

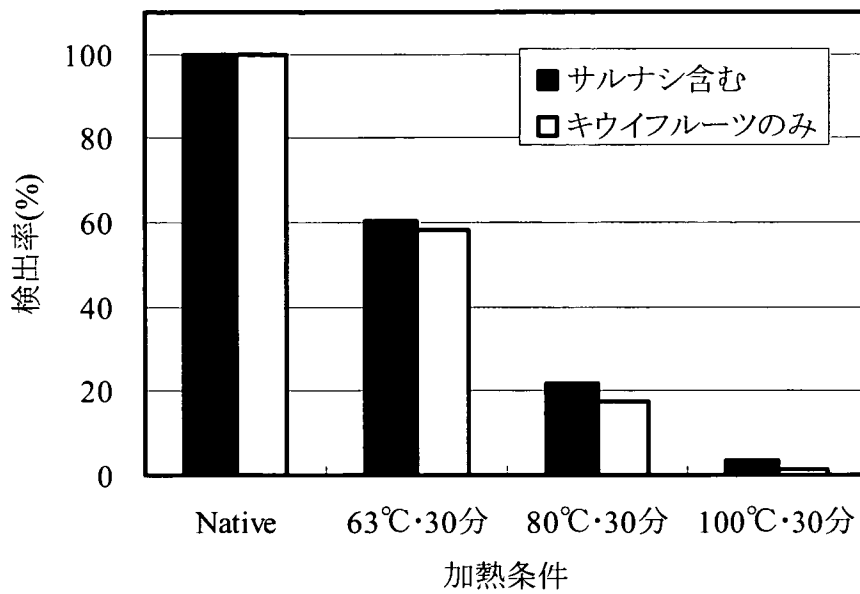
表；安達1 バリデーションに用いたモデル加工食品

A 大豆検知キット用

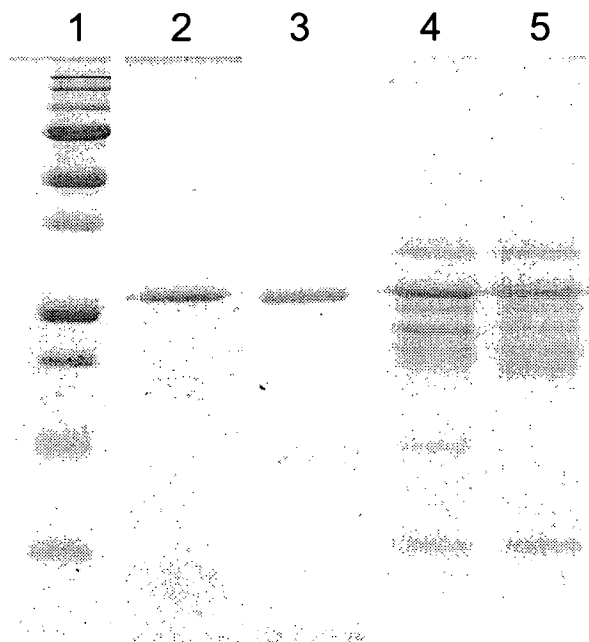
試料	原材料	調製方法	大豆一次標準 粉末濃度 (ppm)
・スイートポテト	さつまいも, 砂糖, 水	電子レンジで加熱し皮を除去したさつまいもと, 砂糖, 水をフードミキサーで均一化後, 100℃, 15 分間加熱 処理	10.0
トマトソース	トマトピューレ, 塩, 砂糖, 水	トマトピューレ, 塩, 砂糖, 水をジューサーで均一化 後, 100℃, 20 分間加熱処理	10.0
おしるこ	小豆, 砂糖, 水	加熱処理し篩で濾した小豆と, 砂糖, 水をジューサー で均一化後, 100℃, 10 分間加熱処理	10.0
ソーセージ	豚肉, 塩, 砂糖, 水	豚肉, 塩, 砂糖, 水をフードミキサーで均一化後, 80℃, 20 分間加熱処理	10.0
白粥	米, 砂糖, 水	米, 砂糖, 水をジューサーで均一化後, 121℃, 10 分間レトルト処理	10.0

B くるみ検知キット用

試料	原材料	調製方法	くるみ一次標準 粉末濃度 (ppm)
ビスケット	小麦粉, 砂糖, ショートニング, 重 炭酸, 食塩, 重曹, 酒石酸, レ シチン, プロテアーゼ	原材料を練り合わせた後, 成形, 焼成 (240℃, 8.5 分)	10.0
食パン	小麦粉, 砂糖, ショートニングイ ースト, 食塩, 脱脂粉乳	原材料を練り合わせた後, 発酵, 焼成	10.0
ケーキ	小麦粉, 砂糖, 全卵, 乳化油脂, 気泡剤, 膨張剤	原材料を練り合わせた後, 焼成	10.0
ジュース	オレンジ果汁, 砂糖, クエン酸, アスコルビン酸	原材料を攪拌後, クエン酸で pH3.5 に調整. 缶に充填後, 90℃で加熱殺菌	10.0
ゼリー	砂糖, 寒天, マスカット香料, ク エン酸, クエン酸ナトリウム	原材料を攪拌後, 加熱 (90℃達温). 缶に充填 後, 15℃, 3 時間冷却	10.0
鶏肉団子	鶏ささみ, ラード 片栗粉, 砂糖	原材料を練り合わせた後, 凍結保存 (-20℃)	10.0
白粥	米, 水	市販炊飯機による炊き上げ	10.0

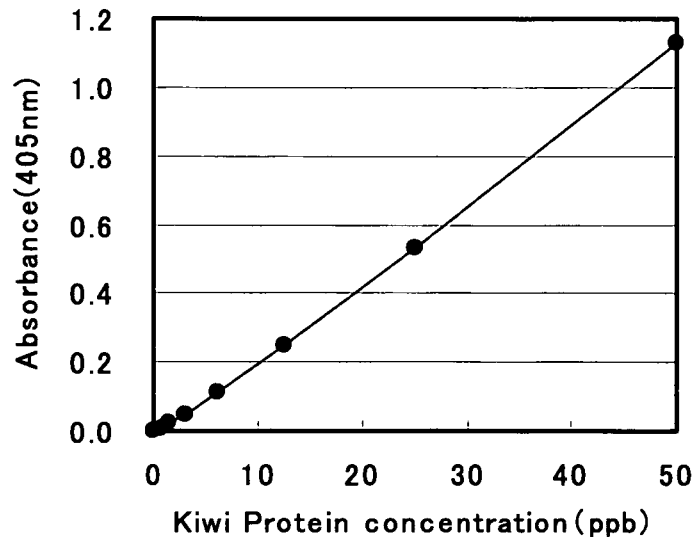


図;安達1 キウイフルーツタンパク質の加熱温度と検出率の変化



図;安達2 各条件で抽出後のキウイフルーツタンパク質の SDS-PAGE 結果

レーン1:分子量マーカー, レーン2:①室温 16 時間抽出, レーン3:②室温 16 時間抽出(E-64 2 $\mu\text{g/ml}$),
 レーン4:③室温 16 時間抽出(E-64 10 $\mu\text{g/ml}$), レーン5:④沸騰水中 1 時間抽出.



