

市販乾麺における非意図的そばタンパク混入について - ELISAによる測定 -

扇谷陽子 坪井 弘 大川一美 藤田晃三

要 旨

市販食品における食物アレルギー物質の非意図的混入の把握を目的として、アレルギーとしてそば、食品として乾麺を選択し、そばタンパク質量の調査を実施した。アレルギー検査のための厚生労働省通知に示されたELISAで、2004年11～12月に市内販売店で購入した、包装の原材料にそばの表示がなく、そば製品と製造の施設または設備を共有する旨表記がある乾麺(13社26製品)中のそばタンパク質量を検査した。その結果、3社7製品から、通知で陽性の判断基準とされている10 μ g/g以上のそばタンパク質を検出した。これらのうち2005年6月にロットの異なる製品が入手可能であった5製品を検査した結果、3社3製品から10 μ g/g以上の、そばタンパク質を検出した。

1. 緒 言

食物アレルギーによる健康被害の発生を防止する観点から、2001年4月に食品衛生法関連法令が改正され、発症数や重篤度から表示する必要性の高い5品目(小麦、そば、卵、乳及び落花生)を原材料とする加工食品に、これを含む旨の表示をすることが義務付けられた。そして、この表示の適切性を判断する検査方法が、2002年11月に厚生労働省より通知¹⁾された。

表示が義務付けられた食品のうち、そばのアレルギーは症例数は卵・牛乳に比較して少ないものの、重篤となり、致命的な状況に陥ることがある²⁾。そこで、そばアレルギーを有する人にとって、原因食品の喫食回避は重要である。製造上の問題等によりコンタミネーションが発生した場合には、表示義務の範囲外であり、任意の注意喚起の表記(同一施設でそばを含む製品を製造している等)があれば喫食を回避できるが、ない場合は回避でき

ず、含有量によっては発症する可能性がある。そこで、札幌市内で販売されている製造上コンタミネーションの可能性が考えられるそば製品と製造の施設または設備を共有して製造された乾麺中のそばタンパク質量を把握することを目的として、包装に上記施設または設備の共有の旨の表記のある乾麺を用い、通知¹⁾に示された2種類のELISAキットを用いてそばタンパク質量を測定したので、概要を報告する。

2. 材料と方法

2-1 試 料

試料は、2004年11月～12月および平成17年6月に札幌市内販売店で購入した原材料表示にそばがなく、同一施設でそばを含有する製品を製造している旨の表記のある6社(製造又は販売)12製品および同一ラインで製造の旨の表記のある7社(製造又は販売)14製品の乾麺を用いた。

2-2 試 薬

(1) 株式会社森永生科学研究所製「モリナガ

そば 測定キット」(以下Mキットと略) :

- a. 抗体固相化モジュール
- b. 凍結乾燥そば標準品(64ng/vial)
- c. 酵素(ペルオキシダーゼ)標識抗そば抗体溶液
- d. 酵素基質溶液(TMB溶液)
- e. 反応停止液(1N H₂SO₄)
- f. 検体希釈液(20倍濃縮液)
- g. 濃縮洗浄液(20倍濃縮液)

(2) 日本ハム株式会社製「FASTKIT エライザ
そば」(以下Nキットと略) :

- a. 抗体固相化プレート
- b. 標準溶液(1,000ng/ml)
- c. 希釈用緩衝液
- d. ビオチン結合抗体
- e. 酵素(アルカリフォスファターゼ)-アビジン
結合物
- f. 発色剤(pNPP)
- g. 濃縮抽出用緩衝液(10倍濃縮液)
- h. 反応停止液(1N NaOH)
- i. 濃縮洗浄液(10倍濃縮液)

2-3 装 置

- (1) マイクロプレートリーダー : (株)テカン製
サンライズ リモート
- (2) 遠心分離機 : (株)久保田製作所製 3700型
- (3) プレート洗浄機 : パイオテック(株)製 ELx50
- (4) ブレンダー : 大阪ケミカル(株)オスターブレンダー
-ST-1

2-4 測定方法

そばタンパク質量の測定は通知の方法¹⁾に準じた。

すなわち、試料一包装を粉碎均質化し、2.0gを採取し、それぞれのキットの抽出用溶液(Mキット:検体希釈液、Nキット:抽出用緩衝液)38mlを加え、ブレンダーで刃の回転数約12,000/分で1分間抽出後、pH測定で中性を確認し、同様に2分間抽出後、4で3,000×g、20分間遠心し、上清を濾紙で濾過し抽出液を得た。Mキットにおいては、これを検体希釈液で20倍に希釈し、図1に示すとおり測定した。Nキット

