

# 小麦アレルギーのエピトープペプチドに対する モノクローナル抗体の作製

山口 (村上) 友貴絵, 中村 美幸, 池田 美紀,  
廣瀬 潤子\*, 成田 宏史

## Preparation of Monoclonal Antibodies Specific to The Epitope Peptide of Wheat Allergy

Yukie Murakami-Yamaguchi, Miyuki Nakamura, Miki Ikeda,  
Junko Hirose and Hiroshi Narita

Monoclonal Antibodies were raised against SQQQ(Q)PPF peptide conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin, which has been identified as epitope peptide of wheat allergy. Three monoclonal antibodies, mAbs 3D, 4B, and 6F were obtained by screening with the peptide conjugated to bovine serum albumin. However, these mAbs did not react with the free peptide in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. On western analysis, about 14 and 17 kDa proteins in the wheat globulin fraction were detected with these mAbs. It is reported that wheat proteins of about 14, 16 kDa were reactive with sera of patients allergic to wheat and that a wheat globulin of about 19 kDa has SQQQQQG sequence. It seems likely that the mAbs obtained here recognize the 19 kDa protein related to wheat allergy.

(Received September 1, 2006)

### 1. 緒 言

2002 年の 4 月から, 食物アレルギーの発症数, 重篤度などを考慮し, 特定原材料 5 品目 (卵, 乳, 小麦, そば, 落花生) については, すべての流通段階での表示が義務付けられた (「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」)。これに伴い, 11 月には厚生労働省からこれらを定量する方法として森永生科学研究所<sup>1)</sup> および日本ハム<sup>2)</sup> が開発した ELISA 法が通知法として認定された (食発第 1106001 号)。しかし, 現行の通知法には加水分解を受けたタンパク質に対する定量性が低いという問題点がある<sup>3)</sup>。調味料などにはタンパク質加水分解物が多く用いられているし, 味噌など発酵食品も市場には多く出回っているため, ELISA の反応性を上げ

ることが重要な課題となるわけである。

卵, 牛乳による食物アレルギーは, 多くの場合乳幼児期に発症し成長とともに寛解するが, 小麦アレルギーの場合, 成人患者が多く難治性である。小麦を摂取した場合に起こるアレルギー症状は, アトピー性皮膚炎などを主徴とするいわゆる食餌性アレルギーと *backer's asthma* (製粉あるいは製パン業者にしばしば見られる喘息), およびセリアック病 (グルテン感受性腸炎) に分類される<sup>3)</sup>。最近では, 食物の摂取と運動の組み合わせで誘導される食物依存性運動誘発性アナフィラキシーが非常に重篤な症状を示すことが知られており, 小麦はその最も頻度の高い食品であると報告されている<sup>4-7)</sup>。表 1 に小麦アレルギーの主な症状とその原因タンパク質を示した<sup>8-11)</sup>。複数の患者血清を用いた IgE-ELISA により小麦タンパク質の抗原性を調べた報告によると, 全体の 6 割以上がグルテンを抗原として認識しており<sup>12)</sup>, その抗原性ペプチド部位 (エピトープ) はグルタミンとプロリンを多く含む SQQQ(Q)PPF の繰り

表 1 小麦タンパク質と食物アレルギー  
小麦アレルギーの主な症状とその原因タンパク質を示した。

小麦アレルギー症状	原因タンパク質
セリアック病	アルブミン, グリアジン
baker's asthma	グリアジン ( $\omega$ -5) 水溶性タンパク質 1) $\alpha$ -amylase inhibitor family 2) acyl-CoA oxidase 3) fructose-bisphosphate aldolase 4) peroxidase
食物依存性運動誘発性 アナフィラキシー	$\omega$ -5 グリアジン
アトピー性皮膚炎	グルテン

返し配列を有していると報告されている<sup>13)</sup>。抗原性ペプチドの部分構造を固相ペプチド合成法により合成し、抗原性発現に必須なアミノ酸残基を検討した報告によると、SQQQ(Q)PPF 中 N 末端側のグルタミンおよび 2 つのプロリンが重要であるとされている<sup>14)</sup>。

