

(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2015-131781

(P2015-131781A)

(43) 公開日 平成27年7月23日(2015.7.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/16 (2006.01)	C O 7 K 16/16	2 B O 3 O
A O 1 H 1/02 (2006.01)	A O 1 H 1/02	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Q

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2014-4102 (P2014-4102)	(71) 出願人	301004765
(22) 出願日	平成26年1月14日 (2014.1.14)		カタギ食品株式会社
		(74) 代理人	100076406
			弁理士 杉本 勝徳
		(74) 代理人	100117097
			弁理士 岡田 充浩
		(72) 発明者	吉田 元信
			奈良県奈良市中町3327番204号 近畿大学農学部内
		(72) 発明者	吉田 和司
			大阪府寝屋川市石津元町12番8号 カタギ食品株式会社内

最終頁に続く

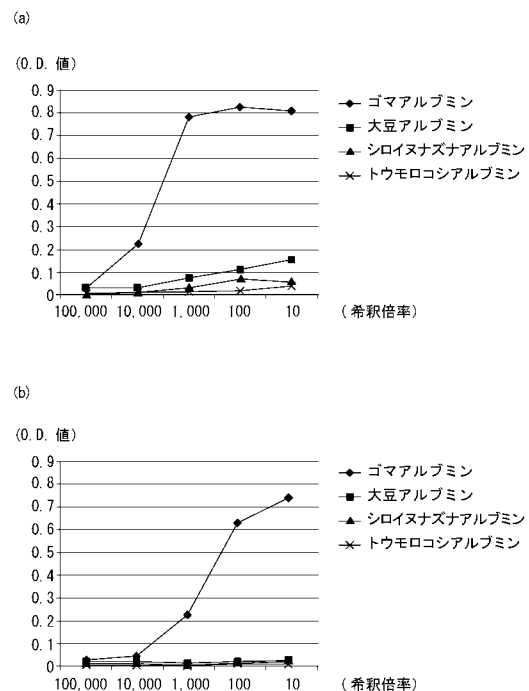
(54) 【発明の名称】 ポリクローナル抗体、ゴマアレルゲンの検出用キット、低アレルゲンゴマの判別方法、低アレルゲンゴマの作出方法及び低アレルゲンゴマ

(57) 【要約】

【課題】ゴマアレルギーの主な原因である14kDaゴマアルブミンの含有量が少ない又はこれを含まない低アレルゲンゴマ、低アレルゲンゴマを作出する作出方法、低アレルゲンゴマの作出に必要な低アレルゲンゴマの判別方法、低アレルゲンゴマの判別方法に使用するポリクローナル抗体及びゴマアレルゲンの検出用キットを提供する。

【解決手段】この発明のポリクローナル抗体は、14kDaゴマアルブミンを抗体産生能力のある生物に免疫注射して、この生物から抗体を取得することにより獲得することができ、かつ14kDaゴマアルブミンに高い親和性を示すものである。また、この発明のゴマアレルゲンの検出用キットはこの発明のポリクローナル抗体をその構成要素として含むものである。さらに、この発明の低アレルゲンゴマの判別方法や作出方法は、この発明のポリクローナル抗体を利用する方法であり、これらの方法によりこの発明の低アレルゲンゴマは作出できる。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

14kDaゴマアルブミンを抗体産生能力のある生物に免疫注射して、この生物から抗体を取得することにより獲得することができ、かつ14kDaゴマアルブミンに高い親和性を示すポリクローナル抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリクローナル抗体を大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン又はトウモロコシアルブミンの何れかで吸収処理することにより獲得することができ、大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン及びトウモロコシアルブミンと実質的に反応しないポリクローナル抗体。

10

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 の何れかのポリクローナル抗体を含むゴマアレルゲンの検出用キット。

【請求項 4】

(1) ゴマの組織から蛋白質を抽出する抽出工程と、
(2) 抽出した蛋白質中の14kDaゴマアルブミン含有量を請求項 1 又は請求項 2 に記載のポリクローナル抗体を使用して測定する測定工程と、
(3) 14kDaゴマアルブミンの含有量が少ないゴマを低アレルゲンゴマとして判別する判別工程と、
を含む低アレルゲンゴマの判別方法。

