膨張剤、乳化剤、香料、ビタミン類等が使用されたものでも差支えない。

【0019】

糖類としては、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、デキストリン、糖アルコール等が挙げられ、調味料としては、食塩、塩化カリウム、リン酸三カリウム等の無機塩、L-アスパラギン酸ナトリウム、DL-アラニン、グルタミン酸ソーダ、5'-イノシン酸二ナトリウム、クエン酸カルシウム、クエン酸三ナトリウム、醤油、魚醤、酢、ソース、アミノ酸、化学調味料、天然エキス等が挙げられ、香辛料としては五香粉、八角、茴香、陳皮、山椒、胡椒、唐辛子、ガーリック、生姜、タマネギ、ネギ等が挙げられ、色素としてはパブリカ色素、クチナシ黄色素、クチナシ赤色素、クチナシ青色素、トウガラシ色素、スピルリナ色素、カラメル色素、カカオ色素、ベニコウジ色素、ラック色素等が挙げられる。

40

【0020】

また甘味料としては、デキストリン、オリゴ糖、砂糖、キシロース、グルコース、糖アルコール、還元水あめ、サッカリンナトリウム、キシリトール、アスパルテム、スクラロース、ソルビトール、ステビア等が挙げられ、増粘剤としてはゼラチン、ジェランガム、

50

カラギナン、キサンタンガム、ローカストビーンガム、グルコマンナン、寒天、グアーガム、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、タマリンドガム、タラガム、アラビアガム、トラガントガム、カラヤガム、プルラン、カルボキシメチルセルロース、微小繊維状セルロース、ファーセララン等が挙げられる。

【0021】

油脂類に関しては、植物性油脂の例として米糠油、米胚芽油、パーム油、大豆油、菜種油、コーン油、綿実油、ひまわり油、ヤシ油、シソ油等が挙げられ、動物性油脂の例として牛脂、豚脂、魚油、乳脂等が挙げられ、これらの部分水素添加、水添分別、分別、エステル交換等の加工を施した油脂等を利用することも可能である。

【0022】

さらに膨脹剤としては炭酸水素ナトリウム、炭酸水素アンモニウム、炭酸アンモニウム、DL-酒石酸水素カリウム、L-酒石酸水素カリウム、アジピン酸、L-アスコルビン酸、塩化アンモニウム、ベーキングパウダー等が挙げられ、乳化剤としてはグリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル等が挙げられ、香料としてはアセト酢酸エチル、アセトフェノン、天然香料等が挙げられ、ビタミン類としてはL-アスコルビン酸、ビタミンE、 $\beta$ -カロテン等が挙げられる。

【0023】

アレルゲンの測定に関して、酵素免疫測定法によるアレルゲン測定の知識のない一般の人が食品中のアレルゲンレベルを簡易に測定することは通常は困難であり、市販の簡易測定キットを用いて初めて行うことができる。また、食品の製造を行う工場であっても、製品としての食品にアレルゲンが混入していないことを確認するための品質管理の方法として、アレルゲンの簡易測定キットを利用することも可能である。アレルゲンの簡易測定キットとは、酵素免疫反応等の原理を利用して簡易にアレルゲンを測定することができるツールとして販売されているものを示す。

【0024】

測定を行うアレルゲンの種類は特に限定されないが、ダニアレルゲン、スギ花粉アレルゲン、ネコアレルゲン、イヌアレルゲン、カビアレルゲン、ゴキブリアレルゲン等を対象とすることができる。ダニアレルゲンの場合には、通常コナヒョウヒダニやヤケヒョウヒダニがアレルゲンの原因となることが多く、アレルゲンとしては、例えばコナヒョウヒダニの糞を由来とするDer f 1、コナヒョウヒダニの虫体を由来とするDer f 2がアレルゲンタンパクとして挙げられる。花粉アレルゲンの代表的なものとしてスギ花粉アレルゲンが挙げられ、スギ花粉の外層に主に存在するCry j 1がアレルゲンタンパクとして挙げられる。その他、アレルゲンの原因となる花粉の由来となる植物種としてはヒノキ、ヨモギ、ブタクサ、ハルガヤ、カモガヤ等が挙げられる。ダニアレルゲンや花粉アレルゲン以外に由来となるものとしては、カビ、イヌやネコのフケ、ゴキブリやユスリカ等の昆虫類等が挙げられる。例えばこれらのアレルゲンタンパクとしては、ゴキブリ由来のBlag 1、イヌのフケ由来のCan f 1、ネコのフケ由来のFel d 1、カビ由来のAlt a 1等が挙げられる。これらのアレルゲンの内、簡易測定キットが一般的に販売されているダニアレルゲンを対象とすることが好ましい。

