

## アレルギー物質を含む食品検査について

—原材料に「あみ」を含む加工食品の分析—

肥塚加奈江, 大月史彦, 林 隆義, 山本 淳 (衛生化学科)

【資 料】

## アレルギー物質を含む食品検査について

—原材料に「あみ」を含む加工食品の分析—

Examination on Foods Containing Allergic Substances

— Analysis of Processed Food Containing “Ami”—

肥塚加奈江, 大月史彦, 林 隆義, 山本 淳 (衛生化学科)

Kanae Koeduka, Fumihiko Ohtuki, Takayoshi Hayashi, Jun Yamamoto

### 要 旨

原材料に「あみ」を含む加工食品の, アレルギー物質を含む食品検査について検討を行った。各検体からの遺伝子抽出は, シリカゲル膜タイプキット法で, 十分な量が確保されたが, PCR 阻害物質が除去されなかった可能性があり通知法に示された別の方法も検討する必要がある。また, アガロースゲル電気泳動のかわりに増幅バンド長やその濃度が定量できるマイクロチップ電気泳動法の活用が有効であることがわかった。

[キーワード: アレルギー物質を含む食品検査, 特定原材料, えび, あみ, PCR法]

[Key words: Foods Containing Allergic Substances, Shrimp, “Ami”, PCR technique]

### 1 はじめに

平成20年6月3日食安発第0603001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知<sup>1)</sup>により, アレルギー疾患を有する者の健康危害の発生を防止する観点から, 「えび」又は「かに」を原材料とする加工食品にあっては, これらを原材料として含む旨を表示することとなった(平成20年6月3日施行, ただし平成22年6月3日まで猶予)。これを受け, 岡山県でも県内で製造される加工食品について, 表示が適正におこなわれているか確認する目的で, 平成14年11月6日付け, 食発第1106001号厚生労働省医薬食品局食品保健部長通知<sup>2)</sup>に示された検査方法(以下通知法)に従い, ELISA法によるアレルギー物質を含む食品の試買調査を実施した。調査を行った加工食品で陽性を示した検体について, PCR法による確認検査を実施し若干の知見を得たので報告する。また, 通知法で示されたアガロースゲル電気泳動法の他に, マイクロチップ電気泳動法も実施したので, その概要についても報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 試料

平成21年6月に, 岡山県食品衛生監視指導計画<sup>3)</sup>に則り, 岡山県内で購入した検体(キムチ)について検査を行

った。比較のために分析した試料は, 岡山市内で適宜購入した。

#### 2.2 試薬等

甲殻類キット「マルハ」: 株式会社マルハニチロ食品  
FAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」: 日水製薬株式会社製

アレルギーチェッカー「動物共通」: オリエンタル酵母株式会社製

えび検出用プライマー対, 甲殻類検出用陽性コントロールプラスミド: 株式会社ファスマック社製

DNeasy Plant Miniキット, RNaseA: QIAGEN社製  
AmplitaqTM Gold, PCR緩衝液, dNTPmix,  
MgCl<sub>2</sub>: アプライドバイオシステムズ社製

TAE緩衝液: 同仁化学研究所製

滅菌水: 蒸留水を超純水製造装置MilliQで精製し,  
121℃20分オートクレーブ滅菌したものを使用した

20 bp DNA Ladder: タカラバイオ(株)社製

φ×174 DNA/Hae III Markers: Promega社製

試薬キット DNA-1000: 島津製作所製

SYBR Gold: インビトロジェン社製

## 2.3 装置

ホモジナイザー：岩谷産業社製 ミルサー IFN-700  
振とう機：TAITEC社製 RECIPRO SHAKER SR-2S  
遠心機：コクサン製 H501FA  
          ベックマン製 CPKR CEntrifuse  
          KUBOTA製 5930  
          Eppendorf製 mini spin plus  
マイクロプレートウォッシャー：TECAN製 columbs  
マイクロプレートリーダー：BMG Labtechnologies製  
FLUO star OPTIMA  
吸光光度計：島津製作所製 UV-2200  
PCR装置：ABI社製 Veriti200  
電気泳動装置：ADVANCE社製 Mupid-S  
ゲル撮影装置：ATTO社製ゲル撮影装置  
AE-6932GXCF-U型プリントグラフ(Densitograph  
Software：CS Analyzer ver 3.0)  
マイクロチップ電気泳動装置：島津製作所製 MultiNA

## 2.4 検査方法

ELISA法、PCR法、共に通知法に従って検査を行った。

### 2.4.1 ELISA検査法の試料調製

粉碎均質混和した試料1gをプラスチック製遠心管にはかりとり、キットに添付の説明書に従って調製した検体抽出液を19ml加え、ボルテックスで検体を分散し、遠心管を横にして振とう機で1晩振とう抽出した(20℃)。pH試験紙で抽出液のpHが6～8の間にあることを確認した後、3000×g、室温で20分間遠心分離し、上清をろ紙でろ過しELISA用試験試料液とした。

