

(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2010-78448

(P2010-78448A)

(43) 公開日 平成22年4月8日(2010.4.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Q	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 2 1	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2008-246781 (P2008-246781)	(71) 出願人	000113067
(22) 出願日	平成20年9月25日 (2008.9.25)		ブリマハム株式会社
			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
		(74) 代理人	100102255
			弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482
			弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100123168
			弁理士 大▲高▼ とし子
		(74) 代理人	100120086
			弁理士 ▲高▼津 一也
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食物中のアレルギー物質の分析方法

(57) 【要約】

【課題】 2 -メルカプトエタノールのような毒物を使用することなく、食物中のアレルギー物質（アレルギー）が変性/未変性のいかなる状態にあっても、より安全かつ簡易にアレルギー物質を検出できる高感度な免疫学的な分析方法や分析キット、これらに用いられるアレルギー物質の抽出用水溶液やアレルギー物質の抽出方法等を提供すること。

【解決手段】 アルキル硫酸塩と尿素とシステイン、又は、アルキル硫酸塩と尿素とシステインとジチオスレイトールを含有する食品からのアレルギー物質の抽出用水溶液、例えば、アルキル硫酸塩：尿素：システインをモル比1.0：8.0～250：0.01～100：0～1.0で含有する抽出用水溶液で、食品からオボアルブミン、s1-カゼイン、 β -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば24kDaタンパク質、Ara h1等のアレルギー物質を抽出し、サンドイッチELISA、イムノクロマト法等で検出・定量する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルキル硫酸塩と尿素とシステイン、又は、アルキル硫酸塩と尿素とシステインとジチオスレートルを含有することを特徴とする食品からのアレルギー物質の抽出用水溶液。

【請求項 2】

アルキル硫酸塩：尿素：システインをモル比 1.0 : 8.0 ~ 250 : 0.01 ~ 100 : 0 ~ 1.0 で含有することを特徴とする請求項 1 記載の抽出用水溶液。

【請求項 3】

アルキル硫酸塩：尿素：システインをモル比 1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 で含有することを特徴とする請求項 1 記載の抽出用水溶液。

10

【請求項 4】

アレルギー物質が、オボアルブミン、 β 1-カゼイン、 α -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば 24 kDa タンパク質、Ar a h 1 から選ばれる 1 種又は 2 種以上のタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の抽出用水溶液。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の抽出用水溶液で、食品からアレルギー物質を抽出することを特徴とするアレルギー物質の抽出方法。

【請求項 6】

アレルギー物質が、オボアルブミン、 β 1-カゼイン、 α -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば 24 kDa タンパク質、Ar a h 1 から選ばれる 1 種又は 2 種以上のタンパク質であることを特徴とする請求項 5 記載の抽出方法。

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の抽出用水溶液で、食品から抽出したアレルギー物質を、抗原抗体反応により検出・定量することを特徴とするアレルギー物質の分析方法。

【請求項 8】

サンドイッチ E L I S A あるいはイムノクロマト法で検出・定量することを特徴とする請求項 7 記載のアレルギー物質の分析方法。

【請求項 9】

アレルギー物質が、オボアルブミン、 β 1-カゼイン、 α -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば 24 kDa タンパク質、Ar a h 1 から選ばれる 1 種又は 2 種以上のタンパク質であることを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の分析方法。

30

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の抽出用水溶液と、食品中のアレルギー物質を認識する抗体とを備えたことを特徴とするアレルギー物質の分析キット。

【請求項 11】

アレルギー物質を認識する抗体が、変性又は未変性のオボアルブミン、 β 1-カゼイン、 α -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば 24 kDa タンパク質、Ar a h 1 から選ばれる 1 種又は 2 種以上のタンパク質を認識する抗体であることを特徴とする請求項 10 記載の分析キット。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、食物中のアレルギー物質の抽出用水溶液、及びアレルギー物質の抽出方法、並びにアレルギー物質の分析方法や分析キット、より詳しくは、アルキル硫酸塩、尿素、システイン等を含有し、2-メルカプトエタノールを含有しないアレルギー物質抽出用水溶液、及び該アレルギー物質抽出用水溶液を用いたアレルギー物質の抽出方法、並びに該アレルギー物質の抽出方法を利用してオボアルブミン、 β 1-カゼイン、 α -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば 24 kDa タンパク質、Ar a h 1 等の食物中のアレルギー物質をサンドイッチ E L I S A、イムノクロマト法等で検出・定量するアレルギー物質の分析方法や分析キットに関する。

50

【背景技術】

【0002】

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を誘発するアレルギー物質（以下、アレルゲンということもある）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
10
含む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、特に乳アレルゲンの主要成分としてのs1カゼインや、ホエーアレルゲンの主要成分であるラクトグロブリンや、卵白アレルゲン成分としてはオボアルブミンとオボムコイドや、小麦アレルゲンの主要成分としてグリアジン
20
や、そばの主要タンパク質である分子量24kDaのタンパク質や、落花生の主要タンパク質であるAra h1が知られている。

【0003】

これらの食物アレルギー物質の検査のためのELISAによる定量分析法が、平成14年11月6日付け食発第1106001号厚生労働省医薬局食品保健部長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（平成17年10月11日付け食安発第1011002号当職通知、平成18年3月24日付け食安発第0324001号当職通知、および平成18年6月22日付け食安発第0622003号当職通知により一部改正）に示されている「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」などにより指定されている。このELISAには2-メルカプトエタノールが使用されているが、平成20年7月1日から施行された「毒物及び劇物指定令の一部改正等について（通知）薬食
30
発第0620001号」により、2-メルカプトエタノールが毒物として指定された。

【0004】

従来、加熱処理後の食品でも変性させずにタンパク質を抽出できる抽出用水溶液として、（a）アルキル硫酸塩と（b）尿素と（c）ジチオスレイトール又は2-メルカプトエタノールとを、モル比で3.1~52:2000以上:1.1以上（ジチオスレイトールの場合）又は9~400（2-メルカプトエタノールの場合）の割合で含有し、（a）アルキル硫酸塩0.09重量%~1.5重量%、（b）尿素2M以上、及び（c）ジチオスレイトール1.1mM以上、又は2-メルカプトエタノール9mM~400mMを含む水性抽出系中で食物アレルゲンを抽出するアレルゲン分析方法が知られている（例えば、特許文献1参照）。
40

【0005】

また、本発明者らも、2-メルカプトエタノールの還元力を利用した簡易なアレルギー物質検査方法を提案している（例えば、特許文献2~5参照）。しかし、食品製造現場あるいは製造工場内でこのような毒物を扱いながらELISAあるいはイムノクロマト法により食品中のアレルギー物質の検査を行うことは望ましいとは言えず、さらに検査後の残余廃棄物の廃棄方法にも安全を担保しながら行わなければならない。そのため、本来、アレルギー患者保護のために積極的に行われるべき製造業者や販売者のアレルギー物質の自主検査が過大な負担となり、自主検査自体が消極的になることが懸念される。

【0006】

【特許文献1】特開2000-65820号公報

10

20

30

40

50

【特許文献2】特開2008-107339号公報

【特許文献3】特開2007-278773号公報

【特許文献4】特開2007-108169号公報

【特許文献5】W O 2 0 0 5 / 0 8 5 8 4 7 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、2-メルカプトエタノールのような毒物を使用することなく、食物中のアレルギー物質（アレルゲン）が変性/未変性のいかなる状態にあっても、より安全かつ簡易にアレルギー物質を検出できる高感度な免疫学的な分析方法や分析キット、これら

