

【特集】

加工食品中の特定原材料検査（小麦）における PCR 法の検討

Examination of Allergens(Wheat) in Processed Foods by PCR Method

萩野賀世¹、松本ひろ子¹、牛山博文²、高野伊知郎¹

¹東京都健康安全研究センター多摩支所、²東京都健康安全研究センター

Kayo HAGINO¹, Hiroko MATSUMOTO¹, Hirofumi USHIYAMA², Ichirou TAKANO¹

¹Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

² Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

要旨：平成17年度および平成18年度に小麦表示のない市販の加工食品について、特定原材料（小麦）の検査を実施した。ELISA法によるスクリーニング検査では、国産品、輸入品あわせて73検体のうち、菓子等8検体から小麦タンパク質を10 µg/g以上検出した。PCR法による確認検査では、揚げ菓子、発酵食品中のDNAは熱、圧力、発酵等により大部分が損傷を受けており小麦DNAを確認できなかった。そこで、DNAの抽出法およびPCR法の改良について検討した。本法を適用したところ、高度に加工された食品中の小麦DNAを確認することができた。

キーワード： 特定原材料、小麦、酵素免疫測定法、PCR法、DNA抽出法、加工食品

Abstract: We tested of allergic substances (wheat) in a processed food on the market without the indication of having used wheat in 2005 fiscal year and 2006 fiscal year. We detected over 10µg/g of wheat protein from eight samples of 73samples in domestic products and imported products by ELISA screening method. However, on processed food, such as a fried snack, a retort-pouched food and a fermented food, DNA of ingredients in them had damaged by heat, pressure and fermentation, we couldn't detect the wheat DNA by using notified PCR method. Then, we tried to develop DNA extraction method and modified PCR method. Therefore wheat DNA in processed food was able to be detected by improved method.

Keywords : allergic substance, wheat, ELISA method, PCR method, DNA extraction method, processed food

社会的意義：近年、乳幼児から成人にいたるまで、アレルギー物質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た。これに対応し、小中学校の給食において食物アレルギー対応マニュアルが作成されるなど、食物アレルギーへの取り組みが広がっている一方で、アレルギー物質の表示欠落等による自主回収事例は後を絶たず、社会的関心は一層高まっている。これに応え、特定原材料表示の適正化を進める監視指導の科学的裏付けとして、正確な検査・判定は不可欠である。

多摩支所では、平成 15 年度から特定原材料検査 5 品目（卵・牛乳・小麦・そば・落花生）に取り組んでおり、平成 17 年度および 18 年度に、小麦表示のない市販の加工食品について、特定原材料（小麦）検査を実施した。小麦は主要な炭水化物源であり、様々な加工食品に原材料として使われ表示違反例も多い。また、乳幼児から成人まで高い頻度で発症例の報告があり、食物依存性運動誘発性アナフィラキシー（FDEIA）の要因ともなる。検査は厚生労働省通知法¹⁾、²⁾、³⁾（以下通知法と略す）に従い、スクリーニング検査として ELISA 法を、ELISA 法陽性試料の確認検査として PCR 法を用いたが、一部の食品では PCR 法による確認が困難であった。そこで PCR 検査を、実際の加工食品に適用するための検討を行ったところ若干の知見を得たので報告する。

1. はじめに

近年、乳幼児から成人にいたるまで、アレルギー物質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た。これに対応し、小中学校の給食において食物アレルギー対応マニュアルが作成されるなど、食物アレルギーへの取り組みが広がっている一方で、アレルギー物質の表示欠落等による自主回収事例は後を絶たない。

多摩支所では、平成 15 年度から特定原材料検査に取り組んでおり、平成 17 年度および 18 年度に、小麦表示のない市販の加工食品について、特定原材料（小麦）検査を実施した。小麦は主要な炭水化物源であり、様々な加工食品に原材料として使われ、表示違反例も多い。また、乳幼児から成人まで高い頻度で発症例の報告があり、食物依存性運動誘発性アナフィラキシー（FDEIA）の要因ともなる。検査は厚生労働省通知法^{1)、2)、3)}（以下通知法と略す）に従い、スクリーニング検査として ELISA 法を、ELISA 法陽性試料の確認検査として PCR 法を用いたが、一部の食品では PCR 法による確認が困難であった。そこで PCR 検査を、実際の加工食品に適用するための検討を行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験方法

