

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5283228号
(P5283228)

(45) 発行日 平成25年9月4日(2013.9.4)

(24) 登録日 平成25年6月7日(2013.6.7)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Q
CO 7 K 16/02	(2006.01)	CO 7 K 16/02	Z N A
CO 7 K 16/04	(2006.01)	CO 7 K 16/04	
CO 7 K 16/16	(2006.01)	CO 7 K 16/16	
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z

請求項の数 10 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2009-170621 (P2009-170621)
 (22) 出願日 平成21年7月21日(2009.7.21)
 (62) 分割の表示 特願2006-510755 (P2006-510755)
 の分割
 原出願日 平成17年3月4日(2005.3.4)
 (65) 公開番号 特開2009-244276 (P2009-244276A)
 (43) 公開日 平成21年10月22日(2009.10.22)
 審査請求日 平成21年8月20日(2009.8.20)
 (31) 優先権主張番号 特願2004-63071 (P2004-63071)
 (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)
 (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)

(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
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (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
 (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
 (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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵白アレルゲンの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

未変性オボアルブミンを認識し、変性オボアルブミン、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識しない、かつ、それぞれ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組合せを用いて、未変性オボアルブミンを指標として分析するか、又は、

変性オボアルブミン、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識し、液相未変性オボアルブミンを認識しない、かつ、それぞれ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組合せを用いて、変性オボアルブミンを指標として分析することを特徴とする卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項2】

未変性オボアルブミンを認識し、変性オボアルブミン、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識しない、かつ、それぞれ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が、ハイブリドーマ(FERM BP-10265)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA1、及びハイブリドーマ(FERM BP-10266)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA2であり、並びに、変性オボアルブミン、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識し、液相未変性オボアルブミンを認識しない、かつ、それぞれ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が、ハイブリドーマ(FERM BP-10275)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA1、及

びハイブリドーマ（FERM BP - 10276）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA2であることを特徴とする、請求項1記載の卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項3】

サンドイッチELISAにより、食品中の未変性オボアルブミン又は変性オボアルブミンを、1.0～10.0ppb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又は2のいずれか記載の卵白アレルゲンの検出方法。

【請求項4】

未変性オボアルブミンを認識し、変性オボアルブミン、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識しない、かつ、それぞれ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組合せを備え、未変性オボアルブミンを指標として分析するため、又は、

変性オボアルブミン、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識し、液相未変性オボアルブミンを認識しない、かつ、それぞれ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組合せを備え、変性オボアルブミンを指標として分析するための卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項5】

未変性オボアルブミンを認識し、変性オボアルブミン、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識しない、かつそれぞれ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が、ハイブリドーマ（FERM BP - 10265）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA1、及びハイブリドーマ（FERM BP - 10266）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA2であり、並びに、変性オボアルブミンを認識し、還元カルボキシメチル化オボアルブミン、及び尿素変性オボアルブミンを認識し、液相未変性オボアルブミンを認識しない、かつそれぞれ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が、ハイブリドーマ（FERM BP - 10275）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA1、及びハイブリドーマ（FERM BP - 10276）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA2であることを特徴とする、請求項4記載の卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項6】

それぞれ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4又は5記載の卵白アレルゲン検出用キット。

【請求項7】

ハイブリドーマ（FERM BP - 10265）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA1。

【請求項8】

ハイブリドーマ（FERM BP - 10266）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA2。

【請求項9】

ハイブリドーマ（FERM BP - 10275）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA1。

【請求項10】

ハイブリドーマ（FERM BP - 10276）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA2。

【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卵白アレルゲンを指標としたアレルゲンの検出方法や、それに用いられるアレルゲンの検出用キットに関する。

10

20

30

40

50

【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オボアルブミンを定性的かつ定量的に高感度で分析することができる、オボアルブミンを指標とした卵白アレルギーの検出方法や、それに用いられる卵白アレルギー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、それを含まる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s1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。

【0004】

従来、アレルギーを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。

【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

10

20

30

40

50

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）。

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、卵白アレルギーを含む食品において、卵白アレルギーが、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、特定原材料である卵白アレルギーを検出する方法について鋭意検討し、未変性及び変性の卵白アレルギーを認識する各2種類又はそれ以上のモノクローナル抗体を用いると、特定原材料の卵白アレルギーを検出することができることを見出した。

