

# 加熱加工食品における特定原材料（小麦）の遺伝子検査法の検討

宮崎悦子・川崎恵・牟田朱美・宮本道彦

福岡市保健環境研究所保健科学課

## Study of the Detection Method for the Allergic substance Wheat in heat processed food by PCR method

Etsuko MIYAZAKI, Megumi KAWASAKI, Akemi MUTA and Michihiko MIYAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

### 要約

加熱加工食品においては、特定原材料（小麦）の検査でスクリーニング検査である ELISA 法で陽性と判定されたにもかかわらず、確認試験の PCR 法では陰性と判定される事例が報告されており、本市においても同様の事例があった。そこで、小麦粉添加米粉クッキーを調製して PCR 法を行い、小麦遺伝子の検出に対する加熱の影響を検討した。その結果、焼成温度が上昇するほど抽出 DNA の収量が減少し、陽性と判定される割合が低下した。その原因の一つとして加熱による DNA の分解又は断片化と推察されたため、PCR 試行回数を増やす手法と鋳型 DNA を 2 倍にする手法を検討した。確認試験で陰性と判定された実試料 2 検体を、PCR 法を再度 5 併行で実施した結果、いずれも 40%（5 回中 2 回）が陽性と判定された。同様に、鋳型 DNA を 2 倍にした場合も陽性と判定された。従って、PCR の試行回数を増やす、或いは鋳型 DNA 量を 2 倍にする手法が、正確な検査結果を出すための簡便かつ有効な手段であることが示唆された。

**Key Words** : 特定原材料 allergic substance 小麦 wheat, 加熱加工食品 heat processed food  
ポリメラーゼ連鎖反応 PCR, エライザ ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

### 1 はじめに

消費者庁次長通知<sup>1) 2)</sup>に基づく特定原材料（小麦）の検査では、2種類の ELISA キットを用いるスクリーニング検査で両方又はいずれか一方で小麦タンパク質が 10 $\mu$ g/g 以上が検出された場合、陽性と判定される。スクリーニング検査で陽性となり、製造記録の確認を行い小麦の使用実態がない場合は、PCR 法による確認検査が行われる。具体的には、植物遺伝子と小麦遺伝子を検知する PCR を行うこととなっている。

本市において、ELISA によるスクリーニング検査で陽性となった加熱加工食品（焼菓子）が PCR による確認検査で陰性となる事例があった。この事例では、製造所内で常時小麦粉を大量に使用しており、コンタミネーションが強く疑われたため、小麦を含む旨の表示の指導を行った。しかし、効果的な行政指導のためには、確認試験でも確実に陽性となる検査を実施する必要がある。加熱加工食品においては同様の事例が知られており、特に焼成等加工段階が進んだ場合は、PCR の鋳型 DNA 量を増

減したり、プライマー量を増減したりすると増幅が認められるという報告がある<sup>3)</sup>。

そこで、今回、小麦粉を添加した米粉クッキーを調製し、通知に基づき ELISA 法及び PCR 法を行い、焼成温度による小麦タンパク質及び遺伝子の挙動を調査する実験を行った。また PCR 法について検討を行い、若干の知見を得たので結果を報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 試料

小麦を使用していないことを確認した米粉（共立食品製「米の粉」）、バター、上白糖、卵、小麦粉（日清製粉製薄力小麦粉「フラワー」）。

平成 27~28 年度に市内で製造され、スクリーニング検査で陽性と判定されたが、確認試験の PCR 法で陰性と判定された焼菓子 2 検体。

## 2.2 試薬

ELISA には、森永生科学研究所製 FASPEKII 小麦（グリアジン）（以下「M キット」と略す）、日本ハム(株)製 FASTKIT エライザ Ver.III小麦（以下「N キット」と略す）を用いた。水は超純水を、DNA の抽出にはキアゲン社製 Genomic Tip 20/G を、緩衝液はキアゲン社製 Genomic DNA Buffer Set 付属のものを、 $\alpha$ -アミラーゼはシグマ社製、ProteinaseK はキアゲン社製を用いた。PCR には既報<sup>4)</sup>の試薬を用いた。

