

タンパク質濃縮キットを応用した特定原材料の検査法

観 公 子*; 牛 山 博 文*; 下 井 俊 子*; 鎌 田 国 広*

Method for Allergic Substances by Protein Concentrate Kit

Kimiko KAN*, Hirofumi USHIYAMA*, Toshiko SHIMOI* and Kunihiko KAMATA*

Keywords : 特定原材料 allergic substances, 卵 egg, 乳 milk, タンパク質濃縮キット protein concentrate kit, 酵素免疫測定法 ELISA method

緒 言

近年、食生活の高タンパク質、高栄養価等の欧米型への変化に伴い、アレルギー患者が増加しており、中でも食物アレルギーは子供で約 28%、成人で 9.3%を占めている¹⁾。また、アレルギーの症例では卵、牛乳、小麦、そばの順に多く約 70%を占めている^{2, 3)}。このような食物アレルギーの健康危害の発生を防止するため、食品衛生法の改正により特定原材料 5 品目 (小麦、卵、乳、そば、落花生) の表示が義務づけられた⁴⁾。これに伴い、平成 14 年 11 月 6 日付、食発第 106001 号の厚生労働省医薬局保健部長より“アレルギー物質を含む食品の検査方法について”が通知された (通知法)⁵⁾。通知法のうち酵素免疫 (ELISA) スクリーニング法では食品中の特定原材料由来のタンパク質濃度として 10 $\mu\text{g/g}$ (または $\mu\text{g/mL}$) 以上検出した場合を陽性と判定している。この数値は総タンパク重量濃度として、 ng/mL レベルではアレルギーの誘発はほぼないと考えられていることに基づいている⁶⁾。しかし、食品の形態により抽出効率の低いものがあることが知られていること⁷⁾、また、アレルギー患者の中には特定原材料中の極微量のアレルゲンでも健康被害を被る人のいることも想定さる。特定原材料が原因と推定されるアレルギー患者が発生した際、原因を究明するために、より低濃度の検出が必要になると考えられる。そこで、特定原材料のうち、卵及び乳について試料液の調製に生物試料に用いられているタンパク質濃縮キットを応用 (以下タンパク濃縮法と略す) し、高感度で検出する方法を検討した。

実験方法

1. 試料

1) 卵 : 市販品のソーセージ 3 検体、ハム、クッキー及び油揚げラーメン各 1 検体、卵の混入が疑われた苦情品のノンエッグマヨネーズ及びその参考品各 1 検体の計 8 検体を試料とした。

2) 乳 : 市販品のパン (バケット、バタール、ベーグル)

3 検体及びソーセージ 1 検体の計 4 検体を試料とした。

2. 試薬

1) マイクロプレート ELISA キット : ①FASTKITTM・卵 及び FASTKITTM・乳 (いずれも(株)日本ハム製) (以下日ハム卵及び日ハム乳と略す)、②特定原材料測定キット・卵白アルブミン及び特定原材料測定キット・カゼイン (いずれも(株)森永生科学研究所製) (以下森永卵及び森永乳と略す)。

2) 簡易アレルゲンキット : ①FASTKITTM イムノクロマト卵 (株)日本ハム製) (以下イムノクロマトと略す)、②ナノトラップ卵 (株)ロート製薬製) (以下ナノトラップと略す)。

3) タンパク質濃縮キット : アグリテスト (有)エヌ・エス・テック製)。

4) ウエスタンブロットキット : ①モリナガ牛乳ウエスタンブロットキット (カゼイン)、②モリナガ牛乳ウエスタンブロットキット (β -ラクトグロブリン) (いずれも(株)森永生科学研究所製)

5) その他 : ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (生化学用) (和光純薬工業(株)製)、TRIS (生化学用) (和光純薬工業(株)製)、2-メルカプトエタノール (特級) (BIO-RAD 社製)

その他の試薬は通知法記載の試薬を用いた。

3. 装置

1) 分光光度計 : マイクロプレート用分光光度計 SUNRISE CLASSIC (TECAN 社製)。

2) 洗浄機 : マイクロプレートウォッシャー M12/4R (TECAN 社製)。

3) 遠心分離機 : ①Centrifuge 5402 (EPPENDORF 社製)、②Centrifuge GPKR (BECKMAN 社製)。

4. 試験溶液の調製

1) 通知法による試験溶液の調製 : 通知法⁵⁾ に定められた方法で調製した。

①日ハム卵及び日ハム乳 : 粉碎均質混和した試料 2 g を

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

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

はかりとり、日ハム卵あるいは日ハム乳の抽出溶液 38 mL を加え、ホモジナイズ抽出後 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清をろ紙でろ過した。ろ液は希釈用緩衝液で 10 倍希釈し ELISA 用試験溶液とした。

