

# グルテンフリー穀物 食品と飲料, グルテンの検知- 2

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)<sup>1,2</sup>

竹内 美貴 (TAKEUCHI Miki)<sup>3</sup> 中村 智英子 (NAKAMURA Chieko)<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 神戸女子大学, <sup>2</sup> 日本穀物科学研究会会長, <sup>3</sup> 神戸女子短期大学

Key Words : グルテンフリー セリアック病

本論文「グルテンフリー穀物 食品と飲料, グルテンの検知-2」は, “Gluten-Free Cereal Foods and Beverages” (Edited by E. K.Arendt and F.D.Bello) 2008 by Academic Press (ELSEVIER), の第3章 Detection of gluten by Herbert Wieser の一部を翻訳し紹介するものである。

## タンパク質抽出

グルテン分析の第1ステップは, グルテンタンパク質の未処理あるいは加工処理した食品からの抽出である。天然のグルテンタンパク質は水あるいは塩溶液には溶けない。1番目の区分(プロラミン)は, 水/アルコールに溶け, 一方2番目の区分(グルテリン)は不溶性残渣にとどまる。残グルテンタンパク質はSS結合を還元すれば(例えばジチオスレイトールにより)水/アルコールに溶け; 尿素あるいは sodium dodecyl sulfate (SDS) で会合をはずすと可溶化が進む (Wieser *et al.* 2006)。以前の Draft Revised Codex Standard (CX/NFSDU 00/4, 2000) には詳細な抽出方法が記述してあり, そこには最近の草案 (CL 2006/5-AFSDU, 2006) の唯一の R5ELISA 法について (以下参照) 述べてる。

ドキュメント CX-NFSDU (2000) によると, 食品あるいは成分中のグルテンの測定はプロラミンの測定に基づくべきで, それは40-70% エタノールで抽出されたグルテンからの区分と定義する。エタノール濃度は60%が全プロラミンを抽出するのに提言され, それはこれまでの

研究で小麦粉からの最高のグリアジンの抽出がこの濃度で進められたからである (Wieser *et al.* 1994)。固形食品あるいは固形成分に関しては, 10%以上脂質含量の混在の食品では以下の用に脂質除去の必要がある; 5gを50mLのヘキサンとブレンドしてホモゲナイズし, 1500×gで30分間遠心分離する。上清は捨て, 抽出ステップはサンプルから脂質がなくなるまで繰り返す。脂質含量が10%以下の食品では脂質除去の必要はない。抽出処理の前に, 脱脂した5gあるいは非脂質食品は60°Cで乾燥し粉体化する。乾燥サンプルの一部をその10倍量の60%エタノールと2分間ホモゲナイズし, 15分後に10分間1500×gで遠心分離にかける。上清液を除去し保存する。もし必要なら4°Cで保存する。沈殿はできたらこれを遠心分離して除去する。溶液食品および成分の場合には, 一部をエタノールで希釈し, その際最終混合物中60%エタノール濃度になるようにする。

混合物はホモゲナイズし, さらに固形食品抽出時のように扱う。サンプルの異なった成分により引き起こされるマトリックス効果は, 抽出収量に影響を与え, このためグルテン含量測定

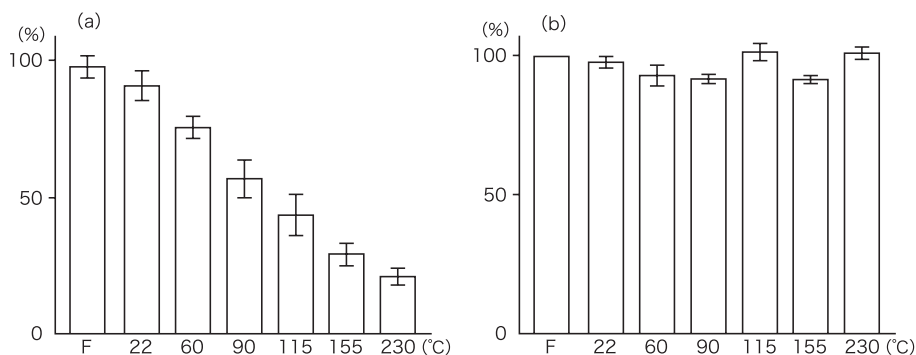


図 3.1 各温度処理したドウから抽出した小麦グリアジン (%)

(a) 60% エタノール, (b) カクテルの場合。

カクテル;還元剤 (2-メルカプトエタノール) の脱凝集剤 (グアニジン) とのくみ合わせ。

結果に影響する。たとえば茶, ホップ, ココア製品のようなポリフェノールに結合するとプロラミンの回収は低下する。カゼイン, 尿素 (CX-NFSDU 00/4, 2000), あるいはゼラチン (Garuia *et al.* 2004) 添加を抽出物にするとプロラミン含量の測定値の低下を抑えるため, 推奨される方法である。高度に粘度の高いサンプル, たとえばデンプン由来のシロップのようなものはマトリックス効果を避けるために適当な溶媒で薄めるべきである (Iametti *et al.* 2004)。グルテン分析でもう1つの大きな問題は, 加熱処理した食品からプロラミン抽出が不完全である事である。その時, 水/アルコールを用いた際に加熱グルテン, 小麦パンに標準グリアジンが含まれている場合の抽出は, 各々,  $\alpha/\beta$ - および  $\gamma$ - グリアジンの抽出が強く低下することが示された一方,  $\omega$ - グリアジンは僅かに影響を受けた (Schofield ら 1983, Wieser 1998)。Cys を含む  $\alpha/\beta$ -  $\gamma$ - グリアジンは, アルコール不溶性のグルテニンに disulfide/sulfhydryl 交換鎖反応によって結合すると考えられていた。SS 結合の還元後, 全グリアジンは完全にアルコール抽出物中に回収された (Wieser, 1998)。 $\omega$ - グリアジンの加熱安定性は Skeritt と Hill (1990) によって用いられ  $\omega$ - グリアジンに対し, モノクローナル抗体の免疫反応をすすめた。グルテン含有生材料, 加熱食品の結果は 40% エタノールで最も抽出がよく, 食品 (生, 料理済み, あるいは加

熱工程したもの) 全てのタイプのものの中のグルテンの定量測定で最も都合よかった。もう1つの方法は, 加熱食品からグルテン抽出の際, 加水分解を制限し, さらにペプシン処理をして, 生グルテン, 100°C加熱処理グルテン両方で約 90% タンパク質抽出を塩緩衝液中で行なった (Denery-Papini ら 2002)。 $\alpha/\beta$ -  $\gamma$ - グリアジンの反復エピトープに対する抗体が一部加水分解したプロラミンの定量に使用された。

還元剤 (2-メルカプトエタノール) の脱凝集剤 (グアニジン) との組み合わせ, いわゆる “cocktail” はプロラミン (グルテリンサブユニット) の完全な抽出を未加熱, 加熱食品両方から可能にした (Garcia *et al.* 2005)。図 3.1 は小麦粉, 22-230°C加熱したドウから, 60% エタノールあるいはカクテル抽出したグリアジンの再生を比較したもので, 60-230°Cまで加熱して 76% から 22% まで再生が低下した事を示す。対照として, カクテルを用いると再生はほぼ定量的に進み, 230°Cで加熱したサンプルでもそうであった。抽出物を希釈後 (例えば 1:100) カクテルは ELISA システムの R5 モノクローナル抗体にもとづくものには影響しなかった。しかしながら, 他のタイプの抗体は, 還元剤に対してより感受性があるかもしれない (Ellis ら 1998, Dona ら 2004)。

