

平成 22 年 5 月 7 日

平成 20 年 9 月 22 日付け「食品健康影響に係る補足資料の提出依頼についてープロテイン
グルタミナーゼの提出依頼補足資料」(府食第 1002 号) に対する回答

【補足資料要求 1】

プロテイングルタミナーゼの製造方法、特に除菌工程について正確に提示し、生産菌が完全に除去されることを明らかにすること。また、細菌が溶解して菌体成分が溶出するようないかなにかについても考察すること。

【回答】

- i) 本品の製造は厳重に管理されており、生産菌株は除菌ろ過、脱塩・濃縮、精製及び無菌ろ過工程により完全に除去されると考えられた。また、このことは実験的にも示された。
- ii) 菌体成分の溶出については、本品及びその製剤には生産菌株由来の夾雑たん白質が微量含まれるが、実生産スケールで製造された本品又は原液を被験物質とした種々の安全性試験の結果に問題のなかったこと、夾雑たん白質のアレルギー誘発性の懸念もなかったことから、本品に残存する範囲においては安全性に問題はないと考えられる。

詳細を以下に記載した。

- 1) 「プロテイングルタミナーゼの製造方法、特に除菌工程について正確に提示し、生産菌株が完全に除去されることを明らかにすること」について

プロテイングルタミナーゼの製造工程を資料 1 に示す。ろ過の工程を以下に説明するが、本製造工程において、生産菌株は完全に除去される。

除菌ろ過 : 菌体をフィルタープレス或いは中空糸膜フィルターにより除去する。

無菌ろ過 : 精製液は 0.45 μm のメンブランフィルター或いはセラミックフィルターを通過し、生産菌株を含むあらゆる菌体が除去される。

なお、本製造方法の除菌工程において生産菌株が完全に除去されることは、実生産スケールでの無菌ろ過工程直後のろ液を用いた実験において示された。また、実際の無菌ろ過の工程に供されるよりも大過剰の生菌数を含んだ菌液を用いたろ過実験においても生産菌株は完全に除去される (資料 2)。

本品の製造に当たっては、本品を含めたすべての食品工業用製品の製造は当社 ISO9001 システム (資料 3) 及び医薬品 GMP に準じた自主規範である食品添加物 GMP (資料 4)

において厳重に管理されており、製造機器は定期的に点検、保守され、適正に使用されることから、不慮のトラブルによる生産菌株の漏出や製剤への残存の懸念もない。除菌ろ過装置については製造バッチごとにフィルターの管理基準、操作手順を定めた製造指図書に基づきフィルターの完全性試験(バブリング試験)を実施している。

2) 「細菌が溶解して菌体成分が溶出するようなことがないかについても考察すること」について

菌体成分の溶出の可能性については、培養工程中の自然死滅やその後の工程中の機械的刺激による溶菌の可能性があり、精製の工程を経ているものの、後述するように製剤には生産菌株由来の夾雑たん白質が 0.08%含まれている。しかしながら、このような菌体溶解物を含む可能性のある実生産スケールで製造された本品又は原液を被験物質とした種々の安全性試験の結果に問題のなかったこと、そして、後述する夾雑たん白のアレルギー誘発性に関する検討においても安全性に懸念を抱かせる知見はなかったことから、本品に残存する範囲においては安全性に問題はないと考えられる。

【補足資料要求2】

生産菌のマウスの静脈内接種試験において認められた肝臓の巣状壊死の発生機序について、細菌学及び毒性学の専門家の意見を踏まえて考察すること。さらに、動物への感染実験において、肝臓の巣状壊死が一般的に生ずる反応であることを文献等により明らかにすること。以上の追加調査を踏まえ、本生産菌の病原性について再度考察すること。

