

アレルギー物質（卵）を含む食品の検知法について

The Method of Detecting the Food Containing Allergen (egg)

曽根 美千代 福原 郁子 佐藤 信俊*¹

Michiyo SONE, Ikuko FUKUHARA, Nobutoshi SATO

卵タンパクを含む模擬試料を用いて加熱による測定値への影響について検討した結果、通知法（ELISA法）のキットでの検出は困難であった。しかし、耐熱性タンパク（オボムコイド）用のキットでは検出が可能であり、このことはアレルギーの見逃回避に有効であると思われる。

ベビーフード及び幼児菓子20件について実態調査を行った結果、表示違反になるものはなかった。しかし、原材料にアレルギー（卵）表示があった加熱加工品であるベビーフードでは、オボムコイドキットのみ卵タンパクを10ppm以上検出し、加工品では加熱程度によりキットを使い分ける必要もあるのではないかとと思われる。

キーワード：アレルギー食品；卵；ELISA；オボムコイド

Keywords：Allergy food；Egg；ELISA；Ovomucoid

1 はじめに

近年、アレルギー物質（以下、アレルギーとする）を含む食品に起因する健康危害が多く見られるようになってきた。食物アレルギー対策検討委員会による研究報告のアンケート調査で、保育園児で12.6%、3才児で8.6%、小学1年生で7.4%、中学生で6.3%、成人でも9.3%の人が何らかのアレルギー症状を有することが明らかになった¹⁾。この結果を受け厚生労働省では、食物アレルギー患者への情報伝達を徹底し、健康被害を回避することを目的に、発症数及びその重篤度の高い特定原材料の5品目（卵・乳・そば・小麦・落花生）について平成13年4月より加工食品への表示を義務づけた²⁾（平成14年4月施行）。

そこで、スクリーニング検査であるELISA法を導入するに当たり、アレルギーを卵タンパクに想定し、模擬食品により加熱における分析値への影響等について検討を行い、若干の知見を得たので報告する。また、流通品の実態調査も行ったので、その結果についても報告する。

2 方法

2.1 試料

1) 模擬試料Ⅰ

全卵、卵白、卵黄を各々凍結乾燥後粉末状にし、その後オスターブレンダーを用い、100、10、5、2、1ppmまで小麦粉で段階希釈し模擬試料とした。

2) 模擬試料Ⅱ

全卵を加えた焼菓子の生地を2種類（脂質含有、非

含有）作り、この生地を用い加熱条件を変え焼菓子を作成した（表1-1、表1-2）。その後、オスターブレンダーで十分粉碎し、模擬試料とした。

3) その他の試料

ベビーフード9件、アレルギー除去食品と表示されているレトルト食品1件、菓子10件合計20件について市販品を購入し、フードカッターで粉碎し均一にしたものを試料とした。

2.2 試薬

（ELISA用分析キット）

- ・FASTKIT™ エライザシリーズ 卵（日本ハム㈱）
- ・特定原材料測定キット 卵白アルブミン、オボムコイド（㈱森永生科学研究所）

表 1-1 模擬食品Ⅱの原材料

	卵割合	脂質割合	原材料
1 クッキー	9.5%	23.8%	卵、小麦粉、バター、砂糖、塩
2 ビスケット	8.6%	0.0%	卵、小麦粉、スキムミルク、砂糖、水、塩

表 1-2 模擬試料Ⅱの加熱条件

①	生地のまま	マッフル炉で12分加熱
②	60	
③	100	
④	150	オープンで12分加熱
⑤	180	
⑥	210	
⑦	240	

* 1 現 原子力センター

(ウェスタンブロット用キット)

- ・卵ウェスタンブロットキット 卵白アルブミン, オボムコイド (株森永生科学研究所)

(免疫染色用)

- ・ VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit (VECTER社)
- ・ Alkaline Phosphatase Substrate Kit <BCIP/NBT> (VECTOR社)
- ・ ウシ血清アルブミン (SIGMA社)