図；安達3. キウイフルーツ検出法 ELISA の標準曲線

表；安達2. キウイフルーツ近縁種との交差性結果

品種	μg/g
ゴールドキウイ	検出限界以下
さぬきゴールド	20<
信山	20<
香粹	検出限界以下
一才	20<
マタタビ未熟	3.6
マタタビ完熟	20<
マタタビ虫えい	2.3

表；安達3. 市販食品の検査結果

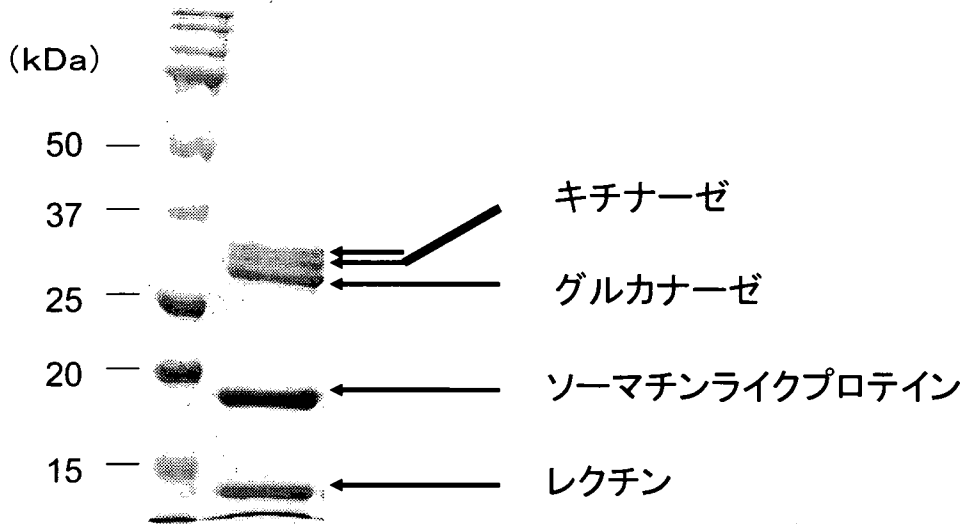
品名	μg/g
缶チューハイ	1.0
ドライキウイ	20<
グミ	20<
ヨーグルト	20<
乳酸菌飲料	20<

表;安達 4 擬似混入試料及び市販品の特異性確認

サンプル	鑄型DNA濃度 (ng/μL)	標的サイズの増幅産物の有無*		
		植物共通 PCR検出法	キウイフルーツ PCR検出法Ⅰ	キウイフルーツ PCR検出法Ⅱ
擬似混入試料				
擬似混入ヨーグルト	20	+	+	+
キウイフルーツまたはサルナシの表示のある試料				
ドライフルーツミックス入りシリアル	20	+	+	+
キウイフルーツ入りクッキー	20	+	+	+
ドライキウイフルーツ (通常⇒洗浄)	<10 ⇒ <10	+	- ⇒ +	- ⇒ +
果物香料入りグミキャンディー (1倍⇒10倍抽出)	<10 ⇒ <10	+	- ⇒ ±	-
キウイフルーツジャム (1倍⇒10倍抽出)	<10 ⇒ 20	+	- ⇒ +	- ⇒ +
サルナシジャム	<10	+	+	+
100%キウイフルーツジュース	<10	±	+	+
ミックスフルーツジュース	11	+	+	+
10%サルナシジュース	<10	+	+	+
ミックスフルーツ果肉入りヨーグルト	20	+	+	+
キウイフルーツ果肉入りヨーグルト	20	+	+	+
表示のない試料				
ドライフルーツ入りシリアル	20	+	-	-
グレープフルーツジャム入りクッキー	20	+	-	-
果物・野菜ジュース	15	+	-	-

