

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810009786.8

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008年10月8日

[11] 公开号 CN 101280010A

[22] 申请日 2008.2.14

[21] 申请号 200810009786.8

[30] 优先权

[32] 2007.4.5 [33] JP [31] 2007-098969

[71] 申请人 ITEA 株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 宫澤博 阪口雅弘 藤村孝志
白井秀治

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 4 页

[54] 发明名称

虾变应原以及抗虾变应原抗体及其用途

[57] 摘要

本发明提供新颖的虾变应原以及抗虾变应原抗体及其用途。本发明的虾变应原是由虾胶原或其多肽片段形成，本发明提供新颖的虾变应原，使用所述虾变应原可提供抗虾变应原抗体、虾变应原的混入的检查方法、虾变应原的混入的检查用试剂、虾变应原敏感性的测定方法、虾变应原敏感性测定用试剂等。

1. 虾变应原，其特征在于，由虾胶原或其多肽片段形成。
2. 如权利要求 1 所述的虾变应原，其特征在于，所述虾胶原的基于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的分子量为 110~140kDa。
3. 如权利要求 1 所述的虾变应原，其特征在于，所述虾胶原来自日本对虾或宽角长额虾。
4. 抗虾变应原抗体，其特征在于，识别权利要求 1 所述的虾变应原。
5. 如权利要求 4 所述的抗虾变应原抗体，其特征在于，所述抗体是抗血清、IgG 成分、多克隆抗体或单克隆抗体。
6. 虾变应原的混入的检查方法，它是检查试样中的虾变应原的混入的方法，其特征在于，变应原从试样调制提取物，检查所述提取物中是否有虾胶原或其多肽片段的混入。
7. 如权利要求 6 所述的虾变应原的混入的检查方法，其特征在于，所述试样是饮食品或其原材料。
8. 如权利要求 6 所述的虾变应原的混入的检查方法，其特征在于，所述虾胶原提取自日本对虾或宽角长额虾。
9. 如权利要求 6 所述的虾变应原的混入的检查方法，其特征在于，检查变应原所述提取物中是否有虾胶原或多肽片段的混入的方法为使用识别权利要求 1 所述的虾变应原的抗虾变应原抗体的免疫学检出方法。
10. 虾变应原的混入的检查用试剂，它是为了检查试样中的虾变应原的混入而使用的检查用试剂，其特征在于，包含识别权利要求 1 所述的变应原的抗虾变应原抗体。
11. 如权利要求 10 所述的虾变应原的混入的检查用试剂，其特征在于，包含含有识别所述权利要求 1 所述的虾变应原的抗虾变应原抗体的溶液。
12. 如权利要求 10 所述的虾变应原的混入的检查用试剂，其特征在于，变应原包含载有识别权利要求 1 所述的虾变应原的抗虾变应原抗体的载体。
13. 虾变应原敏感性的测定方法，其特征在于，使权利要求 1 所述的虾变应原与受试者的活体试样或其调制物作用，测定在所述活体试样或其调制物中包含的 IgE 抗体中结合于所述虾变应原的 IgE 抗体的量。

14. 虾变应原敏感性测定用试剂，它是为了测定受试者对虾变应原的敏感性而使用的测定用试剂，其特征在于，包含权利要求 1 所述的虾变应原。

15. 如权利要求 14 所述的虾变应原敏感性测定用试剂，其特征在于，包含含有权利要求 1 所述的虾变应原的溶液。

16. 如权利要求 14 所述的虾变应原敏感性测定用试剂，其特征在于，包含载有权利要求 1 所述的虾变应原的载体。

17. 如权利要求 14 所述的虾变应原敏感性测定用试剂，其特征在于，还包含标记抗 IgE 抗体。

虾变应原以及抗虾变应原抗体及其用途

技术领域

本发明涉及虾变应原及抗虾变应原抗体，还涉及虾变应原的混入的检查方法、虾变应原的混入的检查用试剂、虾变应原敏感性的测定方法、以及虾变应原敏感性测定用试剂。

背景技术

在日本引起食物过敏的主要的食物源是蛋、牛奶、大豆、虾/螃蟹、或鱼类等。根据年龄引起过敏的食物源的频率不同，认为在成人中由虾/螃蟹等甲壳类引起的过敏症(allergy)有非常高的出现频率(例如，参考非专利文献 1)。

由虾引起的过敏是即时型，在摄取食物(或接触)后 30 分钟以内就会出现口腔粘膜症状(口腔麻木、浮肿等)、皮肤症状(荨麻疹等)、消化器症状(恶心、呕吐、腹泻等)或呼吸器症状(气喘、呼吸困难等)。有时，甚至也会陷入严重的全身性变应性休克(Anaphylactic Shock)(例如，参考非专利文献 2)。

以往，由虾引起的变应原物质，已鉴定有虾原肌球蛋白(TMS; tropomyosin)或虾精氨酸激酶(AK; Arginine Kinase)(例如，参考非专利文献 3 及 4)。

另一方面，最近报道过在鱼过敏患者中鱼胶原为变应原(例如，参照非专利文献 5 及 6)。

[非专利文献 1]

Yoneyama K, Ono A. Study of food allergy among university students in Japan, *Allergology International* 2002; 51:205-208.