(1) 試料

平成 17 年度および 18 年度に都内で市販されていた小麦表示のない各種国産加工食品 55 検体及び輸入加工食品 18 検体を試料とした。

(2) 試薬

通知法に準拠し、次の試薬を用いた。

1) スクリーニング検査（ELISA 法）

モリナガ FASPEK 小麦測定キット・グリアジン（(株) 森永生科学研究所製、以下 M 社キット）、FASTKIT™・エライザ Ver. II 小麦（日本ハム（株）製、以下 N 社キット）

2) 確認検査（PCR 法）

DNA 抽出キット：DNeasy Plant Mini Kit（通知法、QIAGEN 社製）、NucleoSpin DNA Trace（MACHREY-NAGEL 社製）

3) 電気泳動用試薬

Agilent DNA1000 試薬キット（Agilent technologies 社製）

(3) 装置および器具

ミキサー：オスターブレンダー（大阪ケミカル（株）製）、ミルサー：IFM-700G（イワタニ（株）製）、振とう機：MMS-3010（東京理化学器械（株）製）、冷却遠心分離機：7930（クボタ商事（株）製）、マイクロプレートリーダー：SUNRISE CLASSIC（TEKAN（株）製）、マイクロプレートウォッシャー：AMW-8（バイオテック（株）製）、遠心分離機：ミニスピンプラス（エッペンドルフ（株）製）分光光度計：UV-1600（島津製作所（株）製）、サーマルサイクラー：GeneAmp9700（Applied Biosystems 社製）、平板型キャピラリー電気泳動装置：Agilent2100 バイオアナライザー（Agilent technologies 社製）

(4) スクリーニング検査（ELISA 法）

通知法に従って行った。

（５）確認検査（PCR 法）

1) DNA 抽出法

通知法に従い、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN 社製）を使用した。また、DNA の含有量が明らかに少ない試料（液体試料、飴菓子、ELISA 検査で小麦タンパク質が 2~10 µg/g 未満検出されたもの等）は NucleoSpin DNA Trace（MACHREY-NAGEL 社製）を使用し DNA 抽出を行った。

2) PCR 法

通知法に従って行った。小麦 DNA の増幅がされず検出できない場合には、PCR 反応組成の合計液量は 25 µL のまま、プライマー添加量および DNA 試料液量を増減し DNA 増幅を行った。

3) 電気泳動法

通知法にあるアガロースゲル電気泳動法および平板型キャピラリー電気泳動法を用いた。

3. 結果および考察

（１）加工食品中の「小麦」の調査結果

平成 17 年度および 18 年度に検査した 73 検体のうち、ELISA 検査で小麦タンパク質を M 社キットまたは N 社キットのどちらか一方でも 2 µg/g 以上検出した 13 検体（菓子 8 検体、乾麺 3 検体、調味料 2 検体）の結果を表 1 に示した。M 社と N 社の小麦検出用 ELISA キットの検出値はどの食品でもほぼ一致した。13 検体中、ELISA 法陽性（10 µg/g 以上検出）となった検体は 8 検体で、総検体数の約 10%を占めた。

