

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5043077号  
(P5043077)

(45) 発行日 平成24年10月10日(2012.10.10)

(24) 登録日 平成24年7月20日(2012.7.20)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B
CO 7 K 16/16 (2006.01)	GO 1 N 33/553

請求項の数 15 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-191186 (P2009-191186)	(73) 特許権者	000113067
(22) 出願日	平成21年8月20日(2009.8.20)		プリマハム株式会社
(62) 分割の表示	特願2009-170621 (P2009-170621) の分割		東京都品川区東大井3丁目17番4号
原出願日	平成17年3月4日(2005.3.4)	(74) 代理人	100107984
(65) 公開番号	特開2009-271091 (P2009-271091A)		弁理士 廣田 雅紀
(43) 公開日	平成21年11月19日(2009.11.19)	(72) 発明者	秋元 政信
審査請求日	平成21年9月18日(2009.9.18)		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
(32) 優先日	平成16年3月5日(2004.3.5)		茨城県土浦市中向原635番地 プリマハム株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	浪岡 真
(31) 優先権主張番号	特願2004-285542 (P2004-285542)		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】 落花生アレルギーの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

未変性落花生 A r a h 1 タンパク質及び加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を共に認識する抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体と、  
未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体、又は、加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体との、  
2種類の抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体を用い、食品中の A r a h 1 を指標として分析することを特徴とする加熱又は未加熱の落花生アレルギーの検出方法。

10

【請求項2】

未変性落花生 A r a h 1 タンパク質及び加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を共に認識する抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体が、未変性 A r a h 1 タンパク質、未変性落花生粗タンパク質、尿素処理 A r a h 1 タンパク質及び尿素処理落花生粗タンパク質を認識し；  
未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体が、未変性 A r a h 1 タンパク質と未変性落花生粗タンパク質とを認識し、尿素処理 A r a h 1 タンパク質と尿素処理落花生粗タンパク質とを認識しない；  
加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を

20

認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が、尿素処理Ara h 1タンパク質と尿素処理落花生粗タンパク質とを認識し、未変性Ara h 1タンパク質と未変性落花生粗タンパク質とを認識しない；

ことを特徴とする請求項1記載の落花生アレルゲンの検出方法。

【請求項3】

未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を共に認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体をプレート抗体として、

未変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体、又は、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、未変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体をビオチン抗体として用いることを特徴とする請求項1

又は2記載の落花生アレルゲンの検出方法。

【請求項4】

未変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ(FERM

BP-10269)が産生する抗未変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1-1であり、未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を共に認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が、ハイブリド

ーマ(FERM BP-10270)が産生する抗未変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1-2であり、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、未

変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ(FERM BP-10271)が産生する抗加熱変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1-3であることを特徴とする請求項1~3の

いずれか記載の落花生アレルゲンの検出方法。

【請求項5】

サンドイッチELISAにより、未変性落花生Ara h 1タンパク質又は加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を、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のいずれか記載の落花生アレルゲンの検出方法。

【請求項6】

検体から、尿素と2-メルカプトエタノールを用いて加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を抽出することを特徴とする請求項1~5のいずれか記載の落花生アレルゲンの検出方法。

【請求項7】

未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を共に認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体と、

未変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体、又は、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、未変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体との、

2種類の抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体を備え、食品中のAra h 1を指標として分析することを特徴とする加熱又は未加熱の落花生アレルゲン検出用キット。

【請求項8】

未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を共に認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が、未変性Ara h 1タンパク質、未変性落花生粗タンパク質、尿素処理Ara h 1タンパク質及び尿素処理落花生粗タンパク質を認識し；

未変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が、未変性Ara h 1タンパク質と未変性落花生粗タンパク質とを認識し、尿素処理Ara h 1タンパク質と尿素処理

した落花生粗タンパク質とを認識し、尿素処理Ara h 1タンパク質と尿素処理した落花生粗タンパク質とを認識しないことを特徴とする請求項1~7のいずれか記載の落花生アレルゲンの検出方法。

