

博士学位論文

食物アレルギー表示対象となる特定原材料由来

DNA 検出のための定性 PCR 法に関する研究

(A study of qualitative PCR for detection of DNA from allergenic substance.)

平成 26 年度

(2015 年 3 月)

三重大学大学院地域イノベーション学研究科

橋本 博之

食物アレルギー表示対象となる特定原材料由来 DNA 検出のための
定性 PCR 法に関する研究

目次

第 1 章 緒論	1
研究の背景	3
本研究の目的と構成	24
第 2 章 Multiplex PCR 法を用いた食品中の特定原材料の検出	27
第 3 章 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	41
第 4 章 特定原材料検査における乾燥海苔製品中のえび・かに DNA 検出法の検討	66
第 5 章 総括	87
謝辞	92
引用文献	93

Abstract

Recently, an increasing number of people have been diagnosed with food allergies, and there is a growing social concern in Japan regarding the labeling of allergen-containing foods. Consequently, the Ministry of Health and Welfare of Japan changed the allergen-labeling system by amending the Food Sanitation Law in April 2001. It is now mandatory to label all foods that contain eggs, milk, wheat, buckwheat, peanuts, shrimps/prawns, and crabs; this is performed by the Consumer Affairs Agency (CAA), Government of Japan. The CAA has determined the official Japanese methods for the detection of allergens and validation of labeling, and inspections are being implemented with these methods by the municipalities and prefectural public health centers, Prefectural Institute of Public Health in Japan.

For the screening, the official Japanese methods use enzyme-linked immunosorbent kits and confirm the results with a western blot method for egg or milk, and with a polymerase chain reaction (PCR) method for wheat, buckwheat, peanuts, shrimps/prawns, and crabs. As administrative guidance is required to recall foods that pose a food allergy-related health hazard, it is crucial to perform a highly sensitive, specific, rapid, and simple PCR method to detect allergens. The PCR method is particularly useful and highly sensitive for detecting specific DNA sequences in allergenic substances. However, this method is time consuming due to the complex steps involved.

In order to improve allergen detection, we developed a multiplex PCR method for the simultaneous detection of plant, wheat, buckwheat, and peanut DNAs and a nested PCR method for the highly sensitive detection of wheat DNA, in processed foods. The amplified products generated by multiplex PCR correspond to the allergen labeling displayed on commercially processed foods, and nested PCR detected wheat with a higher sensitivity than the official PCR methods in 11 types of models of processed foods containing 10 µg/g wheat protein and commercially processed foods.

As dried seaweed products frequently contain crustacean proteins (e.g., tropomyosin), we developed a DNA extraction method and a PCR method for the sensitive detection of shrimp/prawn or crab DNAs. This method enables the extraction of DNA at a sufficient yield and purity, is easy to perform, and the detection limit of shrimp/prawn and crab DNAs was 1 µg/g.

We conclude that the results of this study may give a new insight into more rapid administrative responses when health hazards occur. In addition, this study may be applied for the detection and determination of genetically modified organisms in foods and applicable in other PCR-based DNA detection techniques.

第1章 緒論

近年、食物アレルギーの即時型反応を呈する患者が急増している¹⁾ことから、食物アレルギーを誘発する食品表示の要望が高まってきた。これを受けて、厚生労働省は平成8年度から複数年にわたり日本における食物アレルギー原因食品の詳細な調査を実施した。症例数の多さから卵、牛乳、小麦を、アナフィラキシーショックの出現率が高く、症状が重篤²⁾なことから、そばと落花生の5品目を特定原材料と定義付けした。食品衛生法の改正により、平成14年度から原則として流通する全ての食品に表示を義務付けた³⁾。その後、平成20年度に特定原材料としてえびとかにが追加され、現在7品目が表示義務となっている。

食物アレルギー患者への治療は、原因療法として行う「食べること」を目指した食事療法と、出現した症状に対する対症療法からなる⁴⁾。現在のところ原因となる食物を除去した除去食が主な治療法となっている。経口免疫療法が一部試みられているが、アナフィラキシーなどの重篤な副反応の問題や一部の患者では適用できない例も多く、その方法、有効性などについても未だ不明な点が多いことから標準治療法とはなっていない⁵⁾。調理による低アレルゲン化の研究⁷⁾やアレルギー疾患用ミルク⁶⁾等の低アレルゲン化食品の開発などが行われているが、製品数も多くなく、流通網も十分整備されていないことから、患者にとって利用されやすいものとはなっていない⁷⁾。そのため、特定の食品に対してアレルギー反応を呈する患者にとっては、その食品を摂取しないことが最も重要な対症方法となる。しかし、食品製造者の原材料の表示ミスや意図せずに特定原材料が混入していた場合には、原材料表示を参考に食品を選択した患者がアレルギー反応を起こし、症状が重篤な場合には生命の危険にさらされることも想定される。そのため、公的試験研究機関である保健所や地方衛生研究所などは、消費者庁から通知された検査方法(通知法)⁸⁾を基に、工場への立ち入りや流通食品の収去検査などを定期的に行い、特定原材料の表示に関する妥当性確認を行っている。しかし、流通食品のすべてを検査することは不可能であることから、適切なアレルギー表示がされていない食品が流通し、現在においてもアレルギー表示の欠落などによる食品の回収事例が後を絶たない⁹⁾。

通知法のスクリーニング検査ではELISAキットを用い、各種の特定原材料のタンパク質

含有量を個別に測定し、厚生労働科学研究費補助金の研究班（アレルギー表示検討会）において決定された 10 µg/g を閾値として表示の妥当性を確認している。スクリーニング検査ではタンパク質を検出していることから、小麦の検出を行った場合には、表示の義務がない近縁種である大麦、ライ麦、オーツ麦などとの交差反応性を示す。そのため、正確な結果が得られない場合がある⁸⁾。小麦、そば、落花生、えびおよびかには確認検査として、特異性の高い DNA 領域を検出対象とした定性 PCR 法を用い、より厳密な確認を行っている。定性 PCR 法では、試料から DNA を抽出し、その抽出 DNA を鋳型として PCR を行い、電気泳動法により増幅バンドの確認を行う。この方法は、定性能は高いものの検査工程が多く、迅速に結果を出すことは難しい。また、加熱、加圧などの食品加工行程により DNA が分解し、検出が困難となる事例^{10,11)}も報告されており、その他の DNA 抽出方法や検出感度の向上など解決しなければならない課題も多い。流通食品等の定期的な検査だけでなく、特に食物アレルギーの発症事例においては、自主回収等の行政指導を迅速に実施するために、信頼性があり、かつ迅速・簡便な検査方法により原因となる食品を正確に同定することが重要となる。

本研究では、これらの問題を解決するために、小麦、そば、落花生、えびおよびかへの確認検査法である定性 PCR 法の迅速、簡便、高感度化等の検討を行った。ここではまず、本研究の背景として「食物アレルギーの概要」、「厚生労働省の食物アレルギー調査研究班の調査概要」、「食物アレルギー表示制度の概要」、「アレルギー物質を含む食品の検査方法」について紹介し、本論文の目的と論文構成を述べる。

研究の背景

1. 食物アレルギーの概要

1. 1 食物アレルギーの定義

古くから食物アレルギーを表す言葉として“*One man’s food is another man’s poison*”ということわざが使用されている¹²⁾。すなわち、ある人にとっては栄養豊富な食べ物が、ある人にとっては有害な毒となる。食物アレルギー関連の分野では、これまで種々の用語が用いられており、重複や混乱がみられていることから、食物アレルギーの定義を十分に理解して用いることが診断、治療または臨床研究などにおいて重要となる。食物により惹起される生体に不利益な反応 (*Adverse reactions to foods*) としては食物アレルギーだけではなく、様々な分類が存在する (Fig.1)¹³⁾。大きな分類としては、毒性物質による反応 (*Toxic reactions*) と非毒性物質による反応 (*Nontoxic reactions*) に分かれる。毒性物質による反応は誰にでも起こりうる反応であるが、発症症状が似通っていることから、アレルギー反応との区別が困難なことが多い。

