

ネステッド PCR を用いたアレルギー対応食品中の 特定原材料(小麦)の検出について

三浦泉, 川崎加奈子, 津田元彦*¹, 藤原美智子, 立野幸治

*1 現 宇部健康福祉センター

Detection of Wheat as an Allergenic Substance In Confectionery by Nested PCR Method

Izumi Miura, Kanako Kawasaki, Motohiko Tuda, Michiko Fujiwara, Kouji Tachino

緒言

食品衛生法が平成13年から改正され小麦, そば, 卵, 乳, 落花生の5品目が特定原材料として表示が義務づけられ, さらに, 平成20年6月にはエビ, カニが追加された。また, 特定原材料の検査法は, 平成21年6月に一部改正として通知された試験法(通知法)により検査が行われている。通知法では2種類の ELISA キットを用いてスクリーニング検査を実施し, どちらか一方が陽性(10 μ g/g)となった場合に PCR 法(通知法 PCR)により, 確認検査を実施することになっている¹⁾。

一方, 最近の食の安心・安全の関心の高さから特定原材料を除去した「アレルギー患者向け」と銘打った食品が増加しており, ケーキやクッキーなどは小麦の代用品として米粉や澱粉を使用した製品がある。しかし, 専用の製造ラインを使用せず特定原材料を使用している食品と同一製造ラインで不十分な洗浄状態のまま製造するなど, その表示と乖離している事も考えられる。アレルギー対応食品は, 実際に疾患を持つ人が購入しており, 特定原材料陽性の判断基準はスクリーニング検査(ELISA 法)で 10 μ g/g 以上となっているが数 μ g/g で発症する可能性もある。

今回アレルギー対応食品群の検査を行った際に特定原材料不使用と表示された加工食品の一部から「小麦」が最大で 5 μ g/g 程度検出されたが, 確認検査の通知法¹⁾PCR では検出が困難であった。通知法 PCR は, 小麦の加工食品の実態調査の際に, 容器包装詰

加圧加熱殺菌食品(加圧加熱食品)で, スクリーニング検査陽性にもかかわらず, 通知法 PCR で感度低下のため小麦陰性となる事例が報告されている²⁾。

本事例も小麦の通知法 PCR の感度低下が疑われたために, 連続した2回の PCR により, 検出感度, 特異性の向上を高めたネステッド PCR 法を用い良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1 試料

アレルギー対応食品として, 2種類のアレルギー患者向け米粉クッキー, マドレーヌ, ケーキをモデル加工食品として, 米粉, 澱粉を使用しクッキーを作成後, 小麦を 5 μ g/g 添加したもの。(表1)

2 試薬および試液

2.1 ELISA 法

森永生化学研究所 FASPEK 小麦グリアジンキットおよび日本ハム(株)製 FASTKIT ver. II を用いた。

2.2 DNA 抽出

DNA の抽出には, CTAB 法(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)法を用いた。CTAB には, シグマ社製, 0.5mM EDTA (pH8.0), 1M Tris-塩酸 (pH8.0) 及び NaCl には, 和光純薬社製を用いた。

2.3 通知法 PCR ならびにネステッド PCR 反応

表1 検査製品一覧

検体名	アレルギー対応の有無	特定原材料の有無	注意喚起表示
クッキー	A	24品目不使用	表示無し
クッキー	B		
ケーキ	C		
マドレーヌ	D		
モデル加工食品(0 μ g/g)	E	小麦粉の代用品として米粉、澱粉を使用	特定原材料を使用している製造ラインと同一表記
モデル加工食品(5 μ g/g)	F		
クッキー(対照品)	G	—	—

植物 DNA 検出用プライマー対および小麦検出用プライマー対はファスマック(株)社製, 陽性対象コントロールはオリエンタル酵母(株)製を用いた.

通知法 PCR 反応には Ampli Taq Gold & 10 \times PCR buffer II/MgCl₂ with dNTPs (アプライドバイシステムズ社製)を用いた. ネステッド PCR 反応には Ampli Taq Gold & 10 \times PCR buffer II/MgCl₂ with dNTPs と Fast Start High Fidelity PCR System (Roche・diagnostica 社製)を用いた. 100bp DNA Ladder, loading Buffer はタカラバイオ社製, エチジウムブロミドはアルドリッチ社製を使用した. TE 緩衝液, TBE 緩衝液はナカライテスク社製を用いた.

