

## 加工食品中の特定原材料検査（小麦）におけるPCR法の検討

萩野賀世，松本ひろ子，牛山博文

## 加工食品中の特定原材料検査（小麦）におけるPCR法の検討

萩野賀世\*, 松本ひろ子\*, 牛山博文\*\*

平成17年度および平成18年度に小麦表示のない市販の加工食品について、特定原材料（小麦）の検査を実施した。ELISA法によるスクリーニング検査では、国産品、輸入品あわせて73検体のうち、菓子等8検体から小麦タンパク質を10 µg/g以上検出した。PCR法による確認検査では、揚げ菓子、発酵食品中のDNAは熱、圧力、発酵等により大部分が損傷を受けており小麦DNAを確認できなかった。そこで、DNAの抽出法およびPCR法の改良について検討した。本法を適用したところ、高度に加工された食品中の小麦DNAを確認することができた。

**キーワード：**特定原材料，小麦，酵素免疫測定法，PCR法，DNA抽出法，加工食品

### はじめに

近年、乳幼児から成人にいたるまで、アレルギー物質を含む食品に起因する健康危害が多く見られるようになった。これに対応し、小中学校の給食において食物アレルギー対応マニュアルが作成されるなど、食物アレルギーへの取り組みが広がっている一方で、アレルギー物質の表示欠落等による自主回収事例は後を絶たない。

多摩支所では、平成15年度から特定原材料検査に取り組んでおり、平成17年度および18年度に、小麦表示のない市販の加工食品について、特定原材料（小麦）検査を実施した。小麦は主要な炭水化物源であり、様々な加工食品に原材料として使われ、表示違反例も多い。また、乳幼児から成人まで高い頻度で発症例の報告があり、食物依存性運動誘発性アナフィラキシー（FDEIA）の要因ともなる。検査は厚生労働省通知法<sup>1)2)3)</sup>（以下通知法と略す）に従い、スクリーニング検査としてELISA法を、ELISA法陽性試料の確認検査としてPCR法を用いたが、一部の食品ではPCR法による確認が困難であった。そこでPCR検査を、実際の加工食品に適用するための検討を行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

平成17年度および18年度に都内で市販されていた小麦表示のない各種国産加工食品55検体及び輸入加工食品18検体を試料とした。

#### 2. 試薬

通知法に準拠し、次の試薬を用いた。

##### 1) スクリーニング検査（ELISA法）

モリナガFASPEK小麦測定キット・グリアジン（株）森永生科学研究所製、以下M社キット）、FASTKIT™・エライザVer. II小麦（日本ハム（株）製、以下N社キット）

##### 2) 確認検査（PCR法）

DNA抽出キット：DNeasy Plant Mini Kit（通知法，QIAGEN

社製）、NucleoSpin DNA Trace（MACHREY-NAGEL社製）

##### 3) 電気泳動用試薬

Agilent DNA1000試薬キット（Agilent technologies社製）

#### 3. 装置および器具

ミキサー：オスターブレンダー（大阪ケミカル（株）製）、ミルサー：IFM-700G（イワタニ（株）製）、振とう機：MMS-3010（東京理化学器械（株）製）、冷却遠心分離機：7930（クボタ商事（株）製）、マイクロプレートリーダー：SUNRISE CLASSIC（TEKAN（株）製）、マイクロプレートウォッシャー：AMW-8（バイオテック（株）製）、遠心分離機：ミニスピンプラス（エッペンドルフ（株）製）分光光度計：UV-1600（島津製作所（株）製）、サーマルサイクラー：GeneAmp9700（Applied Biosystems社製）、平板型キャピラリー電気泳動装置：Agilent2100バイオアナライザー（Agilent technologies社製）

#### 4. スクリーニング検査（ELISA法）

通知法に従って行った。

#### 5. 確認検査（PCR法）

##### 1) DNA抽出法

通知法に従い、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN社製）を使用した。また、DNAの含有量が明らかに少ない試料（液体試料、飴菓子、ELISA検査で小麦タンパク質が2～10 µg/g未満検出されたもの等）はNucleoSpin DNA Trace（MACHREY-NAGEL社製）を使用しDNA抽出を行った。