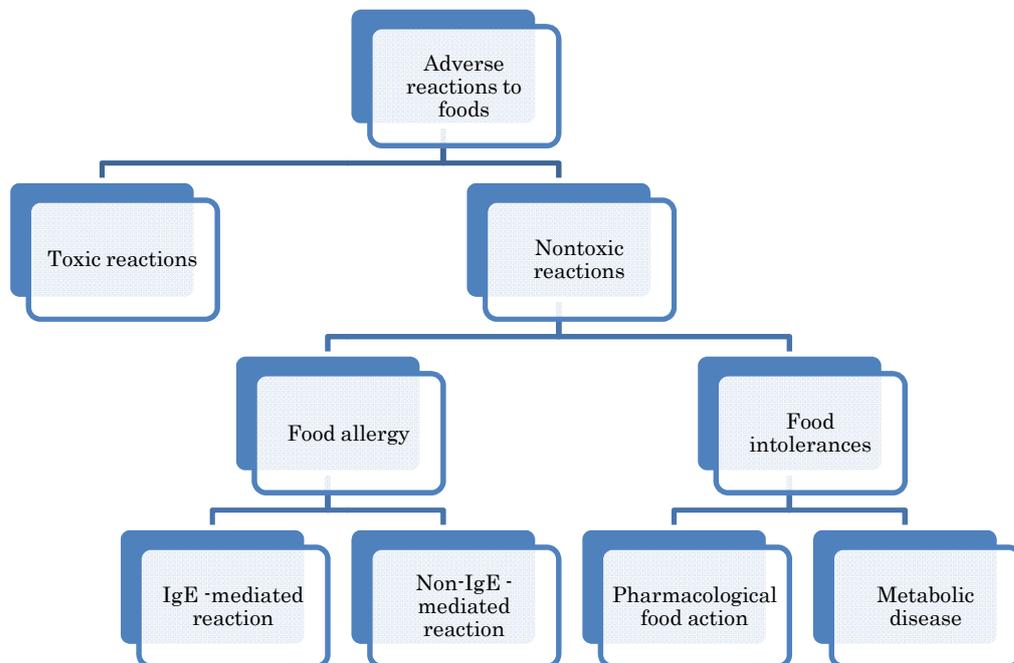


Fig. 1. Classification of adverse reactions to foods

河野陽一, 最新医学別冊新しい診断と治療の ABC26 食物アレルギー免疫 4, 最新医学社 (引用文献 13)

一方、非毒性物質による反応はすべてのヒトに起こる現象ではなく、ある特定のヒトにのみ起こる現象である。この非毒性物質による反応は、さらに免疫学的機序を介した食物アレルギー (Food allergy)と、免疫学的機序を介さない食物不耐症 (Food intolerances)に分けられる。食物不耐症の代表的なものとして乳糖不耐症 (乳糖分解酵素欠損)¹⁴⁾があるが、これは小腸のラクターゼの働きが十分ではなく、乳糖を分解できない、または十分に分解できないことから腹痛や下痢などの症状を呈するものである。乳糖不耐症は、上述の機序により下痢症状がみられることから、しばしば乳製品アレルギーと混同されることが多いが、免疫学的機序を介さないため食物アレルギーとは明確に区別される。また、サバ、カジキ、マグロ、ブリなどのヒスチジンを多く含む魚では、貯蔵温度の管理不良や不適切な取り扱い等により、ヒスチジン脱炭酸酵素を有する *Morganella morganii* 等のヒスタミン生成菌がヒスタミンを多量に産生する。その魚をヒトが摂取することにより発症するヒスタミン中毒も、しばしば食物アレルギーと混同されることが多い。ヒスタミン自体が毛細血管拡張作用をもっていることから食後 30 分から数時間後に顔面紅潮、発疹、吐き気などの症状がみられ、アレルギー様食中毒として報告されるが、免疫学的機序を介さないため、これも明確に食物アレルギーと区別される。

我が国では、これまで食物アレルギーの定義が明確にされていなかったことから、2003 年に日本小児アレルギー学会の食物アレルギー委員会から「原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状(皮膚、粘膜、消化器、呼吸器、アナフィラキシー反応など)が惹起される現象」と定義付けされた¹⁵⁾。現在は、原因食物の摂取ではなく、加水分解小麦の経皮感作により発症したと考えられる石鹼による健康被害事例を考慮し、「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と改訂されている。この食物アレルギーの定義を基に、現在、種々の研究が行われている。

1. 2 食物アレルギーの発症メカニズム

消化管の粘膜表面には、腸管の蠕動運動や胃酸、消化酵素などのバリアー機能や消化粘液中に分泌されている抗原特異的分泌型 IgA 抗体、粘膜表面に存在するマクロファージなどによる粘膜防御 (バリアー) 機構が存在する¹³⁾。通常、ヒトは細菌やウイルスなどを自己

を傷害することなく異物として排除する精巧な免疫機構をもち、この機構により恒常性を保っている。しかし、ヒトが生命を維持するためには、非自己である食物からの栄養分等を摂取することが必須となる。そのため、栄養分の吸収を担う消化管では、これら栄養分を異物としてとらえず、バリアーを通過させるための経口免疫寛容という機能が働いている^{13,16)}。経口的に投与された抗原に対して抗原特異的な免疫学的不応答が誘導される現象が正常に作動しない、つまり経口免疫寛容が正常に働かないときに食物アレルギーが惹起される。

食物アレルギーを誘発する原因抗原のほとんどはタンパク質であり、通常これらは消化酵素によってペプチドやアミノ酸に分解されてから腸管から吸収される。この消化によりほとんどのタンパク質は抗原性を失う。しかし、一部のタンパク質などでは、十分に消化されずに抗原性を保ったまま吸収されることがある。このペプチドが腸管免疫系によって異物として認識され、抗原提示細胞に取り込まれて抗原提示を行い、その結果、抗原情報を持たないナイーブ T 細胞 (胸腺由来リンパ球) はヘルパー T 細胞に分化し、一連の免疫反応が引き起こされることとなる。ヘルパー T 細胞は Th1 細胞および Th2 細胞に分類され、サイトカイン分泌パターンが異なる。

食物アレルギーの典型である I 型アレルギーの場合には、Th1 細胞に比べ、Th2 細胞が優位になる。Th2 細胞はサイトカインである IL-4 (インターロイキン 4)、IL-5、IL-9、IL-13 を産生する^{13,16)}。Th2 細胞が産生した IL-4 は、B 細胞 (骨髄由来リンパ球) を活性化し、活性化された B 細胞は IgE (免疫グロブリン E) 抗体を産生する。IgE 抗体は、血中や組織中のマスト細胞および好塩基球上の高親和性 IgE 受容体 (FcεR I) と結合し、感作が成立する。感作成立後にマスト細胞および好塩基球と結合した IgE 抗体と腸管から再度吸収されたタンパク質が架橋結合することで、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターが放出され、下痢、蕁麻疹、喘鳴、アナフィラキシーなどのアレルギー症状が出現する^{13,16)}。

1. 3 食物アレルギーの臨床型分類

アレルギー反応は、免疫学的機序により、I 型 (即時型)、II 型 (細胞傷害型)、III 型 (免疫複合型)、IV 型 (遅延型) に分けられ、このうち、食物アレルギーは I 型もしくは IV 型によると考えられている¹⁶⁾。一方、臨床型分類では、発症年齢、頻度の高い食物、耐性の獲得、