[非专利文献 2]

中村 晋, 飯倉洋治: 最新食物アレルギー. 永井書店, 2004; 241-244.

[非专利文献 3]

Daul CB, Slattery M, Reese G, et al : Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105:49-55.

[非专利文献 4]

Yu CJ, Lin YF, Ching BL, Chow LP,: Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m2. J Immunol. 2003; 170: 445-453

[非专利文献 5]

Hamada Y, Nagasima Y, Shiomi K, et al.: Reactivity of IgE in fish-allergic patients to fish muscle collagen. Allergology International 2003; 52:139-147

[非专利文献 6]

Sakaguchi M, Toda M, Ebihara T, et al. IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. J Allergy Clin Immunol. 2000;106: 579-584.

大部分虾过敏患者具有对虾原肌球蛋白和虾精氨酸激酶的两种或任意一种的 IgE 抗体。然而，也有对这些变应原的抗体呈阴性的患者，因此可认为其它未经鉴定的变应原也对发病起到重要的作用。

本发明的目的是提供新颖的虾变应原，使用该变应原，可以提供抗虾变应原抗体、虾变应原的混入的检查方法、虾变应原的混入的检查用试剂、虾变应原敏感性测定方法、虾变应原敏感性测定用试剂等。

本发明人为了达到上述目的，经过专心研究的结果，发现在虾尾肉(肌肉)中包含的胶原为变应原，从而完成了本发明。

即，本发明如下所述。

(1)虾变应原，其特征为由虾胶原或其多肽片段形成。

(2)如(1)所述的虾变应原，所述虾胶原的基于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的分子量为 110~140kDa。

(3)如(1)所述的虾变应原，所述虾胶原来自日本对虾(*Penaeus japonicus*)或宽角长额虾(*Pandalus platyceros*)。

(4)抗虾变应原抗体，识别如(1)所述的虾变应原。

(5)如(4)所述的抗虾变应原抗体是抗血清、IgG 成分、多克隆抗体或单克隆抗体。

(6)虾变应原的混入的检查方法，它是检查试样中虾变应原的混入的方法，其特征在于，从试样调制提取物，检查所述提取物中是否有虾胶原或其多肽片段的的存在。

(7)如(6)所述的虾变应原的混入的检查方法，所述试样是饮食品或其原材料。

(8)如(6)所述的虾变应原的混入的检查方法,所述虾胶原提取自日本对虾或宽角长额虾。

(9)如(6)所述的虾变应原的混入的检查方法,检查前述提取物中是否有虾胶原或其多肽片段存在的方法为使用识别如(1)所述的虾变应原的抗虾变应原抗体的免疫学检出方法。

(10)虾变应原的混入的检查用试剂,它是为了检查试样中虾变应原的混入而使用的检查用试剂,其特征为包含识别如(1)所述的虾变应原的抗虾变应原抗体。

(11)如(10)所述的虾变应原的混入的检查用试剂,包含含有识别如(1)所述的虾变应原的抗虾变应原抗体的溶液。

(12)如(10)所述的虾变应原的混入的检查用试剂,包含载有识别如(1)所述的虾变应原的抗虾变应原抗体的载体。

(13)虾变应原敏感性的测定方法,其特征为使受试者活体试样或其调制物与前述(1)所述的虾变应原作用,测定在前述活体试样或其调制物中包含的 IgE 抗体中结合于所述虾变应原的 IgE 抗体的量。

(14)虾变应原敏感性测定用试剂,它是为了测定受试者对虾变应原的敏感性而使用的测定用试剂,其特征为包含如(1)所述的虾变应原。

(15)如(14)所述的虾变应原敏感性测定用试剂,包含含有如(1)所述的虾变应原的溶液。

(16)如(14)所述的虾变应原敏感性测定用试剂,包含含有如(1)所述的虾变应原的载体。

(17)如(14)所述的虾变应原敏感性测定用试剂,还包含标记抗 IgE 抗体。

利用本发明,提供新颖的虾变应原,使用该虾变应原,提供抗虾变应原抗体、虾变应原的混入的检查方法、虾变应原的混入的检查用试剂、虾变应原敏感性测定方法、虾变应原敏感性测定用试剂等。

附图的简单说明

图 1 是制造例 1 的日本对虾胶原提取物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析处理的考马斯染色照片。

图 2 是特异性结合于未变性胶原螺旋结构的色素天狼星红进行染色的结果示意图。

图3是将制造例1中获得的日本对虾胶原的紫外线吸收特性与牛胶原以及BSA(牛血清白蛋白)的紫外线吸收特性进行比较的结果示意图。

图4是作为抑制剂使用虾、鲭鱼及牛胶原的抑制法ELISA的结果示意图。

实施发明的最佳方式

本发明新发现了包含在虾尾肉(肌肉)中的胶原为变应原。即,本发明的虾变应原由虾的胶原或其多肽片段形成。

本发明的虾变应原中所使用的虾胶原,例如可以通过公知的技术而获得,例如蛭原、入江的方法(蛭原哲也、入江伸吉;魚類および無脊椎動物コラーゲン細学マトリックス研究法(I)コラーゲン技術研修会刊1998;52-57)。即,以虾尾肉(肌肉)等作为原料,可以经过均匀化、用洗涤液洗涤、用乙醇进行脱脂、用胃蛋白酶进行消化及提取、用NaCl进行盐析、乙酸溶液溶液化后的透析等各种处理而获得。