(その他)

- ・ 試薬特級
- ・ その他

2.3 機器

- ・ ホモジナイザー：ミルサー, オスターブレンダー, フードカッター
- ・ マイクロプレートリーダー：モデル680 (BIO-RAD社製)
- ・ 電気泳動装置：ミニプロティアン3 レディーゲルセル (BIO-RAD社製)
- ・ プロッティング装置：トランスプロット SD セル (BIO-RAD社製)

2.4 分析方法

試料からの抽出, ELISA法及びウェスタンブロット法については通知法²⁾に従いおこなった (図 1)。

オボムコイドキット及びウェスタンブロットに用いた試料抽出液は, 卵白アルブミンキットで使用した抽出液を用いた。

ELISA法で測定した卵タンパク質濃度に試料及び抽出液の希釈倍率を乗じ, 食品採取重量当たりの卵タンパク質量を求めた。

3 結果及び考察

3.1 繰り返し試験

原材料表示に卵の記載のある市販のビスケット (卵含有量1.5%) を用い, 3 回の繰り返し試験を 1 回につき3well並行で行った。

その結果, 卵タンパク含有量はFASTKITで13.7 ± 0.6ppm (C.V4.2%), 卵白アルブミンキットで17.3 ± 1.5ppm (C.V8.8%) とキット間の差は少なくC.V%も良好であった。また, それぞれ3well間のC.V%は1.0 ~ 4.5%と安定しており良好であった。

3.2 キットの特性

アレルゲンを混入させた模擬試料 を用い, 混入濃度と実際の測定値を比較し, キットの特性を確認した。

乾燥卵白については, 3 種のキット共に混入濃度に比例し, 直線性のある相関が認められた (図 2 - ①, ②)。一方, 乾燥全卵については, キットにより異なり, FASTKITでは直線性のある相関が認められた (図 2 - ③) が, 森永の2キット (卵白アルブミン, オボムコイド) では, 低濃度域での混入濃度と測定値の直線性は低く定量は困難であった。 (図 2 - ④)

スクリーニング試験では, 卵タンパクが10ppm以上検出された場合に陽性と判定される。そこで, 卵タンパクの測定値が10ppmとなる乾燥全卵及び乾燥卵白の混入濃度を回帰直線より換算すると, 乾燥全卵のFASTKIT では9.1ppm, 乾燥卵白ではFASTKIT3.6ppm, 卵白アルブミンキット3.9ppm, オボムコイドキット3.9ppmであった。

また, 判定値付近の実測値でのキット間のバラツキをみると, 乾燥全卵10ppmでは, FASTKIT13ppm, 卵白アルブミンキット12ppm, オボムコイドキット13ppm

【 スクリーニング試験 】

<ELISA法>

(FASTKIT)

試料の粉碎
↓
試料からのタンパク質の抽出
↓
標準溶液, 測定溶液の分注
↓
一次反応 (室温, 1時間)
↓
well洗浄 (250 μl/well × 5回)
↓
ビオチン結合抗体の添加 (100 μl/well)
↓
二次反応 (室温, 1時間)
↓
well洗浄 (250 μl/well × 5回)
↓
酵素-アビシン結合物の添加 (100 μl/well)
↓
三次反応 (室温, 30min)
↓
well洗浄 (250 μl/well × 5回)
↓
発色剤の添加 (100 μl/well)
↓
発色反応 (室温, 20min), 遮光
↓
反応停止液の添加 (100 μl/well)
↓
吸光度測定 (30min以内に測定)
* 卵, 牛乳, 小麦キット : 主波長450nm, 副波長620nm
* そば, 落花生キット : 主波長405nm, 副波長620nm

(特定原材料測定KIT)

