

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4444306号  
(P4444306)

(45) 発行日 平成22年3月31日(2010.3.31)

(24) 登録日 平成22年1月22日(2010.1.22)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>CO7K</b> 14/78	<b>(2006.01)</b>	CO7K	14/78
<b>GO1N</b> 33/53	<b>(2006.01)</b>	GO1N	33/53
			Q
			D
			N

請求項の数 18 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2007-98969 (P2007-98969)	(73) 特許権者	507112457 宮澤 博 東京都立川市一番町5-5-3-404
(22) 出願日	平成19年4月5日(2007.4.5)	(73) 特許権者	507111461 阪口 雅弘 東京都町田市成瀬台3-35-14
(65) 公開番号	特開2008-255054 (P2008-255054A)	(73) 特許権者	507111472 藤村 孝志 千葉県千葉市中央区青葉町1252-6 ハイツ青葉の森 202
(43) 公開日	平成20年10月23日(2008.10.23)	(73) 特許権者	507161983 I T E A 株式会社 東京都文京区湯島2-2-4 スワンビル
審査請求日	平成20年7月17日(2008.7.17)	(74) 代理人	100086689 弁理士 松井 茂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エピアレルゲン及び抗エピアレルゲン抗体並びにその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中のエピアレルゲンの混入を検査する方法であって、試料から抽出物を調製し、前記抽出物中のエピコラーゲン又はそのポリペプチド断片の存在の有無を検出することを特徴とするエピアレルゲン混入検査方法。

【請求項 2】

前記試料は、飲食品又はその原材料である請求項 1 記載のエピアレルゲン混入検査方法。

【請求項 3】

前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である請求項 1 又は 2 記載のエピアレルゲン混入検査方法。

【請求項 4】

前記抽出物中のエピコラーゲン又はそのポリペプチド断片の存在の有無を検出する手段が、エピコラーゲン又はそのポリペプチド断片を認識する抗エピアレルゲン抗体を用いた免疫学的検出手段である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載のエピアレルゲン混入検査方法。

【請求項 5】

試料中のエピアレルゲンの混入を検査するために用いられる検査用試薬であって、エピコラーゲン又はそのポリペプチド断片を認識する抗エピアレルゲン抗体を含むことを特徴とするエピアレルゲン混入検査用試薬。

10

20

## 【請求項 6】

前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である請求項 5 記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

## 【請求項 7】

前記抗エビアレルゲン抗体は、抗血清、I g G 画分、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体である請求項 5 又は 6 記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

## 【請求項 8】

エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を認識する抗エビアレルゲン抗体を含有する溶液を含む請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 つに記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

## 【請求項 9】

エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を認識する抗エビアレルゲン抗体を担持した担体を含む請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 つに記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

## 【請求項 10】

被験者から採取した生体試料又はその調製物に、エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片からなるエビアレルゲンを作用させ、前記生体試料又はその調製物に含まれる I g E 抗体のうち、前記エビアレルゲンに結合する I g E 抗体の量を測定することを特徴とするエビアレルゲン感受性測定方法。

## 【請求項 11】

前記エピコラーゲンは、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析による分子量が 1 1 0 ~ 1 4 0 キロダルトンである請求項 10 記載のエビアレルゲン感受性測定方法。

## 【請求項 12】

前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である請求項 10 又は 11 記載のエビアレルゲン感受性測定方法。

## 【請求項 13】

被験者のエビアレルゲンに対する感受性を測定するために用いられる測定用試薬であって、エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を含むことを特徴とするエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【請求項 14】

前記エピコラーゲンは、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析による分子量が 1 1 0 ~ 1 4 0 キロダルトンである請求項 13 記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【請求項 15】

前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である請求項 13 又は 14 記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【請求項 16】

エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を含有する溶液を含む請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 つに記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【請求項 17】

エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を担持した担体を含む請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 つに記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【請求項 18】

更に、標識抗 I g E 抗体を含む請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 つに記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、エビアレルゲン及び抗エビアレルゲン抗体に関し、更に、エビアレルゲン混入検査方法、エビアレルゲン混入検査用試薬、エビアレルゲン感受性測定方法、並びにエビアレルゲン感受性測定用試薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

10

20

30

40

50

わが国における食物アレルギーの主な原因食物は、卵、牛乳、大豆、エビ・カニや魚類などである。年齢によって原因食物の頻度は異なり、成人ではエビ・カニなどの甲殻類によるアレルギーがもっとも高頻度に認められる（例えば、非特許文献1参照。）。

【0003】

このエビによるアレルギーは即時型であり、摂食（あるいは接触）の直後から30分以内に口腔粘膜症状（口唇のしびれ、浮腫など）、皮膚症状（蕁麻疹など）、消化器症状（吐き気、嘔吐、下痢など）や呼吸器症状（喘息、息切れなど）が出現する。ときには重篤な全身性のアナフィラキシーショックに陥ることもある（例えば、非特許文献2参照。）。

【0004】

従来、エビによるアレルギーの原因物質としては、エビトロポミオシン(TMS)やエビアルギニンキナーゼ(AK)が同定されていた（例えば、非特許文献3及び4参照。）。

【0005】

一方、最近、魚アレルギー患者において魚コラーゲンがアレルギーとなることが報告されている（例えば、非特許文献5及び6参照。）。

【非特許文献1】Yoneyama K, Ono A. Study of food allergy among university students in Japan. *Allergology International* 2002; 51: 205-208.

【非特許文献2】中村 晋、飯倉洋治：最新食物アレルギー．永井書店 2004；241-244.

【非特許文献3】Daul CB, Slattey 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.

【非特許文献4】Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol*. 2003; 170: 445-453.

【非特許文献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.

