

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-239885

(P2004-239885A)

(43) 公開日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/531

GO 1 N 33/53 Q

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/53 V

GO 1 N 33/531 B

GO 1 N 33/543 5 4 5 Z

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2003-71553 (P2003-71553)  
 (22) 出願日 平成15年3月17日 (2003.3.17)  
 (31) 優先権主張番号 特願2002-362003 (P2002-362003)  
 (32) 優先日 平成14年12月13日 (2002.12.13)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000006116  
 森永製菓株式会社  
 東京都港区芝5丁目3番1号  
 (74) 代理人 100062007  
 弁理士 川口 義雄  
 (74) 代理人 100105131  
 弁理士 井上 満  
 (74) 代理人 100113332  
 弁理士 一入 章夫  
 (74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠  
 (74) 代理人 100103920  
 弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イオン性界面活性剤存在下における免疫測定法

## (57) 【要約】

【解決手段】高濃度のイオン性界面活性剤で試料を抽出することを特徴とする、試料中に含まれるオボムコイド等の所定のタンパク質の免疫測定法を提供する。

【効果】該免疫測定法を用いることにより、所定のタンパク質の抽出効率が顕著に改善されるとともに、引き続き免疫測定での抗原 - 抗体反応が維持され、結果として測定系全体の感度が飛躍的に向上する。また当該方法においてはイオン性界面活性剤の除去 / 希釈が必要とされないため測定方法全体を簡便化し得る。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

0.1 から 10% (w/v) のイオン性界面活性剤を含む溶液中のオボムコイド、カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質及び落花生タンパク質からなる群から選択されるタンパク質を測定する免疫測定法。

## 【請求項 2】

イオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、ラウリルサルコシンナトリウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルピリジニウムから成る群より選択される請求項 1 に記載の免疫測定法。

10

## 【請求項 3】

酵素免疫測定法である請求項 1 または 2 に記載の免疫測定法。

## 【請求項 4】

固相サンドイッチ法である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法。

## 【請求項 5】

抗オボムコイド抗体、抗カゼイン抗体、抗 $\beta$ -ラクトグロブリン抗体、抗そばタンパク質抗体、抗小麦タンパク質抗体または抗落花生タンパク質抗体を含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法に用いるキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

20

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、検体に含まれるオボムコイド、カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質及び落花生タンパク質等の簡便かつ高感度な免疫測定法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

食品の安全性への関心が、近年、益々高まっている。特に食物アレルギーは、重度の場合、重篤な全身性アナフェラキシー（咽頭の水腫、重度の喘息或いは低血圧等）を引き起こし、時には致命的な障害をもたらす場合もあるため、これらの食物アレルギー症状を有する消費者のみならず食品製造業者・監督官庁にとっても食品の安全性を保全する立場から極めて重要な課題である。現在、当該食物アレルギーによる症状の発生を防止する最も有効な方法は、それらの食物アレルギー発症履歴を有するか潜在的に有する対象者がその食物アレルゲンと接触することを防止するものであるが、厚生労働省は、当該観点から「アレルギー物質を含む食品については、特定のアレルギー体質を持つ方の健康危害の発生を防止する観点から、食物アレルギーを引き起こすことが明らかになった食品のうち、特に発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高い小麦、そば、卵、乳及び落花生の 5 品目（以下「特定原材料」という。）を食品衛生法施行規則（昭和 23 年厚生省令第 23 号。以下「規則」という。）別表第 5 の 2 に掲げ、これらを含む加工食品については、規則第 5 条に定めるところにより当該特定原材料を含む旨を記載しなければならない」とし、当該 5 品目を含む食品に対してそれら原材料を含む旨の表示を製造者に義務づけている。また、消費者の商品選択の幅を不当に狭めることのないよう、当該表示においては、「入っているかもしれません。」「入っている恐れがあります。」などの可能性表示を禁止し、製品への「特定原材料」混入の監視・検査義務を明確にしている。更に、食品を生産する際に、原材料としては使用していないにも関わらず、特定原材料等がごく微量混入（コンタミネーション）してしまう場合にも当該混入が必ず起こり得るならば表示を必要とし、消費者の高度の安全を確保する立場から原則として数  $\mu\text{g}/\text{g}$  以上程度の混入についても表示するよう求めている。従って、食品製造業者は、上記施行規則を遵守するのは勿論のこと、更なる消費者の安全と適切な商品選択の機会を提供すべく、自らの製品について十分な監視と高い測定感度での検査を行うことが望まれている。

30

40

## 【0003】

このような高度の検査を達成する検査方法としては、PCR を用いた特異的遺伝子の増幅

50

に基づく検査法があげられるが、当該方法は、現在までのところ、熟練した技術と高い費用や比較的長い検査時間を要し、製造現場での迅速且つ簡便な検査という観点から不利益がある。そこで、現時点において当該検査を実行する際の他の最も有効な選択肢として、上記食品原材料に由来する成分に対する抗体を利用した免疫学的検査方法（免疫測定法）が注目され、一部実用化されている。特に、免疫測定法はE L I S A法等として広く普及しており、その操作も高度の熟練を必要とせず、精度のよい結果も短時間で得られるので、当該検査の目的には好適である。