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究し、アルキル硫酸塩や尿素のようなタンパク質変性剤と、食品添加物としても使用されているシステインのような還元剤を組み合わせることで、2-メルカプトエタノールを使用しなくても食品中の食物アレルギー物質由来タンパク質を十分に検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち本発明は、(1)アルキル硫酸塩と尿素とシステイン、又は、アルキル硫酸塩と尿素とシステインとジチオスレイトールを含有することを特徴とする食品からのアレルギー物質の抽出用水溶液や、(2)アルキル硫酸塩：尿素：システインをモル比1.0：8.0～250：0.01～100：0～1.0で含有することを特徴とする上記(1)記載の抽出用水溶液や、(3)アルキル硫酸塩：尿素：システインをモル比1.0：9.6～231：0.01～95.2：0～0.7で含有することを特徴とする上記(1)記載の抽出用水溶液に関する。

20

【0010】

また本発明は、(4)アレルギー物質が、オボアルブミン、s1-カゼイン、 β -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば24kDaタンパク質、Ar a h 1から選ばれる1種又は2種以上のタンパク質であることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれか記載の抽出用水溶液や、(5)上記(1)～(4)のいずれか記載の抽出用水溶液で、食品からアレルギー物質を抽出することを特徴とするアレルギー物質の抽出方法や、(6)アレルギー物質が、オボアルブミン、s1-カゼイン、 β -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば24kDaタンパク質、Ar a h 1から選ばれる1種又は2種以上のタンパク質であることを特徴とする上記(5)記載の抽出方法や、(7)上記(1)～(4)のいずれか記載の抽出用水溶液で、食品から抽出したアレルギー物質を、抗原抗体反応により検出・定量することを特徴とするアレルギー物質の分析方法に関する。

30

【0011】

さらに本発明は、(8)サンドイッチELISAあるいはイムノクロマト法で検出・定量することを特徴とする上記(7)記載のアレルギー物質の分析方法や、(9)アレルギー物質が、オボアルブミン、s1-カゼイン、 β -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば24kDaタンパク質、Ar a h 1から選ばれる1種又は2種以上のタンパク質であることを特徴とする上記(7)又は(8)記載の分析方法や、(10)上記(1)～(4)のいずれか記載の抽出用水溶液と、食品中のアレルギー物質を認識する抗体とを備えたことを特徴とするアレルギー物質の分析キットや、(11)アレルギー物質を認識する抗体が、変性又は未変性のオボアルブミン、s1-カゼイン、 β -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば24kDaタンパク質、Ar a h 1から選ばれる1種又は2種以上のタンパク質を認識する抗体であることを特徴とする上記(10)記載の分析キットに関する。

40

【発明の効果】

50

【0012】

本発明によると、2-メルカプトエタノールのような毒物を使用することなく、食物中のアレルギー物質（アレルゲン）が変性/未変性のいかなる状態にあっても、より安全かつ簡易にアレルギー物質を検出できる高感度な免疫学的な分析方法を提供できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の食品からのアレルギー物質の抽出用水溶液としては、アルキル硫酸塩と尿素とシステイン、又は、アルキル硫酸塩と尿素とシステインとジチオスレイトールを含有する水溶液であれば特に制限されず、好ましくはアルキル硫酸塩：尿素：システイン：ジチオスレイトールをモル比1.0：8.0～250：0.01～100：0～1.0で含有する水溶液、より好ましくはモル比1.0：9.6～76.8：0.01～95.2：0～0.7や、モル比1.0：9.6～231：0.01～95.2：0～0.7で含有する水溶液を好適に例示することができる。また本発明の食品からのアレルギー物質の抽出方法としては、上記本発明の食品からのアレルギー物質の抽出用水溶液で、食品からアレルギー物質を抽出する方法であれば特に制限されず、そしてまた本発明のアレルギー物質の分析方法としては、上記本発明の食品からのアレルギー物質の抽出用水溶液で食品から抽出したアレルギー物質をELISAやイムノクロマト法等の抗原抗体反応により検出・定量する方法であれば特に制限されず、さらに、本発明のアレルギー物質の分析キットとしては、上記本発明の食品からのアレルギー物質の抽出用水溶液と、食品中のアレルギー物質を認識する抗体とを備えたキットであれば特に制限されず、上記アレルギー物質としては、例えば、卵、乳製品、穀類、豆類、ナッツ類、畜肉、魚肉、野菜、果実、又はそれらの加工食品などに含まれる食物アレルギーとして、ヒトにアレルギー症状を引き起こすあらゆる食品成分が含まれ、中でも、オボアルブミン、s1-カゼイン、 β -ラクトグロブリン、小麦グリアジン、そば24kDaタンパク質、落花生タンパク質であるArah1を好適に例示することができる。

10

20

【0014】

本発明のアレルギー物質抽出用水溶液を抽出対象食品と接触させ、その食品からアレルギー物質を抽出する際には、対象食品試料に含まれている水分量を考慮して、本発明のアレルギー物質抽出用水溶液を適宜希釈して用いることができる。例えば、本発明のアレルギー物質の抽出方法においては、抽出対象食品試料を含む水性抽出系中で、アルキル硫酸塩0.1～1.5重量%、好ましくは0.25～1.0重量%、尿素0.5～12.0重量%、好ましくは1.0～4.0重量%、システイン0.0005～15.0重量%、好ましくは0.001～10.0重量%、ジチオスレイトール0～0.2重量%、好ましくは0～0.1重量%の存在下で、前記の対象食品試料からタンパク質を抽出することができる。

30

【0015】

本発明において用いられるアルキル硫酸塩としては、アルキル硫酸と無機塩基又は有機塩基との塩であれば特に制限されず、アルキル硫酸塩におけるアルキル基の炭素数は、8～16であることが好ましく、前記アルキル基は、直鎖状アルキル基であることもできるし、あるいは、分枝状アルキル基であることもできる。アルキル基としては、例えば、ラウリル基、トリデシル基、ミリスチル基、ペンタデシル基、ウンデシル基、デシル基、ノニル基、又はオクチル基を挙げることができ、ラウリル基が好ましい。無機塩基との塩としては、例えば、アルキル金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はリチウム塩）、又はアンモニウム塩を挙げることができ、また、有機塩基との塩としては、例えば、アルカノール塩（例えば、モノエタノールアミン）を挙げることができる。本発明においては、ナトリウム塩であることが好ましく、中でも、アルキル硫酸塩として、ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を好適に例示することができる。

40

【0016】

本発明の抽出用水溶液のベースとなる溶媒や抽出用水溶液の希釈液としては、分析対象であるアレルギー物質の免疫学的活性を損なわない限り、水に加えて他の成分を含んでも

50

よく、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、ヘペス緩衝液、メス緩衝液等の緩衝液や、生理食塩水を挙げることができる。また、上記溶媒や希釈液には、必要に応じて、タンパク質の安定化やタンパク質の抽出効率を向上させるために一般的に使用することのできる成分、例えば、金属イオン、酸化防止剤、キレート剤、吸着剤、グリセリン、ソルビトール、プロテアーゼインヒビター等を、抽出されるタンパク質の免疫学的活性を損なわない範囲で配合することができる。