未加熱処理, 加熱処理サンプルの両方の抽出に 50°C 40 分のインキュベーションが推奨さ

れた。抽出は、MALDI-TOF MS と Western blot besides ELISA と互換性があった。カクテルはまた、製品のタイプにより 60% エタノールより僅かに同じか多少高い再生となり; 未加熱処理食品では 1.1 倍, 小麦デンプンでは 1.4 倍, 加熱処理食品では 3.0 倍である (Garcia *et al.* 2005)。異なった食品 (例えばセリアル, 大豆食品, ベビー食品, シロップ, チョコレート, ビール) での比較研究では, 60% エタノール抽出プロラミン, あるいはカクテルのプロラミンデータがより大きく多様化するかもしれないが, その説明はない (Immer と Haas-lauterbach 2005a, 2001, Iametti *et al.* 2005, Laffey *et al.* 2005, Malmheden Yman, 2006)。

**比較タンパク質 (基準タンパク質)**

抽出物中のプロラミン (グルテン) 含量測定のため, プロラミン (グルテン) の比較タンパク質による計算カーブを設定することができる。さらに比較は, アッセイ用のバリエーションを最小にするために用いられるべきであり, 異なった研究室, あるいは異なった方法で得られた結果で比較をできるようにする。重要な比較材料の基準点は高タンパク質含量であること, 抽出溶媒への溶解性, 均一性, 安定性, セリアック病ウイルスタンパク質に当量であること, さらに測定技術に対し良好な反応性のある事である。プロラミンの多くは, ほぼグリアジンの比較タンパク質で, 異なった研究所あるいは企業でつくられ, 彼らの分析システムまたはキットに用いられた。比較タンパク質は異なった穀物の元から分離され, 化学的にタンパク質含量あるいはタンパク質の定量を決めた。これまでの研究で, 測定したグルテン含量は ELISA 法できめたが, 計算に用いたその元の比較タンパク質のタイプ, テストキットによって明らかにバラバラであることがわかった (Van Eckert, 1993; Van Eckert *et al.* 1997; Sima *et al.* 1999)。1 つの例として図 3.2 は 5 種の異なった市販の比較グリアジンを同じ免疫アッセイ

中で様々な計算カーブを示した。そこで Draft Revised Codex Standard CX-N FSDU 00/4 (2000) は, “gold standard” が厳しい標準条件下である研究室が調製すべきだとすすめた。

プロラミン分析と毒性 (PWG) に関する European Working Group は, 比較グリアジンの調製を組織がかりで行い一括使用した (van Eckart *et al.* 2006)。28 種小麦栽培品種, 3 種の代表的ヨーロッパ小麦 - 生産国, フランス, UK, ドイツの代表的なものが初期のものとして選ばれた。穀類は混合, 製粉, 出来た製粉は脱脂し, 真空乾燥された。アルブミン, グロブリンは 0.4mol/L NaCl 溶液で抽出除去され, グリアジンは 60% エタノールで抽出された。グリアジン抽出物は濃縮され, 遠心分離で脱塩され, 凍結乾燥, 均一にホモゲナイズされた。材料はいろいろな方法で異なった研究室で分析された。できたものは, 高度にホモゲナイズされ, 完全に 60% エタノール中に可溶化した。粗タンパク質含量 (N×5.7, Dumas) は 89.4%。RP-HPLC は粉の同一のタンパク質パターン ( $\omega$ -,  $\alpha$ / $\beta$ -,  $\gamma$ -グリアジン) を示し, さらに比較タンパク質のグリアジンとも同一のものを示し, そのことは主たるグリアジン成分の何れも分離プロセスの間で失われていない事を示した。GP-HPLC 結果によると, 比較タンパク質のグリアジンは 68% モノメリックグリアジン, 23% オ

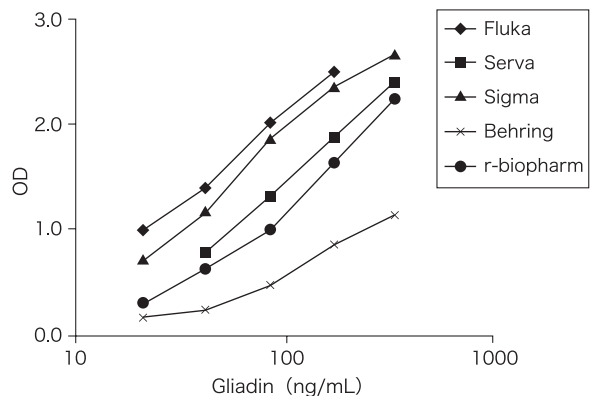


図 3.2 Ridascreen® Gluten のアッセイ方法による各比較タンパク質グリアジンに対する反応性の違い (Van Eckert *et al.* (1997))

リゴ HMW- グリアジン, 僅か 3% アルブミン, プロラミンを含む。このサンプルには高度に均一であり, 安定であり, たとえ 37°C, 28 日間保存しても大丈夫だった。PWG グリアジンは, 比較材料として全ての基準の重要点にあわせ, グルテン測定用の重要なプロラミン比較タンパク質と考えられた。

## 免疫化学法

### 原理

免疫測定法と食品分析の進歩の初期 10 年が Morris と Clifford (1985) に大々的に述べられ, 穀物貯蔵タンパク質の免疫化学については Skeritt (1988) によって述べられた。免疫化学試験はグルテン分析に選択された方法であり, Draft Revised Codex Standard によって進められ, 以来, 彼らはセリアック病毒素タンパク質の特異的, 感受性認識を素早い結果として結論づけた。免疫測定法は, 抗原と抗体(免疫グロブリン)の特異的反応に基づくもので, 物質が決定された(セリアック病毒素タンパク質およびペプチド)。抗体を含む抗血清は, 動物(たとえばラビット, あるいはマウス)の免疫によって生産されるが, それは相応する免疫原の注射によって起こる。約 5000 以上の分子量をもつ唯一の成分が免疫活性をもつために, ペプチドのような LMW 免疫原(ハプテン)がタンパク質(例えば牛血清アルブミン)と共有カップリングするようなことが起こる。この結合は抗血清をつくり, そこにはハプテンとカップルしたタンパク質の両方に対する抗体が含まれる。

抗血清は動物から得られるが, その特異性に対して試験され, できる限り生成して好ましくない特異性を除去する。これらのポリクローナル抗体(PAb)は抗原の異なった結合場所(epitopes)と反応し, グルテン分析を考えると, 結果は穀物種あるいは品種によって影響は小さい。良くない点は, 非毒性穀物からのタンパク質と高いクロスリアクションする高リスクである。より特異的なモノクローナル抗体(MAb)は, 免疫後分離された脾細胞のネズミ

骨髓細胞との融合で生産されるがそれは Galfre と Milstein(1981)のやり方である。ハイブリドーマは, 抗体に対する抗体であるが, クローンされそして成長する。結果として, MAbの調製は, 沈殿あるいはアフィニティクロマトグラフィーで精製する。MAb は大きな長所があり, それは特異性の絶対的な再生産であり, 生産の能力は殆ど無制限の量である。