20

【0009】

特定原材料の一つである卵白の検出方法の検討を行うに当たっては、精製オボアルブミンに対するモノクローナル抗体を作出し、その中から未変性抗原に結合できるMAbと、変性抗原に結合できるMAbとをそれぞれ複数選択し、未変性抗原結合MAb群と変性抗原結合MAb群を組み合わせることで、抗原となるオボアルブミンが変性/未変性のいかなる状態にあっても高感度で検出できることを見出し、特に未変性抗原結合MAb群と変性抗原結合MAb群を組み合わせる場合、未変性オボアルブミンあるいは変性オボアルブミンのみが存在する場合であっても、未変性抗原結合MAb（群）単独使用や変性抗原結合MAb（群）単独使用におけるよりも優れた検出感度で検出しうることを確認した。また、卵白アレルギーであるオボアルブミンに対するMAbを組み合わせることにより、食品中の卵白がいかなる加工工程を経た場合にでも、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卵白アレルギーを検出しうることを確認した。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明（卵白アレルギー）の試験1における各希釈段に対する抗オボアルブミンMAbの反応性を示す図である。

【図2】本発明（卵白アレルギー）の試験2における各希釈段に対する抗オボアルブミンMAbの反応性を示す図である。

【図3】本発明（卵白アレルギー）の試験3における各希釈段に対する抗オボアルブミンMAbの反応性を示す図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の卵白アレルギーの検出方法としては、還元カルボキシメチル化オボアルブミンを認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する2種の抗オボアルブミンモノクローナル抗体を用いることを特徴とする卵白アレルギーの検出方法であれば特に制限されず、さらに、未変性オボアルブミンを認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する2種の抗オボアルブミンモノクローナル抗体を用いることが好ましい。また、本発明の卵白アレルギー検出用キットとしては、還元カルボキシメチル化オボアルブミンを認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する2種の抗オボアルブミンモノクローナル抗体

50

を備えたことを特徴とする免疫学的なアレルゲン検出用キットであれば特に制限されず、さらに、未変性オボアルブミンを認識し、かつ、それぞれ異なるエピトープを認識する2種の抗オボアルブミンモノクローナル抗体を備えたものが好ましい。ここで「卵白アレルゲン」とは、卵白の主要タンパク質であるオボアルブミンを含むものをいう。

【0012】

上記未変性オボアルブミンを認識する抗オボアルブミンモノクローナル抗体として、具体的には、ハイブリドーマ(FERM BP - 10265)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA1や、ハイブリドーマ(FERM BP - 10266)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA2を挙げることができ、また、上記還元カルボキシメチル化オボアルブミンを認識する抗オボアルブミンモノクローナル抗体として、具体的には、ハイブリドーマ(FERM BP - 10275)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA1、ハイブリドーマ(FERM BP - 10276)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA2等を好適に例示することができる。また、PNOA1とPNOA2等の抗未変性オボアルブミンモノクローナル抗体や、PDOA1とPDOA2等の抗変性オボアルブミンモノクローナル抗体の組み合わせ、特にPNOA1とPNOA2等の抗未変性オボアルブミンモノクローナル抗体とPDOA1とPDOA2等の抗変性オボアルブミンモノクローナル抗体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、食品中の未変性オボアルブミン及び/又は変性オボアルブミンを、1.0~10.0ppb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】

本発明の卵白アレルゲンの検出方法においては、尿素と2-メルカプトエタノールを用いてオボアルブミンを抽出することが好ましく、また、未変性オボアルブミンを認識する2種類のモノクローナル抗体及び変性オボアルブミンを認識する2種類のモノクローナル抗体を用いることが好ましい。また、本発明の卵白アレルゲン検出用キットにおいては、オボアルブミンを抽出するための尿素と2-メルカプトエタノールを含むものが好ましく、また、未変性オボアルブミンを認識する2種類のモノクローナル抗体及び変性オボアルブミンを認識する2種類のモノクローナル抗体を備えるものが好ましい。

【0014】

以上の本発明の免疫学的なアレルゲンの検出方法は、未変性及び変性の卵白アレルゲン(以下「食物アレルゲン」ということがある)を含む試料を、標識化した抗オボアルブミンMAbと接触させ、あるいは標識化した抗体の存在下にオボアルブミン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。