【0017】

本発明のアレルギー物質の抽出方法によると、非加熱の食品からの未変性タンパク質アレルギー物質、及び加熱処理後の食品からの変性タンパク質アレルギー物質を共に抽出することができ、本発明のアレルギー物質の分析方法によると、未変性タンパク質アレルギー物質、及び変性タンパク質アレルギー物質を認識する各2種類又はそれ以上の抗体、好ましくはモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAやイムノクロマト法等の抗原抗体反応によりアレルギー物質を検出・定量することができる。

10

【0018】

本発明のアレルギー物質の分析方法は、抗原抗体反応により行われるが、通常、食物アレルゲンを含む試料を、標識化した抗食物アレルゲンモノクローナル抗体と接触させ、あるいは標識化した抗体の存在下に食物アレルゲンモノクローナル抗体と接触させ、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は特に制限されず、例えば、以下の方法を例示することができる。

20

【0019】

不溶性担体に結合した抗食物アレルゲンモノクローナル抗体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食物アレルゲンモノクローナル抗体と異なるエピトープを認識する標識抗食物アレルゲンモノクローナル抗体(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食物アレルゲンモノクローナル抗体に試料中の食物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、食物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食物アレルゲンモノクローナル抗体を作用させさせた後、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、食物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食物アレルゲンモノクローナル抗体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食物アレルゲンモノクローナル抗体と食物アレルゲンであるタンパク質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、食物アレルゲンと結合する抗食物アレルゲンモノクローナル抗体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その他、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、抗食物アレルゲンモノクローナル抗体として、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。

30

40

【0020】

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

50

ン結合法等を用いることができる。

【0021】

本発明のアレルギー物質の分析方法やアレルギー物質の分析キットに用いられる抗食物アレルゲンモノクローナル抗体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、抗食物アレルゲンモノクローナル抗体として、IgG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(ab')₂、Fab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、抗食物アレルゲンモノクローナル抗体は、未変性又は変性の食物アレルゲンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローム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。

10

【0022】

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、アボ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、¹⁴C、¹²⁵I若しくは¹³¹I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、発光剤等が用いることができる。

20

【0023】

本発明のアレルギー物質の分析キットには、有効成分として、試料を調製するための本発明のアレルギー物質の抽出用水溶液と、抗食物アレルゲンモノクローナル抗体、好ましくはそれぞれ異なるエピトープを認識する2以上の抗食物アレルゲンモノクローナル抗体とを含む。抗食物アレルゲンモノクローナル抗体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、分析キットにはかかる抗食物アレルゲンモノクローナル抗体を溶解する緩衝液や培養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アレルギー物質の分析キットとしては、試料を調製するための本発明のアレルギー物質の抽出用水溶液と、前記イムノクロマト法における試験ストリップを備えた物を挙げるができる。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。

30

【0024】

食品中の卵白アレルゲンであるオボアルブミンの分析方法において、サンドイッチELISAには、ハイブリドーマ(FERM AP-21682)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA5、ハイブリドーマ(FERM AP-21683)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA6、ハイブリドーマ(FERM P-20656)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA3、ハイブリドーマ(FERM P-20657)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA4等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ(FERM P-20656)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA3、ハイブリドーマ(FERM P-20657)が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA4等を好適に例示することができる。

40

50

【0025】

食品中の乳アレルギーである s 1 - カゼインの分析方法において、サンドイッチ E L I S A には、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 6 3) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 1、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 6 4) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 2、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 6) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 3 等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 6 3) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 1、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 6 4) が産生する抗 s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 2 等を好適に例示することができる。

10

【0026】

食品中のホエーアレルギーである - ラクトグロブリンの分析方法において、サンドイッチ E L I S A には、ハイブリドーマ (F E R M P - 2 0 7 8 2) が産生する抗 - ラクトグロブリンモノクローナル抗体 P L G 3、ハイブリドーマ (F E R M P - 2 0 7 8 3) が産生する抗 - ラクトグロブリンモノクローナル抗体 P L G 4、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 4) が産生する抗 - ラクトグロブリンモノクローナル抗体 P L G 5 等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ (F E R M P - 2 0 7 8 2) が産生する抗 - ラクトグロブリンモノクローナル抗体 P L G 3、ハイブリドーマ (F E R M P - 2 0 7 8 3) が産生する抗 - ラクトグロブリンモノクローナル抗体 P L G 4 等を好適に例示することができる。

20

【0027】

食品中の小麦アレルギーである小麦グリアジンの分析方法において、サンドイッチ E L I S A 及びイムノクロマト法には、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 6 7) が産生する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体 P G L 1、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 6 8) が産生する抗小麦グリアジンモノクローナル抗体 P G L 2 等を好適に例示することができる。

【0028】

食品中のそばアレルギーであるそば 2 4 k D a タンパク質の分析方法において、サンドイッチ E L I S A には、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 7 3) が産生する抗そば 2 4 k D a タンパク質モノクローナル抗体 P B W 2、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 0) が産生する抗そば 2 4 k D a タンパク質モノクローナル抗体 P B W 4、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 1) が産生する抗そば 2 4 k D a タンパク質モノクローナル抗体 P B W 5 等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ (F E R M B P - 1 0 2 7 3) が産生する抗そば 2 4 k D a タンパク質モノクローナル抗体 P B W 2、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 1) が産生する抗そば 2 4 k D a タンパク質モノクローナル抗体 P B W 5 等を好適に例示することができる。

30

【0029】

食品中の落花生アレルギーであるタンパク質 A r a h 1 の分析方法において、サンドイッチ E L I S A には、ハイブリドーマ (F E R M P - 2 0 9 6 7) が産生する抗 A r a h 1 モノクローナル抗体 P A h 1 - 4、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 7) が産生する抗 A r a h 1 モノクローナル抗体 P A h 1 - 8、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 8) が産生する抗 A r a h 1 モノクローナル抗体 P A h 1 - 9、ハイブリドーマ (F E R M A P - 2 1 6 8 9) が産生する抗 A r a h 1 モノクローナル抗体 P A h 1 - 1 0 等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ (F E R M P - 2 0 9 6 7) が産生する抗 A r a h 1 モノクローナル抗体 P A h 1 - 4、ハイブリドーマ (F E R M P - 2 0 9 6 8) が産生する抗 A r a h 1 モノクローナル抗体 P A h 1 - 5 等を好適に例示することができる。

40

【0030】

以下に、実施例により本発明を具体的に説明するが、これら実施例により本発明の技術

50

的範囲は限定されるものではない。

【実施例 1】

【0031】

[抽出液の作製]

本発明では以下の [表 1] に示す組み合わせとなるよう、SDS、尿素、システイン、ジチオスレイトールをPBSに溶解し抽出液を作製した。

【0032】

【表 1】

表 1. 各抽出液の組成と各成分のモル比

抽出液 No.	SDS (%w/v)	尿素 (%w/v)	Cys* (%w/v)	DTT** (%w/v)	モル比 (SDS を 1 とする)			
					SDS	尿素	Cys.	DTT
1	0.25	2.0	0.2	0	1.0	38.4	1.9	0.0
2	0.25	4.0	0.4	0.025	1.0	76.8	3.8	0.2
3	0.50	2.0	0.2	0	1.0	19.2	1.0	0.0
4	0.25	2.0	10.0	0	1.0	38.4	95.2	0.0
5	0.25	2.0	0.0012	0.1	1.0	38.4	0.01	0.7
6	1.0	2.0	0.2	0	1.0	9.6	0.5	0.0
7	0.25	12	0.2	0	1.0	231	1.9	0.0