#### 【0004】

しかしながら、たとえ上記免疫測定法を用いたとしても、卵、乳、小麦、そば、或いは落花生等からなる食品原材料は、その組成や、形態、製造方法が一様でなく、更にはこれらの原材料が引き続く食品加工の段階で変性・難溶化することもあり、完成した加工食品中に含まれるこれらの多種多様な形態をとりうる食品原材料を、少なくとも $10\mu\text{g}/\text{g}$ という極めて高感度で検査するのは容易でない。しかして、当該免疫測定法に用いる抗体の特異性と抗原結合能を飛躍的に向上させる努力が精力的になされており、本出願人は、そのような極めて高感度の測定を実現する抗体に関し、特願2002-130986号等の特許出願を行っている。当該抗体等の使用は、ある種の食品原材料の測定感度を飛躍的に向上させることに成功したが、より高い測定感度を得るためには、測定用抗体の改良のみならず、加工食品等からの抗原の抽出法を含めた免疫測定系全体を改良していく必要がある。とりわけ、測定対象となる抗原タンパク質が、完成した加工食品中において他の固形成分と強固に結合している場合等には、該タンパク質が固形成分から抽出され難いために十分な感度で測定ができない場合があり、特に小麦を使用した製品（例えばビスケット）中に含まれるタンパク質は、小麦由来のグルテンと極めて強固に結合しているため、通常のタンパク質の抽出に使用される非イオン性界面活性剤であるT w e e n含有水溶液ではこれらを十分に抽出できず、その測定感度が低下する原因となると考えられる。

#### 【0005】

一方で、ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）などのイオン性界面活性剤は、タンパク質に対し極めて高い親和性をもち、水に難溶性の物質、特に生体膜タンパク質を水に可溶化させるために汎用される界面活性剤である。したがって、上記のような難溶性タンパク質を食品から抽出する場合において、比較的高濃度のイオン性界面活性剤を用いることにより、抗原タンパク質の抽出効率を改善し得ることが期待できる。しかしながら、測定試料にイオン性界面活性剤が含まれている場合には、該界面活性剤が抗原抗体反応を阻害することが知られており、たとえば特許文献1には、イオン性界面活性剤であるS D Sの免疫反応溶液中の好ましい濃度は $0.01\sim 0.1\%$ （w/v）であるとされている。したがって、S D S等のイオン性界面活性剤の比較的高濃度で抽出した抽出液中のタンパク質を従来の免疫測定法により測定する場合には、予め該抽出液から該界面活性剤を除去するか、或いはこれを十分に希釈して、イオン性界面活性剤の濃度を免疫反応に悪影響を与えない程度まで低下させる必要がある。

#### 【0006】

上記のイオン性界面活性剤除去方法に関しては、当該抽出液を、1)セロハンチューブなどを用いて透析する、2)遠心濃縮器などを用いて界面活性剤を含まない溶液に置換する、3)ゲル濾過やイオン交換クロマトグラフィーによって界面活性剤を含まない溶液に置換する、4)化学物質を添加して界面活性剤のみを沈殿させる方法などが慣用される。しかしながら、イオン性界面活性剤は、タンパク質と容易にミセルを形成するため、界面活性剤のみを除くことは非常に困難である場合が多く、上記の除去処理を行うことによって、目的とするタンパク質の回収率が著しく低下する原因となる。また、比較的高濃度のイオン性界面活性剤を使用してより高い抽出効率を達成したとしても、当該イオン性界面活性剤の濃度低下のみのために抽出液全体を大幅に希釈したのでは、測定すべき抽出タンパク質の濃度も同時に低下して、結局、引き続き免疫反応における検出感度が一向に向上しない。すなわち、一般に、抗原タンパク質を効率よく試料から抽出するためのイオン性界面活性剤の使用は、引き続き免疫反応を有効に行わせることとは両立しないものと考えら

10

20

30

40

50

れていたのである。

【0007】

【特許文献1】

特開平9-77798号公報(第6頁、左欄、第0033段落)

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明は、極めて高感度で検出・測定することが要求される特定の抗原タンパク質を、試料からの高い抽出効率を維持したままで、引き続き免疫反応により鋭敏かつ簡便に検出する方法を提供するものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

今や、免疫測定法を用いて抽出液中のオボムコイド、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質又は落花生タンパク質濃度を測定する場合、一般的に考えられていたこととは異なり、高濃度のイオン性界面活性剤の存在下でも当該測定における抗原抗体反応が阻害されない、との驚くべき知見が得られた。本発明者は、かかる知見に基き、高感度かつ簡便なオボムコイド、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質及び落花生タンパク質に代表されるタンパク質の免疫測定法を完成させた。即ち、本発明によれば、試料中に含有されるオボムコイド、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質及び落花生タンパク質等のタンパク質を比較的高濃度のイオン性界面活性剤溶液(タンパク質抽出用溶液)によって抽出し、得られた抽出液の溶媒置換或いは溶液希釈を行うことなく、直接、免疫測定法によってそれらのタンパク質を測定することを特徴とする高感度かつ簡便な免疫測定法および該測定法に使用する測定キットが提供される。

【0010】

したがって、本発明の第1は、

(1) 0.1から10%(w/v)のイオン性界面活性剤を含む溶液中のオボムコイド、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質及び落花生タンパク質からなる群から選択される一のタンパク質を測定する免疫測定法である。

【0011】

上記イオン性界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、ラウリルサルコシナトリウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルピリジニウムを例示できる。したがって、本発明の第2は、

(2) イオン性界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、ラウリルサルコシナトリウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルピリジニウムから成る群より選択される上記(1)の免疫測定法である。

【0012】

また、本発明の免疫測定法は、例示的に、酵素免疫測定法や固相サンドイッチ法にも応用することができ、更に本発明の免疫測定法は、簡便にはキットの形態の試薬類を用いて行うことができる。したがって、本発明の第3乃至5は、

(3) 酵素免疫測定法である上記(1)または(2)の免疫測定法、

(4) 固相サンドイッチ法である上記(1)から(3)のいずれかに記載の免疫測定法、および

(5) 抗オボムコイド抗体、抗カゼイン抗体、抗 $\alpha$ -ラクトグロブリン抗体、抗そばタンパク質抗体、抗小麦タンパク質抗体又は抗落花生タンパク質抗体を含む上記(1)から(4)のいずれかの免疫測定法に用いるキットである。