本研究ではこの抗原性ペプチド SQQQ(Q)PPF 配列に着目して、その免疫学的定量系の確立および小麦タンパク質加水分解物含有調味料や発酵食品中の小麦使用の評価系の開発を目的としてこのペプチドに対するモノクローナル抗体の作製を試みた。

## II. 試料および方法

### 1. 試料

小麦アレルゲンペプチドである SQQQPPF(3Q) および SQQQQPPF(4Q) の合成を BIOSYNTHESIS 社に依頼し、ハプテン抗原として使用した。

### 2. 方法

モノクローナル抗体の作製を始めとする免疫学的手法に関しては、基本的に森下と成田の方法<sup>15)</sup>に従った。

#### 1) ハプテン化抗原の作製

3Q および 4Q はカルボジイミドを用いた活性化エステル法により、カコガイヘモシアニン (PIERCE 社製) またはウシ血清アルブミン (KLH または BSA) と結合させた。(3Q-KLH, 4Q-KLH, 3Q-BSA, 4Q-BSA)

#### 2) 免疫

6-8 週令の 14 匹の雌 BALB/c マウスの腹腔内に抗原として 3Q-KLH および 4Q-KLH を KLH 換算で

50  $\mu$ g ずつ混合し、完全フロイントアジュバント (Freund's complete adjuvant, Difco 社製) とのエマルジョン (1 容:1 容) を投与した。2 週間後、上述抗原 100  $\mu$ g と不完全フロイントアジュバント (Freund's in complete adjuvant, Difco 社製) とのエマルジョン (1 容:1 容) を腹腔内に投与し、さらに 2 週間後抗原 50  $\mu$ g を含む PBS (150mM 塩化ナトリウムを含む 10mM リン酸緩衝液 pH7.4) を腹腔内に投与した。その 3 日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出してこれをほぐし、基本培地 (RPMI-1640 培地に 100mM ビルビン酸ナトリウム、結晶ペニシリン G カリウム 1 万単位/l, ストレプトマイシン 10mg/l を加えた培地) に懸濁した後、脾臓細胞を遠心分離で回収した。

#### 3) 細胞融合と HAT 選択

前述で調製した脾臓細胞と 10% ウシ胎仔血清添加基本培地 (以下、血清添加培地と記す) で培養した対数増殖期のマウスミエローマ細胞 P3U1 を 10:1 の比率になるように混合し、基本培地で 2 回洗浄した。遠心分離により細胞を回収し、細胞ペレットに平均分子量 1500 の 50% ポリエチレングリコール溶液 (ロシュ社製) 1ml を 1 分かけて添加し、その後 1 分間静置した。さらに 20ml の基本培地を 10 分間かけて添加し、細胞液を希釈した後、遠心分離により細胞を回収した。この細胞を 40ml の HAT 培地 ( $4 \times 10^{-7}$ M アミノプテリン,  $1.6 \times 10^{-5}$ M チミジン, および  $1 \times 10^{-4}$ M ヒポキサンチンを含む血清添加培地) に懸濁し、96 穴プレート 4 枚に分注し、湿度 100%, 炭酸ガス 5%, 37°C で培養を開始した。培養開始の翌日、HAT 培地を各ウェルに 100  $\mu$ l 添加し、

以後2ないし3日ごとに半量の培地を新たなHAT培地と交換し、培養を続けた。その結果、ほとんどのウェルでハイブリドーマの増殖が認められた。

#### 4) 抗体産生細胞の樹立

細胞融合後、得られたハイブリドーマから目的とする抗体産生細胞を選択するため、固相 ELISA と競合 ELISA によりスクリーニングを行った。すなわち、前者は 3Q-BSA および 4Q-BSA 混合溶液 (1:1) を 5 $\mu$ g/ml 固相化後 1%BSA/PBS によりブロッキングし、一次反応としてハイブリドーマ培養上清を反応させ、続いてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス kappa (サザンバイオ社製) との反応後、 $p$ -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として検出し、405nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio-Rad 社製) を用いて測定した。後者は 3Q-BSA および 4Q-BSA 混合溶液 (1:1) を固相化ブロッキング後、一次反応として遊離競合因子ペプチド (3Q:4Q=1:1) と培養上清とを同時に反応させ、続いて固相 ELISA と同様に検出した。抗体を KLH から BSA に変えたのは、KLH に反応する抗体を除くためである。