【回答】

- i) 生産菌株のマウス静脈内接種試験において認められた肝臓の巣状壊死は、接種された生産菌株が殺菌される過程で生じた、過剰なフリーラジカルや炎症性サイトカインによる細胞障害活性により発生したものと考えられた。
- ii) 肝臓の巣状壊死が一般的に生ずる反応であることを文献等により明らかにすることを目的として種々の文献検索を行ったが、目的の文献は見出されなかった。そこで追加試験を実施したところ、生産菌株によって認められた巣状壊死が乳酸菌でも誘導され、非病原性菌により肝臓の巣状壊死が食経験のある細菌でも生じうることが実験的に証明された。
- iii) 添加物指定要請書の添付資料1において、本菌において動物に死亡が認められなかったこと、臓器中に生残菌が認められなかったこと、肝臓の病理組織学的所見が陽性対照に比べ軽度であったことが既に明らかとなっており、さらに今回試験において、肝臓の限局性の変性壊死は非病原性菌でも生じうるものであること、本菌による肝病変は乳酸菌と比較して重篤でなかったことも明らかとなった。これらのことから本生産菌株の安全性に問題はないと考えられた。

詳細を以下に記載した。

- 1) 「生産菌のマウスの静脈内接種試験において認められた肝臓の巣状壊死の発生機序について、細菌学及び毒性学の専門家の意見を踏まえて考察すること」について

指摘事項を踏まえ、愛知医科大学 医学部微生物・免疫学講座 横地高志教授に生産菌株による肝臓の巣状壊死の発生機序について意見を求めたところ、次の意見が得られた。なお、当該教授は、本件対応のため初めてコンタクトした中立な第三者の専門家であり、当該試験の実施費用の支払い以外に研究費等の提供を行ったことはない。

「病原菌を動物に接種すれば、わずかな菌数でも菌血症、敗血症を起こし、全身性血管内凝固（DIC）、多臓器障害（MOF）などを併発し死亡する。また、毒素産生菌であれば、毒素の標的細胞、標的臓器が選択的に障害され死亡する。他方、非病原菌や弱毒病原菌を

生菌の状態です。静脈内接種した場合、生体はマクロファージや白血球のような貪食系細胞により細菌を捕捉し、血中から速やかに排除しようとする。捕捉された生菌を貪食細胞が殺菌する過程に、フリーラジカル、炎症性サイトカイン、各種抗菌物質が関与する。活性酸素や一酸化窒素（NO）といったフリーラジカルは強い殺菌作用を持つが、他方で強い細胞傷害活性も併せもつ。とりわけ、**peroxynitrite** は強い細胞傷害活性を示す。フリーラジカルはまた炎症性サイトカインの産生を促し、炎症性サイトカインで活性化された貪食細胞はより多量のフリーラジカル産生を導く。殺菌に関与するこのような分子の過剰産生は、他方で生体に細胞傷害、臓器傷害を導く。

肝臓は血中の菌を捕捉し、排除する主要な臓器であり、その殺菌の過程で生じる過剰なフリーラジカル、炎症性サイトカインは殺菌ばかりでなく、周囲への放出拡散により肝細胞を含む実質細胞の細胞死を導き、肝変性壊死（巣状壊死）を導く。プロテイングルタミナーゼ産生菌のような非病原菌といえどもある程度の生菌が接種されれば、殺菌に際して誘発されたフリーラジカル、炎症性サイトカインがその細胞傷害活性により限局性の肝変性壊死を誘導すると考えられる。」（文献 1-3）

上記の専門家の意見から、生産菌株のマウス静脈内接種試験において認められた肝臓の巣状壊死は、血中の菌を捕捉し排除する主要な臓器である肝臓において、接種された非病原性である本生産菌株が殺菌される過程で生じた、過剰なフリーラジカルや炎症性サイトカインによる細胞障害活性により発生したものと考えられた。

2) 「動物への感染実験において、肝臓の巣状壊死が一般的に生ずる反応であることを文献等により明らかにすること」について

回答にあたって種々の文献検索を行ったが、病原性細菌を実験動物に接種して各種検討を行ったものは多いものの、非病原性細菌接種による肝臓の病理組織変化に言及したものは殆ど見出されなかった。唯一、食経験のある一般的な細菌である乳酸菌株の接種により肝臓に広範囲な壊死と細胞反応（好中球・リンパ球の集ぞく）を導くとの報告(文献 4)があったのみであった。そこで、非病原性菌接種において肝臓の巣状壊死が一般的に生ずる反応であることについて実験的検討が必要と考え、追加試験を実施した。(資料 5)