【0013】

【発明の実施の形態】

(試料中に含まれるオボムコイド、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、

10

20

30

40

50

小麦タンパク質、落花生タンパク質の測定法)

本発明の方法においては、上記抗原タンパク質の試料からの効率的な抽出のために、0.1~10%(w/v)、好ましくは0.3~10%(w/v)のイオン性界面活性剤を含むタンパク質抽出用溶液で測定対象となる各種試料を抽出する。たとえば、試料を必要に応じて粉碎した後、これに上記イオン性界面活性剤を含むタンパク質抽出用溶液を加えて、試料に含有される抗原タンパク質を抽出する。当該抽出用溶液には、所望により、不溶性成分とジスルフィド結合したタンパク質を可溶化させるために該検体希釈液に2-メルカプトエタノールなどの還元剤を加えることもでき、また、リン酸緩衝液等を加えてそのpHを調整してもよい。

【0014】

1つの具体例においては、測定対象である食品試料に対して20倍抽出となるように上記のタンパク質抽出用溶液を加え、これを常温にて家庭用ミキサー等を用いて約30秒間ホモジナイズする。その後、得られた抽出液に対して常温にて3000xgで遠心分離を行いその上清を分取するか、または所望により分取した上清を更にNo.5Aの濾紙等を用いて濾過して測定試料溶液を得る。

【0015】

次いで、得られた測定試料溶液を直接の対象にするか、或いは当該溶液中に存在する抗原タンパク質の濃度が著しく低下しない程度に希釈した溶液を対象にして免疫測定法を実施し、該抽出液等中のオボムコイド、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質或いは落花生タンパク質濃度を測定する。免疫測定法は、例えばプレート上に固相化した1次抗体に、測定試料溶液中の抗原タンパク質を反応させ、次いで、生成された抗原-1次抗体複合体に酵素標識した二次抗体を更に反応させ、標識酵素の作用による基質の発色反応で固相に結合した酵素活性を測定する酵素免疫測定法、或いはラジオアイソトープで標識された抗原を用いるラジオイムノアッセイ法などの公知の免疫測定法を用いて実施できる。そして、本発明のオボムコイド、カゼイン、 $\alpha$ -ラクトグロブリン、そばタンパク質、小麦タンパク質、落花生タンパク質の測定系においては、試料抽出の際のタンパク質抽出用溶液に由来する比較的高濃度のイオン性界面活性剤の存在にも拘らず、引き続き免疫測定においてこれらの抗原タンパク質と抗体との反応が該界面活性剤により実質的に阻害されることがない。また、該測定系では、高濃度のイオン性界面活性剤を除去し或いはこれを希釈するという余剰の工程が省略し得る。

【0016】

更に本発明の好ましい態様の一つであるEIAによる固相サンドイッチ法についてより詳細に説明すると、該方法では、まず、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどの酵素で標識した抗体を調製する。また、使用する固相には標的とする抗原を認識する抗体を吸着させておく。次に固相の抗体非吸着面に対し、その反応系には影響しないタンパク質、例えばウシ血清アルブミンなどでブロッキング処理を行う。なお、上記で用いられる抗体やその適用量は、所望とする検出感度に応じて、適宜、選択・調整することができる。

【0017】

次いで、上記のようにして調製した測定試料溶液と、所望により測定のスタンダードを上記の固相に添加し、第一ステップの抗原抗体反応を行わせる。反応後、固相を洗浄し、上述の酵素標識抗体を添加して固相化抗体と反応した抗原と、第二ステップの抗原抗体反応を行わせる。なお、試料またはスタンダードと酵素標識抗体を同時に添加することも可能である。過剰の酵素標識抗体を洗浄操作で除去した後、使用した酵素に応じた発色基質、例えば1,2-フェニルジアミンと $H_2O_2$ 、p-ニトロフェニルリン酸、2-ニトロフェニル-D-ガラクトシド、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を反応系に加えてこれらを酵素と反応させる。基質の発色は、酵素量、ひいては試料中の抗原量に依存するため、発色最終産物の量を測定することにより、標的とする抗原を定量することが出来る。

【0018】

固相サンドイッチ法において、標識酵素 - 発色基質の組合わせを、標識酵素 - 生物発光基質または化学発光基質、標識酵素 - 蛍光基質などの組合わせに変えることが可能である。この場合、酵素 - 発光基質の代表的な組合わせは、アルカリフォスファターゼ - AMP P D、ホースラディッシュペルオキシダーゼルミノール、ルシフェラーゼ - ルシフェリンなどがあり、酵素 - 蛍光基質の代表的な組合わせは、アルカリフォスファターゼ - ウンベリフェリルフォスフェート、ホースラディッシュペルオキシダーゼ - p - ハイドロキシフェニルプロピオン酸などがある。

#### 【0019】

更に、酵素に代えて放射性物質や化学発光物質或いは蛍光物質で直接或いは間接的に標識された抗体や抗原を用い、放射能や発光、蛍光の強度を測定することにより、試料中の抗原を測定することも可能である。放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ や $^{131}\text{I}$ などが一般に使用されており、化学発光物質の代表的なものには、アクリジニウムエステルなどがある。また、蛍光強度を測定する場合には、より高感度な方法として、抗体或いは抗原にキレート剤を直接或いは間接的に結合させ、励起光照射後にそのキレート剤から発せられる蛍光の強度を時間分解的に測定することにより、試料中の抗原を測定する方法（時間分解蛍光免疫測定法）も有用である。なお、代表的な希土類金属の例として、ユーロピウムがあげられる。