アナフィラキシーショックの可能性，食物アレルギーの機序などにより Table 1 のとおり分類されている¹⁷⁾。

新生児・乳幼児消化管アレルギー，食物アレルギーの関与する乳児アトピー性皮膚炎，蕁麻疹やアナフィラキシーなどの症状を発症する即時型症状，さらに，小麦，甲殻類等を摂食し，その後の運動負荷によってアナフィラキシー症状が誘発される食物依存性運動誘発アナフィラキシー (food-dependent exercise-induced anaphylaxis:FEIAn or FDEIA)やリンゴ，レタス，セロリなどの果物や野菜などの摂食により，口腔粘膜とその周辺の粘膜組織において接触性蕁麻疹を発症する口腔アレルギー症候群 (oral allergy syndrome:OAS)などの特殊型に分類される。新生児期から乳幼児期にかけて発症する卵，牛乳，小麦や大豆などの小児型食物アレルギーは，主に非 IgE 依存性であり，寛解することが多い。また，食物アレルギーの関与する乳児アトピー性皮膚炎は，卵，牛乳，小麦，ダイズなどを原因食品として発症し，寛解することが多い。蕁麻疹やアナフィラキシーなどの即時型症状は，IgE 依存性であり，乳児から幼児期には卵，牛乳，小麦，そば，魚類，ピーナッツなどが，学童から成人期では，甲殻類，魚類，小麦，果物類，そば，ピーナッツなどが主な原因食品となる。卵，牛乳，小麦，ダイズなどは比較的寛解しやすいが，その他の原因食品では寛解しにくく，また乳児から成人期まで幅広い年齢において発症することから，食物アレルギーにおいては最も重要な臨床

Table1. Classification of clinical form

Clinical form	Age of onset	food	improvement	anaphylactic shock	mechanism
Newborn, infancy gastrointestinal allergy	Neonatal infancy	Milk (baby milk powder)	Almost	±	Mainly non-IgE mediated
Infancy atopic dermatitis	infancy	Egg, Milk, Wheat, Soybean	Almost	+	Mainly IgE mediated
Immediate type allergy (nettle rashhives, anaphylaxis)	Infancy-adulthood	Infancy-childhood (Egg, Milk, Wheat, Buckwheat, Fish, Peanut) School period-adulthood (Crustacean, Fish, Wheat, Fruit, Buckwheat, Peanut)	Almost (Egg,Milk, Wheat, Soybean) Difficult (others)	++	IgE-mediated
Special type	FEIAn/ FDEIA	School period-adulthood	Wheat,Shrimp, Crab	+++	IgE-mediated
	OAS	Infancy-adulthood	Fruit, Vegetable	±	IgE-mediated

厚生労働科学研究班による食物アレルギーの診断の手引き 2011 (引用文献 17)

型の一つである。一方、学童期から成人期に発症する FEIAn (FDEIA)や OAS などは寛解しにくく、生涯にわたって食物アレルギー発症の危険性が伴う。

2. 厚生労働省の食物アレルギー調査研究班の調査概要¹⁸⁾

近年、食物アレルギーの即時型反応を呈する患者が急増している¹⁾ことから、アレルギーをはじめとした過敏症を起こす物質を含む食品に起因する健康危害を防止するために、表示による情報提供の要望が高まってきた。これを受けて、厚生省(現厚生労働省)は、「食物アレルギー対策検討委員会」を発足させて、実態調査を行った。平成8年度は、食物による即時型反応の質問文章を「特定の物を食べて、1時間以内に皮膚に変化が起こったり、体調が悪くなったり、病気になったことがありますか?(食中毒によるものは除いてください)」とし、1,348人の保育園児を対象に即時型食物アレルギー患者の全国調査が行われた。その結果、即時型アレルギーの反応は6歳児までは年齢が大きくなるに従って増加する傾向にあり、発生頻度は12.6%(168/1336)であることが明らかとなった¹⁸⁾。また、対象となる原因食品は卵・卵製品が55.3%(93/168)と最も高く、次いで牛乳・乳製品が35.1%(59/168)、魚貝類が13.7%(23/168)、小麦、豆・豆製品の順であった。これらの調査結果は日本における即時型の食物アレルギーの最初のデータとなった。

平成9年度は、日本小児アレルギー学会員のうち、調査の趣旨に賛同する学会員を対象に調査用紙を配布し、学会員の所属する医療機関を受診した3歳児、小学1年生、小学5年生、中学2年生、成人を対象とし、即時型反応の調査が行われた。これまで、食物アレルギーは年齢が高くなるに従って頻度が低下すると考えられてきたが、本調査結果では成人で高い傾向を示した(Table 2)¹⁸⁾。また、食物アレルギーの即時型反応の原因食品は年齢によって異なり、各年齢群で魚類が上位にきていることが特徴的であった。成人では果物が上位にきていることから、OASとの関連が考えられた。さらに平成10年・11年度に実施された調査では、どのような食品がアレルギー食品として問題があるかを調査するために、川崎病全国調査に利用されていたネットワークを利用し、全国の総計100床以上のベッドを有し、かつ小児科を標榜している病院2,689の施設に調査用紙を配布し、1,623施設から回答が得られた。その結果、原因食品として一位は卵、二位は牛乳、三位は小麦、四位が

Table 2. Results of survey

	3 years old	First grader (7-8 years old)	Fifth grader (11-12 years old)	Eighth grader (14-15 years old)	adult
n (persons)	3,036	3,132	4,775	4,557	4,234
Frequency (%)	8.6	7.4	6.2	6.3	9.3
Foods (Rank order of frequency)	Egg, Fish, Milk, yorgult, cheese, shrimp/prawn, crab	Egg, Fish, shrimp/prawn, crab, Milk	Fish, shrimp/prawn, Milk, Fruit	Egg, Fish, shrimp/prawn,Fruit, Milk	shrimp/prawn, Fish, Egg, Fruit, Shellfish, Milk

今井孝成, 即時型食物アレルギー疫学調査, 日本小児アレルギー学会誌 (引用文献 18)

そば, 五位がえび, 六位がピーナッツであった。これまでの調査では上位に入っていた大豆が七位になっていたことが日本人の食生活が変容したと推察される特徴的な結果であった¹⁸⁾。

上記の平成 8 年から 11 年度までの連続した調査結果により, 各年齢群での発症頻度, 原因食品など, 日本における食物アレルギーの実態が明らかとなり, 日本の食物アレルギー表示制度をどのように構築していくかの基礎的なデータとなった。

3. 食物アレルギー表示制度の概要

3. 1 食品表示制度の概要

食品の表示は, 消費者が食品を購入するとき, 正しく食品の内容を理解し, 選択する上での重要な情報になる。また, 食中毒や人体に有害な物質が混入した場合など, 万が一の事故が発生した時には, その責任の追及や製品回収等の措置を迅速かつ的確に行うための重要な手がかりとなる。食品の表示に関する法律は, 表示に求める趣旨の違いにより様々なものがある (Table 3)。食品衛生法は, 消費者庁と厚生労働省が所管し, 主に飲食による衛生上の危害発生防止のための法律であり, 名称, 食品添加物, 保存方法, 消費期限又は賞味期限, 製造者氏名, 製造所所在地, 食物アレルギー食品, 遺伝子組み換え食品に関す

Table 3.食品表示の主な法律

法律等の名称	表示の目的
食品衛生法 (消費者庁, 厚生労働省)	・食品に起因する衛生上の危害発生を防止
農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律「JAS 法」 (消費者庁, 農林水産省)	・農林物資の品質の改善 ・品質に関する適正な表示により消費者の 選択に資する
不当景品類及び不当表示防止法「景品表示法」 (消費者庁, 公正取引委員会)	・虚偽, 誇大な表示の禁止
計量法 (経済産業省)	・内容量の表示
健康増進法 (消費者庁, 厚生労働省)	・栄養の改善その他の国民の健康の増進を 図る