胶原存在于各种生物中,其结构和性质相类似。基本上是由分子量约10万的3条多肽链构成,在未变性胶原中呈螺旋结构。在凝胶中进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析时,分成1条多肽链的单体(α 链)、2条多肽链的二聚体(β 链)、3条多肽链的三聚体(γ 链)。但是,从原料组织的提取性或获得的分子种类(分别有单体(α 链)、二聚体(β 链)、三聚体(γ 链))根据动物的种类或所使用的组织的不同而有很大差异。

关于本发明中所使用的虾胶原,通过约重复两次对虾肌肉组织提取时的胃蛋白酶消化从而可以容易得到胶原的纯化成分。如此所得的胶原纯化成分中包含,在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析-考马斯(Coomassie)染色分析中大致呈现单带的胶原的单体(α 链)。

本发明的虾变应原中所使用的虾胶原可由上述方法以外的方法而适当获得。另外,虾胶原可利用公知的技术,适当地将其浓缩、纯化。

原料虾的种类无特别限制,可优选例举作为食用虾的日本对虾或宽角长额虾等。

在本发明的虾变应原中,例如变应原活性、抗体产生能力、抗体结合能力等特性中,如果具有虾胶原的免疫学特性的变应原,则可以使用其多肽片段。即,例如作为决定抗原-抗体反应特异性的局部结构的抗原表位,通常其氨基酸长度约为10~数十个氨基酸。因此,认为在虾胶原中也存有具有这种免疫学

特性的部分多肽片段。

还有，在本发明中的（免疫学的）与该领域中通常所使用的用语的定义相同，不仅指利用对人类的免疫性，也包含利用例如对兔子、山羊、绵羊、猴子、牛、鸡、天竺鼠、大鼠、小鼠等其它动物的免疫性。

在本发明的虾变应原中，如果维持在其免疫学特性的范围内，则可以使其可逆或不可逆地与其它物质结合的状态使用。例如，可以使其与树脂、玻璃、塑料、金属、色素分子、放射性物质、荧光物质、生物高分子、有机材料分子等结合的状态使用。另外，对结合的结合物的性状无特别限制，例如，可以是凝胶状、纳米粒状、胶体状、珠粒状、多孔状、片状等。

本发明的虾变应原，可以如下利用。

例如，从试样调制提取物，以本发明的虾变应原(虾胶原或其多肽片段)作为物质标记，检查前述提取物中是否有虾变应原(虾胶原或其多肽片段)的存在，前述试样可例举饮食品或其原材料等。

依此，制造业者或其管理者可以简便地检查出在饮食品中是否混入有虾变应原，并可以通过将其表示在产品的包装等上面，告知购买者。同时，可以防止有虾过敏发病史或可能会发病的消费者摄食该饮食品。

还有，已知即使胶原融化成明胶也具有抗原性。因此，即使以本发明的虾变应原(虾胶原或其多肽片段)作为物质标记的情况下，也认为经过加热处理了的饮食品具有作为虾变应原的抗原性，可以通过后述的免疫学检查方法简单地检出。

另外，本发明的虾变应原，可以如下利用。

例如，使受试者的活体试样或其调制物与本发明的虾变应原作用，测定前述活体试样或其调制物中包含的 IgE 抗体中，与前述虾变应原结合的 IgE 抗体的量。从而可以测定对受试者对虾胶原的敏感性，或由虾胶原引起的过敏症状的病情经过。

作为受试者的活体试样或其调制物可例举血液、血清、血浆等。

作为测定结合于前述虾变应原的 IgE 抗体的量的方法，例如，首先，将本发明的虾变应原在微型板或玻璃珠上进行固化，在前述活体试样或其调制物中包含的 IgE 抗体的固化物中，通过洗涤操作或离心操作将与本发明的虾变应原结合的物质分离自未能与固化物结合而留在溶液的物质中，再用针对 IgE 抗体的抗体进行测定的方法进行测定。作为针对 IgE 抗体的抗体有市售的抗人 IgE-

β -半乳糖苷酶标记抗体等。

为了使上述测定方法简便且迅速进行，提供了本发明的含有虾变应原的虾变应原敏感性测定用试剂。另外，可提供除了本发明的虾变应原之外，还包含其它所需的任意的试剂的虾变应原敏感性测定用试剂。作为其它所需的任意的试剂，例如，可例举如上述抗人 IgE- β -半乳糖苷酶标记抗体等的标记抗 IgE 抗体。

另一方面，本发明的抗虾变应原抗体是识别本发明的虾变应原的抗虾变应原抗体，具体而言，为抗血清、IgG 成分、多克隆抗体或单克隆抗体等抗虾变应原抗体。作为其调制方法，可以使用该领域中公知的任意一种技术。例如，将本发明的虾变应原施与免疫动物，从该动物提取抗血清。免疫动物可例举兔子、山羊、绵羊、猴子、牛、鸡、天竺鼠、大鼠、小鼠等。