2.4 通知法 PCR 条件

PCR 反応液は最終濃度が1 \times PCR 緩衝液, 0.2 μ mol/L プライマー Wtr01-5' (5'-CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3') および WTR10-3' (5'-TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3') ならびに CP03-5' (5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3') および CP03-3' (5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3') 0.2 μ mol/L dNTP, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.625U Taq polymerase となるように混合し, 20 ng/ μ l に希釈調整した DNA 溶液を 2.5 μ l 加え, 滅菌水により全量を 25 μ l とした. 試液を混和後, 95 $^{\circ}$ C 10 分保持, 95 $^{\circ}$ C 30 秒間, 60 $^{\circ}$ C 30 秒間, 72 $^{\circ}$ C 30 秒間を1サイクルとして, 40 サイクルの増幅反応を行った後, 72 $^{\circ}$ C 7

分間最終伸張反応を行った.

2.5 ネステッド PCR 条件

1st PCR は通知法 PCR と同一条件で行い, 橋本³⁾らの方法を改変し 2nd PCR の際に 1st PCR の反応液を TE 緩衝液で 200 倍に希釈したものを鋳型 DNA として 2.5 μ l を使用した. PCR 反応液は最終濃度が1 \times PCR 緩衝液, 0.4 μ mol/L のプライマー, 0.2mmol/L dNTP, 1.8mmol/L MgCl₂, 1.25U Taq polymerase となるように混合し全量が 25 μ l となるように滅菌水で調整した. ネステッド PCR 用プライマー対としては, Wtr01NE 2-5' (5'-TGG TGG TTG GAA TGG TTT TAG A-3') および Wtr10NE5-3' (5'-GGC ACG CGC GGA TTG TAT ATG T-3') を用いた.

2.6 電気泳動

AgaroseLE ゲル (Roche・diagnostica 社製) を用い, 泳動バッファーには, 通知法 PCR は 1 \times TBE 緩衝液, ネステッド PCR 法は 0.5 \times TBE 緩衝液を用いた.

3. 装置及び器具

ミルサー: LM-2 (LAB CAT 社製), 冷却遠心機: 3740 (久保田製作所社製), 振とう機: SR-2S (TAITEKK 社製), 恒温槽: ALB-21 (IWAKI 社製) マイクロチューブ遠心機: centrifuge5415D (Eppendorf 社製), 分光光度計: V-550 (JASCO 社製), サーマルサイクラー: Gene Amp PCR System 9700 (アプライドバイシステムズ社製), 電気泳動装置: Mupido EX (Advance 社製), ゲルイメージ解析装置: AE-6933FXCF-U (アトー(株)社製) を用