* : Cysはシステインを示す。

** : DTTはジチオスレイトースを示す。

以下表中表記は同じ。

【実施例 2】

【0033】

[卵アレルギーの検出]

(方法)

1) 検査用試料の調製

卵凍結乾燥粉末 0.2 g を 50 mL の PP 製チューブに採取し、各抽出溶液を加え、沸騰水中で 1 時間加熱後、10,000 × g で 30 分間遠心分離した後、上清を 0.8 μm のマイクロフィルターで濾過したものを卵標準原液とした。卵標準原液は 2-D Quant Kit (GE-Healthcare社製) によりタンパク質を定量し、ELISA では 25 ppb、イムノクロマト法では 100 ppb となるように PBST で希釈し、それぞれの検査試料液とした。

【0034】

2) ELISA

PDOA5 (10 μg/mL)、PDOA6 (10 μg/mL) を等量 (1:1) で混合し、混合したものを 96 穴マイクロプレートに 100 μL ずつ分注し、37 °C で 1.5 時間もしくは 4 晩静置後、PBST で 5 回洗浄した。150 μL の 1% BSA で 37 °C 1 時間のブロッキングを行い、PBST で 5 回洗浄した。上記 1) で変性処理した検査試料液を 100 μL 加え、37 °C で 1.5 時間静置後、PBST で 5 回洗浄した。ビオチン標識した PDOA3 (10 μg/mL) 及び PDOA4 (10 μg/mL) を等量 (1:1) で混合し、混合したものを 100 μL ずつ分注し、37 °C で 1.5 時間静置後、PBST で 5 回洗浄した。Avidin, Alkaline Phosphatase Conjugate を PBST で 1/1000 希釈後、100 μL ずつ分注し 37 °C で 1.5 時間静置後、PBST で 5 回洗浄した。p-ニトロフェニルフォスフェートを量りとり、0.1% となるようにジエタノールアミンバッファーを加え、溶解したものを 100 μL ずつ分注し、室温で 30 分静置後、5 N NaOH を 50 μL ずつ加え、反応を停止し、測定波長 405 nm、リファレンス波長

10

20

30

40

50

630 nmで測定した。

【0035】

3) イムノクロマト法

2 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) で 1 mg/mL となるように PDOA4 のモノクローナル抗体溶液を調製した。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 にモノクローナル抗体溶液を 500 μ L 加え、室温で 30 分間反応した後、10% BSA 溶液 625 μ L 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 になるよう調整した。ガラスウール製コンジュゲートパッド (Schleicher & Schuell 社製) に 68 μ L/cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

10

【0036】

PBS で 4 mg/mL となるように PDOA3 のモノクローナル抗体溶液を調製し、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。

【0037】

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。上記 1) で変性処理した検査試料液を 100 μ L 加え、PDOA3 を塗布した部分に赤紫色のラインが出現したものを陽性、またラインが出なかったものを陰性と判定した。

20

【0038】

(結果)

1) ELISA

各抽出液で変性処理した卵タンパク質を ELISA で検査した結果を [表 2] に示した。No. 4 を除くすべての抽出液で測定することができた。No. 4 の抽出液はシステイン濃度が高く、過剰なシステインが検出に影響を与えたため検出できなかったと考えられるが、同じ比率でシステイン濃度を下げると、SDS や尿素の濃度も下がり、抽出効率が下がる危険性が危惧された。これらのことから、SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 3.8 : 0 ~ 0.7 が好ましいと判断された。

30

【0039】

【表 2】

表 2. 各抽出液で抽出した卵タンパク質の ELISA 検査結果

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				吸光値*1
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	0.155
2	1.0	76.8	3.8	0.2	0.134
3	1.0	19.2	1.0	0.0	0.226
4	1.0	38.4	95.2	0.0	0.029
5	1.0	38.4	0.01	0.7	0.144
6	1.0	9.6	0.5	0.0	0.112
7	1.0	231	1.9	0.0	0.413

40

【0040】

2) イムノクロマト法

50

各抽出液で変性処理をした卵タンパク質をイムノクロマトキットで検査した結果を [表 3] に示した。No. 1 ~ 7 まですべての抽出液で良好に陽性と判定された。これらのことから、SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1 . 0 : 9 . 6 ~ 2 3 1 : 0 . 0 1 ~ 9 5 . 2 : 0 ~ 0 . 7 が好ましいと判断された。

【 0 0 4 1 】

【 表 3 】

表 3. 各抽出液で抽出した卵タンパク質のイムノクロマト検査結果

(表中、+は陽性、-は陰性と判定されたものを示す)

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				判定
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	++
2	1.0	76.8	3.8	0.2	++
3	1.0	19.2	1.0	0.0	++
4	1.0	38.4	95.2	0.0	++
5	1.0	38.4	0.01	0.7	++
6	1.0	9.6	0.5	0.0	++
7	1.0	231	1.9	0.0	+

10

20

【 0 0 4 2 】

3) まとめ

以上の結果より、ELISAならびにイムノクロマト法のいずれかの方法で卵を検出するための抽出液の SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は、1 . 0 : 9 . 6 ~ 2 3 1 : 0 . 0 1 ~ 9 5 . 2 : 0 ~ 0 . 7 が好ましいと判断された。

【 実施例 3 】

【 0 0 4 3 】

[牛乳アレルギー (カゼイン) の検出]

(方法)

1) 検査用試料の調製

牛乳凍結乾燥粉末 0 . 2 g を 5 0 m L の P P 製チューブに採取し、各抽出溶液を加え、沸騰水中で 1 時間加熱後、1 0 , 0 0 0 × g で 3 0 分間遠心分離した後、上清を 0 . 8 μ m のマイクロフィルターで濾過したものを牛乳標準原液とした。牛乳標準原液は 2 - D Q u a n t K i t (GE-Healthcare社製) によりタンパク質を定量し、ELISAでは 5 p p b、イムノクロマト法では 5 0 0 p p b となるように P B S T で希釈し、それぞれの検査試料液とした。

【 0 0 4 4 】

2) ELISA

P a s 1 C N 1 (1 0 μ g / m L)、P a s 1 C N 2 (1 0 μ g / m L) を等量 (1 : 1) で混合し、混合したものを 9 6 穴マイクロプレートに 1 0 0 μ L ずつ分注し、3 7 で 1 . 5 時間もしくは 4 で一晩静置後、P B S T で 5 回洗浄した。1 5 0 μ L の 1 % B S A で 3 7 1 時間のブロッキングを行い、P B S T で 5 回洗浄した。上記 1) で変性処理した検査試料液を 1 0 0 μ L 加え、3 7 で 1 . 5 時間静置後、P B S T で 5 回洗浄した。ビオチン標識した P a s 1 C N 3 (1 0 μ g / m L) を 1 0 0 μ L ずつ分注し、3 7 で 1 . 5 時間静置後、P B S T で 5 回洗浄した。Avidin, Alkaline Phosphatase Conjugate を P B S T で 1 / 1 0 0 0 希釈後、1 0 0 μ L ずつ分注し 3 7 で 1 . 5 時間静置後、P B S T で 5 回洗浄した。p - ニトロフェニルフォスフェートを量りとり、0 . 1 % となるようにジエタノールアミンバッファーを加え、溶解したものを 1 0 0 μ L ずつ分注し、室温で 3 0 分静置後、5 N N a O H を 5 0 μ L ずつ加え、反応を停止し、測定波長 4 0