る事項などの記載が必要となっている。農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律 (JAS 法)は、消費者庁と農林水産省が所管しており、主として消費者が商品を選択する際の参考となる名称、原産地 (輸入品の場合は原産国)名、原材料名、食品添加物、内容量、消費期限又は賞味期限、保存方法、製造者又は販売者 (輸入品にあつては輸入業者)の氏名又は名称及び住所、遺伝子組換え食品、その他必要な表示事項など品質に関する適正な表示を行うための法律である。

不当景品類及び不当表示防止法(景品表示法)は、消費者を惑わす誇大な広告や不当な表示を規制し、公正な競争を確保することで一般消費者の利益を保護することを目的とした法律であり、消費者庁と公正取引委員会が所管している。計量法は経済産業省が所管し、内容量などの表示を、健康増進法は消費者庁、厚生労働省が所管し、栄養の改善及び健康の増進、健康の保持増進の効果について虚偽・誇大広告を禁止している。これらの法律は趣旨が異なるものの、「名称」、「消費期限又は賞味期限」、「保存方法」、「遺伝子組み換え使用の有無」など、法的に必要となる表示が重複しており、関連する全ての法律に適合した表示を実施するためには、表示に関連する全ての法律を網羅的に確認しなければならない。また、消費者が食品を選択する際にもわかりにくい表示制度となっている。

そこで、これらの複雑な食品表示に関する法体系を一元化するために、消費者庁は現行の食品衛生法、JAS 法、健康増進法の 3 つの法律を統合し、食品を摂取する際の安全性、一般消費者の自主的かつ合理的な食品選択の機会の確保を目的とし、食品表示法 (平成 25 年 6 月 28 日法律第 70 号)を創設した。現在、施行に向けて準備が行われている。

3. 2 食物アレルギー表示制度

食物アレルギーに関する基礎的・臨床的研究は精力的に実施されているが、有効な治療法は未だ確立されていない⁴⁾。唯一、長期寛解あるいは治療が期待できる方法として経口免疫療法があるが、必ず耐性が獲得できるわけではなく、また重篤な副反応が起こりうるため、一般診療としては推奨されておらず、未解決や未知の問題が山積していることから未だ研究段階の治療法である⁵⁾。そのため、現在実施されている食物アレルギーの治療は、原因療法としての「食べること」を目指した食事療法および出現したアレルギー症状に対する対症療法の2つに大別される⁴⁾。食事療法の基本は原因食品の最低限の除去であり、調理による低アレルゲン化や低アレルゲン化食品等の利用により、患者の栄養面とQOLへ配慮しながら実施するものであるが、日常生活において絶えず実施することは困難と考えられる。

また、対症療法はアレルギー症状が発症した際に薬剤を投与し、症状を抑えるものであり、食物アレルギーを寛解させるための治療ではない。

アレルギー表示制度施行前の食品衛生法、JAS法、景品表示法のいずれの法律においても、原材料または原材料の一部の表示が規定されていた。食品衛生法では、缶詰、食肉、ハム類、ソーセージ類、ベーコン類、加工乳及び乳製品の一部についてのみ主要な原材料などの表示を義務づけており、またJAS法、景品表示法においては、基準が設けられた品目について一括して表示すべき事項の中に原材料があり、使用したすべての原材料を表示することになっている。しかし、JAS法では、複合原材料の原材料が3種類以上ある場合において当該複合原材料の原材料に占める重量の割合の高い順が3位以下であって、かつ、当該割合が5%未満である原材料については、「その他」と記載することができ、また、流通過程にある食品および食品材料については表示の義務がない。

このように、アレルギー表示制度施行以前の表示に関する法律では、加工食品中へ微量に含まれている食物アレルギー原因食品の有無を表示により知ることは困難であり、食物アレルギー患者が食事療法を実施する際に、安全に食品を選択することは非常に困難な状況であった。

平成11年3月に開催された厚生労働省食品衛生調査会表示特別部会「食品の表示のあり

方に関する検討報告書」において、「食品中のアレルギー物質については、健康被害の発生防止の観点から、これを有する食品に対し、表示を義務づける必要がある」とされ、平成12年12月に開催された食品衛生調査会表示特別部会において、アレルギー物質を含む食品の表示が決定された¹⁹⁾。

これを受け、平成13年度より厚生労働科学研究費補助金による「食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究班（主任研究者：丸井英二）」では、「アレルギー表示検討会」と「特定原材料検出法検討会」が組織され、前者では実際に表示を義務化することにより生じる諸問題について検討し、後者では国立医薬品食品衛生研究所を中心に産官学の支援研究機関が協力して検出法の研究が開始された²⁰⁾。そこで、平成14年4月、食物アレルギー調査研究班の調査を基に厚生労働省は、症例数の多さから卵、牛乳、小麦を、症状の重篤さから、そばと落花生の5品目を省令により特定原材料として定め、表示を義務づけた。一方、通知で定める特定原材料に準ずる19品目(あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン)については、表示を推奨することとした³⁾。

その後、平成16年度には、厚生労働省・農林水産省の合同有識者会議である食品の表示に関する共同会議において、特定原材料に準ずるものとしてバナナが追加され、特定原材料に準ずる品目は20品目となった。平成10年、11年の食物アレルギー調査では、原因食品として落花生より上位であったえびとかにについては、検査のためのELISA法^{21,22)}および定性PCR法²³⁾の検査体制が整備されたことから、平成20年度には、特定原材料に準ずるものから特定原材料に移行された。また、平成25年9月に、ごまとカシューナッツが特定原材料に準ずるものに加えられ、現在、特定原材料は内閣布令(平成23年内閣府令第45号)により7品目、特定原材料に準ずるものは通知(平成25年9月20日消食表第257号)により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)が定められている²⁴⁾。上述のように、食物アレルギーの原因物質は、時代の変化とともに変わっていく可能性があることから、原則3年ごとに実態調査などを行い、新たな知見や報告により、適宜表示制度の見直しを行っていくこととなっている²⁵⁾。

これらの表示対象となる特定原材料などの範囲は、原則として日本標準商品分類²⁶⁾をもとに規定されている。日本標準商品分類は、商品の生産、出荷、輸出入などの経済諸活動に関する統計について、その正確性、客観性を保持し、相互比較可能性を確保するために総務省により作成されており、商品を大分類、中分類、小分類に分けている。小麦の表示範囲を例に挙げると、大分類では小麦、小麦粉に分類され、さらに中分類として、小麦は国内産小麦と外国産小麦とに、小分類では、国内産小麦はさらに普通小麦、強力小麦に分けられ、外国産小麦では普通小麦、準強力小麦、強力小麦、デュラム小麦に分けられている。大分類の小麦粉は、中分類において強力小麦粉、準強力小麦粉、薄力小麦粉、普通小麦粉、デュラムセモリナ、その他の小麦粉に分けられている。このように、特定原材料の範囲は細かく規定されており、日本標準商品分類に分類番号のないゼラチンや乳・乳製品等については、消費者庁からの通知²⁴⁾により範囲が規定されている。

日本におけるアレルギー物質を含む食品に関する表示については、前述したように、現在は食品衛生法により規定されているが、保健所などの地方自治体が実施する具体的な指導の方法については、通知⁸⁾の別添1「アレルギー物質を含む食品に関する表示指導要領」に記載されている。表示の義務づけの対象は、特定原材料を原材料とする加工食品または当該食品に由来する添加物であって販売の用に供するものとなっており、具体的には全ての流通過程にある容器包装された加工食品及び食品添加物となる。しかし、対面販売や量り売りの場合には、消費者が求めればその食品についての全ての情報が得られると考えられることから、表示は省略可能となっている。また、例外的に運搬容器への表示や容器包装の面積が30 cm²以下のものについては、記載面積の制約などにより表示の省略が可能となっている。