②森永卵及び森永乳：粉碎均質混和した試料 2 g をはかりとり、森永卵白アルブミン用あるいは乳用の抽出溶液 38 mL を加え、ホモジナイズ抽出後 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清をろ紙でろ過した。ろ液は検体希釈液で 20 倍希釈し ELISA 用試験溶液とした。

2) タンパク質濃縮キットを用いた試験溶液の調製： ①日ハム卵及び日ハム乳：試料 2 g をはかりとり、日ハム卵あるいは日ハム乳の抽出溶液 18 mL を加え、2 分間ホモジナイズ抽出後 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清液の混濁が多い場合はさらに上清液を 10,000 rpm で 20 分間遠心分離した。得られた上清液を 2 mL 容のチューブに 1.8 mL 分注し、タンパク質濃縮キット（アグリテスト）の濃縮補助液（アグリテスト CR-4）を 18 μ L 及び凝集作用液（アグリテスト CR-1）を 50 μ L を加え混合し 5 分間静置後、5,000 rpm で 20 分間遠心分離し上清液を捨て沈殿物を得た。この沈殿物を、可溶性液（アグリテスト CR-2）100 μ L で混合溶解し ELISA 用試験溶液とした。このタンパク質濃縮操作の概要を図 1 に示した。

②森永卵及び森永乳：試料 2 g をはかりとり、①日ハム卵及び日ハム乳と同様に抽出及び沈殿処理し、得られた沈殿物に森永卵または森永乳の検体希釈液 100 μ L を加え、混合溶解し ELISA 用試験溶液とした。

③イムノクロマト及びナノトラップ：①日ハム卵及び日ハム乳と同様に処理し、得られた沈殿物にイムノクロマトまたはナノトラップの各キット添付の希釈用緩衝液 100 μ L ~ 200 μ L を加え、混和溶解し試験溶液とした。

④ウエスタンブロット：①日ハム卵及び日ハム乳と同様に処理し、得られた沈殿物を蒸留水で洗浄し遠心分離した。沈殿物に森永乳の検体希釈液 200 μ L を加え混合溶解しウエスタンブロット用試験溶液とした。

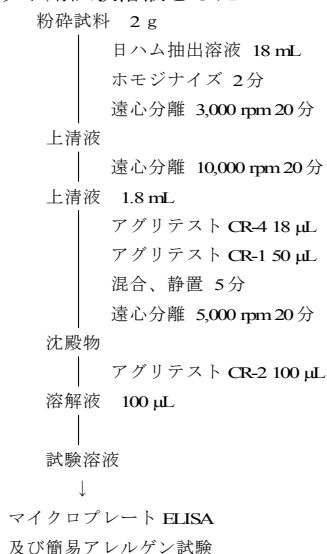


図 1. タンパク質濃縮キットを応用した特定原材料の試験法

5. マイクロプレート ELISA 試験

タンパク濃縮操作を行った試験溶液は各 ELISA キットの希釈液で必要に応じて希釈して、それ以降は通知法⁵⁾に従って ELISA 試験を行った。

①日ハム卵及び日ハム乳：各試験溶液 100 μ L を日ハムキットの抗体固相化プレートに加え 60 分間反応させる。試験溶液を捨て、キット添付の洗浄液で洗浄後、洗浄液を完全に除きビオチン結合抗体溶液 100 μ L を加え 60 分間反応させる。ビオチン結合抗体溶液を捨て、洗浄後、洗浄液を完全に除き酵素-アビジン結合物溶液 100 μ L を加え 30 分間反応させる。アビジン結合物溶液を捨て、洗浄後、洗浄液を完全に除き発色剤 100 μ L を加え 20 分間反応させる。反応後、反応停止液を 100 μ L 加え反応停止させ、マイクロプレートリーダーを用い、主波長 450 nm、副波長 620 nm で測定を行った。同時に測定した標準溶液 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL の濃度で作成した検量線に基づき試験溶液中の濃度を求めた。

②森永卵及び森永乳：試料の調製で作成した各試験溶液 100 μ L を森永キットの抗体固相化プレートに加え 60 分間反応させる。試験溶液を捨て、キット添付の洗浄液で洗浄後、洗浄液を完全に除き酵素標識抗体溶液 100 μ L を加え 30 分間反応させる。酵素標識抗体溶液を捨て、洗浄後、洗浄液を完全に除き酵素基質 100 μ L を加え 10 分間反応させた。反応後、反応停止液を 100 μ L 加え反応停止させ、マイクロプレートリーダーを用い、主波長 450 nm、副波長 620 nm で測定を行った。同時に測定した標準溶液 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ng/mL の濃度で作成した検量線に基づき試験溶液中の濃度を求めた。

