

市販粉類における非意図的小麦タンパク混入について (ELISAによる測定)

扇谷陽子 酒井昌昭 宮下妙子 矢野公一

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、アレルギーとして小麦、食品として粉類を選択し、小麦タンパク質量の調査を実施した。平成18年3～6月に市内販売店で購入した、包装の原材料に小麦の表示がなく、小麦製品と製造の施設または設備を共有する旨の注意喚起の表記のない粉類(20社30製品)中の小麦タンパク質量を、アレルギー検査のための厚生労働省通知に示されたELISAで測定した。その結果、5社5製品から、厚生労働省通知で陽性の判断基準とされている10 μ g/g以上の小麦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、平成13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。これに伴い、アレルギー物質を含む食品の検査方法が、平成14年11月に厚生労働省より通知¹⁾された。

粉類は、その性質上空中に舞いやすいため、製造時にコンタミネーションが発生する可能性がある。市販されている粉類では小麦を原料とする製品の割合が高いが、小麦を原料としない粉類において、同一施設で小麦を含有する製品を製造している等の注意喚起の表記のある製品が少ない。そこで、コンタミネーションとしての含有状況を把握することを目的として、札幌市内で販売されている原材料表示に小麦がなく、同一施設で小麦を含有する製品を製造している旨の注意喚起の表記のない粉類を用い、通知¹⁾に示された2種類のELISAキットを用いて小麦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、平成18年3月～6月に札幌市内販売店で購入した、20社(製造又は販売)30製品の粉類を用いた。これらは、主な種類が表1に示すとおりで、原材料表示に小麦がなく、同一施設で小麦を含有する製品を製造している旨の注意喚起の表記のない製品である。

表 1 調査に用いた粉類の種類

種 類	数 量
コーンスターチ	5
そば粉	4
馬鈴薯でんぷん	4
くず粉	4
米粉	4
白玉粉	3
きなこ	3
わらびもち粉	3

2-2 試 薬

(1) 株式会社森永生科学研究所製「モリナガ

FASPEK 小麦 測定キット(グリアジン)」

(以下Mキットと略) :

- a. 抗体固相化モジュール
- b. 小麦標準品(50ng/ml)
- c. 酵素(ペルオキシダーゼ)標識抗グリアジン抗体溶液
- 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)
- h. 抽出用A液(20倍濃縮液)
- i. 抽出用B液(20倍濃縮液)
- k. 検体抽出液 : 検体希釈液、抽出用A液、抽出用B液、精製水を1:1:1:17の比率で混合
- L. 検体希釈液 : 検体希釈液を精製水で20倍に希釈
- M. 検体希釈液 : 検体抽出液を検体希釈液で20倍に希釈(標準溶液調整用)

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

- a. 抗体固相化プレート
- b. 標準溶液(50ng/ml)
- c. 希釈用緩衝液
- d. ビオチン結合抗体(希釈用緩衝液で100倍希釈)
- e. 酵素(ペルオキシダーゼ)-ストレプトアビジン結合物(希釈用緩衝液で100倍希釈)
- f. 発色剤(TMB)
- g. 抽出用試液 (20倍濃縮液)
- h. 抽出用試液 (20倍濃縮液)
- i. 抽出用試液 (20倍濃縮液)
- j. 反応停止液(0.5N H₂SO₄)
- k. 濃縮洗浄液(10倍濃縮液)
- L. 検体抽出液 : 抽出用試液、抽出用試薬、抽出用試液、精製水を1:1:1:17の比率で混合
- M. 標準品希釈液 : 検体抽出液を希釈用緩衝液で20倍に希釈

(3) PCR用試薬 :

PCR用試薬は以下のものを用いた。Genomic-tip 20/G・Genomic DNA Buffer Set(G2・QBT・QC・QF緩衝液)・DNeasy plant Mini kit・Proteinase K・RNase A(QIAGEN社製)、L03「TAKARA」・100bpラダー(3407A)[宝酒造(株)製]、Ampli Taq Gold™ DNA Polymerase・PCR Buffer・dNTP・MgCl₂溶液[アプライドバイオシステムズ(株)製]、エタノール(残留農薬用)・塩酸(特級)・酢酸(特級)・2-プロパノール(特級)・トリスヒドロキシメチルアミノメタン(生化学用)・SDS(生化学用)[和光純薬工業(株)製]、0.5mol/L EDTA(pH8.0 遺伝子工学用)・1mol/L Tris-HCl (pH8.0)・TE緩衝液[10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)・1mmol/L EDTA(pH8.0)]・10mg/ml EtBr溶液[(株)ニッポンジーン製]・アミラーゼ(シグマ社製)

TAE 緩衝液は、トリスヒドロキシメチルアミノメタン 242g、酢酸 57.1ml、0.5mol/l EDTA 100ml に精製水を加えて溶かし、1l にメスアップ後、50倍に希釈して使用した。