### 2.4.2 ELISA検査

それぞれの試料液について、2種類のELISA検査(甲殻類キット「マルハ」、FAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」)を行った。

### 2.4.3 PCR確認検査

試料はミルサーで粉碎して均質化を行った後、凍結乾燥し、再び粉碎した後、通知法のDNA抽出精製法-シリカゲル膜タイプキット法の項に従ってDNAを抽出精製し、試料原液とした。この試料原液について200-320nmの範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、DNAの精製度とDNA濃度を算出し、通知に示されており、適宜希釈してPCR用試料液とした。このPCR用

試料液について、通知の定性PCR法の項に従ってPCR増幅を行った。DNA増幅バンドの確認は、アガロースゲル電気泳動の項に従って検査を実施した(エチジウムブロミドの染色は後染色で実施した)。アガロースゲル電気泳動後は、ゲル撮影装置で撮影し、専用の電気泳動パターン解析ソフトで解析して検出されたバンドの分子量を推定した。また、同様にPCR増幅した試料について、マイクロチップ電気泳動も実施した。マイクロチップ電気泳動測定条件は次のとおりとした。

マイクロチップ電気泳動測定条件

マイクロチップ電気泳動装置：島津製作所製  
MultiNA  
マイクロチップ：TypeDR-C  
試薬キット：DNA-1000  
染色試薬：SYBR Gold  
DNAマーカー：Promega社製  $\phi \times 174$  DNA/Hae  
III Markers  
参照DNAマーカー：タカラバイオ(株)社製 20 bp  
DNA Ladder

## 3 結果及び考察

### 3.1 ELISA法を用いた「甲殻類」の検査

今回、市販のキムチについて、検査項目「甲殻類」において、ELISA法で定量検査を実施した。今回のELISA法による検査で陽性を示したキムチの原材料表示を表1、また定量検査結果を表2に示す。表2に示すとおり、分析結果はそれぞれのキットで10 $\mu$ g/g以上であり検査結果は陽性であった(以下、この陽性を示したキムチをEPキムチという)。しかし、表1に示すとおり、今回分析したキムチの原材料表示には「アミ塩辛」があり、アミは、今回表示が義務付けられた「えび」「かに」の範囲に含ま

表1 ELISA法で陽性を示したキムチ (EPキムチ) の原材料表示

【原材料名】胡瓜、漬け原材料(唐辛子、食塩、にんにく、大根、人参、アミ塩辛、イカ塩辛、砂糖、昆布、酒、ミリン、もち米、水飴、生姜、ごま、帆立貝柱スープ)

表2 EPキムチのELISA検査結果

使用したELISAキット	検査結果 ( $\mu$ g/g)
甲殻類キット「マルハ」	44
FAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」	41

れない<sup>1)</sup>が、今回使用した2種類のELISA法では擬陽性を示す可能性があるといわれている<sup>3)4)</sup>。また、アキアミと呼ばれる生物は、呼称にアミと入っており、アミ塩辛の原料となることもあるが、サクラエビ科であり、今回表示が義務付けられた「えび」「かに」の範囲に含まれている。今回このキムチと何種類かのえび及びアミについて通知法に従ってPCR法による確認検査を実施した。検査を実施した試料の概要を表3に示す。

### 3.2 PCR確認検査

表3に示した試料について、DNA抽出精製法—シリカゲル膜タイプキット法の項に従ってDNAを抽出精製し、適宜希釈して作成したPCR用試料液の紫外吸収スペクトルから算定されたO.D.260/O.D.280比及び推定DNA濃度を表4に示す。

を表4に示す。O.D.260/O.D.280比は、バナメイエビ以外、通知法に示されているとおり1.2-2.5の範囲であり、また、ピュア度及び低分子不純物や糖度の存在を示すO.D.230値から、おおむね各検体からの遺伝子は抽出されていると判断された。

PCR確認検査を実施した結果を表5に示す。通知法によると、動物DNA検出用プライマー対を使用したPCR反応では、370bp-470bpのバンドが確認され、えび検出用プライマー対を使用したPCR反応では、187bpのバンドが確認されることとなっている。表5に示すとおり、EPキムチは、動物DNA検出用プライマー対及びえび検出用プライマー対のどちらを使用したPCR反応検査でもバンドが確認できなかった。これは、天日干し桜えび、

表3 PCR法検査を実施した試料の概要

番号	試料	概要	原材料
1	EPキムチ	ELISA法で陽性	表1参照
2	カニ風かまぼこ	魚肉練り製品	魚肉(すけそうだら)、卵白、澱粉、風味原料(かに肉)、食塩、カニエキス、調味料(アミノ酸等:大豆由来)、pH調整剤、保存料(ソルビン酸)、香料、乳化剤、着色料(赤104、アナトー、カラメル)
3	天日干し桜えび	魚介類乾製品	さくらえび(台湾産)
4	バナメイエビ	冷凍	バナメイエビ
5	アミ塩辛	塩辛	アキアミ(サクラエビ類)、食塩
6	冷凍オキアミ	釣り餌、冷凍	オキアミ
7	アカアミ	釣り餌、冷凍	アカアミ