追加試験に当たっては、外部第三者機関（愛知医科大学 医学部微生物・免疫学講座 横地高志教授）にその実施を依頼した。本菌(*Chryseobacterium proteolyticum*)と、上記報告にて使用された乳酸菌株と同一の菌株(*Lactobacillus casei* ATCC393)を使用した。5 週齢の ICR マウス（雄）に生産菌株及び乳酸菌株を接種した。生産菌株はマスターシードのものを使用し実生産と同じ培地を用いて培養した。接種量は予め濁度を指標に 10⁹ 個/mL レベルとなるように調製して接種した。正確な菌数については接種後に段階希釈及びプレート培養によって確認した。なお、一群の動物数は前回試験の補足として十分必要な情報が得

られると考えられる各群 5 匹とした。各菌液はマウスに静脈内単回接種し、2 週間目の肝臓の病理組織学的変化を検討するとともに、本菌の病原性について乳酸菌株と比較し、以下の実験結果が得られた。

- i) 乳酸菌株接種マウスにおいて、5 例全例に限局性かつ散在性の肝変性壊死（巣状壊死）が認められた。
- ii) プロテイングルタミナーゼ生産菌株接種マウスにおいて、5 例中 3 例に散在性の肝変性壊死が見られた。3 例のうち、2 例は他の 1 例に比べて軽度であり、また、2 例のうち 1 例は他の 1 例に比べさらに軽度であった。5 例中 2 例はほとんど病変はなく、正常と考えられた。
- iii) 乳酸菌株接種ではリンパ球浸潤が認められたが、生産菌株では認められなかった。

これらの結果から、生産菌株の接種によって認められたのと同様の巣状壊死が、非病原性菌と考えられている乳酸菌株でも誘導されることが確認された。

乳酸菌株の接種によっても巣状壊死が誘導されたことから、1)で専門家により非病原性菌でも生菌接種において巣状壊死が起こり得ることが指摘されたように、非病原性菌接種により肝臓の巣状壊死が一般的に生じうることが実験的にも証明されたと考えられる。

さらに、乳酸菌株に比べ、生産菌株の散在性の肝変性壊死の頻度及び病変の重篤度はともに低いことが明らかとなった。これらの結果から、本菌株の安全性は少なくとも乳酸菌株と同程度以上と考えられた。

3) 「以上の追加調査を踏まえ、本生産菌の病原性について再度考察すること」について

添加物指定要請書の添付資料 1 において、

- i) 高濃度の本菌の接種においても動物の死亡が認められなかったこと
- ii) 臓器中に生残菌が認められなかったこと
- iii) 本菌で認められた肝臓の病理組織学的所見が陽性対照である *Pseudomonas aeruginosa* 接種によるものに比べ軽度であったこと

が明らかとなった。

さらに、今回試験において、本菌で認められた肝臓の限局性の変性壊死は一般的に非病原性菌で生じうるものであること、そして、本菌による肝病変は食経験のある一般的な細菌である乳酸菌株による肝病変と比較して重篤でなかったことも明らかとなった。

以上のことから本生産菌株の安全性に問題はないと考えられる。

【補足資料要求3】

最終製剤におけるプロテイングルタミナーゼ含量及び測定法を示すこと。また、プロテイングルタミナーゼに混在する夾雑物としてのタンパク質の存在を確認すること。夾雑物の主要なタンパク質については、その同定を行い、アレルギー誘発性について考察すること。なお、食品への混入推定量や、食経験がある物質かどうか、既知のアレルゲンとの相同性等を検討した上で考察すること。