【0015】

不溶性担体に結合した本発明の抗オボアルブミンMAbに試料中の食物アレルゲン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オボアルブミンMAbと異なるエピトープを認識する標識抗オボアルブミン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オボアルブミンMAbに試料中の卵白アレルゲンを標識化抗原の存在下で反応させる競合法や、卵白アレルゲン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オボアルブミン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、卵白アレルゲンを含有する試料にこれらと特異的に反応する標識抗オボアルブミン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オボアルブミンMAbと食物アレルゲンであるオボアルブミ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、オボアルブミンと結合する抗オボアルブミンMAb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、抗オボアルブミン 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ゲン及び/又は変性アレルゲンが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。

【0016】

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。

【0017】

本発明の卵白アレルゲンの検出方法や卵白アレルゲン検出用キットに用いられる抗オボアルブミン 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、抗オボアルブミン 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、抗オボアルブミン M A bは、未変性又は変性のオボアルブミン等で免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローマ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。

【0018】

抗オボアルブミン M A b産生ハイブリドーマは、例えば、未変性及び/又は変性のオボアルブミンを用いて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マ細胞とを、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、抗オボアルブミン 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/若しくは変性のオボアルブミ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/又は変性のオボアルブミ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。ミエローマ細胞としては、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マ細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0019】

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マ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、沈殿をH A T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、抗オボアルブミン M A bを産生するハイブリドーマを得ることができる。また、オボアルブミン等の未変性の食物アレルゲンのみを用いて免疫

10

20

30

40

50

した抗免疫動物から、有利に抗変性オボアルブミンM A bを得ることができる場合もある。この場合、抗変性オボアルブミンM A b等の抗変性食物アレルギーM A b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E L I S Aで未変性のオボアルブミン等の未変性の食物アレルギー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オボアルブミンに対してのみ特異的に反応する抗オボアルブミン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、I g G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。

【0020】

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 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}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。

【0021】

本発明の食物アレルギー検出用キットには、有効成分としての抗オボアルブミンM A b、好ましくはそれぞれ異なるエピトープを認識する2以上の抗オボアルブミン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オボアルブミンM A b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ギー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。

【0022】

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-10265)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA1や、ハイブリドーマ(FERM BP-10266)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PNOA2や、ハイブリドーマ(FERM BP-10275)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA1や、ハイブリドーマ(FERM BP-10276)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA2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。

【0023】

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】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

1 . 変性 / 未変性オボアルブミンに結合可能な M A b の確立

1 - 1 材料及び方法

1) ニワトリオボアルブミン (以下「 O A 」ということがある) の調製

新鮮なニワトリ卵より卵白のみを採取し、泡立てないように均質化後、等量の飽和硫酸アンモニウムを加え、濾紙 No . 1 (アドバンテック東洋) で濾過した。そして、得られたる液に 0 . 5 M の硫酸を添加し p H 4 . 6 に調整後、一晚放置した。8 , 0 0 0 r p m × 2 0 分の遠心分離により得られた沈殿を蒸留水に溶解し、同じ方法で再結晶化し、粗 O A 画分を得た。粗 O A はさらに、TSK gel DEAE 650S (Tosoh) を用いたイオン交換クロマトグラフィにより精製した。移動相には 5 0 m M イミダゾール - 塩酸緩衝液 (p H 6 . 4) を使い、N a C l の 0 から 0 . 3 M のリニアグラジェントにより O A を分画し、透析による脱塩後、凍結乾燥を行った。この凍結乾燥 O A を使い、生理食塩水で 0 . 1 % の O A 溶液を作製し、1 m l 容エッペンドルフチューブに 5 0 0 μ l ずつ分注して抗原溶液とし、免疫に供するまで - 2 0 で凍結保管した。

10

【 0 0 2 5 】

2) 免疫

供試動物として、6 週齢の B A L B / c マウス (日本クレア株式会社製) 4 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 O A が 5 0 0 μ l 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 1 5 0 μ l 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 O A が 5 0 0 μ l 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 1 5 0 μ l 腹腔内に注射した。なお、抗変性 O A M A b を得る場合、最終免疫のみに後述する還元カルボキシメチル化 O A を用いた。

20

【 0 0 2 6 】

3) 血中抗体価の測定

初回あるいは追加免疫で O A を注射した 1 週間後に、各 B A L B / 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 1 0 倍希釈段を作製し、非競合法 E L I S A によりマウス血中の抗 O A 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 I g G (H + L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 製) を用いた。