試料の粉碎
↓
試料からのタンパク質の抽出
↓
標準溶液, 測定溶液の分注
↓
一次反応 (室温, 1時間)
↓
well洗浄 (300 μl/well × 6回)
↓
酵素標識抗体溶液の添加 (100 μl/well)
↓
二次反応 (室温, 30min)
↓
well洗浄 (300 μl/well × 6回)
↓
酵素基質溶液の添加 (100 μl/well)
↓
酵素反応 (室温, 10min) 遮光
↓
反応停止液の添加 (100 μl/well)
↓
吸光度測定 (30min以内に測定)
* 主波長450nm, 副波長620nm

【 確認試験 (卵) 】

<ウェスタンブロット法 >

試料からのタンパク質の抽出
↓
SDS-PAGE
・ 試料注入
・ 電気泳動
↓
プロットング (セミドライ方式)
・ ゲルのセッティング
・ 転写 メンブレン1cm²あたり2mA定電流, 60 min
↓
免疫染色
・ ブロッキング 室温: 60min or 4°C: 1晩
・ 一次反応 60min
・ 洗浄 5分 × 3回
・ 二次反応 30min
・ 洗浄 5分 × 3回
・ 三次反応 20min
・ 洗浄 5分 × 3回
・ buffer置換 15min
・ 酵素反応 3~10min
・ 精製水で洗浄 (15min), 保存
↓
判定
卵白アルブミン : M.W. 50,000
オボムコイド : M.W. 38,000

図 1 分析フロー (通知法)

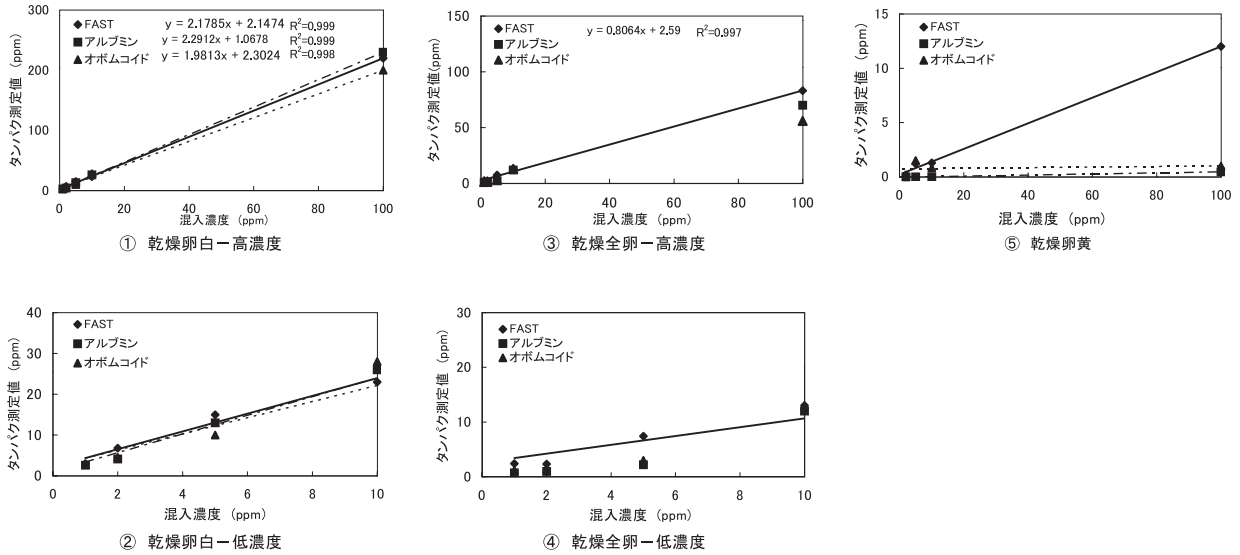


図2 混入濃度と実測値の相関

であり、乾燥卵白5ppmでは、FASTKIT 15ppm、卵白アルブミンキット13ppm、オボムコイドキット10ppmであった。測定キットが全卵の卵タンパクを対象としているため乾燥卵白は混入濃度には高いが、測定値のバラツキは少なく、キット間の相違は認められなかった。