本发明的抗虾变应原抗体中，如果可以维持在免疫学特性的范围内，则可以使其可逆地或不可逆地与其它物质结合的状态使用。例如，可以与树脂、玻璃、塑料、金属、色素分子、放射性物质、荧光物质、生物高分子、有机材料分子等结合的状态使用。另外，对使其结合物的性状无特别限制，例如，可以是凝胶状、纳米粒子状、胶体状、珠粒状、多孔状、片状等。

本发明的抗虾变应原抗体，可以如下利用。

例如，在上述试样中有无虾变应原存在的检查方法中，作为是否有虾胶原或其多肽片段存在的检查方法，可以使用本发明的抗虾变应原抗体的免疫学检查方法。

免疫学检查方法以酶联免疫吸附测定法(ELISA)或免疫层析法(immuno chromatography)等方法为代表的各种方法已广泛被普及，如果是该领域的技术人员，则较容易地适当利用公知的技术。

为了使上述检查方法简便且迅速进行，提供了含有本发明抗虾变应原抗体的虾变应原的混入的检查用试剂。并且，还提供了除了本发明的抗虾变应原抗体之外，还含有其它所需的任意试剂的虾变应原的混入的检查用试剂。作为其它所需的任意的试剂，可例举识别抗虾变应原抗体的抗 IgG-Fc-片段抗体等、抗 IgG 第二抗体。

(实施例)

下面用实施例更具体地说明本发明，但本发明的范围不局限于这些实施例。

<制造例 1>日本对虾胶原的提取

由日本对虾的尾肉依照蛭原、入江的方法(蛭原哲也, 入江伸吉: 魚類および無脊椎動物コラーゲン細学マトリックス研究法(I)コラーゲン技術研修会刊 1998;52-57)1998; 52-57.), 如下所述地提取胶原。

将虾尾肉放入冰冷的洗涤液(0.1 μ M N-乙基马来酰亚胺, 10 μ M PMSF, 1mM EDTA, 25 mM Na_2HPO_4 ; 使用时配制)中, 用玻璃匀浆器使其均匀化。将该溶液在 10000rpm (15000 \times g)、10 分钟、4 $^{\circ}$ C 下进行离心分离(下面的离心操作若无特别说明也按照该离心条件进行。), 在沉淀中加入洗涤液搅拌 3~10 小时, 再次进行离心分离, 在沉淀中加入洗涤液搅拌, 重复该洗涤步骤 5~7 次。确认上清液的蛋白质浓度为 10 μ g/ml 以下后, 在沉淀中加入约 10 倍量的冷乙醇搅拌约 3 小时, 重复多次该操作至上清液变成透明。在该脱脂沉淀中加入约 10 倍量的 1mg/ml 胃蛋白酶-0.5M 乙酸(提取液), 搅拌一晚后。将其离心且回收其上清液。另外, 离心分离后的沉淀中再次加入提取液相同地进行提取。将离心分离后的上清液收集, 其中加入 NaCl 使得最终浓度成为 2M, 搅拌一晚。将其离心分离后在沉淀中加入 10 倍量的 0.05M 乙酸使其溶解后, 再次离心分离, 将该上清液放入透析膜(皮尔斯(PIERCE)公司制, 洛克福特, IL)中, 对 0.005M Tris-HCl, pH7.5 透析一晚, 再次重复透析至透析外液的 pH 稳定在 7.5 为止。透析后, 离心分离, 在其沉淀中加入 10 倍量的 0.05M 已酸使其溶解后, 再次进行离心分离。回收该上清液, 对 0.005M 醋酸透析一晚后, 离心分离 20 分钟, 得到其上清液(日本对虾胶原提取物)。

将获得的上清液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 并进行考马斯染色。其结果示于图 1。

胶原存在于各种生物中, 其结构和性质类似。基本上是由分子量约 10 万的 3 条多肽链所构成, 未变性胶原中它们呈螺旋结构, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析分离在凝胶时, 会分成 1 条多肽的单体(α 链)、2 条多肽的二聚体(β 链)、3 条多肽的三聚体(γ 链)。

如图 1 所示, 由与分子量标记进行对比, 可确认得自上清液的约 120 千道尔顿(kDa)的带为主要的带, 认为该带为胶原的单体(α 链)。另外, 相当于胶原的二聚体(β 链)、三聚体(γ 链)的带只是微弱地进行辨认。此外在 42kDa 附近可辨认出极其微弱的带。

<试验例 1>虾变应原夹杂物的确认

大部分虾过敏患者均具有对虾原肌球蛋白和虾精氨酸激酶的两种或任意一种特异性的 IgE 抗体。

因此，使用抗虾原肌球蛋白抗体(来自小鼠)、及抗虾精氨酸激酶抗体(来自小鼠)作为混入的夹杂物质，可用如下述方法调查制造例 1 的日本对虾胶原的提取物中是否混入上述夹杂质。还有，这些抗体的制备如下。即，将大正虾(明虾(oriental shrimp))(日本对虾属)的尾肉煮沸，其提取液经硫酸铵盐析后，使用阴离子交换柱及羟基磷灰石柱离析虾原肌球蛋白。将该提取的原肌球蛋白与明矾(助剂)对小鼠进行免疫，通过常规的方法获得抗虾原肌球蛋白抗体(小鼠抗血清)。另外，制备日本对虾尾肉的均浆液，经硫酸铵盐析后，用镍螯合柱离析精氨酸激酶，使该精制精氨酸激酶与明矾(助剂)对小鼠进行免疫，依常规方法获得抗虾精氨酸激酶抗体(小鼠抗血清)。