抗血清あるいは抗体の評価に対して必要なことは, ある抗体はその抗原に対し, 特異的であるかどうか決める事で, さらに抗体が多少なりとも他のタンパク質ともクロスリアクトするかどうかである。主には Western Immunoblotting は抗原に対し抗体の結合を研究するために用いられた。たとえば Freedman *et al.* (1988) は, Western blots を用いて MAb のグリアジンへの結合を特徴づけるのに用いた。タンパク質は SDS-PAGE で分離され, Trans-blot cell システムを用いて nitrocellulose 膜に移した。Blot は抗体とインキュベートし, 洗浄し, さらに酵素でラベルした第 2 抗体とはじめの抗体に対しインキュベートし, 相応の着色物質とともにインキュベートする。免疫反応の非常に重要な点は, 抗原-抗体結合の定量である。古い方法は抗体-抗原複合体の沈殿形成が必要だった。最近, 抗原は異なったマーカ, 例えば蛍光染料, ある時は発光性染色のようなものでマークされ, 安定な放射性, 放射性アイソトープ ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ), あるいは酵素でマークされる。ラジオイミュノアッセイ (RIA) では, 研究室で特異的な道具を必要とし, 非常に優れているところは, フリーの抗原は抗体に結合したものから分離せねばならない。ELISA はこのグルテン決定に最もよく使う技術である。ELISA は比較的方法が簡単であり, 他の技術より安価で早い結果が得られる。西洋わさびペルオキシダーゼ(基質 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), アルカリ phosphatase (基質 4-nitrophenylphosphate) と  $\beta$ -D-galactosidase (基質, 4-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside) は, 最も一般的なインデケーター酵素である。それらは高度

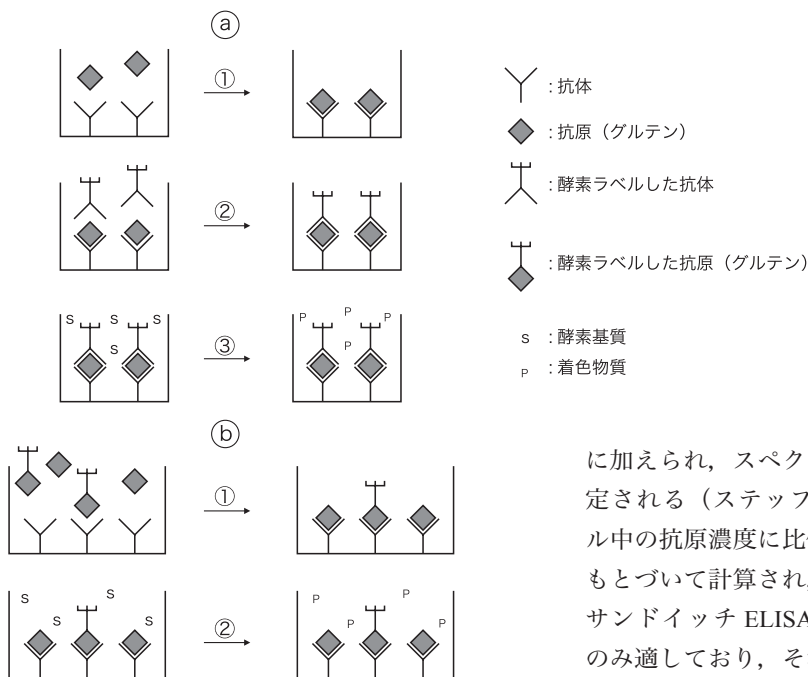


図 3.3 ELISA 法

- (a) サンドイッチ ELISA: 1 段階: 抗原抗体複合体形成 .2 段階: 酵素ラベルした抗体の結合。 3 段階: 酵素基質の着色物質への変化。  
 (b) 競合的 ELISA: 1 段階: 抗体結合への未ラベルと酵素ラベルした抗原の競合。 2 段階: 酵素基質の着色物質への変化。

に精製して利用でき、安定で活性は感度より正確に利用できる。酵素は抗原に共有結合でリンクし、たとえばグルタルアルデヒド、あるいはカルボジイミドとの反応によってである。

2つのELISAシステムがよくグルテン分析に用いられる。サンドイッチELISAと競合的ELISAである。サンドイッチELISAの原理は図3.3aに示した。捕獲抗体はプラスチックキャリアー（マイクロタイター板）の壁につけられる。抗原を含むサンプルの一部は、マイクロセル中でインキュベートされ、抗原-抗体複合体の形成に向かう（ステップ1）。洗浄後、酵素ラベルされた検知抗体が加えられ、さらにインキュベーションで抗体に結合する（ステップ2）。こうして抗原は2つの抗体でサンドイッチされる。未着の酵素マークした抗体は洗われる。この段階で酵素的基質が加えられ着色最終生産物

に加えられ、スペクトルフォトメーターで測定される（ステップ3）。吸光度は直接サンプル中の抗原濃度に比例して、比較タンパク質にもとづいて計算され、カーブから読み取られる。サンドイッチELISA法は大きな抗原に対してのみ適しており、それは抗原は少なくとも2エピトープをもち、それらは抗原と酵素ラベルした抗原の両方に空間的に分離している。そこで一部加水分解されたサワードウ製品、モルト、ビールのようなものが用いられるときグルテン分析用にはサンドイッチELISAは不適である。一方は、競合的ELISA法は1個のエピトープのみで小サイズの抗原の検知に安定である（図3.3b）。アッセイは3成分からなる：(i) 抗体はマイクロタイタープレートに貼付ける (ii) 制限ある一定量の酵素-ラベルした抗原 (iii) サンプルからの未ラベル抗原。システム中の成分をミックスし、ラベル、未ラベル抗原は結合数の一定数の抗体と競合する（ステップ1）。存在する未ラベル抗原の量が多いほどラベル抗原の抗体に対する数は小さくする。未結合の抗原は洗浄し、酵素的基質は添加し着色物質にかえる（ステップ2）。サンプル抗原の量が多いほど、酵素-ラベル抗原による色調は低くなる。検量線は比較タンパク質でつくり、サンプル抗原の定量を可能にする。食品加工で用いる加熱処理は、測定に必要なグルテン量に低下し抽出不能プロラミン（上を見よ）によるだけではなく、タンパク質構造の変化にもよる。それは抗体により認知された修正かマスクされたエピトープ



によるためであろう。たとえば Ellis ら (1994) は、加熱したグリアジン区分の反応性の低下を MAb, サンドイッチ ELISA 法で述べている。 $\alpha/\beta$ - と  $\gamma$ - グリアジンはもっと熱に対し不安定であり、そのオリジナルの活性の僅か 33-51% 残存のみとなり、一方  $\omega$ - グリアジンは 93% が残る。同一のアプローチで、グリアジン区分は 70-100°C で 5-20 分間加熱し、4 つの異なった MAb とラビット抗 - グリアジン血清を用いて競合的 ELISA で定量した (Rumbo *et al.* 2001)。その結果、加熱処理の反応性への影響は、いろいろで単に温度と加熱時間のみならず、使った抗体にもよった。そこで加熱加工食品のグルテン量の定量に用いるときには、抗体は加熱グルテンタンパク質に対して免疫反応性をテストすべきである。