30

【 0 0 2 7 】

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 (1 9 7 5) 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 % O A 溶液 1 0 0 μ l 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、R P M I 1 6 4 0 で洗浄して、滅菌ナイロンメッシュ (Cell Strainer, 70 μ m, Becton Dickinson) を通し、脾臓細胞懸濁液を得た。1 , 0 0 0 r p m × 1 0 分の遠心分離により脾臓細胞を集め、再度 R P M I 1 6 4 0 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 1 0 : 1 になるように混合し、再度 1 , 0 0 0 r p m × 1 0 分の遠心分離を行い、ペレットを得た。このペレットに平均分子量 3 , 3 5 0 の 4 5 % 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 R P M I 1 6 4 0 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 (1 0 % 牛胎児血清、4 0 m M の 2 - メルカプトエタノール、1 0 0 U / m l のペニシリン、1 0 0 m g / m l のストレプトマイシンを含む R P M I 1 6 4 0 培地) に 1 0 0 μ M のヒポキサンチン、0 . 4 μ M のアミノプテリン、1 6 μ M のチミジンを含む H A T 選択培地を加え、5 × 1 0 ⁶ cells/well となるように 2 4 ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に分注し、5 % C O ₂ 下 3 7 で培養した。

40

【 0 0 2 8 】

50

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、E L I S A の一次抗体として供試し、抗 O A 抗体を産生しているハイブリドーマの存在を調べた。E L I S A により O A 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 B A L B / 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 g / ml のストレプトマイシンを含む R P M I 1640 培地を用いた。

10

【0029】

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 O A (以下「NOA」ということがある)あるいは還元カルボキシメチル化 O A (以下「RCMOA」ということがある)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。RCMOA は、精製 O A (上記凍結乾燥物)を 10 mg 量り、1.4 M トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.6) 1 ml、5% の E D T A 100 μ l、1.2 g の尿素、33 μ l の 2 -メルカプトエタノールを加え 2.5 ml に定容した後、窒素ガス置換を行い、37、1 時間の還元処理を行った。さらに、1 M の N a O H 300 μ l に溶解した 89 mg のモノヨード酢酸を加え窒素ガス置換した後、室温で 1 時間のカルボキシメチル化を行い、RCMOA とした。

20

【0030】

7) 腹水の採取及び M A b の精製

Jones ら (1990) に従い、まず、B A L B / 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。

【0031】

8) M A b の特性と M A b のクラス、サブクラス及びタイプ

抗 O A M A b の特性を決定するために、固相法と液相法を用いた。固相法として、NOA 又は RCMOA 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 (NOA 又は RCMOA) に抗未変性 / 変性 O A M A b を作用させる方法を用い、また、液相法として、ウサギ抗 O A ポリクローナル抗体をあらかじめ細胞培養用プレートのウェル内に固定し、このポリクローナル抗体に NOA 又は RCMOA を結合させた状態で、抗未変性 / 変性 O A M A b を作用させる方法を用いた。また、M A 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、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、I g M、I g A、I g L () 及び I g L () を決定した。

30

【0032】

9) M A b のビオチン化

精製した M A b について、サンドイッチ E L I S A 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 μ l で溶解した NHS - ビオチン溶液を 10 μ l 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 P B S で置換した。

40

【0033】

1 - 2 結果

1) 抗 O A M A b の特性とクラス、サブクラス

NOA に対する特異性を持つ M A b 9 種類、及び、RCMOA に対する特異性を持つ M

50

A b 1 0 種類を得た。それぞれ液相あるいは固相の抗原に対する特異性を表 1 に示した。

【 0 0 3 4 】

【表 1】

MAb 名	固 相	液 相	固 相	液 相	クラス、サブクラスおよびタイプ
	NOA	NOA	RCMOA	RCMOA	
301B5	+	+	-	-	IgG1 (κ)
304E4(PNOA1)	+	+	-	-	IgG1 (κ)
305G5	+	+	-	-	IgG1 (κ)
306B2(PNOA2)	+	+	-	-	IgG1 (κ)
307G4	+	-	-	-	IgG1 (κ)
310G7	+	+	-	-	IgG1 (κ)

311E11	+	-	-	-	IgG1 (κ)
314E12	+	+	-	-	IgG1 (κ)
316G1	+	+	-	-	IgG1 (κ)
63E5	+	-	+	+	IgG1 (κ)
65F2	+	-	+	+	IgG1 (κ)
68G4	+	-	+	+	IgG1 (κ)
69H6	+	-	+	+	IgG1 (κ)
74G2	+	-	+	+	IgG1 (κ)
115F8	+	-	+	+	IgG1 (κ)
117F9	+	-	+	+	IgG1 (κ)
119D11	+	-	+	+	IgG1 (κ)
948G11 (PDOA1)	+	-	+	+	IgG1 (κ)
962B8 (PDOA2)	+	-	+	+	IgG1 (κ)