限られた表示スペースにおいて、表記から特定原材料を連想できるような一般的、常識的な表記方法として、特定原材料の表示には、「代替表記」と「特定加工食品」という表示方法が認められている。卵の表示を例に挙げると、代替表記とは、玉子、たまご、タマゴ、エッグ、鶏卵など、別の書き方ではあるが特定原材料と同一であるということが理解可能な表記であり、代替表記を記載していれば卵という表示は不要となる。また、特定加工食品とは、厚焼き卵やハムエッグなど表記を含んでいるものや、マヨネーズ、親子丼など予

測可能な表記方法とであり、代替表記同様に卵の表示は不要となる。これらは食物アレルギーの子供を持つ親にアンケート調査を実施し、その結果を基に決定した表記方法であるため、実用性のある表記方法と考えられる²⁴⁾。

原材料として特定原材料などを使用していない食品を製造する場合であっても、製造工程上の問題などにより、コンタミネーションが発生することが指摘されている²⁴⁾。このコンタミネーションを原因とし、食物アレルギーが発症する可能性があることから、①他の製品の原材料中の特定原材料が製造ライン上で混入しないように当該ラインを十分に洗浄する、②特定原材料などを含まない食品から順に製造する、③可能な限り専用器具を使用するなど、製造者のコンタミネーション防止対策の徹底が望まれている。これらの防止対策を徹底してもなおコンタミネーションの可能性が排除できない場合には、原材料表示欄の外に「注意喚起表記」を行うことが可能となっている²⁴⁾。注意喚起表記の例としては、製造ラインを共用した場合などは「本製品の製造ラインでは、小麦を使用した製品も製造しています」、サイロやはしけなどを共用している場合には「とうもろこしの輸送設備等は大豆、小麦の輸送にも使用しています」などが認められている。また、共生による混入が避けられない場合には「本製品で使用しているアサリなどの二枚貝には、かにが共生しています」、捕食による混入には「本製品で使用している○○○は、えびを食べています」、混獲による意図せざる混入には「本製品で使用している○○○は、かにが混ざる漁法で捕獲しています」などがある²⁴⁾。ただし、製造物責任法 (PL 法) 逃れのためや原材料調査の負担を回避するために、食品製造者が安易に表示してしまい、その結果、患者の食品選択の幅を狭める可能性があることから、原材料表示欄の外であっても可能性表示(May contain)は認められていない²⁴⁾。

以上のように、アレルギー表示の方法は複雑であることから、加工食品製造者や販売業者が適切な表示が実施できるように、消費者庁により「アレルギー物質を含む加工食品のハンドブック」が作成されている²⁷⁾。

農林水産省が報告している加工食品の食品製造業生産指数²⁸⁾によると、平成 22 年の指数を 100 としたとき、平成 23 年は 101.1、平成 24 年は 103.7、平成 25 年は 106.9 であり、年々上昇傾向になっている。今後ますます加工食品の需要が増えていくことが想定されること

から、食物アレルギー患者にとっては、加工食品の特定原材料表示の重要性は益々高まっていくものと考えられる。

4. アレルギー物質を含む食品の検査方法

アレルギー表示検討会により特定原材料の表示義務を決定した際に、表示を必要とする特定原材料の混入レベルをどのように設定するかが重要な問題となった²⁹⁾。食品の製造工場内では製造設備を共有していることが多く、製造ラインを十分に洗浄したとしてもコンタミネーションの問題が生じ、特定原材料を使用していない食品において、特定原材料を完全に“ゼロ”にすることは事実上不可能と考えられた。そのため、アレルギー表示検討会に所属する医療従事者等の意見を参考に、アレルギー症状を誘発しない濃度レベルとして、表示の閾値が数 $\mu\text{g/g}$ ($\mu\text{g/mL}$)と設定された³⁰⁾。これを受けて、特定原材料検出法検討会により特定原材料総タンパク質含有量として $10 \mu\text{g/g}$ の濃度レベルが検出可能となる検査法の開発が進められ、各種特定原材料タンパク質を検出するELISA法がスクリーニング検査法として通知された³⁾。

通知法では、あらゆる加工食品を検査対象検体とすることから、測定結果の変動をできるだけ縮小するために、検査の原則が明記されている。要約すると、①試料中の特定原材料は不均一に分布すると考えられることから、検査対象検体としては一包装を一単位とする、②一包装すべてのうち可食部を均質化し、調製試料とする、③調製試料は固体や液体の性状にかかわらず、重量測定にて一定量を採取する、④微量測定のため、意図せざる混入となるコンタミネーションを防ぐため、試料の調製場所と検査場所をゾーニングにより区別し、試料の均質化に用いた粉碎器やフードカッターなどは次の測定に影響しないように十分に洗浄する、などの原則が明記されている。

また、特定原材料タンパク質を検出するためのスクリーニング検査として、Table 4 に示すELISAキットのうち、いずれか2種類のキットを用いることとなっている。特定原材料等の検査に用いる方法は、通知法の別添5として添付されている「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に準拠することが必要であり、定量検査法であるELISA法においては、試験室数8以上、試料数5以上（ただし、試料に含まれる特定原

Table 4. Commercial ELISA kits for specific allergenic ingredient

Specific allergenic ingredient	Elisa kits	Target protein
Egg	FASTKIT ELISA VerIII for egg ^{a)}	Egg soluble protein
	FASPEK ELISA II for egg ^{b)}	Ovalbumin
	ALLERGENEYE ELISA II for egg ^{c)}	Ovalbumin
Milk	FASTKIT ELISA VerIII for egg	Milk soluble protein
	FASPEK ELISA II for egg	β-lactoglobulin
	ALLERGENEYE ELISA II for egg	Casein
Wheat	FASTKIT ELISA VerIII for egg	Wheat soluble protein
	FASPEK ELISA II for egg	Gliadin
	ALLERGENEYE ELISA II for egg	Gliadin
Buckwheat	FASTKIT ELISA VerIII for egg	Buckwheat soluble protein
	FASPEK ELISA II for egg	Soluble buckwheat protein mixture
	ALLERGENEYE ELISA II for egg	24-kDa protein
Peanut	FASTKIT ELISA VerIII for egg	Peanut soluble protein
	FASPEK ELISA II for egg	Soluble peanut protein
	ALLERGENEYE ELISA II for egg	Ara h1 protein
Crustacean	Crustacean Kit [Maruha] ^{d)}	Tropomyosin
	FA test EIA-Crustacean II [Nissui] ^{e)}	Tropomyosin

a) FASTKIT ELISA VerIII series: Nippon Meat Packers, Inc.

b) FASPEK ELISA II series: Morinaga Institute of Biological Sciences Co., Ltd.

c) ALLERGENEYE ELISA II series: Purima Meat Packers, Ltd.

d) Maruha Nichiro Foods, Inc.

e) Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.

