

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4427541号
(P4427541)

(45) 発行日 平成22年3月10日(2010.3.10)

(24) 登録日 平成21年12月18日(2009.12.18)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18 Z N A
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 H
CO 7 K 16/16 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	CO 7 K 16/16

請求項の数 12 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-510755 (P2006-510755)	(73) 特許権者 000113067 プリマハム株式会社 東京都品川区東大井3丁目17番4号
(86) (22) 出願日 平成17年3月4日(2005.3.4)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2005/003799	
(87) 国際公開番号 W02005/085847	(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀
(87) 国際公開日 平成17年9月15日(2005.9.15)	
審査請求日 平成18年6月20日(2006.6.20)	(72) 発明者 秋元 政信 茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム株式会社内
(31) 優先権主張番号 特願2004-63071 (P2004-63071)	(72) 発明者 加藤 重城 茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム株式会社内
(32) 優先日 平成16年3月5日(2004.3.5)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 浪岡 真 茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム株式会社内
(31) 優先権主張番号 特願2004-285542 (P2004-285542)	
(32) 優先日 平成16年9月29日(2004.9.29)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2004-285543 (P2004-285543)	
(32) 優先日 平成16年9月29日(2004.9.29)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳アレルギーの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

未変性 s 1 カゼイン 及び 尿素処理 s 1 カゼイン を認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する 2 種類の抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 を用いることを特徴とする乳アレルギーの検出方法。

【請求項2】

抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 が、さらに、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 であることを特徴とする請求項1記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項3】

抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 が、配列番号1で示される s 1 カゼインのアミノ酸配列の132番目から193番目までの領域 を認識するモノ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記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項4】

抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 が、ハイブリドーマ(FERM BP - 10263) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 1 及びハイブリドーマ(FERM BP - 10264) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 2 であることを特徴とする請求項1~3のいずれか記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項5】

サンドイッチELISAにより、食品中の s 1 カゼイン を、10~1000ppbの濃

度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項 6】

未変性 s 1 カゼイン 及び 尿素処理 s 1 カゼイン を認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する 2 種類の抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体を備えたことを特徴とする乳アレルギー検出用キット。

【請求項 7】

抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体が、さらに、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体であることを特徴とする請求項 6 記載の乳アレルギー検出用キット。

10

【請求項 8】

抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体が、配列番号 1 で示される s 1 カゼイン のアミノ酸配列の 132 番目から 193 番目までの領域を認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 6 又は 7 記載の乳アレルギー検出用キット。

【請求項 9】

抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体が、ハイブリドーマ (FERM BP - 10263) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体 Pas 1 CN1 及びハイブリドーマ (FERM BP - 10264) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体 Pas 1 CN2 であることを特徴とする請求項 6 ~ 8 のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット。

20

【請求項 10】

異なるエピトープを認識する 2 種類のモノクローナル抗体の少なくとも一つが、免疫クロマト用に使われる金コロイドで標識された モノクローナル 抗体であることを特徴とする請求項 6 ~ 9 のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット。

【請求項 11】

ハイブリドーマ (FERM BP - 10263) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体 Pas 1 CN1。

【請求項 12】

ハイブリドーマ (FERM BP - 10264) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル 抗体 Pas 1 CN2。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、食品等の試料中に含まれる未変性及び変性の乳アレルギーを指標とした乳アレルギーの検出方法や、それに用いられる乳アレルギーの検出用キットに関する。

【0002】

また、本発明は、食品等の試料中に含まれる未変性又は変性の乳アレルギーを定性的かつ定量的に高感度で分析することができる、カゼインの主要タンパク質である s 1 カゼイン を指標とした乳アレルギーの検出方法や、それに用いられる乳アレルギーの検出用キットに関する。

40

【背景技術】

【0003】

自然環境の減少、車や工場などからの排気ガス、住宅事情等、或いは食べ物の変化など様々な因子により、現在では、3人に1人が何らかのアレルギー疾患をもつといわれている。特に、食物アレルギーは、食品中に含まれるアレルギー誘発物質（以下、食物アレルギーという）の摂取が引き起こす有害な免疫反応であり、皮膚炎、喘息、消化管障害、アナフィラキシーショック等を引き起こし、このような食物アレルギーの患者が増加していることから、医学上及び食品産業上、深刻な問題を生じている。これらの危害は死に至らせることがあり、未然に処置を施す必要がある。そのためには、表示を通じて消費者へ情報提供の必要性も高まっており、FAO/WHO 合同食品規格委員会は、アレルギー物質

50

として知られている 8 種の原材料を含む食品にあっては、それを含む旨の表示について合意し、加盟国で各国の制度に適した表示方法を検討することとした（1999年6月）。日本では過去の健康危害などの程度、頻度を考慮して重篤なアレルギー症状を起した実績のある 24 品目の食品について、その表示方法が定められた（2002年4月より施行）。アレルギーを引き起こす食品としては、卵類、牛乳類、肉類、魚類、甲殻類及び軟体動物類、穀類、豆類及びナッツ類、果実類、野菜類、ビール酵母若しくはゼラチンなどが知られており、特に乳アレルギーの主要成分としての β 1 カゼインや、ホエーアレルギーの主要成分である ラクトグロブリンや、卵白アレルギー成分としてはオボアルブミンとオボムコイドや、小麦アレルギーの主要成分としてグリアジンや、そばの主要タンパク質である分子量 24 kDa と 76 kDa のタンパク質や、落花生の主要タンパク質である Ara h 1 が知られている。

10

【0004】

従来、アレルギーの検出する方法としては、例えば、アレルギーに特異的に反応するイムノグロブリンを定量する方法（特開平05-249111号公報参照）や、抗原抗体複合体を含有する検体中の該抗原抗体複合体を酸処理等により解離させ、必要に応じてアルカリを用いて中和処理を行った後、該検体中のアレルギー特異的 IgE 抗体を測定する方法（特開平07-140144号公報参照）等が知られている。

【0005】

また、現在、乳、卵、小麦、そば、落花生の特定原材料を検出するための公定法として、加熱・非加熱複合抗原より得られるポリクローナル抗体を用いた免疫学的な検出方法（特開2003-155297号公報参照；以下「市販公定法A」という）、あるいは精製抗原より得られたポリクローナル抗体を用いた免疫学的な検出方法（以下「市販公定法B」という）が用いられている。これらは、特異的にアレルギーを検出するために有効な方法であるが問題も多い。例えば、市販公定法Aでは複合抗原を用いているため、何に対する抗体なのかが不明で、交差性が高く、例えば、イムノプロット法などによる抗原の同定ができず、また非特異反応が増える可能性がある。また、市販公定法Bでは、抗原が精製されているため抗体の特異性は明確であるものの、未変性の抗原を用いて作製された抗体を使用しているため、変性/未変性により抗体が結合する程度に違いがあるため、同じ添加量であっても、加熱前、加熱後での定量値が異なるという問題があった。特に、小麦は他の特定原材料（卵、乳、そば、落花生）の中でも過酷な加熱処理が施される場合が多い（例えばパン、唐揚げ等）ため、小麦アレルギーは未変性から加熱変性まで、広範囲な状態で存在する。そこで、小麦アレルギーを検出するためには、どのような状態のアレルギーに対して結合するかを明らかにしたモノクローナル抗体を作製し、その特性に応じて利用する必要がある。

20

30

【0006】

さらに、卵の同定、定量に関しては、オボムコイドを指標として、すでにポリクローナル抗体を用いた方法（例えば、Int. Archs. Allergy appl. Immun., 75, 8-15, 1984参照）あるいはモノクローナル抗体を用いた方法（例えば、Nutr. Sci. Vitaminol. 45, 491-500, 1999参照）が知られている。また、オボムコイドを認識するモノクローナル抗体で、未変性オボムコイドと反応するが熱変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、熱変性オボムコイドと反応するが未変性オボムコイドとは反応しないモノクローナル抗体、及び未変性オボムコイドと熱変性オボムコイドに反応するモノクローナル抗体を用いて、加熱変性状態をも識別してオボムコイドを定量し、卵アレルギーの同定と正確な定量を可能とする免疫学的定量方法が報告されている（例えば、特開2002-253230号公報参照）。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、乳アレルギーを含む食品において、乳アレルギーが、変性/未変性のいかなる状態にあっても検出できる高感度な免疫学的な検出方法及びそれに用いられる検

50

出キット等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、特定原材料である乳アレルギーを検出する方法について鋭意検討し、未変性及び変性の乳アレルギーを認識する2種類のモノクローナル抗体を用いると、これら特定原材料の乳アレルギーを検出することができることを見出した。

【0009】

特定原材料の一つである乳の検出方法の検討を行うに当たっては、カゼインの主要たんぱく質である s1カゼインを指標として、これに対するモノクローナル抗体（以下MAbと記す場合がある）を作出し、その中から未変性 s1カゼイン、尿素処理 s1カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識することができるMAbを複数選択し、サンドイッチELISAにより、未変性 s1カゼイン、尿素処理 s1カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを、100～1000ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうるMAbの組合わせを見出した。また、これらのMAbを用いると、食品中の乳アレルギーがいかなる加工工程を経た場合にも、本発明による検出方法や検出キットを利用する者がより簡便に検査対象製品からの乳アレルギーを検出しうることを確認した。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明（乳アレルギー）の2種類の抗 s1カゼインMAbを用いた、各種状態の s1カゼインに対するサンドイッチELISAの結果を示す図である。

