

アレルギー物質（小麦）を含む食品の検知法について

The Method of Detecting the Food Containing Allergen (Wheat)

曾根美千代 手代木年彦*¹ 柳田 則明

Michiyo SONE, Toshihiko TESHIROGI, Noriaki YANAGITA

平成17年10月に追加された改良法は、加熱加工品および加圧加熱加工品の検出に非常に有効であった。しかし、改良法で示されたFASPEKキットは混入量に比べ実測値が高値になる傾向があり、偽陽性検体が増加する可能性が示唆された。また、加圧加熱食品の定性PCRによる確認試験は、加工工程におけるDNAの分解によりDNAの検出が困難となりスクリーニング結果と一致しない場合がある。流通品の実態調査でスクリーニング陽性だった2食品は、改良法キット間の測定値が相違しており、確認試験での陰性結果からこれらは試料マトリックスによる偽陽性反応と思われた。その他19食品については表示と一致した。

キーワード：アレルギー食品；小麦；ELISA；改良法

Keywords : Allergy food ; Wheat ; ELISA ; Improved method

1 はじめに

平成13年4月より、厚生労働省は食物アレルギーによる健康危害を回避するため特定原材料5品目（卵、乳、小麦、そば、落花生）について食品への表示を義務づけ、検査法については、翌年11月に「アレルギー物質を含む食品の検査法について」¹⁾（以下従来法）を通知した。しかし、容器包装詰加圧加熱殺菌食品や焼菓子等加熱及び加圧加熱加工した食品は、タンパクの熱変性等により検出が困難であり、そのため偽陰性リストに挙げられている。平成16年度に当部で検討した結果²⁾も渡邊等の報告³⁾でも同様の結果であった。

平成17年10月に「アレルギー物質を含む食品の検査法について（一部改正）」⁴⁾が通知され、加熱加工品の抽出率が改善された改良法が加わった。

そこで、アレルギーを小麦に想定し、模擬試料を作成し従来法と改良法について比較検討を行い若干の知見を得たので報告する。また、流通品について実態調査も行ったので併せて報告する。

2 方法

2.1 試料

1) 模擬試料Ⅰ

コーンフラワーに小麦粉を2%添加し、その後コーンフラワーで段階希釈し200, 125, 100, 50, 10 μ g/gとしたものを模擬試料Ⅰとした。

2) 模擬試料Ⅱ

小麦粉を1%加えたとうもろこし菓子の生地を作り、これを用い加熱温度を変え20分焼成し焼菓子を作成した。その後、オスターブレンダーで十分粉碎し、模擬試料Ⅱとした。

3) 模擬試料Ⅲ

マッシュポテト及びトマトピューレに小麦粉を1%添加しミキサー等で十分混和後、その一部をオートクレーブにより121 $^{\circ}$ C, 1.2kgf/cm², 20分加圧加熱したものを模擬試料Ⅲとした。

4) その他の試料

原材料に小麦表示のない加工食品20件、小麦表示のある加工食品1件合計21件について市販品を購入し、ミルサーで粉碎し均一にしたものを試料とした。

2.2 試薬

(ELISA用)

従来法

- ・FASTKITエライザシリーズ 小麦（日本ハム(株)）（以下FASTキット）
- ・特定原材料測定キット 小麦グリアジン（榎森永生科学研究所）（以下グリアジンキット）

改良法

- ・FASTKITエライザVer. IIシリーズ 小麦（日本ハム(株)）（以下FASTVer. IIキット）
- ・モリナガFASPEK特定原材料測定キット 小麦グリアジン（榎森永生科学研究所）（以下FASPEKキット）

* 1 現 仙台保健福祉事務所黒川支所

(定性PCR用)

- ・ Genomic-Tip 20/G (QIAGEN)
- ・ Genomic DNA buffer Set (QIAGEN)
- ・ α-アミラーゼ (SIGMA)
- ・ ProteinaseK (QIAGEN)
- ・ Ampli Taq Gold&10×buffer with dNTP (Applied Biosystems)
- ・ アレルゲンチェッカー小麦 (オリエンタル酵母工業株)

(その他)

- ・ 試薬特級

2.3 機器

- ・ ホモジナイザー：ミルサー，ミキサー，フードカッター，オスターブレンダー
- ・ マイクロプレートリーダー：モデル680 (BIO-RAD社製)
- ・ サーマルサイクラー：GeneAmp9700 (Applied Biosystems)

