

加工食品中の特定原材料（そば）の分析

松本ひろ子^{*}, 萩野賀世^{*}, 坂牧成恵^{*},
中里光男^{*}, 安田和男^{*}

Analysis of Allergic Substances (Buckwheat) in Processed Foods

Hiroko MATSUMOTO^{*}, Kayo HAGINO^{*}, Narue SAKAMAKI^{*},
Mitsuo NAKAZATO^{*} and Kazuo YASUDA^{*}

Keywords: そば buckwheat, アレルギー allergy, 特定原材料 allergic substances, 酵素免疫測定法 ELISA method, ポリメラーゼ連鎖反応 PCR, 遺伝子検査 PCR test

緒言

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とから、厚生労働省は平成14年4月より、アレルギー物質を含む食品として省令で定める特定原材料5品目(卵、牛乳、小麦、そば、落花生)について表示を義務づけた¹⁾。また、同年11月にはその検査法を通知した^{2,3)}(以下通知法と略す)。すなわち、スクリーニング検査としてはELISA法を、ELISA法陽性試料の確認検査としては、卵、牛乳ではウェスタンブロット法、小麦、そば、落花生ではPCR法を用いることとしている。

一方、表示が義務付けられたものの、これらアレルギー物質の表示が漏れた加工食品が多数判明し、自主回収が相次いだことから、食品のアレルギー物質表示に対する社会的な関心が高まっている。

これに応え、実際に行政機関が適正に表示が行われているか否かを検証するためには、科学的な裏付けとしてのアレルギー物質検査は欠かすことができない。しかし、通知法で示されたスクリーニング検査としてのELISA法では、食品の加工度の違いが測定値に大きく影響し、偽陽性又は偽陰性を示す成分もあることから、測定不可能な食品が存在するとされている^{4,5)}。

そこで、今回は特定原材料5品目のうち、症状が重篤で小児から成人まで幅広く患者が認められる「そば」に着目して、通知法による検査を実際の加工食品に適用するための検討を行った。すなわち、実際の加工食品からのそばタンパク及びそばDNAの抽出法や加熱処理によるタンパク質変性が検査に及ぼす影響などについて検討を行った。また、市販のそばをはじめとする麺類及びそば加工品について「そば」検査を行い、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料 市販そば及びその他の麺類、そば加工品
2. 試薬 通知法に準拠し、次の試薬を用いた。ELISA検査キット: 日本ハム(株)製 FASTKIT そばエライザキット(以下N社キットと略す)及び(株)森永生科学研究所製モリナガそば測定キット(以下M社キットと略す)の2社のキットを用いた。DNA抽出キット: QIAGEN社製 DNeasy Plant Mini Kit, DNAポリメラーゼ: Applied Biosystems社製 AmpliTaq Gold, PCR用プライマー: オリエンタル酵母工業(株)製 PCRプライマーキットアレルギーゲンチェッカー「そば」、陽性コントロール: オリエンタル酵母工業(株)製 PCR用陽性コントロールテンプレート, 電気泳動用アガロース: Cambrex社製 NuSieve GTG agarose 及び SeaKem GTG agarose, 電気泳動用DNA分子量マーカー: Amersham Biosciences社製 50Base-Pair ladder 及び 100Base-Pair ladder, TBE緩衝液: 和光純薬工業(株)製(遺伝子研究用), PCR用の水: 日本薬局方注射用蒸留水。
3. 機器 粉碎機: 岩谷産業(株)製ミルサーIMF-700G, シャフトジェネレーター付きホモジナイザー: IKAジャパン(株)製ウルトラタラックスT25, ホモジナイザー: (株)エスエムテ社製 HF93, オスターブレンダー: Oster社製 Osterizer, マイクロプレートリーダー: TECAN(株)製 SUNRISE CLASSIC, 恒温槽: タイテック(株)製 DTU-18, 遠心機: (株)久保田商事製 7930型及び日本ミリポア(株)製チビタン[®], 分光光度計: 島津製作所(株)製 UV-1600型, サーマルサイクラー: Applied Biosystems社製 Gene Amp PCR System 9700, 電気泳動装置: (株)

* 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

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

アドバンスバイオ製 Mupid-

4. そばタンパク抽出法及び ELISA 検査

1) そばタンパク抽出法: 試料 2 g を遠沈管に採り, これに抽出液 38 mL を加え, シャフトジェネレーター付きホモジナイザーで 3 回攪拌 (20,500 rpm, 30 秒) し, 抽出を行った. その後, 冷却遠心 (4℃, 3,000 × g, 20 分) を行い, 上清をろ過し試料液とした. 脂肪分の多い食品の場合は抽出, 遠心後, -20℃ の冷凍庫に移し約 5 分後に庫内でろ過することで脂肪分を除去した.

2) ELISA 検査: 試料液について, 通知法に従い, N 社キット及び M 社キットの 2 社のキットを用いてそば抗原タンパク量を測定した.

5. そば DNA 抽出法及び PCR 検査

1) そば DNA 抽出法: 固形試料はミルサーもしくはオスターブレンダーで均一に粉碎した後, その 2 g を, 液体試料は凍結乾燥後の 1 g を 30 mL 遠沈管に採り, 通知法に従い, DNA 抽出キットとして QIAGEN 社の DNeasy Plant Mini Kit (シリカゲル膜タイプキット) を用いて DNA を抽出し, DNA 試料液とした.

2) DNA 試料液の濃度および精製度の測定: DNA 試料液の 260 nm と 280 nm における吸光度を分光光度計で測定し, その濃度と精製度を算出した. DNA の濃度は 260 nm での吸光度 1 を DNA 50 ng/μL とし計算した. また, DNA の精製度は, 260 nm と 280 nm の吸光度比 (260 nm/280 nm) を計算し, この比が PCR 法に適した 1.2~2.5 の範囲内であることを確認した. 最終的に DNA 試料液は, 水を加えて 20 ng/μL に調製した. 20 ng/μL に達しなかったもの, あるいは吸光度を測定できなかった DNA 試料液は原液のまま以後の操作に供した.

3) PCR 反応液組成: PCR 反応液は, 最終濃度が 1×PCR 緩衝液 (Applied Biosystems 社製), 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L 塩化マグネシウム, 0.2 μmol/L F-プライマー, 0.2 μmol/L R-プライマー, 0.025 units/μL DNA ポリメラーゼとなるように混合し, DNA 試料液 (20 ng/μL) もしくは陽性コントロールプレート 2.5 μL と水を加えて全量を 25 μL に調製した.

4) PCR 反応条件: プレヒート 95℃ 10 分の後, 熱変性 95℃ 30 秒, アニール 60℃ 30 秒, 伸長 72℃ 30 秒を 40 回繰り返し, 終了反応 72℃ 7 分とし, 4℃ で保存した.

5) 電気泳動: 0.5 μg/mL エチジウムブロマイド含有 2% アガロースゲル (NuSieve GTG agarose・SeaKem GTG agarose(1:1)) を用いて 0.5 μg/mL エチジウムブロマイド含有 TBE 緩衝液中で電圧 100V で泳動と染色を行った. 泳動後 UV312 nm 照射下でゲルの写真撮影を行った. PCR 増幅産物は, ポジティブコントロールの植物 DNA 検出用プライマーでは 124bp, そば検出用プライマーでは 127bp のバンドを比較し, 確認した.

6. 加熱調理実験

市販の生そばを試料として「蒸す」「ゆでる」「炒める」, 「加圧加熱 (オートクレーブ)」, 「油で揚げる」及び「焼く」の加熱処理をしたものについて, そば抗原タンパク量の変化を ELISA 法で調べるとともに, PCR 法での検知を行った. 加熱処理後, 試料中の水分含量, 粗脂肪を測定しサンプリング重量を補正してそば抗原タンパク量を算出した.

7. 加工食品及び麺類中の「そば」の検査

各種加工食品及び麺類中のそば抗原タンパク量を ELISA 法により測定し, PCR 法によりそば DNA を確認した.

8. そばゆで汁からのそば抗原タンパクのうどんへの移行実験

生そば 250 g を 4 L の熱湯でゆで, そのゆで汁及び 4 倍に希釈したゆで汁の各 3 L に, 太さの異なる 2 種類のうどんの乾麺 (太麺, 細麺) を各 250 g 入れて, 太麺は 12 分, 細麺は 7 分間ゆでてステンレス製のザルに取り上げた. 次に, ザルごと溜め水 1.5 L にくり返し 3 回漬け, さらに流水に 3 分間さらした. 各工程でのゆでうどんについて ELISA 検査及び PCR 検査を行った.

結果及び考察

1. 抽出法の検討

1) そばタンパク抽出法: 試料からタンパクの抽出を行う際には, まず, 食品を細かく粉碎することが必要である. しかし, ゆでそばやゆでうどんなどの水分を多く含む食品の場合は, 粘り気があるためにミルサーなどの粉碎器を用いることができない. そこで, 包丁やハサミ等により細かくきざみ, 抽出液を加えてホモジナイザーで処理したところ, カップ中に抽出前と同じ形状のままのものが残り, タンパクの抽出が不十分と思われた. そこで, 通知法のミルサー, ホモジナイザーの他に吸い込み式のシャフトジェネレーター付きホモジナイザー及びオスターブレンダーの 4 種の抽出器具について, 市販のゆでそばを用いて, そば抗原タンパクの抽出量を比較した. 回転数, 抽出時間などの抽出条件及び結果を表 1 に示した.

4 種の中では, 吸い込み式のシャフトジェネレーター付きホモジナイザーの場合がそば抗原タンパクの抽出量が一番多かった. また, この場合はホモジナイズに遠沈管が使用できるため, そのまま遠心機にかけることができ, 簡便なことから, 抽出用器具としてはシャフトジェネレーター付きホモジナイザーを使用することとした. また, 脂肪分の多い食品については, 冷却遠心だけでは脂肪の除去が不十分であった. そこで, 遠心後さらに -20℃ 冷凍庫に移し, 庫内で脂肪分を固めてからろ過して, 脂肪分を除去することとした.

シャフトジェネレーター付きホモジナイザーを用い, ゆでうどんにそば粉を添加した試料における添加回収試験

表1. 各種抽出器具によるそば抗原タンパク抽出量

抽出用器具	回転数 (rpm)	抽出時間	抽出容器	そば抗原タンパク量 ($\mu\text{g/g}$)	CV (%)
1 ミルサー	20,000	30sec×3回	ガラス専用容器	1,489	1.0
2 ホモジナイザー	12,000	5min×3回	ステンレス専用容器	1,374	2.5
3 シャフトジェネレーター付き ホモジナイザー	20,500	30sec×3回	PP製遠沈管	1,636	2.9
4 オスターブレンダー	16,800	45sec×3回	ガラス専用容器	1,452	5.4

n=3

(n=3)では,2社キットの平均回収率はいずれも94%,CV値3%と良好な結果が得られた。

2) そばDNA抽出法:通知法では,セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)を使用したCTAB法と市販のイオン交換樹脂タイプキットとシリカゲル膜タイプキットを用いた方法をDNAの抽出法としている。このうちシリカゲル膜タイプキット法は,主に植物細胞からのDNAの抽出を目的としており,加工度の低い試料に適用できるとされている。インキュベーションは65-15分間と短時間で,マイクロチューブでの遠心時間も短く操作が最も簡便かつ迅速であった。

そこで,シリカゲル膜タイプキットによるDNA抽出法のそば加工食品への適用について検討した。その結果,レトルトそば雑炊やそばかりんとうなどの加工度の高い食品にも十分適用可能であったことから,DNA抽出にはシリカゲル膜タイプキットであるQIAGEN社製のDNeasy Plant Mini Kitを使用することとした。

2. 加熱処理による検査への影響

ELISA法を加工食品に適用するにあたり最も懸念されるのは,加熱等の加工処理によるタンパク変性が,ELISA検査キットの測定値に及ぼす影響である。そこで,市販そばに表2に示した各種調理法に従って加熱処理を行い,そば抗原タンパク量の変化について,抗体の異なる2社の

キットの比較を行った。ELISA法による検出量は,加熱前の生そばのそば抗原タンパク量を100として表したもので,「蒸す」、「ゆでる」、「炒める」、「加圧加熱(オートクレーブ)」、「油で揚げる」、「焼く」の順に減少し,減少パターンは2社のキットとも良く類似していた。

焼いたそばについては,ゆでたそばとは異なり,タンパクの外部への流出がないにもかかわらず,加熱により抗原タンパクの検出量が1.5%程度まで減少した。この結果から,加工度の高い食品については,ELISA法では偽陰性となる可能性があることがわかった。なお,PCR法では,いずれの加熱処理をした場合でもそばDNAを確認することができた。

3. 加工食品中の「そば」の検査

食品の加工の程度によっては,ELISA法では偽陰性となる可能性が考えられたことから,市販されていた「そば」使用表示のある加工食品について,2社のキットによるELISA検査及びPCR検査を実施した。

加工度の低いそば粉から,レトルトそば雑炊のような比較的加工度の高いもの,そばかりんとうのような油脂処理したもの,そばアメのような糖分の多いもの,そばビールなどの液体試料など30検体について検査を行い,結果を表3に示した。加工度の低いそば粉や生そばでは,2社のキットによる測定値にバラツキが見られたが,加工度の高

表2. そばの加熱処理によるELISA及びPCR検査結果

加熱処理条件	水分含量 (粗脂肪) (%)	ELISA法		PCR法
		生そば100に対する そば抗原タンパク量(%)		
		N社キット	M社キット	
A 生そば	27.6	100	100	+
B 蒸す 10分	31.8	75.3	85.4	+
C ゆでる 3分	63.9	52.9	61.6	+
D 炒める 5分 (ゆでそば)	20.2(0.06)	29.9	30.1	+
E 加圧加熱 120℃ 10分 (オートクレーブ)	23.8	5.8	4.2	+
F 揚げる 180℃ 5分	(25.1)	3.2	2.6	+
G 焼く 180℃ 7分 (オープン)	0.67	1.6	1.4	+

表3. 「そば」加工食品中のアレルギー物質検査

No.	品名	ELISA法		PCR法
		そば抗原タンパク量 (μg/g)		
		N社キット	M社キット	
1	そば粉1	170,000	370,000	+
2	そば粉2	87,000	230,000	+
3	生そば	19,000	44,000	+
4	揚げそば	45	81	+
5	そば粉入り韓国冷麺	100	100	+
6	そば粉入りパスタ	14,000	6,800	+
7	そば雑炊 (レトルト)	10	26	+
8	発芽玄米入りそば粥 (フリーズドライ)	634	4,846	+
9	そばまんじゅう	96	100	+
10	そばおやきの皮 (野沢菜入り)	1,700	1,300	+
11	そばおやきの具 (野沢菜入り)	12	14	+
12	そば茶 (実) 1	1.2	ND	+
13	そば茶 (実) 2	2.1	2.4	+
14	そばの実入り紅茶	ND	ND	+
15	そばチップ	650	860	+
16	そばせんべい	1,600	1,700	+
17	そばぼうろ	37	86	+
18	そばかりんとう	63	30	+
19	そばクッキー1	1,500	1,100	+
20	そばクッキー2	15	19	+
21	そばラスク	1,500	970	+
22	そばようかん	80	110	+
23	そばチョコレート	700	410	+
24	そばあめ	1,800	2,200	+
25	そばはちみつ	ND	2.7	+
26	そば新芽	1.3	12	+
27	そば七味唐辛子	4.6	4.5	+
28	ペットボトル入りそば茶	ND	ND	+
29	そばビール	ND	ND	+
30	そば焼酎	ND	ND	-

ND : 1 μg/g未満

い食品については比較的近似した値が得られた。そば粉では、そば抗原タンパクが10万 μg/g以上検出されたが、その一方で、そばの実100%のそば茶では1 μg/g程度しか検出されなかった。これは高温焙煎により、そば抗原タンパクが変性し、検出値が低くなったためと考えられる。液体試料のそば茶飲料、そばビール、そば焼酎のELISA検査の結果は全て陰性であった。