【図2】本発明（乳アレルギー）のPas1CN1およびPas1CN2の認識する s1カゼインの構成たんぱく質の相違を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の乳アレルギーの検出方法としては、未変性 s1カゼイン及び尿素処理 s1カゼインを認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する2種類の抗 s1カゼインモノクローナル抗体を用いる乳アレルギーの検出方法であれば特に制限されず、また、本発明の乳アレルギー検出用キットとしては、未変性 s1カゼイン及び尿素処理 s1カゼインを認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する2種類の抗 s1カゼインモノクローナル抗体を備えた乳アレルギー検出用キットであれば特に制限されない。かかる未変性 s1カゼイン及び尿素処理 s1カゼインを認識するモノクローナル抗体として、抗 s1カゼインモノクローナル抗体を具体的に例示することができる。ここで「乳アレルギー」とは、乳カゼインの主要タンパク質である s1カゼインを含むものをいう。

【0012】

上記抗 s1カゼインモノクローナル抗体としては、未変性 s1カゼインと尿素処理 s1カゼインに加えて、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 s1カゼインモノクローナル抗体が好ましく、例えば、配列番号1で示される s1カゼインのアミノ酸配列の132番目から193番目までの領域を認識するモノクローナル抗体を挙げることができ、具体的には、ハイブリドーマ（FERM BP-10263）が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体 Pas1CN1、ハイブリドーマ（FERM BP-10264）が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体 Pas1CN2等を好適に例示することができる。また、Pas1CN1とPas1CN2を組み合わせることで、特に有利にサンドイッチELISAやイムノクロマトを行うことができる。例えば、これらの抗体を用いることで、サンドイッチELISAにより、食品中の未変性 s1カゼイン及び尿素処理 s1カゼインを、10～1000ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析することができる。

【0013】

以上の本発明の免疫学的なアレルギーの検出方法は、未変性/変性の乳アレルギーを含

10

20

30

40

50

む試料を、標識化した抗 s 1 カゼイン M A b と接触させ、あるいは標識化した抗体の存在下に s 1 カゼイン M A b と接触させ、抗原抗体反応により標識化免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識物質を用いて分離・測定する検出段階とからなり、かかる免疫反応段階における抗原抗体反応の方法も特に制限されず、例えば、以下の方法を例示することができる。

【 0 0 1 4 】

不溶性担体に結合した本発明の抗 s 1 カゼイン M A b に試料中の乳アレルギーを捕捉させた後に標識化抗 I g G 抗体を反応させるサンドイッチ法や、不溶性担体に結合した抗 s 1 カゼイン M A b と異なるエピトープを認識する標識抗 s 1 カゼイン M A b (第二抗体) を用いるサンドイッチ二抗体法や、不溶性担体に結合した抗 s 1 カゼイン M A b に試料中の乳アレルギーを標識化抗原の存在下で反応させる競合法や、乳アレルギーを含有する試料にこれらと特異的に反応する磁気ビーズ結合標識抗 s 1 カゼイン M A b を作用させさせた後、磁力により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する磁気ビーズ法や、乳アレルギー を含有する試料にこれらと特異的に反応する標識抗 s 1 カゼイン M A b を作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する凝集沈殿法や、金コロイド等で標識された抗 s 1 カゼイン M A b と食物アレルギーである s 1 カゼイン が結合した抗原抗体複合体が試験ストリップ上を毛管現象等により移動する途中に、s 1 カゼイン と結合する抗 s 1 カゼイン M A b をあらかじめ固定しておき、抗原抗体複合体を補足させることで現れる着色ラインの有無によって定性分析するイムノクロマト法の他、二重免疫拡散法、放射免疫拡散法など公知の免疫測定法を利用することができるが、抗 s 1 カゼイン M A b として、それぞれ異なるエピトープを認識する2以上のモノクローナル抗体を用いる方法、例えば、食品中の未変性アレルギー及び/又は変性アレルギーが100~1000ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうる高感度の点でサンドイッチ二抗体法が、定性的には簡便性からイムノクロマト法が好ましい。また、食肉製品等の食品試料中からアレルギーを抽出する場合、尿素と2-メルカプトエタノールを用いることが望ましい。