### 進歩したアッセイ

20 世紀の初期、はじめての免疫研究は穀物に関して行なわれた。1925 年 Lewis と Wells (1925) は、小麦からのアルコール抽出物をモルモットに注射し、さらに小麦粉かあるいは他の穀物の抽出物を注射した。彼らはアナフィラキシー反応を、小麦のみならずライ麦、大麦、オート麦でもみられたがトウモロコシではみられなかった。Berger と Freudenberg (1961) のグループはバーゼルでグリアジン抗原性をより組織的に研究し、免疫沈殿技術を用いている。最初の試みでグルテンフリー焙焼加工品中の小麦タンパク質を同定するため、抗原-抗体沈殿の測定ではゲル拡散技術、免疫電気泳動、向流電気泳動 (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG, 1984) の技術で行なった。検知リミット、1-50 $\mu$ g タンパク質 /mL の範囲がその用いた方法の信頼性である。ずっと高い信頼性は RIA であり、Ciclitira と Lennox (1983) の述べる方法で、抗血清は A- グリアジン、 $\alpha$ - グリアジンの 1 成分であるが、それに対するラビットで得たものである。このアッセイで用いた抗原は、 $\alpha/\beta$ - グリアジンを  $^{125}$ I でラベルしたもので、抗原-抗

体複合体は *Stephylococcus aureus* cell 懸濁液に吸収させたあと集めたものである。アッセイの感受性は未ラベル抗原との結合の競合によって判断するが、1mg の  $\alpha/\beta$ - グリアジンであった。他の小麦タンパク質に対するクロス反応は、1% 以下であり、ライ麦、大麦、あるいはオート麦の抽出物に対するクロス反応は見られなかった。

今日まで ELISA はグルテンの定量的決定のため最もよく使う方法である。ELISA 法の効率限界は、1998 年まで Denery- Papini ら (1999) によってレビューされた。はじめて信頼できるグルテン決定の競合とサンドイッチ ELISA は、PAb の全グリアジン A- グリアジンに対するもので、Windermann ら (1982) によって進められた。このアッセイは非常に感受性がよく A-gliadin で 1-20ng/mL の範囲で、全グリアジンで 10-300mg/mL の範囲で行なわれた。しかし  $\omega$ - グリアジンとは反応せず、他の毒性穀物、例えばライ麦のタンパク質に反応しなかった。サンドイッチ ELISA は、未加熱、加熱食品中のグリアジンの検索に用いられた (Meier *et al.* 1984; Fritscher ら)。未加熱食品の 70% エタノール抽出でグリアジンの回収は良好である、ただしココア、コーヒー、茶が含まれている場合は除く。バンドウ中のグリアジンの回収量は 80°C 以上加熱後、しかしながら強く低下する。Mckillop ら (1985) は、同様の ELISA を述べ、そこではポリクローナルウサギ抗血清を用いた。検知限界は 3.3ng グリアジンで、そのアッセイ法はセリアック病の人々のための小麦毒とくらべ、他の穀物も検知した。PAb を全グリアジンに対し用いたサンドイッチ ELISA 法は Troncone ら (1986), Aubrecht と Touth (1995) で行なわれ、クロス反応を非毒性米、トウモロコシプロラミンで行い、これらの毒性の応用の限界を示した。Friis (1988) はラビット PAb を全グリアジンに対し用いた競合的 ELISA を行なった。抗体はトウモロコシ、ミレット、米、大豆タンパク質とは反応しなかった。しかし弱くソバタンパク質とは反応した。このアッセイ

方法は検知限界 1ng 抗原に対し非常に高い正確性で検知した。さらに近年, Chirido ら (1995) は PAb の競合的 ELISA を全グリアジンに対し行い, 全てのタイプのグリアジンと HMW-GS をライ麦, トリテケール, 大麦のグリアジン同様に認めた; 僅かの反応がオートタンパク質でもみられ, トウモロコシ, 米, 大豆では全くクロス反応はなかった。試験の感度は 1ng グリアジン/mL あるいは 1mg グルテン/kg 粉であった。試験は大麦, ライ麦プロラミンでは 10-15 倍感度は低く, オート麦プロラミンでは 50 倍感度が低い。

幾つかの ELISA は PAb を用いて抗原を捕らえるためにマイクロタイター板に吸着させ, MAb を西洋わさびペルオキシダーゼあるいはアルカリフォスファターゼを抗原測定のために結合させた。トリプルサンドイッチ ELISA は Freedman ら (1987) によって応用され食品中のグリアジン含量の測定をした。ウサギポリクローナル抗グリアジン IgG は抗体を捕捉するのに用いた。検知システムは, ネズミモノクローナル上清, ヒツジ抗マウス IgG, IgM をアルカリフォスファターゼ, p-nitrophenylphosphate を基質として含む。アッセイは全てのグリアジン区分とプロラミンをライ麦, 大麦, オート麦を小麦グリアジン同様検知した。

検知限界は全てのグリアジンで 0.75mg であった。セリアック活性ペプチド 54 アミノ酸残基長に対し惹起された MAb が検知システムの一部として取り上げられる以外は同じシステムを Ellis ら (1994) は用いた。そのアッセイの感受性は, 全てのグリアジンとライ麦プロラミンに対するものは 15ng/mL (0.3mg/kg 粉), 大麦プロラミンには 125ng/mL (2.5mg/kg), オートプロラミンには 250ng/mL (5mg/kg) であった。非毒性の米, トウモロコシ, ミレット, ソールガムのプロラミンはクロス反応しなかった。最近になってアッセイはより感受的になり, そこでは MAb が合成ペプチド 19 アミノ酸長で, 31-49 の  $\alpha$ -グリアジンの配列位置に相当するものに惹起した (Ellis ら 1998)。アッセイの感度

はグリアジンでは 4ng/mL (0.08mg/kg 粉), セカリンでは 500ng/mL, ホールッデン, アベニンでは 1000ng/mL であった。

アッセイは料理食品中のグルテンでも測定でき, しかし感度は落ちる。非毒性穀物からのプロラミンはクロス反応しなかった。一連のアッセイは MAb だけ用いて進んだ。Theobald ら (1983) は, はじめて穀物粉タンパク質に対する MAb の生産を報告し, とくに塩-可溶タンパク質で小麦アレルギーを引き起こすものに対して行なった。MAb の穀物タンパク質に対する多量の収集は Skerritt と Co-worker によってなされた (Skerritt と Underwood, 1989)。殆どの抗-グリアジン抗体はすべてのグリアジンに結合し, 一方, 幾つかの抗体はグリアジンの小グループに結合した。