【非特許文献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.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

エビアレルギー患者の多くはエビトロポミオシン(TMS)とエビアルギニンキナーゼ(AK)の両方あるいはいずれかのIgE抗体を保有する。しかしながら、これらのアレルギーに対する抗体が陰性である患者もあることから、他の未同定アレルギーもまた発症に重要な役割を果たしていると考えられる。

【0007】

したがって本発明の目的は、新規エビアレルギーを提供し、これを用いて、抗エビアレルギー抗体、エビアレルギー混入検査方法、エビアレルギー混入検査用試薬、エビアレルギー感受性測定方法、エビアレルギー感受性測定用試薬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、上記目的を達成するため鋭意研究した結果、エビ尾肉（筋肉）に含まれるコラーゲンがアレルギーであることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

【0015】

(1) 試料中のエビアレルギーの混入を検査する方法であって、試料から抽出物を調製し、前記抽出物中のエビコラーゲン又はそのポリペプチド断片の存在の有無を検出することを特徴とするエビアレルギー混入検査方法。

10

20

30

40

50

## 【0016】

(2) 前記試料は、飲食品又はその原材料である前記(1)記載のエビアレルゲン混入検査方法。

## 【0017】

(3) 前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である前記(1)又は(2)記載のエビアレルゲン混入検査方法。

## 【0018】

(4) 前記抽出物中のエピコラーゲンは、そのポリペプチド断片の存在の有無を検出する手段が、エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を認識する抗エビアレルゲン抗体を用いた免疫学的検出手段である前記(1)～(3)のいずれか1つに記載のエビアレルゲン混入検査方法。

10

## 【0019】

(5) 試料中のエビアレルゲンの混入を検査するために用いられる検査用試薬であって、エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を認識する抗エビアレルゲン抗体を含むことを特徴とするエビアレルゲン混入検査用試薬。

(6) 前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である前記(5)記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

(7) 前記抗エビアレルゲン抗体は、抗血清、IgG画分、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体である前記(5)又は(6)記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

## 【0020】

20

(8) エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を認識する抗エビアレルゲン抗体を含有する溶液を含む前記(5)～(7)のいずれか1つに記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

## 【0021】

(9) エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を認識する抗エビアレルゲン抗体を担持した担体を含む前記(5)～(7)のいずれか1つに記載のエビアレルゲン混入検査用試薬。

## 【0022】

(10) 被験者から採取した生体試料又はその調製物に、エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片からなるエビアレルゲンを作用させ、前記生体試料又はその調製物に含まれるIgE抗体のうち、前記エビアレルゲンに結合するIgE抗体の量を測定することを特徴とするエビアレルゲン感受性測定方法。

30

(11) 前記エピコラーゲンは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析による分子量が110～140キロダルトンである前記(10)記載のエビアレルゲン感受性測定方法。

(12) 前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である前記(10)又は(11)記載のエビアレルゲン感受性測定方法。

## 【0023】

(13) 被験者のエビアレルゲンに対する感受性を測定するために用いられる測定用試薬であって、エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を含むことを特徴とするエビアレルゲン感受性測定用試薬。

40

(14) 前記エピコラーゲンは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析による分子量が110～140キロダルトンである前記(13)記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

(15) 前記エピコラーゲンは、クルマエビ又はボタンエビ由来である前記(13)又は(14)記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【0024】

(16) エピコラーゲンは、そのポリペプチド断片を含有する溶液を含む前記(13)～(15)のいずれか1つに記載のエビアレルゲン感受性測定用試薬。

## 【0025】

50

(17) エピコラーゲン又はそのポリペプチド断片を担持した担体を含む前記(13) ~ (15)のいずれか1つに記載のエピアレルゲン感受性測定用試薬。

【0026】

(18) 更に、標識抗IgE抗体を含む前記(13) ~ (17)のいずれか1つに記載のエピアレルゲン感受性測定用試薬。

【発明の効果】

【0027】

本発明によれば、新規エピアレルゲンを提供し、これを用いて、抗エピアレルゲン抗体、エピアレルゲン混入検査方法、エピアレルゲン混入検査用試薬、エピアレルゲン感受性測定方法、エピアレルゲン感受性測定用試薬等を提供することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明は、エビ尾肉(筋肉)に含まれるコラーゲンがアレルゲンであることを新たに見出したことによる発明である。すなわち、本発明のエピアレルゲンはエピコラーゲン又はそのポリペプチド断片からなる。

【0029】

本発明のエピアレルゲンにおいて用いられる、エピコラーゲンは、例えば、蛭原、入江の方法(蛭原哲也, 入江伸吉: 魚類および無脊椎動物コラーゲン細胞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.)のような公知の技術を用いて得ることができる。すなわち、エビの尾肉(筋肉)等を原料にして、均一化、洗浄液による洗浄、エタノールによる脱脂、ペプシンによる消化・抽出、NaClによる塩析、酢酸溶液可溶化後の透析、の各処理を経ること等によって得ることができる。

20

【0030】

コラーゲンは様々な生物が保有し、その構造や性質は類似している。基本的には分子量約10万のポリペプチド鎖3本から構成され、未変性コラーゲンではそれらがヘリックス構造をとっている。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりゲルに展開すると、ポリペプチド鎖1本の1量体(鎖)、2本の2量体(鎖)、3本の3量体(鎖)にわかれる。ただし、原料組織からの抽出性や得られる分子種(1量体(鎖)、2量体(鎖)、3量体(鎖)の別)は、動物の種類、又は用いる組織によって大きく異なる。

【0031】

本発明において用いられるエピコラーゲンについては、エビ筋肉組織からの抽出時のペプシン消化を2回程度繰り返すことにより、コラーゲン精製分画を容易に得ることができる。そのようにして得られたコラーゲン精製分画には、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動クマシー染色分析において略シングルバンドを示す程度に、コラーゲンの1量体(鎖)が精製されている。