また、低濃度域でも卵タンパクは検出できていることから、キットの特異性は十分あり、コンタミネーション等の検出にも有効であると思われる。

表2に各キットの特徴を示す。

各キットは主に卵白中の抗原を対象にしている^{3),4)}。そのため、乾燥卵黄については、単一抗体を用いている森永のキットでは検出はできず、複合抗体を用いているFASTKITでも陽性と判定するためには100ppm以上の混入濃度が必要であった(図2-⑤)。

3.3 加熱による影響

焼菓子が偽陰性となる食品のリストにあることから、模擬試料Ⅱにより加熱による測定値への影響について検討を行った。

焼菓子生地中の卵タンパク含有量の測定値を100%としたときの加熱温度による測定値の変化を図3,4に示した。

3キット共に60℃ではタンパク含有量に大きな変化は見られなかったが、100℃を超えるとビスケットでは38.2~64.3%に減少し、クッキーでは15.0~23.8%とさらに顕著に減少した。これは油脂の比熱が0.45前後と水の約半分であり、油脂の方がより早く高温になるため、油脂を含むクッキーではビスケットに比べタンパク変性が進み、測定が困難になったものと考えられる。

また、キット間の違いについては、FASTKITと卵白アルブミンキットでは、測定値の差はあまり見られず、同じような挙動を示した。一方、オボムコイドキットは、クッキーでは他のキットと差は認められなかったが、ビスケットでは、FASTKITと卵白アルブミンキットが

表2 使用キットの特徴

	FASTKIT (日本ハム(株)製)	特定原材料測定キット ((株)森永生科学研究所製)	
特徴	複数タンパク質を検出(ポリクロナール抗体)	特異的単一あるいは精製タンパク質を検出(モノクロナール抗体)	
	卵キット	卵白アルブミン	オボムコイド
測定対象抗原 (アレルゲン:卵)	オボアルブミン, オボムコイド, リゾチーム, オボトランスフェリンなど	オボアルブミン	オボムコイド
長所	適用食品が広く見逃しが少ない	交差反応が少ない 特異性が高い	
短所	交差反応による偽陽性	特定原材料の混入の見逃し (偽陰性)	

食衛誌Vol.44 No.2「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」
より抜粋

100℃で38.4%~41.4%、150℃で0.7%~1.2%であるのに対し、オボムコイドキットは100℃で64.3%、150℃で5.9%と他のキットに比べ緩やかに減少した。

また、これらの結果を実際の定量値と比較すると(表3,4)、通知法で定められているFASTKITと卵白アルブミンキットでは、210ppm以上になると前者は6.3ppm以下、後者は6.5ppm以下と陽性判定値(10ppm)未満となり、偽陰性の判定となった。一方、オボムコイドキットでは、クッキーの210℃で21ppm、ビスケットの240℃でも91ppmと他のキットに比べ高温条件でも検出し、スクリーニング陽性と判定することができ、伊達等⁵⁾の報告と同様の傾向が見られた。

これらは、オボムコイドが耐熱性タンパクであるため易熱性タンパクのアルブミンより変性しにくく検出できたものと思われる。卵白アルブミンキットはオボムコイドキットに比べ加工食品への適用範囲が広いとされている⁶⁾が、加熱加工品については、逆にオボム

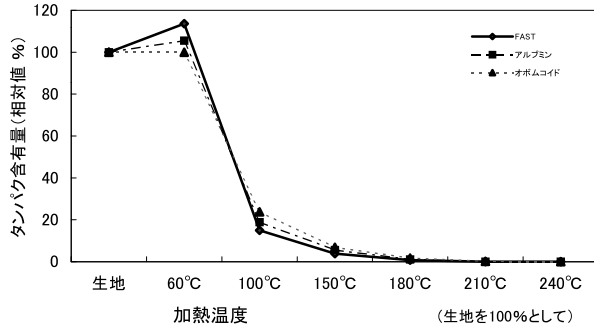


図3 加熱による測定値への影響① (クッキー)