抗-グリアジン MAb は 1 つの酵素結合したアッセイで用いられ, いろいろな食品でグリアジン定量をした (Skerritt, 1985)。グリアジンに対する検知限界は, しかしながら, かなり高い (20 $\mu$ g/mL)。より感受性のある競合的 ELISA では西洋わさびペルオキシダーゼラベル MAb を用いて, Hill と Skerritt (1990) によって行なわれた。抗体は  $\omega$ -グリアジンとの特別の反応が選ばれ; これらの抗体はまた小麦タンパク質に並んでライ麦, 大麦のタンパク質と結合し, その結果は異なる品種で影響されなかった。これらの抗体の結合は, グルテンの料理あるいはベーキングによる加熱によって阻害されない。例えば 40-70% エタノールが推薦された。アッセイの感度は 0.05-0.10 $\mu$ g グリアジンの範囲で, 1:5 希釈の食品抽出物を用いた 200-400mg グルテン/kg に相当する。2 個の抗体に結合する  $\omega$ -グリアジン, HMW-GS, プロラミン, これらはライ麦, 大麦からのもので, それらはサンドイッチ ELISA の発展に用いられ, 2 つの形でパテントと商品化した (下を見よ)。著者の記述によると (Skerritt 等, 1991), “Gluten Lab Test” は最初の方法で, 未調理, 調理, 加工食品中, 全てのタイプのグルテンを定量できる。2 番目 “Rapid Gluten Test Kit” は素早く,

定量的で、あるいは半定量的な結果で、家庭用、あるいは食品、小麦デンプン産業界で品質のコントロールに用いる。Chirido *et al.* (1998) は、いろいろなフォーマット（競合的 ELISA, 連続競合的 ELISA, サンドイッチ ELISA）で、グリアジンに対する 3MAb を用いて好感度のアッセイを行なった。

ビオチン化抗体がアッセイの 2 つに用いられた。抗体の 2 つは、広くグリアジン、セカリン、ホルデンと反応し、3 番目のみグリアジンと反応し；大豆、米からのタンパク質と反応し、トウモロコシタンパク質は観察されなかった。用いたシステムと抗体により、1:50 の希釈で検知限界は 1-20ng グリアジン /mL の範囲であった。ビオチン-アビシン (biotin-streptavidin) 相互作用をシグナル強化システムとして利用すると、グリアジン定量化に非常に有用である事がわかった。小麦、ライ麦、あるいはオートムギ粉のエタノール抽出物に対し MAb 混合物がサンドイッチ ELISA でテストされた (Sorell *et al.* 1998)。2 つの抗体は捕捉抗体として用いられ、3 つ目が認知用抗体として、ホースラデッシュペルオキシダーゼに結合する。広い特異性のために、この抗体のコンビネーションは、毒性プロラミンとの高いクロス反応性を確かにし、グリアジン、セカリン、ホルデンの認識を同じ程度 3-200ng 範囲 /mL 抽出 (検知リミット約 1.5ng/mL) を許し、一方アベニンに対する感受性はずっと低い (検知リミット約 12ng/mL)。溶液 (120°C, 30 分) 中でプロラミンを加熱すると、定量的な測定は影響しない、そしてエピトープスは抗体で認識されてこの処理によっては変性されない。ここでプロラミンの低下した抽出性は、加熱した物質の分析に対しても大きな問題のようである。同じグループはサンドイッチ ELISA 法を発展させ、それは 1 つの単独の  $\omega$ -セカリンに対して惹起する MAb (R5) をベースにしたものである。R5 は捕捉および検出抗体の両方に用いられ、後方はホースラデッシュペルオキシダーゼでラベルされた (Valdes *et al.* 2003)。R5 ELISA は、小麦、ライ

麦、大麦プロラミンに同一の感受性を示し、一方、クロス反応はオート麦、とうもろこし、コメタンパク質との間では得られなかった。検出限界は 1.5mg グリアジン /mL で、これは 3.2mg グルテン /kg に相当し；再現性は  $\pm 8.7\%$  で、繰返し率 7.7% である。アッセイはカクテル抽出法で加熱加工食品（前述見よ）に対して互換性がある。R5 のエピトープ特異性は、合成ペプチドでグリアジンのオーバーラップのやり方の配列にわたるものに結合する試験で特徴づけられた (Kahlenberg ら, 2006)。発光試験で、R5 結合の  $\alpha/\beta$ -タイプグリアジンの N 末端ドメインの全てのペプチドはセリアック病患者にとって有毒であることが知られた (表 3.2 *New Food Indust.* 60 (10): p62. 2018. 参照)。QQFPF, QQQFP, LQFPF, QLFPF といった繋がり是最も強く結合する。最近、競合的 ELISA は R5MAb を用いて進歩した (Ferre *et al.* 2004)。

サンドイッチ ELISA の対照として、このシステムは全ての小さいものを検知し、プロラミンからの毒ペプチドも検知する。そしてモルト抽出物、ビールのような部分的加水分解されたものの分析に特にデザインされたものである。表 3.3 は競合的 ELISA の高効率で、ビール中のグルテンの測定にファクター約 2-17 倍のデータであり、これはサンドイッチ ELISA に比べてである (Hernando *et al.* 20-05; Immer and Haas-Lauterbach, 2005b)。

市販のテストキットは R5MAb に基づいたもので、発達しリングテストされた (下記参照)。新規の競合的 ELISA は MAb を用いたもので、 $\alpha$ -グリアジンからの毒性ペプチドに対してつくられたもので、これは Bermudo Redondo *et al.* (2005) によって述べられた。このアッセイ法はセリアック病、毒プロラミンに対し特異的であるとわかり、加水分解され特異的抽出剤で互換性のあるものも検知できる。検知限度は 0.3mg グルテン /kg であり、再現性は  $\pm 3.6\%$  であった。最近まで免疫化学決定法はプロラミンの検出に焦点がおかれ、プロラミン含量はグルテンを得るためにファクター 2 によって増やし



表 3.3 生産したビールの分析：サンドイッチと競合的 R5 ELISA<sup>a</sup> の比較

Beers	Origin	Sandwich (cocktail)	Competitive (60% ethanol)
1	Spain	6	30
2	Spain	16	76
3	Czech Republic	<3	24
4	Czech Republic	6	102
5	Belgium	181	833
6	Belgium	1113	4053
7	Germany	2410	4530
8	Germany	22	66
9	Ireland	26	49
10	Ireland	26	101
11	Mexico	<3	11
12	USA	<3	16
13	Germany	10	76
14	Germany	14	88
15	Germany	<3	74
16	Germany	8	98
17	Germany	52	212

a 値 mg gluten/kg

Adapted from Hernando *et al.* (2005) and immer and Hans-Lauterbach (2005b).

た。この計算は Draft Revised COodex Standard によって提案されたもので疑問である。というのはプロラミン（60% エタノール可溶の貯蔵タンパク質）のグルテリン（60% エタノール不溶の貯蔵タンパク質）に対する比率は極端に1の提案比率とちがうからだ。例はいろいろあり、その中で一般の小麦品種（プロラミン/グルテリン=1.7-3.1）（Wieser と Kieffer, 2001）、小麦品種（1.8-1.6）（Wieser, 2000）、ライ麦栽培種（6.3-8.2）（Gellrich ら, 2003）大麦品種（0.5-2.5）（Wieser, 未発表）、小麦デンプン（0.2-4.9）（Wieser and Seilmeier, 2003）。これらの理由で正確なグルテリンの値を求める方法がプロラミン以外必要である。続いての結果は、HMW-および LMW-GS からのペプチドがひどくセリアック病患者の T cells を刺激する（Van de Wal *et al.* 1999; Vader *et al.* 2002; Molberg *et al.* 2003）、および HMW-GS は生体中で有毒であると示された（Dewar *et al.* 2006）。Ellis *et al.* (2006, 2007) はハツカネズミ MAb が HMW-GS 1 D X 5 と IDy10 に対して惹起するものをつくった。その結果は、1 個の単独の MAb は両 HMW-GS を測定するのに十分であった。イムノプロット