【 0 0 1 5 】

上記抗原抗体反応において用いられる不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等を挙げることができ、また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管、ラテックスビーズ状等の種々の形状で用いることができる。更に、これら不溶性担体への抗原又は抗体の固定化方法は特に限定されるものでなく、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

【 0 0 1 6 】

本発明の乳アレルギーの検出方法や乳アレルギー検出用キットに用いられる抗 s 1 カゼイン M A b の免疫グロブリンのクラス及びタイプは特に制限されないが、抗 s 1 カゼイン M A b として、I g G クラス、タイプ の抗体が好適に用いられる。また、モノクローナル抗体の形態としては、全抗体又はF (a b ')₂、F a b 等の断片を用いることもできる。抗体の由来は特に限定されるものではないが、マウス、ラット、ヒト、兎、鶏等を挙げることができるが、作製の簡便性からマウスに由来するモノクローナル抗体が好適に用いられる。また、抗 s 1 カゼイン M A b は、未変性又は変性の s 1 カゼイン で免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローム細胞との細胞融合により調製されるハイブリドーマを培地上で培養するか、又は動物腹腔内に投与して腹水内で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造することができる。

【 0 0 1 7 】

抗 s 1 カゼイン M A b 産生ハイブリドーマは、例えば、未変性及び/又は変性の s 1 カゼイン を用いてB A L B / c マウスを免疫し、免疫されたマウスの抗体産生細胞とマウスミエローム細胞とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリ

10

20

30

40

50

ーニングすることにより、抗 s 1 カゼイン M A b 産生ハイブリドームを作出することができる。上記の抗体産生細胞としては、例えば未変性及び/若しくは変性の s 1 カゼイン 又はこれを含む組成物を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、B - リンパ球等を挙げることができる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えば未変性及び/又は変性の s 1 カゼイン をそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に1 ~ 2回/月、1 ~ 6ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から2 ~ 4日後に免疫動物から採取することにより行なわれる。ミエローム細胞としては、マウス、ラット由来のもの等を使用することができる。抗体産生細胞とミエローム細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

10

【0018】

細胞融合は、例えばダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)等の培地中で抗体産生細胞とミエローム細胞とをポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在下で混合することにより行なうことができる。細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、沈殿をHAT培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドームを選択し、次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドームを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、抗 s 1 カゼイン M A b を産生するハイブリドームを得ることができる。また、s 1 カゼイン等の未変性の食物アレルゲンのみを用いて免疫した抗免疫動物から、有利に抗変性 s 1 カゼイン M A b を得ることができる場合もある。この場合、抗変性 s 1 カゼイン M A b 産生ハイブリドームをスクリーニングしてもよいし、あるいは、固相状態でのELISAで未変性の s 1 カゼイン に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドームを選択し、この抗体産生ハイブリドームが産生するモノクローナル抗体から液相状態で未変性の s 1 カゼイン に対してのみ特異的に反応する抗 s 1 カゼイン M A b を得ることができる。前記のように、抗体産生ハイブリドームを培地中又は生体内で培養しモノクローナル抗体を培養物から採取することができるが、培養物又は腹水からのモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、例えば、IgG精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体又はプロテインA、G等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

20

【0019】

また、標識化抗体作製に用いられる標識物質としては、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたらすことができる標識物質であればよく、酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、金コロイド等を使用するのができ、酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコ-ス-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等を、蛍光物質としては、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコピリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等を、発光物質としては、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等を、放射性物質としては³H、¹⁴C、¹²⁵I若しくは¹³¹I等を例示することができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、発光剤等を用いることができる。

30

40

【0020】

本発明の食物アレルゲン検出用キットには、それぞれ異なるエピトープを認識する2以上の抗 s 1 カゼイン M A b を含むが、これらは保存安定性の点から、溶液状態よりも凍結乾燥物として収容されていることが好ましく、検出用キットにはかかる抗 s 1 カゼイン M A b 溶解する緩衝液や培養液の他、試料を調製するための緩衝液等を含んでいてもよい。また、より好ましい別の態様の本発明の抗食物アレルゲン検出用キットとしては、前記イムノクロマト法における試験ストリップを挙げることができる。この場合、異なるエ

50

ピトーブを認識する2種類のモノクローナル抗体の少なくとも一つを、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクローナル抗体とすることが好ましい。

【0021】

本発明のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマ(FERM BP - 10263)が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN1や、ハイブリドーマ(FERM BP - 10264)が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN2を挙げることができ、これらハイブリドーマは、平成17(2005)年2月24日(受領日)付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に寄託されている。

