

平成26及び27年度における北海道産加工食品中の アレルギー物質のモニタリング検査について

The Monitoring Test for Allergenic Materials in Processed Foods Produced in Hokkaido
in Fiscal Years 2014 and 2015

菅野 陽平 青塚 圭二 鈴木 智宏

Yohei SUGANO, Keiji AOTSUKA and Tomohiro SUZUKI

Key words : food allergy (食物アレルギー) ; processed food (加工食品) ; ELISA (エライザ法) ;
PCR (PCR法) ; western blotting (ウエスタンブロット法)

近年、食物アレルギーの有症者数は増加傾向を示しており、その重篤な症状を呈する健康被害は広く知られている。食物アレルギー患者は、アレルギー物質の摂取を可能な限り避けることが極めて重要である²⁾。食品の適切な原材料表示は、食品中のアレルギー物質に関する情報を提供し、食物アレルギー患者にとって摂取可能な食品の選択基準となり、アレルギー症状の発症を防ぐとともに食品の選択肢も広げることに役立つ。

消費者の健康被害の発生を防止する観点から、現在は特定原材料7品目(小麦、そば、落花生、卵、乳、えび、かに)の表示が義務付けられており、これら特定原材料に準ずるものとして20品目(あわび、いか、いくら、オレンジ、カシューナッツ、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、ごま、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン)の原材料について表示が奨励されている³⁾。

北海道では、平成16年度から道内で製造された加工食品におけるアレルギー物質のモニタリング検査を実施している。我々は平成16年度から平成25年度に実施した検査において、陽性と確認された事例が表示義務に対する認識の欠如や製造工程における混入(コンタミネーション)によるものであることを報告してきた⁴⁻⁹⁾。今回は平成26及び27年度に行った検査についてその結果を報告する。

方 法

1. 試験品

北海道内で製造された加工食品を検査対象とした。平成26年度は21の保健行政室及び地域保健室(以下、保健所と表記)が35試験品を、平成27年度は17の保健所が30試験品をそれぞれ管内製造施設にて収去した。これらの試験品の中で要冷凍・要冷蔵のものについては、温度記録装

置を同梱して搬送中の温度管理を行った。

2. 一次スクリーニング検査

1) 試料溶液の調製

試料溶液の調製と測定は消費者庁通知¹⁰⁾(以下、通知法と略記)の通り、各ELISAキットの説明書に従って行った。最初に試験品をフードプロセッサー(松下産業¹¹⁾製、MK-K78)を用いて均質化した。均質化した試験品1gを50mLの共栓付きディスポーザブル遠沈管に精秤し、19mLの抽出液(ELISAキットの3液を混合して調製)を加えてpHを6.0~8.0に調整後、水平状態に固定し、1分間あたり90~110往復、室温(20~25°C)で18~20時間振とうし、試験品からタンパク質の抽出操作を行った。抽出液は遠心分離(3,000×g, 20分間)し、上清をろ紙(5A, 110mm)でろ過して試料溶液とした。

2) ELISA 検査

特定原材料7品目(小麦、そば、落花生、卵、乳、えび、かに)の混入の有無を判定する一次スクリーニング法には、これらの精製タンパク質もしくは複合タンパク質を抗原として作製された抗体を使用したELISA法を用いた。

平成26年3月26日付け消費者庁通知¹¹⁾により、抽出液の組成が毒物である2-メルカプトエタノールを含有したものから、含まないものに変更された。そこで、平成26年度の検査から以下の2-メルカプトエタノール不使用のELISAキットを用いた。

小麦、そば、落花生、卵、乳の一次スクリーニング検査は、¹²⁾森永生科学研究所製モリナガFASPEKエライザII特定原材料測定キット(以下、モリナガと略)(小麦グリアジン、そば、落花生、卵白アルブミン、カゼイン)及び日本ハム¹³⁾中央研究所製日本ハムFASTKITエライザVer.IIIシリーズキット(以下、日ハムと略)(小麦、そば、落花生、卵、牛乳)を用いて行った。

また、えびとかにの一次スクリーニング検査については、えびとかにの共通タンパク質トロポミオシンを検出するマルハニチロ(株)製甲殻類キット II「マルハニチロ」(以下、マルハと略)及び日水製薬(株)製 FA テスト EIA-甲殻類 II「ニッスイ」(以下、ニッスイと略)の2種類の ELISA キットを用いて行った。この一次スクリーニング検査では、えびとかには「えび・かに」としてまとめて検出される。

各 ELISA キットを用いた検査では、試験品から抽出した試料溶液を検体希釈液で 20 倍に希釈し、ELISA 法用 96 穴マイクロプレートに負荷した。1 次抗体、2 次抗体、発色基質などを順次反応させ、コロナ電機(株)製 MTP-310Lab 型マイクロプレートリーダーにて吸光度測定を行い、データ解析用ソフト SF6 を用いて、4 係数 Logistic 解析により特定原材料由来タンパク質含有量を算出した。特定原材料由来のタンパク質含有量が、検量線下限値(モリナガ、日ハム、マルハ、ニッスイ共に:0.3 µg/g)未満を「検出せず」とし、判定基準と定められている 10 µg/g 以上を示した試験品を陽性と判定した。なお、1 回目の測定値が 8~12 µg/g の場合は、均質化した試験品から再度試料溶液を調製し、同様に測定を行い、2 回の平均値が 10 µg/g 以上の場合に陽性と判定した。

3. 確認検査

一次スクリーニング検査の ELISA 法にて、10 µg/g 以上の特定原材料由来タンパク質の混入が認められた試験品については確認検査を行うこととされている¹⁰⁾。確認検査として、小麦、そば、落花生については PCR 法が、卵(オボアルブミン、オボムコイド)、乳(カゼイン、β-ラクトグロブリン)にはウエスタンブロット法が指定されている。なお、えびとかには、一次スクリーニング検査の ELISA 法では「えび・かに」として検出され、PCR 法による確認検査においてえび及びかにの判別を行うこととされている。

1) PCR 法による小麦の確認検査

通知法¹⁰⁾に従って PCR 法による確認検査を行った。均質化した試験品 2g を精秤し、CTAB 抽出法、シリカゲル膜(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)抽出法及びイオン交換樹脂カラム(QIAGEN Genomic-tip 20/G)抽出法により DNA を抽出した。PCR 反応には、オリエンタル酵母工業(株)製のキットに含まれる DNA 抽出の可否を判定するための植物 DNA 増幅プライマーセットと小麦遺伝子確認用プライマーセットをそれぞれ使用した。また、陽性コントロールは同キットに付属していたものを用いた。DNA 増幅のための反応液は、最終濃度が 1×PCR Buffer, 1.5 mM 塩化マグネシウム, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM センスプライマー, 0.2 µM アンチセンスプライマー, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 社製)を 0.025 Units/µL, DNA 2 ng/µL となるよう調製し、全量を 25 µL とした。PCR 反応は、95°C10 分間保持後、95°C30 秒間, 60°C30 秒間, 72°C30 秒間を 1 サイクルとして 40 サイクル、最後に 72°C 7 分間の条件で行った。得ら

れた反応液を 3%アガロースゲル(0.01%GelRed(和光純薬工業(株)含有)による電気泳動で分離した。DNA マーカーは、Gene Ladder 100(ニッポンジーン)を用いた。アガロースゲル電気泳動により分離後のゲルを UV 下で確認し、小麦遺伝子の泳動バンドの位置(141 bp)に増幅産物の明瞭なバンドが認められた場合を陽性とした。

2) ウエスタンブロット法による乳の確認検査

通知法¹⁰⁾に従ってウエスタンブロット法による確認検査を行った。乳の確認検査には2種のモリナガ牛乳ウエスタンブロットキット、カゼイン検出用及びβ-ラクトグロブリン検出用をそれぞれ使用した。試料溶液は「2. 試料溶液の調製」の項に従い、均質化した試験品に対してウエスタンブロットキットの抽出溶液3液を混合した2-メルカプトエタノール含有抽出液を用い、同様の手順で調製した。

試料溶液 100 µL にローディングバッファー(和光純薬工業(株)製) 200 µL を加えて、よく攪拌した後、100°Cで5分間加熱した。冷却後その 20 µL をテフコ(株)製 15%SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライし、定電流・定電圧電源(株)BIOCRAFT 製, BP-550)を用いて 20 mA の定電流で電気泳動(泳動装置:テフコ(株)製, STC-808)を行った。泳動後ゲルはアマシャム・バイオサイエンス社製 PVDF 膜 Hybond-P に重層し、転写装置(テフコ(株)製 STB-88)を用いて、PVDF 膜 1 cm²あたり約 2 mA の電流値で1時間転写を行った。転写した PVDF 膜には、モリナガ製ウエスタンブロットキットの1次抗体溶液(終濃度 0.5 µg/mL)、2次抗体溶液(VECTOR 社製, VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit のビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体を 10,000 倍に希釈したもの)、アルカリホスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液(VECTOR 社製, VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit)、検出試薬(VECTOR 社製, Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV <BCIP/NBT>)を順次反応させ、免疫染色を行った。

同じゲル上に、キットに付属の標準試料溶液(タンパク質濃度 10, 1.0 及び 0.5 µg/mL)をアプライし、同様に操作した後、標準品と同じ分子量位置に明瞭なバンドが認められた場合を陽性とした。

結果及び考察

1. 平成 26 年度の検査結果

平成 26 年度に検査を実施した 35 試験品の検査結果を表 1 に示した。小麦を検査対象とした試験品では、No.6「洋生菓子」から小麦タンパク質がモリナガ及び日ハムの各 ELISA キットでそれぞれ 2.2 及び 1.4 µg/g 検出されたが、アレルギー症状を引き起こす恐れが生じ始める 10 µg/g 未満であった。また、そばを検査対象とした試験品及び落花生を検査対象とした試験品については、微量の特定原材料由来タンパク質が検出されたものも認められたが、いずれにおいても基準値以下であり陰性と判定された。

表1 平成26年度アレルギー物質モニタリング検査結果

No.	名称	特定原材料	ELISA 検査(μg/g)		確認検査 (PCR 法)
			モリナガ	日ハム	
1	和菓子	小麦	ND	ND	—
2	トマトケチャップ	小麦	ND	ND	—
3	菓子	小麦	ND	ND	—
4	漬物	小麦	ND	ND	—
5	魚肉練り製品	小麦	ND	ND	—
6	洋生菓子	小麦	2.2	1.4	—
7	清涼飲料水	小麦	ND	ND	—
8	清涼飲料水	小麦	ND	ND	—
9	めん	そば	ND	ND	—
10	めん類	そば	0.64	0.67	—
11	菓子	そば	ND	ND	—
12	菓子類	落花生	ND	0.36	—
13	菓子類	落花生	ND	0.6	—
14	焼菓子	落花生	ND	ND	—
15	パン	落花生	ND	ND	—
16	アイスクリーム	落花生	ND	ND	—

No.	名称	特定原材料	ELISA 検査(μg/g)		確認検査(ウェスタンブロット法)	
			モリナガ	日ハム	1	2
17	菓子	乳	35	17	陽性	陽性
18	菓子	乳	ND	ND	—	—
19	パスタソース	乳	ND	ND	—	—
20	焼菓子	乳	33	11*	陽性	陰性
21	食肉製品	乳	ND	ND	—	—
22	菓子	乳	23	18	陽性	陽性
23	清涼飲料水	乳	ND	ND	—	—
24	焼菓子	乳	ND	ND	—	—
25	めん	卵	2.3	2.4	—	—
26	冷凍食品	卵	ND	ND	—	—
27	清涼飲料水	卵	ND	ND	—	—
28	菓子	卵	ND	ND	—	—

No.	名称	特定原材料	ELISA 検査(μg/g)		確認検査 (PCR 法)
			マルハ	ニッスイ	
29	魚肉練り製品	えび・かに	0.41	0.42	—
30	魚肉練り製品	えび・かに	0.42	0.41	—
31	菓子	えび・かに	ND	ND	—
32	魚肉練り製品	えび・かに	ND	ND	—
33	そうざい	えび・かに	0.88	0.65	—
34	魚肉練り製品	えび・かに	0.33	ND	—
35	そうざい	えび・かに	ND	ND	—

乳の確認検査1：カゼイン，確認検査2：β-ラクトグロブリン
卵の確認検査1：オボアルブミン，確認検査2：オボムコイド
ND：0.3 μg/g 未満。—：検査せず。

※2回測定した平均値（日ハム 1回目 11，2回目 10）

乳を検査対象とした試験品では，乳タンパク質が各 ELISA キットで No.17「菓子」からそれぞれ 35 及び 17 μg/g，No.20「焼菓子」から 33 及び 11 μg/g，No.22「菓子」から 23 及び 18 μg/g 検出された。そこで，図1及び2に示したように，この3件の試験品についてウェスタンブロット法による確認検査を行った。その結果，No.17及び22（共に「菓子」）からカゼイン及びβ-ラクトグロブ

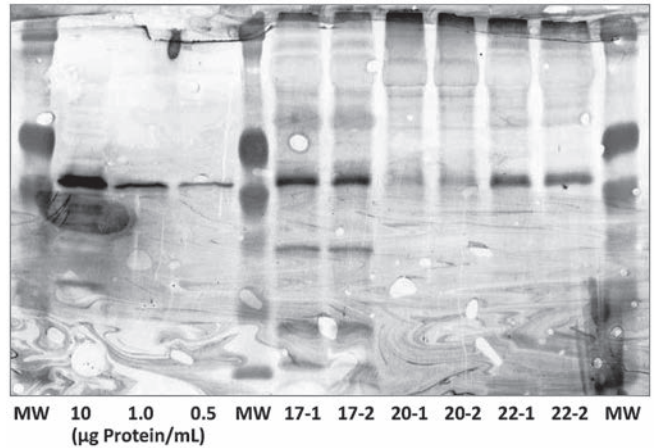


図1 ウェスタンブロット法による乳の確認検査（カゼイン）

レーン MW：分子量マーカー，レーン 10，1.0，0.5：乳標準試料 10，1.0 及び 0.5 μg タンパク質/mL（各 20 μL アプライ），レーン 17-1 及び 17-2：試料 No.17（各 20 μL アプライ），レーン 20-1 及び 20-2：試料 No.20（各 20 μL アプライ），レーン 22-1 及び 22-2：試料 No.22（各 20 μL アプライ）

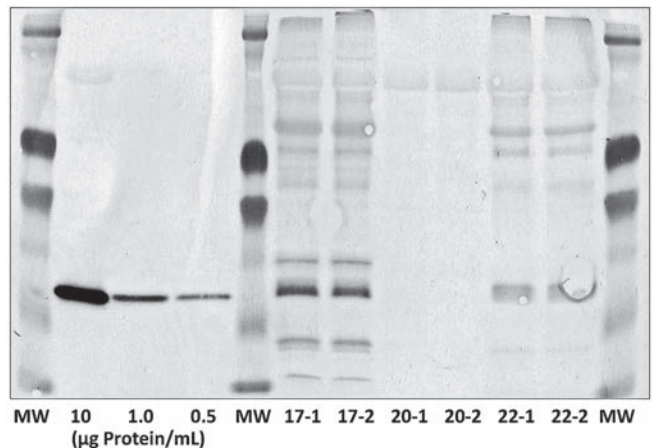


図2 ウェスタンブロット法による乳の確認検査（β-ラクトグロブリン）

レーン：図1に同じ。

リンの両タンパク質が検出され，また No.20「焼菓子」では，β-ラクトグロブリンは検出されなかったが，カゼインが検出されたため，これらの試験品は陽性と判定された。

当該製品の製造施設を管轄する保健所の調査から，No.17「菓子」については，製造時に原料として使用する豆乳が不足し，代替として牛乳を添加したこと，No.20「焼菓子」については，一括表示の内容と実際に使用した原材料が一部異なっており，一括表示にない「植物油加工品」にアレルギー物質「乳」が含まれていたことが判明した。No.22「菓子」は，原材料として使用していた品質改良剤が変更になり，新たに使用したものに乳成分が含まれていたが確認を怠っていたとのことであった。

また，えびとかにの甲殻類を検査対象とした7試験品の

表2 平成27年度アレルギー物質モニタリング検査結果

No.	名称	特定原材料	ELISA 検査(μg/g)		確認検査(PCR法)
			モリナガ	日ハム	
1	漬物	小麦	ND	ND	—
2	菓子類	小麦	ND	ND	—
3	魚練り製品	小麦	1.3	1.1	—
4	ジャム	小麦	ND	0.33	—
5	菓子類*	小麦	9.7	8.2	—
6	めん類	そば	2.0	3.0	—
7	めん類	そば	1.4	1.6	—
8	めん類	そば	2.8	2.7	—
9	ドライトマト	そば	0.49	ND	—
10	菓子類	落花生	ND	ND	—
11	菓子類	落花生	ND	ND	—
12	菓子類	落花生	ND	ND	—
13	菓子類	落花生	ND	ND	—

No.	名称	特定原材料	ELISA 検査(μg/g)		確認検査(ウェスタンブロット法)	
			モリナガ	日ハム	1	2
14	菓子	乳	ND	ND	—	—
15	みそ	乳	ND	ND	—	—
16	菓子類	乳	ND	ND	—	—
17	菓子類	乳	90	85	陽性	陽性
18	菓子類	乳	ND	ND	—	—
19	菓子類	乳	ND	0.92	—	—
20	食肉	卵	ND	ND	—	—
21	パン	卵	ND	ND	—	—
22	食肉製品	卵	ND	ND	—	—
23	菓子類	卵	ND	ND	—	—
24	ジャム	卵	ND	ND	—	—

No.	名称	特定原材料	ELISA 検査(μg/g)		確認検査(PCR法)
			マルハ	ニッスイ	
25	そうざい	えび・かに	1.1	1.8	—
26	魚肉練り製品	えび・かに	ND	ND	—
27	食肉製品	えび・かに	ND	ND	—
28	魚肉練り製品	えび・かに	0.32	ND	—
29	魚肉練り製品	えび・かに	1.5	1.2	—
30	魚肉練り製品	えび・かに	1.2	1.1	—

乳の確認検査1：カゼイン，確認検査2：β-ラクトグロブリン
卵の確認検査1：オボアルブミン，確認検査2：オボムコイド
ND：0.3 μg/g 未満。—：検査せず。

* 2回測定した平均値（モリナガ 1回目 9.5，2回目 9.8；
日ハム 1回目 9.0，2回目 7.5）

一次スクリーニング検査では，4試験品からマルハもしくはニッスイのELISAキットで微量の甲殻類由来タンパク質が検出されたが，いずれも基準値以下であり陰性と判定された。

2. 平成27年度の検査結果

平成27年度に検査を実施した30試験品の検査結果を表2に示した。小麦を検査対象とした5試験品については，No.5「菓子類」において小麦タンパク質をモリナガ及び日ハムの各ELISAキットでそれぞれ9.7及び8.2 μg/gを検知したが基準値以下であったため陰性と判定された。

そばを検査対象とした試験品の一次スクリーニング検査

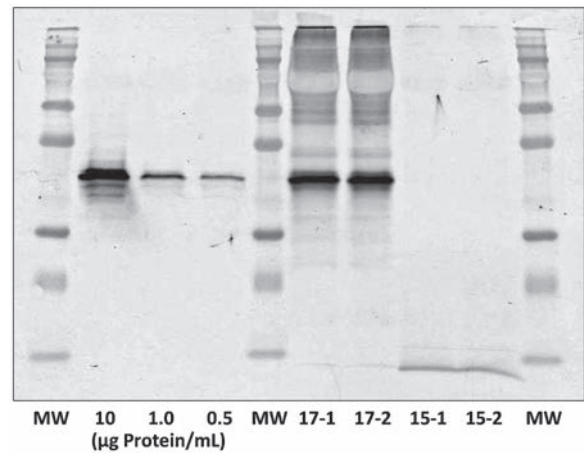


図3 ウェスタンブロット法による乳の確認検査（カゼイン）

レーン MW：分子量マーカー，レーン 10，1.0，0.5：乳標準試料 10，1.0 及び 0.5 μg タンパク質/mL（各 20 μL アプライ），レーン 17-1 及び 17-2：試料 No.17（各 20 μL アプライ），レーン 15-1 及び 15-2：試料 No.15（陰性コントロール；各 20 μL アプライ）

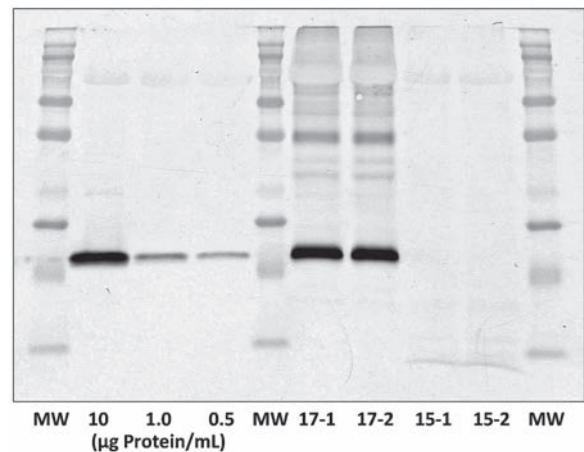


図4 ウェスタンブロット法による乳の確認検査（β-ラクトグロブリン）

レーン：図3に同じ。

では，No.6，7 及び 8（いずれも「めん類」）から各 ELISA キットで 1.4～3.0 μg/g のそば由来タンパク質が検出されたが，いずれも基準値以下であり陰性と判定された。また，落花生を検査対象とした一次スクリーニング検査では，すべての試験品で検量線下限値（0.3 μg/g）未満であり落花生タンパク質は検出せずとなった。

乳を検査対象とした試験品については，No.17「菓子類」において，乳タンパク質が各 ELISA キットでそれぞれ 90 及び 85 μg/g 検出されたことから，ウェスタンブロット法による確認検査を行った。その結果，図3及び4に示したとおり，カゼイン及びβ-ラクトグロブリンの両タンパク質が検出されたため陽性と判定された。当該製品は保健所の調査から，誤って乳成分を含む添加物を使用していたことが判明した。

えびとかにを検査対象とした試験品では、No.25「そうざい」、No.29及び30(共に「魚肉ねり製品」)からマルハ及びニッスイの各ELISAキットで1.1~1.8 $\mu\text{g/g}$ のえび・かに由来タンパク質が検出されたが、いずれも基準値以下であり陰性と判定された。

さらに、前述した小麦を検査対象とした一次スクリーニング検査で、9.7及び8.2 $\mu\text{g/g}$ と陰性ながら基準値である10 $\mu\text{g/g}$ に近い小麦含有量を検知した試験品No.5「菓子類」について、予備検査としてPCR法による確認検査を実施した。その結果、3種類のDNA抽出法で抽出したいずれのDNAにおいても小麦遺伝子は検出されなかった。後日、保健所の聞き取りにより、当該製品は小麦を使用した商品の製造後に製造されていたことから、微量の小麦タンパク質が混入した可能性が示唆された。これまでELISA法による一次スクリーニング検査で10 $\mu\text{g/g}$ 未満の特定原材料が検出された試験品をPCR法に供した場合、特定原材料由来DNAの増幅が認められた事例があった⁴⁾。しかし、本試験品では小麦由来DNAの量がPCR法による確認検査では増幅できないほど微量であったため、小麦遺伝子を検出できなかったと考えられた。これは、小麦由来DNAの混入量のごくわずかであったか、食品加工工程においてDNAの分解が生じたため、もしくはその両方の原因によると思われる。今後、このような試験品に対しても特定原材料の混入を確認する検査法の検討が必要であると考えられる。

3. 総括

平成26年度及び27年度の北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査では、乳を対象とした検査において、合計4件の陽性試験品が確認された。その内2件の事例(平成26年度のNo.17「菓子」及びNo.20「焼菓子」)に関しては、一括表示に記載されていない原材料を使用したことによる混入であった。残る2件(平成26年度No.22「菓子」及び平成27年度No.17「菓子類」)については、製品に使用していた添加物製剤を変更した際に、アレルギー物質の有無について確認を怠ったための混入であった。いずれの場合も、食品表示に関する認識不足が原因であると考えられる。

また、平成26年度及び27年度の検査結果で陰性と判定された試験品の中にも一次スクリーニング検査で数 $\mu\text{g/g}$ の特定原材料由来タンパク質が検知されたものが複数あった。食物アレルギーは、微量でも症状を呈する可能性があることから、製造者は製造工程における特定原材料由来タンパク質の混入防止に努めると共に、使用する原材料や食品添加物に含まれる特定原材料の確認を徹底し、細心の注意を払う必要がある。

食物アレルギーを含むアレルギー疾患の患者数の増加を

受けてアレルギー疾患対策基本法が平成26年6月に公布され、平成27年12月より施行された¹²⁾。わが国においても食品に含まれるアレルギー物質の表示充実をより一層図っていく考えであることから、今後も継続して食品中のアレルギー物質のモニタリング検査を実施していく必要がある。

本モニタリング検査において、試験品採取及び調査にご協力を頂きました北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課食品安全グループ及び道立保健所の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 文部科学省食物アレルギーに関する調査結果について：「学校生活における健康管理に関する調査」中間報告、http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/25/12/1342460.htm (確認：2016年10月3日)
- 2) 伊藤節子：食物アレルギーの診断と治療の標準化。アレルギー、55, 1491-1496 (2006)
- 3) 消費者庁次長通知消費表第139号「食品表示基準について」、平成27年3月30日
- 4) 兼俊明夫, 林 隆章, 田沢悌二郎, 加藤芳伸, 平間祐志, 藤本 啓, 斉藤明子, 鈴木智宏, 孝口裕一, 小川 広：平成16及び17年度における北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査について。道衛研所報, 56, 61-66 (2006)
- 5) 兼俊明夫, 林 隆章, 平間祐志, 加藤芳伸, 鈴木智宏, 孝口裕一, 小川 広：平成18及び19年度における北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査について。道衛研所報, 58, 37-41 (2008)
- 6) 兼俊明夫, 林 隆章, 平間祐志, 加藤芳伸, 鈴木智宏, 孝口裕一, 長南隆夫, 小川 広：北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査について。北海道公衆衛生学雑誌, 23(1), 第61回北海道公衆衛生学会抄録集, 98 (2009)
- 7) 兼俊明夫, 林 隆章, 平間祐志, 加藤芳伸, 鈴木智宏, 孝口裕一, 長南隆夫：平成20及び21年度における北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査について。道衛研所報, 60, 39-43 (2010)
- 8) 兼俊明夫, 鈴木智宏, 孝口裕一, 藤本 啓, 林 隆章, 田沢悌二郎, 桂 英二, 長南隆夫：平成22及び23年度における北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査について。道衛研所報, 62, 71-75 (2012)
- 9) 菅野陽平, 兼俊明夫, 鈴木智宏：平成24及び25年度における北海道産加工食品中のアレルギー物質のモニタリング検査について。道衛研所報, 64, 35-38 (2014)
- 10) 消費者庁次長通知消費表第286号「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」、平成22年9月10日
- 11) 消費者庁次長通知消費表第36号「「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」の一部改正について」、平成26年3月26日
- 12) 厚生労働省健康局長通知健発1202第9号「アレルギー疾患対策基本法の施行について(施行通知)」, 平成27年12月2日