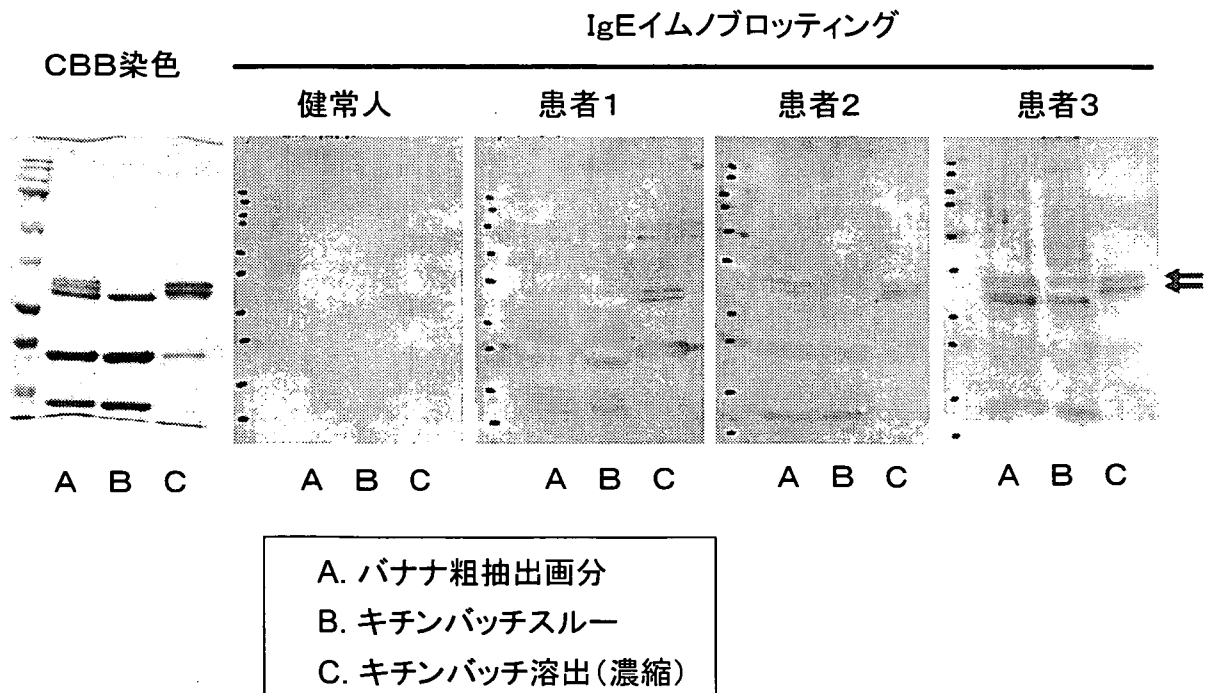
* n=2で実施し、結果は+:2/2、±:1/2、-:0/2で表示した。

CBB染色



PVDF膜に転写し、ポンソーSにて染色後、エドマン分析によってN末端アミノ酸配列を決定しホモロジーサーチを行った。

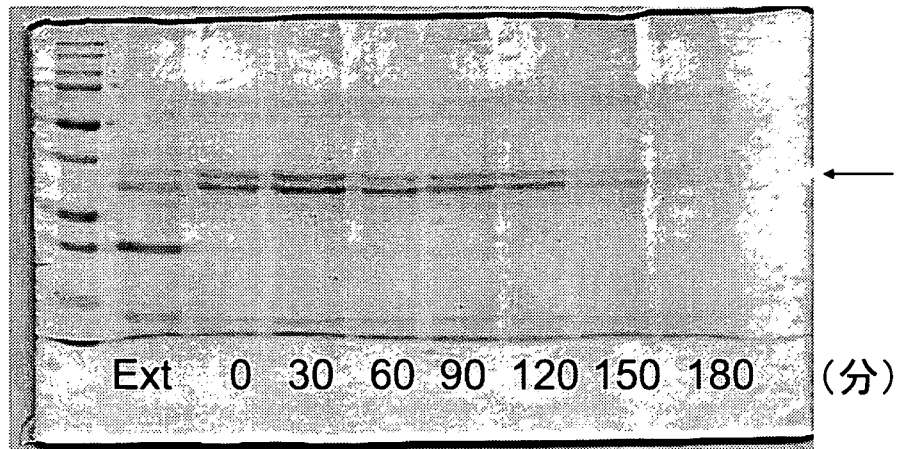
図;安達4 バナナ主要タンパク質の帰属・同定



図;安達5 バナナキチナーゼの精製と患者血清によるIgEイムノプロットティング

図；安達一6 精製キチナーゼの熱安定性

エッペンチューブに20 μ lずつサンプル(約0.5mg/ml)を入れ、80 $^{\circ}$ Cで湯煎し、各時間ごとに取り出し、サンプル調整した。

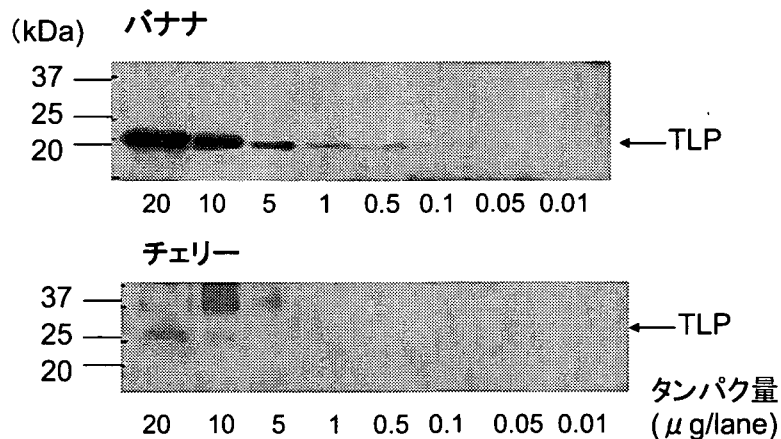


加熱120分までは安定に存在した。

図；安達7 抗バナナソーマチンライクプロテイン抗体の特異性確認

ウエスタンブロッティングの結果

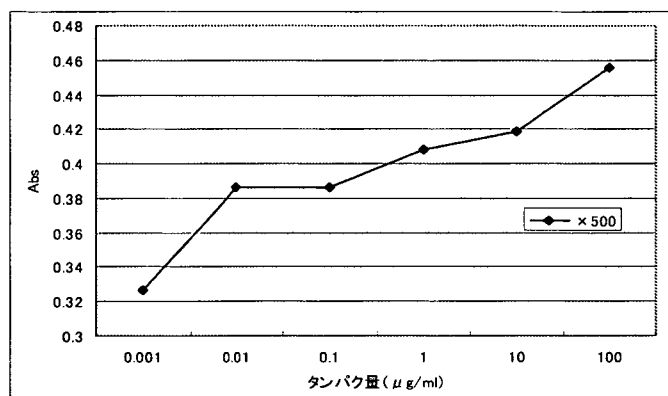
- ・1次抗体:抗バナナ TLP \rightarrow \times 1000希釈
- ・2次抗体:抗ウサギIgG-HRP標識 \rightarrow \times 400希釈



この抗体はバナナのTLPに反応性を示したが、チェリーのTLPにはあまり反応しなかった。よってバナナに特異性が認められた。

図；安達8 **ビオチン-抗バナナTLP抗体を用いた
バナナサンドイッチELISA法による検出**

- ・固相化抗体：抗バナナ α PTN抗体 \rightarrow 10 μ gにPBSで希釈
- ・サンプル：バナナ抽出物(タンパク1mg/ml) \rightarrow $\times 10^1\sim 10^7$ 希釈
- ・2次抗体：ビオチン-抗バナナTLP抗体 \rightarrow $\times 500$ 希釈
- ・HRP抗体：HRP-ストレプトアビジン \rightarrow $\times 5000$ 希釈



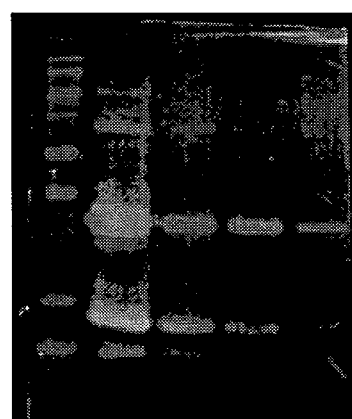
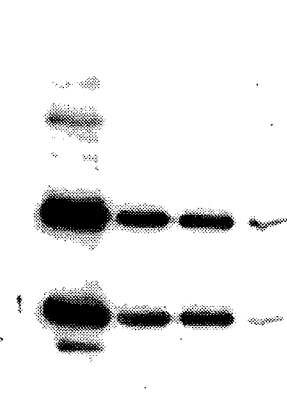
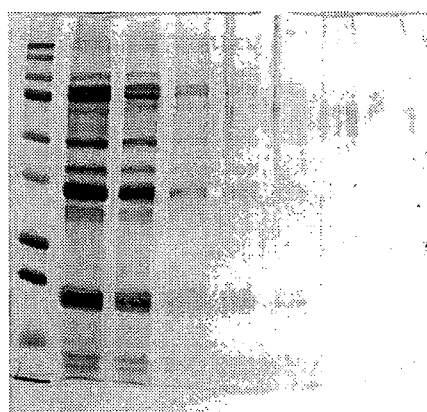
ビオチン-アビジンシステムによるサンドイッチELISA系の構築を試みた。