##### 2) PCR法

通知法に従って行った。小麦DNAの増幅がされず検出できない場合には、PCR反応組成の合計液量は25 µLのまま、プライマー添加量およびDNA試料液量を増減しDNA増幅を行った。

##### 3) 電気泳動法

通知法にあるアガロースゲル電気泳動法および平板型キャピラリー電気泳動法を用いた。

\* 東京都健康安全研究センター多摩支所食品衛生研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町3-16-25

\*\* 東京都健康安全研究センター食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

## 結果及び考察

## 1. 加工食品中の「小麦」の調査結果

平成17年度および18年度に検査した73検体のうち、ELISA検査で小麦タンパク質をM社キットまたはN社キットのどちらか一方でも2 µg/g以上検出した13検体（菓子8検体、乾麺3検体、調味料2検体）の結果を表1に示した。M社とN社の小麦検出用ELISAキットの検出値はどの食品でもほぼ一致した。13検体中、ELISA法陽性（10 µg/g以上検出）となった検体は8検体で、総検体数の約10%を占めた。

## 2. DNA抽出法の検討

表1で示した13試料を、通知法通りDNeasy Plant Mini KitによりDNAを抽出しPCR検査を行ったところ、植物DNA（124 bp）は検出できたが、小麦DNA（141 bp）の検出ができない場合があった。実際に、小麦DNAの確認が困難であった試料を表2に示した。これらの試料では、高温加熱、発酵等の加工処理により、DNAが損傷を受け、大部分が断片化し、PCR反応での小麦DNAの増幅が不可能であったためと考えられた。また、コーンチップス、およびレトルト

表1. 小麦タンパク質が検出された試料の検査結果

試料	小麦表示	スクリーニング検査 ELISA法( µg/g )			確認検査 PCR法	原産国
		M社	N社	判定		
大麦粉練り菓子	注意喚起	++	++	陽性	+	日本
米菓子	なし	+++	+++	陽性	+	日本
大豆粉練り菓子	なし	+	+	陽性	+	日本
卵ボーロ	なし	+	9	陽性	+	日本
オニオンチップス	なし	+++	+++	陽性	+ ※	シンガポール
シュリンプチップス	なし	++	++	陽性	+ ※	タイ
揚げ米菓子	なし	+	+	陽性	+ ※	イタリア
コーンチップス	なし	6	2	陰性	+ ※	アメリカ
乾麺（十割そば）	注意喚起	3	3	陰性	+	日本
乾麺（雑穀）	なし	6	—	陰性	+	日本
乾麺（フォー）	なし	2	—	陰性	+	ベトナム
唐辛子みそ	なし	++	++	陽性	+ ※	韓国
トマトソース	なし	4	3	陰性	+ ※	日本

+ : >10 µg/g  
 ++ : >100 µg/g  
 +++ : >1,000 µg/g  
 - : <2 µg/g  
 ※ : 改良法により確認

表2. PCR検査が困難であった試料の原材料およびDNA抽出量

試料	原材料表示	脂質表示 (g/100g)	NucleoSpin Traceでの DNA抽出量 (ng/µL)
オニオンチップス	オニオン, 植物油	不明	40
シュリンプチップス	タピオカ粉, えび, パームオイル, にんにく, 砂糖, 食塩, こしょう	18	143
揚げ米菓子	米粉, トウモロコシ粉, 植物油, エキストラバージンオリーブ油, ホエイ, 食塩, コーンスターチ, ブドウ糖, イーストエキス, 香辛料, 香料	19	25
コーンチップス	とうもろこし粉, 植物油	19	30
唐辛子みそ	唐辛子, 水飴, 食塩, ニンニク, タマネギ, イワシエキス, 酒精	不明	32
トマトソース (レトルト)	トマト, タマネギ, トマトジュース, 植物油, 水飴, チーズ, 食塩, でんぷん, ガーリック, ベーコン, 牛豚エキス, ドライトマト, 香辛料, 調味料	不明	58