（２）DNA 抽出法の検討

表 1 で示した 13 試料を、通知法通り DNeasy Plant Mini Kit により DNA を抽出し PCR 検査を行ったところ、植物 DNA（124 bp）は検出できたが、小麦 DNA（141 bp）の検出が困難である場合があった。実際に、小麦 DNA の確認が困難であった試料を表 2 に示した。これらの試料では、高温加熱、発酵等の加工処理により、DNA が損傷を受け、大部分が断片化し、PCR 反応での小麦 DNA の増幅が不可能であったためと考えられた。また、コーンチップス、およびレトルトトマトソースは ELISA 検査での小麦タンパク質の含有量が少なく、DNA 抽出キットにより抽出された全 DNA 中の小麦 DNA 量が少なかったと考えられた。さらに、揚げ菓子等では試料中の油分が DNA 抽出率に影響を与えていることも考えられた。そこで、NucleoSpin DNA Trace を用いた DNA 抽出法について検討することとした。NucleoSpin DNA Trace は、法医学的試料（骨、血痕）等、微量 DNA 試料に適したキットであり、加温抽出に 3 時間かかるが、シリカゲル膜は 1 種類で 50 mL 遠心管にセットでき、一度に遠心分離できる液量が 8 mL と多いため、遠心分離の回数が少なく操作も簡単である。本キットを用いて再抽出した DNA 試料液は、PCR 検査に必要な DNA 濃度を十分に満たしており、各種加工食品から DNA 抽出が可能であることがわかった（表 2）。これらの DNA 試料液を用いて PCR 検査を行ったところ、いずれの試料も小麦 DNA の検出が可能であった。以後、高温加熱食品、発酵食品、および ELISA 検査の結果、小麦タンパク質が微量に検出された（2~10 µg/g 未満）試料から DNA を抽出する場合は NucleoSpin DNA Trace を用いることとした。

表1. 小麦タンパク質が検出された試料の検査結果

試料	小麦表示	スクリーニング検査 ELISA法(µg/g)			確認検査 PCR法	原産国
		M社	N社	判定		
菓子	注意喚起	++	++	陽性	+	日本
米菓子	なし	+++	+++	陽性	+	日本
大豆菓子	なし	+	+	陽性	+	日本
卵ボーロ	なし	+	9	陽性	+	日本
オニオンチップス	なし	+++	+++	陽性	+ ※	シンガポール
シュリンプチップス	なし	++	++	陽性	+ ※	タイ
揚げ米菓子	なし	+	+	陽性	+ ※	イタリア
唐辛子みそ	なし	++	++	陽性	+ ※	韓国
コーンチップス	なし	6	2	陰性	+ ※	アメリカ
トマトソース	なし	4	3	陰性	+ ※	日本
乾麺（十割そば）	注意喚起	3	3	陰性	+	日本
乾麺（雑穀）	なし	6	-	陰性	+	日本
乾麺（フォー）	なし	2	-	陰性	+	ベトナム

- : <2µg/g
 + : ≥10µg/g
 ++ : ≥100µg/g
 +++ : ≥1,000µg/g

陽性 : ≥10µg/g
 陰性 : <10µg/g

※ : 改良法により確認

表2. PCR検査が困難であった試料の原材料およびDNA抽出量

試料	原材料表示	改良法での DNA抽出 量(ng/µL)
オニオンチップス	オニオン, 植物油	40
シュリンプチップス	タピオカ粉, えび, パームオイル, にんにく, 砂糖, 食塩, こしょう	143
揚げ米菓子	米粉, トウモロコシ粉, 植物油, エキストラバージンオリブ油, ホエイ, 食塩, コーンスターチ, ブドウ糖, イーストエキス, 香辛料, 香料	25
コーンチップス	とうもろこし粉, 植物油脂	30
唐辛子みそ	唐辛子, 水飴, 食塩, ニンニク, タマネギ, イワシエキス, 酒精	32
トマトソース (レトルト)	トマト, タマネギ, トマトジュース, 植物油脂, 水飴, チーズ, 食塩, でんぷん, ガーリック, ベーコン, 牛豚エキス, ドライトマト, 香辛料, 調味料	58

（3）PCR 法の検討

アレルギー物質の確認検査としての PCR 法において、各種加工食品から抽出した DNA 試料液を用いて、小麦 DNA を増幅し検出するのは困難であることが多かった。これは、DNA 試料液が、小麦を含め多種多様な DNA の混合液であることから、PCR 検査時の小麦検出用プライマー添加量および DNA 試料液量の最適量が試料ごとに異なるためであると考えられた。そこで、PCR 反応組成の合計液量は 25 μL のまま、小麦検出用プライマー濃度を通知法の添加量 0.2 μL から 0.5 μL （最終濃度 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ）に変更し、DNA 試料液量を 0.5~4 μL の間で 0.5 μL ずつ増減し、数種類の反応組成で PCR 検査を行ったところ、小麦 DNA を検出することが可能となった。そこで以後は、小麦検出用プライマー添加量 0.2 μL で PCR 検査を行い、小麦 DNA が検出できなかった場合には、プライマー添加量を 0.5 μL に変更し、DNA 試料液量を増減し再度 PCR 検査を実施することとした。