6. 簡易アレルギー試験

試料の調製で作成した試験溶液をそのまま、イムノクロマトは 100 μ L、ナノトラップは 200 μ L をそれぞれのプレート試料滴下部に滴下し 15 分後判定部に現れるラインを目視により確認した。

7. ウエスタンブロット試験

試料の調製で作成した試験溶液を公定法に従って電気泳動し、次いで転写後染色を行い判定した。

結果及び考察

1. マイクロプレート ELISA 試験におけるタンパク濃縮法と通知法との比較

通知法では、食品中の特定原材料由来タンパク質の濃度として 10 μ g/g（または 10 μ g/mL）以上検出した場合を陽性としている。この値は ELISA 用試験溶液中の濃度として日ハムキットでは 50 ng/mL、森永キットでは 25 ng/mL である。そこで、タンパク質濃縮キットを応用し、マイクロプレート試験溶液中のタンパク質濃度を高くすることにより特定原材料の含量が少ない食品においても感度よく検出できるものと考えた。タンパク濃縮法と通知法による試験溶液中の濃度について比較検討した。

1) 卵：表 1 に通知法とタンパク濃縮法を応用して行った

卵の ELISA 試験の結果を示した。日ハム卵で比較したところ、ソーセージ②、ソーセージ③、クッキー、油揚ラーメンは通知法による結果では試験溶液中の濃度は 3.1~28 ng/mL であった。これらの試料をタンパク濃縮法で行ったところ、試験溶液中の濃度は 70~3,300 ng/mL であり、通知法に比べタンパク濃縮法は 25~100 倍の高濃度で測定された。また、森永卵で比較したところ、通知法で検出されなかったソーセージ②はタンパク濃縮法で 55 ng/mL、ソーセージ③は通知法 27 ng/mL、タンパク濃縮法 640 ng/mL で 20 倍以上と、日ハム卵同様に高濃度で測定された。以上の結果から、通知法では陰性と判定される試料でも卵が微量混入していることが推定された。

なお、患者の症状よりアレルギーが疑われ、当研究室に搬入されたノンエッグマヨネーズの苦情品及びその参考品について卵の検査を行った。通知法及びタンパク濃縮法で試験溶液を調製し ELISA 試験を行った結果、いずれの試験

溶液でも検出されなかった。このことにより当該苦情品には卵の混入はなかったものと推察された。

2) 乳：通知法とタンパク濃縮法を応用して行った乳の ELISA 試験の結果を表 2 に示した。日ハム乳で比較したところ、バケット、バター、ベーグル、ソーセージ④は通知法では 4~15 ng/mL であるが、これらの試料をタンパク濃縮法で行ったところ、170,000 ~340,000 ng/mL であり、通知法に比べ濃縮法はいずれも 10,000 倍以上の高濃度で測定され、微量の乳が混入した可能性が示唆された。このことはタンパク濃縮法により、濃縮効果と ELISA 試験を妨害する物質が除去されたことにより高感度で検出されたと考えられた。一方、森永乳では、いずれの試料においても通知法に比較してタンパク濃縮法における ELISA 上の発色濃度は顕著に増加せず、濃縮効果はほとんど認められなかった。

表 1. 通知法とタンパク濃縮法による測定値の比較 (卵)

試料	ng/mL*								表示
	通知法				タンパク濃縮法				
	日ハム	森永	イノコマト	ナトリップ	日ハム	森永	イノコマト	ナトリップ	
ソーセージ①	—	—	—	—	—	2	—	—	卵タンパク
ソーセージ②	3.1	—	—	—	70	55	—	—	一部に卵
ソーセージ③	28	27	—	—	3,300	640	—	—	一部に卵
ハム	400	230	—	—	24,000	13,000	—	—	卵成分
クッキー	5.2	—	—	—	510	7.9	+	+	全卵
油揚ラーメン	3.5	—	—	—	190	7.1	+	+	卵粉
ノンエッグマヨネーズ 苦情残品	—	—	—	—	—	—	—	—	
ノンエッグマヨネーズ 参考品	—	—	—	—	—	—	—	—	

*: 試験溶液中の特定原材料タンパク質濃度

表 2. 通知法とタンパク濃縮法による測定値の比較 (乳)