10

#### 【0020】

（イオン性界面活性剤）

本発明で使用するイオン性界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、ドデシル硫酸リチウム（LDS）、3,5 - ジヨードサリチル酸リチウム、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタドデシルスルフェート、コール酸ナトリウム、N - ラウリルサルコシン、N - ドデカノイルサルコシン酸ナトリウムその他の陰イオン界面活性剤または臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（以下HDTMA Bと略す）、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（HDTMA Cと略す）または塩化ヘキサデシルピリジニウム（HDP Cと略す）その他の陽イオン界面活性剤であって、タンパク質を可溶化させるために一般に使用される界面活性剤であれば、いずれの界面活性剤であってもよい。

20

#### 【0021】

（抗体）

本明細書において、「抗体」にはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および抗血清が含まれる。また、抗体はペプシンなどのタンパク質分解酵素で分解されたF（ab'）<sub>2</sub> 或いはFab'などの抗原結合性フラグメントであっても良い。目的の抗体がポリクローナル抗体である場合は、免疫した動物から得られる抗血清を硫酸アンモニウムで塩析し、沈殿画分を溶解後、DEAE - セルロースなどの陰イオン交換樹脂に供し、素通り画分であるIgG画分を回収したのち、透析などによって目的の溶媒に置換する。

30

#### 【0022】

モノクローナル抗体を調製する場合には、免疫した動物の脾細胞とミエローマ細胞株などの細胞融合用のペARENTセルを融合させ、得られたハイブリドーマの中から好適なものと選択してクローン化し、次いで、その融合細胞を生体外または生体内で培養し、この培養混合物より特異性の高いモノクローナル抗体を採取する。

40

#### 【0023】

上記のようにして得た抗体は、必要に応じて精製を行う。精製方法は、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を組合わせて実施し得る。

#### 【0024】

上記のとおり、本発明においては、モノクローナル抗体の他にもポリクローナル抗体やそれらの抗体の抗原結合性フラグメント及び抗血清が使用可能であり、その使用濃度等の最適化も当業者にとって容易であろう。

#### 【0025】

【実施例】

50

以下に、実施例をもって本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の各種態様の一例として示すものであり、したがって本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0026】

なお、以下において、特にことわりのない限り濃度(%)は、重量/容量(w/v)%をさす。

【0027】

実施例1 固相サンドイッチ法による、SDSを含む検体中のオボムコイドの測定

(1) 抗オボムコイド抗体の固相化

ウサギ抗オボムコイドポリクローナル抗体を炭酸緩衝液(pH 9.6)に1 µg/mlになるように溶解した。これをマイクロタイタープレート(Nunc社、マイクロモジュールプレート、Maxsorp-F8)に100 µlずつ分注し、常温で2時間放置した。 10

【0028】

(2) マイクロタイタープレートのブロッキング

各ウェルから上記抗体溶液を除去後、300 µlのブロッキング溶液(150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.1% ウシ血清アルブミンを含む20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4))を加え常温で2時間放置した。

【0029】

(3) オボムコイドの測定

各ウェル中のブロッキング溶液を除去後、各ウェルに検体希釈溶液(0.1% ウシ血清アルブミン: 150 mM NaCl: 0.05% Tween 20: 0%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5% または1%のSDS含有20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4))で段階希釈したオボムコイド標準品(商品名: 卵製トリプシンインヒビター、ナカライテスク社製)を100 µl加え、常温で2時間放置した。 20

【0030】

なお、以下に示す種々の検体の実際の測定において、当該検体に含まれるオボムコイド量が上記系での測定範囲以外となる場合には、当該検体を更に検体希釈溶液で希釈して上記系の測定範囲内となるようにしてから測定した。

【0031】

次いで、各ウェルを洗浄液300 µlで6回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗オボムコイドポリクローナル抗体を0.1% BSA、150 mM NaCl、0.05% Tween 20含有20 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で希釈した溶液を100 µlずつ加え、常温で30分間放置した。 30

【0032】

次に、各ウェルを洗浄液300 µlで5回洗浄後、TMB溶液(3、3'、5、5' テトラメチルベンジジン)を100 µlずつ加え、常温で遮光し10分間反応させた。

【0033】

その後、1規定硫酸を100 µlずつ各ウェルに加えて反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて主波長450 nm、副波長630 nmで測定した。 40

【0034】

得られた標準曲線を図1に示す。

【0035】

図1からわかるように、0.01~1.0%のSDS溶液中の検体による標準曲線は、SDSを添加していない溶液中の検体による曲線とほぼ同等であることから、本測定系においてSDS存在下でもオボムコイドの定量が可能であることが確認された。

【0036】

なお、実際に種々の検体中のオボムコイド量を測定する場合には、このようにして得られた標準曲線をもとに検体中のオボムコイド量を換算した。

【0037】

## (4) 検体の免疫測定

上記の試験法に従って、実際に検体の免疫測定試験を行った。市販品の三種類のマヨネーズを、1% SDSを含む検体希釈液でそれぞれ3倍段階希釈し、同時に測定した標準オボムコイドから得られた標準曲線に基いて、検体のオボムコイド濃度を算出した。