材料タンパク質濃度レベルには、10 µg/g を含むこと)で実施した試験室間バリデーションで、50 %以上、150 %以下の回収率および25 %以下の室間精度が求められており、また、定性検査法であるウエスタンブロット法 (WB 法)と PCR 法では、試験室数6以上、試料数5以上 (試料に含まれる特定原材料タンパク質濃度レベルには、10 µg/g を含むことが望ましい)で実施した試験室間バリデーションで、特定原材料タンパク質を含む試料についての陽性率90 %以上、ブランク試料における陰性率90 %以上となっている。

通知法に記載されている検査方法は、すべて上記ガイドラインの条件を満たしており、試験室間バリデーションの結果および偽陰性、偽陽性のデータについて、説明書等に添付し、公表されている。

行政検査としてスクリーニング検査を実施する場合、2種類の ELISA キットのうち、どちらか一方でも陽性 (10 µg/g 以上)となった場合には、通知法の別添2で規定されている判断樹 (Fig.2)に従い行政指導を行うこととなっている。判断樹は、食品への表示の有無、スクリーニング検査の結果、製造記録への記載の有無などにより12の枝に分かれており、通



Fig.2 通知法別添 2 に示された判断樹

知法の別添 3 で、12 の枝に対する行政措置の方法などが細かく記載されている。食品監視指導を担う保健所職員などは、この判断樹により統一的な行政指導を行うことが可能となっている。

また、通知法の別添 4 ではこれまで明らかにされていなかった標準品規格が明記され、別添 6 にはアレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドラインが示されたことから、ガイドラインに沿って妥当性を評価し、一定の性能を有することが確認された検査方法は、従来法と同様の検査方法とみなすことができることとなった。このことにより、新規検査法の開発の可能性が広がった。

以下に通知法で示されている各試験法の概要を説明する。

試料調整法は、各検査法においてすべて共通であり、食品一包装単位に含まれる可食部全体を試料とし、全量を粉砕器あるいはフードカッターなどで十分に破砕し、均質混和したものを調整試料とする。

スクリーニング検査である ELISA 法は、キットによって若干の操作方法の違いがあるため、森永生科学研究所(株)製モリナガ FASPEK エライザ II を例に操作法の概要を説明する。

調製試料 1.0 g を 50 mL 遠心管に計りとり、検体抽出液 19 mL を添加後、遠心管を横にして振とう機で一晩 (12 時間以上) 浸透しながら抽出を実施する (90~110 往復/分、室温、振とう幅 3 cm 程度)。抽出液の pH を確認し、必要であれば中性付近 (pH6~8) になるよう調整し、遠心分離 (3,000 × g, 20 分) により上清を採取する。沈査が得られない場合にはろ紙でろ過する。上清 (濾過液) を検体希釈液で 20 倍に希釈したものを測定溶液とする。キット付

属の抗体固相化プレートに標準溶液 (0 および 0.78~50 ng/mL の範囲) および測定溶液を 100 μ L/ウェルで 3 ウェルに添加し、室温で 1 時間、一次反応を行う。反応終了後、キット付属の洗浄液により 300 μ L/ウェルで 6 回ウェルの洗浄を行う。洗浄後、ウェル内の液を十分に除去し、酵素基質溶液を 100 μ L/ウェルで添加し、室温で 30 分二次反応を行う。一次反応と同様にウェルの洗浄を行い、酵素基質溶液を 100 μ L/ウェルで添加し、室温で 20 分間、遮光下で酵素反応を行う。反応終了後、反応停止液を 100 μ L/ウェルで添加し、プレートリーダーにより主波長 450 nm、副波長 600~650 nm で吸光度の測定を行う。各ウェルの 450 nm の吸光度から副波長 600~650 nm の吸光度を差し引いた値をそのウェルの吸光度とする。標準溶液の吸光度から 4 係数 Logistic 解析 (4-パラメーター解析) を用いて標準曲線グラフを作成し、測定溶液の吸光度の平均値から測定溶液のタンパク質濃度を算出し、希釈倍数などを乗じて食品中の特定原材料由来タンパク質濃度を求める。ELISA 法の反応原理の模式図と吸光度の測定例を Fig.3 に示す。

結果の判定方法としては、食品採取重量 1 g あたりの特定原材料等由来タンパク質含量が 10 μ g 以上の検体については、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する。一度目の測定結果が 8~12 μ g/g の範囲内にある場合は、二度目の測定を行い、平均値により判断することとなっている。ELISA 法では、検査対象とする特定原材料が含まれていない場合にも反応性を示す偽陽性食品があり、また特定原材料が含まれている場合においても反応性を示さない偽陰性食品があることから、結果の判定には十分な注意を要する。

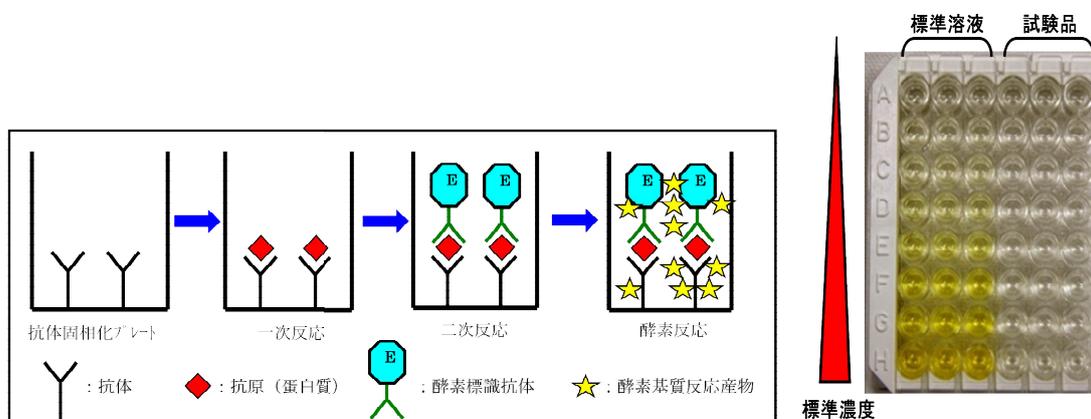


Fig.3 ELISA 法の反応原理と測定例

そのため、キットを作製している各社はホームページなどで偽陽性、偽陰性情報を公開している。乳と卵については、WB キットによる確認検査法が通知⁸⁾に記載されている (Table 5)。ELISA 法では、様々な原材料由来のタンパク質が含まれている食品抽出液を用いて溶液中で抗原抗体反応を行うことから反応の阻害が報告されている^{31,32)}。しかし、WB 法では、PVDF 膜上で抗原抗体反応を行うため、他の食品由来タンパク質などによる抗原抗体反応の阻害の影響も少なく、分子量の情報も得られることから、ELISA 法より特異性の高い方法となっている。

WB 法の詳細な操作方法については通知法⁸⁾に記載されておらず、キットに添付されている説明書に従って操作することとなっている。WB 法の操作概要を説明する。各種キットに付属している抽出液を用いて、ELISA 法と同様に上清 (濾過液) を調製する。Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD(株)製) と 2-メルカプトエタノール (同社製) を 19:1 の混合比で混合したローディング緩衝液と上清 (濾過液) を 2:1 の比で混合し、沸騰水浴中で 5 分間加熱したものを泳動用サンプルとする。標準品も同様に、終濃度が 10, 1, 0.5 µg/g になるよう希釈調製し、標準品サンプルとする。1× Tris-BES 泳動バッファー (テフコ(株)製) に 1× 濃度となるように酸化防止剤 (テフコ(株)製) を添加した泳動バッファーを用い、ゲル 1 枚あたり 60 mA の定電流でポリアクリルアミドゲル (Q-PAGE mini 12.5 % 1.0 mm × 12well : テフコ(株)製) により電気泳動を行う。分子量スタンダードは 7 µL、標準品サンプルおよび泳動用サンプルの 20 µL をそれぞれウェルに注入し、ゲルの下端から 1 cm のあたりまで進んだところで泳動を終了する。次に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離されたタンパク質を電氣的に

Table 5. Commercial western blotting kits for specific allergenic ingredients

Specific allergenic ingredient	Western blotting kits	Target protein	Detection for Relative molecular weight (Da)
Egg	FASPEK Western blotting KIT for egg	Ovalbumin	50,000
	FASPEK Western blotting KIT for egg	Ovomucoid	38,000
Milk	FASPEK Western blotting KIT for milk	Casein	18,400
	FASPEK Western blotting KIT for milk	β-lactoglobulin	33,000-35,000

All kits are produced and commercialized by Morinaga Institute of Biological Sciences Co., Ltd.