PCR検査では、そば焼酎を除き、全てそばDNAが確認できた。そば焼酎のDNA抽出は、他の液体試料と同様に凍結乾燥したのから行ったが、DNAは確認できなかった。

以上から、加工度が高く偽陰性となってしまう恐れのある食品、例えばそば茶(実)のようにタンパクが著しく変性した食品やそばハチミツやそばビールのようなそばタンパクが微量にしか検出されない食品については、PCR検査が有効であると言える。

4. ELISA検査の偽陽性に対するPCR法での確認

本ELISA検査キットでは偽陽性を示す食品があることが知られており^{4,5)}、N社の「そば」検査キットの取扱説明書には、寒天などを含む食品で偽陽性を示す可能性のあることが記載されている。そこで、寒天を含む小倉ようかんについて検査を行った。その結果、ELISA検査では、そば抗原タンパク量がN社キットで13.8 μg/g、M社キットで2.6 μg/gと陽性であった。しかし、PCR検査では、図1に示したように植物検出用プライマーでのバンドが確認されたが、そば検出用プライマーでのバンドは確認されなかった。これは、小倉ようかんにはそばが含まれていないことを示しており、ELISA検査の結果は偽陽性であったことが証明された。

このようにELISA法で偽陽性を示す食品についても、PCR検査が有効である。

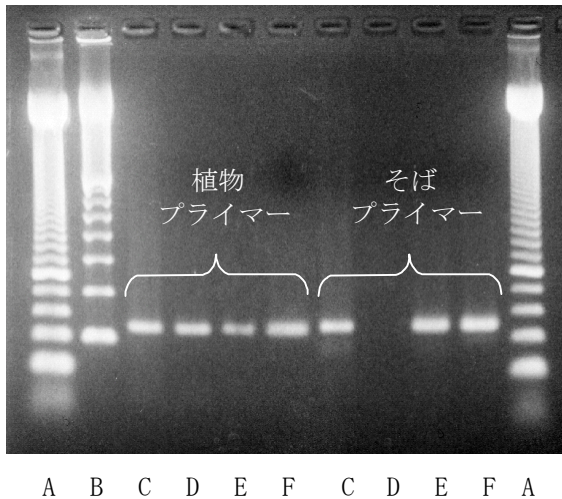


図1. ELISA検査で偽陽性を示した試料のPCR法での確認

A:50bp ladder, B:100bp ladder, C:そば粉
D:小倉ようかん, E:そばようかん,
F:陽性コントロール

5. 麺類の検査

麺類製造所内では、そばと同時に他の麺類も扱っている場合が多いことから、それらの麺類について、そばアレルギー検査を実施し、そば粉によるコンタミネーションの有無を調査した。

そばを除く市販各種麺類 42 検体について ELISA 検査を行ったところ、表 4 のように「そば」表示のない 12 検体から、微量のそば抗原タンパクが検出された。また、これらの一部について PCR 検査を行ったところ、陽性が確認された。

6. そばゆで汁からのそば抗原タンパクのうどんへの移行
微量ではあるが、ゆでうどんからそば抗原タンパクが検出されたことから、そばをゆでた後のゆで汁でうどんをゆでた可能性が疑われた。そこで、そばをゆでた汁とこれを4倍に希釈した汁を用いて、太さの異なる2種類のうどんの乾麺をゆで、そば抗原タンパクのうどんへの移行について調査した。その結果、図2に示したようにうどんの太さに関係なく、また、4倍に希釈したゆで汁でゆでた場合でも、水に漬け、さらに流水にさらしても、最終的にゆでたうどんからそば抗原タンパクが約 5 µg/g 検出された。このことから、そば抗原タンパクがうどんの中まで浸透し、漬け水や流水にさらしても容易に除くことができないことがわかった。