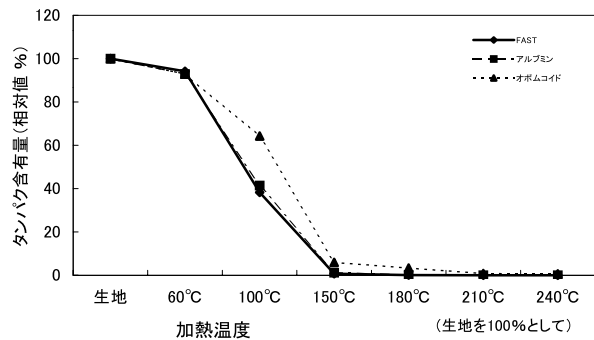


図4 加熱による測定値への影響② (ビスケット)

コイドキットの方がアレルゲンの見逃しを回避するために有効ではないかと思われた。

3.4 実態調査

表5は、乳幼児が食するベビーフード9品目(No.1~9)と、成人向けに低アレルゲン食品として販売されている1品目(No.10)についてのELISA法での分析結果である。

通知法の2キット(FASTKIT, アルブミンキット)での測定結果は、No.3の生菓子のみFASTKITで2.7ppmのタンパク量を検出したが、判定ではスクリーニング陰性となり、表示と一致しない。

しかし、オボムコイドキットではNo.3の生菓子で11ppm, No.7の豆腐ハンバーグから20ppm以上検出され、スクリーニング陽性となり、表示と一致した。瓶詰め、レトルト食品の加熱加工条件は厳しいため通知法の2キットは、前述と同様に検出が困難だったものと思われる、加熱加工品でのオボムコイドキットの有用性が示唆された。

表6は、同様に幼児の菓子コーナーで販売されている菓子8品目(No.11~18)と焼菓子2品目(No.19~20)についてのELISA法での分析結果である。

No.14の焼菓子(ボーロ)は分析した3キットすべてで20ppm以上となり、スクリーニング陽性と判定した。単一抗原のキットでは卵黄は偽陰性となる食品になっているが、割卵する際微量の卵白も混入すること、また加熱時間が短いこと(280℃, 4分(メーカー聞き取りによる))から、検出できたものと思われる。

一方、卵殻カルシウムを含むNo.15, 16は通知法の2

表3 模擬試料IIによる卵タンパクの定量結果① (単位: 定量値 ppm 相対値 %)

加熱条件	クッキー					
	日本ハム		森永		永	
	FAST		アルブミン		オボムコイド	
	定量値	相対値	定量値	相対値	定量値	相対値
生地	22000	100.0	18000	100.0	16000	100.0
60	25000	113.6	19000	105.6	16000	100.0
100	3300	15.0	3400	18.9	3800	23.8
150	840	3.8	1000	5.6	1100	6.9
180	170	0.8	190	1.1	280	1.8
210	6.3	0.0	6.5	0.0	21	0.1
240	1.3	0.0	0.9	0.0	4.4	0.0

判定基準 陽性: 特定原材料由来蛋白含量 10ppm以上
陰性: 特定原材料由来蛋白含量 10ppm未満

表4 模擬試料IIによる卵タンパクの定量結果② (単位: 定量値 ppm 相対値 %)

加熱条件	ビスケット					
	日本ハム		森永		永	
	FAST		アルブミン		オボムコイド	
	定量値	相対値	定量値	相対値	定量値	相対値
生地	17000	100.0	14000	100.0	14000	100.0
60	16000	94.1	13000	92.9	13000	92.9
100	6500	38.2	5800	41.4	9000	64.3
150	120	0.7	170	1.2	830	5.9
180	16	0.1	25	0.2	460	3.3
210	2.3	0.0	0.7	0.0	110	0.8
240	2.1	0.0	0	0.0	91	0.7

判定基準 陽性: 特定原材料由来蛋白含量 10ppm以上
陰性: 特定原材料由来蛋白含量 10ppm未満

表5 実態調査I (ベビーフード及び低アレルゲン食品)