法は、この抗体がグリアジンと反応しない事を示した。

著者らの見解によると、この MAb はカクテル ELISA システムで用いるのに抗-グリアジン抗体とのコンビネーションに用いる。Spaenij-Dekking *et al.* (2004, 2006) は、イムノアッセイ法を MAb をベースにしてつくり、ここではセリアック病ウイルスグルテンペプチドを認識する。 $\alpha/\beta$ -グリアジン、 $\gamma$ -グリアジン、LMW-GS, HMW-GS からの T-cell epitopes に対する MAb 特異性が生成した。これらの抗体を用いたアッセイは T-cell 刺激エピトープを異なるバックグラウンドで検知した。さらにそのままのタンパク質と小麦タンパク質のフラグメントの両方は、分析されたが、それはアッセイが競合的に基づくものであるからである。

サマリーとして、PAb あるいは MAb に基づく多くの ELISA は、グルテン定量を進歩させた。しかし、そのほとんどは、特異性、感度、精度に関して共通の受容に必要なすべての要件に対応しているわけではない。2-3 のアッセイだけはリングテスト（重層試験）され、商業的に利用されている。以下、次号へ。

## 参考文献

1. Allmann, M., Candrian, U., Hofelein, C., and Luthy, J.: Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Z. Lebensm. - Wiss. Untersuch. Forsch.* **196**, 248-251. 1993.
2. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. 1984.
3. Untersuchung von Lebensmitteln. Immunologischer Nachweis von Proteinen in Backwaren (einschließlich Brot und blutenfreie Backwaren) und Süßwaren. Wien, Zurich ; Beuth-Verlag GmbH.
4. Anderson, R. P. and Wieser, H.: Medical applications of gluten-composition knowledge. In: Wrigley, C., Bekes, F., and Bushunk, W.: eds, *Gliadin and Glutenin the Unique Balance of wheat Quality*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, pp. 387-409. 2006.
5. Arentz-Hansen, H., McAdam, S. N., Molberg, Ø. *et al.*: Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in praline residues. *Gastroenterology* **123**, 803-809. 2002.
6. Aubrecht, E. and Toth, A. Investigation of gliadin content of wheat flour by ELISA method. *Acta Aliment.* **24**, 23-29. 1995.
7. Berger, E. and Freudenberg, E.: Bemerkungen über die antigenen Eigenschaften von Abbaustufen des Gliadins. *Ann. Paediatr.* **196**, 238-243. 1961.
8. Bermudo Redondo, M. C., Griffin, P. B., Garzon Rasanz, M., Ellis, H. J., and Ciclitira, P. J.: Monoclonal antibody-based competitive assay for the sensitive detection of coeliac disease toxic prolamins. *Anal. Chim. Acta* **551**, 105-114. 2005.
9. Camafeita, E., Alfonso, P., Acevedo, B., and Mendez, E.: Sample preparation optimization for the analysis of gliadins in food by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32**, 444-449. 1997a.
10. Camafeita, E., Alfonso, P., Mothes, T., and Mendez, E.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: the first on-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples. *J. Mass Spectrom.* **32**, 940-947. 1997b.
11. Camafeita, E., Solis, J., Alfonso, P., Lopez, A., Sorell, L., and Mendez, E.: Selective identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of different types of gluten in foods made with cereal mixtures. *J. chromatogr. A* **823**, 299-306. 1998.
12. Chirido, F. G., Anon, M. C., and Fossati, C. A.: Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food Agric. Immunol.* **7**, 333-343. 1995.
12. Chirido, F. G., Anon, M. C., and Fossati, C. A.: Development of high-sensitive enzyme immunoassays for gliadins quantification using the streptavidin-biotin amplification system. *Food Agric Immunol.* **10**, 143-155. 1998.
13. Ciclitira, P. J. and Lennox, E. S.: A radioimmunoassay for  $\alpha$ - and  $\beta$ -gliadins. *Clin. Sci.* **64**, 655-659. 1983.
14. Codex document CX/NFSDU 00/4 Draft revised standard for gluten-free foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. Rome:WHO. 2000.
15. Codex document CL 2006/5-NFSDU. Draft revised for gluten-free foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. Rome:WHO. 2006.
16. Codex Stan 118-1981 Codex Standard for Gluten-Free Foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. Rome: WHO; p. 118. 1981.
17. Codex Standard for the Labelling of Prepacked Foods. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Standard. ROME; WHO. 2001.
18. Dahinden, L., von Büren, M., and Lüthy, J.: A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 228-233. 2001.
19. Denery-Papini, S., Nicolas, T., and Popineau, Y.: Efficiency and limitations of immunochemical assays for the testing of gluten-free foods. *J. Cereal Sci.* **30**, 121-131. 1999.
20. Denery-Papini, S., Boucherie, B., Larré, C. *et al.*: Measurement of raw, heated and modified gluten after limited hydrolysis. In: Stern, M. ed. *Proceedings of the 16th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Zwickau:Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 71-73. 2002.

21. Dewar, D. H., Amato, A., Ellis, H. J. *et al.*: The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 483-491. 2006.
22. Dicke, W. K.: Coeliac disease. Investigation of the harmful effects of certain types of cereals on the patients with coeliac disease. PhD thesis. University of Utrecht. 1950.
23. Dona, V. V., Fossati, C. A., and Chirido, F. G.: Interference of denaturing and reducing agents on gliadin/antibody interaction In: Stern, M. ed. Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin. Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 51-57. 2004.
24. Ellis, H. J., Doyle, A. P., Wieser, H., Sturgess, R. P., Day, P., and Ciclitira, P. J. Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a sequenced peptide of  $\alpha$  gliadin from the coeliac-activating domain I. *J. Biochem. Biophys. Methods* **28**, 77-82. 1994.
25. Ellis, H. J., Rosen-Bronson, S., O'Reilly, N., and Ciclitira, P. J.: Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of gliadin. *Gut* **43**, 190-195. 1998.
26. Ellis, H. J., Pollock, E. L., Engel, W., Fraser, J. S., Rosen-Bronson, S., Wieser, H., and Ciclitira, P. J.: Investigation of putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease, *Gut* **52**, 211-217. 2003.
27. Ellis, H. J., Dewar, D. H., Gonzales-Cinca, N., Wieser, H., O'Sullivan, C., and Ciclitira, P. J.: Production of murine monoclonal antibodies to toxic gluten peptides and proteins, for use in ELISA. In: Stern, M., ed. Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 53-57. 2006.
28. Ellis, H. J., Dewar, D. H., Gonzales-Cinca, N. *et al.*: Characterisation of monoclonal antibodies raised against HMW glutenin subunits In: Stern, M. ed. Proceedings of the 21th Meeting of the Working Group on Prolamin analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, 2007.
29. Ferre, S., Garcia, E., and Mendez, E.: Measurement of hydrolysed gliadins by a competitive ELISA based on monoclonal antibody R5, analysis of syrups and beers, In: Stern, M. ed. Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 65-69. 2004.
30. Fraser, J. S., Engel, W., Ellis, H. J., *et al.*: Coeliac disease: *in vivo* toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut* **52**, 1698-1702. 2003.
31. Freedman, A. R., Galfre, G., Gal, E., Ellis, H. J., and Ciclitira, P. J.: Monoclonal antibody ELISA to quantitate wheat gliadin contamination in gluten-free foods. *J. Immunol. Methods* **98**, 123-127. 1987.
32. Freedman, A. R., Galfre, G., Gal, E., Ellis, H. J., and Ciclitira, P. J.: Western immunoblotting of cereal proteins with monoclonal antibodies to wheat gliadin to investigate coeliac disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **85**, 346-350. 1988.
33. Friis, S. U.: Enzyme-linked immunoabsorbent assay for quantitation of cereal proteins toxic in coeliac disease. *Clin. Chim. Acta* **178**, 261-270. 1988.
34. Fritschy, F., Windemann, H., and Baumgartner, E.: Quantitative determination of wheat gliadins in foods by enzyme-linked immunosorbent assay. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **181**, 379-385. 1985.
35. Galfre, G. and Milstein, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* **73**, 3-75. 1981.
36. Garcia, E., Hernando, A., Toribio, T., Genzor, C., and Mendez, E.: Test immunochromatographic rapid assay: a rapid, highly sensitive and semi-quantitative test for the detection of gluten in foodstuffs. In: Proceeding of the 16th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 55-64. 2002.
37. Garcia, E., Hernando, A., Mujico, J. R., Lombardia, M., and Mendez, E.: Matrix effects in the extraction and detection of gliadins in foods by R5 ELISA and MALDI-TOF mass spectrometry. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 59-64. 2004.
38. Gallrich, C., Schieberle, P., and Wieser, H.: Biochemical characterization and quantification of the storage protein (secalin) types in rye flour. *Cereal Chem.* **80**, 102-109. 2003.
39. Henterich, N., Osman, A. A., Mendez, E., and Mothes, T.: Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung* **47**, 345-348. 2003.
40. Hernando, A., Garcia, F., Llorente, M. *et al.*: Measurements of hydrolysed gliadins in malts, breakfast cereals.