【0038】

図2の結果に示すとおり、原点を通る良好な直線性が得られた。

【0039】

## (5) 添加回収試験

上記の試験法に従って抗原の添加回収試験を行った。

【0040】

市販品の3種類のビスケットを検体として、その1% SDS含有抽出液を調製した。すなわち、当該ビスケットを均一に粉末化し、当該粉末の2gを秤取した。これに38mlの1% SDS含有検体希釈液を加え、ホモジナイザーを用いて30秒×2回の攪拌を行い、得られた混合液を3,000×gで20分間遠心分離した。得られた上清を5Aの濾紙で濾過し、当該濾液を食品抽出液(1% SDS含有抽出液)として測定に用いた。次いで、該抽出液に標準オボムコイドを添加して免疫測定を実施し、測定値から添加したオボムコイド量の回収率を求めた。回収率は、添加抗原量を100%とし、該添加抗原量に対する測定値から固有の検体含有抗原量を引いた値の割合で示す。

【0041】

以下の表1に示すとおり、添加回収率は88.7から96.1%と良好な結果が得られ、本発明の方法により食品中のオボムコイドが正確且つ鋭敏に測定し得ることが示された。

【0042】

【表1】

表1 添加回収試験の結果

	検体含有抗原濃度 (ng/mL)	添加抗原濃度 (ng/mL)	添加後測定値 (ng/mL)	回収率 (%)
検体1	5.14	11.32	15.18	88.69
	5.14	22.79	25.54	89.51
検体2	8.44	11.32	19.06	93.80
	8.44	22.79	29.87	94.02
検体3	17.98	11.32	28.86	96.11
	17.98	22.79	39.30	93.55

【0043】

実施例2 固相サンドイッチ法による、各種イオン性界面活性剤または非イオン界面活性剤を含む検体中のオボムコイドおよびオボアルブミンの測定

上記実施例と同様の条件で、本発明の陰イオン性界面活性剤の一種であるSDS、ドデシル硫酸リチウムおよびラウリルサルコシナトリウム、陽イオン性界面活性剤の一種である臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムおよび塩化ヘキサデキシルピリジニウム、並びに参考として非イオン界面活性剤であるTween 20、ルプロールPXおよびTrion X-100ならびにステロイド骨格を有する界面活性剤であるデオキシコール酸の、オボムコイドおよびオボアルブミン(参考例)の免疫測定系に対する影響を検討した。

【0044】

すなわち、1mlあたり64μgのオボアルブミンおよび64μgのオボムコイドを含む

10

20

30

40

50

検体について、上記の各種界面活性剤の種々の濃度における免疫測定を行って吸光度を測定し、その結果を以下の表 2 ~ 5 および図 3 ~ 6 に示す。

【 0 0 4 5 】

【表 2】

表 2 オボアルブミンの測定系におけるイオン性界面活性剤の影響

界面活性 剤濃度(%)	陰イオン性界面活性剤			陽イオン性界面活性剤		
	LDS	Lauroylsarcosine N a	SDS	HDTM AB	HDTM AC	HDPC
0.005	1.743	1.805	0.751	0.725	0.707	0.735
0.014	1.782	1.720	0.746	0.733	0.736	0.748
0.041	1.260	1.713	0.600	0.715	0.707	0.718
0.123	0.005	1.570	0.033	0.134	0.089	0.076
0.370	0.004	1.360	0.024	0.034	0.016	0.028
1.110	0.004	1.185	0.018	0.045	0.016	0.023
3.330	0.002	1.055	0.015	N.D	0.017	0.023
10.000	0.002	0.886	0.021	N.D	N.D	0.023

10

20

【 0 0 4 6 】

【表 3】

表 3 オボムコイドの測定系におけるイオン性界面活性剤の影響

界面活性 剤濃度(%)	陰イオン性界面活性剤			陽イオン性界面活性剤		
	LDS	Lauroylsarcosine N a	SDS	HDTM AB	HDTM AC	HDPC
0.005	1.898	1.870	0.459	0.444	0.456	0.465
0.014	1.849	1.857	0.439	0.432	0.419	0.469
0.041	1.808	1.738	0.433	0.410	0.444	0.439
0.123	1.639	1.729	0.384	0.402	0.408	0.424
0.370	1.336	1.719	0.319	0.412	0.410	0.406
1.110	0.904	1.731	0.239	0.398	0.405	0.376
3.330	0.644	1.732	0.221	0.402	0.434	0.386
10.000	0.381	1.737	0.205	0.278	0.398	0.338

30

40

【 0 0 4 7 】

【表 4】

表4 オボアルブミンの測定系における非イオン界面活性剤の影響

界面活性 剤濃度(%)	非イオン界面活性剤			ステロイド界面活性剤
	Tween20	LubrolPX	TritonX-10 0	DOC
0.005	1.769	1.859	1.667	1.888
0.014	1.713	1.803	1.837	1.889
0.041	1.718	1.727	1.847	1.895
0.123	1.786	1.710	1.828	1.820
0.370	1.754	1.609	1.788	1.830
1.110	1.743	1.658	1.812	1.627
3.330	1.780	1.612	1.791	1.383
10.000	1.668	1.399	1.735	1.199

10

20

【 0 0 4 8 】

【 表 5 】

表5 オボムコイドの測定系における非イオン界面活性剤の影響

界面活性 剤濃度(%)	非イオン界面活性剤			ステロイド界面活性剤
	Tween20	LubrolPX	TritonX-10 0	DOC
0.005	1.762	1.979	1.988	1.867
0.014	1.845	1.943	1.937	2.028
0.041	1.899	1.866	1.915	2.0223
0.123	1.832	1.877	1.894	1.940
0.370	1.879	1.846	1.869	1.866
1.110	1.836	1.877	1.900	1.775
3.330	1.844	1.780	1.869	1.733
10.000	1.778	1.117	1.645	1.447

30

40

【 0 0 4 9 】

本試験の結果、オボアルブミンの測定系においては比較的高濃度（例えば0.1%以上）のイオン性界面活性剤が測定感度を著しく低下させ、免疫測定を阻害するのに対し、オボムコイドの測定系においては10%程度の極めて高い濃度のイオン性界面活性剤存在下においてもその測定が十分可能なことが明らかとなった。このことから、本発明の方法は、本発明のイオン性界面活性剤の有する高いタンパク質抽出能力とあわせて、優れた検出感度と正確性を達成する免疫測定系を提供することが実証された。なお、参考とした非イオン界面活性剤およびデオキシコール酸は、オボアルブミンおよびオボムコイドのいずれの測定系にも影響しなかった。

50

## 【 0 0 5 0 】

実施例 3 カゼイン及び - ラクトグロブリンの測定

抗オボムコイド抗体の代わりに抗カゼイン抗体又は抗 - ラクトグロブリン抗体を使用した他は、実施例 1 とほぼ同様な手順でカゼイン又は - ラクトグロブリンの測定を行った。すなわち、SDS 濃度を 10% から 0.156% まで段階希釈した検体希釈液に、それぞれ 1 ml あたり牛乳タンパク質量として 64 ng の牛乳タンパク質を添加して測定用の試料溶液を作製した。当該試料中のカゼイン又は - ラクトグロブリンを実施例 1 と同様のプロトコールで実施される市販のカゼイン用牛乳免疫測定キット又は - ラクトグロブリン用牛乳免疫測定キット（ともに株式会社森永生科学研究所より入手。商品名、モリナガ特定原材料測定キット：牛乳測定キット（カゼイン）及びモリナガ特定原材料測定キット：牛乳測定キット（ - ラクトグロブリン））で測定した。結果を図 9 および図 10 に示した。

10

## 【 0 0 5 1 】

図 9 および図 10 から明らかなように、カゼインおよび - ラクトグロブリンにおいても SDS に代表されるようなイオン性界面活性剤の高濃度存在下で、免疫測定が良好に実施できることが示された。

## 【 0 0 5 2 】

実施例 4 そばタンパク質、小麦タンパク質及び落花生タンパク質の測定

実施例 3 と同様にして、そばタンパク質、小麦タンパク質（グリアジン）及び落花生タンパク質の測定に対するイオン性界面活性剤の影響を検証した。なお、添加実験に用いたそばタンパク質は、そばの子実を磨砕し、当該磨砕物に塩化ナトリウム等の塩類を含む緩衝液（トリス - 塩酸緩衝液等）を加えて成分を抽出することで得られた抽出物を遠心分離してその上清を回収し、次いで、該上清をスーパーデックス G - 200 やスーパーロース 6（ともに Amersham Pharmacia 社製）のゲル濾過カラムに供し、分子量 70 ~ 500 kD の範囲に溶出される画分を回収することにより調製した。

20

## 【 0 0 5 3 】

また、小麦タンパク質（グリアジン）は、アサマ化成（株）より入手した市販品を用い、落花生タンパク質は、落花生の子実を磨砕し、当該磨砕物に塩化ナトリウム等の塩類を含む緩衝液（トリス - 塩酸緩衝液等）を加えて成分を抽出することで得られた抽出物を遠心分離してその上清を回収し、次いで、該上清をスーパーデックス G - 200 やスーパーロース 6（ともに Amersham Pharmacia 社製）のゲル濾過カラムに供し、分子量 30 ~ 100 kD の範囲に溶出される画分を回収することにより調製した。

30

これらの試料を用いた免疫測定法による試験は、各市販の測定キット（株式会社森永生科学研究所製、モリナガ特定原材料測定キット：そば測定キット、モリナガ特定原材料測定キット：小麦測定キット（グリアジン）及びモリナガ特定原材料測定キット：落花生測定キット）により実施した。結果を図 11 乃至 13 に示した。

## 【 0 0 5 4 】

図 11 乃至図 13 から、そばタンパク質、小麦タンパク質及び落花生タンパク質においても、高濃度のイオン性界面活性剤の存在下で免疫測定が良好に実施できることが示された。

40

## 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 標準オボムコイドを順次段階希釈し、本発明の実施例の方法（EIA の原理に基づく固相サンドイッチ法）により測定波長 450 nm、副波長 630 nm での吸光度を測定した結果を示す。

【 図 2 】 オボムコイドを含む未知濃度検体（検体 a 乃至 c）を測定系に用いて、本発明の実施例の方法（EIA の原理に基づく固相サンドイッチ法）により測定波長 450 nm、副波長 630 nm での吸光度を測定した結果を示す。

【 図 3 】 HD T M A B、HD T M A C および HD P C の存在下におけるオボアルブミンの測定結果を示す（参考例）。横軸は各界面活性剤の濃度（%）を示し、縦軸は吸光度を示す。

50

【図4】LDS、ラウリルサルコシナトリウムおよびSDSの存在下におけるオボアルブミンの測定結果を示す(参考例)。横軸は各界面活性剤の濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。

【図5】HDTMAB、HDTMACおよびHDP Cの存在下におけるオボムコイドの測定結果を示す。横軸は各界面活性剤の濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。

【図6】LDS、ラウリルサルコシナトリウムおよびSDSの存在下におけるオボムコイドの測定結果を示す。横軸は各界面活性剤の濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。

【図7】Tween 20、ルプロールPX、Triton X-100およびDOCの存在下におけるオボアルブミンの測定結果を示す(参考例)。横軸は各界面活性剤の濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。

10

【図8】Tween 20、ルプロールPX、Triton X-100およびDOCの存在下におけるオボムコイドの測定結果を示す(参考例)。横軸は各界面活性剤の濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。

【図9】SDSの存在下におけるカゼインの測定結果を示す。横軸は界面活性剤(SDS)濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。( )は抗原有り、( )は抗原なし(対照)。