30

40

50

5 nm、リファレンス波長 630 nm で測定した。

【0045】

3) イムノクロマト法

2 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) で 1 mg/mL となるように Pas1CN2 のモノクローナル抗体溶液を調製した。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 にモノクローナル抗体溶液を 500 μ L 加え、室温で 30 分間反応した後、10% BSA 溶液を 625 μ L 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 になるよう調整した。ガラスウール製コンジュゲートパッド (Schleicher & Schuell 社製) に 68 μ L/cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

10

【0046】

PBS で 4 mg/mL となるように Pas1CN1 のモノクローナル抗体溶液を調製し、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。

【0047】

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。1) で変性処理した検査試料液を 100 μ L 加え、Pas1CN2 を塗布した部分に赤紫色のラインが出現したものを陽性、またラインが出なかったものを陰性と判定した。

20

【0048】

(結果)

1) ELISA

各抽出液で変性処理した牛乳タンパク質を ELISA で検査した結果を [表 4] に示した。No. 1 ~ 7 までのすべての抽出液で良好に測定することができた。これらのことから、SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 で検出可能で、特に、1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 3.8 : 0 ~ 0.7 が好ましいと判断された。

30

【0049】

【表 4】

表 4. 各抽出液で抽出した牛乳タンパク質の ELISA 検査結果

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				吸光値*1
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	2.203
2	1.0	76.8	3.8	0.2	2.169
3	1.0	19.2	1.0	0.0	2.210
4	1.0	38.4	95.2	0.0	1.662
5	1.0	38.4	0.01	0.7	1.998
6	1.0	9.6	0.5	0.0	2.252
7	1.0	231	1.9	0.0	2.319

40

【0050】

2) イムノクロマト法

各抽出液で変性処理をした牛乳タンパク質をイムノクロマトキットで検査した結果を [表 5] に示した。No. 1 ~ 7 までのすべての抽出液で良好に陽性と判定された。これら

50

のことから、SDS：尿素：システイン：ジチオスレイトールのモル比は1.0：9.6～231：0.01～95.2：0～0.7で検出可能で、特に、1.0：9.6～76.8：0.01～95.2：0～0.7が好ましいと判断された。

【0051】

【表5】

表5. 各抽出液で抽出した牛乳タンパク質のイムノクロマト検査結果

(表中、+は陽性、-は陰性と判定されたものを示す)

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				判定
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	++
2	1.0	76.8	3.8	0.2	++
3	1.0	19.2	1.0	0.0	++
4	1.0	38.4	95.2	0.0	++
5	1.0	38.4	0.01	0.7	++
6	1.0	9.6	0.5	0.0	++
7	1.0	231	1.9	0.0	+

10

20

【0052】

3) まとめ

以上の結果より、ELISAならびにイムノクロマト法のいずれかの方法で牛乳タンパク質を検出するための抽出液のSDS：尿素：システイン：ジチオスレイトールのモル比は、1.0：9.6～231：0.01～95.2：0～0.7が好ましいと判断された。

【実施例4】

【0053】

[牛乳アレルギー(ホエー)の検出]

(方法)

30

1) 検査用試料の調製

牛乳凍結乾燥粉末0.2gを50mLのPP製チューブに採取し、各抽出溶液を加え、沸騰水中で1時間加熱後、10,000×gで30分間遠心分離した後、上清を0.8μmのマイクロフィルターで濾過したものを牛乳標準原液とした。牛乳標準原液は2-D Quant Kit (GE-Healthcare社製)によりタンパク質を定量し、ELISAでは5ppb、イムノクロマト法では100ppbとなるようにPBSTで希釈し、それぞれの検査試料液とした。

【0054】

2) ELISA

PLG3(10μg/mL)、PLG4(10μg/mL)を等量(1:1)で混合し、混合したものを96穴マイクロプレートに100μLずつ分注し、37℃で1.5時間もしくは4℃で一晩静置後、PBSTで5回洗浄した。150μLの1%BSAで37℃1時間のブロッキングを行い、PBSTで5回洗浄した。上記1)で変性処理した検査試料液を100μL加え、37℃で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。ビオチン標識したPLG5(10μg/mL)を100μLずつ分注し、37℃で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。Avidin, Alkaline Phosphatase ConjugateをPBSTで1/1000希釈後、100μLずつ分注し37℃で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。p-ニトロフェニルフォスフェートを量りとり、0.1%となるようにジエタノールアミンバッファーを加え、溶解したものを100μLずつ分注し、室温で30分静置後、5N NaOHを50μLずつ加え、反応を停止し、測定波長405nm、リフ

40

50

アレンス波長 630 nm で測定した。

【0055】

3) イムノクロマト法

2 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) で 1 mg/mL となるように P L G 4 のモノクローナル抗体溶液を調製した。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 にモノクローナル抗体溶液を 500 μL 加え、室温で 30 分間反応した後、10% BSA 溶液 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 (Schleicher & Schuell 社製) に 68 μL/cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

10

【0056】

PBS で 4 mg/mL となるように P L G 3 のモノクローナル抗体溶液を調製し、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。

【0057】

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。上記 1) で変性処理した検査試料液を 100 μL 加え、P L G 3 を塗布した部分に赤紫色のラインが出現したものを陽性、またラインが出なかったものを陰性と判定した。

20

【0058】

(結果)

1) ELISA

各抽出液で変性処理した牛乳タンパク質を ELISA で検査した結果を [表 6] に示した。No. 1 ~ 7 までのすべての抽出液で良好に測定することができた。これらのことから、SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 が好ましいと判断された。

30

【0059】

【表 6】

表 6. 各抽出液で抽出した牛乳タンパク質の ELISA 検査結果

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				吸光値*1
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	0.672
2	1.0	76.8	3.8	0.2	0.641
3	1.0	19.2	1.0	0.0	0.862
4	1.0	38.4	95.2	0.0	0.451
5	1.0	38.4	0.01	0.7	0.607
6	1.0	9.6	0.5	0.0	0.873
7	1.0	231	1.9	0.0	0.483

40

【0060】

2) イムノクロマト法

各抽出液で変性処理をした牛乳タンパク質をイムノクロマトキットで検査した結果を [表 7] に示した。No. 1 ~ 6 までの抽出液出では良好に陽性と判定された。No. 7 の

50

抽出液では尿素濃度が高く、検出に影響を与えたため、検出できなかったと考えられた。しかし、同じ比率で尿素濃度を下げると、SDSの濃度も下がり、抽出効率が下がる危険性が危惧された。これらのことから、SDS：尿素：システイン：ジチオスレイトールのモル比は1.0：9.6～76.8：0.01～95.2：0～0.7が好ましいと判断された。

【0061】

【表7】

表7. 各抽出液で抽出した牛乳タンパク質のイムノクロマト検査結果

10

(表中、+は陽性、-は陰性と判定されたものを示す)