【0025】

食品中のアレルゲン量を測定するためのアレルゲン簡易測定キットに関しては、いくつかの市販品が存在し、例えばマイティチェッカー（登録商標）（住化エンピロサイエンス株式会社製）、ダニスキャン（登録商標）（アサヒフードアンドヘルスケア株式会社製）等を使用することができる。

【0026】

これらのアレルゲン簡易測定キットの測定原理は、抗原抗体反応を利用した、モノクローナル抗体を用いたものであるが、それ以外の原理を利用した方法でも差支えない。このようなアレルゲン簡易測定キットとしては、例えばアレルゲンのタンパク質またはペプチドとしての性質を利用して発色試薬等により検出する方法が挙げられる。

【0027】

10

20

30

40

50

また現在のところダニアレルゲン以外のアレルゲンについて、簡易測定キットは一般には普及していないが、将来において簡易測定キットが開発された場合、そのような製品を食品中のアレルゲン測定に応用することができる。

【0028】

食品中のアレルゲンの測定を行うためには、アレルゲンを抽出することが必要であり、抽出液を用いることができる。この抽出液にはpHを中性の範囲にした緩衝液を用いることができる。緩衝液としてはリン酸塩や、クエン酸、酒石酸、酢酸等の有機酸の塩等を用いることができる。

【0029】

次にアレルゲンを緩衝液を用いて回収した後、このアレルゲン抽出液中のアレルゲン量の測定を行う。アレルゲンの測定原理に関しては特に限定されないが、上述のように酵素免疫法(ELISA法)等を利用した市販のアレルゲン簡易測定キットを使用する方法が考えられる。ELISA法は、抗原抗体反応を利用した抗原の測定方法であり、本発明においては抗原が測定するアレルゲンに相当する。

10

【0030】

食品、特に粉末状の食品を対象としてアレルゲンの測定を行う場合、食品には高濃度のタンパク質、脂肪分、糖分等のさまざまな添加剤を含有する可能性が高いため、アレルゲン測定のための検量線を作成するには、これらの食品に既知量の測定アレルゲンを添加したもので作成することが好ましい。

【0031】

検量線の作成のために、食品に添加されるアレルゲン量は、使用するアレルゲンの簡易測定キットの仕様によるが、アレルゲン水溶液中に粗アレルゲンとしてタンパク量として0.1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは1~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。

20

【実施例】

【0032】

本発明を実施例により更に詳しく説明するが、本発明がこれらによって限定されるものではない。なお、下記に示す%はすべて重量%である。

【0033】

食品試料として下記の粉末市販製品を使用した。

薄力小麦粉(日清製粉株式会社製)

お好み焼き粉(日清フーズ株式会社製)

てんぷら粉(日清フーズ株式会社製)

から揚げ粉(日清フーズ株式会社製)

30

【0034】

標準アレルゲンとしてMite Extract-Df(LSL社製)をpH7.2のリン酸緩衝液に溶解し、Der f2濃度が粗アレルゲンタンパク量として2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにダニアレルゲン溶液を調製した。ダニアレルゲン簡易測定キットとして、マイティチェッカー(住化エンピロサイエンス株式会社製)を用いてダニアレルゲン溶液のアレルゲンレベルを測定した。表1に示す判定基準を適用し、+となることを確認した。

40

【0035】

【表1】

判定	判定の基準	Der f2濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
++	はっきりとしたライン	>3.5
+	ラインであることが確認できる	1.0
+-	うっすらと発色していることがわかる	0.5
-	全く発色していない	<0.1

【0036】

食品試料1gを15mL容プラスチックチューブに取り、ダニアレルゲン溶液10mLを

50

加えて十分に攪拌した。次に遠心分離機を用いて12000rpmの回転数で5分間、遠心分離を行い、プラスチックチューブに生じた上清を分析試料とした。またダニアレルゲン溶液の代わりにpH7.2のリン酸緩衝液を用いて同様の操作を行い、対照分析試料を調製した。