転写膜へ転写するブロッティングを行う。転写装置としてトランスブロット SD セル (BIO-RAD(株)製)を用い、転写装置の陽極面から、ろ紙 (ブロットアブソーベントフィルターペーパー (極厚) : BIO-RAD(株)製), 転写膜 (Hybond-P : GE ヘルスケアジャパン(株)製), ゲル, ろ紙の順に重層し, 15 V の定電圧で1時間転写する。次に, タンパク質が転写された転写膜の免疫染色を行う。転写膜は速やかにブロッキング溶液に浸し, 室温で1時間振とう, もしくは4℃で一晩静置する。転写膜を一次抗体溶液に浸し, 1時間振とうする。一次反応終了後, 1×洗浄液 (BIO-RAD(株)に終濃度が0.05%になるように Tween-20(BIO-RAD(株)を添加した洗浄液を用いて5分間×3回, 転写膜を洗浄する。転写膜を二次抗体溶液に浸して30分間振とうし, 洗浄液で5分間×3回洗浄する。洗浄後, 転写膜をアルカリフォスファターゼ標識ビオチン-アビジン溶液に浸し, 20分間振とうし, 洗浄液で5分間×3回洗浄する。転写膜を100 mM Tris/塩酸 (pH9.5)に浸し, 15分間振とうし, 溶液を捨てて検出試薬に3~10分浸す。検出バンドが十分に濃くなったら検出試薬を捨てて精製水で転写膜を十分にすすぎ反応を止める。

WB法では, 各特定原材料等由来のタンパク質の分子量, つまり SDS-PAGE における見かけ上の分子量 (卵白アルブミン M.W. 50,000, オボムコイド M.W. 38,000, カゼイン M.W. 33,000~35,000, β-ラクトグロブリン M.W. 18,400)付近に明瞭なバンドが検出されたものを陽性と判定する。卵白アルブミンの測定例と検査機器の例を Fig.4 に示す。

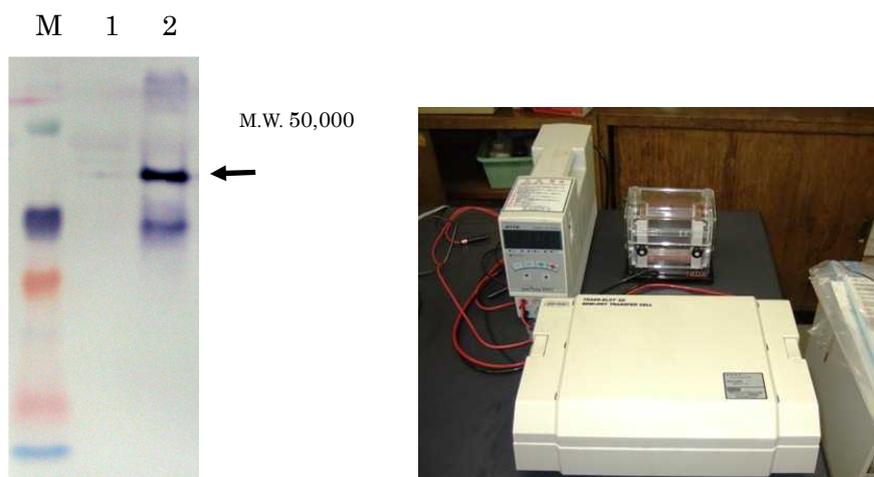


Fig.4 卵白アルブミン測定例と WB 法検査機器

M:分子量マーカー, 1:陰性コントロール, 2:卵標準 10 µg/g

卵タンパク質測定の際には、卵白アルブミンあるいはオボムコイド、乳タンパク質測定の際には、カゼインあるいはβラクトグロブリンのどちらか一方の抗体を用いて陽性の結果が得られた場合には、各特定原材料（卵，乳）が微量を超える混入があると判断する。

スクリーニング検査ではタンパク質を検出していることから、例えば小麦の検査では近縁種である大麦，ライ麦，オーツ麦などは小麦と類縁のタンパク質を有するため交差反応性を示す。そのため、確認検査においては、より特異性の高いDNAを検出対象とすることを基本として考えられている。しかし、DNAを検出対象とした場合、卵では鶏肉が、牛乳では牛肉が陽性となるため、DNAを検出対象とすることが不可能である。そのため、上述したように、WB法により確認検査を実施することとなっている。小麦，そば，落花生およびえびとかにの確認検査法である定性PCR法は、各種特定原材料のDNAを特異的に検出するために作製されたプライマー対（Table 6）を用いて、食品試料から抽出されたDNAを鋳型DNAとし、PCRにより特定原材料由来のDNAを検出する定性能の高い方法である。食品試料からのDNA抽出方法としては、市販キットである Genomic-tip20/G（Qiagen（株）社製）を用いたイオン交換樹脂タイプキット法と DNeasy plant mini kit（Qiagen（株）社製）を用いたシリカゲル膜タイプキット法、およびキット化されていない Cetyl trimethyl ammonium bromide（CTAB）法の3種類の方法が通知⁸⁾に示されている。加工食品での利用実績の多いイオン交

Table 6. Commercial PCR kits for specific allergenic ingredients

Specific allergenic ingredient	PCR kits	Target gene	PCR Product length (bp)
Wheat	Allergen checker [Wheat]Oriental Yeast Co., Ltd.	Triticin precursor gene	141
Buckwheat	Allergen checker [Buckwheat]Oriental Yeast Co., Ltd.	Gene encoding soba allergenic protein	127
Peanut	Allergen checker [Peanut]Oriental Yeast Co., Ltd.	Agglutinin precursor gene	95
Shrimp	Primer for shrimp detection, FASMAC Co., Ltd.	16S rRNA gene of mitochondrial DNA	187
Crab	Primer for crab detection, FASMAC Co., Ltd.	16S rRNA gene of mitochondrial DNA	62
Plant DNA	Allergen checker [Plant]Oriental Yeast Co., Ltd.	Noncoding region of chloroplast DNA	124
Animal DNA	Allergen checker [Animal]Oriental Yeast Co., Ltd.	16S rRNA gene of mitochondrial DNA	370-470

換樹脂タイプキット法について操作方法の概要を説明する。

調整試料 2 g を 50 mL 遠心管に計りとり、キットに付属の G2 緩衝液を 15 mL、 α -アミラーゼ (SIGMA 社製 Cat.No.A-6380 同等品 : 1 mg/mL) を 200 μ L 添加し、十分混合し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間加温する。加温終了後、Proteinase K (>600 mAU/ml, QIAGEN 社製 Cat. No.19133 同等品) を 100 μ L、キットに付属の RNase A (17,500 U) を 20 μ L 添加し、50 $^{\circ}$ C で 2 時間加温する。加温終了後、遠心分離 (3,000 \times g, 15 分, 4 $^{\circ}$ C) により上清を採取し、15 mL 遠心管に移す。キットに付属の QBT 緩衝液 1 mL を通液して平衡化した Genomic-tip20/G に 2 mL ずつ上清を全量負荷する。キットに付属の QC 緩衝液 (2 mL \times 3 回) を通液し、カラムの洗浄を行う。50 $^{\circ}$ C に温めておいたキットに付属の QF 緩衝液 (1 mL \times 2 回) でカラムから DNA を溶出する。得られた 2 mL の溶出液に対し、1.4 mL のイソプロピルアルコールを加え、よく混合後に遠心分離 (10,000 \times g, 15 分, 4 $^{\circ}$ C) を行い、遠心後に DNA の沈殿を除かないように上清のみを除く。沈殿に 70% エタノールを加え、遠心分離 (10,000 \times g, 5 分, 4 $^{\circ}$ C) を行う。上清を取り除き、残った沈殿を乾燥させる。DNase フリー水を 100 μ L 加え、65 $^{\circ}$ C 5 分間加温し、ピペッティングにより DNA を溶解させ、食品から抽出した DNA 試料原液とする。