30

【0032】

本発明のエピアレルゲンにおいて用いられる、エピコラーゲンは、上記の方法以外の方法によっても適宜得ることができる。また、エピコラーゲンは、公知の技術を利用して、適宜これを濃縮、精製することができる。

【0033】

原料エビの種類に特に制限はないが、食用エビであるクルマエビ(*Penaeus japonicus*)又はボタンエビ(*Pandalus platyceros*)等を好ましく例示できる。

40

【0034】

本発明のエピアレルゲンにおいては、例えばアレルゲン性、抗体産生能、抗体結合能等の特性において、エピコラーゲンの免疫学的特性を保持するものであれば、そのポリペプチド断片を用いることもできる。すなわち、例えば、抗原-抗体反応の特異性を決定する局所構造であるエピトープは、一般的にそのアミノ酸長は10~数十アミノ酸程度である。したがって、エピコラーゲンにもそのような免疫学的特性を保持する部分ポリペプチド断片が存在するものと考えられる。

【0035】

50

なお、本発明において「免疫学的」とは、当該分野で一般に用いられる用語と同義に用いられ、ヒトに対する免疫性を利用するものだけでなく、例えば、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、サル、ウシ、ニワトリ、モルモット、ラット、マウス等、他の動物に対する免疫性を利用するものも含まれる。

【0036】

本発明のエビアレルゲンにおいては、その免疫学的特性を保持する範囲であれば、可逆的あるいは不可逆的に、他物質と結合させた状態で使用することができる。例えば、樹脂、ガラス、プラスチック、金属、色素分子、放射性物質、蛍光物質、生体高分子、有機材料分子などに結合させた状態で使用することができる。また結合させるものの性状に特に制限はなく、例えば、ゲル状、ナノ粒子状、コロイド状、ビーズ状、多孔質状、プレート状などであってもよい。

10

【0037】

本発明のエビアレルゲンは、以下のように利用することができる。

【0038】

例えば、試料から抽出物を調製し、本発明のエビアレルゲン（エビコラーゲン又はそのポリペプチド断片）を物質的指標にして、前記抽出物中のエビアレルゲン（エビコラーゲン又はそのポリペプチド断片）の存在の有無を検出する。前記試料としては、飲食品又はその原材料等が挙げられる。

【0039】

これによれば、飲食品中にエビアレルゲンの混入があるかどうかを製造業者又はその管理者が簡便に検査することができ、これを製品のパッケージ等に表示することによって、購入者に知らせることができる。そして、エビアレルギー発症履歴を有するか、発症のおそれのある消費者がその飲食品を摂取することを防止することができる。

20

【0040】

なお、コラーゲンは溶化しゼラチンとなっても抗原性が保たれることが知られている。したがって、本発明のエビアレルゲン（エビコラーゲン又はそのポリペプチド断片）を物質的指標にする場合でも、加熱処理された飲食品中のエビアレルゲンとしての抗原性は保たれるものと考えられ、後述する免疫学的検出手段によって簡便に検出することができる。

【0041】

また、本発明のエビアレルゲンは、以下のようにも利用することができる。

30

【0042】

例えば、被験者から採取した生体試料又はその調製物に、本発明のエビアレルゲンを作用させ、前記生体試料又はその調製物に含まれるIgE抗体のうち、前記エビアレルゲンに結合するIgE抗体の量を測定する。これによって、被験者のエビコラーゲンに対する感受性を測定し、又はエビコラーゲンによるアレルギー症状の病態を測定することができる。

【0043】

被験者から採取した生体試料又はその調製物としては、血液、血清、血漿等が挙げられる。

40

【0044】

前記エビアレルゲンに結合するIgE抗体の量を測定する手段としては、例えば、まず、本発明のエビアレルゲンを、マイクロプレートやビーズに固相化しておき、前記生体試料又はその調製物に含まれるIgE抗体のうちその固相に本発明のエビアレルゲンを介して結合するものを、結合せずに溶液中にとどまるものから洗浄操作や、遠心操作により分離し、これをIgE抗体に対する抗体で測定する方法で行うことができる。IgE抗体に対する抗体としては、抗ヒトIgE- $\beta$ -galactosidase標識抗体等が市販されている。

【0045】

上記の測定方法を簡便且つ迅速にできるようにするためには、本発明のエビアレルゲンを含むエビアレルゲン感受性測定用試薬が提供され得る。また、本発明のエビアレルゲン

50

の他に必要とされる任意の試薬を更に含むエビアレルゲン感受性測定用試薬としても提供され得る。他に必要とされる任意の試薬としては、例えば、上記抗ヒトIgE- $\beta$ -galactosidase標識抗体等の標識抗IgE抗体が挙げられる。

【0046】

一方、本発明の抗エビアレルゲン抗体は、本発明のエビアレルゲンを認識する抗エビアレルゲン抗体であり、具体的には、抗血清、IgG画分、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体等の抗エビアレルゲン抗体である。その調製方法としては、当該分野で周知のいずれの技術をも用いることができる。例えば、本発明のエビアレルゲンを免疫動物に投与し、当該動物からの抗血清の採取する。免疫動物としては、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、サル、ウシ、ニワトリ、モルモット、ラット、マウス等が挙げられる。

10

【0047】

本発明の抗エビアレルゲン抗体においては、その免疫学的特性を保持する範囲であれば、可逆的あるいは不可逆的に、他物質と結合させた状態で使用することができる。例えば、樹脂、ガラス、プラスチック、金属、色素分子、放射性物質、蛍光物質、生体高分子、有機材料分子などに結合させた状態で使用することができる。また結合させるものの性状に特に制限はなく、例えば、ゲル状、ナノ粒子状、コロイド状、ビーズ状、多孔質状、プレート状などであってもよい。