【0037】

ダニアレルゲン測定（簡易測定キットによる測定）

分析試料にマイティチェッカーを3秒間浸漬し、10分経過した後で発色の程度を評価した。

【0038】

E L I S A法（酵素免疫測定法）によるダニアレルゲン測定

酵素免疫測定法（Der f 2サンドイッチE L I S A法）

まず、リン酸緩衝液（pH7.4、0.1重量%NaN<sub>3</sub>含有）で2μg/mLに希釈したDer f 2モノクローナル抗体15E11を、F16 MAXISORP NUNC - IMMUNO MODULEプレート（NUNC社製）の1ウェルあたり200μLずつ添加し、4℃にて3日以上感作させた。感作後、液を捨て、ブロッキング試薬{1重量%牛血清アルブミン+リン酸緩衝液（pH7.2、0.1重量%NaN<sub>3</sub>含有）}を1ウェルあたり200μLずつ添加し、37℃、60分間反応させた。反応後、リン酸緩衝液{pH7.2、0.1重量%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート含有}にてプレートを洗浄した。

【0039】

次に、食品試料から抽出したダニアレルゲン測定試料液を1ウェルに100μL滴下し、37℃、60分間反応させた。反応後、リン酸緩衝液{pH7.2、0.1重量%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート含有}にてプレートを洗浄した。ペルオキシダーゼ標識したDer f 2モノクローナル抗体を蒸留水で200μg/mLに溶解し、それをリン酸緩衝液{pH7.2、1重量%牛血清アルブミンおよび0.1重量%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート含有}で1000倍希釈した液を、1ウェルあたり100μLずつ添加した。37℃、60分間反応させた後、リン酸緩衝液{pH7.2、0.1重量%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート含有}で、次いで蒸留水でプレートを洗浄した。0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH6.2）13mLにオルト-フェニレンジアミンジヒドロクロライド（SIGMA CHEMICAL CO.製：26mg Tablet）と過酸化水素水13μLを加えたものを1ウェルあたり100μLずつ添加し、37℃、5分間反応させた。その後直ちに、2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を50μLずつ入れて反応を停止させ、マイクロプレート用分光光度計（テカンジャパン株式会社製）で吸光度（OD490nm）を測定した。既知濃度のDer f 2水溶液を用いて同様に測定した検量線より測定試料のDer f 2濃度を求めた。

【0040】

簡易測定キット及びE L I S A法によるアレルゲン濃度測定結果を表2に示す。簡易測定キットによる測定結果はE L I S A法による測定結果と良好な相関を示し、食品試料中のアレルゲン量を簡便に測定することができた。

【0041】

10

20

30

40

【表 2】

試料	抽出液アレルギー濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	マイティチェッカー 判定結果	ELISAによる測定値 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
薄力小麦粉	0	-	<0.1
	2.0	+	1.9
お好み焼き粉	0	-	<0.1
	2.0	+	2.0
てんぷら粉	0	-	<0.1
	2.0	+	2.1
から揚げ粉	0	-	<0.1
	2.0	+	2.1

10

## 【産業上の利用可能性】

## 【0042】

本発明により、食品、特に乾燥状態にある粉末状の食品中のアレルギー量を簡便に測定することができ、食品工場においてもアレルギーの混入について簡易に検査を行うことができる。

20

专利名称(译)	测量食物中过敏原的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015078875A</a>	公开(公告)日	2015-04-23
申请号	JP2013215533	申请日	2013-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	住化愿必隆梦之赛因斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	住化环境科学有限公司		
[标]发明人	江口英範 乾圭一郎		
发明人	江口 英範 乾 圭一郎		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/535		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/569.A G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

[问题] 食品，特别是提供一种易于测量干燥状态下粉状食品中过敏原含量的方法，或通过简单地测量过敏原来确认食品安全的方法 要做。[解决方案] 使用简单的用于环境测量的变应原测量试剂盒测量食品中所含的变应原，特别是干燥状态的粉状食品，例如小麦粉，大阪烧粉和天妇罗粉。另外，为了对食品工厂进行质量控制，只需测量食品中是否混合了过敏原。[选择图]无

判定	判定の基準	Der f2濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
++	はっきりとしたライン	>35
+	ラインであることが確認できる	1.0
+-	うっすらと発色していることがわかる	0.5
-	全く発色していない	<0.1