20

【請求項 5】

請求項 4 に記載の判別方法によって判別された低アレルゲンゴマから、非遺伝子工学的な方法で低アレルゲンゴマを作出する低アレルゲンゴマの作出方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の作出方法によって作出された低アレルゲンゴマ。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の低アレルゲンゴマの子孫である低アレルゲンゴマ。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

30

この発明は、ポリクローナル抗体、これを含むゴマアレルゲンの検出用キット、前記ポリクローナル抗体を使用してアレルギー反応を引き起こし難い低アレルゲンゴマを判別する低アレルゲンゴマの判別方法、前記判別方法により判別した低アレルゲンゴマから、より低アレルゲンゴマを作出する低アレルゲンゴマの作出方法、及び前記作出方法により作出した低アレルゲンゴマに関する。

【背景技術】**【0002】**

ゴマは、セサミンをはじめとするゴマリグナン、鉄分、カルシウム、カリウムなどの多様な栄養素を含んでおり、近年では健康食品としてはもちろん、離乳食としても使用されるようになってきている。

40

【0003】

ただ、ゴマは、前記の栄養素に加えて様々なゴマ蛋白質を含んでおり、これらゴマ蛋白質によるアレルギー反応が生じることがある。中でも、ゴマを含む離乳食を乳幼児に与えた場合、重篤なアレルギー反応を起こす可能性があることが知られている。（非特許文献 1 を参照）。

【0004】

さて、ゴマアレルギーの原因であるゴマ蛋白質は、アルブミン、グロブミン、オレオシンなどから構成されているが、アレルギーの原因としてはゴマアルブミン、中でも14kDaゴマアルブミンがその主な原因であると考えられている（非特許文献 2 を参照）。

【先行技術文献】

50

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】「ゴマ」、[online]、ウィキペディア、[平成25年11月19日検索]、インターネット<<http://ja.wikipedia.org/wiki/ゴマ>>

【非特許文献2】Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. Food Chem. Toxicol. 41, 1165-1174 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、この発明は、ゴマアレルギーの主な原因である14kDaゴマアルブミンの含有量が少ない又はこれを含まない低アレルゲンゴマ、低アレルゲンゴマを作出する作出方法、低アレルゲンゴマの作出に必要な低アレルゲンゴマの判別方法、及び低アレルゲンゴマの判別方法に使用するポリクローナル抗体及びゴマアレルゲンの検出用キットを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明者らは、鋭意検討の結果、アレルゲンである14kDaゴマアルブミンと特異的に反応するポリクローナル抗体を使用することによって、低アレルゲンゴマを判別でき、判別した低アレルゲンゴマから、交配育種等の非遺伝子工学的な方法によって、より低アレルゲンなゴマを作出できることを見出した。

【0008】

すなわち、この発明の請求項1に記載のポリクローナル抗体は、14kDaゴマアルブミンを抗体産生能力のある生物に免疫注射して、この生物から抗体を取得することにより獲得することができ、かつ14kDaゴマアルブミンに高い親和性を示すものである。

【0009】

請求項2に記載のポリクローナル抗体は、請求項1に記載のポリクローナル抗体を大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン又はトウモロコシアルブミンの何れかで吸収処理することにより獲得することができ、大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン及びトウモロコシアルブミンとは実質的に反応しないものである。

【0010】

請求項3に記載のゴマアレルゲンの検出用キットは、請求項1又は請求項2の何れかのポリクローナル抗体を含むものである。

【0011】

請求項4に記載の低アレルゲンゴマの判別方法は、(1)ゴマの組織から蛋白質を抽出する抽出工程と、(2)抽出した蛋白質の14kDaゴマアルブミン含有量を請求項1又は請求項2に記載のポリクローナル抗体を使用して測定する測定工程と、(3)14kDaゴマアルブミンの含有量が少ないゴマを低アレルゲンゴマとして判別する判別工程とを含む方法である。

