

【資料】

アレルギー物質を含む食品の試買調査について - 平成26～27年度 -

Survey of Foods containing Allergic Substances in Okayama Prefecture - 2014 ~ 2015 -

浅田幸男, 北村雅美, 難波順子, 赤木正章, 吉岡敏行, 村上泰之*, 中尾美江** (衛生化学科)

*食肉衛生検査所, **保健福祉部生活衛生課

Yukio Asada, Masami Kitamura, Junko Namba, Masaaki Akaki, Toshiyuki Yoshioka, Yasuyuki Murakami*, Mie Nakao** (Food and Drug Chemical Research Section)

*Okayama Prefectural Meat Sanitation Inspection Station

**Environmental Health Division, Department of Health and Welfare

要 旨

岡山県内で製造された各種加工食品の試買を実施し, アレルギー物質について適正な表示がなされているか確認した。平成26年度は, 落花生及びえび・かにを調査項目とし, 20検体を試買した。ELISA法によるスクリーニング検査では, 両項目とも全ての検体が陰性と判定された。しかし, 味付けのり1検体から落花生が $8 \mu\text{g/g}$ 検出され, 陽性基準である $10 \mu\text{g/g}$ は超えなかったものの, 混入が疑われた。そこで, PCR法による確認検査を行ったところ, 落花生遺伝子は検出されず, ELISA法の結果が偽陽性であった可能性が示唆された。平成27年度は, 小麦及び落花生を調査項目とし, 21検体を試買した。ELISA法によるスクリーニング検査では, 米粉類1検体から小麦が陽性基準値を超えて検出された。PCR法による確認検査でも小麦遺伝子が検出されたため, 当該製品の製造所に対し, 混入防止策についての指導が行われた。

[キーワード : アレルギー物質を含む食品検査, 特定原材料, 小麦, 落花生, ELISA法 (酵素免疫測定法), PCR法]

[Key words : Foods inspection containing Allergic Substances, specific raw materials, wheat, peanut, ELISA technique, PCR technique]

1 はじめに

我が国では, 食物アレルギーを引き起こすことが明らかとなったもののうち, 特に発症数, 重篤度から勘案して表示する必要性の高い7品目 (えび, かに, 小麦, そば, 卵, 乳及び落花生) のアレルギー物質を含む食品について, これらを含む旨の表示が義務化されている。¹⁾²⁾

本県においては, 食の安全・安心事業の一環として, 平成15年度より県内で製造された製品を中心に, 表示が適正に行われているか確認する目的で, アレルギー物質を含む食品の試買検査を実施している。岡山県食品衛生監視指導計画に基づき, 平成26年度は, 落花生, えび・かにについて, 平成27年度は小麦, 落花生についての試験検査を行った³⁾ので, その検査結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試料

2.1.1 平成26年度

平成26年6月に, 平成26年度岡山県食品衛生監視指導計画³⁾に基づき, 県内で購入した20検体について検査を行った。検査試料については表1に示す。

2.1.2 平成27年度

平成27年11月に, 平成27年度岡山県食品衛生監視指導計画³⁾に基づき, 県内で購入した21検体について検査を行った。検査試料については表2に示す。

2.2 試薬等

2.2.1 ELISA法

小麦, 落花生については, 森永生科学研究所製モリナガ FASPEK エライザ 特定原材料測定キット (小麦グリアジン, 落花生), 日本ハム中央研究所製 FASTKIT エライザ Ver. キット (小麦, 落花生) を, えび・かにについては, マルハニチロ製甲殻類キット 「マルハニチロ」, 日水製薬製 FA テスト EIA- 甲殻類 「ニッスイ」を用いた。

2.2.2 PCR法

QIAGEN 製 Genomic-Tip 20/G, SIGMA 製 - アミラーゼ, オリエンタル酵母製アレルギーチェッカー 「小麦」, 「落花生」, アプライドバイオシステムズ製 PCR 緩衝液, dNTP, MgCl_2 , Taq DNA ポリメラーゼ, タカラバイオ製 100bpDNA Ladder, Loading Buffer, パイオラッド製 アガロース, ニッポンジーン製 TAE 緩衝液を用いた。

2.3 装置

ホモジナイザー : 岩谷産業製 IFM-800

振とう機 : TAITEC 製 RECIPRO SHAKER SR-2S

表1 検査試料の一覧及びELISA法での検査結果(平成26年度)

