

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

肥前昌一郎・林原亜樹・福崎睦美

福岡市保健環境研究所環境科学部門

Survey of Allergic Substance Wheat in Foods and Detection Limit of Wheat on PCR method

Shoichiro HIZEN, Aki HAYASHIBARA and Mutsumi FUKUZAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

乾麺そばおよび粉製品中に混入した特定原材料小麦の実態調査を行った。乾麺そばに検出量に違いはあるものの小麦粉使用表示があるものだけでなく、注意喚起表示の検体からも小麦たんぱく質を検出した。粉製品は 16 検体中 5 検体が ELISA 法で陽性であった。陽性を示したそば粉は PCR 法でも陽性だったが、大麦粉は PCR 法では陰性であり、ELISA 法での偽陽性が疑われた。また、米粉は小麦 DNA の抽出ができず測定が不能であった。

各 DNA 抽出法で PCR 法における小麦粉の検出限界について比較したところ、イオン交換樹脂タイプキットでの抽出が最も良好な結果を示し、CTAB 法はバンドの確認が困難であった。

Key Words : 特定原材料 allergic substances, 小麦 wheat, 酵素免疫測定法 ELISA method, ポリメラーゼ連鎖反応 PCR, DNA 抽出法 DNA extraction method

は じ め に

近年、食物の摂取により引き起こされる食品アレルギー患者の数は増加傾向にある。日本では昭和 63 年札幌の学校給食におけるアレルギーの死亡事故をきっかけに、表示による情報提供の必要性が高まり、平成 13 年 4 月に食品衛生法が改正され、アレルギー発症例の多い乳、卵、小麦とアナフィラキシーショックを起こす可能性が高く症状が重篤なそば、落花生を特定原材料と定め、翌年 4 月から本格的に表示が義務づけられた。

また、その試験法については平成 14 年 11 月に通知され、

スクリーニング検査として ELISA 法が、卵、乳の確認試験としてウェスタンブロット法、小麦、そば、落花生の確認試験として PCR 法が示された¹⁾。

本所では平成 15 年度から特定原材料の検査を行い、いくつかの違反事例を確認した(表 1)。今回、これら特定原材料 5 品目のうち流通量も多く、粉体として利用され相互汚染の起こりやすい小麦に注目し、乾麺そばや菓子などの原材料として使用される粉製品に混入する小麦についての実態調査を行った。さらに小麦の確認試験である PCR 法における DNA 抽出法の比較検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

表1 福岡市における特定原材料違反事例(平成15～18年度)

食品名	食品分類	特定原材料
ベーコン	食肉製品	卵
純そば粉	穀類加工品	小麦
そば	穀類加工品	小麦
そば粉	穀類加工品	小麦
そば粉	穀類加工品	小麦
そば粉	穀類加工品	小麦
ミックス粉	穀類加工品	小麦
乾そば	穀類加工品	小麦
メンチカツ	そうざい半製品	卵
ミンチ天	魚肉練り製品	卵
ちくわ	魚肉練り製品	卵

実験方法

ELISA 法，PCR 法ともに平成 17 年 10 月 11 日厚生労働省通知食安基発第 1011002 号「アレルギー物質を含む食品の検査法について(一部改正)」²⁾に準じた。

1. 試料

実態調査では市内流通品の乾麺および粉製品などを調査試料とした。DNA 抽出法の比較検討では日清製粉(株)製の日清フラワー薄力粉を試料とした。

2. 試薬

1) ELISA 法

森永生科学研究所製 FASPEK 小麦グリアジンキット(以下 M キット)および日本ハム(株)製 FASTKIT ver. 小麦キット(以下 N キット)を用いた。水は超純水を用いた。

2) PCR 法

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)製を，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。

PCR 緩衝液，dNTP，MgCl₂ および Taq DNA ポリメラーゼはアプライドバイオシステムズ社製を使用した。100bp DNA Ladder，Loading Buffer は宝酒造(株)製，エチジウムブロミド，アガロース，TE 緩衝液，TAE 緩衝液は(株)ニッポンジーン製を使用した。