【0012】

請求項5に記載の低アレルゲンゴマの作出方法は、請求項4に記載の判別方法によって判別された低アレルゲンゴマから、非遺伝子工学的な方法で低アレルゲンゴマを作出する方法である。

【0013】

加えて、請求項6及び請求項7に記載の低アレルゲンゴマは、請求項5に記載の作出方法によって作出されたもの、及びその子孫である。

【発明の効果】

【0014】

この発明のポリクローナル抗体、低アレルゲンゴマの判別方法、低アレルゲンゴマの作出方法により、14kDaゴマアルブミンの含有量が少ない低アレルゲンゴマを作出できる。このようにして作出した低アレルゲンゴマは、ゴマの持つ高い栄養価を備え、アレルギー

10

20

30

40

50

反応を引き起こし難い。また、遺伝子組み換えによる消費者の忌避も受けない。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図 1】図 1 は、この発明のポリクローナル抗体の抗原特異性を調べた結果を示すグラフである。

【図 2】図 2 は、この発明のポリクローナル抗体による各品種における 14kDa ゴマアルブミンの含有量の違いを調べた結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

1. ポリクローナル抗体

この発明のポリクローナル抗体は、14kDa ゴマアルブミンを抗体産生能力のある生物に免疫注射して、この生物から抗体を取得することにより獲得することができ、かつ 14kDa ゴマアルブミンに高い親和性を示すものである。

【 0 0 1 7 】

ここで、14kDa ゴマアルブミンとは、非特許文献 2 に記載されているゴマアレルギーの原因物質（アレルゲン）であり、分子量が 14kDa の蛋白質である。また、抗体産生能力のある生物とは、一般的には、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、羊、ヤギ、ニワトリなどが例示できる。中でも、免疫し易さ、飼育易さ、得られる抗体量などを考慮するとウサギが好ましい。

【 0 0 1 8 】

また、抗体の獲得は、抗原である 14kDa ゴマアルブミンを前記抗体産生能力のある生物に免疫注射して抗体を取得することによって行われる。抗原の免疫注射、抗体の取得は公知の方法であれば特に問題なく使用することができる。

【 0 0 1 9 】

抗原の免疫注射は、公知の方法、例えば、抗原を緩衝液中に溶かして適切なアジュバンドと混ぜ、ウサギの皮下及び腹腔などに注射器で免疫注射することにより行う。なお、この免疫注射を一定期間（例えば 10 日間）ごとに複数回繰り返すことによって、免疫した生物に抗体産生を促すことができる。

【 0 0 2 0 】

抗体は、例えば、免疫した生物から採血し、採血した血液を遠心分離して血球等を含む血餅を除き、血清を採取することによって獲得できる。なお、このようにして獲得された抗体は補体による溶血等の副作用を防ぐため、加熱処理する必要がある。

【 0 0 2 1 】

また、この発明のポリクローナル抗体は、類似する蛋白質、例えば大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン、トウモロコシアルブミンなどの植物アルブミンと混合して抗原抗体反応したのちに遠心分離により沈殿を除去する吸収処理によって、抗原特異性がより向上して、ゴマ以外の他の植物種子アルブミンと実質的に反応しなくすることもできる。なお、「実質的に反応しない」とは、例えば酵素免疫測定法（ELISA 法）などによって、試料中の 14kDa ゴマアルブミンの含有量を測定した場合に、バックグラウンド程度しか検出できないことをいう。

【 0 0 2 2 】

2. ゴマアレルゲンの検出用キット

ゴマアレルゲンを検出する際に使用する緩衝液等は、市販の試薬を別々に購入して使用する際に調製してもよい。ただ、緩衝液等をこの発明のポリクローナル抗体とともに予めキット化しておけば、試薬を購入して調製する手間が省け、ゴマアレルゲンをより容易に検出できる。また、蛋白質の抽出に必要な緩衝液なども併せてキット化しておけば、ゴマアレルゲンをさらに容易に検出できる。