（4）電気泳動法

通知法に従い、PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色、紫外線を照射、ポラロイド撮影した場合、PCR 増幅した小麦 DNA バンド（141 bp）の発色が弱く、結果の判定が難しいことが多くあった。そこで、電気泳動法の感度向上について検討した。平板型キャピラリー電気泳動装置は、レーザー蛍光検出を原理とし、専用チップを用い、データをデジタル化して取り込み、エレクトロフェログラムイメージおよびゲルイメージとして見るができる。また、DNA 検出限界は 0.1 ng/ μL 、分解能は ± 5 bp と感度が高く、PCR 産物の小麦 DNA バンドを検出することができた。以後は本装置を用いることとした。以上の検討結果をもとに、PCR 法で小麦 DNA の検出が困難であった 6 試料を NucleoSpin DNA Trace で DNA 抽出し、プライマー濃度 0.5 $\mu\text{mol/L}$ で PCR 検査を行い、Agilent2100 バイオアナライザーを用いて電気泳動したところ、いずれの試料からも小麦 DNA を検出することができた。その中の 4 試料の結果を図 1 に示した。

4. まとめ

（1）特定原材料（小麦）の確認検査 PCR 法についての検討

1) 小麦 DNA の検出が困難であった、高温加熱食品、発酵食品等、高度に加工されている食品から、NucleoSpin Trace キットを用いることにより、試料中の損傷を受けている DNA のうち、残存している断片化していない微量の小麦 DNA を検出することが可能となった。

2) PCR 反応組成のうち、小麦検出用プライマー添加量を 0.5 μL （最終濃度 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ）に変更し、DNA 試料液量を増減させ PCR 検査することにより、微量の小麦 DNA の良好な検出が可能になった。

3) PCR 反応産物の確認を平板型キャピラリー電気泳動装置を用いて行うことにより、小麦 DNA の感度良い検出・確認が可能となった。

各々の食品中の原材料の種類、比率に応じて DNA 抽出キットを変更し、PCR 反応組成中のプライマー量および DNA 試料液量を変えるなどの工夫によって、加工食品中の微量の小麦 DNA を抽出し PCR 反応において増幅させることが可能となった。

（2）平成 17・18 年度の市販加工食品中の特定原材料（小麦）の実態調査結果

小麦表示のない食品 73 検体中 8 検体が ELISA 法で小麦陽性（10 $\mu\text{g/g}$ 以上）であった。

特に輸入加工食品は 18 検体中 3 検体が陽性であり高い陽性率であった。小麦陽性であった 8

検体のうち 5 検体からは、ELISA 検査で多量（100 $\mu\text{g/g}$ 以上）の小麦タンパク質が検出された。ELISA 法で小麦タンパク質が 2 $\mu\text{g/g}$ 以上検出された 13 検体中 6 検体については改良した PCR 法により小麦 DNA を確認できた。

今回の調査で、小麦に対して食物アレルギー症状を持つ消費者にとって健康被害をおよぼす可能性のある製品が市場に出回っていることが明らかになった。これらの食品の排除および表示の適正化を進める一助として、引き続き市販製品の特定原材料検査が必要であると考えられる。

本報文は、東京都健康安全研究センター研究年報第 59 号（2008）に掲載された論文の一部に一部加筆・修正したものである。

参考資料：

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方法について”平成14年11月6日、食発第1106001号、2002
2. 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方法について（一部改正）”平成17年10月11日、食安発第1011002号、2005
3. 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方法について（一部改正）”平成18年6月22日、食安発第0622003号、2006