においては、これを希釈用緩衝液で10倍に希釈し、図2に示すとおり測定した。標準品および試料は3-1および3-2の測定内変動は8重測定、その他は3重測定し、4係数logistic解析により得られた標準曲線から算出したタンパク質量の平均値を測定値とした。

wellに標準溶液または試料溶液を100 μl添加
常温 1時間静置
300 μl/wellの洗浄液で6回洗浄し、酵素標
識抗そば抗体溶液を100 μl/well添加
常温 30分間静置
300 μl/wellの洗浄液で6回洗浄し、酵素基
質溶液を100 μl/well添加
常温遮光下 10分間静置
反応停止液を100 μl/well添加

主波長450、副波長620nmで吸光度測定

図 1 Mキットにおける測定方法

wellに標準溶液または試料溶液を100 μl添加
常温 1時間静置
300 μl/wellの洗浄液で5回洗浄し、ビオチン
結合抗体を100 μl/well添加
常温 1時間静置
300 μl/wellの洗浄液で5回洗浄し、酵素
アビジン結合物を100 μl/well添加
常温 30分間静置
300 μl/wellの洗浄液で5回洗浄し、発色剤
を100 μl/well添加
常温遮光下 20分間静置
反応停止液を100 μl/well添加

主波長405、副波長620nmで吸光度測定

図 2 Nキットにおける測定方法

3. 結 果

3-1 標準曲線および標準物質の再現性

キット添付の標準溶液を、各キットに指定された濃度に希釈して8重測定することにより、それぞれの濃度の再現性を調べた。結果は、表1・2に示すとおりで、1.0ng/mlからそれぞれの最高濃度まで相対標準偏差 (relative standard deviation, 以下 RSD と略)4%以下の良好な再現性であった。また、標準曲線は図3に示すとおりであった。

表 1 Mキットにおける標準物質の再現性 (n = 8)

濃度 (ng/ml)	吸光度 (mean±SD)	RSD (%)
0	0.008±0.001	9.4
1.0	0.047±0.001	2.8
2.0	0.087±0.002	2.7
4.0	0.165±0.003	1.8
8.0	0.307±0.006	1.9
16	0.548±0.014	2.6
32	0.883±0.025	2.8
64	1.277±0.013	1.1

表 2 Nキットにおける標準物質の再現性 (n = 8)

濃度 (ng/ml)	吸光度 (mean±SD)	RSD (%)
0	0.130±0.002	1.4
1.0	0.149±0.004	2.5
2.5	0.180±0.003	1.7
5.0	0.244±0.001	0.5
10	0.358±0.009	2.6
25	0.686±0.024	3.4
50	1.175±0.031	2.6
100	1.858±0.066	3.6

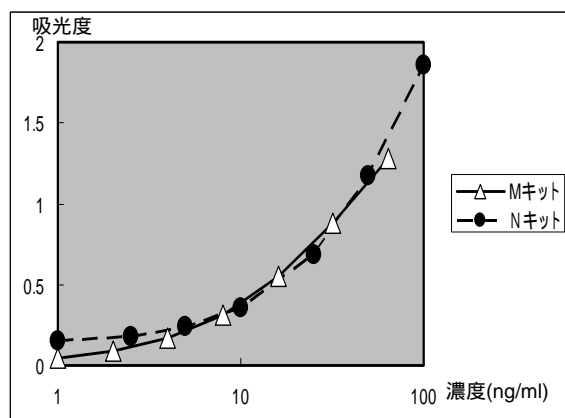


図 3 標準曲線

3-2 試料における再現性

そばタンパク質が検出される2種類の乾麺を試料とし、測定用に希釈した溶液を8重測定することにより測定内の再現性を調べた。結果は表3に示すとおりであった。

また、これらについて抽出と測定を3回繰り返し、測定間の再現性を調べた。結果は表4に示すとおりであった。

表 3 測定内の再現性 (n = 8)

キット	食品名	mean±SD (µg/g)	RSD (%)
M	A	2.8±0.1	2.9
	B	10.0±0.3	2.6
N	A	6.0±0.2	3.2
	I	16.8±0.9	5.2

表 4 測定間の再現性 (n = 3)

キット	食品名	mean±SD (µg/g)	RSD (%)
M	A	2.7±0.7	24.7
	B	10.7±2.4	22.5
N	A	6.2±0.2	3.2
	I	14.6±1.7	11.5