【回答】

- i) 製剤中の培養物由来たん白質含量は 1.9%であった。また、その 96%がプロテイングルタミナーゼであることが確認された。従って、製剤におけるプロテイングルタミナーゼ含量は 1.82% ($1.9\% \times 0.96$) であり、生産菌株由来の夾雑たん白質は 0.08% ($1.9\% \times 0.04$) であった。
- ii) この夾雑たん白質は解析の結果、分子量約 24 kDa の単一たん白質であることが判明した。ちなみにプロテイングルタミナーゼの分子量は 20 kDa である。
- iii) 本 24 kDa 夾雑たん白質（アミノ酸にして 230～240 残基程度）は 390 アミノ酸からなるたん白質として翻訳された後、成熟体になる過程で分解などを受けて変換すること（プロセッシング）により生ずると考えられるが、N 末端及び C 末端解析で明瞭な結果が得られなかったため、390 アミノ酸配列上の位置は確定に至らなかった。なお、分解されたアミノ酸のペプチド部分（今回は 150～160 残基）は通常、菌体のプロテアーゼにより最終的にアミノ酸まで分解されると考えられる。
- iv) 本 24 kDa 夾雑たん白質について、推定される N 末端アミノ酸が最も上流になる場合及び C 末端アミノ酸が最も下流になる場合の位置までの 275 アミノ酸配列について、4 種のアレルゲンデータベースに対して、相同性検索を行ったが、いずれもヒットするものはなかった。局所の完全一致検索では、チモシーグラス花粉、ニンジン及び落花生由来の 3 種類のアレルゲンとの連続一致配列が見られたものの、そのいずれによるアレルギー誘発性のリスクも低いと考えられた。
- v) 夾雑たん白質の一日摂取量は、①本品が使用される可能性のある食品（群）摂取量からの推計で 0.108、②Budget 法による推計で 0.480、③本品が添加される可能性のある食品たん白質素材生産量からの推計で 0.281 mg/人/日となる。①の場合、24 kDa 夾雑たん白質の食品中濃度は 320 ppb と推定された。
- vi) 本夾雑たん白質は、そのままでは難消化性を示すが、90℃30 分間の加熱処理をした後には、人工胃液、人工腸液いずれでもほぼ消化される。食品加工の際に加熱処理が行われる場合においては、夾雑たん白質は消化管内でほぼ分解されると考えられる。また、本夾雑たん白質は、加熱処理により免疫反応性が低下する可能性が考えられた。しかしながら、本夾雑たん白質は、人工胃液又は人工腸液で処理した後においても、SDS 処

理へウェスタンブロッティング解析で免疫反応性の変化が認められなかった。

- vii) 以上の、既知のアレルゲンとの相同性検討、食品への混入量の推定結果、加熱処理が行われた場合の消化性の向上から、本夾雑たん白質によるアレルギー誘発性の懸念は低いと結論した。

詳細を以下に記載した。

- 1) 「**最終製剤におけるプロテイングルタミナーゼ含量及び測定法を示すこと。また、プロテイングルタミナーゼに混在する夾雑物としてのタンパク質の存在を確認すること。**」について

資料6に示すように、試作製剤（安定化剤としての食品素材由来のたん白質を含まない。）中のたん白質含量は、Lowry 法に基づく市販のたん白質定量キット（バイオラッド社 DC プロテインアッセイ）を用いて測定したところ、1.90%であった。また、高速液体ゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより、製剤中のたん白質の 96%を有効成分プロテイングルタミナーゼが占めていることが確認された。従って、製剤（安定化剤としてのたん白質成分を含む食品素材を添加しない場合）における有効成分プロテイングルタミナーゼ含量は 1.82% ($1.9\% \times 0.96$) であり、0.08% ($1.9\% \times 0.04$) が生産菌株由来の夾雑たん白質となる。

この夾雑たん白質は、高速液体ゲルパーミエーションクロマトグラフィーの各画分について SDS-PAGE 解析（より感度の高い銀染色を行った。）を行った結果、分子量約 24 kDa の単一たん白質であることが判明した。試作製剤（安定化剤としての食品素材由来のたん白質を含まない。）について SDS-PAGE 解析（プロテインシークエンサーに供することができる CBB 染色を行った）を行ったところ、有効成分プロテイングルタミナーゼの他に 5 つのたん白質バンドが検出されたが、N 末端アミノ酸配列解析の結果、1 つは 24 kDa の夾雑たん白質、4 つはプロテイングルタミナーゼの分解物であることが判明した。