## 2.3 装置

フードプロセッサー：ナショナル社製 MK-K48, 型 (11.2 cm×13.3 cm)、マッフル炉：アドバンテック東洋社製 KM-420、マイクロプレートリーダー BioRad 社製 MODEL680、マイクロプレートウォッシャー BioRad 社製 MODEL1575、恒温槽：イワキ社製 ALB-22、アステック社製 BI-525、振とう器：ヤマト社製 BW201、冷却遠心機：久保田製作所製 KUBOTA3700, 6200 分光光度計：Thermo Scientific 社製 NanoDrop ND-1000、サーマルサイクラー：BioRad 社製 iCycler E-gel, invitrogen 社製 E-gel4%agarose, ゲル撮影装置 UVP 社製 BioDoc-It System

## 2.4 試料の調製

米粉クッキー：バター25g, 砂糖 20g, 卵黄 15g で調製した卵液 60g に、米粉 40g, 小麦粉 10mg を少量の水で懸濁した液を加え、よく混合し、型に入れ、5mm の厚さで 9 分割した。蒸しパン等の加熱温度である 100℃を対照とし、一般的なクッキーの焼成温度である 180℃, 200℃, 220℃の条件下でいずれも 20 分焼成した。焼成後冷却し、フードプロセッサーを用いて全量を粉砕したものを試料とした。この米粉クッキーには小麦粉 100 $\mu$ g/g, 小麦タンパク質として約 10 $\mu$ g/g を含む。

焼菓子 2 検体は、それぞれ 1 包装を全量粉砕、均一化したものを試料とした。

## 2.5 試料の分析

小麦タンパク質の分析は、試料 1g を 2 つのキットを用いた ELISA により行った。小麦遺伝子の分析は、まず、試料 2g からイオン交換膜タイプのキットで抽出した DNA 溶液を 100 $\mu$ L とし、DNA 溶液の 230nm（糖類）、260nm（DNA）及び 280nm（タンパク質）の吸光度を測定した。260nm の吸光度(A260)から DNA 濃度を求めた。また、DNA とタンパク質との吸光度比 (A260/A280) 及び DNA と糖類との吸光度比 (A260/A230) から純度を評価した。次に 20ng/ $\mu$ L となるように調製した DNA 溶液を、植物検知用プライマー対及び小麦検知用プライマー

対を用いた PCR に供した。陽性対照には、小麦粉から同様に抽出した DNA 溶液を用いた。鑄型 DNA 量を 2 倍にするときは、DNA 溶液濃度を 40ng/ $\mu$ L に調整し、同様に操作を行った。PCR 産物は 4%アガロースゲル電気泳動し、ゲル撮影装置にて検出した。

## 3 実験結果及び考察

### 3.1 ELISA 法（小麦タンパク質）

ELISA の結果、米粉クッキーからは、N キットが 10～11 $\mu$ g/g, M キットが 8 $\mu$ g/g の小麦タンパク質が検出され、いずれも通知法の判定基準では陽性となった。検出された小麦タンパク質の量は推定される量に概ね合致しており、2 つのキット間での定量値の差は、キットが標的とするタンパク質が異なるためであると考えられた。つまり、ELISA の結果、100℃～220℃の焼成条件では定量値に影響がないことがわかった（表 1）。

表 1 米粉クッキーの ELISA 結果

	焼成温度			
	100℃	180℃	200℃	220℃
Nキット( $\mu$ g/g)	11	10	10	11
Mキット( $\mu$ g/g)	8.1	7.8	8.2	8.2
判定	陽性	陽性	陽性	陽性

### 3.2 DNA 抽出

米粉クッキーから DNA を抽出した結果、全体的に収量が少なく、100, 180, 200, 220℃と焼成温度が上昇するほど、収量が 22, 12, 8.4, 6.8 $\mu$ g と減少する傾向が認められた（図 1, 表 2）。

抽出 DNA の純度は、DNA とタンパク質との吸光度比 A260/A280 は 1.4～1.8 であり、高純度とされる 1.8 より低値を示したものもあったが、PCR にほぼ適しているとされる 1.2 以上を満たしていた。それに対し、DNA と糖類の吸光度比 A260/A230 は 0.45～0.80 であり、高純度とされる 1.8 を大きく下回っており、糖類の除去が不十分な傾向が認められた。その理由の一つとして、この米粉クッキーが重量比 20%の大量の砂糖を含んでいるためであることが推測された。今後、DNA 抽出においては、PCR 阻害物質除去カラムを使用するなど<sup>5), 6)</sup> 様々な加工食品の特性に合わせた精製方法の検討の余地があると考えられた（表 2）。