10

20

【 0 0 3 5 】

2) 組合せ条件

NOAを検出するためのMAbあるいはRCMOAを検出するためのMAbの組合せは、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、NOAでは301B5と316G1や304E4(PNOA1; FERM BP - 10265)と306B2(PNOA2; FERM BP - 10266)、RCMOAでは117F9と119D11や948G11(PDOA1; FERM BP - 10275)と962B8(PDOA2; FERM BP - 10276)を高い組合せとして選択した。

【 0 0 3 6 】

2. サンドイッチELISAによる変性及び未変性抗原の検出

30

2-1 材料及び方法

NOA溶液は、精製OAをPBSで100ppb溶液となるように調製し、3倍の希釈段を作製した(希釈段A)。一方、ガラス試験管に精製OAを1mg量り、6gの尿素、0.2mlの2-メルカプトエタノール、1mlの50mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.6)、1.5mlの蒸留水を加え、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。冷却後、100ml容メスフラスコに移し、PBSで100mlにメスアップした。これをさらにPBSで100倍希釈し、尿素変性OA(以下「UDO A」という)100ppb溶液とした。さらに尿素濃度を0.01Mに保ちながら3倍の希釈段を作製した(希釈段B)。また、NOA100ppb溶液とUDO A100ppb溶液を等量ずつ混ぜ(NO A及びUDO Aは各50ppb溶液となる)、尿素濃度を0.005Mに保ちながら3倍の希釈段を作製した(希釈段C)。また、サンドイッチELISAに供試した条件を表2に示す。コーティングMAb濃度は単独の場合は25μg/mlに、また混合した場合には各12.5μg/mlとし、合計で25μg/mlとなるようにした。

40

【 0 0 3 7 】

【表 2】

試験 No.	コーティング MA b	抗原	二次抗体
試験 1	301B5	希釈段 A (未変性)	316G1 と 117F9 の混合
	119D11		
	301B5 と 119D11 の混合		
試験 2	301B5	希釈段 B (変性)	
	119D11		
	301B5 と 119D11 の混合		
試験 3	301B5	希釈段 C (未変性 + 変性)	
	119D11		
	301B5 と 119D11 の混合		

10

【 0 0 3 8 】

2 - 2 結果

図 1 に示すように、未変性 OA を対象とした (試験 1) では 301B5 単独と、301B5 と 119D11 の混合の曲線はほとんど重なったが、10 ppb 以下のより希薄な状態において 301B5 単独よりも 301B5 と 119D11 の混合の曲線では若干混合の方が吸光値は高く、検出感度が上げられる可能性が考えられた。また、変性 OA を対象とした (試験 2) の UDOA では、301B5 単独では吸光値が認められず、301B5 及び 316G1 は UDOA に関与しないものと考えられたが、119D11 単独と 301B5 と 119D11 の混合の曲線では明らかに混合の方が吸光値は高く、MAb を混合することにより検出感度を上げることができるものと考えられた (図 2)。これは未変性 / 変性 OA を対象とした (試験 3) でも認められ、301B5 単独よりも 301B5 と 119D11 の混合の方が明らかに吸光値が高かった (図 3)。試験 1 ~ 3 のいずれの場合も、単独でコーティングされた抗体濃度は 25 g / ml であり、混合ではそれぞれ半分の濃度の 12.5 mg / ml であったことから、MAb の種類を増やす混合系を用いることで、抗体濃度が同じあるいは少なくとも、より抗原の検出感度を上げることが可能であることが明らかとなった。

20

【 0 0 3 9 】

3 . イムノクロマトによる変性及び未変性 OA 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 119D11 及び 316G1 の MAb 単独あるいは混合溶液を調製した。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 (日本ミリポア社製) に 68 µl / cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

【 0 0 4 0 】

2) 抗体固定化メンブレンの作製

PBS で 4 mg / ml となるよう 117F9 及び 301B5 の MAb 単独あるいは混合溶液を調製し、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。

【 0 0 4 1 】

3) イムノクロマトストリップの組立と評価

上記で作製したコンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレンに加えて、被検液スポット用のガラスウール製サンプルパッド、被検液吸収用のガラスウール製吸収パッドを別途用意し、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、吸収パッドの順にそれぞれ貼り付け、イムノクロマトストリップとした。被検液としては、上記 2 . で