(1) CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)法

CTAB 溶液は，(株)ニッポンジーン製 0.5mM EDTA(pH8.0) 8mL，(株)ニッポンジーン製 1M Tris-塩酸(pH8.0)20mL および 5M NaCl 水溶液 56mL を量り採り，水約 150mL を加え混合したものに，和光純薬(株)製 CTAB 4g を攪拌しながら加え完全に溶解した後，水で全量を 200mL としオートクレーブで滅菌したものを用いた。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液は和光純薬(株)製クロロホルムと関東化学(株)製イソアミルアルコール

を 24:1(v/v)の割合で混合したものを用いた。フェノール/クロロホルム混合液は(株)ニッポンジーン製，RNase A はキアゲン社製を用いた。

(2) シリカゲル膜タイプキット法

シリカゲル膜タイプカラムおよび緩衝液はキアゲン社製 DNeasy Plant mini kit を用いた。

(3) イオン交換樹脂タイプキット法

イオン交換樹脂タイプカラムはキアゲン社製 Genomic Tip 20/G を用いた。緩衝液はキアゲン社製 Genomic DNA Buffer Set 付属のものを，α-アミラーゼはシグマ社製，Proteinase K はキアゲン社製を用いた。

3. 機器

超純水装置はアドバンテック東洋社製 PWU-400 を，オートクレーブはトミー製 BS-305 を，フードカッターは象印マホービン社製 BME-02 を使用した。

ELISA 法で使用するマイクロプレートリーダーおよびプレートウォッシャーはそれぞれバイオラッド社製 MODEL680，MODEL1575 を使用した。

PCR 法で使用する恒温装置はイワキ社製 ALB-22 および(株)アステック製 BI-525，マイクロ冷却遠心機は(株)久保田製作所製 KUBOTA3700，分光光度計は日本分光(株)製 V-530，PCR 装置はバイオラッド社製 iCycler，電気泳動装置はコスモバイオ社製 Mupid-21，画像解析装置はUVP 社製 BioDoc-It System を用いた。

4. 検査法

ELISA 法，PCR 法ともに前述の厚生労働省通知²⁾に準じ，PCR 溶液の組成および反応条件は表 2 および 3 のとおりとした。

表2.反応溶液

試薬	終濃度	容量(μL)
10×buffer	1×	2.5
25mM MgCl ₂	1.5mM	1.5
2mM dNTP	0.20mM	2.5
25 μM F-primer	0.2 μM	0.2
25 μM R-primer	0.2 μM	0.2
5U Taq Polymerase	0.625U	0.125
鋳型DNA (20ng/μL)	50ng	2.5
滅菌超純水		15.475
全量		25

表3.反応条件

95	10min
95	30sec
60	30sec
72	30sec
72	7min
4	∞

40サイクル

実験結果および考察

1. 乾麺そば中の小麦たんぱく質

特定原材料として表示が義務づけられた5品目(小麦, そば, 卵, 乳および落花生)のうち, 小麦は食材として広く利用されており, 製造所における製品の製造過程で他の食材に混入する可能性が高い。本来原材料として特定原材料を使用した場合は, その量が微量であっても表示しなければならないが, 厚生労働省通知³⁾のQ&Aによればやむを得ない微量の混入に関しては「本製造所では特定原材料○○を含む製品を製造しています」等の注意喚起表示が認められている。しかし, 特定原材料がその製品に明らかに混入している場合は原材料としての表示が必要となる。

そこで市内を流通するそば(乾麺)中の特定原材料小麦の測定を行った(表4)。No.1~6は原材料に小麦粉の表示がないが欄外に注意喚起表示のあるそば, No.7~9は原材料に小麦粉を使用しているものである。特定原材料の検査結果は, MキットもしくはNキットのいずれかが10μg/g以上は混入の可能性があるとして判断し陽性となるため, No.2以外のものはすべて陽性となる。また, 全ての検体で小麦たんぱく質を検出したが, 原材料に小麦粉表示のないNo.1~4と表示のあるNo.7~9では検出量に差があった。No.5, 6は注意喚起表示のみであるがNo.1~4に比して検出値が高く, 原材料として小麦を使用していることも疑われる。