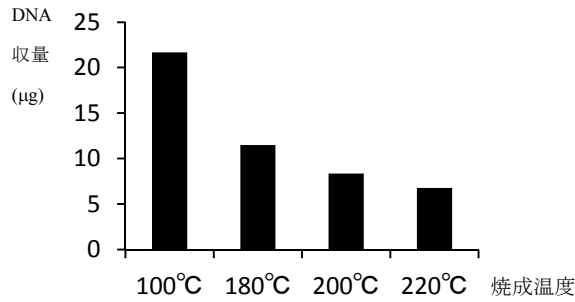


図1 米粉クッキーから抽出した DNA の収量

表2 米粉クッキーから抽出した DNA の収量と純度

	焼成温度			
	100°C	180°C	200°C	220°C
DNA量(μg)	21.7	11.5	8.4	6.8
A260	4.33	2.30	1.67	1.35
A280	2.71	1.28	1.03	0.98
A260/A280	1.6	1.8	1.6	1.4
A230/A260	0.67	0.80	0.66	0.45

### 3.3 PCR 及び電気泳動

3.2で抽出した DNA を用いて、焼成温度により陽性となる割合に差が出るののかの確認を目的とし、植物検知用プライマー対及び小麦検知用プライマー対を用いた PCR 及び電気泳動を各 25 回試行した。その結果、植物検知の増幅バンドは 100%検出されたが、小麦検知のバンドが検出されない現象が認められ、焼成温度が上昇するごとに、陽性と判定される割合は 88, 84, 84, 60%と低下した(表3)。この理由として、加熱により DNA の分解又は断片化が生じ、抽出された DNA 量が減少するだけでなく、鋳型となり得るに十分な長さの小麦 DNA 量が減少することが原因であると推察された。

そこで、PCR 法において分解又は断片化されていない小麦 DNA 量を増加させることを目的として、鋳型 DNA 量を通知法の 20ng/μL の 2 倍の 40 ng/μL となるよう調製して検討を行った。対象は米粉クッキー中で 60%と最も陽性率の低かった 220°Cの米粉クッキーとし、PCR を 10 回試行した。その結果、小麦検知のバンドは 100%検出され、陽性と判定された割合は 100%と上昇した。

通知法では、DNA 抽出については 2 併行で実施するように記載されているが、抽出した DNA での PCR の試行回数には記載がなく、通常 1 回の PCR で判定を行っている。米粉クッキーと同様の加熱加工食品の場合、陽性率を考慮すると PCR を 5 回程度試行する手法や、鋳型 DNA 量を 2 倍とする手法などの改良を加えることで、陽性と判定される確率が上昇するものと推察された。

表3 米粉クッキーの PCR 検討結果

	焼成温度				
	100°C	180°C	200°C	220°C	220°C
DNA濃度(ng/μL)	20	20	20	20	40
植物検知 (+)	25/25	25/25	25/25	25/25	10/10
小麦検知 (+)	22/25	21/25	21/25	15/25	10/10
陽性率 (%)	88	84	84	60	100

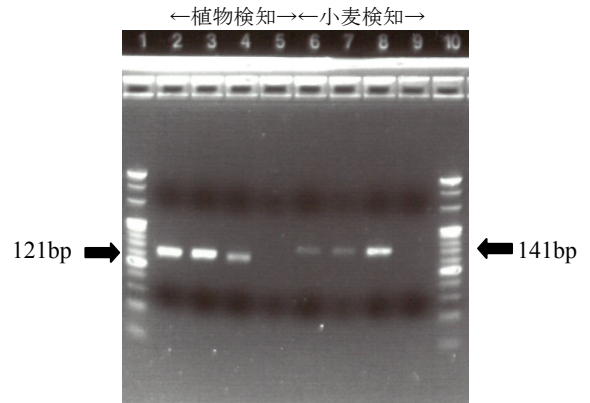


図2 植物及び小麦検知用 PCR 産物の電気泳動パターン  
 レーン 1,10: 20bp Ladder Marker,2,3,6,7: 米粉クッキーDNA,  
 4,8: 陽性対照 (小麦粉 DNA) 5,9: 陰性対照