(4) PCR用プライマー

プライマーは以下の配列の 25 μM 溶液を用いた。植物 DNA 検出用(増幅サイズ 124bp)

CP03-5':5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'

CP03-3':5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3'

小麦検出用(増幅サイズ 141bp)

Wrt01-5':5'-CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3'

Wrt10-3':5'-TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3'

2-3 装置

- (1) ブレンダー : (株)レッチェ製 GRINDOMIX GM 200
- (2) プレート振とう機 : 東京理化学器械(株) MULTI SHAKER MMS
- (3) 遠心分離機 : (株)久保田製作所製 3700型
- (4) プレート洗浄機 : バイオテック(株)製 ELx50
- (5) 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
- (6) 遠心濃縮装置 : エッペンドルフ(株)製 遠心濃縮機 5301

- (7)微量分光光度計：アマシャムファルマシアバイオテック(株)製 GeneQuant pro
- (8)ウォーターバス：タイトック(株)製ウォーターバスシェイカー パーソナル11
- (9)PCR装置(定性)：アプライドバイオシステムズ(株)製 Gene Amp PCR System 9700
- (10)電気泳動装置：コスモバイオ(株)製 Mupid
- (11)画像解析装置：東洋紡績(株)製 FAS- システム

2-4 測定方法

(1)ELISA

小麦タンパク質量の測定は通知¹⁾の方法に準じた。すなわち、試料一包装を粉碎均質化した後、1.0 g を採取し、検体抽出液19mlを加えて混合後、振とう機で、室温で12時間以上、振とう回数90～110往復/分で振とう抽出した。抽出液のpHが中性であることを確認後、室温で3,000×g、20分間遠心し、上清を別の容器に分取した。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20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、標準物質の再現性の検討は6ウェルを、試料におけるの測定内の再現性の検討は8ウェルを、その他は3ウェルを使用して測定を行い、4係数logistic解析により得られた標準曲線からタンパク質量を算出し、その平均値を測定値とした。

ウェルに標準溶液または試料溶液を100 μl添加
 室温 1時間静置
 300 μl/ウェルの洗浄液で6回洗浄し、酵素標識抗グリアジン抗体溶液を100 μl/ウェル添加
 室温 30分間静置
 300 μl/ウェルの洗浄液で6回洗浄し、酵素基質溶液を100 μl/ウェル添加
 室温遮光下 10分間静置
 反応停止液を100 μl/ウェル添加
 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

ウェルに標準溶液または試料溶液を100 μl添加
 室温 1時間静置
 300 μl/ウェルの洗浄液で5回洗浄し、ビオチン結合抗体溶液を100 μl/ウェル添加
 室温 1時間静置
 300 μl/ウェルの洗浄液で5回洗浄し、酵素アビジン結合物溶液を100 μl/ウェル添加
 室温 30分間静置
 300 μl/ウェルの洗浄液で5回洗浄し、発色剤を100 μl/ウェル添加
 室温遮光下 20分間静置
 反応停止液を100 μl/ウェル添加
 主波長450、副波長620nmで吸光度測定

図 2 Nキットにおける測定方法

(2)PCR(いずれかのキットで2 μg/g以上であった製品の定性による確認検査)

ELISA用に粉碎した試料2gを採取して、DNAの抽出を行った。抽出は、通知¹⁾に記載されているQIAGEN Genomic-tip 20/G 及びQIAGEN DNeasy plant Mini kitによる方法に準じ、各試料について、それぞれの抽出用キットで、2試料ずつ抽出した。抽出後の溶液は、TE緩衝液で20ng/μlに希釈した。

PCR反応溶液は、総量25 μlで、組成は1×PCR buffer・200 μmol/L dNTPs・1.5mmol/L MgCl₂・0.5 μmol/L F/Rプライマー・0.625 units AmpliTaq Gold™ DNA polymerase・抽出DNA(いずれかのキットで10 μg/g以上であった製品:50ng、検出されたが10 μg/g未満の製品:250ng)とした。

PCR条件は、ELISAの結果が、いずれかのキットで10 μg/g以上であった製品は、95 °Cで10分間保持後、熱変性を95 °Cで30秒間、アニーリングを65 °Cで30秒間、延長反応を72 °Cで30秒間行い、これを1サイクルとして40サイクル増幅反応を行った後、72 °Cで10分間保持とした。検出されたが10 μg/g未満の製品については、アニーリング温度を、橋本らの報告²⁾に

よる57.1 にするとともに、増幅反応を45サイクルとする点を変更した条件とした。

PCR後のサンプルは、エチジウムブロマイドを添加した3%アガロースゲルで電気泳動を行い、UV照射下で増幅されたDNAを観察し、目的とするDNAの検知について判断した。