アレルギー症状を発症する濃度は個人差が大きく, 判定基準となる10μg/g以下でもその発症は充分考えられる⁴⁾。

今回の調査において, 製造方法等は調査していないため小麦粉使用の有無は未確認であるが, 検査結果から小麦を取り扱う施設においては, 少なくとも注意喚起表示が必要であると思われる。しかしながら, 製造工程などの十分な確認をせず「この製品には特定原材料○○が入っているおそれがあります」等という可能性表示は, アレルギー患者の選択肢を狭めてしまうために禁止されている。また, 注意喚起表示についても, その乱用により可能性表示と同じであるという指摘もあるため⁵⁾, アレルギー表示の管理には細心の注意が必要である。なお, No.6は原材料に小麦粉使用の記載はないが, 本測定方法で偽陽性を示す大麦を使用しているため, 陽性になったことも考えられる。(株)森永生科学研究所 HP, <http://www.mioobs.com/>, 日本ハム(株) HP, <http://www.rdc.nipponham.co.jp/>

2. 小麦による粉製品などの汚染状況

本所における収去検査において, 菓子材料などの粉製品に小麦が混入している事例がみられた。小麦粉はその形態的特徴から相互汚染の可能性が高く製品管理が困難である。めん類, 菓子類などの加工食品においては, 製品の製造段階以前での混入, すなわち原料である粉が既に汚染されていることが考えられた。そこで, そばや菓子などの原材料となる粉製品について, 混入する特定原材料小麦の検査を行った(表5)。ELISA法のMキットでそば粉2検体, 米粉1検体, 大麦粉2検体が陽性で, Nキットでそば粉2検体, 大麦粉2検体が陽性であった。また, イオン交換

表4 そば中の小麦たんぱく質検査結果

No.	品名	Mキット (μg/g)	Nキット (μg/g)	判定	原材料表示
					注意喚起
1	十割そば	60	150	陽性	そば粉, 食塩 この製品の製造ラインでは小麦粉を含む製品を製造しています
2	十割そば	4.0	6.5	(-)	そば粉 製造工場内で小麦を使用しています
3	ダッタン入り十割そば	8.3	12	陽性	ダッタンそば粉, そば粉 当工場は小麦を含む製品も製造しております
4	十割そば	15	30	陽性	そば粉 当工場は小麦を含む製品も製造しております
5	本十割そば	>160	>160	陽性	そば粉100% 小麦入りのそばと同一ラインで製造しているため, 小麦アレルギーの方はご注意ください
6	七割そば	>160	>160	陽性	そば粉, 大麦粉, 食塩 当工場は小麦を含む製品も製造しております
7	さらしなそば	>160	>160	陽性	小麦粉, そば粉, 食塩
8	ざるそば	>160	>160	陽性	小麦粉, そば粉, 食塩
9	山芋入りそば	>160	>160	陽性	小麦粉, そば粉, 山芋粉, 食塩

定量下限値: 1.0 μg/g

膜タイプキットで DNA の抽出をし、確認検査の PCR 法を行ったところ、そば 2 検体が陽性となったが、米が原料である上新粉はイオン交換膜タイプキット以外の他の二法でも DNA が検出できず測定が不可能であった。でんぷんなどの夾雑物の含有量が多いためと思われるが、平成 19 年 2 月 20 日厚生労働省通知食安監発第 0220001 号「安全性未審査の中国産米加工品について」⁶⁾で示されたシリカゲル膜タイプのキットを用いた方法が有効と思われるので今後検討していく必要がある。大麦は、前述のとおり ELISA 法で偽陽性を示すため PCR 法で確認されなかったことから小麦が混入していなかった可能性が高い。

表5 粉製品中の小麦検査結果

検体	原料	ELISA		PCR (Gtip)
		Mキット	Nキット	
そば粉	そば	陽性	陽性	陽性
そば粉	そば	陽性	陽性	陽性
そば粉	そば	(-)	(-)	N.T.
そば粉	そば	(-)	(-)	N.T.
上新粉	米	(-)	(-)	N.T.
上新粉	米	陽性	(-)	N.D.
もち粉	米	(-)	(-)	N.T.
かるかん粉	米	(-)	(-)	N.T.
コーンスターチ	馬鈴薯	(-)	(-)	N.T.
もちり粉	馬鈴薯	(-)	(-)	N.T.
片栗粉	馬鈴薯	(-)	(-)	N.T.
タピオカスターチ	キャッサバ	(-)	(-)	N.T.
はったい粉	大麦	陽性	陽性	(-)
大麦シフォンミックス	大麦	陽性	陽性	(-)
わらび粉	わらび	(-)	(-)	N.T.
くず粉	くず	(-)	(-)	N.T.