【0022】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0023】

1. 抗 s1カゼインモノクローナル抗体の確立

1-1 材料及び方法

1) s1カゼイン(以下「CN」という)の調製

新鮮な牛乳よりZittle(1959)に従い、CNの粗画分を得た。この粗画分をさらにTSK gel DEAE 650S(TOSOH)を用いて、50mMのイミダゾール-HCl緩衝液(pH6.4)、4Mの尿素を含むNaClのリニアグラジエント(0から0.3M)により精製を行った。精製したCN画分を蒸留水による透析後、凍結乾燥を行った。生理食塩水でこの凍結乾燥物の0.1%溶液を調製し、1ml容エッペンドルフチューブに500μlずつ分注し、免疫に供するまで-20で凍結保管し、抗原溶液とした。

【0024】

2) 免疫

供試動物として、6週齢のBALB/cマウス(日本クレア株式会社製)5尾を用いた。初回免疫には、完全フロイントアジュバント(Difco)を0.1%のCNが500μl入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150μl腹腔内に注射した。また、追加免疫は、3週間の間隔で2回行った。免疫には、不完全フロイントアジュバント(Difco)を0.1%のCNが500μl入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを1尾当たり150μl腹腔内に注射した。

【0025】

3) 血中抗体価の測定

初回あるいは追加免疫でCNを注射した1週間後に、各BALB/cマウスの尾部静脈より採血を行った。採血した血液は室温に2時間放置後、遠心分離を行い、血清を得た。これらの血清の10倍希釈段を作製し、非競合法ELISAによりマウス血中の抗CN抗体価を調べた。なお、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(H+L)抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.製)を用いた。

【0026】

4) ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマの作製は、ケラーとミルシュタインの方法(1975)に従った。すなわち、十分に抗体価が上がったマウスに、0.1% CN溶液100μlを尾部静脈より注射した。静脈注射から4日後、マウスより脾臓を無菌的に摘出した。脾臓を細切後、RPMI 1640で洗浄して、滅菌ナイロンメッシュ(Cell Strainer, 70 μm, Becton Dickinson)を通し、脾臓細胞懸濁液を得た。1,000rpm×10分の遠心分離により脾臓細胞を集め、再度RPMI 1640で再懸濁し細胞数をカウントした。この脾臓細胞懸濁液とマウスミエローマ細胞(P3X63Ag8.653)懸濁液を細胞数が10:1になるように混合し、再度1,000rpm×10分の遠心分離を行い、ペレットを得た。このペレット

10

20

30

40

50

に平均分子量 3,350 の 45% ポリエチレングリコールを滴下し細胞融合を行った。細胞溶液に RPMI 1640 を加え希釈後、遠心分離でペレットにした。このペレットに、ハイブリドーマ用培地 (10% 牛胎児血清、40 mM の 2-メルカプトエタノール、100 U/ml のペニシリン、100 mg/ml のストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地) に 100 μM のヒポキサンチン、0.4 μM のアミノプテリン、16 μM のチミジンを含む HAT 選択培地を加え、 5×10^6 cells/well となるように 24 ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に分注し、5% CO₂ 下 37℃ で培養した。

【0027】

5) 限界希釈法によるクローニング

細胞培養用プレートの各ウェルの培養上清について、ELISA の一次抗体として供試し、抗 CN 抗体を産生しているハイブリドーマの存在を調べた。ELISA により CN に対して陽性を示したウェルのハイブリドーマについて、0.9 cell/well となるように 96 ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に移し、限界希釈法によるクローニングを行った。なお、フィーダー細胞として、4 週齢 BALB/c マウス胸腺細胞を 5×10^6 cells/well となるように 96 ウェル細胞培養用プレートの各ウェルに加えた。クローニングされたハイブリドーマの培養には、10% 牛胎児血清、40 mM の 2-メルカプトエタノール、100 U/ml のペニシリン、100 μg/ml のストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地を用いた。

【0028】

6) 抗体のスクリーニング

モノクローナル抗体のスクリーニングは、未変性 CN (以下「N-CN」という)、尿素処理 CN (以下「D-CN」という)、市販のカゼインナトリウムの未変性物 (以下「N-CN」という) 又は市販のカゼインナトリウムの尿素処理物 (以下「D-CN」という) の 4 種類のたんぱく質に対する反応性の違いを調べることで特異性の異なるクローンを得ることとした。D-CN は、精製 CN を 1 mg 量り、5% EDTA 100 μl、尿素 6.0 g、2-メルカプトエタノール 0.2 ml、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) 1 ml、蒸留水 1.5 ml を加え、アルミフویلで蓋をした後、100℃ で 1 時間オイルバスで加熱、変性処理を行った。培養上清の N-CN、D-CN、N-CN あるいは D-CN に対する反応性を非競合法 ELISA にて調べた。