試料	通知法		タンパク濃縮法				表示
	日ハム*	森永*	日ハム*	森永*	WB(C, β-L)**		
パン (バケット)	8	5	320,000	8	0.5	10<	注意喚起
パン (バター)	4	3	230,000	13	0.5	10<	注意喚起
パン (ベーグル)	6	3	340,000	13	0.5	10<	バター
ソーセージ④	15	15	170,000	36	10	10<	

*: ELISA 試験溶液中の特定原材料タンパク質濃度 ng/mL,

** : WB(ウェスタンブロット)試験溶液中の (C: casein, β-L: β-ラクトグロブリン) 濃度 μg/mL

タンパク濃縮法を用いた場合と通知法を用いた場合の試験溶液濃度を比較すると日ハムキットでは360倍、森永キットでは720倍の濃度になる。卵では日ハム及び森永いずれの場合でも濃縮効果が認められた。一方、乳では日ハムにおいてのみ濃縮効果がみられた。これらのことからタンパク濃縮法は卵あるいは乳による食物アレルギー発症時において特定原材料が微量含まれる食品の検出に有用であると考えられる。

2. 簡易アレルギー試験においてタンパク濃縮法を用いた場合

卵の簡易アレルギー試験について、通知法とタンパク濃縮法の試験液を用い検討を行った。その結果を表1に示した。クッキー及び油揚げラーメンではイムノクロマト及びナノトラップいずれの場合も通知法では陰性であったが、タンパク濃縮法では陽性となった。タンパク濃縮操作と簡易アレルギー試験を組み合わせることにより、通知法で検出できなかった試料中の特定原材料の迅速なスクリーニング法とすることができるものと期待される。

3. ウェスタンブロット試験による確認

タンパク濃縮法を用いたELISA試験の場合、日ハム乳と森永乳の結果に大きな差が認められた。そこで、ELISA試験の結果の信頼性を確認するためにウェスタンブロット試験を行った。その結果、表2に示すように、タンパク濃縮法による全ての試験溶液からカゼイン及び β -ラクトグロブリンが検出された。このことからELISA試験の結果は擬似反応ではなく、乳によることが明らかとなった。

なお、ウェスタンブロット試験による試験溶液中のカゼイン濃度が0.5~10 ng/mLと低濃度であったのに対し、 β -ラクトグロブリン濃度はいずれも10 ng/mLより高濃度で検出された。さらに、日ハム乳は複合抗原認識抗体を使用しているのに対し、森永乳は精製抗原認識抗体(カゼイン)のみを使用している⁸⁾ことが、日ハム乳と森永乳のELISA試験の結果の差になったと思われる。

以上のことから、タンパク濃縮法はELISA試験には有効であり、また、タンパク濃縮法の試験溶液はウェスタンブロット試験にも応用できると考えられた。

まとめ

食物アレルギーによる健康被害を防止するため、低濃度試料中の特定原材料の卵及び乳について、タンパク濃縮キットを応用し、試験溶液のタンパク濃度を高くすることにより、高感度で検出する方法を検討した。その結果、マイクロプレートELISA卵において通知法とタンパク濃縮法を比較したところ日ハム卵で25~100倍及び森永卵で20倍以上の高感度で検出できた。日ハム乳においては通知法とタンパク濃縮法を比較したところ10,000倍以上の高感度で測定できたが、森永乳では目立った濃縮効果が認められなかった。また、簡易アレルギー試験においても卵についてタンパク質濃縮キットを応用したところ低濃度の試料において検出が可能であった。ウェスタンブロット試験乳においても濃縮効果が認められた。タンパク濃縮法は食物アレルギー等が発生した場合、あるいは特定原材料が低濃度含有する食品のスクリーニング法として効果があると考えられた。なお、本報では卵及び乳について検討を行ったが、今後は、小麦、そば、落花生について、タンパク質濃縮法を種々の加工食品に応用して適用可能か検討が必要であると考えられる。

文献

- 1) 食品衛生研究“食の安全推進アクションプラン(6)食物アレルギー対策と遺伝子組換え食品の安全性確保”, 52(6), 111-116, 2002.
- 2) 食品と開発, 35, (8)2-3, 2000.
- 3) 海老澤元宏: 食品衛生研究, 51(10), 67-82, 2001.
- 4) 食品衛生研究会編“食品衛生小六法”, 2045-2084, 2004, 新日本法規出版, 東京.
- 5) 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).
- 6) 穂山 浩: JAFAN, 22(5), 201-207, 2002.
- 7) 本庄 勉: 食品工業, 45(14), 55-65, 2002.
- 8) 布藤 聡: 食品と開発, 40(9), 11-13, 2005.