未変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識しない抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が、未変性Ara h 1タンパク質と未変性落花生粗タンパク質とを認識し、尿素処理Ara h 1タンパク質と尿素処理

した落花生粗タンパク質とを認識し、尿素処理Ara h 1タンパク質と尿素処理した落花生粗タンパク質とを認識しないことを特徴とする請求項1~7のいずれか記載の落花生アレルゲンの検出方法。

10

20

30

40

50

落花生粗タンパク質とを認識しない；

加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体が、尿素処理 A r a h 1 タンパク質と尿素処理落花生粗タンパク質とを認識し、未変性 A r a h 1 タンパク質と未変性落花生粗タンパク質とを認識しない；

ことを特徴とする請求項 7 記載の落花生アレルギー検出用キット。

【請求項 9】

未変性落花生 A r a h 1 タンパク質及び加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を共に認識する抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体をプレート抗体として、

未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体、又は、加熱変性落花生 A r a

h 1 タンパク質を認識し、未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体をビオチン抗体として備えることを特徴とする請求項 7

又は 8 記載の落花生アレルギー検出用キット。

【請求項 10】

未変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ ( F E R M

B P - 1 0 2 6 9 ) が産生する抗未変性 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体 P A h 1 - 1 であり、未変性落花生 A r a h 1 タンパク質及び加熱変性落花生 A r a h 1

タンパク質を共に認識する抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体が、ハイブリド

ーマ ( F E R M B P - 1 0 2 7 0 ) が産生する抗未変性 A r a h 1 タンパク質モノク

ローナル抗体 P A h 1 - 2 であり、加熱変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識し、未

変性落花生 A r a h 1 タンパク質を認識しない抗 A r a h 1 タンパク質モノクローナル

抗体が、ハイブリドーマ ( F E R M B P - 1 0 2 7 1 ) が産生する抗加熱変性 A r a

h 1 タンパク質モノクローナル抗体 P A h 1 - 3 であることを特徴とする請求項 7 ~ 9 の

いずれか記載の落花生アレルギー検出用キット。

【請求項 11】

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、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であることを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれか記載の落花生アレルギー検出用キット。

【請求項 12】

検体からのタンパク質抽出剤としての、尿素と 2 -メルカプトエタノールが備えられていることを特徴とする請求項 7 ~ 11 のいずれか記載の落花生アレルギー検出用キット。

【請求項 13】

ハイブリドーマ ( F E R M B P - 1 0 2 6 9 ) が産生する抗未変性 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体 P A h 1 - 1。

【請求項 14】

ハイブリドーマ ( F E R M B P - 1 0 2 7 0 ) が産生する抗未変性 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体 P A h 1 - 2。

【請求項 15】

ハイブリドーマ ( F E R M B P - 1 0 2 7 1 ) が産生する抗加熱変性 A r a h 1 タンパク質モノクローナル抗体 P A h 1 - 3。

【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落花生アレルギーを指標としたアレルギーの検出方法や、それに用いられる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落花生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、落花生の主要タンパク質である A r a

10

20

30

40

50

h 1 を指標とした落花生アレルゲンの検出方法や、それに用いられる落花生アレルゲンの検出用キットに関する。

【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、食物アレルゲンという）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、特に乳アレルゲンの主要成分としてのs1カゼインや、ホエーアレルゲンの主要成分であるラクトグロブリンや、卵白アレルゲン成分としてはオボアルブミンとオボムコイドや、小麦アレルゲン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24kDaと76kDaのタンパク質や、落花生の主要タンパク質であるArah1が知られている。

10

20

【0004】

従来、アレルゲンを検出する方法としては、例えば、アレルゲン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、該検体中のアレルゲン特異的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、特異的にアレルゲン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、小麦アレルゲン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、小麦アレルゲンを検出するためには、どのような状態のアレルゲン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。