2.4 分析方法

スクリーニング試験における試料からの抽出，ELISA法については通知法⁴⁾に従い，2ウェル並行で行った。なお，模擬試料については1検体につき2点並行で抽出した。ELISA法で測定した小麦タンパク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小麦タンパク量を求めた。模擬試料IIについては，焼成前後の重量を測定し，それにより補正した値を小麦タンパク量とした。

確認試験の定性PCRは，DNA抽出にはイオン交換樹脂タイプキット (Genomic-tipキット) を用い，その他は通知法⁴⁾に従い行った。

3 結果及び考察

3.1 改良キットの特性

小麦粉を添加した模擬試料Iを用い，添加量と実際の測定値を比較し，キットの特性を確認した。小麦粉添加量と小麦タンパク量との相関を図1に実測値を表1に示す。

従来法と改良法とも小麦粉の添加量に比例し良好な相関が得られた。従来法の2キットは同様の測定値を示し，改良法のFASPEKキットの測定値はFASTVer. IIキットの約1.5倍であった。

使用した小麦粉の成分表示によるタンパク量は8g/100gであり，これをもとに小麦タンパク量を想定すると小麦粉100μg/g添加試料のタンパク量は8μg/gとなる。そこで，小麦粉100μg/g添加試料の回収率を求めると，従来法のFASTキットで64%，グリアジンキットで70%となった。改良法については，FASTVer. IIキットで130%，FASPEKキットで194%となり，FASPEKキットで高値となった。判定値の10μg/gとなる小麦粉125μg/g添加試料の測定値はFASTVer. IIで11.2μg/g (回

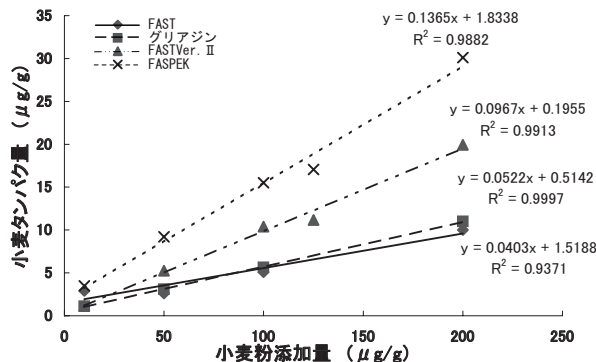


図1 小麦粉添加量と実測値の相関

表1 模擬試料Iによる小麦タンパク定量結果

| 小麦粉添加量 (μg/g) | 想定タンパク量 (μg/g) | (単位：測定値 μg/g 回収率 %) | | | | | | | |
|---------------|----------------|---------------------|-----|-------|-----|-------------|-----|--------|-----|
| | | 従来法 | | | | 改良法 | | | |
| | | FAST | | グリアジン | | FASTVer. II | | FASPEK | |
| 測定値 | 回収率 | 測定値 | 回収率 | 測定値 | 回収率 | 測定値 | 回収率 | | |
| 200 | 16 | 10.0 | 63 | 11.0 | 69 | 19.9 | 125 | 30.1 | 188 |
| 125 | 10 | | | | | 11.2 | 112 | 17.1 | 171 |
| 100 | 8 | 5.1 | 64 | 5.7 | 71 | 10.4 | 130 | 15.5 | 194 |
| 50 | 4 | 2.6 | 65 | 3.1 | 78 | 5.2 | 131 | 9.2 | 230 |
| 10 | 0.8 | 2.9 | 363 | 1.1 | 138 | 1.2 | 145 | 3.5 | 435 |

使用した小麦粉のタンパク量：8g/100g

表2 メーカーによる小麦タンパク測定例

| 商品名 | グリアジン | |
|---------------|-------|--------|
| | 従来系 | FASPEK |
| 薄力粉 | 28469 | 177362 |
| 食パン | 18373 | 175288 |
| 冷麺 | 18641 | 168149 |
| そば (乾麺) | 13642 | 139608 |
| レトルトカレー | 81 | 7484 |
| カレールウ | 6668 | 57642 |
| 固形スープ | 19 | 205 |
| パスタソース (レトルト) | 69 | 19913 |
| スープ (レトルト) | 47 | 17365 |
| ソース (缶詰) | 15 | 16227 |
| ウエハース | 224 | 12174 |