【0029】

7) 腹水の採取及び MA b の精製

Jones ら (1990) に従い、まず、BALB/c マウスに不完全フロイントアジュバントを 0.2 ml 腹腔内に注射した。1 週間後、一尾当たり 5×10^6 cells のクローニングされたハイブリドーマを接種した。腹水貯留後、シリンジにより腹水を採取した。採種した腹水を Protein G カラム (アマシャム ファルマシア) により精製した。

【0030】

8) MA b のクラス、サブクラス及びタイプ

MA b のクラス及びサブクラスについては、Monoclonal mouse immunoglobulin isotyping kit (Pharmingen) により、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL () 及び IgL () を決定した。

【0031】

9) MA b のビオチン化

精製した MA b について、サンドイッチ ELISA に供試するため、それぞれビオチン化処理を行った。50 mM の炭酸緩衝液 (pH 8.5) を用いて 20 mg/ml となるよう調製し、DMSO に 3 mg/100 μl で溶解した NHS-ビオチン溶液を 10 μl 加え、攪拌後、氷冷しながら 2 時間静置した。その後、20 mg/ml となるように PBS で置換した。

【0032】

1-2 結果

1) MA b の選択

10

20

30

40

50

乳の主要アレルゲンである α 1カゼイン (α 1CN) を特異的に認識する6種類のMAbが得られた。これら6種類のMAbにおける、それぞれ固相とした各抗原N- α 1CN、D- α 1CN、N-CN、又はD-CNに対する特異性をダイレクトELISAにより調べた。また、これらMAbのクラス、サブクラスについても調べた。結果を表1に示す。表1中、+は各固相抗原に対し陽性であることを、-は陰性であることを示す。表1に示されるように、全ての状態の抗原に結合するMAbであるPas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3を選択した。

【0033】

【表1】

MAb名	N- α 1CN	D- α 1CN	N-CN	D-CN	クラス、サブクラス およびタイプ
Pas1CN1	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN2	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN3	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN4	+	-	+	-	IgG1 (κ)
Pas1CN5	+	-	+	-	IgG1 (κ)
Pas1CN6	+	-	+	-	IgG1 (κ)

10

【0034】

2) サンドイッチELISAにおける組合せ条件

ダイレクトELISAで選択したPas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3を用いて、全てのMAbの組合せについてサンドイッチELISAを行った。Pas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3をそれぞれ固相あるいはビオチン化抗体として、 α 1CNあるいはCNを検出するためのMAbの組合せを、サンドイッチELISAにより選出した。その結果、N- α 1CN、D- α 1CN、N-CN、D-CNを検出できる組合せとしてPas1CN1 (FERMBP-10263) とPas1CN2 (FERMBP-10264) を選択した。結果を図1に示す。

20

【0034】

2. Pas1CN1とPas1CN2の認識するエピトープ

α 1カゼイン溶液を、リシルエンドプロテアーゼで分解し、分解物をトリシンSDS-PAGE (分離ゲル16.5%、濃縮ゲル5%) により分離した。分離したゲルを用いて、エレクトロブロットングによりPVDF膜に転写した。転写したPVDF膜にPas1CN1とPas1CN2の培養上清 (1/1000) を反応させたのち、発色させて、認識するエピトープを確認した。結果を図2に示す。その結果、認識部位はPas1CN1とPas1CN2ともに、分子量約7000、配列番号1で示される α 1カゼインのアミノ酸配列の132番目から193番目までの領域を認識した。

30

【0035】

3. サンドイッチELISAによる食品中の変性および未変性カゼインの検出

上記1. で選択されたPas1CN1とPas1CN2の組合せにより、実際の食品中のカゼインを検出できるかを試みた。

【0036】

3-1 材料及び方法

40

1) モデル食肉製品の作製

定量試験のためのモデル食品として食肉製品を選択し、表2に示す配合にて各濃度のカゼインナトリウムを含むモデル食肉製品を作製した。豚赤肉は、豚ロース肉より脂、スジを除去し、5mmで挽肉にしたものを使用した。

【0037】

【表2】

モデル食肉製品の配合表

原材料	TEST 1	TEST 2	TEST 3	Control
豚赤肉 (%)	83.0	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0	2.0
ポリリン酸Na (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
亜硝酸ナトリウム (ppm)	120	120	120	120
アスコルビン酸ナトリウム (ppm)	300	300	300	300
水	14.5	14.5	14.5	14.5
カゼインナトリウム (ppm)	200	20	2	0
合計 (%)	99.762	99.744	99.7422	99.742