- heated/hydrolysed foods, whiskies and beers by means of a new competitive R5 ELISA. In: Stern, M. ed. Proceedings of 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 31-37. 2005.
41. Hill, A. S. and Skerritt, J. H.: Determination of gluten in foods using a monoclonal antibody-based competition enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* **2**. 21-35. 1990.
  42. Iametti, S., Cappelletti, C., Oldani, A., Scafuri, L., and Bonomi, F.: Improved protocols for ELISA determination of gliadin in glucose syrups, *Cereal Chem.* **81**. 15-18. 2004.
  43. Iametti, S., Bonomi, F., Ferranti, P., Picariello, G., and Gabrovska, D.: Characterization of gliadin content in beer by using different approaches. In: Stern, M. ed. 2005.
  44. Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity . Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 73-78.
  45. Iametti, S., Bonomi, F., Ferranti, P., de Martino, A., and Picariello, G.: Characterization of peptides and proteins in beer by different approaches. 2006.
  46. In:Stern, M. ed.: Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 47-52.
  47. Immer, U. and Haas-Lauterbach, S.: Ridascreen  $\circ$  R/Rida  $\circ$  R gliadin test systems. 2003.
  48. In:Stern, M. ed.: Proceedings of the 17th Meeting of the Prolamin Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 45-52.
  49. Immer, U. and Haas-Lauterbach, S.: The question of extraction procedures. 2005a.
  50. In:Stern, M. ed.: Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.45-52.
  51. Immer, U. and Haas-Lauterbach, S.: Sandwich ELISA versus competitive ELISA: which approach is the more appropriate? 2005b.
  52. In:Stern, M.ed.: Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.53-62.
  53. Kahlenberg, F., Sanchez, D., Lachmann, I., Tuckova, L., Tlaskalva, H., Mendez, E., and Mothes, T.: Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides, *Eur. Food Res. Technol.*, **222**, 78-82. 2006.
  54. Kasarda, D. D.: Toxic cereal grains in coeliac disease. In: Feighery, C. and O'Farrelly, C. eds. Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease. Dublin: Oak Tree Press, pp. 203-220. 1994.
  55. Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., and Hübner, P.: Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **206**. 399-403. 1998.
  56. Kruger, E. and Bietz, J. A.: HPLC-High-Performance Liquid Chromatography of Cereals and Legume Proteins. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. 1994.
  57. Laffey, C., Madden, N., Fogarty, T., and Burke, P.: Gluten testing: an Irish perspective. 2005.
  58. In:Stern, M.ed.: Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.63-68.
  59. Lewis, J. H. and Wells, H. G.: The immunological properties of alcohol-soluble vegetable proteins. *J. Biol. Chem.* **66**, 37-48. 1925.
  60. Malmheden Yman, I.: Detection of gluten/cereals in baby food samples collaborative study. In:Stern, M. ed. Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 65-74. 2006.
  61. Marsh, M. N., Morgan, S., Ensari, A., *et al.*: *In vivo* activity of peptides 31-43, 44-55, 56-68 of  $\alpha$ -gliadin in gluten sensitive enteropathy (GSE). *Gastroenterology* **108**. A871. 1995.
  62. McKillop, D. F., Goslin, J. P., Stevens, F. M., and Fottrell, P. F.: Enzyme immunoassay of gliadin in food. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 486-487. 1985.
  63. Meier, P., Windemann, H., and Baumgartner, E.: Zur Bestimmung des  $\alpha$ -Gliadin-Gehaltes in glutenhaltigen und 'glutenfreien' erhitzten Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **178**. 361-365. 1984.
  64. Mendez, E., Camafeita, E., Sebastian, J. S., *et al.*: Direct identification of wheat gliadins and related cereal prolamins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*