【 0 0 2 3 】

3. 低アレルゲンゴマの判別方法

この発明の低アレルゲンゴマの判別方法は、（ 1 ）ゴマの組織から蛋白質を抽出する抽

10

20

30

40

50

出工程と、(2)抽出した蛋白質中の14kDaゴマアルブミン含有量を請求項1又は請求項2に記載のポリクローナル抗体を使用して測定する測定工程と、(3)14kDaゴマアルブミンの含有量が少ないゴマを低アレルゲンゴマとして判別する判別工程とを含む方法である。そこで、各工程の詳細を以下に説明する。

【0024】

(1)抽出工程

抽出工程は、ゴマの組織から蛋白質を抽出する工程である。蛋白質を抽出するゴマとしては、白ゴマ、黒ゴマ、金ゴマ、茶ゴマ等食用に供するものであれば特に限定することなく使用できる。また、蛋白質を抽出するゴマの組織としては、ゴマの葉、茎、根、種子等の採取・抽出し易い組織であれば特に限定しないが、食用に利用している点から、種子が好ましい。

10

【0025】

蛋白質の抽出は、後述する測定工程で使用する量と質の蛋白質を抽出できる公知の方法であれば特に限定することなく使用することができる。具体的には、ゴマの組織を適当な緩衝液に入れて、ホモジナイザーによってゴマの組織を破碎し、遠心分離により上清を得る方法、ゴマの組織を凍結させて、乳鉢と乳棒ですりつぶしたのち、緩衝液に溶解して、遠心分離により上清を得る方法などが挙げられる。なお、必要に応じて、酵素処理や有機溶媒による処理を加えてもよい。

【0026】

(2)測定工程

20

測定工程は、抽出した蛋白質中の14kDaゴマアルブミン含有量を請求項1又は請求項2に記載のポリクローナル抗体を使用して測定する公知の免疫学的検出方法である。具体的には、蛍光抗体法、RIA法、ELISA法、免疫電気泳動法、ウェスタンブロット法等が挙げられる。中でも、安全で、一時に多数のサンプルを扱え、手軽なことからELISA法が好ましい。

【0027】

なお、使用する免疫学的検出方法に応じて、この発明のポリクローナル抗体をFITC(フルオレセインイソシアネート)、フィコエリトリン又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{35}S 又は ^3H 等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ又は β -ガラクトシダーゼ等の酵素で標識してもよい。

30

【0028】

(3)判別工程

判別工程は、14kDaゴマアルブミンの含有量が少ないゴマを低アレルゲンゴマとして判別する工程である。低アレルゲンゴマと呼べるゴマの14kDaゴマアルブミンの含有量は、ゴマの品種、株、栽培地域等によって変動するが、例えば、ゴマ種子に含まれる14kDaゴマアルブミンの含有量が $10\mu\text{g/粒}$ (grain)以下、より好ましくは $5\mu\text{g/粒}$ (grain)以下のゴマを低アレルゲンゴマとして判別すればよい。

【0029】

4.低アレルゲンゴマの作出方法及び低アレルゲンゴマ

40

この低アレルゲンゴマの作出方法は、この発明の判別方法によって判別された低アレルゲンゴマから、非遺伝子工学的な方法で低アレルゲンゴマを作出する方法である。ここで、非遺伝子工学的な方法とは、交配育種等が例示できる。中でも、伝統的で安全と効果が確認されている作出方法である交配と判別を複数回繰り返す方法が好ましい。なお、この発明の低アレルゲンゴマは、この発明の低アレルゲンゴマの作出方法によって作出されたゴマ、その子孫である。

【0030】

以下、この発明について実施例に基づいてより詳細に説明する。なお、この発明の特許請求の範囲は、以下の実施例によって如何なる意味においても制限されない。

【実施例1】

50

【 0 0 3 1 】

1. ポリクローナル抗体の調製

14kDaゴマアルブミン（抗原）に対するポリクローナル抗体を、（ 1 ）抗原の準備、（ 2 ）免疫、（ 3 ）抗体の調製の手順で調製した。そこで、その詳細を以下に説明する。

【 0 0 3 2 】

（ 1 ）抗原の準備

登熟後のゴマ種子（*Sesamum indicum* Acc.No.800）から、（ a ）粗精製蛋白質を抽出したのち、（ b ）粗精製蛋白質からSDS- ポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE）によって14kDaゴマアルブミンを精製した。そこで、その詳細を以下に説明する。

【 0 0 3 3 】

（ a ）粗精製蛋白質の抽出

ゴマ種子約0.4 gに、0.6 Mスクロースを含む10mMリン酸緩衝液（pH7.5）4 mlを加えて、4 で20分吸水させた。吸水したゴマ種子を氷中でホモジナイザー（polytron PT2100、KinematicaAG）により22,000 rpmで破碎処理した。破碎物を細胞液濾過器（ポアサイズ40 μ mのセルストレーナー、ベクトン・ディッキンソン）で濾過した（以下、サンプルIと省略する）。

【 0 0 3 4 】

濾過したサンプルIをガラス製の遠心管に入れ、0.4 Mスクロースを含む10mMリン酸緩衝液、pH 7.5（以下、サンプル用緩衝液と省略する）を等量重層したのち、8,500 rpmで20分間遠心して上清液を取り除き、中間層を採取した。採取したサンプルをガラス製の遠心管に入れ、10,000rpmで30分遠心し、上清液を50 mlファルコンチューブに採取した。採取したサンプルに4倍量のアセトン加えて、-30 で一晚保温した。ファルコンチューブを10,000 rpmで20分遠心して、アセトンを取り除いたのち、1時間真空乾燥した。真空乾燥残渣に1 mlの滅菌水を加えて、10,000 rpmで20分遠心し、その上清液を採取した（以下、サンプルIIと省略する）。

【 0 0 3 5 】

なお、比較のため、大豆、シロイヌナズナ、トウモロコシからも同様の方法によってアルブミンを含む粗精製蛋白質を調製した。また、異なる品種のゴマ、具体的には、*Sesamum indicum* Acc.No.9043、同No.9087-2、同No.9090、同No.9093、同No.9094についても、サンプルIIと同様にして、粗精製蛋白質を抽出した。

【 0 0 3 6 】

（ b ）SDS-PAGEによる抗原の精製

ゲル板、スパーサーをセットし、分離ゲル（15%）を調製した。セットしたゲル板の間に分離ゲルを流し込み、その上に蒸留水を重層した。分離ゲルの重合を確認して、蒸留水を取り除いたのち、濃縮ゲル（4.75%）を流し込んでコームを挿入した。

【 0 0 3 7 】

サンプルIIをマイクロチューブに入れ、それと等量の2 倍のサンプル用緩衝液を加え、5分間煮沸処理して電気泳動用サンプルとした。ゲル板に電極をセットしたのち、これを泳動用緩衝液の満たされた泳動槽に浸し、ゲル板のレーン（ウェル）を泳動用緩衝液で洗浄した。

【 0 0 3 8 】

プロモフェノールブルー（以下、BPBと省略する）を含む分子量マーカー（Bio-Rad）と電気泳動用サンプルをゲル板のレーンにそれぞれアプライした。濃縮ゲルにBPBが入りきったら20～30 mAに電流を上げ、分離ゲルの末端にBPBが達したところで電気泳動を止めた。泳動槽からゲルを取り出して、クイックCBB染色法により染色した。

【 0 0 3 9 】

染色されたゲルのタンパク質バンドの分子量に基づいて、14 kDaのバンドをゲルからメスで切り出した。切り出したゲル片を1 mlシリンジに入れ、粉々に粉碎した。粉碎したゲル片を50 mlファルコンチューブに入れ、タンパク質抽出用緩衝液を加えて、室温で一晩撹拌した。ファルコンチューブを3,000 rpmで20分遠心して、上清液を採取した。上清液