単位：μg/g

従来系：モリナガ特定原材料測定キット

FASPEK：モリナガFASPEK特定原材料測定キット

(森永生科学研究所ホームページより)

収率112%)，FASPEKキットで17.1μg/g (171%) となり，同様であった。(表1)

森永生科学研究所ホームページの測定データを表2に示す。日本食品標準成分表⁵⁾による薄力粉のタンパク量は1等で8.0g/100g (80,000μg/g)，2等で8.8g/100g (88,000μg/g) である。これをもとに表2のFASPEKキットの薄力粉の回収率を求めると1等で221%，2等で201%となり，模擬試料Iの測定結果はこれと同様である。このようにFASPEKキットは，添加量に対し高値になる傾向が見られ，判定値付近では注意が必要であり，同キットによる測定では偽陽性検体が増加するのではないかと思われた。

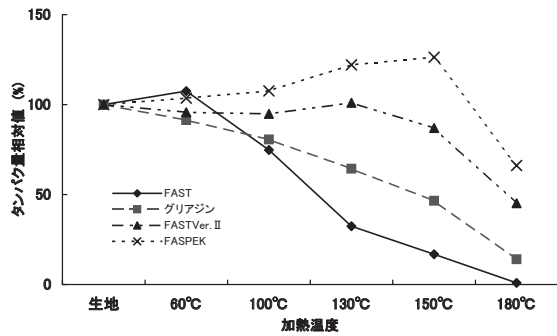


図2 加熱による測定値への影響

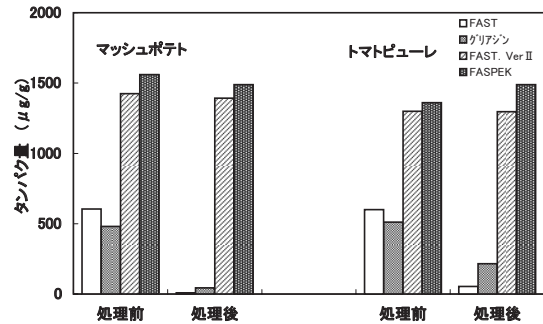


図3 加圧加熱による測定値への影響

表3 模擬試料Ⅱによる小麦タンパク定量結果

(単位 : 測定値 μg/g 相対値 %)

| | 従来法 | | | | 改良法 | | | |
|-------|------|-------|-------|-------|--------------|-------|--------|-------|
| | FAST | | グリアジン | | FAST Ver. II | | FASPEK | |
| | 測定値 | 相対値 | 測定値 | 相対値 | 測定値 | 相対値 | 測定値 | 相対値 |
| 生地 | 518 | 100.0 | 514 | 100.0 | 1520 | 100.0 | 1396 | 100.0 |
| 60°C | 557 | 107.5 | 470 | 91.4 | 1455 | 95.7 | 1446 | 103.6 |
| 100°C | 387 | 74.8 | 414 | 80.6 | 1442 | 94.9 | 1503 | 107.7 |
| 130°C | 168 | 32.3 | 331 | 64.3 | 1536 | 101.1 | 1705 | 122.1 |
| 150°C | 87 | 16.8 | 239 | 46.5 | 1322 | 87.0 | 1763 | 126.3 |
| 180°C | 4 | 0.8 | 72 | 14.0 | 686 | 45.1 | 924 | 66.2 |

3.2 加熱による影響

3.2.1 加熱温度による影響

焼菓子を想定した模擬試料Ⅱを用い、加熱温度を変え、加熱による測定値の影響について検討を行った。焼菓子生地の小麦タンパク量の実測値を100%としたときの測定値の変化を図2に実測値を表3に示した。

従来法のFASTキットは、加熱により減少し、180°Cで4 μg/gと生地の小麦タンパク量に対し0.8%まで減少し陰性判定となった。グリアジンキットは、FASTキットに比べ緩やかに減少している。これらは、タンパクの熱変性や他のタンパクとの結合により小麦タンパクが抽出液に可溶化せず、検出が困難になっているためと考えられる。

一方改良法のFASTVer. IIキットは、生地の小麦タンパク量に対し130°Cで101.1%、150°Cで87.0%と150°C付近までは大幅な減少は見られない。FASPEKキットは、130°Cで122.1%、150°Cで126.3%と逆に増加傾向にあった。

改良法の抽出液には、タンパクの可溶化のために界面活性剤のSDSと還元剤のβ-メルカプトエタノールが加わっており³⁾、それにより抽出率が改善されている。また、変性タンパクに対する抗体も加わったポリクロナール抗体用いたことも検出率を上昇させている。