将制造例 1 的日本对虾胶原提取物，以 0.05M 碳酸-碳酸氢盐缓冲液，调至 pH 9.6 的 10 μ g/ml 液，在 96 孔平底微型板的每个孔中各添加 100 μ l(约 1 μ g)，在 4 $^{\circ}$ C 下放置一晚，使其固化。用 PBST 洗涤 3 次后，使上述虾主要变应原抗体(小鼠抗血清)(抗 TMS、抗 AK、各 25000 倍)在室温下反应 60 分钟。洗涤后，使碱性磷酸酶标记抗小鼠 IgG 抗体(2000 倍)在室温下反应 60 分钟。洗涤后，与 1mg/ml 对硝基苯磷酸在室温下反应 15 分钟。加入 0.2M EDTA 停止反应，测定在 405nm 的吸光度。另外，作为有关各个抗体的阳性对照，将虾原肌球蛋白和虾精氨酸激酶以 96 孔平底微型板的每个洞中分别含有约 0.1 μ g 的条件，进行固体化，并同样地进行测定，其结果示于表 1。

表 1

虾主要变应原抗体	固化抗原		虾主要变应原 [#]
	对照	日本对虾胶原*	
抗原肌球蛋白(TMS)	0.08	0.08	>2.0(TMS)
抗精氨酸激酶(AK)	0.079	0.08	>2.0(AK)

*日本对虾胶原以 10 μ g/ml 进行固化

[#]虾主要变应原以 1 μ g/ml 进行固化：TMS(原肌球蛋白)、AK(精氨酸激酶)两种虾主要变应原抗体(小鼠多克隆抗体)分别以 1: 25000 反应，用抗小鼠 IgG Al-p 标识抗体与 pNPP 检出。

如表 1 所示，制造例 1 的日本对虾胶原的提取物，对于抗虾原肌球蛋白抗体(小鼠抗血清)，及抗虾精氨酸激酶抗体(小鼠抗血清)完全无反应性，两种抗体

对虾胶原的反应量(吸光度)分别与对照相等。

由上述结果以及上述 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果,可以判定在制造例 1 的日本对虾胶原的提取物中,未混入虾原肌球蛋白或虾精氨酸激酶,用于评估虾胶原变应原活性已充分被提取。

<试验例 2>日本对虾胶原的鉴定

为了确认制造例 1 中获得的蛋白质为胶原,因此与未变性胶原的螺旋结构特异结合的天狼星红(Sirius red)色素进行染色。具体而言,有关制造例 1 的日本对虾胶原提取物,利用作为胶原鉴定试剂盒的(斯儿克胶原鉴定试剂盒(Sircol collagen Assay kit))(商品名,英国毕欧带萨恩斯(Biodye science)公司制,北爱尔兰),测定被天狼星红染色的程度。另外,对经加热处理(变性)的胶原也同样地进行测定。其结果示于图 2。

如图 2 所示,未加热(未变性)的试样,被色素天狼星红染色,但加热处理(变性)的试样染色性大幅下降。其结果与牛胶原的结果相同。

胶原的氨基酸组成的最大特征为甘氨酸多、疏水性氨基酸少、几乎不含酪氨酸,因此几乎不能确认在 280nm 的吸收。因此,在图 3 中,对于制造例 1 中获得的蛋白质(日本对虾胶原)的紫外线吸收特性,与牛胶原及 BSA(牛血清白蛋白)的紫外线吸收特性进行了比较。具体来说,将制造例 1 的日本对虾胶原提取物与牛胶原及 BSA,分别用纯水调至 1mg/ml 的浓度,对在 240~300nm 的波长下的紫外线吸收特性进行比较。

如图 3 所示,与 BSA 在 280nm 下有明显的吸收峰相比,制造例 1 的日本对虾胶原提取物,或牛胶原在 280nm 处未能确认吸收峰。

由上述,可以确认制造例 1 中获得的蛋白质为胶原。

<制造例 2>宽角长额虾胶原的提取

与制造例 1 同样地操作,由宽角长额虾的尾肉提取胶原。其结果,可以提取与日本对虾胶原具有相同的特性、分子量约 120 千道尔顿(kDa)的宽角长额虾胶原。

<试验例 3>虾胶原的变应原活性

虾过敏患者(虾 CAP RAST 阳性 23 例)的血清中,调查对虾胶原的 IgE 抗体的表达量是否增加为目的,如下述以间接 ELISA 法进行测定。还有,上述虾过敏患者具有在摄食虾后发生口唇浮肿或荨麻疹、或接触性皮炎(调理中)等过敏症状的经历,其血清用市售的变应原 IgE 抗体检查试剂盒(CAP-RAST)判定为