### 3.4 実試料での検討

ELISA 法で陽性と判定されたにもかかわらず、確認試験の PCR 法では陰性と判定された実試料(チーズクッキー、ビスコッティ)について、PCR 法の試行回数を増加させる手法及び鋳型 DNA 量を 2 倍にする手法による検討を行った。

まず、それぞれ PCR 法で 5 併行の検査を実施した結果、いずれも 2 回陽性となり、陽性率は 40%であった(表4)。

チーズクッキーの焼成条件は、上段 188°C, 下段 180°Cのオープンで約 16 分であり、180°Cの米粉クッキーとほぼ同じ焼成温度と時間であった。米粉クッキーと比較して陽性率は低かったが、その原因としては焼成温度と時間以外の可能性が示唆された。一方、ビスコッティは焼成条件が 180°C20 分、さらに 150°C30 分の合計 50 分焼成したものであり、180°Cの米粉クッキーと比較して陽性率が低かった。米粉クッキーより焼成時間が長いことが陽性率の低下の原因の一つであるものと推察された。

次に、実試料の鋳型 DNA 量を 2 倍にしてそれぞれ PCR を行ったところ、いずれも陽性となった。

これらの結果から、実試料においても陽性率の低下現象が認められ、その原因の一つは焼成によるものと推察された。また、実試料において PCR を 5 回程度試行する

手法又は鋳型 DNA 量を 2 倍にする手法で陽性となることがわかった。

表 4 実試料の PCR 結果 (n=5)

品名	チーズクッキー	ビスコッティ
焼成温度時間	上180°C/下188°C 16分	180°C20分 →150°C30分
植物検知 (+)	5/5	5/5
小麦検知 (+)	2/5	2/5
陽性率 (%)	40	40

#### 4 まとめ

加熱加工食品の特定原材料（小麦）の検査において、スクリーニング検査（ELISA 法）で陽性と判定されたにもかかわらず、確認試験（PCR 法）では陰性と判定される事例があった。そこで、100～220°Cの焼成条件で調製した小麦粉添加米粉クッキーを用いた検討を行った。その結果、ELISA 法では焼成温度によらず全ての検体で陽性と判定された。一方、PCR 法においては、焼成温度が上昇するほど抽出 DNA 収量が減少し、陽性と判定される割合が低下した。これは、焼成による DNA の分解又は断片化が生じて PCR の鋳型となり得る小麦 DNA が減少していることが一因であると推察された。そこで、PCR を複数回試行する手法や、PCR の鋳型 DNA 量を通知法の 2 倍にする手法は、陽性判定される確率を上昇させることがわかった。また、今後、DNA 抽出において、加工食品の特性に合わせた精製方法には検討の余地があるものと考えられた。

確認試験で陰性と判定された実試料における検討で

は、焼成が原因と推察される陽性率の低下現象が認められたが、PCR を複数回試行する手法や鋳型 DNA 量を 2 倍にする手法により陽性と判定される確率が上昇するこ用いた PCR 法で確認試験を実施することが重要であるが、小麦遺伝子を検出できない場合には、これらの簡便な手法を組み合わせることで、正確な検査結果を出すための有効な手段であることが示唆された。

#### 謝辞

この検討を行うにあたり、ご協力いただきました福岡市中央区保健福祉センター衛生課に深謝します。

#### 文献

- 1) 消費者庁次長通知 消食表第 139 号, 食品表示基準について, 平成 27 年 3 月 30 日
- 2) 消費者庁次長通知 消食表第 169 号「食品表示基準について」の一部改正について, 平成 29 年 3 月 28 日
- 3) 萩野賀世ほか: 加工食品中の特定原材料（小麦）における PCR 法の検討, 化学生物総合管理第 6 巻第 1 号, 2010.3
- 4) 肥前昌一郎ほか: 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 32,2006
- 5) 石本聖ほか: アレルギー物質を原材料として含む加工食品からの DNA 検出法に関する検討, 石川県保健環境センター研究報告書 50, 2013
- 6) 福井優子ほか: アレルギー物質を原材料として含む加工食品からの DNA 検出法に関する検討 (第 2 報), 石川県保健環境センター研究報告書 52, 2015