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				判定
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	+
2	1.0	76.8	3.8	0.2	+W
3	1.0	19.2	1.0	0.0	+
4	1.0	38.4	95.2	0.0	+W
5	1.0	38.4	0.01	0.7	++
6	1.0	9.6	0.5	0.0	+W
7	1.0	231	1.9	0.0	-

20

【0062】

3) まとめ

以上の結果より、ELISAならびにイムノクロマト法のいずれかの方法で牛乳タンパク質を検出するための抽出液のSDS：尿素：システイン：ジチオスレイトールのモル比は、1.0：9.6～231：0.01～95.2：0～0.7が好ましいと判断された。

【実施例5】

【0063】

[小麦アレルゲンの検出]

(方法)

1) 検査用試料の調製

小麦タンパク質凍結乾燥粉末0.2gを50mLのPP製チューブに採取し、各抽出溶液を加え、沸騰水中で1時間加熱後、10,000×gで30分間遠心分離した後、上清を0.8μmのマイクロフィルターで濾過したものを小麦タンパク質標準原液とした。小麦タンパク質標準原液は2-D Quant Kit (GE-Healthcare社製)によりタンパク質を定量し、ELISAでは5ppb、イムノクロマト法では500ppbとなるようにPBSTで希釈し、それぞれの検査試料液とした。

40

【0064】

2) ELISA

PG1 (10μg/mL)を96穴マイクロプレートに100μLずつ分注し、37で1.5時間もしくは4で一晚静置後、PBSTで5回洗浄した。150μLの1%BSAで37 1時間のブロッキングを行い、PBSTで5回洗浄した。上記1)で変性処理した検査試料液を100μL加え、37で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。ピオチン標識したPG2 (10μg/mL)を100μLずつ分注し、37で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。Avidin, Alkaline Phosphatase ConjugateをPBSTで1/1000希釈後、100μLずつ分注し37で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。p-ニトロフェニルフォスフェートを量りとり、0.1%となるよ

50

うにジエタノールアミンバッファーを加え、溶解したものを100 μ Lずつ分注し、室温で30分静置後、5N NaOHを50 μ Lずつ加え、反応を停止し、測定波長405nm、リファレンス波長630nmで測定した。

【0065】

3) イムノクロマト法

2mMホウ酸緩衝液(pH9.0)で1mg/mLとなるようにPGL2のモノクローナル抗体溶液を調製した。あらかじめ0.2M炭酸カリウム溶液でpH9.0に調製した金コロイド溶液(シグマ社製)5mLにモノクローナル抗体溶液を500 μ L加え、室温で30分間反応した後、10%BSA溶液を625 μ L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OD525=1.0になるよう調整した。ガラスウール製コンジュゲートパッド(Schleicher & Schuell社製)に68 μ L/cm²となるよう塗布し、乾燥させた。

【0066】

PBSで4mg/mLとなるようにPGL1のモノクローナル抗体溶液を調製し、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%Tween20を含むPBSで37 $^{\circ}$ Cで2時間ブロッキング後、PBSで洗浄し乾燥させた。

【0067】

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。上記1)で変性処理した検査試料液を100 μ L加え、PGL1を塗布した部分に赤紫色のラインが出現したものを陽性、またラインが出なかったものを陰性と判定した。

【0068】

(結果)

1) ELISA

各抽出液で変性処理した小麦タンパク質をELISAで検査した結果を[表8]に示した。No.1~7までのすべての抽出液で良好に測定することができた。これらのことから、SDS:尿素:システイン:ジチオスレイトールのモル比は1.0:9.6~231:0.01~95.2:0~0.7が好ましいと判断された。

【0069】

【表8】

表8. 各抽出液で抽出した小麦タンパク質のELISA検査結果

抽出液 No.	モル比 (SDSを1.0)				吸光値*1
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	1.860
2	1.0	76.8	3.8	0.2	1.453
3	1.0	19.2	1.0	0.0	1.041
4	1.0	38.4	95.2	0.0	0.921
5	1.0	38.4	0.01	0.7	1.198
6	1.0	9.6	0.5	0.0	0.611
7	1.0	231	1.9	0.0	0.870

【0070】

2) イムノクロマト法

各抽出液で変性処理をした小麦タンパク質をイムノクロマトキットで検査した結果を[

表 9] に示した。No. 1 ~ 7 までのすべての抽出液で良好に陽性と判定された。これらのことから、SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1 . 0 : 9 . 6 ~ 231 : 0 . 01 ~ 95 . 2 : 0 ~ 0 . 7 で検出可能で、特に、1 . 0 : 19 . 2 ~ 76 . 8 : 0 . 01 ~ 95 . 2 : 0 ~ 0 . 7 が好ましいと判断された。

【 0 0 7 1 】

【 表 9 】

表 9 . 各抽出液で抽出した小麦タンパク質のイムノクロマト検査結果

(表中、+は陽性、-は陰性と判定されたものを示す)

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				判定
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	++
2	1.0	76.8	3.8	0.2	++
3	1.0	19.2	1.0	0.0	++
4	1.0	38.4	95.2	0.0	++
5	1.0	38.4	0.01	0.7	++
6	1.0	9.6	0.5	0.0	+
7	1.0	231	1.9	0.0	+

10

20

【 0 0 7 2 】

3) まとめ

以上の結果より、ELISA ならびにイムノクロマト法のいずれかの方法で小麦タンパク質を検出するための抽出液の SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は、1 . 0 : 9 . 6 ~ 231 : 0 . 01 ~ 95 . 2 : 0 ~ 0 . 7 となった。

【 実施例 6 】

【 0 0 7 3 】

[そばタンパク質の検出]

30

(方法)

1) 検査用試料の調製

そばタンパク質凍結乾燥粉末 0 . 2 g を 50 mL の PP 製チューブに採取し、各抽出溶液を加え、沸騰水中で 1 時間加熱後、10,000 × g で 30 分間遠心分離した後、上清を 0 . 8 μ m のマイクロフィルターで濾過したものをそばタンパク質標準原液とした。そばタンパク質標準原液は 2 - D Quant Kit (GE-Healthcare 社製) によりタンパク質を定量し、ELISA では 5 ppb、イムノクロマト法では 500 ppb となるように PBST で希釈し、それぞれの検査試料液とした。

【 0 0 7 4 】

2) ELISA

40

PBW4 (10 μ g / mL)、PBW5 (10 μ g / mL) を等量 (1 : 1) で混合し、混合したものを 96 穴マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、37 °C で 1 . 5 時間もしくは 4 °C で一晩静置後、PBST で 5 回洗浄した。150 μ L の 1 % BSA で 37 °C、1 時間のブロッキングを行い、PBST で 5 回洗浄した。1) で変性処理した検査試料液を 100 μ L 加え、37 °C で 1 . 5 時間静置後、PBST で 5 回洗浄した。ビオチン標識した PBW2 (10 μ g / mL) を 100 μ L ずつ分注し、37 °C で 1 . 5 時間静置後、PBST で 5 回洗浄した。Avidin, Alkaline Phosphatase Conjugate を PBST で 1 / 1000 希釈後、100 μ L ずつ分注し 37 °C で 1 . 5 時間静置後、PBST で 5 回洗浄した。p - ニトロフェニルフォスフェートを量りとり、0 . 1 % となるようにジエタノールアミンバッファーを加え、溶解したものを 100 μ L ずつ分注し、室温で 30 分静置後、