- (Spec, Issue). S123-S128. 1995.
65. Mendez, E., Vela, C., Immer, U., and Janssen, F. W.: Repoet of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur. J. Gastroentero Hepatol.* **17**, 1053-1063. 2005.
  66. Molberg, Ø., Solheim, Flaete, N., Jensen, T., *et al.*: Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* **125**, 337-344. 2003.
  67. Morris, B. A. and Clifford, M, N.: *Immunoassays in Food Analysis*. London; Elsevier Applied Science. 1985.
  68. Mujico, J. R., Lombardia, M., and Mendez, E.: Detection of wheat DNA in foods by a quantitative real-time PCR system: can the measurement of wheat DNA be used as a non-immunological and complementary tool in gluten technology? In: Stern, M, ed. *Proceedings of the 18h Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp.91-98. 2004.
  69. Mujico, J. R., Hernando, A., Lombardia, M., *et al.*: Quantification of wheat, barley and rye contamination in oat samples by real-time PCR. In: Stern, M, ed. *Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp.87-94. 2005.
  70. Mujico, J. R. and Mendez, E.: Simultaneous detection/quantification of wheat, barley and rye DNA by a new quantitative real-time PCR system. In: Stern, M, ed. *Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 39-45. 2006.
  71. Osborne, T. B.: *The proteins of the wheat kernel*. Publication 84. Carnegie Inst., Washington, DC. 1907.
  72. Ranz, A. I., Venteo, A., Vela, C., and Sanz, A.: Ingezim gluten. Immunoenzymatic assay for gluten detection using monoclonal antibody R5. In: Stern, M, ed.: *Proceedings of the 18th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 37-49. 2004.
  73. Ranz, A. I., Venteo, A., Cano, M. J., Vela, C., and Sanz, A.: Development of a new and rapid semiquantitative method for gliadin detection using R5 antibody. In: Stern, M, ed.: *Proceeding of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 39-44. 2005.
  74. Rumbo, M., Chirido, F. G., Fossati, C. A., and Anon, M. C.: Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamin antibodies. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5719-5726. 2001.
  75. Sandberg, M., Lundberg, L., Ferm, M., and Malmheden, Yman, I.: Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 344-349. 2003.
  76. Schofield, J. D., Bottlomley, R. C., Timms, M. F., and Booth, M. R.: The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions. *J. Cereal Sci.* **1**, 241-253. 1983.
  77. Seilmeier, W. and Wieser, H.: Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. IV. Reactivity of gliadin fractions and components from different wheat species in a commercial immunoassay. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 360-364. 2003.
  78. Shewry, P. R. and Tatham, A. S.: The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* **267**, 1-12. 1990.
  79. Sima, A., van Eckert, R., and Pfannhauser, W.: Vergleich unterschiedlicher kommerzieller ELISA-Testsystem zur Bestimmung von Gluten. *Lebensmittelchemie* **53**, 40. 1999.
  80. Skerritt, J. H.: A sensitive monoclonal-antibody-based test for gluten detection: quantitative immunoassay, *J. Sci. Food Agric.* **36**, 987-994. 1985.
  81. Skerritt, J. H.: Immunochemistry of cereal grain storage proteins, *Adv. Cereal Sci. Technol.* **9**, 263-338. 1998.
  82. Skerritt, J. H. and Hill, A. S.: Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1771-1778. 1990.
  83. Skerritt, J. H. and Hill, A. S.: Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J. AOAC* **74**, 257-264. 1991a.
  84. Skerritt, J. H. and Hill, A. S.: Self-management of dietary compliance in coeliac disease by means of ELISA "home test" to detect gluten. *Lancet* **337**, 379-382. 1991b.
  85. Skerritt, J. H. and Underwood, P. A.: Specificity characteristics of monoclonal antibodies to wheat grain storage proteins, *Biochem. Biophys. Acta* **874**, 245-254. 1986.
  86. Skerritt, J. H., Devery, J. M., and Hill, A. S.: Chemistry, celiac-toxicity and detection of gluten and related

- prolamins in foods. *Panminerva Med.* **33**, 65-74. 1991.
87. Sollid, L. M.: Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 647-655. 2002.
  88. Sorell, L., Lopez, J. A., Valdes, I., *et al.*: An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis, *FEBS Lett.* **439**, 46-50. 1998.
  89. Spaenij-Dekking, E. H. A., Kooy-Winkelaar, E. M. C., Nieuwenhuizen, W. F., Drijfhout, J. W., and Koning, F.: A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of  $\alpha/\beta$ - and  $\gamma$ -gliadins. *Gut* **53**, 1267-1273. 2004.
  90. Spaenij-Dekking, L., Kooy-Winkelaar, Y., Stepniak, D., Edens, L., and Koning, F.: Detection and degradation of gluten. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 20th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp. 59-64. 2006.
  91. Stern, M., Ciclitira, P. J., van Eckert, R., *et al.*: Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 741-747. 2001.
  92. Sturgess, R., Day, P., Ellis, H. J.: *et al.*: Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet* **334**, 758-761. 1994.
  93. Theobald, K., Bohn, A., Thiel, M., Ulmer, W. T., and König, W.: Production of monoclonal antibodies against wheat flour components. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **72**, 84-86. 1983.
  94. Troncone, R., Vitale, M., Donatiello, A., Farris, E., Rossi, G., and Auricchio, S.: A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. *J. Immunol. Methods* **92**, 21-23. 1986.
  95. Vader, W., Kooy, Y., van Veelen, P. *et al.*: The gluten response in children with celiac disease is directed towards multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* **122**, 1729-1737. 2002.
  96. Valdes, I., Garcia, E., Llorente, M., and Mendez, E.: Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 465-474. 2003.
  97. Van de Wal, Y., Kooy, Y. M. C., van Veelem, P. *et al.*: Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3133-3139. 1999.
  98. Van Eckert, R.: Methodological and practical experience in gluten analysis. *Ernährung/Nutrition* **17**, 163-165. 1993.
  99. Van Eckert, R., Scharf, M., Wald, T., and Pfannhauser, W.: Determination of proteins with ELISA-methods: doubtful quantitative results? In: Amado, R. and Battaglia, R. eds. Authenticity and Adulteration of Food-the Analytical Approach. Proceedings of the 9th European Conference on Food Chemistry, FECS Event No. 220. Vol. 1. Zürich: Swiss Society of Food and Environmental Chemistry, pp. 263-268. 1997.
  100. Van Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitira, P. J. *et al.*: Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation. *J. Cereal Sci.* **43**, 331-341. 2006.
  101. Weisgerber, C.: ELISA for the detection of gliadin in food. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 12th Meeting of the Working Group on Protamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Eigenverlag, p.59. 1998.
  102. Wieser, H.: Cereal protein chemistry. In: Feighery, C. and O'Farrelly, C. eds, *Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease*. Dublin: Oak Free Press, pp. 191-202. 1994.
  103. Wieser, H.: The precipitating factor in celiac disease. In: Howdle, P. D., ed. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*, Vol. 9: Coeliac Disease. London: Bailliere Tindall, pp. 191-207. 1995.
  104. Wieser, H.: Investigating the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **A207**, 128-132. 1998.
  105. Wieser, H.: Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 262-268. 2000.
  106. Wieser, H. and Antes, S.: Development of a non-immunochemical method for the quantitative determination of gluten in wheat starch. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 16th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp.19-23. 2002.
  107. Wieser, H. and Kieffer, R.: Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a microscale. *J. Cereal Sci.* **34**, 19-27. 2001.
  108. Wieser, H. and Seilmeier, W.: Determination of gliadin and gluten in wheat starch by means of alcohol extraction and gel permeation chromatography. In: Stern, M. ed. Proceedings of the 17th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten. pp.53-57. 2003.

109. Wieser, H., Belitz, H.-D., Idar, D., and Ashkenazi, A.: Coeliac activity of the gliadin peptides CT-1 and CT-2. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **182**, 115-117. 1986.
110. Wieser, H., Seilmeier, W., and Belitz, H.-D.: Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* **19**, 149-155. 1994.
111. Wieser, H., Antes, S., and Seilmeier, W.: Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.* **75**, 644-650. 1998.
112. Wieser, H., Bushuk, W., and MacRitchie, F.: The polymeric glutenins. In: Wrigley, C., Bekes, F., and Bushuk, W. eds. *Gliadin and Glutenin: the Unique Balance of Wheat Quality*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. pp. 231-240. 2006.
113. Windemann, H., Fritschy, F., and Baumgarmer, E.: Enzyme-linked immuno sorbent assay for wheat  $\alpha$ -gliadin and whole gliadin. *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 110-121. 1982.
114. Wrigley, C., Corke, H., and Walker, C. E.: *Encyclopedia of Grain Science*. Vol.1-3. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2004.

連絡先：瀬口 正晴

email : gr228587@wf7.so-net.ne.jp