阳性。

将在制造例 1 或制造例 2 中获得的虾胶原，以 0.05M 碳酸-碳酸氢盐缓冲液，调至 pH 9.6 的 10 μg/ml 液，以在 96 孔平底微型板的每个孔中各含约 1 μg 的条件进行固化。用 PBST(PBS,0.05% 吐温 20)洗涤 3 次后，将虾过敏患者的血清用 1% BSA-PBST 稀释 5 倍并分别注入，在室温反应 3 小时。用 PBST 洗涤 3 次后，用 1% BSA-PBST 将抗人 IgE-β-半乳糖苷酶标记抗体(CAP RAST FEIA 试剂盒)(商品名)、法迪亚(Phadia)公司制)稀释至 15 倍后分别注入后，在 4℃ 下使其反应 1 晚。用 PBST 洗涤 3 次后，加入 0.3mM 的 4-甲基伞形基-β-D-吡喃半乳糖苷(4-Methyl umbelliferyl-β-D-galactopyranoside)，在 37℃ 恒温槽中使其反应 90 分钟。最后加入 pH 10.2 的 0.1M 甘氨酸-NaOH 使反应停止。萤光单位(FU)用微板读出器(福洛尔斯基 II(Fluoroskan II))(商品名，美国提特特克(Titertek)公司制)测定，以 100 萤光单位(FU)以上作为抗体阳性。

其结果示于表 2。

表 2

胶原	胶原 IgE(>100FU)	
	阳性数/n	阳性率(%)
日本对虾	8/23	35
宽角长额虾	5/23	33

如表 2 所示，作为抗原使用日本对虾胶原时，虾过敏患者 23 例中 8 例(35%)呈抗体阳性，另外，作为抗原使用宽角长额虾胶原时，虾过敏患者 23 例中 5 例(22%)呈抗体阳性。

由上述可知一部分虾过敏患者(虾 CAP RAST 阳性 23 例)的血清中，对虾胶原的 IgE 抗体的表达量增加。因此，表明虾胶原为虾过敏症状的起因物质之一。

< 试验例 4 > 与源自其它动物的胶原的交差反应性

胶原存在于各种生物中，其结构和性质类似，另外，Sakaguchi 等人曾报导鱼过敏患者的鱼明胶 IgE 抗体阳性率约为 30%(参考上述非专利文献 6)。

因此，为了确认试验例 3 中所示的虾胶原的变应原活性，并非来自虾过敏患者的血清中存在的其它动物的胶原所引起的 IgE 抗体的反应，因此对虾胶原的交差反应性进行调查。具体而言，采用利用鲭鱼(Mackerel)和牛胶原的抑制法

ELISA, 研究虾变应原(shrimp allergy)患者的血清中存在的胶原 IgE 抗体的特异性。

首先, 将制造例 1 中获得的日本对虾胶原以 0.05M 碳酸-碳酸氢盐缓冲液调至 pH 为 9.6 的 $10 \mu\text{g/ml}$ 溶液, 并以在 96 孔平底微型板的每个孔中使其各含约 $1 \mu\text{g}$ 的条件进行固化。在另一个试验管中分别对于制造例 1 中获得的日本对虾胶原与鲑鱼以及牛胶原, 准备从 $20 \mu\text{g/ml}$ 分别稀释至 $4 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.8 \mu\text{g/ml}$ 的溶液, 等量加入经稀释至 5 倍的胶原 IgE 阳性混合血清(试验例 3 中的阳性者 3 例的血清的混合物)并混合, 在 4°C 下反应一晚。将胶原固化板用 PBST 洗涤 3 次后, 在试验管中分别注入所制备的胶原与血清的混合液各 $100 \mu\text{l}$, 在室温下反应 3 小时。之后, 与试验例 3 同样地进行测定。抑制率由下式求得。

抑制率(%) = (未添加抑制剂的孔的 FU - 添加抑制剂的孔的 FU) ÷ 未添加抑制剂的孔的 FU × 100

其结果示于图 4。如图 4 所示, 在抑制剂中使用虾胶原时, 固化日本对虾胶原与血清的反应根据浓度被抑制。与此相对在抑制剂中使用鲑鱼与牛胶原的情况下完全没有被抑制。

由上述可知, 虾胶原是与其它胶原(源自其它种的胶原)的交差反应性低的变应原。另外, 在试验例 3 中所示的虾胶原的过敏活性, 并不是起因于与虾过敏患者的血清中存在的源自其它动物的胶原所引起的 IgE 抗体的反应, 而是起因于虾胶原特异性的 IgE 抗体的表达量的增加。

<实施例 1> 虾胶原特异性 IgE 抗体持有者的检出

调查普通成人 175 例中对于虾或鲑鱼的胶原的 IgE 抗体持有状况。具体而言, 从各受试者采取血清, 与试验例 3 相同地操作, 检出阳性者。其结果示于表 3。

表 3

血清编号	胶原 IgF(FU)		症状	食品源
	日本对虾	鲭鱼		
1	833	2350	荨麻疹	虾、蟹
2	793	—	荨麻疹	虾
3	106	—	口唇浮肿	虾、蟹
4	—	3849	荨麻疹	鱼板
5	—	328	不明	不明
6	—	163	过敏性休克	荞麦
阳性数(≥ 100 FU)	3	4		
阴性数	172	171		
阳性率(%)	1.7	2.3		