いた。

4. 結果および考察

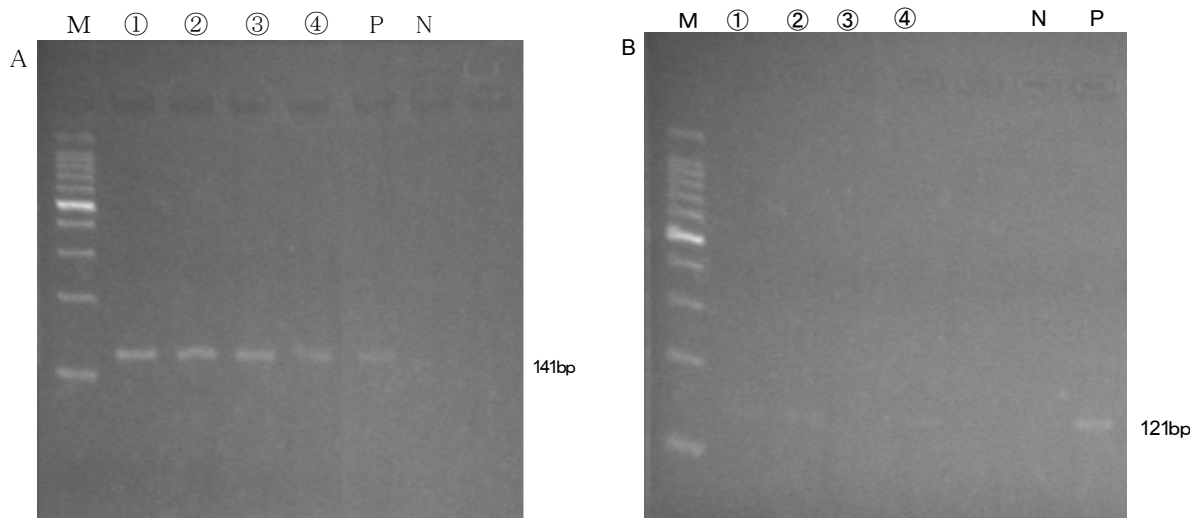
4.1 特定原材料(小麦)定量結果

アレルギー患者向け食品のうち注意喚起表示がない製品①, ②は特定原材料の陽性判断基準である 10 $\mu\text{g/g}$ 以下であったが, 通知法に基づく2種類の ELISA でそれぞれ 4.8~5.0 $\mu\text{g/g}$, 0.68~0.79 $\mu\text{g/g}$ 検出され, 注意喚起表示がある製品③, ④はそれぞれ 1.0~1.4 $\mu\text{g/g}$, 0.97~0.28 $\mu\text{g/g}$ 検出された。また, モデル加工食品は, 概ね添加量の測定値が得られた(表2)。ELISA のうち FASPEK は米に対してロット間に交差反応がわずかな程度あることが判明していたが, FASTKIT では交差性が < 1.0 $\mu\text{g/g}$ のため①, ③に小麦の混入が疑われた。厚生労働省の通知によると, やむを得ない微量の混入に関しては, 「特定原材料を含む製品の製造を行っている」旨の注

し, 「アレルギー対応」と表示された食品であり, 一般の

表 2 検査製品の ELISA 定量結果

製品名	検体名	ELISA ($\mu\text{g/g}$)	
		FASPEK	FASTKIT
クッキー	A	5.0	4.8
クッキー	B	0.68	0.79
ケーキ	C	1.0	1.4
マドレーヌ	D	0.97	0.28
モデル加工食品 (0 $\mu\text{g/g}$)	E	<0.31	<0.31
モデル加工食品 (5 $\mu\text{g/g}$)	F	4.1	3.9
小麦クッキー (対照品)	G	>10	>10



A:植物由来, B:小麦由来

①クッキー ②クッキー ③ケーキ ④マドレーヌ M: DNA 分子量マーカー, P: ポジティブコントロール, N: ネガティブコントロール

図 1 アレルギー対応食品の通知法確認検査

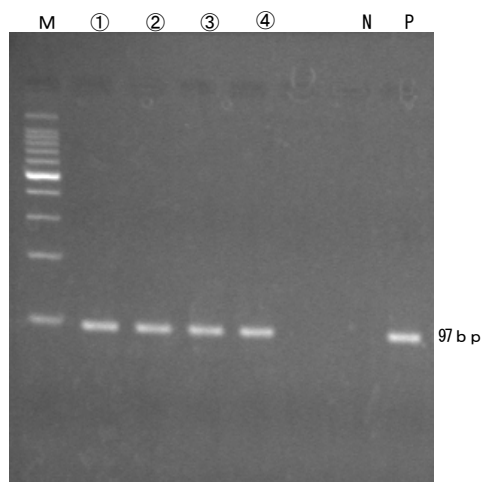
意喚起表示が認められている。

①, ②を製造している事業所は, 通常のケーキ等も製造しており, 専用の製造ラインを設けているわけではないため, 小麦を除去したアレルギー患者対応ケーキの小麦は非意図的の混入である可能性が高かった。しか

食品表示より厳密な表示等が必要だと考えられた。

4.2 DNA 抽出及び通知法, ネステッド PCR

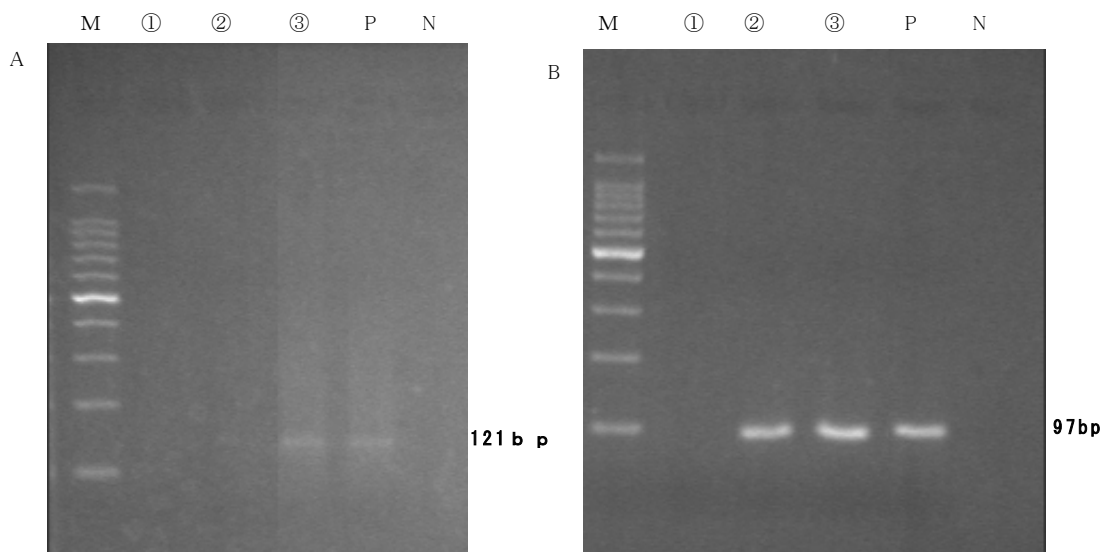
特定原材料不用品, モデル加工食品及び小麦クッキーは概ね良好な抽出結果であった。PCR 法では通知法の植物検出用プライマーを用いて PCR を実施した