#### 5) ハイブリドーマのクローニング

限界希釈法により 2 回のクローニングを行った。増殖培地として血清添加培地に増殖因子として ORIGIN (IGEN 社製の B 細胞増殖因子を含む溶液) を 10% になるように添加したものをを用いた。

#### 6) モノクローナル抗体サブクラスの決定

モノクローナル抗体産生細胞株が培養上清液中に分泌するモノクローナル抗体について、その免疫グロブリンのサブクラスを、マウスモノクローナル抗体アイソタイプキット (アマーシャム社製) を用いて調べた。

#### 7) 抗体の大量調製

BALB/c マウスに腹水癌を誘導するために 0.5ml のプリスタン腹腔内に投与し、投与 3 ~ 10 日後に  $1 \times 10^7$  個のモノクローナル抗体産生細胞を腹腔内に移植した。その約 2 週間後に腹水を採取した。

#### 8) 抗体の精製

採取した腹水を遠心分離後 (10000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5 分), 上清を採取し、IgG についてはプロテイン G セファロース (アマーシャム社製) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより純化した。IgM については硫酸塩析法を用いて精製を行った。

#### 9) ELISA

スクリーニングで使用した固相 ELISA, 競合 ELISA については、先に述べた。抗体の特異性を調

べるための競合 ELISA はスクリーニングと同様の方法および一次反応として遊離競合因子 (3Q-BSA: 4Q-BSA=1:1) と培養上清とを同時に反応させる系と、遊離競合因子 BSA と培養上清とを同時に反応させる系の 3 つの系で行った。現行通知法 (小麦測定キット, グリアジン, FASPEK, 森永社製) を使用してサンドイッチ ELISA 法による解析は、通知法の一次反応 (抗原) 後、ハイブリドーマ培養上清を反応させて、固相 ELISA と同様に検出した。得られたモノクローナル抗体同士のサンドイッチ ELISA は、精製 IgM 抗体を 5 $\mu$ g/ml 固相化したプレートにグロブリンを抗原として反応させて、純化した IgG 抗体、続いてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (カッセル社製) を供し、 $p$ -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として検出した。

#### 10) SDS-PAGE

NuPAGE 10%Bis-Tris Gel (インビトロジェン社製) を用い、CROSSPOWER1000 (アトー社製) 80 mA の定電流、還元剤存在下において電気泳動を行った。ゲルはクマシーブリリアントブルー R-250 で染色した。

#### 11) ウェスタン解析

穀類粉 1%SDS 抽出液 (タンパク質として 10 $\mu$ g) または分画した小麦タンパク質を SDS-PAGE に供し、電気泳動を行った後、ゲル上のタンパク質を 170 mA の定電流で 90 分間ポリビニルピロリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (BIO-RAD 社製) に転写し、5%スキムミルクを含む PBS によるブロッキングを室温、1 時間で反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、ハイブリドーマ培養上清を室温、1 時間で反応させた。次に、Tween20-TBS で 3 回、0.1%BSA-Tween20-TBS 溶液で 5000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗マウス kappa (サザンバイオ社製) で室温、1 時間の反応を行った。その後、Tween20-TBS で 3 回洗浄し、アルカリフォスファターゼ発色キット (ナカライテスク社製) による発色を行った。

#### 12) 小麦タンパク質の分画

米タンパク質の分画法 (図 1) に準じて行った<sup>16)</sup>。

### III. 結果および考察

#### 1. モノクローナル抗体の作製

一般に数残基のペプチドのような低分子 (分子量 1 万以下) は抗体とは結合し得るが、免疫応答を誘導できないため、免疫原性の高い高分子と結合させて抗原とする手法を取る。そこで合成ペプチド SQQQPPF(3Q) および SQQQPPF(4Q) を KLH に結

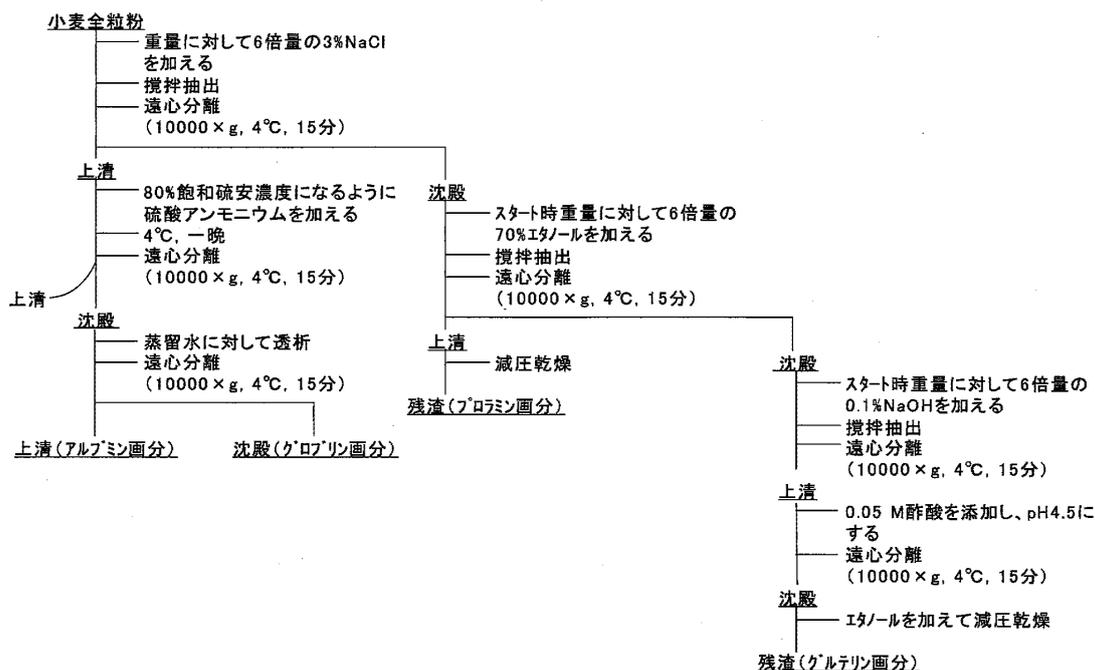


図1 小麦タンパク質の分画法  
小麦全粒粉をスタートとしてタンパク質の分画を行った<sup>16)</sup>。

合させて抗原とし、マウスに免疫した。免疫マウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合後、最終的にBSA・ハプテン抗原を認識する3D, 4B, 6Fの3つのモノクローナル抗体産生細胞を樹立した。これらの抗体のクラス決定を行った結果、3DはIgG, 4Bおよび6FはIgMであることが確認できた。その後、これらの細胞をプリスタン処理マウスに腹水ガン化し、腹水を採取した。採取した腹水について3DについてはプロテインGによる抗体の純化を行い、4Bおよび6Fについては50%飽和硫酸による塩析法を用いて精製を行った。

## 2. モノクローナル抗体の特異性

ハプテン化抗原の場合、キャリアーへの結合の際に化学変化を起こしてしまう、あるいはキャリアーとの結合状態が認識されてしまうことがある。従って、抗体の特異性を論ずる場合には競合ELISAにおいて本来の構造を持った遊離抗原で阻害がかかることが非常に重要である。そこで、得られた抗体が目的とするペプチドを認識しているかどうかを確認するために、遊離競合因子としてBSA, 3Q-BSA:4Q-BSA=1:1 (3Q/4Q-BSA), 3Q:4Q=1:1 (3Q/4Q)を用いた競合ELISAを行った(図2)。3抗体ともキャリアーであるBSAでは阻害はかからなかった。3Q/4Q-BSAの場合は、3Dのみ遊離競合因子の濃度増加に伴い吸光度の低下がみられた。しかし、3Q/4Qペ

プチドへは3抗体共に阻害が全くかからなかったため、キャリアーとの架橋部分を含む分子でないと認識できないことが考えられた。有機塩素系の農薬として広く使用されているクロロタロニルに対するモノクローナル抗体の作製もハプテン化抗原を用いて行った結果、得られた抗体はマウスの免疫に用いた抗原であるペンタクロロフェノールをほとんど認識できなかったが、クロロタロニルなど類似化合物に対しては高い親和性を示した<sup>17)</sup>。今回使用したペプチドも免疫ペプチドよりもスペーサーとしてN, C末端に何残基か加えたペプチドには反応性があるかもしれない。

次に、小麦タンパク質に対する反応性についてウエスタン解析を行ったところ、3抗体いずれも14, 17kDa付近のタンパク質を認識していることが確認できた(図3)。椿らは、小麦RASTスコア3~4を示す患者血清と健常人血清の小麦精製タンパク質に対する反応をIgG-イムノブロット法により解析を行ったところ、健常人は33kDa以上の高分子画分を認識し、29kDa以下の分画に対する抗体は検出されなかったが、患者血清は12~100kDaにわたる小麦成分と反応し、特に14, 16, 24, 29kDa画分で強く検出されたと報告している<sup>18)</sup>。このことから、得られた3抗体が認識している画分は小麦アレルギーとなんらかの関係があると推察される。さらに、大麦、

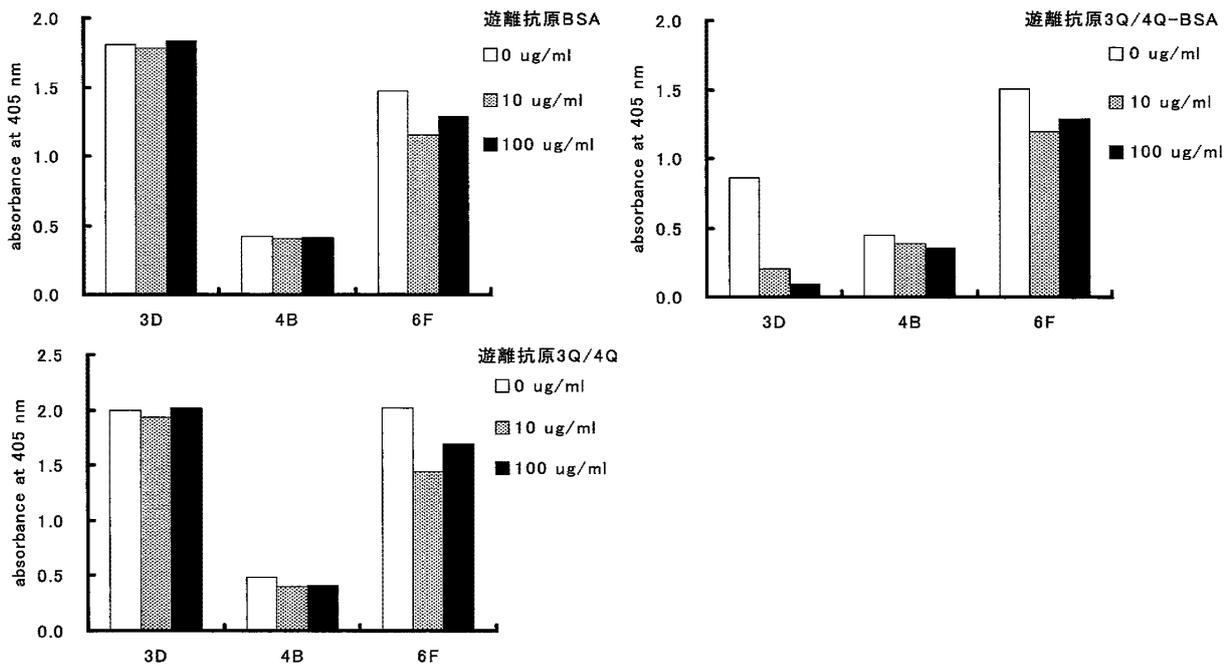


図 2 特異性解析 (競合 ELISA)

3Q-BSA および 4Q-BSA (1:1) を固相化し、一次反応として遊離競合因子 BSA, 3Q-BSA:4Q-BSA=1:1, 3Q:4Q=1:1 とハイブリドーマ培養上清を同時に反応させ、続いてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス kappa との反応後、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムにより検出し、405 nm における吸光度を測定した。

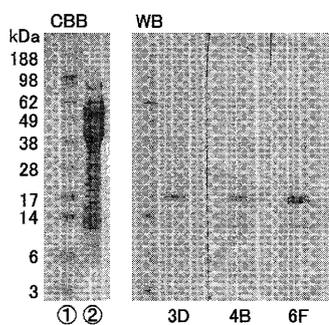


図 3 特異性解析 (Western Blotting)

左側 (CBB) は①分子量マーカー, ②小麦 1%SDS 抽出画分 (タンパク質として 10 $\mu$ g) を CBB 染色により検出した。右側 (WB) は小麦 1%SDS 抽出画分 (タンパク質として 10 $\mu$ g) を転写後モノクローナル抗体 3D, 4B, 6F がどのタンパク質を認識しているかを検討した。

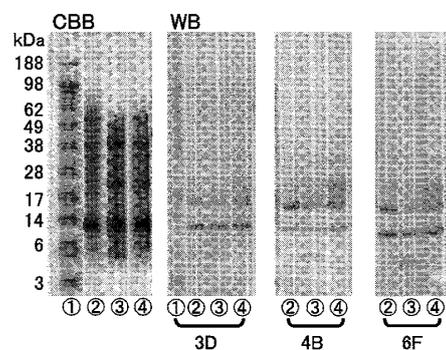


図 4 交差反応性

左側 (CBB) は①分子量マーカー, ②小麦 1%SDS 抽出画分③大麦 1%SDS 抽出画分, ④ライ麦 1%SDS 抽出画分 (以上タンパク質として 10 $\mu$ g) を CBB 染色により検出した。右側 (WB) は同様にアプライし、転写後モノクローナル抗体 3D, 4B, 6F の交差反応性をウェスタン解析により検討した。

ライ麦に対する交差反応性を調べるためにウェスタン解析を行ったところ、3 抗体共に大麦、ライ麦に対しては、小麦と同様 14, 17kDa 付近を認識していた (図 4)。卵白、牛乳タンパク質ではこの部分は染色されなかったため、これらは穀類共通のタンパク質であることが判明した。

3Q, 4Q はグルテン由来のペプチドであることから 14, 17kDa のタンパク質がグリアジン、グルテニンに含まれているかどうかを、通知法である森永社製小麦グリアジンキットにより確認を行った (図 5)。ただし、ウェスタン解析と同条件にするために、変性剤および還元剤存在下における通知法の改良法を

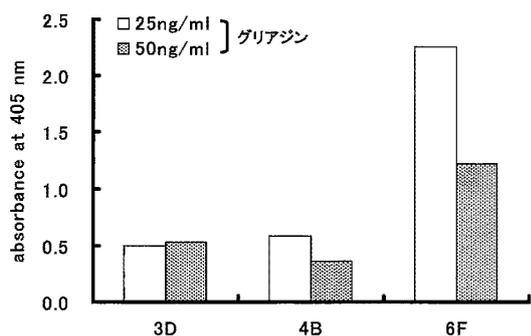


図 5 グリアジンの反応性  
通知法（改良法）を一次反応まで使用して、二次反応に得られた 3 抗体を供し、ELISA を行った。

使用した。二次反応はキットの抗体を用いずに、3D、4B、6F をそれぞれ二次抗体として検出を行った。3D、4B は吸光度が低く、グリアジンを認識していないと思われた。6F はグリアジンの濃度上昇に伴い吸光度は低下しているため、検出値は高いが、グリアジンを認識している可能性は低いと考えられる。そこで、小麦タンパク質を溶解性の特徴に合わせて図 1 に示す方法にしたがってアルブミン、グロブリン、グリアジン、グルテニン画分に分画した。それぞれのタンパク質の含有率<sup>19)</sup>と実際の回収率を表 2 に示した。グロブリン画分として回収した沈殿部は 3%NaCl に再溶解させたが溶けずに残っている部分が見られ、同様にグルテリン画分として回収した残渣を 1%SDS に溶解させたが、ほとんど溶けずに残っていた。回収率の低いグロブリンは蒸留水に溶解できなかった沈殿部分であり、グルテリンは 70%エタノールに不溶な沈殿部分である。回収率が低い原因は、この沈殿の一部が不溶化しているためであると考えられる。次に、得られた 3 抗体がこれら 4 画分のどの画分を認識しているかをウエスタン解析によ

り検討した（図 6）。その結果、3 抗体ともアルブミン画分とグリアジン画分を全く認識しないこと、驚いたことに 14、17kDa のタンパク質はグロブリン画分に存在するタンパク質であることが判明した。クマシー染色では 14、17kDa のタンパク質はどの画分においてもバンドが見られないため、量的には少ないタンパク質であることが推測された。

次に 3D、4B、6F 抗体と抗原グロブリンによる小麦タンパク質定量系の構築を試みた。固相化した IgM 抗体 4B、6F と IgG 抗体 3D でグロブリンを挟み、抗 IgG 酵素標識抗体を使用して発色させるサンドイッチ ELISA を行った。しかし、グロブリンと抗体との反応に濃度依存性は見られず（図 7）、定量系の確立は困難であった。これは遊離状態の抗原は認識されていないためと考えられる。

以上のことより、得られた 3 抗体は、グルテン由来のペプチドをマウスに免疫して得られたにもかかわらず、小麦アレルギーと関連するであろうグロブリン系のタンパク質を、ウエスタン解析のみで認識する抗体であった。

我々は既に同様のハプテン化により、新規ビタミンとして注目されている PQQ に対するモノクローナル抗体の作製に成功しているが、この中で免疫抗原とした PQQ よりそのオキサゾ誘導体に 100 倍近く親和性の高い抗体が得られた<sup>20)</sup>。また、昨年度はペンタクロロフェノールをハプテン抗原として、類似体の農薬であるクロロタロニルに対するモノクローナル抗体の作製にも成功している<sup>17)</sup>。このように用いた抗原よりもその誘導体に対して親和性が高い抗体を heteroclitic 抗体といい、ハプテン抗原を用いた場合に良く問題となる現象である。今回のペプチド抗原の場合、今のところ競合因子が見つからないため特異性は不明であるが、heteroclitic 抗体の一つといえるかもしれない。我々はかつて、κ-カゼイン由来の抗オビオイド活性を持つデカペプチドであ

表 2 小麦タンパク質の溶解度による分画結果  
図 1 に従って小麦タンパク質の分画を行い、理論値より回収率を求めた。

	含有率	理論値	実測値	回収率
	%	mg/g		%
アルブミン	9	90	96.0	106.7
グロブリン	5	50	24.6	49.2
プロラミン	40	400	500.5	125.1
グルテリン	46	460	130.2	28.3
合計	100	1000	751.3	75.1

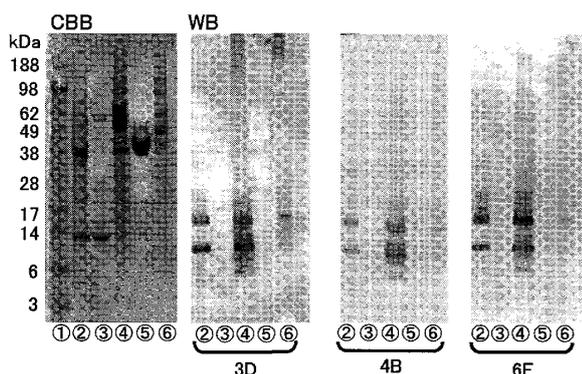


図 6 小麦タンパク質に対する反応性  
 図 1 に示す分画方法に基づき分画後、左側 (CBB) は①分子量マーカー②小麦抽出画分③アルブミン④グロブリン⑤グリアジン⑥グルテニン (以上タンパク質として 10 $\mu$ g) を CBB 染色により検出した。右側 (WB) は同様にアブライシ、転写後モノクローナル抗体 3D, 4B, 6F が分画したどのタンパク質を認識するか検討した。

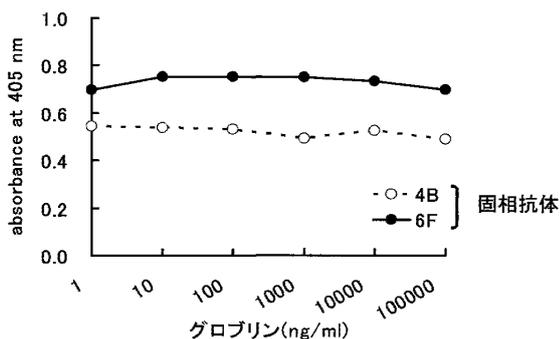


図 7 サンドイッチ ELISA 定量系  
 精製抗体 4B または 6F を固相化し、抗原としてグロブリンを加えた後 3D を反応させて、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を使用して発色させた。