【0048】

本発明の抗エビアレルゲン抗体は、以下のように利用することができる。

【0049】

例えば、上述の、試料中のエビアレルゲンの存在の有無を検出する方法において、エビコラーゲン又はそのポリペプチド断片の存在の有無を検出する手段として、本発明の抗エビアレルゲン抗体を用いた免疫学的検出手段を用いることができる。

20

【0050】

免疫学的検出手段はELISA法やイムノクロマト法等をはじめとして各種の方法が広く普及しており、当該分野の当業者であれば、公知の技術を適宜利用することに困難はない。

【0051】

上記の検査方法を簡便且つ迅速にできるようにするためには、本発明の抗エビアレルゲン抗体を含むエビアレルゲン混入検査用試薬が提供され得る。また、本発明の抗エビアレルゲン抗体の他に必要とされる任意の試薬を更に含むエビアレルゲン混入検査用試薬としても提供され得る。更に、他に必要とされる任意の試薬としては、例えば、抗エビアレルゲン抗体を認識する抗IgG Fcフラグメント抗体等、抗IgG 2次抗体が挙げられる。

30

【実施例】

【0052】

以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0053】

<製造例1> クルマエビコラーゲンの精製

クルマエビの尾肉より、蛭原、入江の方法（蛭原哲也，入江伸吉：魚類および無脊椎動物コラーゲン細胞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.）に従い、以下のようにしてコラーゲンを精製した。

40

【0054】

エビ尾肉を氷冷した洗浄液（0.1 $\mu$ M N-ethylmaleimide，10 $\mu$ M PMSF，1mM EDTA，25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>；用時調整）の中に入れ、ガラスホモジナイザーで均質化した。この溶液を10000 rpm（15000 $\times$ g）、10分間、4 で遠心し（以下の遠心操作も、特に記載のない場合はこの遠心条件による。）、沈殿に洗浄液を加えて3～10時間攪拌した。再度遠心し、沈殿に洗浄液を加えて攪拌、この洗浄工程を5～7回繰り返した。上清のタンパク質濃度が10 $\mu$ g/ml以下になったことを確認し、沈殿に約10倍量の冷エタノールを加え約3時間

50

攪拌、上清が透明になるまで数回繰り返した。この脱脂沈殿に約10倍量の1mg/mlペプシン 0.5M酢酸(抽出液)を加え、一晚攪拌した。これを遠心してその上清を回収した。また、遠心後の沈殿には再度抽出液を加えて同様に抽出を行った。遠心後の上清を合わせて、これに終濃度2MになるようにNaClを加え、一晚攪拌した。これを遠心して、その沈殿に約10倍量の0.05M酢酸を加え溶解させた後、再度遠心し、その上清を透析膜(PIERCE社製、Rockford, IL)に入れ、0.005M Tris-HCl, pH7.5 に対して一晚透析し、更に、透析外液のpHが7.5に安定するまで繰り返し透析を行った。透析後、遠心し、その沈殿に約10倍量の0.05M酢酸を加え溶解させ、再度遠心した。この上清を回収、0.005M酢酸に対して一晚透析後、20分間遠心し、その上清(クルマエビコラーゲン精製物)を得た。

10

## 【0055】

得られた上清を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に処し、クマシー染色を行った。その結果を図1に示す。

## 【0056】

コラーゲンは様々な生物が保有し、その構造や性質は類似している。基本的には分子量約10万のポリペプチド鎖3本から構成され、未変性コラーゲンではそれらがヘリックス構造をとっている。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりゲルに展開すると、ポリペプチド鎖1本の1量体(鎖)、2本の2量体(鎖)、3本の3量体(鎖)にわかれる。

## 【0057】

20

図1に示すように、分子量マーカーとの対比から、得られた上清からは約120キロダルトン(kDa)のバンドが主要バンドとして認められ、これがコラーゲンの1量体(鎖)であると考えられた。また、コラーゲンの2量体(鎖)、3量体(鎖)に相当するバンドはわずかに認められるのみであった。その他に42kDa付近にごくわずかなバンドが認められた。

## 【0058】

## &lt;試験例1&gt; エビアレルゲン夾雑物質の確認

エビアレルギー患者の多くはエビトロポミオシン(TMS)とエビアルギニンキナーゼ(AK)の両方あるいはいずれかに対する特異的IgE抗体を保有する。

## 【0059】

30

そこで、抗エビトロポミオシン抗体(マウス由来)、及び抗エビアルギニンキナーゼ抗体(マウス由来)を用いて、製造例1のクルマエビコラーゲン精製物中に、これらが夾雑物質として混入していないかどうかを以下のようにして調べた。なお、これらの抗体はつぎのように作製した。すなわち、大正エビ(クルマエビ属)の尾肉を煮沸し、その抽出液を硫酸塩析した後、陰イオン交換カラムおよびハイドロキシアパタイトカラムを用いてエビトロポミオシンを単離した。この精製トロポミオシンをアラム(アジュバント)とともにマウスに免疫し、常法に従い抗エビトロポミオシン抗体(マウス抗血清)を得た。また、クルマエビ尾肉のホモジネイトを作製し、硫酸塩析後、ニッケルキレートカラムを用いてアルギニンキナーゼを単離した。この精製アルギニンキナーゼをアラム(アジュバント)とともにマウスに免疫し、常法に従い抗エビアルギニンキナーゼ抗体(マウス抗血清)を得た。

40

## 【0060】

製造例1のクルマエビコラーゲン精製物を、0.05M炭酸-重炭酸緩衝液, pH9.6で10µg/mlに調製し、96穴平底マイクロプレートの1ウェル中に100µl(約1µg)ずつ添加し、4一晚静置し、固相化した。PBSTで3回洗浄後、上記エビ主要アレルゲン抗体(マウス抗血清)(抗TMS、抗AK、各25000倍)を室温で60分間反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ(Alp)標識抗マウスIgG抗体(2000倍)を室温で60分間反応させた。洗浄後、1mg/ml p-nitro phenyl phosphateを室温で15分間反応させた。0.2M EDTAを加えて反応を停止し、405nmで吸光度を測定した。また、それぞれの抗体についての陽性コントロールとして、エビトロポミオシン(TMS)とエビアルギニンキナーゼ(

50

AK)を96穴平底マイクロプレートの1ウェル中にそれぞれ約0.1 µg含まれるように固相化し、同様に測定した。その結果を表1に示す。

【0061】

【表1】

エビ主要アレルゲン抗体	固相化抗原			
	blank	クルマエビコラーゲン*	エビ主要アレルゲン#	
抗トロポミオシン (TMS)	0.08	0.08	>2.0 (TMS)	10
抗アルギニンキナーゼ (AK)	0.079	0.08	>2.0 (AK)	

\*クルマエビコラーゲンは10 µg/mlで固相化、

#エビ主要アレルゲンは1 µg/mlで固相化：TMS(トロポミオシン)、AK(アルギニンキナーゼ)の2種のエビ主要アレルゲン抗体(マウスポリクロ)はそれぞれ1：25000で反応、抗マウスIgG A1-p標識抗体とpNPPで検出。

【0062】

表1に示すように、製造例1のクルマエビコラーゲン精製物は、抗エビトロポミオシン抗体(マウス抗血清)、及び抗エビアルギニンキナーゼ抗体(マウス抗血清)に対しては全く反応性を有さず、2種の抗体のエビコラーゲンへの反応量(吸光度)は、それぞれblankと等しかった。

20

【0063】

以上の結果、及び上述のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から、製造例1のクルマエビコラーゲン精製物には、エビトロポミオシン(TMS)やエビアルギニンキナーゼ(AK)の混入はなく、エビコラーゲンのアレルゲン性を評価するために十分に精製されていると判断された。

【0064】

<試験例2>クルマエビコラーゲンの同定

製造例1で得られたタンパク質がコラーゲンであることを確認するために、未変性コラーゲンのヘリックス構造に特異的に結合する色素であるSirius-redによる染色を行った。具体的には、製造例1のクルマエビコラーゲン精製物について、コラーゲン同定キットである「Sircol Collagen Assayキット」(商品名、英国Biodye science社製、Northern Ireland)を用いて、Sirius-redによる染色の程度を測定した。また、加熱処理(変性)したものについても同様に測定した。図2にはその結果を示す。

30

【0065】

図2に示すように、非加熱(未変性)の試料は色素Sirius-redで染色されたが、加熱処理(変性)の試料では染色性が大きく低下した。この結果はウシコラーゲンの結果と同様であった。

【0066】

コラーゲンのアミノ酸組成は極めて特徴的でグリシンが多く、疎水性アミノ酸が少なく、チロシンがほとんど含まれていないため、280nmの吸収がほとんど認められない。そこで、図3には、製造例1で得られたタンパク質(クルマエビコラーゲン)の紫外線吸収特性について、ウシコラーゲン及びBSA(ウシ血清アルブミン)の紫外線吸収特性と比較した。具体的には、製造例1のクルマエビコラーゲン精製物とウシのコラーゲン及びBSAを、それぞれ1mg/mlの濃度に精製水で調整し、240-300nmの波長での紫外線吸収特性を比較した。

40

【0067】

図3に示すように、BSAは280nmに明瞭な吸収ピークを認めたのに対し、製造例1のクルマエビコラーゲン精製物、又はウシコラーゲンでは280nmに吸収ピークを認めなかった。

【0068】

50

以上から、製造例 1 で得られたタンパク質がコラーゲンであることが確認された。

【 0 0 6 9 】

<製造例 2> ボタンエビコラーゲンの精製

ボタンエビの尾肉より、製造例 1 と同様にしてコラーゲンを精製した。その結果、クルマエビコラーゲンと同様の特性を有する、分子量約120キログルトン ( k D a ) のボタンエビコラーゲンを精製することができた。

【 0 0 7 0 】

<試験例 3> エビコラーゲンのアレルギー性

エビアレルギー患者 ( エビCAP RAST陽性 2 3 例 ) の血清中で、エビコラーゲンに対する I g E 抗体の発現量が増加しているかどうかを調べる目的で、以下のようにして、間接ELISA法による測定を行った。なお、上記エビアレルギー患者は、エビの摂食で口唇浮腫やじん麻疹、また接触皮膚炎 ( 調理中 ) などのアレルギーを発症した経験があり、その血清は、市販のアレルギー I g E 抗体検査キット ( CAP-RAST ) での判定で陽性である。

【 0 0 7 1 】

製造例 1 又は製造例 2 で得られたエビコラーゲンを、 0 . 0 5 M 炭酸-重炭酸緩衝液、p H 9.6 で 1 0 μ g / m l に調製し、 9 6 穴平底マイクロプレートの 1 ウェル中に約 1 μ g 含まれるように固相化した。PBST ( PBS, 0.05% Tween 20 ) で 3 回洗浄後、エビアレルギー患者の血清を 1% BSA-PBST で 5 倍に希釈して分注し、室温で 3 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、抗ヒト I g E - -galactosidase 標識抗体 ( 「CAP RAST FEIA キット」 ( 商品名 ) 、ファディア株式会社製 ) を 1 % BSA-PBST で 15 倍希釈して分注し、 4 で一晩反応させた。PBST で 3 回洗浄後、0.3mM 4-Methylumbelliferyl- -D-galactopyranoside を加え、 3 7 の恒温槽中で 9 0 分間反応させた。最後に 0.1M Glycine-NaOH、pH 10.2 を加えて反応を停止させた。蛍光単位 ( FU ) は、マイクロプレートリーダー 「Fluoroskan II」 ( 商品名、米国 Titertek 社製 ) を用いて測定し、100 蛍光単位 ( FU ) 以上を抗体陽性とした。

【 0 0 7 2 】

その結果を表 2 に示す。

【 0 0 7 3 】

【表 2】

コラーゲン I g E ( > 100FU )		
コラーゲン	陽性数 / n	陽性率 (%)
クルマエビ	8 / 23	35
ボタンエビ	5 / 23	22

【 0 0 7 4 】

表 2 に示すとおり、抗原としてクルマエビコラーゲンをを用いた場合には、エビアレルギー患者 2 3 例のうち 8 例 ( 3 5 % ) が抗体陽性であった。また、抗原としてボタンエビコラーゲンをを用いた場合には、エビアレルギー患者 2 3 例のうち 5 例 ( 2 2 % ) が抗体陽性であった。

【 0 0 7 5 】

以上から、一部のエビアレルギー患者 ( エビCAP RAST陽性 2 3 例 ) の血清で、エビコラーゲンに対する I g E 抗体の発現量が増加していることが明らかとなった。したがって、エビコラーゲンがエビアレルギー症状の原因物質のひとつであることが示唆された。

【 0 0 7 6 】

<試験例 4> 他の動物由来のコラーゲンとの交差反応性

コラーゲンは様々な生物が保有し、その構造や性質は類似している。また、Sakaguchi

らは魚アレルギー患者の魚ゼラチン I g E 抗体陽性率は約 30%であったと報告している（上記非特許文献 6 参照。）。

【0077】

そこで、試験例 3 で示されたエビコラーゲンのアレルギー性が、エビアレルギー患者の血清中に存在する他の動物由来のコラーゲンに起因する I g E 抗体との反応によるものではないことを確認するために、エビコラーゲンの交差反応性について調べた。具体的には、サバとウシのコラーゲンをを用いた抑制法 ELISA によって、エビアレルギー患者の血清中に存在するコラーゲン I g E 抗体の特異性について検討した。

【0078】

まず、製造例 1 で得られたクルマエビコラーゲンを、0.05 M 炭酸-重炭酸緩衝液、pH9.6 で 10 µg/ml に調製し、96 穴平底マイクロプレートの 1 ウェル中に約 1 µg 含まれるように固相化した。別の試験管に製造例 1 で得られたクルマエビコラーゲンと、サバとウシのコラーゲンの各々について、20 µg/ml から、4 µg/ml、0.8 µg/ml と段階的に希釈した溶液を用意し、5 倍に希釈したコラーゲン I g E 陽性プール血清（試験例 3 での陽性者 3 例の血清を混合したもの）を等量加えて混合、4 時間で一晩反応させた。コラーゲン固相化プレートを PBST で 3 回洗浄後、試験管に作製したコラーゲンと血清の混合液を 100 µl ずつ分注し室温で 3 時間反応させた。以後は、試験例 3 と同様にして測定を行った。抑制率は次式により求めた。

・抑制率 (%) = (抑制剤未添加穴の FU / 抑制剤添加穴の FU) ÷ 抑制剤未添加穴の FU × 100

【0079】

その結果を図 4 に示す。図 4 に示すとおり、抑制剤にエビコラーゲンをを用いた場合には、固相化クルマエビコラーゲンと血清との反応が濃度依存的に抑制された。これに対し、サバやウシのコラーゲンを抑制剤に用いた場合には全く抑制されなかった。

【0080】

以上から、エビコラーゲンは、他種コラーゲンとの交差反応性が低いアレルギーであることが明らかとなった。また、試験例 3 で示されたエビコラーゲンのアレルギー性が、エビアレルギー患者の血清中に存在する他の動物由来のコラーゲンに起因する I g E 抗体との反応によるものではなく、エビコラーゲン特異的な I g E 抗体の発現量の増加によるものであると考えられた。

【0081】

<実施例 1> エビコラーゲン特異的 I g E 抗体保有者の検出

一般成人 175 例におけるエビ又はサバのコラーゲンに対する I g E 抗体保有状況を調べた。具体的には、各被験者から血清を採取し、試験例 3 と同様にして、陽性者を検出した。その結果を表 3 に示す。

【0082】

10

20

30

【表 3】

血清 no.	コラーゲンIgE(FU)		症状	原因食品	
	クルマエビ	サバ			
1	833	2350	じん麻疹	エビ, カニ	
2	793	-	じん麻疹	エビ	
3	106	-	口唇浮腫	エビ, カニ	
4	-	3849	じん麻疹	かまぼこ	10
5	-	328	不明	不明	
6	-	163	アナフィラキシー	そば	
陽性数(≥100FU)	3	4			
陰性数	172	171			
陽性率(%)	1.7	2.3			

## 【0083】

表3に示すように、IgE抗体陽性者はクルマエビで3例(1.7%)、サバで4例(2.3%)であった。エビとサバの抗体値間には相関が認められず、両者にIgE抗体を保有したのは1例のみであった。また、エビコラーゲンIgE抗体を保有した3例はいずれもエビやカニの摂食によりじん麻疹や口唇浮腫などの経験を持っていた。

## 【0084】

以上のように、エビアレルギー発症者と、エビコラーゲンIgE抗体保有者との相関が認められることから、アレルゲンとしてのエビコラーゲンや、これを用いて作製することができる抗エビアレルゲン抗体等を、エビアレルギーの測定等に応用することができることが明らかとなった。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0085】