①クッキー ②クッキー ③ケーキ ④マドレーヌ
M: DNA 分子量マーカー, P: ポジティブコントロール
N: ネガティブコントロール

図 2 アレルギー対応食品の小麦ネステッド PCR

が確認できた(図 2). 通知法 PCR の反応性は, 加圧加熱加工食品や米粉などでは小麦が 10 $\mu\text{g/g}$ 以上存在しているにもかかわらず通知法の PCR 法では増幅バンドが得られないことがあることも報告^{4), 5)}されており, 米粉, デンプンを使用したモデル加工食品を作成し検証を行った. 小麦が検出された最大量を基準とし 5 $\mu\text{g/g}$ 添加した群は通知法 PCR を用いて明瞭な増幅バンドが確認できなかったが, ネステッド PCR を行うと確認ができた. 今回のアレルギー患者向け食品ならびにモデル加工食品はデンプン等多糖類をかなり用いており, 加圧加熱加工食品や米粉の事例と同様に PCR 反応が阻害された可能性が考えられた. 加工度が高い食品などは DNA が断片化しやすい状態, または多糖類, 油などの阻害物質により反応性が低下



A:通知法 PCR B: ネステッド PCR

①0 $\mu\text{g/g}$ 添加群 ②5 $\mu\text{g/g}$ 添加群 ③クッキー M: DNA 分子量マーカー, P: ポジティブコントロール, N: ネガティブコントロール

図 3 モデル加工食品の通知法 PCR とネステッド PCR

ところ明瞭な増幅バンドが得られた. しかし, 小麦検出用プライマーではいずれのサンプルとも増幅バンドが薄く判断が困難であった(図1). ネステッド PCR を行うと明瞭な増幅バンドが得られ, 小麦が混入していること

するため通知法 PCR では確認検査が困難になるが, ネステッド PCR を利用することにより高度に低分子化した加工品や多糖類の存在下でも小麦 DNA 検出に有効な方法である可能性が示唆された. ネステッド PCR

は遺伝子組換え大豆の検出などにも使われる高感度な方法⁶⁾であるためにクロスコンタミネーションやプライマー設計の際のアーティファクトおよびコントロールに注意する必要があると考えられる。

まとめ

アレルギー対応食品で小麦を 5 μ g/g 検出した製品は非意図的混入であったが、「アレルギー対応」と称する製品は厳密な注意喚起表示等の必要性が考えられた。

感度低下を引き起こす状態や物質の存在下でも、小麦の通知法 PCR を利用しネステッド PCR を使用することで検出が可能になる。

5 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21年7月24日,食安発第0724第1号
- 2) 橋本博之,真壁祐樹,長谷川康行,佐二木順子,永田和子,宮本文夫:食物アレルギーを誘発する特定原材料(小麦)の検査法に関する検討,54,53-57,2005
- 3) 橋本博之,真壁祐樹,長谷川康行,佐二木順子,宮本文夫:ネステッドPCR法を用いた食品中の特定原材料(小麦)の検出,食品衛生学雑誌,49,23-30
- 4) 曾根美千代,手代木俊彦,柳田則明:アレルギー物質(小麦)を含む食品の検知法について,宮城県保健環境センター年報,24,67-71,2006
- 5) 肥前昌一郎,林原亜紀,福崎睦美:食品中の特定原材料小麦実態調査およびPCR法における小麦の検出限界,福岡市保健環境研究所報,32,81-84,2006
- 6) Fábio Cristiano Angonesi Broda, Cibele dos Santos Ferraria, Luciana Lehmkuhl Valentea and Ana Carolina Maisonnave Arisi: Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk.

LWT-Food Science and Technology, 40,
748-751,2007