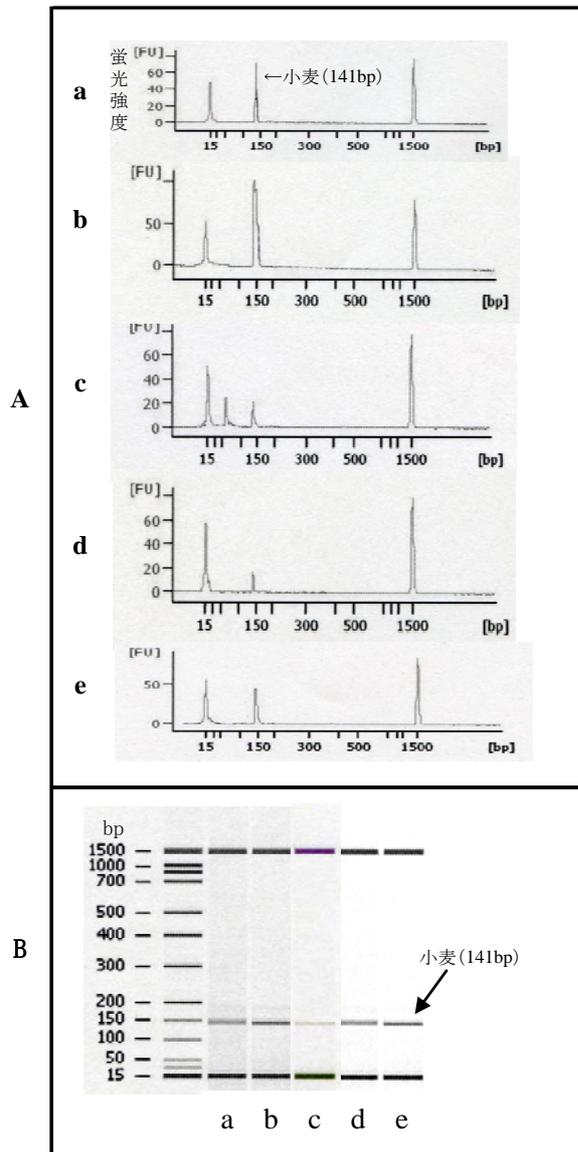


図1. PCR法による小麦DNAの確認  
(平板型キャピラリー電気泳動装置  
Agilent2100バイオアナライザー  
による分析データ)

- A: エレクトロフェログラムイメージ  
B: ゲルイメージ  
a: 標準品  
b: シュリンプチップス  
c: コーンチップス  
d: 唐辛子みそ  
e: オニオンチップス

マトソースはELISA検査での小麦タンパク質の含有量が少なく、DNA抽出キットにより抽出された全DNA中の小麦DNA量が少なかったと考えられた。さらに、揚げ菓子等では試料中の油分がDNA抽出率に影響を与えていることも考えられた。そこで、NucleoSpin DNA Traceを用いたDNA抽出法について検討することとした。NucleoSpin DNA Traceは、法医学的試料(骨、血痕)等、微量DNA試料に適したキットであり、加温抽出に3時間かかるが、シリカゲル膜は1種類で50 mL遠心管にセットでき、一度に遠心分離できる液量が8 mLと多いため、遠心分離の回数が少なく操作

も簡単である。本キットを用いて再抽出したDNA試料液は、PCR検査に必要なDNA濃度を十分に満たしており、各種加工食品からDNA抽出が可能であることがわかった(表2)。これらのDNA試料液を用いてPCR検査を行ったところ、いずれの試料も小麦DNAの検出が可能であった。以後、高温加熱食品、発酵食品、およびELISA検査の結果、小麦タンパク質が微量に検出された(2~10 µg/g未満)試料からDNAを抽出する場合はNucleoSpin DNA Traceを用いることとした。

### 3. PCR法の検討

アレルギー物質の確認検査としてのPCR法において、各種加工食品から抽出したDNA試料液を用いて、小麦DNAを増幅し検出するのは困難であることが多かった。これは、DNA試料液が、小麦を含め多種多様なDNAの混合液であることから、PCR検査時の小麦検出用プライマー添加量およびDNA試料液量の最適量が試料ごとに異なるためであると考えられた。そこで、PCR反応組成の合計液量は25 µLのまま、小麦検出用プライマー濃度を通知法の添加量0.2 µLから0.5 µL(最終濃度0.5 µmol/L)に変更し、DNA試料液量を0.5~4 µLの間で0.5 µLずつ増減し、数種類の反応組成でPCR検査を行ったところ、小麦DNAを検出することが可能となった。そこで以後は、小麦検出用プライマー添加量0.2 µLでPCR検査を行い、小麦DNAが検出できなかった場合には、プライマー添加量を0.5 µLに変更し、DNA試料液量を増減し再度PCR検査を実施することとした。