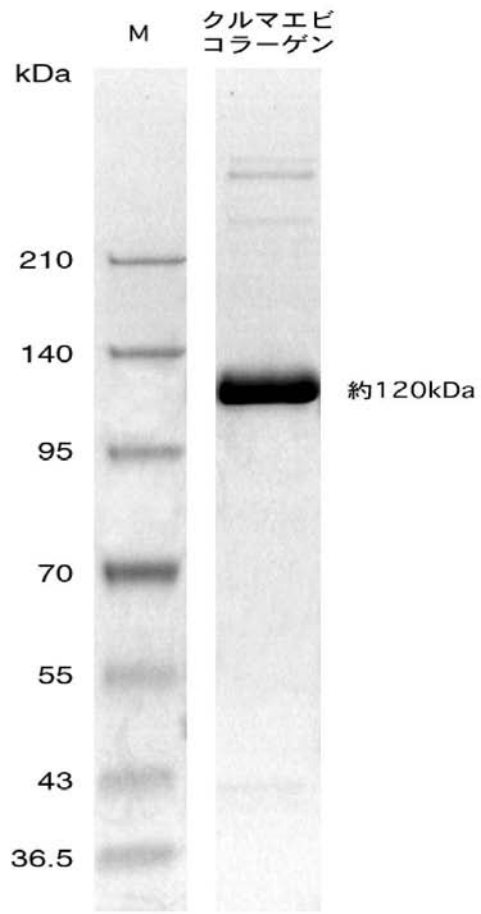
【図1】製造例1のクルマエビコラーゲン精製物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に処しクマシー染色した写真である。

【図2】未変性コラーゲンヘリックス構造に特異的に結合する色素であるSirius-redによる染色を行った結果を示す図表である。

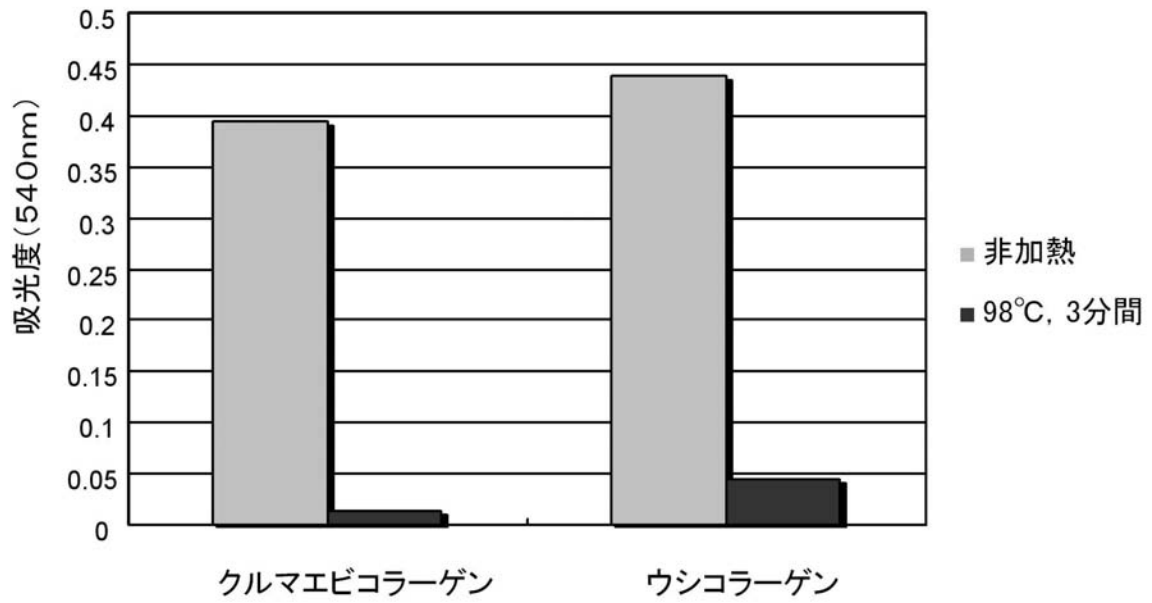
【図3】製造例1で得られたクルマエビコラーゲンの紫外線吸収特性を、ウシコラーゲン及びBSA(ウシ血清アルブミン)の紫外線吸収特性と比較した結果を示す図表である。