- 2) 「夾雑物の主要なタンパク質については、その同定を行い、アレルギー誘発性について考察すること。なお、食品への混入推定量や、食経験がある物質かどうか、既知のアレルゲンとの相同性等を検討した上で考察すること。」について

i) 24 kDa 夾雑たん白質の同定（資料 7）

本 24 kDa 夾雑たん白質の部分アミノ酸配列情報を基にクローニングされた遺伝子は、390 アミノ酸（分子量約 41 kDa）をコードしていた。精製たん白質のインタクトマス解析の結果、分子量は 24,109.1 であったが、LC/MS/MS 解析で同定されたアミノ酸配列は 195（分子量約 20 kDa）であった。本夾雑たん白質（24 kDa、アミノ酸にして 230～240 残基程度）は、390 アミノ酸からなるたん白質として翻訳された後プロセッシングにより生ずると考えられるが、N 末端及び C 末端解析で明瞭な結果が得られなかったため、390 アミノ酸配列上の位置は確定に至らなかった。

尚、得られた 390 アミノ酸のたん白質の配列情報を用いて、NCBI データベースに対し、Blast 解析を行った結果、有意な相同性のあるたん白質は見出されなかった。しかし、比較的スコアの高いたん白質群は本生産菌株との類縁の菌由来の 'Hypothetical protein' であったことから、本夾雑たん白質が生産菌株由来のものであることが示唆された。

ii) 既知アレルゲンとの相同性評価（資料 8）

本夾雑たん白質について、LC/MS/MS で同定された 195 アミノ酸配列を含み、且つインタクトマス解析より得られた分子量 24,109.1 となる場合を考えると、N 末端アミノ酸が最も上流になる場合の位置と C 末端アミノ酸が最も下流になる場合の位置が推定できる。従って、この最も上流の可能性のあるアミノ酸から最も下流の可能性のあるアミノ酸までの 275 アミノ酸配列について考察すれば十分であると考えられた。

この 275 アミノ酸配列について、4 種のアレルゲンデータベースに対して、全長の相同性検索、80 アミノ酸スライディングウインドウ検索（80 アミノ酸ごとの相同性検索）を行ったがいずれもヒットするものはなかった。

局所の完全一致検索では、以下の 3 種類のアレルゲンと連続一致配列が見られた。

①チモシーグラスの花粉アレルゲン Phl_p_5 との連続 6 アミノ酸配列の一致

②ニンジンアレルゲン Dau_c_1.0201 との連続 6 アミノ酸配列の一致

③落花生アレルゲン Ara_h_3/4 グループとの連続 6 又は 7 アミノ酸配列の一致

①については、Phl_p_5 として登録されている配列は 5 つあったが連続 6 アミノ酸配列一致のものはそのうち 1 つのみであり、またコンホメーションナルエピトープの報告があるが、全体の配列相同性をみると 24 kDa 夾雑たん白質がそのような構造をとる可能性は低いと考えられた。③については、連続一致部位はエピトープが存在しないサブユニ

ット領域に位置していた。②については、詳細なエピトープ部位の同定がなされていないため考察できなかったが、いずれのアレルゲンに対しても 80 アミノ酸スライディングウインドウ検索でヒットしていない。

また、アレルゲンデータベースに対する Blast 検索の結果、最も低い E-value 値でも 0.02 であった。6 ないし 7 連続アミノ酸配列の一致が見られた 3 種類、6 つのアレルゲンたん白質 (Phl_p_5、Dau_c_1.0201、Ara_h_3、Ara_h_4、Ara_h_3/4、iso-Ara_h_3) との E-value 値は、最低でも 20.5 であり、これらの 6 ないし 7 連続アミノ酸配列の一致は、ノイズ (偶然の一致) の範囲内と考えられた。

iii) 推定摂取量及び食品への推定混入量 (資料 10)

24 kDa 夾雑たん白質の推定摂取量を以下のとおり計算した (資料 10)。

①本品が使用される可能性のある食品 (群) の摂取量を国民健康栄養調査から求め、各食品 (群) への本品最大添加率を乗じて算出すると、67.543 mg/人/日、

②同最大添加率を用いて Budget 法による推計を行うと、300 mg/人/日、

③本品が添加される食品たん白質素材生産量から摂取量 (たん白質ベース) を算出し、本品の対たん白質あたり最大添加率を乗じて算出すると、175.574 mg/人/日、