3.2.2 加圧加熱による影響

図3にオートクレーブ処理前後の模擬試料Ⅲの小麦タンパク量の測定結果を示す。

従来法では、オートクレーブ処理により小麦タンパクが加熱変性し、測定値は著しく減少している。特にマッ

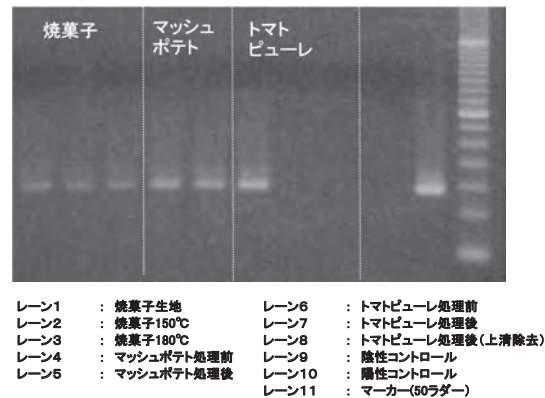


図4 定性PCRによる確認試験結果(小麦)

シュポテトで顕著であった。

一方、改良法のFASTVer. IIキットでは、マッシュポテトで処理前の小麦タンパク量の97.8%、トマトピューレで99.7%、FASPEKキットでは、マッシュポテトで95.4%、トマトピューレで109.4%と測定値は処理前後で同等であり、加圧加熱加工による影響は認められなかった。

3.3 定性PCRによる確認試験

図4に模擬試料Ⅱ、Ⅲの定性PCR(小麦)の結果を示す。焼菓子である模擬試料Ⅱでは加熱温度150°C、180°Cにおいても小麦由来DNAは確認できた。レトルト食品を想定した模擬試料Ⅲについては、マッシュポテトは小麦由来を確認できたが、トマトピューレは小麦由来DNAは確認できず、また、植物由来DNAの検出バンドも非常に薄かった。水分含有量の多い試料ではオートクレーブ処理でDNAの分解がより進んでいることがわかる。

食品衛生法の容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準では、「中心部の温度を120°Cで4分間加熱する方法またはこれと同等以上の効力を有する方法であること」となっている。

また、改良法では抽出液の改良により加熱変性タンパクが検出可能となり、容器包装詰加圧加熱殺菌食品およびレトルトパウチ製品が偽陰性リストから除かれている。

前述のように、試料によってはオートクレーブ処理でDNAが分解され目的DNAが検出できないものがあり、

表4 実態調査結果

(単位 : $\mu\text{g/g}$)

| No. | 品名 | FASPEK | | FASTVer. II | | スクリーニング試験 | 確認試験(定性PCR) | 表示 | | | 形態 |
|-----|----------------------|--------|----|-------------|----|-----------|-------------|-----|------|------------|---------|
| | | 含有量 | 判定 | 含有量 | 判定 | | | 原材料 | 注意喚起 | その他(偽陽性食品) | |
| 1 | せんべい | 13.6 | + | 0.8 | - | 陽性 | 陰性 | | あり | | |
| 2 | クッキー | 1.5 | - | ND | - | 陰性 | | | | | |
| 3 | 焼菓子 | 4.7 | - | 2.1 | - | 陰性 | | | | ひえ | |
| 4 | 焼菓子(ポーロ) | 0.7 | - | 0.7 | - | 陰性 | | | | | |
| 5 | 油菓子 | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | |
| 6 | 米菓 | 17.8 | + | ND | - | 陽性 | 陰性 | | | | |
| 7 | 清涼菓子(ラムネ) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | |
| 8 | 野菜加工品(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | 瓶詰め |
| 9 | 野菜煮物(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | 瓶詰め |
| 10 | 米飯類(チャーハンがゆ)(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | 瓶詰め |
| 11 | そうざい(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | レトルト |
| 12 | 米飯類(魚野菜がゆ)(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | レトルト |
| 13 | 米飯類(野菜がゆ)(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | フリーズドライ |
| 14 | そうざい(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | フリーズドライ |
| 15 | そうざい(ベビーフード) | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | レトルト |
| 16 | カレールウ | 5.2 | - | 5.0 | - | 陰性 | | | | オーツ麦 | |
| 17 | カレールウ | 1.8 | - | 1.7 | - | 陰性 | | | | | |
| 18 | ホワイトソースの素 | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | フリーズドライ |
| 19 | トマトケチャップ | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | |
| 20 | カレー | ND | - | ND | - | 陰性 | | | | | レトルト |
| 21 | カレー | 20 | + | 20 | + | 陽性 | | 小麦粉 | | | レトルト |