N.D.; Not Detected N.T.; Not Tested

3. PCR 法での小麦検出限界の確認

小麦の確認試験である PCR 法は、食品から DNA の抽出を行い、PCR による増幅後その増幅産物を電気泳動で確認することにより結果の判定を行う。通知による抽出法は CTAB 法、シリカゲル膜タイプキット法およびイオン交換膜タイプキット法の三法が示されており、食品の加工状態により適切な抽出法を選択することとなっている。小麦粉の DNA 抽出はシリカゲル膜タイプキットで行うことが推奨されているが、混入量が少ないものには確認が困難となるものがあつたため、各 DNA 抽出法での検査結果の比較を行い、PCR 法における小麦の検出限界について検討した。

小麦粉のたんぱく質含有量は約 10%であることから、ELISA 法での判定基準である小麦たんぱく質含有量 10μg/g を確認するためには、100μg/g の小麦粉を検出することが必要である。そこで小麦粉濃度 100μg/g の懸濁液を滅菌超純水で調整し、各方法において DNA の抽出を行った。小麦粉濃度 100μg/g では三法いずれの方法でも PCR に最適である 20ng/L の DNA 量を得ることができなかった。そのため抽出液を希釈調整せずに PCR で増幅し、電

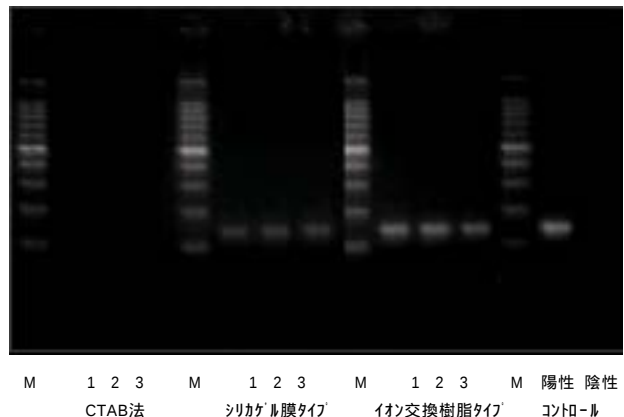


図1 各方法で抽出したDNAの電気泳動結果(n=3)

気泳動で分離後染色した。図1のとおり、イオン交換樹脂タイプキットで抽出したものは141bp付近で明瞭なバンドの確認ができたが、シリカゲル膜タイプキット法では不明瞭であり、また CTAB 法で抽出したのものについてはバンドの確認はできなかった。イオン交換樹脂タイプキットにおいてはさらに10倍希釈した10μg/g 懸濁液の抽出も行ったがバンドの確認は困難であった。いずれの抽出法も同じ試料量を必要とするが、シリカゲル膜タイプおよび CTAB 法では、抽出過程でその一部しか精製しないことがバンドの確認が困難である要因と思われる。小麦粉ではイオン交換タイプが有効な抽出法であったが、強い加工がなされた食品においては、新たなプライマーの利用⁷⁾や対象食品毎に試料量や試薬量などの調整を行うなど抽出条件の検討が必要であると思われた。

文 献

- 1)厚生労働省通知食安基発第 0513003 号：アレルギー物質を含む食品の検査法について、平成 14 年 11 月 6 日
- 2)厚生労働省通知食安基発第 1011002 号：アレルギー物質を含む食品の検査法について(一部改正)、平成 17 年 10 月 11 日
- 3)厚生労働省通知食安基発第 12270001 号、食安監発第 12270004 号：アレルギー物質を含む食品に関する表示について、平成 16 年 12 月 27 日(QA)
- 4)食品表示研究班アレルギー表示検討会最終報告書(平成 14 年 3 月 31 日)
(http://www.nih.go.jp/eiken/chosa/chosa_shokuhin.html)
- 5)今井孝成：食品衛生学雑誌、45、J-315-322、2005
- 6)厚生労働省通知食安監発第 0220001 号：安全性味審査の中国産米加工品の検知法について、平成 19 年 2 月 20 日
- 7)内野昌孝：小麦検出用のプライマーセットの開発、日本食品科学工学会誌、54、83-86、2007