10

20

30

40

50

に4倍量のアセトンを加え、-30 で一晩保温したのち、アセトンを除去して、10 分間真空乾燥して得られた乾燥残渣を抗原として使用した。

【0040】

(2) 免疫

抗体の獲得のため、ウサギ (New Zealand White) に免疫した。具体的には、次のように初回免疫及び1~3回の追加免疫をした。初回免疫は、抗原5 µgと等量のフロイント完全アジュバント (Freund's complete adjuvant、FCA) とを混合してエマルジョンを形成し、これを皮下と腹腔に免疫注射した。

【0041】

初回免疫から10 日後に、FCAの代わりにフロイント不完全アジュバント (Freund's incomplete Adjuvant、FIA) を使用したことを除き初回免疫と同様に1回目の追加免疫を実施し、1回目の追加免疫から10 日後に2回目の追加免疫を実施し、2回目の追加免疫から10 日後に3回目の追加免疫を実施した。 10

【0042】

(3) ポリクローナル抗体の調製

3回目の追加免疫の3 日後にウサギの耳の静脈から試採血して、15 mlファルコンチューブに回収した。3回目の追加免疫から1週間後に、ウサギの心臓から全採血して、シャーレに回収した。全採取した血液を37 で1時間保温して、シャーレの淵から血餅を剥がしたのち、4 で一晩保温した。

【0043】

シャーレを傾けて、コマゴメピペットにより血清50 mlをファルコンチューブに入れて、5,000 rpmで10分遠心し、上清液を回収した (以下、抗血清と省略する)。また、シャーレに残った血餅をファルコンチューブに入れたのち、10,000 rpmで20 分遠心し、上清液を回収し、これを抗血清と混合した。最後に、抗血清に含まれる補体を不活性するため、56 で30分間保温した。このようにして調製した抗血清を「未吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」として以下の実験で使用した。 20

【0044】

(4) ポリクローナル抗体の吸収処理

調製した未吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体の抗原特異性を向上させるため、大豆アルブミンによって吸収処理した。具体的には、(a)大豆アルブミン懸濁液の調製、(b)吸収処理の手順で行った。その詳細を以下に記載する。 30

【0045】

(a) 大豆アルブミン懸濁液の調製

大豆0.4gを乳鉢に入れて、液体窒素を加えたのち、乳棒で破碎した。破碎物にリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.1 (以下、PBSと省略する) 4 ml加え、室温で20分間保温した。保温した懸濁液を2,200 rpmで2 分間、ホモジナイザーによりさらに破碎した。

【0046】

破碎物を細胞液濾過器 (ポアサイズ40 µmのセルストレーナー) で濾過し、濾液を回収した。濾液を8,500rpm、20分間遠心分離して上清液を回収したのち、5倍量のアセトン添加して-30 で一晩保温した。アセトンを添加した上清液を10,000 rpmで20分間遠心分離して、沈殿物を約1時間真空乾燥した。乾燥残渣をPBS 1.5 mlに懸濁して懸濁液を調製した。 40

【0047】

(b) 吸収処理

未吸収抗14 kDaゴマアルブミン抗体を含む抗血清をPBSで10倍希釈し、これと等量の大豆アルブミン懸濁液とを混合したのち、室温で2時間保温した。混合液を10,000 rpmで20分間遠心分離して上清液を回収した。この上清液を使用して、同様に2回吸収処理 (計3回) し、「吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」として以下の実験で使用した。

【実施例2】

【0048】

2. ポリクローナル抗体の特性

実施例 1 で調製した抗14kDaゴマアルブミン抗体の特性、具体的には、抗原特異性とゴマ品種間におけるアルブミン含有量の違いを調べた。その詳細を以下に記載する。

【0049】

(1) 抗原特異性と吸収処理の影響

「未吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」と「吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」の異なる植物に由来するアルブミンに対する抗原特異性を、ELISA法により調べた。その詳細を以下に記載する。

【0050】

実施例 1 で調製したサンプルIIと、同様に調製した大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン及びトウモロコシアルブミンとを、10倍、100倍、1,000倍、10,000倍、100,000倍希釈して抗原液とした。各抗原液を96 ウェルのフレキシブルプレート (Falcon) の各ウェルに50 μ lずつ入れ、マイクロプレートミキサー (TAITEC) によって2時間振盪した。

【0051】

フレキシブルプレートから抗原液を捨て、4%BSA、0.05 % Tween-20 (終濃度) を含むPBSのブロッキング溶液を各ウェルに50 μ lずつ入れ、1時間振盪した。ブロッキング溶液を捨て、各ウェルを100 μ lの0.05 % Tween-20を含むPBS(PBS-T) で3回洗浄した。

【0052】

「未吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」は1,000倍、「吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」は500倍にPBSで希釈して、一次抗体液を調製した。フレキシブルプレートの各ウェルに一次抗体液を50 μ lずつ入れたのち、マイクロプレートミキサーにより2時間振盪した。一次抗体液を捨て、100 μ lのPBS-Tを入れて5 分間振盪する洗浄を3 回行った。

【0053】

ペルオキシターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (CAPPEL) をPBSで3,000倍に希釈して二次抗体液を調製した。フレキシブルプレートの各ウェルに二次抗体液を50 μ lずつ加え、マイクロプレートミキサーにより2時間振盪した。二次抗体液を捨て、100 μ lのPBS-Tを入れて10分間振盪する洗浄を5回行った。

【0054】

フレキシブルプレートの各ウェルに、TMBマイクロウェルペルオキシターゼ基質システム (Kirkegaard & Perry Laboratories) を50 μ l加えて10 分間静置したのち、マイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio-Rad) により波長655 nmにおける吸光度を測定した。その結果を図 1 に示す。なお、図 1 (a) は「未吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」を使用した結果を示しており、図 1 (b) は「吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」を使用した結果を示している。

【0055】

図 1 から、「未吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」、「吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」の何れも、14kDaゴマアルブミンとは高い抗原抗体反応したこと、反対に実験対照である大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン、トウモロコシアルブミンとは殆ど抗原抗体反応しなかったこと、が分かった。また、図 1 (a) と図 1 (b) との比較から、吸収処理によって抗原特異性が向上し、大豆アルブミン、シロイヌナズナアルブミン、トウモロコシアルブミンに対して実質的に反応しなくなることが分かった。

【0056】

(2) 品種間における14kDaゴマアルブミン含有量の違い

品種間における14kDaゴマアルブミンの含有量の違いを調べた。具体的には、実施例 1 で調製したSesamum indicum Acc.No.9043、同No.9087-2、No.9090、同No.9093、同No.9094を抗原に使用し、「吸収抗14kDaゴマアルブミン抗体」を抗体として使用して、(1) と同様にELISA法により14kDaゴマアルブミン含有量を調べた。その結果を図 2 に示す。なお、図 2 中の14kDaゴマアルブミン含有量は、標準品種Acc.No.800の粒あたりのアルブミン含有量26.5 μ gを基に、5,000倍希釈した各品種のサンプルIIの吸光度を比較することによ