NO.	製品名	検査項目						備考
		落花生			えび・かに			
		モリナガ*1	日本ハム*2	判定	マルハニチロ*3	ニッスイ*4	判定	
1	米菓	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
2	米菓	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
3	米菓	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
4	ゆば	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
5	ゆば	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
6	味付けのり	不検出	8 µg/g	陰性				「海老」表示あり
7	焼き菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
8	焼き菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
9	和菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
10	めんつゆ	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
11	たれ	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
12	ジャム	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
13	羊羹	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
14	羊羹	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
15	羊羹	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
16	焼き菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
17	和菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
18	和菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
19	和菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
20	焼き菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	

検出限界値：1 µg/g(10 µg/g以上を陽性と判定)

*1：モリナガ FASPEK エライザⅡ特定原材料測定キット

*2：FASTKIT エライザ Ver.Ⅲキット

*3：甲殻類キットⅡ「マルハニチロ」

*4：FAテストEIA-甲殻類Ⅱ「ニッスイ」

表2 検査試料の一覧及びELISA法での検査結果(平成27年度)

NO.	製品名	検査項目						備考
		小麦			落花生			
		モリナガ*1	日本ハム*2	判定	モリナガ*1	日本ハム*2	判定	
1	米粉麺	36 µg/g	32 µg/g	陽性	不検出	不検出	陰性	
2	焼き菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
3	米菓	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
4	米菓	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
5	米菓	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
6	豆腐	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
7	みそ	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
8	豆腐	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
9	揚げ	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
10	焼き菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
11	惣菜				不検出	不検出	陰性	「小麦」表示あり
12	ジャム	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
13	はっ酵乳	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
14	はっ酵乳	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
15	洋生菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
16	洋生菓子	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
17	焼き菓子				不検出	不検出	陰性	「小麦」表示あり
18	焼き菓子				不検出	不検出	陰性	「小麦」表示あり
19	焼き菓子				不検出	不検出	陰性	「小麦」表示あり
20	キャンディー	不検出	不検出	陰性	不検出	不検出	陰性	
21	冷凍食品				不検出	不検出	陰性	「小麦」表示あり

検出限界値：1 µg/g(10 µg/g以上を陽性と判定)

*1：モリナガ FASPEK エライザⅡ特定原材料測定キット

*2：FASTKIT エライザ Ver.Ⅲキット

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 ハイドロフレックス

マイクロプレートリーダー：TECAN 製 サンライズインポー RC-R

吸光度計：島津製作所製 UV-2200

PCR 装置：ABI 製 Gene Amp PCR System 9700

電気泳動装置：ADVANCE 製 Mupid-S

2.4 アレルギー物質同定（定量）検査

通知法⁴⁾では、小麦、落花生、えび・かにはついては、ELISA 法によるスクリーニング検査を行い、食品採取重量 1g あたりの特定原材料等由来のタンパク質含量が 10 μ g 以上の試料については、微量を超える特定原材料が混入している可能性があるものと判断し、PCR 法による確認検査を実施することとされている。ELISA 法、PCR 法共に通知法⁴⁾に従って検査を行った。

2.4.1 ELISA 検査

粉砕等により均質混和した試料 1g をポリプロピレン製遠沈管にはかりとり、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、遠沈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 \times g、室温で 20 分間遠心分離し、上清をろ紙でろ過して ELISA 用試験試料液とした。

それぞれの試料液について、小麦、落花生については、モリナガ FASPEK エライザ 特定原材料測定キット及び FASTKIT エライザ Ver. キットを用いて、また、えび・かにはついては、甲殻類キット「マルハニチロ」及び FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」を用いて通知法⁴⁾に従い、ELISA 検査を行った。

2.4.2 PCR 確認検査

試料は均質化を行った後、通知法⁴⁾のうちより精製度の高い DNA 抽出液が得られたとされる⁵⁾⁶⁾「DNA 抽出精製法-イオン交換樹脂タイプキット法」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、同じく通知法⁴⁾の定性 PCR 法、アガロースゲル電気泳動

の項に従って定性検査を行った。

3 結果及び考察

3.1 平成 26 年度の調査結果

3.1.1 ELISA 法によるスクリーニング検査

県内で試買した 20 検体を検査に供した。落花生については全ての検体を検査したが、えび・かにはついては「海老」の表示がなされていた 1 検体を除く 19 検体を検査した（表 1）。