実際に原材料を使用しているにもかかわらずスクリーニング試験と確認試験が不一致の場合があると推定される。これらの加工食品では製造記録確認が非常に重要となり最終判定には十分注意が必要である。

3.4 実態調査

表4は、試買検査における流通品の実態調査結果である。原材料に小麦表示のない加工食品20件(菓子7件、ベビーフード8件、調味料等5件)、小麦表示のある加工食品1件(レトルト食品)合計21件について改良法によりスクリーニング検査を実施した。

原材料表示のない試料で小麦タンパクを定量下限値 $0.64\mu\text{g/g}$ 以上検出したものは、FASTVer. IIキットでNo. 1, 3, 4の焼菓子類とNo.16, 17のカレールウであった。一方、FASPEKキットではNo. 1, 2, 3, 4, 6の焼菓子類とNo.16, 17のカレールウであった。

No. 3, 4, 16, 17の測定値は2キット間でほぼ同様の値を示した。No. 3には、偽陽性食品である“ひえ”が、同様にNo.16には“オーツ麦”が入っており、これらによる偽陽性反応であると思われた。同様にNo. 2, 4, 17についても、FASTVer. IIキットでND~ $1.7\mu\text{g/g}$ 、FASPEKキットで $0.7\sim 1.8\mu\text{g/g}$ と低濃度であり、非特異反応であると思われた。これらは、スクリーニング結

果は陰性であり、表示と一致した。

しかし、FASPEKキットでNo. 1が $13.6\mu\text{g/g}$ 、No. 6が $17.8\mu\text{g/g}$ と判定値の $10\mu\text{g/g}$ を超過しスクリーニング陽性となり、一方、FASTVer. IIキットでは $0.8\mu\text{g/g}$ 、NDと測定値は乖離した。原材料に表示がなくスクリーニング陽性だったNo. 1のせんべいとNo. 6の米菓について定性PCRを実施した結果、小麦由来DNAは検出しなかった。

改良法の抽出液は両キットとも同一組成であり、抽出法も同様であることから抽出効率に差はない。また、前述の模擬試料による検討結果から同一検体において2つの改良法の測定値に大きな相違は認められない。

今回のNo. 1とNo. 6については、スクリーニング検査の2キット間の値が相違しており、また、定性PCRの結果が陰性であることからこれらは試料マトリックスによる偽陽性反応であると思われた。これらは米を使った焼菓子であるが、FASPEKキットでは米は偽陽性食品に含まれていない。しかし、加熱加工することにより小麦タンパクと類似の活性点ができELISA法で偽陽性反応を引き起こしたのではないかと考えられた。原材料表示のあったNo.21は両キットとも $20\mu\text{g/g}$ 以上検出し陽性判定となり、表示と一致した。

4 まとめ

- 1) 改良法は抽出効率が上がり回収率も上昇したが、FASPEKキットは混入量に対し高値になる傾向が見られた。
- 2) 改良法は、加熱による測定値の減少は少なく加熱加工品および加圧加熱加工品の分析には有効であった。
- 3) 加圧加熱食品の定性PCRによる確認試験では、加工工程におけるDNAの分解によりDNAの検出は困難となり、確認試験結果とスクリーニング結果が一致しない場合がある。
- 4) 流通品の実態調査でスクリーニング陽性だった2食品は、キット間の測定値が相違しており、確認検査の陰性結果からこれらは試料マトリックスによる偽陽性反応と思われた。その他19食品についてはスクリーニング結果と表示は一致し、表示上問題はなかった。

参考文献

- 1) 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)
- 2) 曾根美千代, 福原郁子, 佐藤信俊: 宮城県保健環境センター年報, 23, 60 (2005)
- 3) 渡邊裕子, 甲斐茂美, 三谷智雄, 横山洋司, 岸美智子: 食品衛生学雑誌, 46, 139 (2005)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“アレルギー物質を含む食品の検査法について(一部改正)”平成17年10月11日, 食安発第1011002号(2005)
- 5) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会編: 五訂増補 日本食品標準成分表