如表 3 所示, IgE 抗体阳性者对日本对虾有 3 例(1.7%), 对鲭鱼有 4 例(2.3%)。判断出虾与鲭鱼的抗体之间无相关性, 对两种都具有 IgE 抗体的只有 1 例。另外, 拥有虾胶原 IgE 抗体的 3 例中任意一例都有因摄食虾或螃蟹而引起荨麻疹或口唇浮肿等经历。

如上所述, 由于可确认虾过敏患者与拥有虾胶原 IgE 抗体的持有者的相关性, 因此可知作为变应原的虾胶原变应原, 或利用该虾胶原可制作的抗虾变应原抗体等应用在虾过敏的测定中。

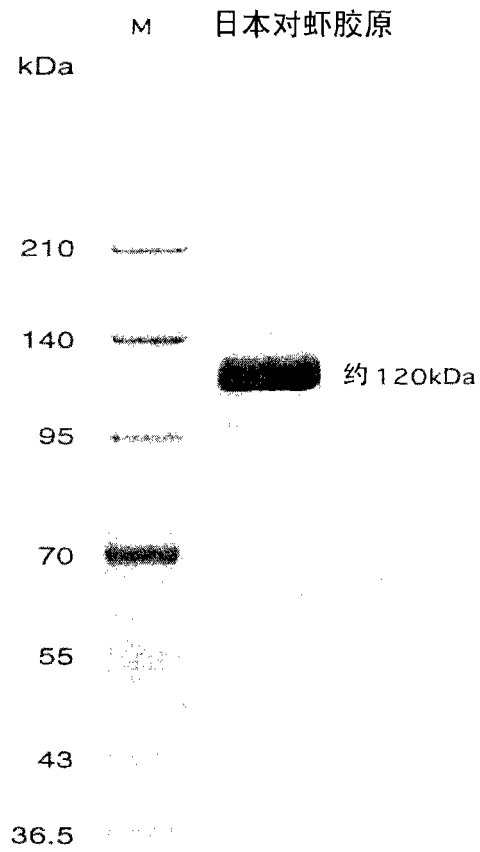


图 1

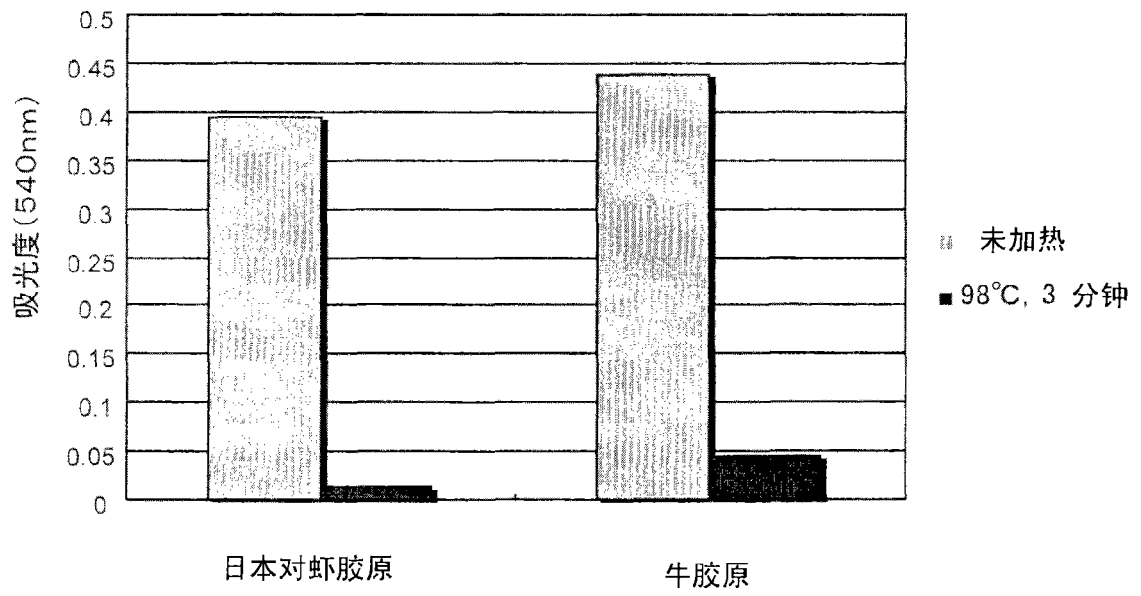


图 2

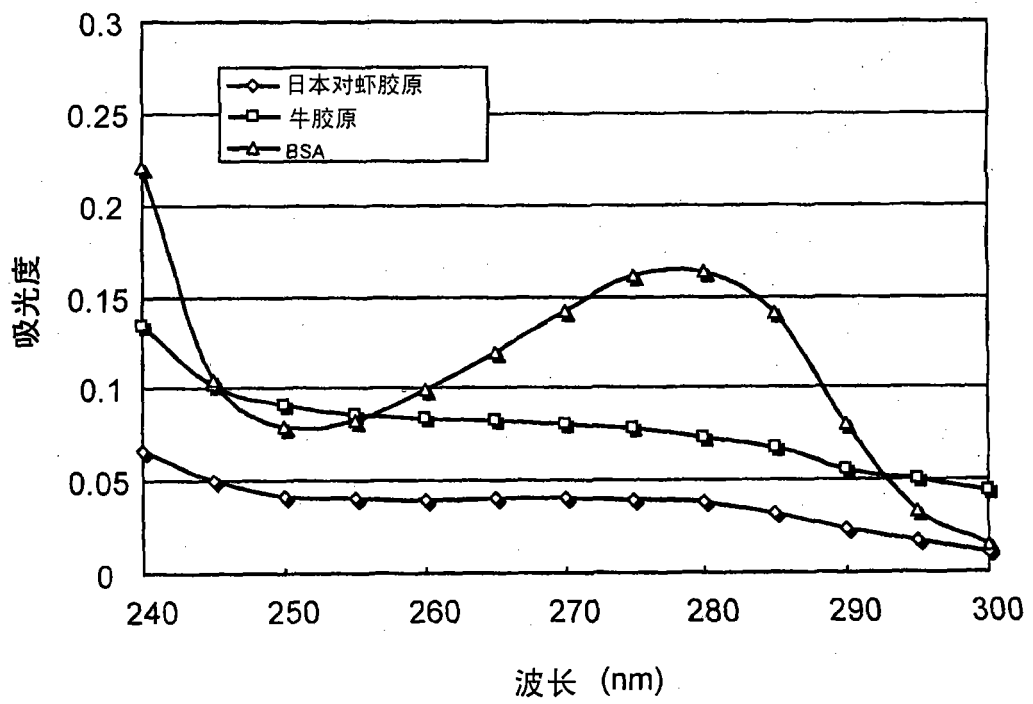


图 3

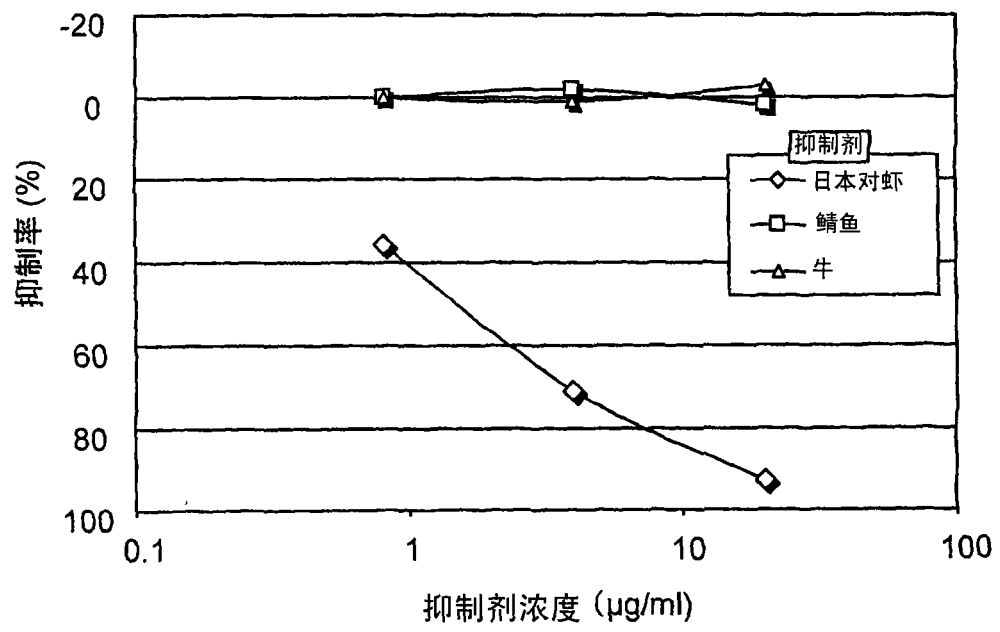


图 4

专利名称(译)	虾变应原以及抗虾变应原抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101280010A	公开(公告)日	2008-10-08
申请号	CN200810009786.8	申请日	2008-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	伊蒂股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	ITEA株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	ITEA株式会社		
[标]发明人	宫澤博 阪口雅弘 藤村孝志 白井秀治		
发明人	宫澤博 阪口雅弘 藤村孝志 白井秀治		
IPC分类号	C07K14/435 C07K16/18 G01N33/577 C07K14/78 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/43508 G01N33/6854 C07K14/43509 A61K39/35 C07K16/18 G01N33/68		
代理人(译)	范征		
优先权	2007098969 2007-04-05 JP		
其他公开文献	CN101280010B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供新颖的虾变应原以及抗虾变应原抗体及其用途。本发明的虾变应原是由虾胶原或其多肽片段形成，本发明提供新颖的虾变应原，使用所述虾变应原可提供抗虾变应原抗体、虾变应原的混入的检查方法、虾变应原的混入的检查用试剂、虾变应原敏感性的测定方法、虾变应原敏感性测定用试剂等。

	固化抗原		
	对照	日本对虾胶原*	虾主要变应原#
虾主要变应原抗体			
抗原肌球蛋白(TMS)	0.08	0.08	>2.0(TMS)
抗精氨酸激酶(AK)	0.079	0.08	>2.0(AK)