表4 シリカゲル膜タイプキット法で調整したPCR用試料の紫外吸収スペクトルから算定されたO.D.260/O.D.280比及び推定DNA濃度

番号	試料	O.D.260	O.D.280	O.D.260/O.D.280比	Pure度	推定DNA濃度(ng/μl)	希釈倍率
1	EPのキムチ	0.739	0.478	1.885	104.7	27.80	14.3
2	カニ風かまぼこ	0.380	0.046	2.265	125.8	29.90	20.0
3	天日干し桜えび	0.283	0.054	1.970	109.5	23.25	20.0
4	バナメイエビ	0.355	0.322	1.110	61.7	16.60	10.0
5	アミ塩辛	0.382	0.239	1.803	100.2	16.05	5.0
6	冷凍オキアミ	0.504	0.311	1.617	89.8	25.30	1.0
7	アカアミ	0.575	0.287	1.875	104.2	30.85	50.0

表5 定性PCR法結果

番号	試料	確認されたバンドの推定増幅バンド長(bp)				抽出液に甲殻類検出用陽性コントロールプラスミドを添加してPCRを行った結果
		動物共通		えび		
		アガロースゲル電気泳動	マイクロチップ電気泳動	アガロースゲル電気泳動	マイクロチップ電気泳動	
1	EPのキムチ	ND	ND	ND	ND	ND
2	カニ風かまぼこ	386	382	183	189	検出
3	天日干し桜えび	ND	ND	ND	ND	ND
4	バナメイエビ	400	396	203	194	検出
5	アミ塩辛	ND	ND	ND	ND	ND
6	冷凍オキアミ	ND	ND	ND	ND	ND
7	アカアミ	ND	ND	ND	ND	ND
	ポジティブコントロール	441	444	196	192	

アミ塩辛、冷凍オキアミ、アカアミでも同様であった。今回実施した検体の内、明らかにエビ類である生のバナメイエビは当然検出されたが、表示のないカニ風かまぼこにエビ由来の遺伝子が検出された。これは、原料であるスケソウダラは、甲殻類を補食していることから<sup>6)</sup>加工工程で消化管内容物が流出し、それらがすり身に混入した結果ではないかと推測された。また、天日干し桜エビやアカアミを使用したアミ塩辛の検査では、対象バンドが検出できなかったが、それぞれのPCR用試料液に、甲殻類検出用陽性コントロールプラスミドを添加してPCR確認検査を行っても目的DNAバンドを確認できなかったため、何らかのPCR反応阻害があることが予想された。

### 3.3 アガロースゲル電気泳動法とマイクロチップ電気泳動法

今回、目的DNAバンドの確認に、通知法に示されているアガロースゲル電気泳動法だけでなくマイクロチップ電気泳動法も実施した。どちらの方法でも専用の解析ソフトで、検出された増幅バンド長を推定したが、検出されたバンドの大きさは、表5に示すとおり、よく一致しており、マイクロチップ電気泳動法も活用できるものと思われた。

## 4 まとめ

今回、各検体からの遺伝子抽出は、シリカゲル膜タイプキット法で、十分な量が確保されたが、PCR阻害物質が除去されなかった可能性があり通知法に示されたイオン交換樹脂タイプキット法、CTAB法等、別の方法も検

討する必要がある。また、アガロースゲル電気泳動のかわりに増幅バンド長やその濃度が定量できるマイクロチップ電気泳動法の活用が有効であることがわかった。

## 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について”平成20年6月3日食安発第0603001号, 2008
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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, 2002
- 3) 岡山県ホームページ保健福祉部生活衛生課“平成21年度食品衛生監視指導計画”[http://www.pref.okayama.jp/file/open/1273112706\\_746651\\_31932\\_118775\\_misc.pdf](http://www.pref.okayama.jp/file/open/1273112706_746651_31932_118775_misc.pdf)
- 4) 清木興介：食物アレルギーの原因食品として問題になっている甲殻類原材料を検出するキットの開発, (社)日本フードスペシャリスト協会平成20年度フードスペシャリスト養成機関研修会講演録講演Ⅱ  
<http://www.jafs.org/workshopLecturesBy.html>
- 5) 日水製薬ホームページ“FAテスト EIA-甲殻類「ニッスイ」において偽陽性を示す食品”  
[http://www.cosmokai.com/recommend/FA-EIA\\_list\\_090819.pdf](http://www.cosmokai.com/recommend/FA-EIA_list_090819.pdf)
- 6) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡 道弘, 阿部晃久ら：食品原材料中に含まれる「えび」, 「かに」等の甲殻類タンパク質の実態調査, 日本食品化学学会誌, 15巻1号, 12-17, 2008