10

【0038】

各配合に従い添加物を計量し、フードプロセッサーにて混合後、塩ビチューブに充填を行い、75 で30分の加熱を行った。

2) サンドイッチELISAによる定量分析

各モデル食肉製品を、フードプロセッサーにて均一になるまで磨砕し、分析用サンプルとした。サンプルを2gを量り取り、1M尿素および0.1% 2-メルカプトエタノールを含むPBSTを38g加え100、一時間加熱処理を行った。冷却後、3,000rpm×20分の遠心分離を行い、上清0.5mlにPBSTを9.5ml加え、ELISA用サンプルとした。検量線には同様に尿素・2-メルカプトエタノール処理を行ったカゼインナトリウムの段階希釈を用いた。また、分析用サンプルからPBSTを用いて抽出し、PBST (PBSにポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート0.5%加えたもの)に溶解したカゼインナトリウムを検量線とした尿素および2-メルカプトエタノールを用いない場合との比較を行った。

20

【0039】

3-2 結果

サンドイッチELISAによるモデル食肉製品中のカゼインナトリウムの分析について、尿素および2-メルカプトエタノールを用いた結果を表3に、また、PBSTのみで抽出した結果を表4に示す。

30

【0040】

【表3】

	TEST 1	TEST 2	TEST 3	Control
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析値 (ppm)	235.4	16.4	1.5	N. D. *2
回収率 (%) *1	117.7	82.0	75.0	—

*1: (分析値/添加量) × 100

*2: 検出せず

【0041】

【表4】

	TEST 1	TEST 2	TEST 3	Control
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析値 (ppm)	16.1	1.7	N. D. *2	N. D.
回収率 (%) *1	8.1	8.5	—	—

*1: (分析値/添加量) × 100

*2: 検出せず

40

【0042】

50

以上の結果から、尿素および2-メルカプトエタノールを抽出液に加えた場合に、高い回収率でモデル食肉製品中のカゼインナトリウムを検出可能であり、PBS抽出では非常に低い回収率となった。これらのことから、食品中からのカゼインナトリウムの抽出には尿素および2-メルカプトエタノールを用いることが有効であり、その場合に利用するMAbの特性には、尿素可溶化カゼインに結合可能であることが必要であることが明らかとなった。

【0043】

4. イムノクロマトによる変性および未変性カゼインナトリウムの検出

4-1 材料および方法

1) 金コロイド標識およびコンジュゲートパッドの作製

2 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) で 1 mg/ml となるように Pas 1 CN 1 の MAb 溶液を調製した。あらかじめ 0.2 M 炭酸カリウム溶液で pH 9.0 に調製した金コロイド溶液 (シグマ社製) 5 ml に MAb 溶液を 500 µl 加え、室温で 30 分間反応した後、10% BSA 溶液を 625 µl を加え、さらに 15 分間反応させた。遠心分離を行い、1% BSA 溶液で OD 525 = 1.0 になるよう調製した。ガラスウール製コンジュゲートパッドに 68 µl/cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

10

【0044】

2) 抗体固定化メンブレンの作製

PBS で 4 mg/ml となるよう Pas 1 CN 2 の MAb 溶液を調製し、ニトロセルロースメンブレンに直線状に塗布し乾燥させた。その後、1% BSA、0.1% Tween 20 を含む PBS で 37℃、2 時間ブロッキング後、PBS で洗浄し乾燥させた。

20

【0045】

3) イムノクロマトストリップの組立と評価

上記で作製したサンプルパッド、コンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレン、吸収パッドをそれぞれ貼り付け、イムノクロマトストリップとした。被検液としては、上記調製したモデル食肉製品を適宜希釈して用いた。

【0046】

4-2 結果

Pas 1 CN 2 および金コロイド標識 Pas 1 CN 1 の組合せによりカゼインナトリウムは加熱、非加熱に係わらず 50 ppb (食品中 2 ppm) まで検出することができた。この結果から、製造工程中に混入した未変性カゼインナトリウムが対象となっても、加熱後の製品が対象となっても、いかなる場合にでも対応できるイムノクロマトストリップの設計が可能となった。

30

【0047】

市販のアレルゲン検出用イムノクロマトストリップでは、ブランクとして 0.01 M の尿素のみを含む PBS を滴下したところ、非特異的なバンドが生じてしまい、擬陽性となってしまった。これでは、加熱などにより変性した食品たんぱく中から効率よくアレルゲンを抽出するためのたんぱく質変性剤を使用できず、アレルゲンとして検出できる対象が極めて狭い範囲に限られてしまう危険性が考えられた。

【産業上の利用可能性】

40

【0048】

本発明によると、食品等に含まれる乳アレルゲンについての免疫学的な検出方法において、乳アレルゲンが、変性/未変性のいかなる状態にあっても正確に定性かつ定量的に検出することができる。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Prima Meat Packers, Ltd.