【図10】SDSの存在下における -ラクトグロブリンの測定結果を示す。横軸は界面活性剤(SDS)濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。( )は抗原有り、( )は抗原なし(対照)。

【図11】SDSの存在下におけるそばタンパク質の測定結果を示す。横軸は界面活性剤(SDS)濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。( )は抗原有り、( )は抗原なし(対照)。

20

【図12】SDSの存在下における小麦タンパク質(グリアジン)の測定結果を示す。横軸は界面活性剤(SDS)濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。( )は抗原有り、( )は抗原なし(対照)。

【図13】SDSの存在下における落花生タンパク質の測定結果を示す。横軸は界面活性剤(SDS)濃度(%)を示し、縦軸は吸光度を示す。( )は抗原有り、( )は抗原なし(対照)。

【 図 1 】

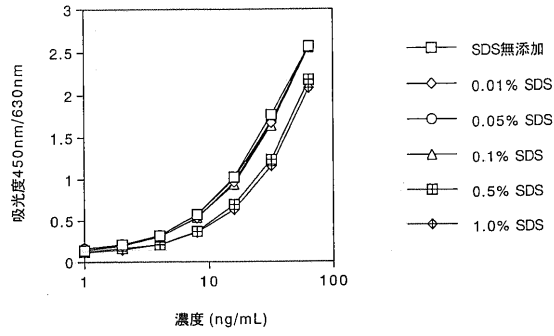


図 1 測定系に対する SDS 濃度の影響

【 図 2 】

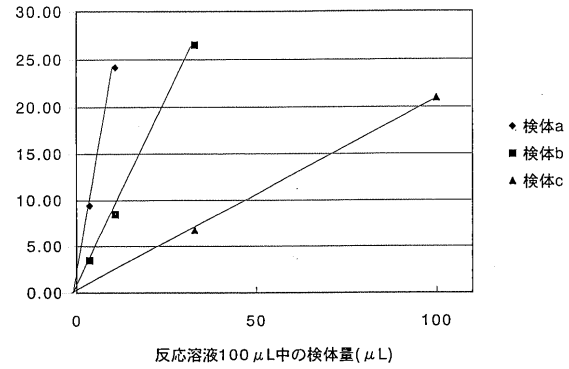


図 2 1% SDS を含む検体の希釈試験

【 図 3 】

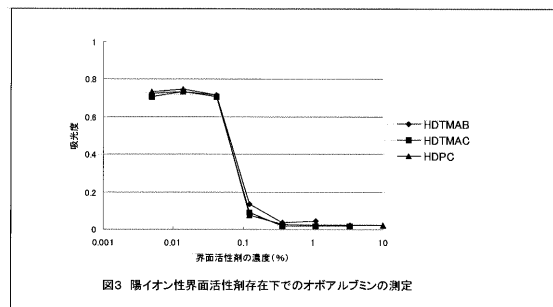


図 3 陰イオン性界面活性剤存在下でのオボアルブミンの測定

【 図 4 】

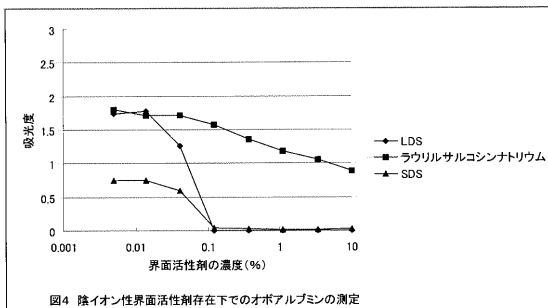


図 4 陰イオン性界面活性剤存在下でのオボアルブミンの測定

【 図 6 】

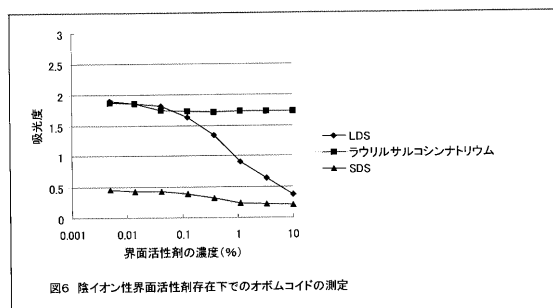


図 6 陰イオン性界面活性剤存在下でのオボムコイドの測定

【 図 5 】

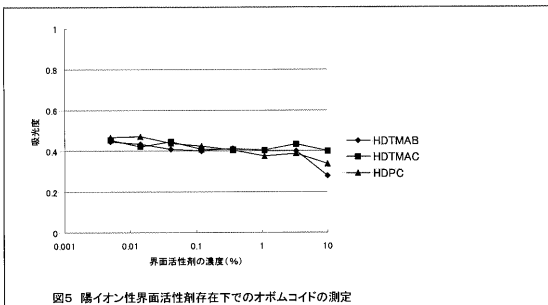


図 5 陰イオン性界面活性剤存在下でのオボムコイドの測定

【 図 7 】

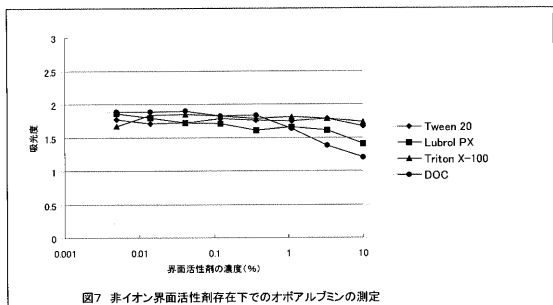


図 7 非イオン界面活性剤存在下でのオボアルブミンの測定

【 図 8 】

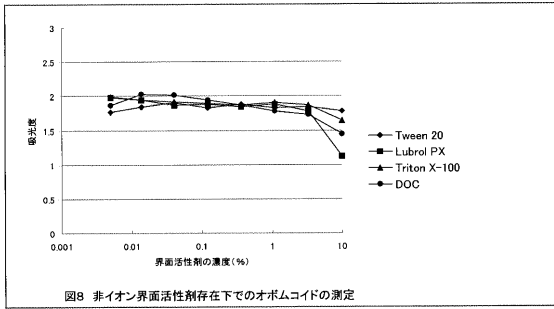
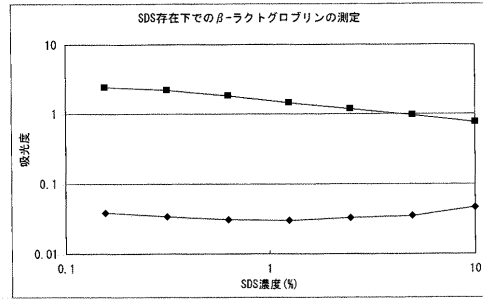
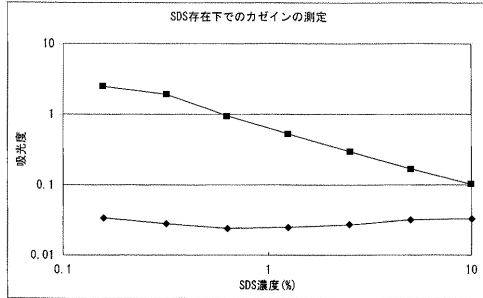


図8 非イオン界面活性剤存在下でのオボムコイドの測定

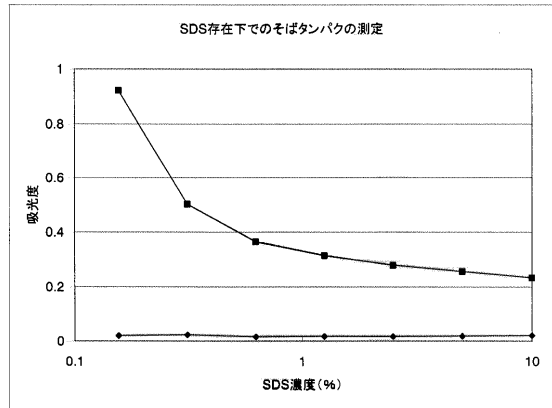
【 図 1 0 】



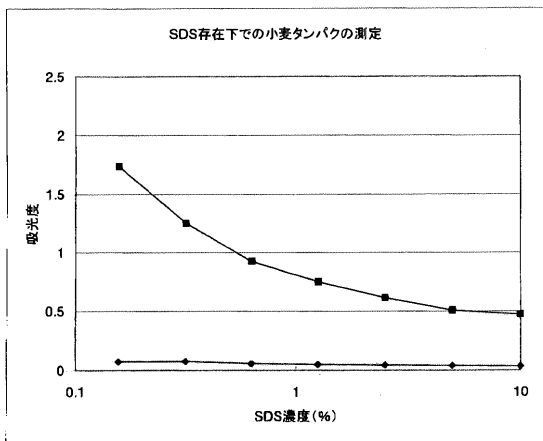