30

40

【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-

50

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)。

【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、落花生アレルギーを含む食品において、落花生アレルギーが、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、特定原材料である落花生アレルギーを検出する方法について鋭意検討し、未変性及び変性の落花生アレルギーを認識する2種類又はそれ以上のモノクローナル抗体を用いると、これら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落花生の検出方法の検討を行うに当たっては、精製した未変性のAra h 1(以下「NAh 1」という場合がある)、又は精製したAra h 1を尿素と2-メルカプトエタノールを用いて変性したAra h 1(以下「DAh 1」という場合がある)に対するモノクローナル抗体を作出し、その中からNAh 1、DAh 1、未変性の落花生粗タンパク質(以下「NP-e」という場合がある)、及び/又は尿素処理した落花生粗タンパク質(以下「DP-e」という場合がある)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、未加熱(未変性)、加熱(変性)のいかなる状態の落花生タンパク質でも、高感度で分析できるMAbの組み合わせを見出した。また、これらのMAbを用いると、食品中の落花生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落花生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(落花生アレルギー)のPAh 1-1およびPAh 1-2のサンドイッチELISAによる各種落花生粗タンパク質に対する反応性を示す図である。

【図2】本発明(落花生アレルギー)のPAh 1-2およびPAh 1-3のサンドイッチELISAによる各種落花生粗タンパク質に対する反応性を示す図である。

【図3】本発明(落花生アレルギー)のPAh 1-1、PAh 1-2及びPAh 1-3のMAb混合系サンドイッチELISAによる未変性落花生粗タンパク質に対する反応性を示す図である。

【図4】本発明(落花生アレルギー)のPAh 1-1、PAh 1-2及びPAh 1-3のMAb混合系サンドイッチELISAによる変性落花生粗タンパク質に対する反応性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の落花生アレルギーの検出方法としては、未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体を用いる落花生アレルギーの免疫学的な検出方法や、未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種以上の抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体を併用する落花生アレルギーの免疫学的な検出方法であれば特に制限されず、また、本発明の落花生アレルギー

10

20

30

40

50

ゲン検出用キットとしては、未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識する抗落花生Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体を備えた免疫学的なアレルギー検出用キットや、未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種以上の抗落花生Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体を備えた免疫学的なアレルギー検出用キットであれば特に制限されず、抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体としては、未変性Ara h 1タンパク質と未変性落花生粗タンパク質、及び/又は、尿素処理Ara h 1タンパク質と尿素処理落花生粗タンパク質を認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体が好ましく、具体的には、ハイブリドーマ(FERM BP - 10269)が産生する抗未変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1 - 1、ハイブリドーマ(FERM BP - 10270)が産生する抗未変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1 - 2、ハイブリドーマ(FERM BP - 10271)が産生する抗加熱変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1 - 3等を好適に例示することができる。また、PAh1 - 1等の未変性Ara h 1タンパク質と未変性落花生粗タンパク質を認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体と、PAh1 - 2等の未変性/変性Ara h 1タンパク質と未変性/変性落花生粗タンパク質を認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体との組合せや、PAh1 - 2とPAh1 - 3等の未変性/変性Ara h 1タンパク質と未変性/変性落花生粗タンパク質を認識する抗Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体同士の組み合わせ、中でも、これらのモノクローナル抗体の混合系として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、サンドイッチELISAにより、未変性落花生Ara h 1タンパク質及び加熱変性落花生Ara h 1タンパク質を、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。

10

20

#### 【0012】

さらに、本発明の落花生アレルギーの検出方法においては、検体から、尿素と2-メルカプトエタノールを用いて加熱変性落花生粗タンパク質を抽出することが好ましく、また、本発明の落花生アレルギー検出用キットとしては、検体からの加熱変性落花生粗タンパク質抽出剤としての、尿素と2-メルカプトエタノールが備えられているものが好ましい。

30

#### 【0013】

以上の本発明の免疫学的なアレルギーの検出方法は、未変性及び変性の落花生アレルギー(以下「食物アレルギー」ということがある)を含む試料を、標識化した抗落花生Ara h 1タンパク質MAbと接触させ、あるいは標識化した抗体の存在下に食物アレルギーMAb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。