その結果、落花生及びえび・かには 10 μ g/g 以上検出された検体はなかったため、通知法⁴⁾に従い、全て陰性とした。しかし、落花生の検査における味付けのり 1 検体は、モリナガ FASPEK エライザ 特定原材料測定キットでは不検出であったが、FASTKIT エライザ Ver. キットでは陽性基準値を下回る 8 μ g/g が検出された。FASTKIT エライザ Ver. キットの製造元である日本ハム中央研究所が提供している情報⁷⁾（2014 年 3 月作製）を確認したところ、焼きのり、青のり、ふのりといったのり類に偽陽性が確認されていない旨は示されていたが、味付けのりに関する偽陽性情報は確認できなかった。しかし、一般に、味付けのりには醤油、調味料等が使用されているため、抗原抗体反応を利用した検査法である ELISA 法において、非特異反応が生じる可能性は否定できない。そこで、PCR 法による確認検査を行った。

3.1.2 PCR 法による確認検査

PCR 法による確認検査の結果を表 3 に示す。通知法⁴⁾に従い、2 点併行で行ったが、植物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅では、1 点の増幅バンドが確認できなかった（図 1）。のり製品からの抽出 DNA による、植物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅においては、抽出 DNA 中に PCR 阻害物質の存在が示唆されることが報告されている⁸⁾ことから、本確認検査においても PCR 増幅が確認できなかった抽出 DNA 中に PCR 阻害物質が存在する可能性が考えられた。このため、植物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅で陽性と判断できた 1 検体により、落花生 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅を行ったが、増幅バンドの確認はできなかった（図 2）。従って、味付けのりからは、落花生遺伝子は不検出であると判断した。

表3 PCR法での落花生の確認検査結果（平成26年度）

NO.	製品名	ELISA 法の検査項目		PCR 確認	
		モリナガ ^{*1}	日本ハム ^{*2}	植物 DNA	落花生 DNA
1	味付けのり	不検出	8 μ g/g	+	-

検出限界値：1 μ g/g (10 μ g/g 以上が陽性)

*1：モリナガ FASPEK エライザ II 特定原材料測定キット

*2：FASTKIT エライザ Ver. III キット

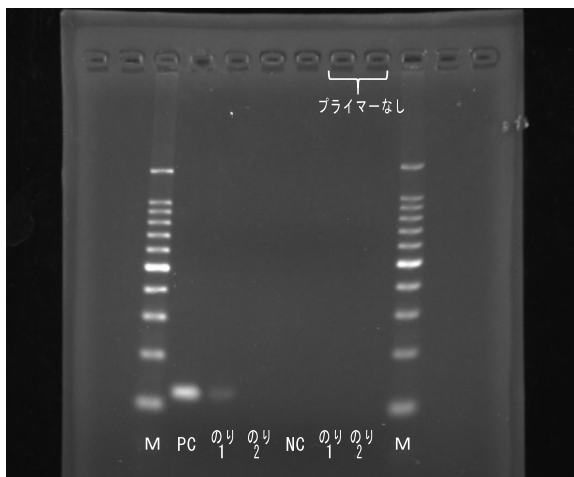


図1 植物 DNA 検出用電気泳動

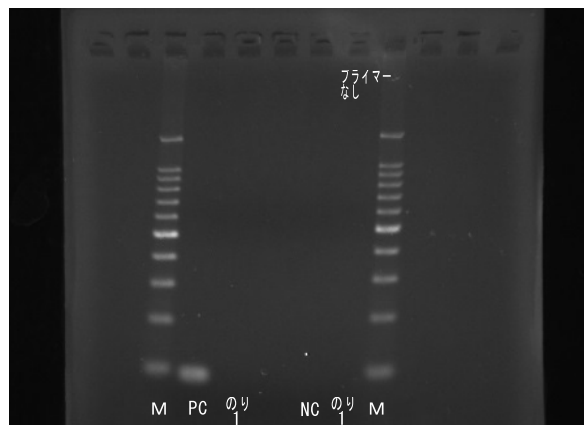


図2 落花生 DNA 検出用電気泳動

これらの結果を勘案すると、今回、FASTKIT エライザ Ver. キットを用いた ELISA 法で、味付けのり検体から落花生が $8 \mu\text{g/g}$ 検出された結果は、何らかの非特異反応による偽陽性であると考えられた。