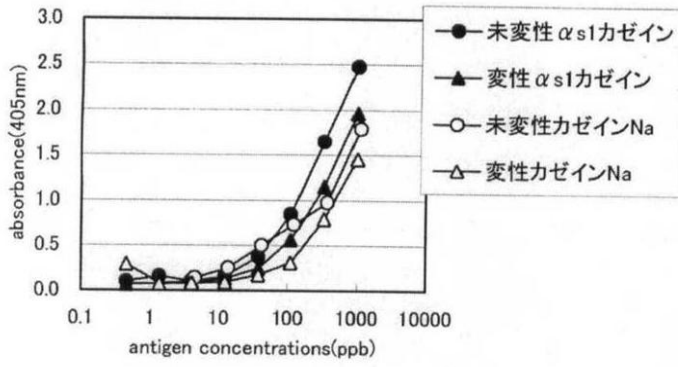
<120> Method for detecting allergen

<130> 2006P3340

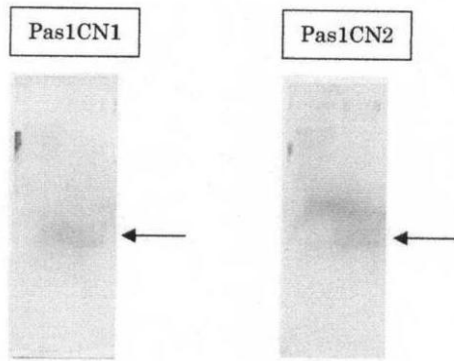
<150> 2004-63071

50

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 P 21/08

審査官 赤坂 祐樹

(56) 参考文献 特開 2 0 0 2 - 2 5 3 2 3 0 (J P , A)

特開 2 0 0 3 - 1 5 5 2 9 7 (J P , A)

食物アレルギー : 食物のアレルゲン性について, 千葉医学雑誌, 日本, 1 9 9 8 年 1 2 月 1 日, 74(6), 431-437

(58) 調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/53-33/543

C07K 16/16-16/18

CA/REGISTRY(STN)

专利名称(译)	检测牛奶过敏原的方法		
公开(公告)号	JP4427541B2	公开(公告)日	2010-03-10
申请号	JP2006510755	申请日	2005-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	普利玛食品株式会社		
申请(专利权)人(译)	プリマハム株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	プリマハム株式会社		
[标]发明人	秋元政信 加藤重城 浪岡真		
发明人	秋元 政信 加藤 重城 浪岡 真		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 G01N33/543 C07K16/16 C12P21/08 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/16 C07K16/18 G01N33/5308 G01N33/68 G01N2333/4731 Y10S530/85 Y10S530/868		
FI分类号	G01N33/53.Q C07K16/18.ZNA G01N33/543.545.H G01N33/543.521 C07K16/16 C12P21/08		
优先权	2004063071 2004-03-05 JP 2004285542 2004-09-29 JP 2004285543 2004-09-29 JP		
其他公开文献	JPWO2005085847A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

乳变应原，蛋白，小麦，荞麦，在含有花生变应原的食物，这些待使用的变应原，高灵敏度的免疫检测方法和检测试剂盒为此，甚至可以检测到修改的任何状态/未修饰的它旨在提供。天然的和变性牛奶过敏，天然的和变性蛋白过敏，天然的和变性小麦变应原，原生和荞麦过敏原修改，或者未改性和改性为每两个认识花生过敏原或更多使用单克隆抗体的变应原的检测方法中，酪蛋白Arufaesu1arufaesu1是αS1酪蛋白的主要蛋白质，β-乳球蛋白是乳清，卵清蛋白和卵类粘蛋白的主要蛋白，其是蛋清主要蛋白，麦醇溶蛋白是小麦的主要蛋白质，荞麦，或ARA H1的主要蛋白质分子量24kDa和76kDa的蛋白质，其是花生的主要蛋白质作为指标。

MA b名	N-αCN	D-αCN	N-CN	D-CN	クラス、サブクラス およびタイプ
Pas1CN1	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN2	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN3	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN4	+	-	+	-	IgG1 (κ)
Pas1CN5	+	-	+	-	IgG1 (κ)
Pas1CN6	+	-	+	-	IgG1 (κ)