#### 【0014】

不溶性担体に結合した本発明の抗落花生Ara h 1タンパク質MAbに試料中の食物アレルギーを捕捉させた後に標識化抗IgG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落花生Ara h 1タンパク質MAbと異なるエピトープを認識する標識抗落花生Ara h 1タンパク質MAb(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落花生Ara h 1タンパク質MAbに試料中の落花生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、落花生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落花生Ara h 1タンパク質MAbを作用させた後、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、落花生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落花生Ara h 1タンパク質MAb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落花生Ara h 1タン

40

50

パク質 M A b と落花生アレルゲンであるタンパク質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、落花生アレルゲンと結合する抗落花生 A r a h 1 タンパク質 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その他、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、抗落花生 A r a h 1 タンパク質 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ゲン及び/又は変性アレルゲンが 1 0 0 ~ 1 0 0 0 p p b 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ゲンを抽出する場合、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。

10

## 【 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。

20

## 【 0 0 1 6 】

本発明の落花生アレルゲンの検出方法や落花生アレルゲン検出用キットに用いられる抗落花生 A r a h 1 タンパク質 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、抗落花生 A r a h 1 タンパク質 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 ' )<sub>2</sub>、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、抗落花生 A r a h 1 タンパク質 M A b は、未変性又は変性の落花生 A r a h 1 タンパク質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。

30

## 【 0 0 1 7 】

抗落花生 A r a h 1 タンパク質 M A b 産生ハイブリドーマは、例えば、未変性及び/又は変性の落花生アレルゲンを用いて 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ーニングすることにより、抗落花生 A r a h 1 タンパク質 M A b 産生ハイブリドーマ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/若しくは変性の落花生アレルゲン又はこれを含有する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/又は変性の落花生アレルゲ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 ケ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。

40

## 【 0 0 1 8 】

細胞融合は、例えばダルベッコ改変イーグル培地 ( D M E M ) 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、D M E M 等で適当に希釈し、遠心分離し、

50

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マを選択し、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マを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、抗落花生Ara h 1タンパク質MAbを産生するハイブリドーマを得ることができる。また、落花生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、有利に抗変性落花生アレルゲンMAbを得ることができる場合もある。この場合、抗変性落花生Ara h 1タンパク質MAb等の抗変性食物アレルゲンMAb産生ハイブリドーマ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で未変性の落花生アレルゲンに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択し、この抗体産生ハイブリドーマ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落花生Ara h 1タンパク質に対してのみ特異的に反応する抗食物アレルゲンMAb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マ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うことができる。

10

## 【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、 $\alpha$ -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、フィコビリタンパク、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 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 若しくは $^{131}\text{I}$ 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、発光剤等が用いられることができる。

20

30

## 【0020】

本発明の食物アレルゲン検出用キットには、有効成分としての抗落花生Ara h 1タンパク質MAb、好ましくはそれぞれ異なるエピトープを認識する2以上の抗落花生Ara h 1タンパク質MAb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落花生Ara h 1タンパク質MAbを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。

40

## 【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-10269)が産生する抗未変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1-1や、ハイブリドーマ(FERM BP-10270)が産生する抗未変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1-2や、ハイブリドーマ(FERM BP-10271)が産生する抗加熱変性Ara h 1タンパク質モノクローナル抗体PAh1-3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(〒305-8566 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。