No.	名称	測定結果 (ppm)			判定結果	表示		形態
		FAST	アルブミン	オボムコイド		原材料	注意喚起	
1	鶏肉野菜煮物	ND	ND	ND	-			瓶詰め
2	調理麺	ND	ND	ND	-			瓶詰め
3	生菓子	2.7	ND	11	-	卵黄		瓶詰め
4	八宝菜	ND	ND	ND	-			レトルト/缶
5	炊き込みご飯	ND	ND	ND	-			レトルト/缶
6	チキンライス	ND	ND	ND	-			レトルト/缶
7	豆腐ハンバーグ	ND	ND	>20	-	卵白		レトルト/缶
8	チキンクリームシチュー	ND	ND	ND	-			レトルト/缶
9	野菜カレー	ND	ND	ND	-		あり	レトルト/缶
10	低アレルゲンカレー	ND	ND	ND	-			レトルト/缶

*通知法 (FASTKIT, アルブミンキット) による判定結果

表6 実態調査II (幼児菓子及び焼菓子)

No.	名称	測定結果 (ppm)			判定結果	表示		形態
		FAST	アルブミン	オボムコイド		原材料	注意喚起	
11	ビスケット	ND	ND	ND	-			
12	ビスケット	ND	ND	ND	-		あり	
13	焼菓子(ボーロ)	ND	ND	ND	-			
14	焼菓子(ボーロ)	>20	>20	>20	+	卵黄	あり	
15	ウエファース	ND	ND	ND	-	卵殻 Ca		
16	ラムネ菓子	ND	ND	1.3	-	卵殻 Ca	あり	
17	スナック菓子	ND	ND	ND	-			
18	油菓子(海蒸せんべい)	ND	ND	ND	-			
19	クッキー	ND	ND	ND	-		あり	
20	パイ	ND	ND	ND	-		あり	

*通知法 (FASTKIT, アルブミンキット) による判定結果

キットでは検出できず、オボムコイドキットでもNo.16で1.3ppmと定量下限値付近であり、表示と一致しなかった。各キットは主に卵白中の抗原を対象にしているため検出は困難であり、通知法の偽陰性の食品リスト²⁾と一致していた。

3.5 ウェスタンブロット法による確認試験

ウェスタンブロットによる確認試験の結果、スクリーニング結果と同様に卵白アルブミンではNo.14のみ検出され、一方オボムコイドではNo.3, No.7, No.14が検出された。

4 ま と め

- 1) 単一抗原用キットで低濃度域での定量性に難はあったが、判定値(10ppm)でのキット間差はなく、また、キット特異性もありコンタミネーションの検出に有効であると思われた。
- 2) 卵タンパクは、加熱により著しく減少し、高温条件での検出は通知法の2キットでは困難であった。しかし、耐熱性タンパク用のオボムコイドキットで検出することができたことから、このことはアレルギーの見逃しを回避できるのではないかと思われた。
- 3) ベビーフード及び幼児菓子20件について実態調査

を行った結果、表示違反になるものはなかった。が、原材料にアレルギー(卵)表示がある加熱加工品のベビーフードにおいてオボムコイドキットのみ10ppm以上検出されたことから、加熱・非加熱、或いは加熱程度により、単一抗原用キットを使い分ける必要もあるのではないかと思われた。

参 考 文 献

- 1) 飯倉洋次他：食物アレルギー対策検討委員会平成9年度報告書(1998)
- 2) 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法について”平成14年11月6日，食発第1106001号(2002)
- 3) 本庄勉，村岡嗣朗，豆越慎一，境雅寿：FFIジャーナル，206，13(2002)
- 4) 高畑能久，森松文毅：FFIジャーナル，206，23(2002)
- 5) 伊達英代，豊田安基江，杉村光永，金森久幸：第41回全国衛生化学技術協議会年会講演集，p128(2004)
- 6) 穂山浩：食品衛生学雑誌，44(2)，168(2003)