3. 結果

3-1 標準物質の再現性および標準曲線

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測定し(n=6)、それぞれの濃度の再現性を調べた。結果は、表2・3に示すとおりで、0.78ng/mlから最高濃度の50.0ng/mlまで相対標準偏差(relative standard deviation、以下RSDと略)9%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 2 Mキットにおける標準物質の再現性 (n=6)

濃度 (ng/ml)	吸光度 (mean±SD)	RSD (%)
0	0.011±0.004	34.2
0.78	0.052±0.005	8.8
1.56	0.091±0.003	3.4
3.13	0.172±0.003	1.5
6.25	0.328±0.015	4.4
12.5	0.564±0.014	2.4
25	0.890±0.015	1.7
50	1.346±0.010	0.8

表 3 Nキットにおける標準物質の再現性 (n=6)

濃度 (ng/ml)	吸光度 (mean±SD)	RSD (%)
0	0.109±0.004	3.6
0.78	0.135±0.006	4.6
1.56	0.166±0.007	4.1
3.13	0.230±0.004	1.9
6.25	0.346±0.005	1.4
12.5	0.559±0.008	1.5
25	0.921±0.025	2.7
50	1.573±0.022	1.4

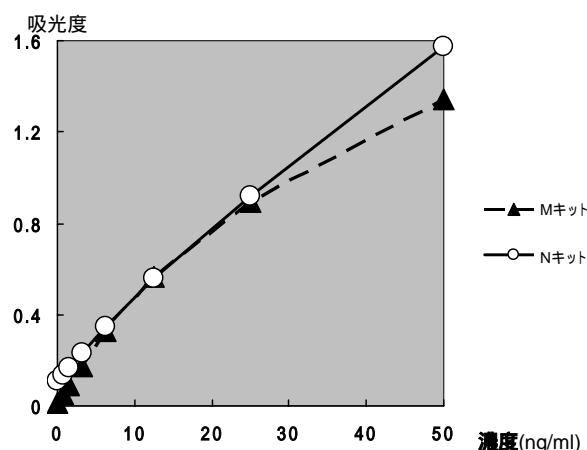


図 3 標準曲線

3-2 試料における再現性

小麦タンパク質が検出される各2種類の粉類を試料とし、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4に示すとおりであった。

また、これらについて測定を3回繰り返し、測定間の再現性を調べた。結果は表5に示すとおりであった。

表 4 測定内の再現性 (n=8)

キット	食品名	mean±SD (µg/g)	RSD (%)
M	a	5.3±0.1	2.3
	b	15.5±0.5	3.1
N	c	6.4±0.3	4.6
	d	15.2±0.8	5.0

表 5 測定間の再現性 (n=3)

キット	食品名	mean±SD (µg/g)	RSD (%)
M	a	4.8±0.4	8.3
	b	13.8±1.6	11.9
N	c	6.4±0.2	2.9
	d	12.8±1.2	9.6

3-3 添加回収試験

食品成分の測定への影響を調べるため、小麦タンパク質が検出されない粉類を試料とし、測定用に希釈した溶液に標準溶液を添加後測定し、回収率を調

べた。結果は表6に示すとおり74%以上であった。

表6 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	5.0	4.5±0.0	90.0
	10.0	8.4±0.6	84.0
N	5.0	3.8±0.1	76.0
	10.0	7.4±0.3	74.0

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、各キットの希釈用溶液で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。

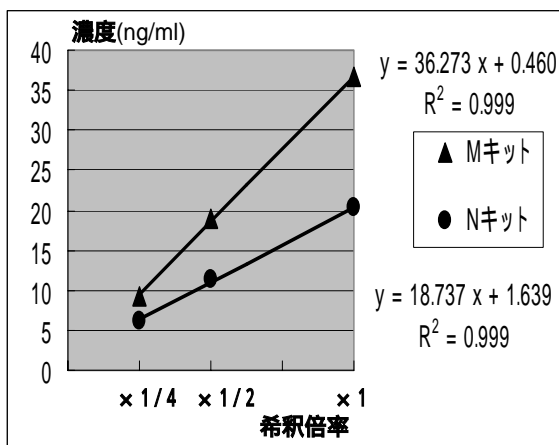


図4 希釈試験

3-5 市販粉類の検査

包装の原材料表示に小麦がなく、かつ同一施設で小麦を含有する製品を製造している旨の注意喚起の表記のない20社30製品の粉類について、M・Nキットで小麦タンパク質量を測定した。この結果、小麦タンパク質を検出した製品は表7に示すとおりで、Mキット(定量下限:2.0 µg/g)において9社10製品、Nキット(定量下限:2.0 µg/g)において9社9製品から検出した。Mキットで、通知¹⁾において混入の可能性のある(陽性)と判断する10 µg/g以上であったのは、5社5製品であった。Nキットで10 µg/g