10

20

30

40

50

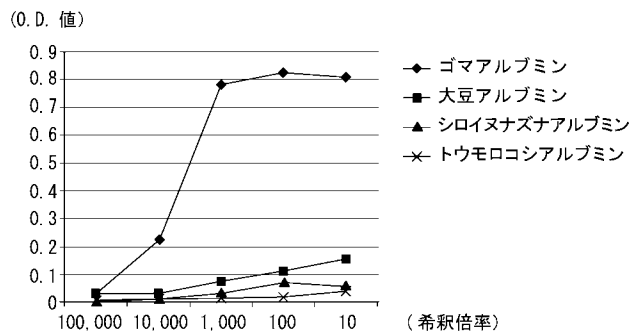
って算出した。

【 0 0 5 7 】

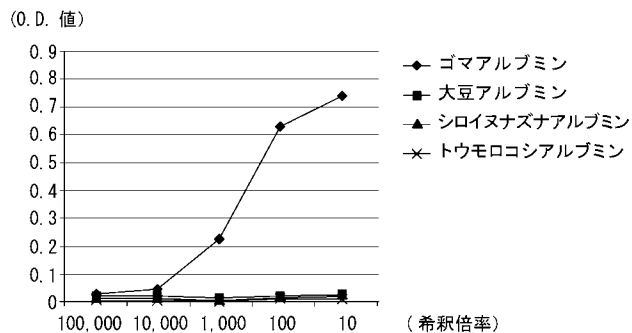
図 2 から、同じゴマであっても品種が異なれば、ゴマアレルギーの原因である14kDaゴマアルブミンの含有量が異なることが分かった。そのため、14kDaゴマアルブミン含有量の低い品種（例えば、Acc.No.9094、9090）から、非遺伝子工学的な方法、例えば、交配育種等によって、14kDaゴマアルブミンの含有量の少ない品種を育成することができる。

【 図 1 】

(a)

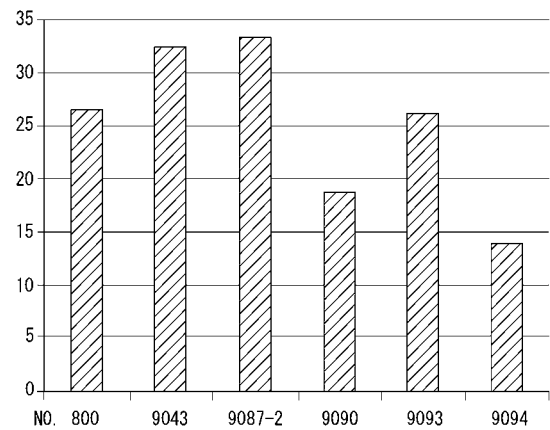


(b)



【 図 2 】

μg/grain



フロントページの続き

(72)発明者 高田 直幸

大阪府寝屋川市石津元町 1 2 番 8 号 カタギ食品株式会社内

Fターム(参考) 2B030 AB02 AD08 CA28

4H045 AA11 AA30 CA30 DA75 EA50 FA71

专利名称(译)	多克隆抗体，用于检测芝麻过敏原的试剂盒，用于辨别低过敏性芝麻的方法，用于制备低过敏性芝麻和低过敏性芝麻的方法		
公开(公告)号	JP2015131781A	公开(公告)日	2015-07-23
申请号	JP2014004102	申请日	2014-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	Katagi食品		
申请(专利权)人(译)	Katagi食品有限公司		
[标]发明人	吉田元信 吉田和司 高田直幸		
发明人	吉田 元信 吉田 和司 高田 直幸		
IPC分类号	C07K16/16 A01H1/02 G01N33/53		
FI分类号	C07K16/16 A01H1/02.Z G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	2B030/AB02 2B030/AD08 2B030/CA28 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA30 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	杉本胜则 冈田 充浩		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：要鉴定产生低过敏原芝麻所需的低过敏原芝麻，应将低过敏原芝麻中14kDa芝麻白蛋白的含量降低或降低，这是造成芝麻过敏的主要原因。提供了一种方法，用于区分低变应原芝麻的方法中的多克隆抗体和用于检测芝麻变应原的试剂盒。解决方案：本发明的多克隆抗体可通过将14kDa芝麻白蛋白注射到能够产生抗体的生物体中并从该生物体获得抗体而获得，并且对14kDa芝麻白蛋白具有高亲和力。显示。此外，本发明的芝麻过敏原检测试剂盒包含本发明的多克隆抗体作为其构成要素。另外，本发明的低变应原芝麻的鉴别和生产方法是利用本发明的多克隆抗体的方法，并且可以通过这些方法生产本发明的低变应原芝麻。[选型图]图1

(21) 出願番号	特願2014-4102(P2014-4102)	(71) 出願人	301004765
(22) 出願日	平成26年1月14日 (2014.1.14)		カタギ食品株式会社
			大阪府豊中市石津元町12番8号
		(74) 代理人	100076406
			弁理士 杉本 勝徳
		(74) 代理人	100117097
			弁理士 岡田 充浩
		(72) 発明者	吉田 元信
			奈良県奈良市中町3327番204号 近畿大学農学部内
		(72) 発明者	吉田 和司
			大阪府豊中市石津元町12番8号 カタギ食品株式会社内

最終頁に続く