本品製剤中の夾雑たん白質の濃度は 0.08% であるので、本品から製剤 (550 単位品) への賦形倍率を 2 倍とすると、上記にそれぞれ $0.08\% \times 2$ を乗じて①0.108、②0.480、③0.281 mg/人/日となる。

なお、本品の食品への推定混入濃度は、①の場合において、 $0.020\% \times 0.08\% \times 2 = 320$ ppb と算出される。

iv) 加熱後の消化性 (資料 11 及び 12) 加熱による免疫反応性変化 (資料 13) 並びに消化液による免疫反応性変化 (資料 14)。

本夾雑たん白質は、そのままでは人工消化液に対して難消化性を示すが、90℃30 分間の加熱処理をした後には人工胃液、人工腸液いずれでもほぼ消化される (資料 11 及び 12)。食品加工の際加熱処理が行われた場合においては、本夾雑たん白質は、消化管内でほぼ分解され则认为られる。本夾雑たん白質については、90℃以上の加熱処理によって、ドットブロット解析及び ELISA 解析において発色の低下がみられたことから、食品加工の際加熱処理が行われた場合においては、免疫反応性が低下する可能性が考えられる (資料 13)。本夾雑たん白質については、人工胃液又は人工腸液で 1 時間以上処理した後においても、SDS 処理による変性後のウェスタンブロッティング解析で免疫反応性の変化は認められなかった (資料 14)。なお、本夾雑たん白質の人工胃液又は人工腸液による免疫反応性の変化について、ドットブロット解析及び ELISA 解析を行い、いずれも発色の低下がみられたが、本夾雑たん白質が適切に固相化されていなかった可能性を完全に否定することはできず、免疫反応性が低下したのか否かについて判断を行

うことはできなかった（資料 14）。

（参考 1）落花生たん白質測定用キットを用いた交差性試験の結果（資料 9）

落花生は食品衛生法施行規則により特定原材料として表示が義務付けられている食品（えび、かに、小麦、そば、落花生、卵、乳の 7 品目）の 1 つである。本夾雑たん白質には、落花生アレルゲン Ara_h_3/4 グループと、報告されているエピトープとは別の位置ではあるが 6 ないし 7 アミノ酸配列の連続一致が見られた。参考として、製剤及び夾雑たん白質が、落花生たん白質抗体と交差反応性を有するかについて試験を行った。市販の 2 種類の落花生たん白質測定用キットを用い、製剤及び夾雑たん白質ともに食品に残存する可能性のある濃度の 2,500 倍以上の濃度について測定した。使用したキットは動物の抗体を用いた系であり、また、この抗体が落花生のアレルゲンたん白質に特異的に反応するか否か不明であるものの、いずれのキットにおいても陰性の結果であり、使用した 2 種類の測定キットで用いられている抗体に関して、製剤及び夾雑たん白質は反応しなかった。

（参考 2）乳及び乳製品中の *Chryseobacterium* 属の存在

Chryseobacterium 属の菌種について、本生産菌株とは分類上必ずしも近い位置ではないものの^{注 1)}、*C. joostei*, *C. haifense*, *C. oranimense* 及び *C. bovis* が生の牛乳中に、*C. shigense* が乳酸菌飲料中に見出されたと報告されており（文献 5-9）、*Chryseobacterium* 属の細菌は長い間、ヒトに食されてきた可能性がある。

注 1：食品添加物の指定要請添付資料の添付資料 14 の図 3-1(16SrRNA 遺伝子配列に基づき作成した系統樹)において、本生産菌株はグループ A に位置し、*C. joostei*, *C. oranimense* 及び *C. shigense* がグループ C、*C. bovis* 及び *C. haifense* がグループ D に位置している。