50

## 【 0 0 2 2 】

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 】

## 【 0 0 2 3 】

## 1 . 抗 A r a h 1 M A b の 確 立

## 1 - 1 材 料 及 び 方 法

## 1 ) A r a h 1 タ ン パ ク 質 の 調 製

市販生落花生に5倍量の20mM bis-tris-propanebuffer (pH 7.2)を加え、室温で2時間攪拌後3000×gで遠心分離を行い沈殿および油分を除去した。得られた水溶性画分を再度10000×gで遠心分離を行い上清を得た。上清をさらにSource Q (アマシャム ファルマシア)を用いて、20mMのbis-tris-propane buffer (pH 7.2)、NaClのリニアグラジエント(0~1M)により精製を行った。精製したArah1画分を蒸留水による透析後、凍結乾燥を行い、未変性Arah1(以下NAh1と記す)とした。また、変性Arah1(以下DAh1と記す)はNAh1を10mg量り、尿素6g、2-メルカプトエタノール(以下2-MEと記す)0.2ml、50mMのTris-HCl緩衝液(pH 8.6)1ml、蒸留水1.5mlを加え、アルミフイルで蓋をした後、100℃で1時間オイルバスで加熱、変性処理を行った。その後透析し、凍結乾燥を行った。これらの凍結乾燥を用い、生理食塩水で0.1%のDAh1溶液及び0.1%のDAh1溶液それぞれを作製し、1ml容エッペンドルフチューブに500µlずつ分注して抗原溶液とし、免疫に供するまで-20℃で凍結保管した。

## 【 0 0 2 4 】

## 2 ) 免 疫

供試動物として、5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NAh1溶液及び0.1%のDAh1溶液がそれぞれ500µl入ったエッペンドルフチューブに等量ずつ加え、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、2週間の間隔で3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NAh1溶液及び0.1%のDAh1溶液がそれぞれ500µl入ったエッペンドルフチューブに等量ずつ加え、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。

## 【 0 0 2 5 】

## 3 ) 血 中 抗 体 価 の 測 定

初回あるいは追加免疫でNAh1溶液又はDAh1溶液を注射した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NAh1抗体価及び抗DAh1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。

## 【 0 0 2 6 】

## 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%のNAh1溶液又は0.1%のDAh1溶液それぞれ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、RPMI1640で洗浄して、滅菌ナイロンメッシュ(Cell Strainer, 70µm, 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RPMI1640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

10

20

30

40

50

離を行い、ペレットを得た。このペレットに平均分子量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、40mMの2-メルカプトエタノール、100U/mlのペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地)に100 $\mu$ Mのヒポキサンチン、0.4 $\mu$ Mのアミノプテリン、16 $\mu$ Mのチミジンを含むHAT選択培地を加え、5 $\times$ 10<sup>6</sup> 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%CO<sub>2</sub>下37 $^{\circ}$ C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NAh1抗体又はDAh1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NAh1又はDAh1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 $\times$ 10<sup>6</sup> 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、40mMの2-メルカプトエタノール、100U/mlのペニシリン、100g/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、NAh1、DAh1、あるいは落花生粗タンパク質の未変性物(以下NP-eと記す)、尿素処理(以下DP-eと記す)の4種類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。なお、NP-eは落花生に5倍量の20mMbis-tris-propanebuffer(pH7.2)を加え、室温で2時間攪拌後遠心分離を2回行い得られた上清を透析した後、凍結乾燥したものとした。また、DP-eはNP-eを10mg量り、尿素6g、2-ME0.2ml、50mMのTris-HCl緩衝液(pH8.6)1ml、蒸留水1.5mlを加え、アルミフオイルで蓋をした後、100 $^{\circ}$ Cで1時間オイルバスで加熱、変性処理を行ったものとした。培養上清のNAh1、NP-e、DAh1あるいはDP-e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MAb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0.2ml腹腔内に注射した。1週間後、一尾当たり5 $\times$ 10<sup>6</sup> 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) MAbの特性とMAbのクラス、サブクラス及びタイプ

抗NAh1MAb又は抗DAh1MAbの特性を決定するために、固相法を用いた。固相法として、NAh1、DAh1、NP-e又はDP-eをあらかじめ細胞培養用プレートのウェル内に固定し、この固定化された抗原に抗NAh1MAb又はDAh1MAbを作用させる方法を用いた。また、MAbのクラス及びサブクラスについては、Monoclonal mouse immunoglobulin isotypingkit(Pharmingen)により、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL( )及びIgL( )を決定した。

【0031】

#### 9) MAbのビオチン化

精製したMAb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。50mMの炭酸緩衝液(pH8.5)を用いて20mg/mlとなるよう調製し、DMSOに3mg/100 $\mu$ lで溶解したNHS-ビオチン溶液を10 $\mu$ l加