30

40

50

調製したNOA並びにUDO Aを適宜希釈して用いた。

【 0 0 4 2 】

3 - 2 結果

301B5及び金コロイド標識316G1の組合せによりNOAは10ppbまで検出することができたが、UDO Aは1ppmでも検出できなかった。一方、117F9及び金コロイド標識119D11の組合せにより、UDO Aは10ppbまで検出することができたが、NOAは1ppmでも検出できなかった。これに対して、301B5及び117F9の固定化抗体混合物、並びに316G1及び119D11の金コロイド抗体混合物を用いたイムノクロマトストリップを作製した場合、変性OAあるいは未変性OAを10ppbまで検出可能であった。この様に変性OAに結合可能なMAbと未変性OAに結合可能なMAbを組み合わせることにより、製造工程中に混入した未変性卵白が対象となっても、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。

10

【 0 0 4 3 】

市販の卵アレルギー検出用イムノクロマトストリップでは、ブランクとして0.01M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。これでは卵白アレルギー検査において、熱などにより不溶化した卵白アレルギーを抽出するためのたんぱく質変性剤である尿素を使用できず、アレルギー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。

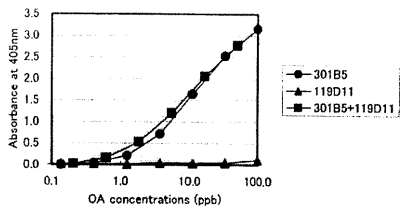
20

【 産業上の利用可能性 】

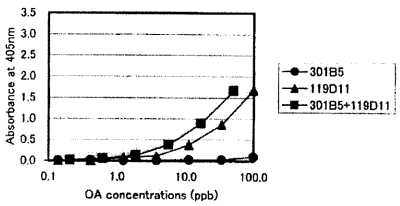
【 0 0 4 4 】

本発明によると、食品等に含まれる卵白アレルギーについての免疫学的な検出方法において、これらアレルギーが、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。

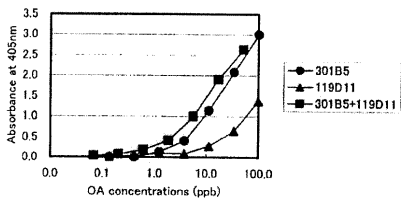
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

0005283228000001.app

フロントページの続き

(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-10265

微生物の受託番号 FERM BP-10266

微生物の受託番号 FERM BP-10275

微生物の受託番号 FERM BP-10276

前置審査

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開平03-282260(JP,A)

特開2003-155297(JP,A)

特開2002-253250(JP,A)

Yoshinori Mine et al., Comparative Studies on Antigenicity and Allergenicity of Native and Denatured Egg White Proteins, J. Agric. Food Chem., 2002年, 50, 2679-2683

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53 - 33/68

专利名称(译)	检测蛋清过敏原的方法		
公开(公告)号	JP5283228B2	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	JP2009170621	申请日	2009-07-21
[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 C07K16/02 C07K16/04 C07K16/16 G01N33/543 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 C07K16/02.ZNA C07K16/04 C07K16/16 G01N33/543.541.Z		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2004063071 2004-03-05 JP 2004285542 2004-09-29 JP 2004285543 2004-09-29 JP		
其他公开文献	JP2009244276A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种高灵敏度的免疫学检测方法，即使在含有蛋白过敏原的食品中改性/未改性的状态下，也能够检测蛋清过敏原，以及其中使用的检测试剂盒。解决方案：在蛋清过敏原的检测方法中，使用至少两种单克隆抗体识别未修饰和修饰的蛋清过敏原，将蛋白质卵清蛋白作为指标。

311E11	+	-	-	-	IgG1 (κ)
314E32	+	+	-	-	IgG1 (κ)
316G1	+	+	-	-	IgG1 (κ)
63E5	+	-	+	+	IgG1 (κ)
65F2	+	-	+	+	IgG1 (κ)
68G4	+	-	+	+	IgG1 (κ)
69H6	+	-	+	+	IgG1 (κ)
74G2	+	-	+	+	IgG1 (κ)
115F8	+	-	+	+	IgG1 (κ)
117F9	+	-	+	+	IgG1 (κ)
119D11	+	-	+	+	IgG1 (κ)
948G11 (P00A1)	+	-	+	+	IgG1 (κ)
962B8 (P00A2)	+	-	+	+	IgG1 (κ)