3.2 平成 27 年度の調査結果

3.2.1 ELISA 法によるスクリーニング検査

県内で試買した 21 検体を検査に供した。小麦については「小麦」の表示がなされていた 5 検体を除く 16 検体を、落花生については全ての検体を検査した（表 2）

その結果、小麦の検査における米粉麺 1 検体から、モリナガ FASPEK エライザ 特定原材料測定キット及び FASTKIT エライザ Ver. キットで、それぞれ $36 \mu\text{g/g}$ 及び $32 \mu\text{g/g}$ が検出されたため、通知法⁴⁾に従い、当該検体を陽性とした。なお、その他の検体（小麦 15 検体、落花生 21 検体）については全て陰性とした。

3.2.2 PCR 法による確認検査

PCR 法による確認検査結果を表 4 に示す。ELISA 法によるスクリーニング検査で小麦陽性となった米粉麺は、確認検査でも小麦遺伝子が検出され、陽性と確定した。当該検体には、製造工場で小麦を含む製品を製造している旨の注意喚起表示がなされていたことから、製造工程におけるコンタミネーションが原因であることが推測されたため、食品衛生監視員からコンタミネーション防止対策の徹底⁸⁾について指導が行われた。

4 まとめ

平成 26 年度に実施したアレルギー物資を含む食品の試買検査では、落花生 20 検体及びえび・かに 19 検体の検査を行ったが、ELISA 法による検査の結果、いずれの検体も陰性であった。

なお、味付けのりの FASTKIT エライザ Ver. キット

を用いた ELISA 法による落花生の検査の結果は、 $8 \mu\text{g/g}$ であったが、PCR 法による確認検査では陰性であり、ELISA 法による検出値は偽陽性と判断した。また、味付けのりの加工所においても、食品衛生監視員が調査を行ったところ、落花生の使用、持ち込み等は確認されなかった。

平成 27 年度に実施したアレルギー物質を含む食品の試買検査では、小麦 16 検体及び落花生 21 検体の検査を行い、ELISA 法による検査の結果、小麦の 15 検体及び落花生の 21 検体についてはいずれも陰性であったが、小麦については、米粉麺が陽性であったため、PCR 法で確認検査を実施した。その結果、ELISA 法で小麦の陽性を示した米粉麺は、PCR 法でも陽性であることが確認された。米粉麺の製造所では、うどんの製造も行っており、うどんに使用する小麦が微量に混入した可能性が高く、食品衛生監視員からコンタミネーション防止対策の徹底⁸⁾について指導が行われた。

謝 辞

本件の調査に際して、検体試買等に携わった岡山県保健福祉部生活衛生課及び県下保健所衛生課の皆様へ感謝申し上げます。

文 献

- 1) 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行について、食発第 79 号，平成 13 年 3 月 15 日，2001（最終改正 消食表第 257 号，平成 25 年 9 月 20 日）
- 2) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課長 / 監視安全課長連名通知：アレルギー物質を含む食品に関する表示について、食企発第 2 号・食監発第 46 号，平成 13 年 3

月 21 日，2001（最終改正 消食表第 257 号，平成 25 年 9 月 20 日）

- 3) 岡山県ホームページ：保健福祉部生活衛生課食の安全推進班“岡山県食品衛生監視指導計画と結果”<http://www.pref.okayama.jp/page/detail-3088.html>
- 4) 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，消食表第 286 号，平成 22 年 9 月 10 日，2010（最終改正 消食表第 36 号，平成 26 年 3 月 26 日）
- 5) 新家薫子，清水隆二，芹川俊彦，安田和弘，竹田正美ら：特定原材料検査における DNA 抽出法の検討（第 2 報），石川県保健環境センター年報，48，42-48，2011
- 6) 橋本博之，中西希代子，眞壁祐樹，宮本文夫，長谷川康行ら：特定原材料検査における海苔製品からの DNA 抽出法の検討，第 46 回全国衛生化学技術協議会年会講演集，106-107，2009
- 7) 日本ハム中央研究所：「FASTKIT エライザ Ver. シリーズ」において偽陽性・偽陰性を示す食品一覧
<http://www.rdc.nipponham.co.jp/fastkit/3-foods-list.html>
- 8) 厚生労働省医薬局食品安全部基準審査課長 / 監視安全課長連名通知：アレルギー物質のコンタミネーション防止対策の徹底について，食安基発第 1118001 号・食安監発第 1118001 号，平成 15 年 11 月 18 日，2003