50

5 N NaOHを50 μ Lずつ加え、反応を停止し、測定波長405 nm、リファレンス波長630 nmで測定した。

【0075】

3) イムノクロマト法

2 mMホウ酸緩衝液(pH 9.0)で1 mg/mLとなるようにPBW2のモノクローナル抗体溶液を調製した。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にモノクローナル抗体溶液を500 μ L加え、室温で30分間反応した後、10%BSA溶液を625 μ L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(Schleicher & Schuell社製)に68 μ L/cm²となるよう塗布し、乾燥させた。

10

【0076】

PBSで4 mg/mLとなるようにPBW5のモノクローナル抗体溶液を調製し、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℃で2時間ブロッキング後、PBSで洗浄し乾燥させた。

【0077】

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。上記1)で変性処理した検査試料液を100 μ L加え、PBW5を塗布した部分に赤紫色のラインが出現したものを陽性、またラインが出なかったものを陰性と判定した。

20

【0078】

(結果)

1) ELISA

各抽出液で変性処理したそばタンパク質をELISAで検査した結果を[表10]に示した。No.6を除くすべての抽出液で測定することができた。SDS濃度を高くし、尿素の比率が少ないNo.6の抽出液では、過剰なSDSが検出に影響を与えたため吸光値が低かったと考えられた。これらのことから、SDS:尿素:システイン:ジチオスレイトールのモル比は1.0:9.6~231:0.01~95.2:0~0.7で検出可能で、特に、1.0:19.2~231:0.01~95.2:0~0.7が好ましいと判断された。

30

【0079】

【表10】

表10. 各抽出液で抽出したそばタンパク質のELISA検査結果

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				吸光値*1
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	0.281
2	1.0	76.8	3.8	0.2	0.263
3	1.0	19.2	1.0	0.0	0.272
4	1.0	38.4	95.2	0.0	0.193
5	1.0	38.4	0.01	0.7	0.244
6	1.0	9.6	0.5	0.0	0.092
7	1.0	231	1.9	0.0	0.218

40

【0080】

50

2) イムノクロマト法

各抽出液で変性処理をしたそばタンパク質をイムノクロマトキットで検査した結果を [表 1 1] に示した。No. 4 と No. 6 を除く抽出液で良好に陽性と判定された。No. 4、No. 6 の抽出液は陽性と判定されたが、No. 4 では過剰なシステインが検出に影響を与えるため、また SDS 濃度を高くし、尿素の比率が低い No. 6 では SDS が検出に影響を与えたため、良好には検出できなかった。しかし、No. 4 の比率でシステイン濃度を低くした場合、SDS や尿素の濃度が低くなるため、抽出効率が下がる危険性が危惧された。これらのことから、SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 で検出可能で、特に、SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1.0 : 19.2 ~ 231 : 0.01 ~ 3.8 : 0 ~ 0.7 が好ましいと判断された。

【0081】

【表 1 1】

表 1 1. 各抽出液で抽出したそばタンパク質のイムノクロマト検査結果

(表中、+は陽性、-は陰性と判定されたものを示す)

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				判定
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	+
2	1.0	76.8	3.8	0.2	+W
3	1.0	19.2	1.0	0.0	+W
4	1.0	38.4	95.2	0.0	+·
5	1.0	38.4	0.01	0.7	+W
6	1.0	9.6	0.5	0.0	+·
7	1.0	231	1.9	0.0	+W

【0082】

3) まとめ

以上の結果より、ELISA ならびにイムノクロマト法のいずれかの方法でそばタンパク質を検出するための抽出液の SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は、1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 が好ましいと判断された。

【実施例 7】

【0083】

[落花生タンパク質の検出]

(方法)

1) 検査用試料の調製

落花生タンパク質凍結乾燥粉末 0.2 g を 50 mL の PP 製チューブに採取し、各抽出溶液を加え、沸騰水中で 1 時間加熱後、10,000 × g で 30 分間遠心分離した後、上清を 0.8 μm のマイクロフィルターで濾過したものを卵標準原液とした。落花生タンパク質標準原液は 2 - D Quant Kit (GE-Healthcare 社製) によりタンパク質を定量し、ELISA では 5 ppb、イムノクロマト法では 500 ppb となるように PBST で希釈し、それぞれの検査試料液とした。

【0084】

2) ELISA

PAh1 9 (10 μg/mL)、PAh1 10 (10 μg/mL) を等量 (1 : 1) で混合し、混合したものを 96 穴マイクロプレートに 100 μL ずつ分注し、37 °C で

1.5時間もしくは4で一晚静置後、PBSTで5回洗浄した。150 μ Lの1%BSAで37 1時間のブロッキングを行い、PBSTで5回洗浄した。上記1)で変性処理した検査試料液を100 μ L加え、37で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。ビオチン標識したPAh1-4(10 μ g/mL)及びPAh1-8(10 μ g/mL)を等量(1:1)で混合し、混合したものを100 μ Lずつ分注し、37で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。Avidin,Alkaline PhosphataseConjugateをPBSTで1/1000希釈後、100 μ Lずつ分注し37で1.5時間静置後、PBSTで5回洗浄した。p-ニトロフェニルフォスフェートを量りとり、0.1%となるようにジエタノールアミンバッファーを加え、溶解したものを100 μ Lずつ分注し、室温で30分静置後、5N NaOHを50 μ Lずつ加え、反応を停止し、測定波長405nm、リファレンス波長630nmで測定した。

【0085】

3) イムノクロマト法

2mMホウ酸緩衝液(pH9.0)で1mg/mLとなるようにPAh1-4のモノクローナル抗体溶液を調製した。あらかじめ0.2M炭酸カリウム溶液でpH9.0に調製した金コロイド溶液(シグマ社製)5mLにモノクローナル抗体溶液を500 μ L加え、室温で30分間反応した後、1%BSA溶液を625 μ L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OD525=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(Schleicher & Schuell社製)に68 μ L/cm²となるよう塗布し、乾燥させた。

【0086】

PBSで4mg/mLとなるようにPAh1-5のモノクローナル抗体溶液を調製し、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%Tween20を含むPBSで37で2時間ブロッキング後、PBSで洗浄し乾燥させた。

【0087】

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。上記1)で変性処理した検査試料液を100 μ L加え、PAh1-5を塗布した部分に赤紫色のラインが出現したものを陽性、またラインが出なかったものを陰性と判定した。

【0088】

(結果)

1) ELISA

各抽出液で変性処理した落花生タンパク質をELISAで検査した結果を[表12]に示した。No.1~7のすべての抽出液で測定することができた。これらのことから、SDS:尿素:システイン:ジチオスレイトールのモル比は1.0:9.6~231:0.01~95.2:0~0.7が好ましいと判断された。

【0089】

10

20

30

40

【表 1 2】

表 1 2. 各抽出液で抽出した落花生タンパク質の ELISA 検査結果

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				吸光値*1
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	0.444
2	1.0	76.8	3.8	0.2	0.494
3	1.0	19.2	1.0	0.0	0.508
4	1.0	38.4	95.2	0.0	0.396
5	1.0	38.4	0.01	0.7	0.487
6	1.0	9.6	0.5	0.0	0.416
7	1.0	231	1.9	0.0	0.558