図；安達9 **アレルゲンの近赤外蛍光検出 (大豆アレルゲンの検出)**

タンパク質染色(CBB染色)

化学発光検出(ECL)

近赤外蛍光検出

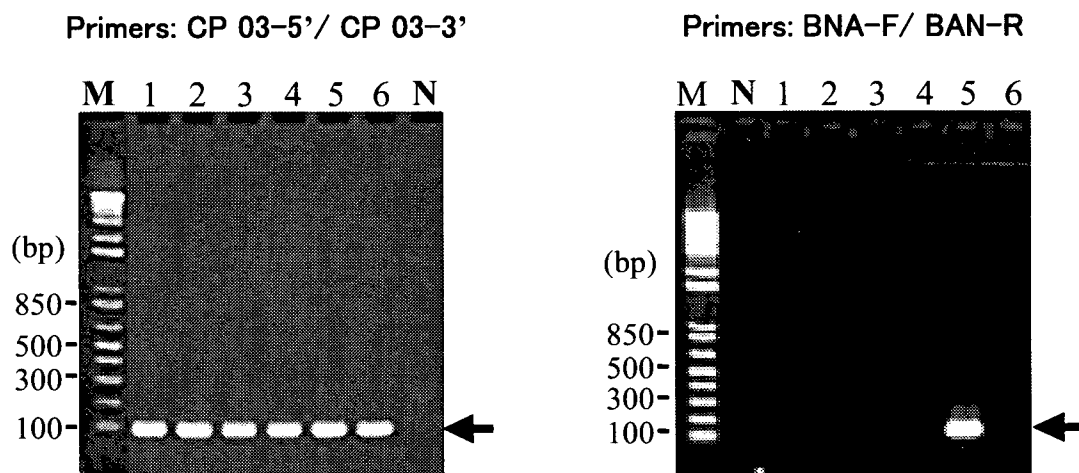


表；安達 5 List of designed primers for detection of banana.

Name	Sequence (5'→3')	Specificity	Amplicon
A:	CP 03-5'	5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'	Chloroplast DNA /sense Plants
	CP 03-3'	5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3'	
B:	BAN-F	5'-TCG TCA CCT ATT GGG ATG C-3'	Chloroplast rbcl gene /sense Banana
	BAN-R	5'-GCT TTA ATA AGT GCT TCG GTG-3'	

A, for confirmation of validity of the DNA extracted from plants for polymerase chain reaction.
B, for specific detection of banana

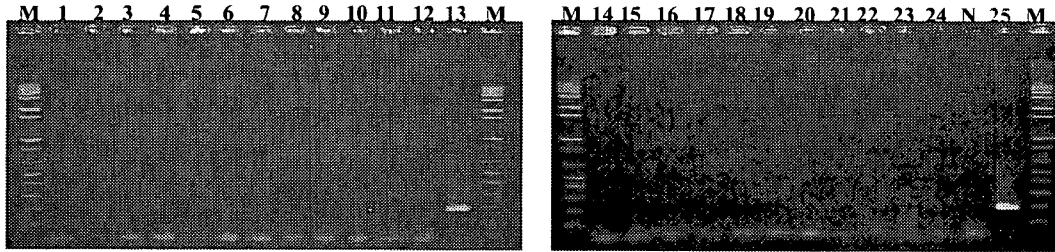
図；安達 10A Specificity of the polymerase chain reaction method using the primer pair BAN-F/BAN-R.



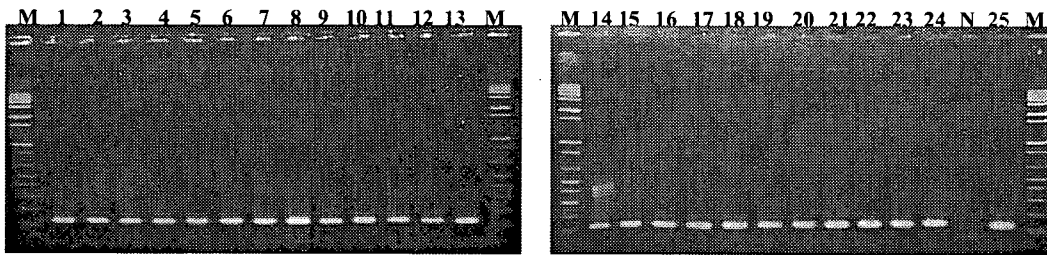
M: DNA marker, N, no-template control.
1: kiwifruit, 2: walnut, 3: apple, 4: yam, 5: banana, 6: soybean

図；安達 10B IB バナナ特異プライマーの交差性確認

バナナ特異プライマー (186bp)

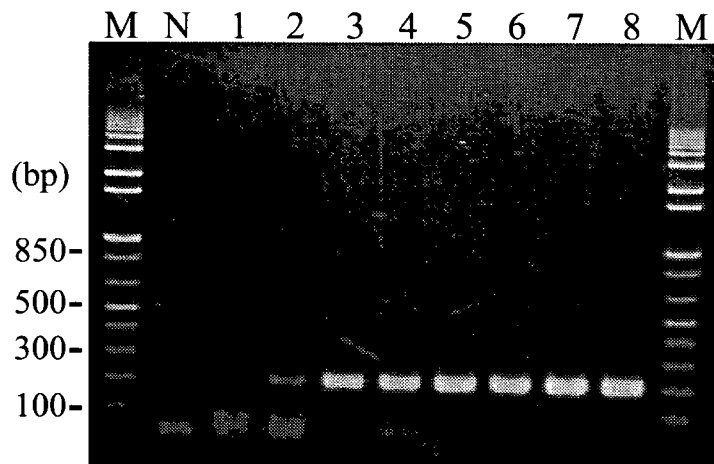


植物標準プライマー (120bp)



抽出DNA由来魚介類			
1, リンゴ	6, すもも	11, みかん	16, ブルーベリー
2, 洋ナシ	7, アンズ	12, イチジク	17, ラズベリー
3, ナシ	8, うめ	13, モンキーバナナ	18, ジューンベリー
4, カキ	9, さくらんぼ	14, キウイ	19, イチゴ
5, もも	10, オレンジ	15, ブドウ	20, メロン
			21, アボカド
			22, パパイア
			23, パイナップル
			24, マンゴー
			25, バナナ

図；安達 11 Sensitivity of the specific detection method for banana.