【図4】エビ、サバおよびウシのコラーゲンを抑制剤に用いた抑制法ELISAの結果を示す図表である。

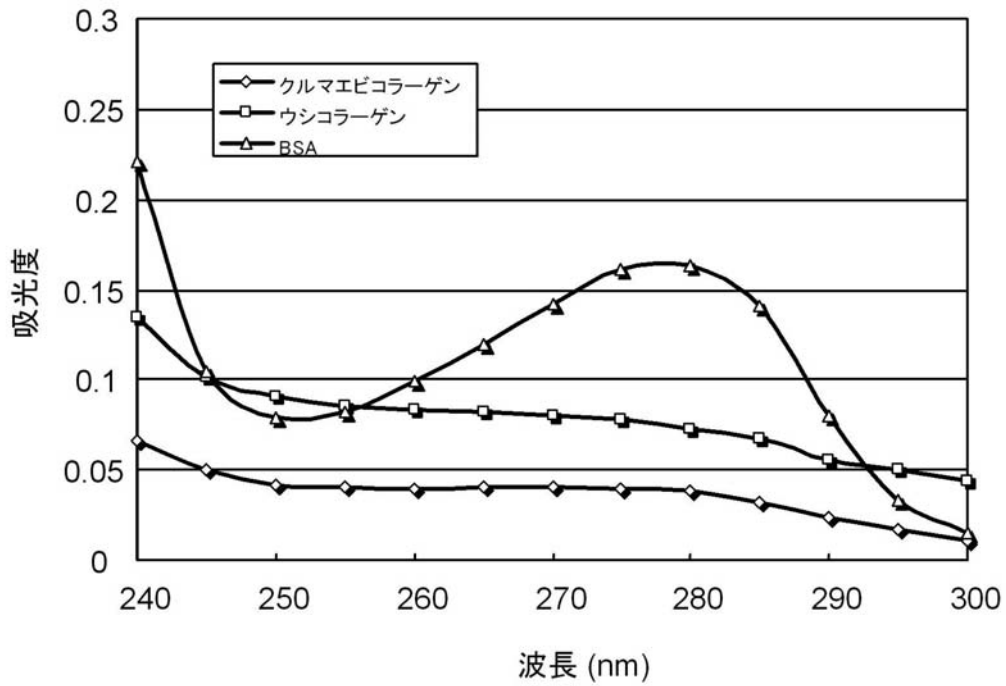
【図1】



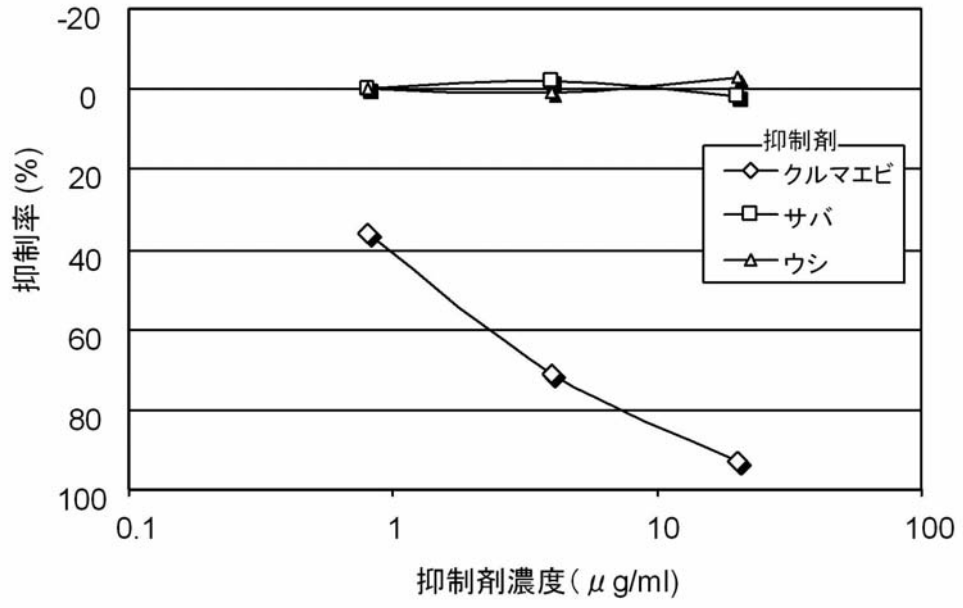
【 図 2 】



【 図 3 】



【図4】



## フロントページの続き

- (72)発明者 宮澤 博  
東京都立川市一番町5 - 5 - 3 - 404
- (72)発明者 阪口 雅弘  
東京都町田市成瀬台3 - 35 - 14
- (72)発明者 藤村 孝志  
千葉県千葉市中央区青葉町1252 - 6 ハイツ青葉の森 202
- (72)発明者 白井 秀治  
東京都練馬区高松4 - 21 - 30 - 302

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 Eur. Food Res. Technol., 2003年, vol.217, no.4, p.277-280  
Comp. Biochem. Physiol., 1968年, vol.27, no.1, p.127-132  
Comp. Biochem. Physiol., 1970年, vol.35, no.2, p.471-477  
Comp. Biochem. Physiol., 1991年, vol.98B, no.1, p.59-65  
Comp. Biochem. Physiol., 1982年, vol.73B, no.2, p.301-304  
Comp. Biochem. Physiol., 1968年, vol.64B, no.4, p.381-385  
アレルギー, 2002年, vol.51, no.9-10, p.1022 [464]  
アレルギー, 2003年, vol.52, no.8-9, p.875 [201]  
アレルギー, 2005年, vol.54, no.3-4, p.403 [330]  
アレルギー, 2005年, vol.54, no.8-9, p.1013 [25]  
J. Allergy Clin. Immunol., 1997年, vol.100, no.2, p.229-234  
Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001年, vol.65, no.2, p.285-291  
日本水産学会誌, 2005年, vol.71, no.4, p.527-530

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 14/78  
G01N 33/53 - 33/577  
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
G - Search

专利名称(译)	虾过敏原和抗虾过敏原抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP4444306B2</a>	公开(公告)日	2010-03-31
申请号	JP2007098969	申请日	2007-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	马萨希罗·萨卡圭奇 藤村隆 伊蒂股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	宫泽 博 坂口昌弘 藤村隆 ITEA株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	宫泽 博 坂口昌弘 藤村隆 ITEA株式会社		
[标]发明人	宫泽博 阪口雅弘 藤村孝志 白井秀治		
发明人	宫泽 博 阪口 雅弘 藤村 孝志 白井 秀治		
IPC分类号	C07K14/78 G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/35 A61P37/00 C07K14/43509 C07K16/18 G01N33/68 G01N33/6854 G01N2333/43508		
FI分类号	C07K14/78 G01N33/53.Q G01N33/53.D G01N33/53.N C07K16/18 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/HA07		
代理人(译)	松井 茂		
其他公开文献	JP2008255054A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供新的虾过敏原和抗虾过敏原抗体。ŽSOLUTION：虾过敏原包括虾胶原蛋白或其多肽片段。新的虾过敏原用于提供抗虾过敏原抗体，用于检测虾过敏原污染的方法，用于检测虾过敏原污染的试剂，用于测量对虾过敏原的敏感性的方法和用于测量的试剂对虾过敏原的敏感性。Ž

---

コラーゲンIgE(>100FU)

---

コラーゲン	陽性数/n	陽性率(%)
クルマエビ	8/23	35
ボタエビ	5/23	22

---