3-3 添加回収試験

乾麺由来の成分の測定への影響を調べるため、そばタンパク質が検出されない乾麺 (表示に記載のある原材料: 小麦粉・大豆・食塩) を試料とし、測定用に希釈した溶液に標準溶液を添加して測定し、回収率を調べた。結果は表 5 に示すとおり 87%以上であった。

表 5 添加回収試験 (n=3)

キット	添加量 (ng/ml)	測定値 mean±SD (ng/ml)	回収率 (%)
M	6.4	6.3±0.2	98.4
	12.8	12.4±0.9	96.9
N	10.0	8.7±0.6	87.0
	50.0	46.0±4.4	92.0

3-4 希釈試験

それぞれのキットの測定用に希釈した試料を、各キットの希釈に用いる溶液で2倍と4倍に希釈して測定した。結果は図4に示すとおりで、希釈倍率と濃度は、ほぼ原点を通る直線関係であった。

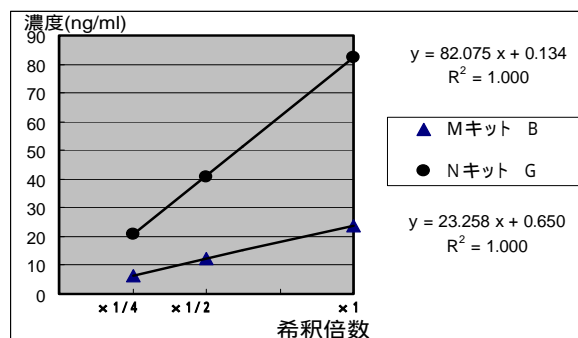


図 4 希 釈 試 験

3-5 同一施設又はラインでそばを含む製品を製造している旨表記のある乾麺の検査

包装に同一施設でそば製品を製造の旨表記のある乾麺12製品および同一ラインで製造の旨表記のある14製品について、M・Nキットでそばタンパク質を測定した。検査はできる限り異なる製造者の製品を検査することが望ましいと考えたが、店頭で入手可能な注意喚起の表記のある製品数に限りがあり、一部は同一製造者の製品を使用した。測定の結果、検出された製品は表6(3回の結果は全て異なるアッセイの測定による)に示すとおりで、いずれのキットにおいても4社9製品からそばタンパク質を検出した。Mキット(定量下限:2.0 μg/g)で、通知¹⁾において混入の可能性がある(陽性)と判断する10 μg/g以上であったのは4製品で全て同一製造者の製品であった。Nキット(定量下限:2.0 μg /g)で10 μg/g以上であったのは7製品で、5製品が同一製造者で、残り2製品はそれぞれ異なる製造者であった。検出された製品については、同一ロット別包装品で検査を実施したが、結果は同様であった。10 μg/g以上であった製品については、通知¹⁾のPCR法で陽性を確認し、結果を施設を管轄する地方公共団体へ連絡した。

表 6 乾麺中のそばタンパク質量 (n=3)

食品名	Mキット		Nキット		表示
	Mean±SD (μg/g)	RSD (%)	Mean±SD (μg/g)	RSD (%)	
A	2.7±0.7	24.7	6.2±0.2	3.2	1
B	10.7±2.4	22.5	19.9±1.5	7.5	1
C	24.7±4.8	19.5	53.7±3.2	6.0	1
D	81.1±10.4	12.9	159.8±11.6	7.3	1
E	15.4±3.8	24.7	32.4±7.1	21.8	1
F	5.5±1.4	25.6	9.0±1.7	19.4	1
G	8.3±2.3	28.2	16.9±0.8	4.7	1
H	6.7±1.3	19.6	13.3±1.3	10.0	1
I	6.8±0.8	12.2	14.6±1.7	11.5	2

表示1:同一ラインでそばを含む食品を製造の旨の表記有
表示2:同一施設でそばを含む食品を製造の旨の表記有

3-6 3-5において検出された製品の異なるロット品の検査

3-5において検出された製品の異なるロット品の検査を、2005年6月に市内販売店で入手可能であった5製品(2製品について2ロット)について実施した。結果は表7に示すとおりで、3製品は購入時期・ロットの異なる製品においても10 μg/g以上検出した。10 μg/g以上であった製品については、通知¹⁾のPCR法で陽性を確認し、施設を管轄する地方公共団体へ連絡した。