以上であったのは4社4製品であった。希釈試験の結果、4倍までの希釈において希釈直線性を認めた(図4)が、今回の調査で、標準曲線の範囲を超えた食品Hは、50倍希釈しても、標準曲線の範囲を超えたため、数値として示さなかった。それぞれの製品の種類及び原材料は表8に示すとおりであった。

なお、M・Nいずれかのキットで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。

また、検出されたが、10 µg/g未満の製品については、方法に示す条件でPCRを行い、全て陽性を確認した。

表7 粉類中の小麦タンパク質量

食品名	Mキット		Nキット	
	Mean±SD (µg/g)	RSD (%)	Mean±SD (µg/g)	RSD (%)
A	13.0±1.4	10.7	8.4±0.6	7.2
B	12.5±0.6	4.7	16.3±1.1	6.7
C	10.2±1.0	9.8	12.1±1.1	9.1
D	6.6	-	5.5	-
E	2.5	-	<2.0	-
F	7.1	-	5.6	-
G	<2.0	-	3.1	-
H	>20.0	-	>20.0	-
I	5.7	-	3.0	-
J	13.5±1.7	12.5	11.6±0.5	4.0
K	3.0	-	<2.0	-

(8.0 µg/g以上:n=3, 8.0 µg/g未満:n=1)

表8 検出食品の種類と原材料

食品名	種類	原材料
A	白玉粉	もち米
B	そば粉	そば
C	そば粉	そば
D	そば粉	そば
E	米粉	もち米
F	米粉	うるち米
G	そば粉	そば
H	米粉	もち米・うるち米
I	米粉	もち米・うるち米
J	きな粉	大豆
K	白玉粉	もち米・澱粉

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、アレルギーとして小麦、食品として粉類を選択し、小麦タンパク質量の調査を実施した。

標準物質および試料の再現性・添加回収試験・希釈試験の測定の基礎的検討の結果は概ね良好で、粉類を測定する際、測定上支障となる問題はないと考えられた。

市販粉類の調査において、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。検査の結果、20社30製品のうち、M・Nいずれかのキットで小麦タンパク質が検出されたのは、10社11製品(37%)、通知において陽性と判断される10 μ g/g以上検出されたのは5社5製品(17%)と、注意喚起の表記のない製品から高い割合で小麦タンパク質が検出された(表7)。今回調査した8種類の粉類(表1)のうち、小麦タンパク質が検出されたのは、製造方法が穀粒の粉砕を主体とするそば粉や米粉等の粉類に集中し、そば粉及び米粉は、検査を行った各4製品全てで、M・Nいずれかのキットで小麦タンパク質が検出された(表8)。粉体は空中に舞いやすい性質を有することから、このような製造方法の粉類においては、今回検出した程度のコンタミネーションが発生する可能性があると考えられた。

粉類は、さらに加工されて喫食される場合が多い食品であることから、同一施設で小麦を含有す

る製品を製造している旨の注意喚起の表記の実施は、これを用いて製造される食品へのアレルギー物質に関しての情報提供となる。小麦のアレルギーは、運動誘発性のアナフィラキシーといった重篤な症状を呈することもあることから、患者が表示により喫食を避けることができるよう、注意喚起の表記が望まれる。

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、アレルギーとして小麦、食品として粉類を選択し、小麦タンパク質量の調査を実施した。その結果、原材料の表記に小麦がなく、小麦製品と製造の施設・設備を共有する旨の注意喚起の表記がない粉類の17%から、M・Nいずれかのキットで10 μ g/g以上の小麦タンパク質が検出された。

今後対象を変えた同様な調査を実施し、食物にアレルギーを有する人の健康被害の発生の防止対策が、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。
(改正 平成17年10月11日 食安発第1011002号)
(最終改正 平成18年6月22日 食安発第0622003号)
- 2) 橋本博之，眞壁祐樹，永田知子：特定原材料検査に関する定性PCR法の検討，第42回全国衛生化学技術協議会年会講演集，128-129，2005

Inadvertent Contamination of Grain Powders on the Market with Wheat Protein ; Measurement using ELISA

Yoko Ogiya, Masaaki Sakai, Taeko Miyasuta and Koichi Yano

Grain powders on the market could be inadvertently contaminated by undeclared wheat protein during the manufacturing process. We determined the levels of wheat protein in grain powders on the market in Sapporo using ELISA recommended as official methods in Japan. In March and June, 2006, we purchased 30 grain powders produced by 20 manufacturers. The levels of those packages indicated neither wheat as a ingredient nor processing wheat in the same facilities. The amounts of wheat proteins were more than official contamination level (10 μ g /g) in 5 grain powders from 5 manufacturers.