. M: DNA marker, N: no-template control.
1: 5 fg, 2: 50 fg, 3: 500 fg, 4: 5 pg, 5: 50 pg, 6: 500 pg, 7: 5 ng, 8: 50 ng

表；安達6

表 6. Investigation of commercial products containing banana

No	Sample	Concentration of template DNA (ng/μL)	PCR	
			CP 03-5'/CP 03-3'	BAN-F/BAN-R
1	Banana puree	<10	+	+
2	Fruits juice	<10	+	+
3	Banana juice	<10	+	+
4	Soy milk with banana puree	20	+	+
5	Banana chip	20	+	+
6	Chocolate with banana powder	20	+	+
7	Yogurt with mixed fruit pieces	20	+	+
8	Soft cookie with dried banana	20	+	+
9	Cereal product	20	+	+

+, positive; -, negative.

表；安達7 バリデーション用試料均一性評価結果

A 大豆検知キット用

	スイートポテト	トマトソース	おしるこ	ソーセージ	白粥
平均 (μg/g)	9.93	9.36	10.94	8.43	10.41
併行 (RSD%)	3.28	3.34	3.28	4.55	2.17
試料間 (RSD%)	0.55	0.00	1.36	0.00	0.00
total (RSD%)	3.32	3.34	3.55	4.55	2.17
F	1.06	0.54	1.34	0.56	0.98
F critical	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39

B くるみ検知キット用

	ビスケット	食パン	ケーキ	ジュース	ゼリー	鶏肉団子	白粥
平均 (μg/g)	9.12	13.17	10.18	10.56	10.30	10.53	12.09
併行 (RSD%)	3.52	1.95	2.55	4.71	1.66	8.32	3.23
試料間 (RSD%)	2.21	2.16	0.70	0.00	0.76	0.00	0.00
total (RSD%)	4.16	2.91	2.64	4.71	1.83	8.32	3.23
F	1.79	3.45	1.15	0.64	1.42	0.34	0.34
F critical	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39

表；安達8 FASTKIT エライザ Ver. II 大豆 バリデーション結果

試料	機関数	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
スイートポテト	11	10.0	9.93	99.3	3.9	13.4
トマトソース	11	10.0	9.67	96.7	4.8	13.2
おしるこ	11	10.0	11.36	113.6	2.5	12.9
ソーセージ	11	10.0	9.96	99.6	3.5	10.8
白粥	11	10.0	10.17	101.7	4.8	9.3

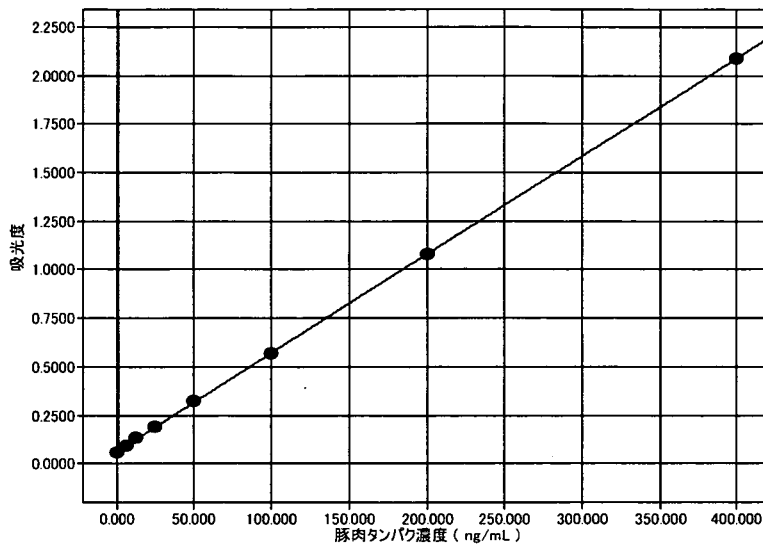
表；安達9 モリナガ FASPEK くるみ測定キット バリデーション結果

試料	機関数	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
ビスケット	11	10.0	8.1	81.3	4.4	7.1
食パン	12	10.0	11.5	115.1	3.0	7.5
ケーキ	11	10.0	9.6	96.0	3.1	5.8
ジュース	12	10.0	9.9	99.0	5.6	8.5
ゼリー	11	10.0	10.3	103.0	4.3	7.3
鶏肉団子	12	10.0	10.6	105.9	6.0	9.9
白粥	12	10.0	11.9	119.3	5.0	8.3

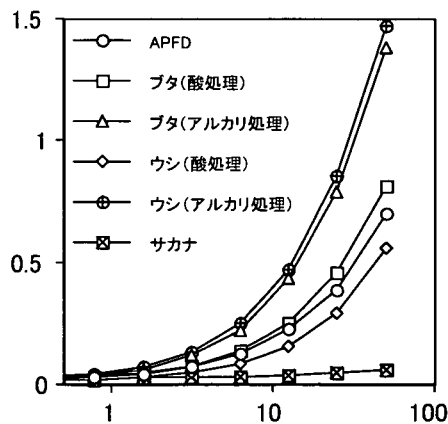
表；田辺 1

サンプル	未加熱区		80°C・30分間加熱区		120°C・30分間加熱区	
	牛肉タンパク質濃度(mg/ml)	B100の濃度を100とした場合	牛肉タンパク質濃度(mg/ml)	B100の濃度を100とした場合	牛肉タンパク質濃度(mg/ml)	B100の濃度を100とした場合
B100	10.826	100.00	3.878	100.00	0.612	100
B10	0.957	8.84	0.461	11.88	0.107	17.3
B1	0.112	1.03	0.037	0.96	0.007	1.1
B0.1	0.009	0.09	0.003	0.07	0.0002	0.1
B0.01	0.001	0.01	-	-	-	-
P100	- ¹⁾	-	-	-	-	-

1): 検出限界未満



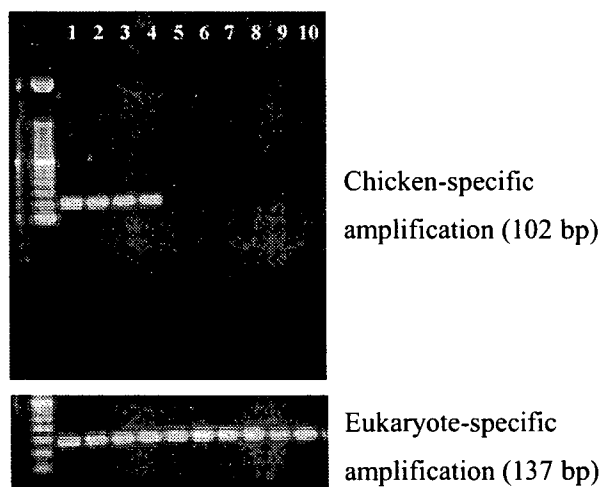
図；田辺 1 豚肉タンパク質検出 ELISA の検量線



図；田辺 2 抗ウシアルカリ処理ゼラチン抗体での反応性
APFD: ブタ(酸処理)凍結乾燥品を100%としたときの相対値

表；田辺2 抗ウシアルカリ処理ゼラチン抗体での測定例

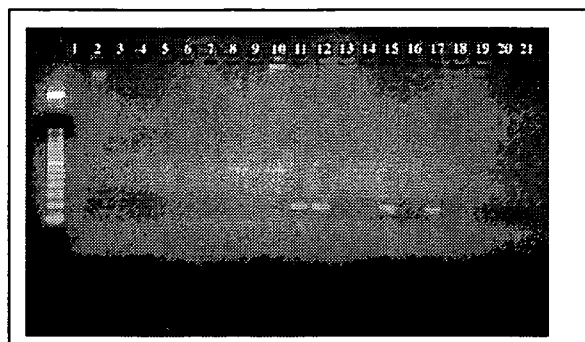
	生魚介類	加熱魚介類
測定サンプル	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)
サバ	N.D.	N.D.
サケ	0.6	N.D.
カツオ	N.D.	2.4
マグロ	N.D.	3.2
スルメイカ	N.D.	4.8
ミズダコ	N.D.	2.1
エビ	N.D.	N.D.
カニ	N.D.	N.D.
アサリ	N.D.	N.D.
ホタテ	N.D.	0.8
たらこ	N.D.	N.D.
ししゃも(卵)	N.D.	N.D.



図：田辺3 鶏肉 PCR 検出系の各肉類との交差性反応

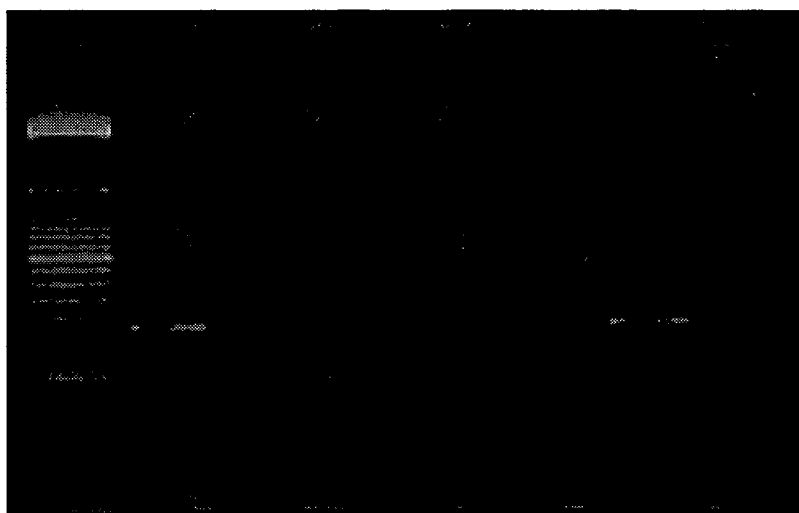
上図：トリ特異的プライマー、下図：真核生物特異的プライマー

1.ブロイラー、2.シャモ、3.名古屋コーチン、4.比内地鶏、
5.鶉、6.七面鳥、7.鴨、8.牛、9.豚、10.羊

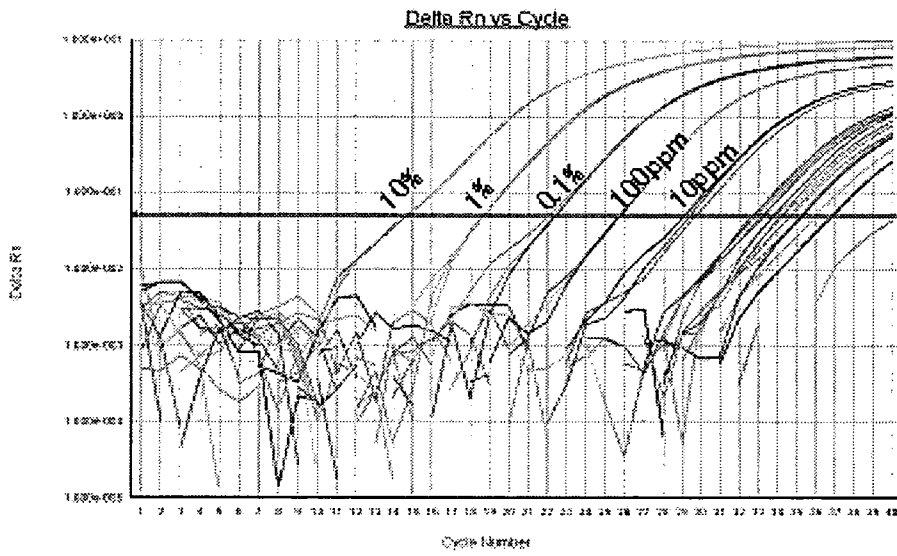


図；田辺4 ウシ特異的プライマーの交差性確認

1. どうもろこし, 2. そら豆, 3. グリーンピース, 4. 昆布,
5. あさり, 6. はまぐり, 7. カレイ, 8. タイ, 9. サケ,
10. タラ, 11. 牛乳, 12. 牛乳(低温殺菌), 13. ナチュラルチーズ,
14. プロセスチーズ, 15. ヨーグルト, 16. バター, 17. 牛肉,
18. 豚肉, 19. 羊肉, 20. 鶏肉, 21. DW



図；田辺創5 ブタ検出用プライマーの交差性確認試験
(左からマーカー、ブタ、ウシ、トリ、ヒツジ、ウマ、イノシシ、
陰性コントロール)



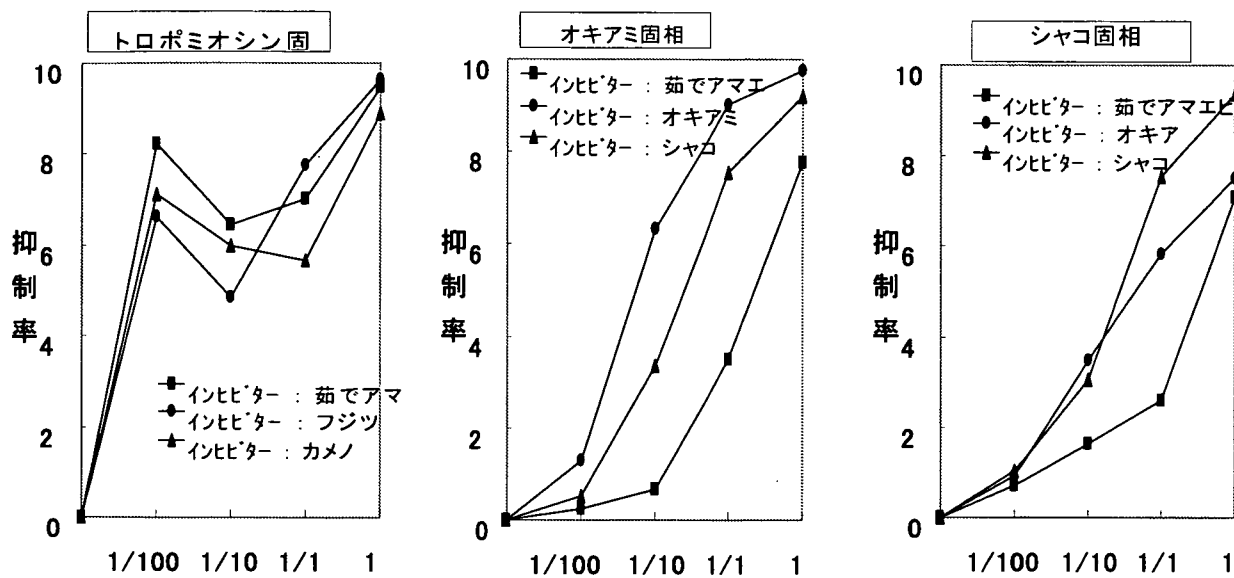
図；田辺 6 餃子中の豚肉の Real-Time PCR による検出

正比生	0.87																	
ブラックタイ生	0.88	0.99																
シハ比生	0.93	0.98	0.98															
アカエビ (ムキエビ) 生	0.91	0.95	0.95	0.96														
ホッコクアカエビ生	0.95	0.96	0.96	0.98	0.98													
エビ mix 生	0.94	0.95	0.96	0.98	0.98	0.98												
ヨーロッパイチョウガニ加熱	0.96	0.85	0.84	0.90	0.87	0.92	0.90											
タラガニ生	0.96	0.92	0.94	0.95	0.93	0.96	0.95	0.93										
カニ生	0.93	0.94	0.95	0.96	0.93	0.96	0.94	0.91	0.98									
シャコ加熱	0.96	0.88	0.87	0.92	0.93	0.96	0.93	0.94	0.94	0.91								
オキアミ加熱	0.98	0.87	0.86	0.93	0.91	0.95	0.93	0.94	0.95	0.91	0.98							
フジツボ加熱	0.97	0.85	0.83	0.90	0.90	0.93	0.90	0.93	0.93	0.90	0.99	0.99						
カメノテ加熱	0.96	0.84	0.84	0.90	0.90	0.93	0.91	0.94	0.94	0.91	0.97	0.98	0.98					
トロボミオン	0.95	0.83	0.80	0.88	0.88	0.92	0.89	0.92	0.91	0.88	0.98	0.98	0.99	0.96				
	ホッコクアカエビ加熱	大正エビ生	ブラックタイ生	シハエビ生	アカエビ (ムキエビ) 生	ホッコクアカエビ生	エビ mix 生	ヨーロッパイチョウガニ加熱	タラガニ生	カニ生	シャコ加熱	オキアミ加熱	フジツボ加熱	カメノテ加熱				