この結果及び市販麺類の検査結果から、そばを取り扱う製造施設内での汚染の危険性が示唆された。

ま と め

加工食品中のアレルギー物質検査への ELISA 法と PCR 法の適用について、「そば」に着目して検討を行った。

1. そば抗原タンパク抽出は、吸い込み式のシャフトジェネレーター付きホモナイザーによる抽出が良好であった。そば DNA の抽出には、加工度の高い食品にもシリカゲル膜タイプキットが適用可能であった。
2. ELISA 法では、加熱等によるタンパク変性の影響を受け、加工度の高い食品は、キットとの反応性が著しく低下することがわかった。
3. PCR 法では、そば抗原タンパク検出量が 1 µg/g 程度の微量なもので、そば DNA を検出することができた。また、ELISA 法で偽陽性を示す食品の確認法としても有効であった。

表4. 市販麺類の検査結果

麺の種類	検体数	陽性検体	品名	表示の有無	ELISA法		PCR法
					そば抗原タンパク量 (µg/g)		
					N社キット	M社キット	
生うどん	13	5	細生うどん	無	6.9	4.6	+
			生うどん	無	1.3	ND	/
			手打ち生うどん	無	1.5	1.3	/
			手練れ生うどん	無	3.4	6.5	/
			手打ちうどん(生)	無(注意喚起)	ND	1.2	/
ゆでうどん	8	2	ゆでうどん	無	4.7	4.8	+
			ゆでうどん	無	ND	2.0	+
中華麺	15	5	生ラーメン	無	3.7	2.4	+
			生中華麺a	無	3.4	1.9	+
			生中華麺b	無	1.2	ND	/
			卵麺	無	1.1	ND	/
			生中華麺c	無	1.1	ND	/
その他の麺	6	1	韓国冷麺	有	100	100	+

計 42 13

ND: 1µg/g未満

/: 未試験

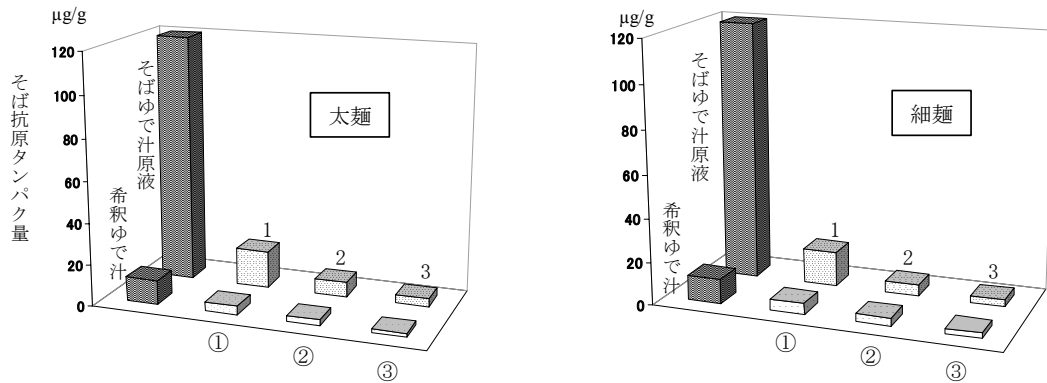


図2. そばゆで汁でうどんをゆでた時のそば抗原タンパクの移行

処理条件 1. ゆで汁原液でゆでた直後 → 2. 水に漬ける → 3. 流水にさらす
 ① 希釈ゆで汁でゆでた直後 → ② 水に漬ける → ③ 流水にさらす

4. そばのゆで汁でうどんをゆでた場合、ゆで汁からうどんへのそば抗原タンパクの移行があることが確認された。

なお、本研究の概要は、第40回全国衛生化学協議会年会(2003年11月)、地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第16回理化学研究部研究会(2004年2月)、及び日本食品衛生学会第87回学術講演会(2004年5月)において発表した。

文 献

- 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施工について”平成13年3月15日、食発第79号(2001)。
- 厚生労働省医薬局食品保健部企画課長、監視安全課長通知“アレルギー物質を含む食品に関する表示について”平成13年3月21日、食企発第2号及び食監発第46号(2001)。
- 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)。
- 穂山 浩, 米谷 民雄: アレルギー物質を含む食品の検査方法の概要(), 食品衛生研究, **53**(2), 25-33, 2003。
- 森松 文毅, 高畑 能久: アレルギー物質の迅速検出法, 月刊フードケミカル, **12**, 68-76, 2002。