るカゾキシ C (YIPIQYVLSR) に対して今回同様モノクローナル抗体の作製を試みたことがある。この場合カゾキシ C では競合がかかったが $\kappa$ -カゼインは認識されなかった (未発表)。他にも抗ペプチド抗体の報告は多くあり、原理的に取得不能とは思われない。しかし、3Q, 4Q ペプチドについては実験年度を変えて何度もトライしたが、得られた抗体はいずれも抗原ペプチドを認識せず、グロブリン中の 14, 17kDa 付近のタンパク質を認識するという結果には再現性がみられた。したがって、これらの抗体は非特異的に偶然とれたわけではない。データベースによるアミノ酸配列検索の結果、小麦グロブリン

画分に 19kDa の SQQQQQG 配列を持つタンパク質の存在が判明したので、今回得られた抗体はグリアジンに多数存在する 3Q, 4Q 配列よりもグロブリンに存在する SQQQQQG 配列を認識しやすいと考えられる。キャリアータンパク質に結合した 3Q, 4Q が付近の環境によって特殊な構造をとりやすいのかもしれない。いずれにせよ、ハプテン抗原に対する抗体に関しては、取得後その特異性を十分に検討しておく必要がある。抗原抗体反応の認識の複雑さ、奥深さを痛感させられた。

(平成 18. 9. 1. 受付)

### 引用文献

- 1) T. Honjoh, S. Muraok, S. Mamekoshi and M. Sakai: *Food and Food Ingredients J. Jpn.*, 206, 13–22 (2002)
- 2) Y. Takahata and F. Morimatsu: *Food and Food Ingredients J. Jpn.*, 206, 23–32 (2002)
- 3) 田辺創一: *化学と生物*, 38, 143–145 (2000)
- 4) M. T. Guinnepain, C. Eloit, M. Raffard, et al.: *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 77, 491–496 (1996)
- 5) H. Kushimoto and T. Aoki: *Arch. Dermatol.*, 121, 355–360 (1985)
- 6) E. Varionen, E. Vainio and K. Kalimo: *Clin. Exp. Allergy*, 27, 162–166 (1997)
- 7) M. Dohi, M. Suko and H. Sugiyama: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 87, 34–40 (1991)
- 8) J. Franken, U. Stephan and H. E. Meyer: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 103, 912–917 (1999)
- 9) A. Posch, W. Weiss and C. Wheeler: *Electrophoresis*, 16, 1115–1119 (1995)
- 10) W. Weiss, G. Huber and K. H. Engel: *Electrophoresis*, 18, 826–833 (1997)
- 11) R. Sanchez-Monge, G. Garcia-Casado and C. Lopez-Otin: *Clin. Exp. Allergy*, 27, 1130–1137 (1997)
- 12) S. Tanabe and M. Watanabe: *Recent Res. Devel. Arg. Biol. Chem.*, 1, 83–99 (1997)
- 13) M. Watanabe, S. Tanabe, T. Suzuki, Z. Ikezawa and S. Arai: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1596–1597 (1995)
- 14) S. Tanabe, S. Arai, Y. Yanagihara, H. Mita, K. Takahashi and M. Watanabe: *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 219, 290–293 (1996)
- 15) 森下恵美, 成田宏史: 本誌, 47, 1–18 (1992)
- 16) 満田久輝等編: *食品工学実験書 上巻*, 養賢堂

- 版, 602-603 (1970)
- 17) 山口 (村上) 友貴絵, 小川加那子, 伊東茂寿, 成田宏史: 本誌, 60, 15-21 (2005)
- 18) 椿 和文, 栗山智之, 清水広子, 松山秀介, 横田俊平, 高橋一夫, 杉山朝美, 小松 平, 池澤善朗: アレルギー, 40, 521-528 (1991)
- 19) ジャンークラウド・シャフテル等編: 食品シリーズ 1 食品タンパク質ハンドブック NTS (1988)
- 20) H. Narita and E. Morishita: *J. Biochem.*, 117, 830-835 (1995)