【補足資料要求 4】

上記 1～3 に関連し、評価に有益な資料があれば、併せて整理すること。

【回答】

本回答において作成・提出された資料は以下である。

提出依頼補足資料に関する資料

本文	平成 20 年 9 月 22 日付け「食品健康影響に係る補足資料の提出依頼について-プロテイングルタミナーゼの提出依頼補足資料」（府食第 1002 号）に対する回答
資料 1	本品の製造方法について
資料 2	本品生産菌株のメンブレンフィルター(MF)除菌試験
資料 3	品質マネジメントシステム審査登録制度登録証
資料 4	食添 GMP 登録証
資料 5	プロテイングルタミナーゼ産生菌接種マウスにおける肝病変の病理組織学的解析と乳酸菌との病原性比較
資料 6	製剤中の有効成分プロテイングルタミナーゼ及び夾雑たん白質の含量分析
資料 7	24 kDa 夾雑たん白質のアミノ酸配列解析
資料 8	24 kDa 夾雑たん白質と既知アレルゲンとのアミノ酸配列の比較
資料 9	製剤及び 24 kDa 夾雑たん白質の落花生たん白質測定用キットを用いた交差反応性検討
資料 10	24 kDa 夾雑たん白質の推定摂取量の算出
資料 11	24 kDa 夾雑たん白質の人工胃液による消化性評価
資料 12	24 kDa 夾雑たん白質の人工腸液による消化性評価
資料 13	加熱処理による 24 kDa 夾雑たん白質の免疫反応性の変化
資料 14	人工胃液、人工腸液処理による 24 kDa 夾雑たん白質の免疫反応性の変化
文献	
1) 光山正雄、標準微生物学（医学書院）、生体防御と感染、p30- p 48 (2005).	
2) 吉田眞一、柳雄介編、戸田新細菌学（南江堂）、感染防御免疫の機構、p 406-423 (2007)	
3) Diehl, A. M., Cytokine regulation of liver injury and repair. Immunol. Rev., 174, p160-171 (2000).	
4) 動物性飼料並びに微生物飼料の安全性評価手法の開発、農林水産技術会議事務局、研究成果 170、p70-77 (1985).	
5) Hugo CJ, Segers P, Hoste B, Vancanneyt M, Kersters K. <i>Chryseobacterium joostei</i> sp. nov., isolated from the dairy environment. Int J Syst Evol Microbiol. 2003 May;53(Pt 3):771-7.	
6) Shimomura K, Kaji S, Hiraishi A. <i>Chryseobacterium shigense</i> sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. Int J Syst Evol Microbiol. 2005 Sep;55(Pt 5):1903-6.	

7) Hantsis-Zacharov E, Halpern M. <i>Chryseobacterium haifense</i> sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. Int J Syst Evol Microbiol. 2007 Oct;57(Pt 10):2344-8.
8) Hantsis-Zacharov E, Senderovich Y, Halpern M. <i>Chryseobacterium bovis</i> sp. nov., isolated from raw cow's milk. Int J Syst Evol Microbiol. 2008 Apr;58(Pt 4):1024-8.
9) Hantsis-Zacharov E, Shakéd T, Senderovich Y, Halpern M. <i>Chryseobacterium oranimense</i> sp. nov., a psychrotolerant, proteolytic and lipolytic bacterium isolated from raw cow's milk. Int J Syst Evol Microbiol. 2008 Nov;58(Pt 11):2635-9.
10) Maglio O, Saldanha W. J, Vrtala S, Spitzauer S, Valenta R and Pestore A. A major IgE epitope-containing grass polles allergen domain from Phl p5 folds as a four-helix bundle. Protein Engineering. 2002, vol. 15, No.8, 635-642.
11) Boldt A, Fortunato D, Conti A, Petersen A, Ballmer-Weber B, Lepp U, Reese G and Becker W-M. Analysis of the composition of an immunoglobulin E reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4. Proeomics. 2005 Feb; 5(3), 675-686.
12) Rabjohn P, Helm M. E, Stanley J. S, West C. M, Sampson A. H, Burks A. W and Bannon A G. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. J Clin Invest. 1999, vol 4, 535-542.
13) 日本ハム(株)中央研究所、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生《取扱説明書》
14) (株)森永生科学研究所、モリナガ FASPEK 落花生測定キット 取扱説明書
15) Kirkegaard & Perry Laboratories, Protein Detector HRP Microwell Kit Manual
16) 山梨県工業技術センター 研究報告 No.23 (2009) p55-57 「果実アレルゲンの検出方法と低減化加工手法の確立に関する研究（第2報） 齊藤美貴・小島匡人・長沼孝多・辻政雄」

以上