表 7 乾麺(異なるロット品)中のそばタンパク質量 (8.0μg/g以上:n=3, 8.0μg/g未満:n=1)

食品名	Mキット		Nキット		表示
	Mean±SD (μg/g)	RSD (%)	Mean±SD (μg/g)	RSD (%)	
A2	<2.0	-	<2.0	-	1
E2	27.1±0.4	1.6	44.9±1.3	2.9	1
E3	7.2	-	13.0±0.4	3.2	1
F2	2.7	-	5.0	-	1
H2	26.2±1.7	6.5	49.2±1.3	2.5	1
H3	49.8±2.7	5.4	100.1±2.1	2.1	1
I2	11.8±1.6	13.7	20.0±0.3	1.4	2

表示1:同一ラインでそばを含む食品を製造の旨の表記有
表示2:同一施設でそばを含む食品を製造の旨の表記有

4. 考 察

札幌市内で販売されている食品での食物アレルギーとなる物質の意図しない混入について把握することを目的として、アレルギーとしてそば、食品として乾麺を選択し、そばタンパク質量の調査を実施した。調査を実施するにあたって、これに用いる食品は、タンパク質の加熱変性による測定系への影響³⁾を考慮し、製造時の加熱が比較的緩和と推測される乾麺に限定した。

3-1~4の測定の基礎的検討の結果、測定の再現性・添加回収試験の結果は概ね良好で、乾麺を測定する際、測定上支障のある問題はないと考えられた。また、希釈試験の結果、希釈倍率と濃度がほぼ原点を通る直線関係であったため、濃度が検量線の範囲を外れる試料については希釈して測定することとした。

3-5・6の調査において、そば製品と製造の施設・設備を共有しており、かつ注意喚起がある13社26製品の検査をした結果、3社7製品から10 μ g/g以上そばタンパク質を検出、このうち3社3製品は購入時期・ロットの異なる製品においても10 μ g/g以上検出した。また、Nキットの結果において2社2製品で100 μ g/g以上の量を検出した。従って、そば製品と製造の施設・設備を共有する場合には、今回検出した程度のコンタミネーションが起こる可能性があるかと判断された。

前述のとおり、同一施設等でそば製品を製造していることについての表記はあくまで任意であり、表記のない製品では、製造の施設・設備がそばを含む製品と共有していることの有無を判別できない。また、購入者にとっては、施設・設備を共有

し、かつ注意喚起の表記をしていない製品が、コンタミネーションがないよう十分に管理されていることについて把握することは困難である。こういった状況から、そばにアレルギーを有する人を特に対象とした乾麺については、包装上の表記から製造の施設・設備がそばを含む製品と共有していることの有無を判別できるようにすることが、健康被害の発生を防止する上で望ましいと考えられた。

5. 結 語

市販食品における食物アレルギー物質の非意図的混入の把握を目的として、アレルギーとしてそば、食品として乾麺を選択し、そばタンパク質量の調査を実施した。その結果、そば製品と製造の施設・設備を共有することが表記された乾麺の27%から10 μ g/g以上のそばタンパク質を検出した。

今後対象を変えた同様な調査が実施され、食物にアレルギーを有する人の健康被害の発生防止対策が、より進展することを期待したい。

6. 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方法について、平成14年11月6日食発第1106001号。
- 2) 今井孝成，海老澤元宏：わが国の食物アレルギーの原因抗原．小児科診療，67(7),1056-1060,2004．
- 3) 松本ひろ子，萩野賀世，坂牧成恵，他：加工食品中の特定原材料（そば）の分析．東京都健康安全研究センター年報，55,127-132,2004．

Inadvertent contamination of Dry Noodles on the Market with Buckwheat protein ; Measurement using ELISA

Yoko Ogiya, Hiroshi Tuboi, Kazumi Okawa and Kozo Fujita

Dry noodles on the market could be inadvertently contaminated by undeclared buckwheat protein during a manufacturing process. We determined the level of buckwheat allergen in dry noodles sold in Sapporo using ELISA recommended as Japanese official method. In November and December, 2004, we purchased 26 dry noodles produced by 13 manufacturers, whose packages indicated that no buckwheat as ingredient but indicated that they used the same facilities with buckwheat products for their processing. The amounts of buckwheat proteins were more than $10\mu\text{g g}^{-1}$ official contamination level in seven dry noodles from three manufacturers. In June, 2005, we also purchased five other products of the different lots, and repeated the measurement. Three products contained the contamination levels of buckwheat protein.