10

【 0 0 9 0 】

2) イムノクロマト法

各抽出液で変性処理をした落花生タンパク質をイムノクロマトキットで検査した結果を [表 1 3] に示した。No. 1 ~ 6 までのすべての抽出液で良好に陽性と判定できた。No. 7 の抽出液では尿素濃度が高く、過剰な尿素が検出に影響を与えたため、良好には検出できなかった。これらのことから、SDS : 尿素 : Cys : DTT のモル比は 1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 で検出可能で、特に SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は 1.0 : 9.6 ~ 76.8 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 が好ましいと判断された。

20

【 0 0 9 1 】

【表 1 3】

表 1 3. 各抽出液で抽出した落花生タンパク質のイムノクロマト検査結果

(表中、+は陽性、-は陰性と判定されたものを示す)

抽出液 No.	モル比 (SDS を 1.0)				判定
	SDS	尿素	Cys	DTT	
1	1.0	38.4	1.9	0.0	++
2	1.0	76.8	3.8	0.2	++
3	1.0	19.2	1.0	0.0	++
4	1.0	38.4	95.2	0.0	+w
5	1.0	38.4	0.01	0.7	++
6	1.0	9.6	0.5	0.0	+
7	1.0	231	1.9	0.0	+-

30

40

【 0 0 9 2 】

3) まとめ

以上の結果より、ELISA ならびにイムノクロマト法のいずれかの方法でそばタンパク質を検出するための抽出液の SDS : 尿素 : システイン : ジチオスレイトールのモル比は、1.0 : 9.6 ~ 231 : 0.01 ~ 95.2 : 0 ~ 0.7 が好ましいと判断された。

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成 20 年 11 月 11 日 (2008.11.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

食品中の卵白アレルギーであるオボアルブミンの分析方法において、サンドイッチELISAには、ハイブリドーマ（FERM P-21682）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA5、ハイブリドーマ（FERM P-21683）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA6、ハイブリドーマ（FERM P-20656）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA3、ハイブリドーマ（FERM P-20657）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA4等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ（FERM P-20656）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA3、ハイブリドーマ（FERM P-20657）が産生する抗オボアルブミンモノクローナル抗体PDOA4等を好適に例示することができる。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

食品中の乳アレルギーである s1-カゼインの分析方法において、サンドイッチELISAには、ハイブリドーマ（FERM BP-10263）が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN1、ハイブリドーマ（FERM BP-10264）が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN2、ハイブリドーマ（FERM P-21686）が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN3等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ（FERM BP-10263）が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN1、ハイブリドーマ（FERM BP-10264）が産生する抗 s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN2等を好適に例示することができる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

食品中のホエーアレルギーである -ラクトグロブリンの分析方法において、サンドイッチELISAには、ハイブリドーマ（FERM P-20782）が産生する抗 -ラクトグロブリンモノクローナル抗体P LG3、ハイブリドーマ（FERM P-20783）が産生する抗 -ラクトグロブリンモノクローナル抗体P LG4、ハイブリドーマ（FERM P-21684）が産生する抗 -ラクトグロブリンモノクローナル抗体P LG5等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ（FERM P-20782）が産生する抗 -ラクトグロブリンモノクローナル抗体P LG3、ハイブリドーマ（FERM P-20783）が産生する抗 -ラクトグロブリンモノクローナル抗体P LG4等を好適に例示することができる。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

食品中のそばアレルゲンであるそば24kDaタンパク質の分析方法において、サンドイッチELISAには、ハイブリドーマ(FERM BP-10273)が産生する抗そば24kDaタンパク質モノクローナル抗体PBW2、ハイブリドーマ(FERM P-21680)が産生する抗そば24kDaタンパク質モノクローナル抗体PBW4、ハイブリドーマ(FERM P-21681)が産生する抗そば24kDaタンパク質モノクローナル抗体PBW5等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ(FERM BP-10273)が産生する抗そば24kDaタンパク質モノクローナル抗体PBW2、ハイブリドーマ(FERM P-21681)が産生する抗そば24kDaタンパク質モノクローナル抗体PBW5等を好適に例示することができる。

。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

食品中の落花生アレルゲンであるタンパク質Ara h1の分析方法において、サンドイッチELISAには、ハイブリドーマ(FERM P-20967)が産生する抗Ara h1モノクローナル抗体PAh1-4、ハイブリドーマ(FERM P-21687)が産生する抗Ara h1モノクローナル抗体PAh1-8、ハイブリドーマ(FERM P-21688)が産生する抗Ara h1モノクローナル抗体PAh1-9、ハイブリドーマ(FERM P-21689)が産生する抗Ara h1モノクローナル抗体PAh1-10等を好適に例示することができ、また、イムノクロマト法には、ハイブリドーマ(FERM P-20967)が産生する抗Ara h1モノクローナル抗体PAh1-4、ハイブリドーマ(FERM P-20968)が産生する抗Ara h1モノクローナル抗体PAh1-5等を好適に例示することができる。

フロントページの続き

- (72)発明者 八木 敬広
茨城県土浦市中向原 6 3 5 プリマハム株式会社基礎研究所内
- (72)発明者 加藤 重城
茨城県土浦市中向原 6 3 5 プリマハム株式会社基礎研究所内
- (72)発明者 秋元 政信
茨城県土浦市中向原 6 3 5 プリマハム株式会社基礎研究所内

专利名称(译)	分析食物中过敏物质的方法		
公开(公告)号	JP2010078448A	公开(公告)日	2010-04-08
申请号	JP2008246781	申请日	2008-09-25
[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		
[标]发明人	八木敬広 加藤重城 秋元政信		
发明人	八木 敬広 加藤 重城 秋元 政信		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.Q G01N33/543.501.A G01N33/543.521		
代理人(译)	▲▼高津哉 堀内申		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：提供灵敏的免疫分析方法和分析试剂盒，无需使用2-巯基乙醇等毒物即可安全，简单地检测过敏物质，无论食物中过敏物质（过敏原）的变化/天然状态如何还提供用于提取用于它们的过敏物质的水溶液，以及提取过敏物质的方法。ZSOLUTION：从食物中提取过敏物质的水溶液含有烷基硫酸盐，尿素和半胱氨酸，或烷基硫酸盐，尿素，半胱氨酸和二硫苏糖醇。在水溶液中，所含的烷基硫酸盐，脲和半胱氨酸的摩尔比为1.0：8.0-250：0.01-100：0-1.0。从食品中提取卵清蛋白， α s1-酪蛋白， β -乳球蛋白，小麦醇溶蛋白，荞麦24kDa蛋白和Ara h1等过敏物质，通过夹心ELISA法或免疫色谱法检测，定量。Z

抽出液 No.	SDS (%w/v)	尿素 (%w/v)	Cys* (%w/v)	DTT** (%w/v)	モル比 (SDSを1とする)			
					SDS	尿素	Cys.	DTT
1	0.25	2.0	0.2	0	1.0	38.4	1.9	0.0
2	0.25	4.0	0.4	0.025	1.0	76.8	3.8	0.2
3	0.50	2.0	0.2	0	1.0	19.2	1.0	0.0
4	0.25	2.0	10.0	0	1.0	38.4	95.2	0.0
5	0.25	2.0	0.0012	0.1	1.0	38.4	0.01	0.7
6	1.0	2.0	0.2	0	1.0	9.6	0.5	0.0
7	0.25	12	0.2	0	1.0	231	1.9	0.0