表；字理須 1、甲殻類種間での IgE 抗体価の相関関係

加熱ホッコクアカエビは非加熱の各エビ抗原に対してよりも加熱のカニや、シャコ、オキアミ、フジツボ、カメノテの方が相関係数が高かった

水色：非加熱食品からの抽出、ピンク：相関係数 0.91-94、赤：0.95 以上



図; 宇理須1 トロポミオシン、オキアミ、シャコ抗原を固相とし、各抗原添加によるIgE 結合能抑制率についての検討

図；宇理須2 ELISA-inhibition

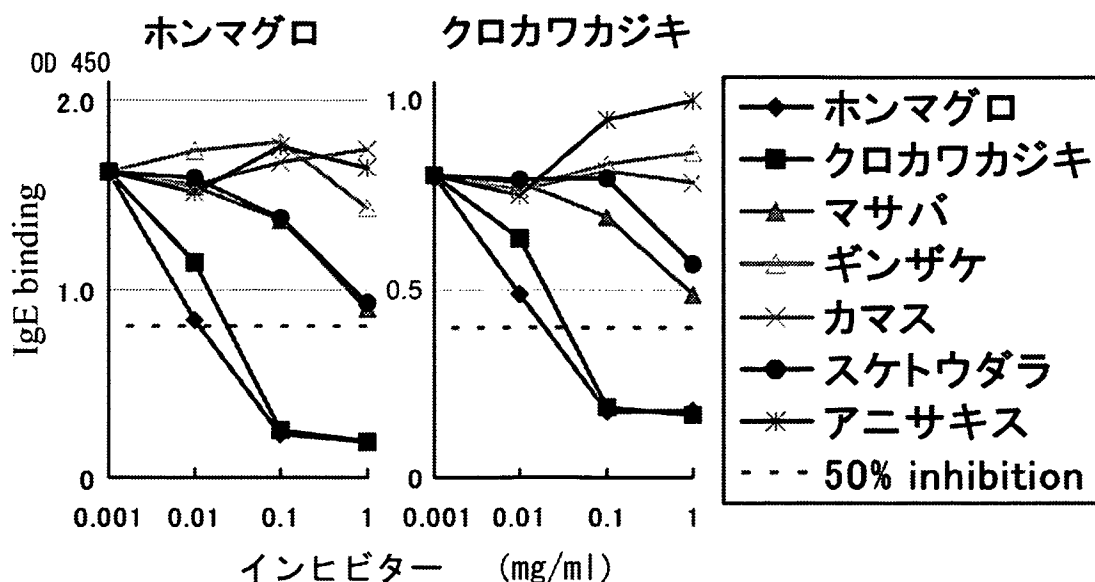
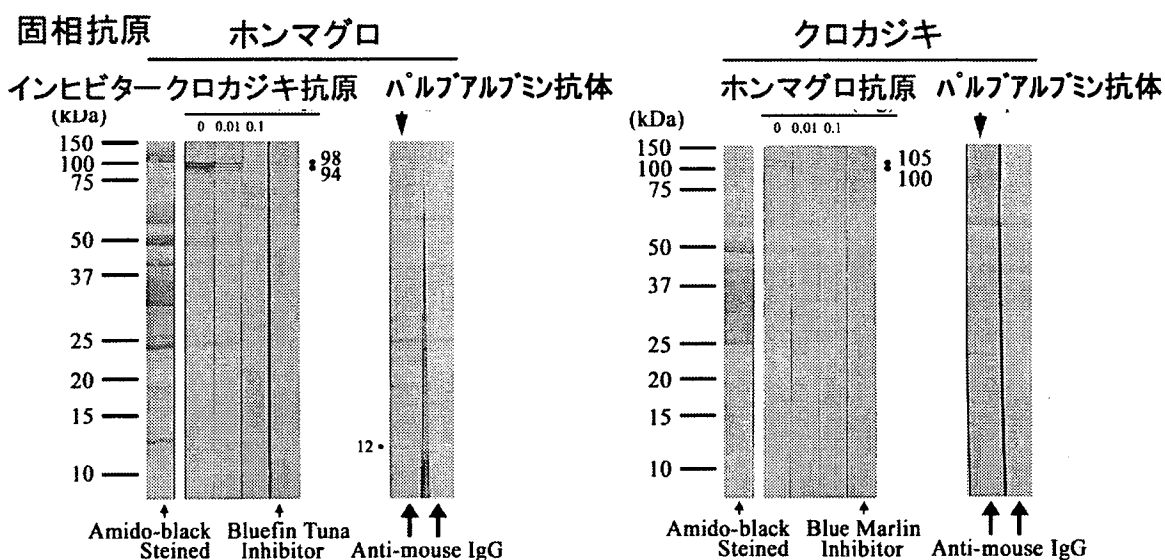


図1 ホンマグロとクロカワカジキとの ELISA inhibition
 ホンマグロとクロカワカジキは互いに IgE 結合を 50%以上抑制した

図；宇理須3 Immunoblot inhibition



J Allergy Clin Immunol (2006) 改変

ホンマグロの94kDaの蛋白を切り出して、アミノ酸N末端のシーケンスを調べたところ
 APAEKVRXXVKSDQELであり、これはトランスフェリンのアミノ酸と87.5%一致していた

表：宇理須1；平成17-19年度研究成果 -アレルギ-物質検査法の開発-

	ELISA法					PCR法					検 証	
	精製抗原	抗体	交叉反応性	感 度	定 量 性	モテル加工食品：回収率	検 証	プライマー特異性	特 異 性	感 度		交叉反応性
甲殻類	エビトロポミオシン； 2種類確立	モノクロ	甲殻類内では交叉反応性あり	良好	良好	良好	完了	えび類、いせえび、うらわえび、ざりがに類	良好	良好	エビとカニと分別可能なエビとカニ二検知法開発	
頭足類	スルメイカトロポミオシン	モノクロ		良好								
サバ	パルプアルブミン	ポリクロ、モノクロ	区別困難					サバ				
サケ								サケ				
イクラ	β-コンポーネント	ポリクロ	良好									
大豆	GlymBd30K。	ポリクロ	良好	良好	良好	良好	完了	大豆	良好			
クルミ	2Sアルブミン	ポリクロ	良好	良好	良好	完了		クルミ	良好		ピーナッツと交叉反応性(制限酵素で区別可能)	
キウイ	アクチニン	モノクロ	コーヒー豆、ブラックペッパーと交叉反応	良好	良好	良好		キウイ	良好			
バナナ	キチナーゼ							バナナ	良好	良好		
鶏肉	アルブミンおよび鶏肉可溶性画分	ポリクロ	卵と交叉、牛肉、豚肉、羊肉とは交叉なし	低い	良好			鶏肉	良好	良好	鶏、鴨、七面鳥と鑑別可能	
豚肉	アルブミンとミオグロビン	ポリクロ	検討中	低い	良好			豚肉	良好	良好	猪肉とは反応。牛、鶏、羊、馬、兔の肉とは鑑別可能	
牛肉	ミオグロビンとウシミンオグロビンの部分配列を含むペプチド2種類	ポリクロ、モノクロ	検討中	低い	良好			牛肉	良好	良好	良好	
ゼラチン	ゼラチン部分配列ペプチドであるいはウシゼラチン	ポリクロとモノクロ	ブタとウシゼラチンに対して反応。サカナゼラチンに対しては反応しない。加熱肉とは反応	良好	良好	検討中(良好と思われ)		不可能	-	-	-	-

ND:no data

表；宇理須2；甲殻類アレルギー物質表示比較一覧

日本標準商品分類	現行	十脚目	臨床症状の交叉	IgE結合能に基づく交差反応性		トロポミオシン		ELISA	PCR法
				IgE阻害係数	RAST (IgE)抑制試験	IgE 阻害 Immunoblot	アミノ酸配列の相同性		
7133 えび類 (いせえび・ざりがりに類を除く)	○	○	基準	0.94以上	相互に抑制	交差性あり	基準	検出	工ビとカニ分別検出可能
7134 いせえび・うちわえび・ざりがりに類	×	○	ND	0.95 0.85	ND	交差性あり	約90%以上	検出	
7135 かに類	○	○	64.7%	0.90以上	ND	交差性あり	約90%以上	検出	
7136 その他の甲殻類	×	×	21.4%	0.93	抑制+/-	ND	約90%以上	検出	検出せず
			ND	ND	ND	ND	ND	検出	検出せず
	71361 しゃこ類	×	26.7%	0.93	抑制+/-	交差性あり	約90%以上	検出	検出せず
	71362 あみ類	×	ND	0.91	抑制+/-	交差性あり	ND	検出	ND
71363 おさあみ類	×	×	ND	0.90	抑制+/-	交差性あり	約55%(アワビ類75-80%)	検出	ND
71369 他に分類されない甲殻類	×	×	ND						
7131 いか類			17.5%	0.75	ND	交差性あり	約60%	検出せず	検出せず
7132 たこ類			20.3%	0.75	ND		約60%	検出せず	検出せず