【 図 9 】



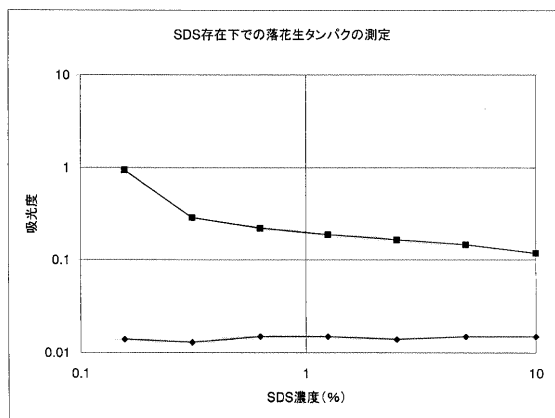
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 豆越 慎一  
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 境 雅寿  
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 松岡 由美子  
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 村岡 嗣朗  
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内
- (72)発明者 本庄 勉  
神奈川県横浜市鶴見区下末吉2 - 1 - 1 株式会社森永生科学研究所内

专利名称(译)	在离子表面活性剂存在下的免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004239885A</a>	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2003071553	申请日	2003-03-17
申请(专利权)人(译)	森永有限公司		
[标]发明人	豆越慎一 境雅寿 松岡由美子 村岡嗣朗 本庄勉		
发明人	豆越 慎一 境 雅寿 松岡 由美子 村岡 嗣朗 本庄 勉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.Q G01N33/53.V G01N33/531.B G01N33/543.545.Z		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	2002362003 2002-12-13 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种灵敏，简单地检测基于持续免疫反应的特定抗原蛋白的方法，同时保持样品的高提取效率。ZSOLUTION：通过高浓度的离子表面活性剂从样品中提取，通过免疫测量方法测量样品中含有的卵类粘蛋白等处方蛋白质。免疫测定方法的使用显着提高了处方蛋白质的提取效率，同时在连续免疫测定中保持了抗原 - 抗体反应。结果，整个测量系统的灵敏度显着提高。此外，由于省去了表面活性剂的去除/稀释，因此可以简化整个测量方法。Z

	検体含有抗原濃度 (ng/mL)	添加抗原濃度 (ng/mL)	添加後測定値 (ng/mL)	回収率 (%)
検体1	5.14	11.32	15.18	88.69
	5.14	22.79	25.54	89.51
検体2	8.44	11.32	19.06	93.80
	8.44	22.79	29.87	94.02
検体3	17.98	11.32	28.86	96.11
	17.98	22.79	39.30	93.55