### 4. 電気泳動法

通知法に従い、PCR増幅産物をアガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色、紫外線を照射、撮影した場合、PCR増幅した小麦DNAバンド(141 bp)が薄く、結果の判定が難しいことが多くあった。そこで、電気泳動法の感度向上について検討した。平板型キャピラリー電気泳動装置は、レーザー蛍光検出を原理とし、専用チップを用い、データをデジタル化して取り込み、エレクトロフェログラムイメージおよびゲルイメージとして見るができる。また、DNA検出限界は0.1 ng/µL、分解能は±5 bpと感度が高く、PCR産物の小麦DNAバンドを検出することができた。以後は、本装置を用いることとした。

以上の検討結果をもとに、PCR法で小麦DNAの検出が困難であった6試料をNucleoSpin DNA TraceでDNA抽出し、プライマー濃度0.5 µmol/LでPCR検査を行い、Agilent2100バイオアナライザーを用いて電気泳動したところ、いずれの試料からも小麦DNAを検出することができた。その中の4試料の結果を図1に示した。

## まとめ

### 1. 特定原材料(小麦)の確認検査PCR法についての検討

1) 小麦DNAの検出が困難であった、高温加熱食品、発酵食品等、高度に加工されている食品から、NucleoSpin Trace

キットを用いることにより、試料中の損傷を受けているDNAのうち、残存している断片化していない微量の小麦DNAを検出することが可能となった。

2) PCR反応組成のうち、小麦検出用プライマー添加量を0.5  $\mu$ L(最終濃度0.5  $\mu$ mol/L)に変更し、DNA試料液量を増減させPCR検査することにより、微量の小麦DNAの良好な検出が可能になった。

3) PCR反応産物の確認を平板型キャピラリー電気泳動装置を用いて行うことにより、小麦DNAの感度良い検出・確認が可能となった。

各々の食品中の原材料の種類、比率に応じてDNA抽出キットを変更し、PCR反応組成中のプライマー量およびDNA試料液量を変えるなどの工夫によって、加工食品中の微量の小麦DNAを抽出しPCR反応において増幅させることが可能となった。

## 2. 平成17・18年度の市販加工食品中の特定原材料(小麦)の実態調査結果

小麦表示のない食品73検体中8検体がELISA法で小麦陽性(10  $\mu$ g/g以上)であった。特に輸入加工食品は18検体中3検体が陽性であり高い陽性率であった。小麦陽性であった8

検体のうち5検体からは、ELISA検査で多量(100  $\mu$ g/g以上)の小麦タンパク質が検出された。ELISA法で小麦タンパク質が2  $\mu$ g/g以上検出された13検体中6検体については改良したPCR法により小麦DNAを確認できた。

今回の調査で、小麦に対して食物アレルギー症状を持つ消費者にとって健康被害をおよぼす可能性のある製品が市場に出回っていることが明らかになった。これらの食品の排除および表示の適正化を進める一助として、引き続き市販製品の特定原材料検査が必要であると考えられる。

## 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，2002
- 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（一部改正）”平成17年10月11日，食安発第1011002号，2005
- 3) 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（一部改正）”平成18年6月22日，食安発第0622003号，2006

**Examination of Allergens(Wheat) in Processed Foods by PCR Method**Kayo HAGINO\*, Hiroko MATSUMOTO<sup>†</sup> and Hirofumi USHIYAMA\*

We tested of allergens (wheat) in a processed food in the market without the indication of containing wheat in fiscal years 2005 and 2006. We detected over 10µg/g of wheat protein using an ELISA screening method in 8 of 73 samples of domestic and imported products. However, in processed foods, including a fried snack, a retort-pouched food and a fermented food, wheat DNA had been damaged by heat, pressure and fermentation, and we could not detect wheat DNA using a method notified by the Ministry of Health, Labour and Welfare. Subsequently, we attempted to develop a DNA extraction method and modified PCR method. Wheat DNA in processed foods was detectable by using this improved method.

**Keywords:** allergic substance, wheat, ELISA method, PCR method, DNA extraction method, processed food

---

\* Tama Branch Institute, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-16-25, Shibasaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

\*\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan