

## アレルギーを含む特定原材料「小麦」の検査方法の検討

山口県環境保健センター

仙代 真知子・辻本 智美・山根 泉\*<sup>1</sup>・増井 陽介\*<sup>2</sup>・藤井 千津子・田中 和男

\*<sup>1</sup>現 生活衛生課 \*<sup>2</sup>現 薬務課

### Examination of the Method for Detection of Wheat as an Allergenic Substance in Food

Machiko SENDAI, Tomomi TSUJIMOTO, Izumi YAMANE\*<sup>1</sup>, Yousuke MASUI\*<sup>2</sup>, Chizuko FUJII, Kazuo TANAKA

Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

\*<sup>1</sup>Environmental Health Division \*<sup>2</sup>Pharmaceutical Division

#### はじめに

小麦は、食物アレルギーを引き起こす食品であることから「特定原材料」として定められ、小麦を含む食品は、その表示を義務付けられている。表示を検証するための検査法<sup>1)</sup> (以下、「通知法」という。)は、「判断樹」(図1)に従い、スクリーニング(定量)検査で陽性(タンパク含量が10ppm以上)の場合、確認検査をすることとされている。スクリーニング検査結果及び確認(定性)検査結果等の組合せで行政措置の要否が判断される。当センターにおいて、スクリーニング検査が陽性、確認検査が陰性となった例があったこと、他の検査機関において、確認検査で検知不能となる例が報告されていることから、確認検査方法の検討を行った。

#### 調査方法

##### (1) モデル食品の調製とスクリーニング検査

モデル食品は、当センターでスクリーニング検査が陽性、確認検査が陰性となったよもぎ大福とした。抽出条件やPCR条件の比較で結果に差が出るか判定する必要があるため、0~20ppm程度の小麦タンパクを含むよう調製し、スクリーニング検査を行った。(表1)

表1 モデル食品の調製

材料	よもぎ(茹でたもの) 2g だんご粉(砂糖入り) 5g あんこ 10g 水 34g 小麦
調製方法	①だんご粉、よもぎ、水、小麦(材料の全重量に対して小麦タンパクが各濃度となるように添加)を混合し、電子レンジで加熱する ②あんこを混合し、均一化する 各濃度: 0, 1, 5, 10, 20 ppm(ただし、小麦タンパクは小麦重量の10%として計算)

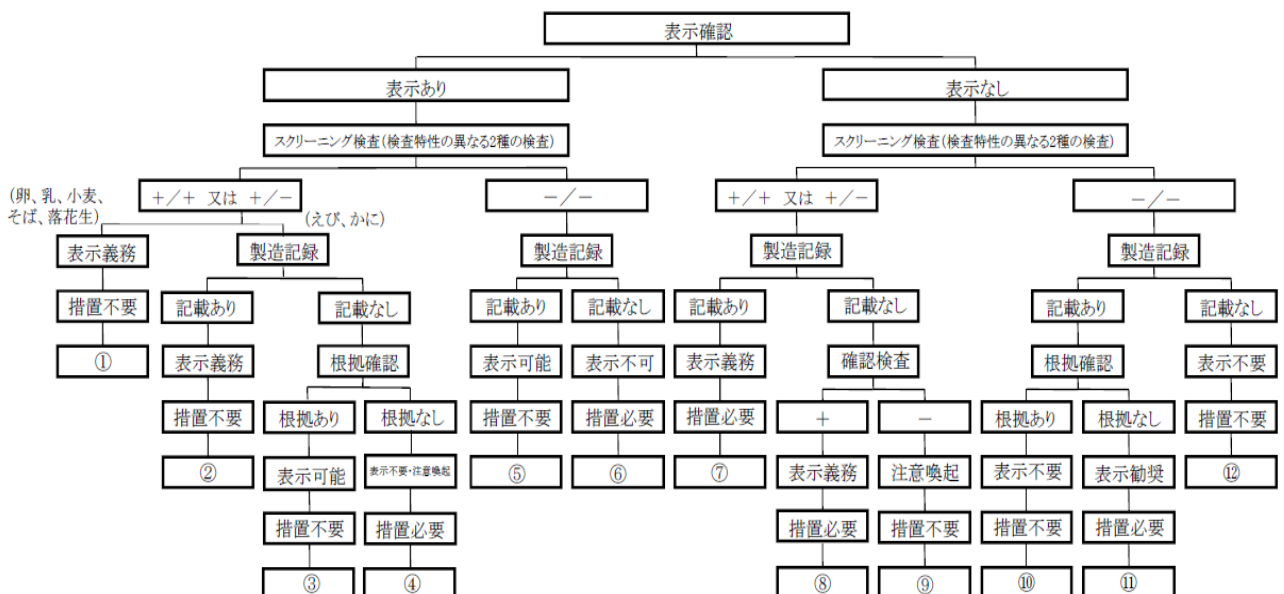


図1 判断樹

(2) 抽出条件の検討

最も品質のよい DNA を得るため、通知法に示された DNA 抽出精製法 (シリカゲル膜タイプキット法、イオン交換樹脂タイプキット法、CTAB 法) を比較した。

(3) PCR 条件の検討

イオン交換樹脂タイプキット法を用いてモデル食品 (小麦タンパク 0, 1, 10 µg/g) から DNA 抽出を行い、得られた DNA 試料液について、プライマーの種類 (「通知法」, 「PRP プライマー法」及び「ネステッド PCR 法」) と濃度について比較した。

ア 通知法

PCR 反応液は、1 x PCR 緩衝液, 0.20 mM dNTP, 1.5 mM 塩化マグネシウム, 0.2 µM F 及び R primer, 及び 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼを含む液に、20 ng/µL に調製した DNA 試料液 2.5 µL (DNA として 50 ng) を加え、滅菌水で全量を 25 µL とした。プライマー濃度は、0.2 (通知法で示された濃度), 0.5 及び 0.7 µM について検討した。

PCR 反応条件及びプライマー対を示す。(表 2, 表 3)

°C	min
95	2
95	0.5
60	0.5
72	0.5
72	7
4	∞

F primer (Wtr01-5')	5'-CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3'
R primer (Wtr10-3')	5'-TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3'
※増幅長	141bp

イ PRP プライマー法

PRP プライマーとは、遺伝子組換えコムギの検査法<sup>2)</sup> で用いられるコムギ陽性対照試験用プライマーの代替プライマーで、小麦に特異性があり、「通知法」よりも増幅長が短いため、PCR の反応性向上を期待して選択した。(表 4)

PCR 反応液及び PCR 反応条件は通知法と同一とした。プライマー濃度は、「ア 通知法」で示したそれぞれの濃度について検討した。プライマー対を示す。(表 4)

F primer (PRP8F)	5'-GCA CCC ATG ATG AGT ACT ACT ATT CTG TA-3'
R primer (PRPs6R)	5'-TGC AAA CGA ATA AAA GCA TGT G-3'
※増幅長	117bp

ウ ネステッド PCR 法

ネステッド PCR 法は、連続した 2 回の PCR により、検出感度と反応特異性が高められる方法で、小麦の検出感度を向上させることが報告されている<sup>3)</sup>。当センターの三浦ら<sup>4)</sup>の方法に従い、1 stPCR の反応液、条件及びプライマー対は、通知法と同一とした。2 ndPCR 反応液は、1 x PCR 緩衝液, 0.20 mM dNTP, 1.8 mM 塩化マグネシウム, 0.4 µM F 及び R primer, 及び 1.25 units Taq DNA ポリメラーゼを含む液に、1 stPCR の反応液を TE で 200 倍希釈した DNA 試料液 2.5 µL を加え、滅菌水で全量を 25 µL とした。2 ndPCR 条件及びプライマー対を示す。(表 5, 6)

°C	min
95	2
95	0.5
60	0.5
72	0.5
72	7
4	∞

F primer (Wtr01NE2-5')	5'-TGG TGG TTG GAA TGG TTT AGA-3'
R primer (Wtr10NE5-3')	5'-GGC ACG CGG ATT GTA TAT GT-3'
※増幅長	97bp

結果

(1) モデル食品の調製とスクリーニング検査

小麦タンパクの濃度が、設定値に近いモデル食品を得たため確認検査の検討に使用した。(表 7)

キット名	モデル食品の小麦設定濃度 (2 併行平均)				
	0ppm	1ppm	5ppm	10ppm	20ppm
モリナガ FASPEK エライザ II	N. D.	1.03	5.02	10.00	18.29
FASTKIT エライザ Ver. III	N. D.	1.50	6.68	12.24	21.95

(2) 抽出条件の検討

当センターでは、様々な食品に対応するため、抽出方法は、CTAB 法を用いているが、よもぎ大福には、イオン交換樹脂タイプキット法が最適であるとわかった。いずれの方法も通知に示された精製度を

満たしていた。（表 8）

方法	DNA 濃度	精製度	操作	時間
シリカゲル膜タイプキット法	高い	満足	容易	短い
イオン交換樹脂タイプキット法	最も高い	満足	やや容易	やや短い
CTAB 法	高い	満足	煩雑	長い

### (3) PCR 条件の検討

0 及び 1ppm の小麦タンパクを含むモデル食品は、全ての方法で陰性であった。

10ppm の小麦タンパクを含むモデル食品において、「PRP プライマー法」及び「通知法」は、プライマー濃度 0.2 及び 0.5  $\mu\text{M}$  で使用した場合、同等の結果であった。「ネステッド PCR 法」では、PCR 増幅産物の確認が可能であった。「通知法」のプライマー濃度を 0.7  $\mu\text{M}$  にすると、「ネステッド PCR 法」と同等に検出した。

### まとめ

抽出条件については、イオン交換樹脂タイプキット法を選択することにより、品質のよい DNA 試料液が得られることから、検知不能となる事例がなくなることが期待される。

PCR 条件については、検出感度と判定に要する時間から、「通知法」のプライマー濃度を変更する方法が望ましいと考えられた。

### 参考文献

- 1) 食品表示基準について（平成 27 年 3 月 30 日付け消費者庁次長通知消食表第 139 号）「別添 アレルゲンを含む食品の検査方法」
- 2) 「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法について（平成 24 年 11 月 16 日食安発 1116 第 3 号）」Ⅱ. 個別検査方法・コムギ（MON71200, MON71100/71300, MON71700, MON71800）の検査方法
- 3) 橋本博之, 真壁祐樹, 長谷川康行, 佐二木順子, 宮本文夫: ネステッド PCR 法を用いた食品中の特定原材料（小麦）の検出, 食品衛生学雑誌, 49, 23-30
- 4) 三浦泉, 川崎加奈子, 津田元彦, 藤原美智子, 立野幸治: ネステッド PCR を用いたアレルギー対応食品中の特定原材料（小麦）の検出について, 山口県環境保健センター所報, 第 52 号, 45-49