10

20

30

40

50

え、攪拌後、氷冷しながら2時間静置した。その後、20mg/mlとなるようにPBSで置換した。

【0032】

1-2 結果

1) 抗NAh1MAbとDAh1MAbの特性とクラス、サブクラス

NAh1に対する特異性を持つMAb7種類、及び、DAh1に対する特異性を持つMAb3種類を得た。それぞれ固相の抗原に対する特異性を表1及び表2に示した。

【0033】

【表1】

MAb名	NAh1	DAh1	NP-e	DP-e	クラス、サブクラスおよびタイプ
203	+*	-	+	-	IgG1(κ)
217(PAh1-1)	+	-	+	-	IgG1(κ)
223	+	-	+	-	IgG1(κ)
236(PAh1-2)	+	+	+	+	IgG1(κ)
427	+	-	+	-	IgG1(κ)
432	+	+	+	+	IgG1(κ)
451	+	+	+	+	IgG1(κ)

10

20

【0034】

【表2】

MAb名	NAh1	DAh1	NP-e	DP-e	クラス、サブクラスおよびタイプ
967	-*	+	-	+	IgG1(κ)
970	-	+	-	+	IgG3(κ)
971(PAh1-3)	-	+	-	+	IgG1(κ)

30

【0035】

2) 組合せ条件

固相の抗原に対し陽性反応を示した各MAbをそれぞれ固相あるいはビオチン化抗体として、NP-eおよびDP-eを検出するためのMAbの組合せを、サンドイッチELISAにおける検出感度の点から選出した。その結果、NP-eを検出できる組合せとして、プレート抗体にPAh1-2(FERM BP-10270)とビオチン抗体にPAh1-1(FERM BP-10269)、また、DP-eを検出できる組合せとしてプレート抗体にPAh1-2とビオチン抗体にPAh1-3(FERM BP-10271)の組合せを選択した(図1と図2)。

40

【0036】

3) MAb混合系でのNP-e、DP-eの検出

固相にPAh1-2、ビオチン化にPAh1-1およびPAh1-3を混合し、NP-e、DP-eの検出感度を確認した。それぞれのMAb濃度は50μg/mlに設定した。その結果、MAb混合系でNP-e、DP-eともに検出することが可能であった(図3と図4)。

【0037】

50

## 2. サンドイッチ E L I S A による食品中の落花生粗タンパク質の検出

上記 1. で選択された P A h 1 - 1、P A h 1 - 2 および P A h 1 - 3 の組合せにより、実際の食品中の落花生粗タンパク質を検出できるかを試みた。

【0038】

## 2-1 材料及び方法

## 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 3 に示す配合にて各濃度の落花生粗タンパク質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、5 mm で挽肉にしたものを使用した。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。

【0039】

【表 3】

原材料	TEST1	TEST2	TEST3	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
落花生粗タンパク質 (ppm)	200	20	2	0
合計 (%)	99.762	99.744	99.7422	99.742

【0040】

## 2) サンドイッチ E L I S A による定量分析

## (モデル塩漬肉)

各モデル塩漬肉を、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 1 g を量り取り、P B S T 19 g を加えホモジナイザーにて 30 秒攪拌した。3000 rpm × 20 分の遠心分離を行い、上清をろ紙でろ過したものを 0.5 ml 測り取り、P B S T を 9.5 ml 加え、E L I S A 用サンプルとした。検量線には同様に P B S T に溶解した落花生粗タンパク質の段階希釈を用いた。

## (モデル加熱製品)

各モデル加熱製品を、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 1 g を量り取り、1 M 尿素および 0.1% 2-ME を含む P B S T 19 g を加えホモジナイザーにて 30 秒攪拌した。その後、100 で 1 時間加熱処理を行った。冷却後 3000 rpm × 20 分の遠心分離を行い、上清をろ紙でろ過したものを 0.5 ml 測り取り P B S T を 9.5 ml 加え、E L I S A 用サンプルとした。検量線には同様に 1 M 尿素および 0.1% 2-ME 処理を行った落花生粗タンパク質の段階希釈を用いた。また、分析用サンプルから P B S T を用いて抽出し、P B S T に溶解した落花生粗タンパク質を検量線とした尿素および 2-ME を用いない場合との比較を行った。

【0041】

## 2-2 結果

10

20

30

40

50

サンドイッチE L I S Aによるモデル食肉製品中の落花生粗タンパク質の分析について、モデル塩漬肉の結果を表4に、モデル加熱製品の結果を表5に、また、P B S Tのみで抽出した結果を表6に示す。

【0042】

【表4】

	TEST1	TEST2	TEST3	Control
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析値 (ppm)	206.0	18.4	1.8	N.D. *2
回収率 (%) * 1	103.0	92.0	90.0	-

10

\* 1 : (分析値 / 添加量) × 100

\* 2 : 検出せず

【0043】

【表5】

	TEST1	TEST2	TEST3	Control
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析値 (ppm)	137.0	19.5	10.3	N.D. *2
回収率 (%) * 1	68.5	97.5	515.0	-

20

\* 1 : (分析値 / 添加量) × 100

\* 2 : 検出せず

【0044】

【表6】

	TEST1	TEST2	TEST3	Control
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析値 (ppm)	N.D. *2	N.D.	N.D.	N.D.
回収率 (%) * 1	-	-	-	-

30

【0045】

以上の結果から、モデル塩漬肉のように未加熱の落花生粗タンパク質でも、モデル加熱製品のような加熱変性した落花生粗タンパク質でも、高い回収率で落花生粗タンパク質を検出可能であった。これらのことから、未変性タンパク質に結合可能なMAbと変性タンパク質に結合可能なMAbを組み合わせることにより、未加熱（未変性）、加熱（変性）のいかなる状態の落花生タンパク質でも、高感度で分析できることがわかった。また、食品中からの落花生粗タンパク質の抽出には尿素および2-MEを用いることが有効であり、尿素で変性させたAh1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。

40

【0046】

3. イムノクロマトによる未変性および変性落花生粗タンパク質の検出

3-1 材料及び方法

1) 金コロイド標識及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 PAh1-1 と PAh

50

1 - 3 の M A b 溶液を調製した。あらかじめ 0 . 2 M 炭酸カリウム溶液で p H 9 . 0 に調製した金コロイド溶液（シグマ社製）5 m l に M A b 溶液を 5 0 0 m l 加え、室温で 3 0 分間反応した後、1 0 % B S A 溶液 6 2 5  $\mu$  l を加え、さらに 1 5 分間反応させた。遠心分離を行い、1 % B S A 溶液で O D 5 2 5 = 2 . 0 になるよう調製し、1 : 1 の割合で混合した。ガラスウール製コンジュゲートパッドに 6 8  $\mu$  l / c m <sup>2</sup> となるよう塗布し、乾燥させた。

【 0 0 4 7 】

### 2 ) 抗体固定化メンブレンの作製

P B S で 4 m g / m l となるよう P A h 1 - 2 の M A b 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 % スキムミルクを含む 1 0 m M リン酸バッファ（p H 7 . 5 ）で 3 7  $^{\circ}$  C 、1 時間ブロッキング後、1 0 m M リン酸バッファ（p H 7 . 5 ）で洗浄し乾燥させた。

10

【 0 0 4 8 】

### 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。非検液としては、上記 2 . で調製したモデル食肉製品を適宜希釈して用いた。

【 0 0 4 9 】

### 3 - 2 結果

メンブレン塗布 M A b P A h 1 - 2 、および金コロイド標識 M A b P A h 1 - 1 と P A h 1 - 3 の組合せにより、落花生粗タンパク質は加熱、非加熱に係わらず 5 0 p p b （食品中 2 p p m ）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落花生タンパク質が対象となっても、加熱後の製品が対象となっても、いかなる場合に対処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。

20

【 0 0 5 0 】

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 . 0 1 M 尿素、0 . 2 % 2 - M E を含む P B S 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タンパク中から効率よくアレルゲンを抽出するためのタンパク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。

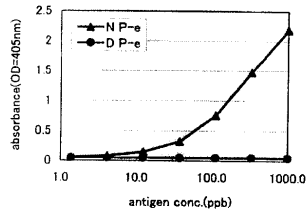
30

【産業上の利用可能性】

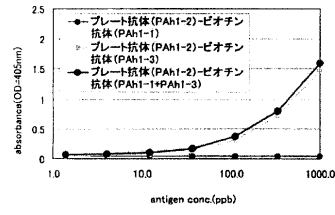
【 0 0 5 1 】

本発明によると、食品等に含まれる落花生アレルゲンについての免疫学的な検出方法において、これらアレルゲンが、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。

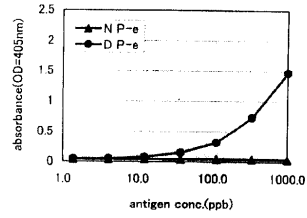
【 図 1 】



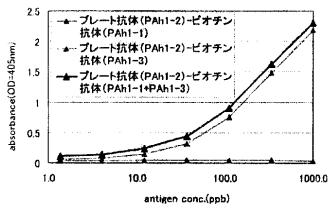
【 図 4 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/02 (2006.01) G 0 1 N 33/543 5 4 1 Z  
C 0 7 K 16/16 Z N A  
C 1 2 N 15/00 C

(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)

微生物の受託番号 FERM BP-10269  
微生物の受託番号 FERM BP-10270  
微生物の受託番号 FERM BP-10271

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開2003-155297(JP,A)  
特開2003-294738(JP,A)  
特開2000-065820(JP,A)  
特開2002-253250(JP,A)  
特開平3-282260(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 3 3 / 5 7 7

专利名称(译)	检测花生过敏原的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5043077B2</a>	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	JP2009191186	申请日	2009-08-20
[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 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/553 C07K16/16 C12N15/02 C07K16/18 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 G01N33/543.545.A G01N33/543.521 G01N33/577.B G01N33/553 G01N33/543.541.Z C07K16/16.ZNA C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA47 4B024/GA03 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AC14 4B065/BA06 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/FA72		
优先权	2004063071 2004-03-05 JP 2004285542 2004-09-29 JP 2004285543 2004-09-29 JP		
其他公开文献	JP2009271091A JP2009271091A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

需要解决的问题：提供一种高度敏感的免疫检测方法，可以在任何状态下检测食品中含有的过敏原（例如，牛奶过敏原，蛋清过敏原，小麦过敏原，荞麦过敏原或花生过敏原）（即，变性或未变性），并提供其中使用的检测试剂盒。Z SOLUTION：检测过敏原的方法使用两种或多种能够识别未变性和变性状态的牛奶过敏原的单克隆抗体，未变性和变性状态的蛋清过敏原，未变性和变性状态的小麦过敏原，未变性的荞麦过敏原在未变性和变性状态下变性状态或花生过敏原，其中使用as1as1酪蛋白作为as1酪蛋白中的主要蛋白质，β-乳球蛋白是乳清蛋白，卵清蛋白和卵类粘蛋白中的主要蛋白质。是蛋清中的主要蛋白质，麦醇溶蛋白是小麦中的主要蛋白质，分子量为24 kDa和76 kDa的蛋白质是荞麦中的主要蛋白质，或Ara h1是花生中的主要蛋白质。Z

MAb名	NAh l	DAh l	NP- e	DP- e	クラス、サブクラス およびタイプ
203	+*	-	+	-	IgG1 (κ)
217 (PA h1-1)	+	-	+	-	IgG1 (κ)
223	+	-	+	-	IgG1 (κ)
236 (PA h1-2)	+	+	+	+	IgG1 (κ)
427	+	-	+	-	IgG1 (κ)
432	+	+	+	+	IgG1 (κ)
451	+	+	+	+	IgG1 (κ)