実際の検査では、これらの抽出法から一つを選択し、食品試料から 2 併行で DNA を抽出し、抽出 DNA の精製度と収量の確認を行う。通知⁸⁾では、DNA の精製度については、原則的基準が設定されている。PCR を阻害する糖、フェノール等の低分子化合物の混入を評価する目安として、260 nm/230 nm の吸光度比を測定し、2.0 を上回ることを原則としている。また、同じく PCR 阻害物質となるタンパク質の混入を評価する目安として、260 nm/280 nm の吸光度比を測定し、1.2-2.5 の範囲内にあることを原則としている。PCR に用いる鋳型 DNA の濃度が 20 ng/ μ L であることから、DNA の濃度については、原則 20 ng/ μ L 以上となっている。これら 2 種類の吸光度比および DNA 濃度の 3 つの条件を満たさない抽出 DNA が得られたときには、まだ未実施である 2 種類の DNA 抽出方法により DNA 抽出を行うこととなっている。2 回目を選択した DNA 抽出方法においても上記条件を満たさなかった場合には、通知⁸⁾に記載された 3 種すべての DNA 抽出方法を実施しなければならないため、非常に時間を要する作業となる。

遺伝子組換え食品の検知法において、納豆、トウモロコシ澱粉、ビーフンや馬鈴薯澱粉などでは、加圧加熱等の加工により DNA が断片化し、また加工により DNA の残存が著しく少なくなっていることから、DNA の収量が低く、検出が難しいことが報告されている³³⁻³⁷⁾。上記食品など、いずれの DNA 抽出方法を用いても通知⁸⁾で示された抽出 DNA の条件を満たさない場合には、260 nm/280 nm の吸光度比の原則範囲である 1.2-2.5 に最も近い値を示した抽出 DNA を用いることが通知⁸⁾に記載されている。

抽出 DNA 中に存在している PCR 阻害物質の影響により PCR が阻害され、特定原材料由来の DNA が存在しているにもかかわらず偽陰性となることが考えられる。そのため、原材料配合比等を考慮して、植物または動物 DNA を網羅的に検出することが可能なプライマー対の一つを選択し、抽出 DNA を鋳型として PCR 増幅の確認を行うことが通知法に明記されている。3 種の DNA 抽出法により 2 点併行で抽出された DNA から植物または動物 DNA 検出用プライマー対の増幅がみられなかった場合には、PCR に供することが不可能と判断され、最終的に PCR 法による検知不能と判断される。

植物または動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR において増幅がみられた場合には、その後、Table 6 に示した各種特定原材料 DNA 検出用のプライマー対を用いて PCR を行い、増幅の可否で特定原材料の陽性、陰性の判断を行うこととなっている。また、えびとかにのスクリーニング検査においては、甲殻類タンパク質として、えびとかに共通のタンパク質であるトロポミオシンを検出しているが、アミノ酸の相同性が高い^{21,22)}ため、ELISA 法ではえびとかにの区別ができない。そのため、定性 PCR 法を用いた確認試験が開発されている²³⁾。また、定性 PCR 法は、各種特定原材料に特異的な DNA 配列を基に検出していることから、小麦、そば、落花生では偽陰性や偽陽性の報告がないが、えびではシャンハイガニ、ダンジネスクラブ、タカアシガニ、ベニズワイガニ、マルズワイガニおよびワタリガニで偽陽性を示すことが確認されている²³⁾。そのため、PCR 増幅産物がえびに由来するものかこれらのかにに由来するものか判断が付かない場合には、制限酵素 HaeIII を用いて PCR 増幅産物を消化し、えび由来の制限酵素消化断片 (149 bp) を確認することにより判断する⁸⁾。しかし、制限酵素消化処理後においてもシャンハイガニは偽陽性を示すことが報告されている⁸⁾。えびではアキアミで偽陰性を示し、かにではシャコで偽陽性を示すこ

とから、既報²³⁾のアキアミプライマーおよびシャコプライマーで増幅を確認することが必要となる。

通知法は、特定原材料等の表示制度を科学的に検証する目的で、現時点で最も信頼性の高いと考えられる方法によって構成されている。しかし、検査対象検体として、市場に流通する様々な食品を対象としているため、すべての食品へ適用することは実際上不可能であるとされている。また、加工による特定原材料成分の変化・分解や食品からの特定原材料成分の抽出効率の変動³⁸⁻⁴⁰⁾により、通知法による特定原材料総タンパク質含有量の測定結果は、実際の含有量と必ずしも一致しないことも通知法に記述されている。また、通知法は、表示の妥当性を客観的に検査するための方法であり、測定結果の陽性、陰性をもって患者の発症の有無を判断しているものではない。食物アレルギー患者においては、アレルギー症状を発症する食品の量はヒトにより異なり、またそのヒトの体調によっても異なることから、10 µg/g の濃度レベルは発症の目安として設定されてはいるものの、測定結果と発症の有無に直接的な関連性がないことを十分に留意する必要がある。

現在、平成 26 年 3 月に改訂された通知法により、流通食品の表示が適正か否かを判定するため 7 品目の特定原材料検査が各地の保健所や地方衛生研究所等で行政検査として実施されている^{41,42)}

本研究の目的と論文構成

内閣布令で定められた特定原材料 (卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生, えびおよびかに) を原材料として使用した場合には, 食品衛生法により, 原則これらの原材料を表示することが義務となる. 食品原材料の表示については, 食品を製造する企業が責任をもって実施する事が重要であるが, 食品製造者の原材料の表示ミスや意図せずに特定原材料が混入していた場合には, 原材料表示を根拠として食品を選択した患者がアレルギー反応を起こし, 症状が重篤な場合には生命の危険にさらされることが想定される. そのため, 表示が正しく行われているかどうかを確認するために, 都道府県の保健所や衛生研究所等が流通食品に対し, 公費での買い上げによるモニタリング検査や, 食品衛生法に基づく収去により検査を行なっている.

通知法では 7 品目の特定原材料について, スクリーニング検査として, まず ELISA 法により定量検査を行い, 10 $\mu\text{g/g}$ 以上となった場合には製造記録を確認し, その品目の使用が認められた場合には表示をするよう行政指導をすることとなっている. また, 使用が認められなかった場合には, 小麦, そば, 落花生, えびおよびかにについては定性 PCR 法で, 卵と牛乳では WB 法により正確な定性確認を実施することとなっている.

定性 PCR 法は, 試料から 2 点並行で DNA を抽出し, その抽出 DNA を鋳型として PCR を行い, 電気泳動法により増幅バンドの確認を行うことから, 非常に時間を要する検査法である. また, 原材料の異なる様々な加工食品すべてに関して適用可能な DNA 抽出方法は存在しないことから, 検査結果を得るまでに複数の DNA 抽出方法の実施や, 繰り返し定性 PCR を実施する必要性が生じる.

食物アレルギー患者の危害発生を防止するためには, 行政検査等により流通食品の表示の妥当性を正しく検証することが重要である. また, 危害発生時においては, 発生原因の究明, 特定原材料の同定等を迅速に実施し, 食品の自主回収等を適切に指導することが, 危害発生の拡大を防止するためには最も重要となる. そのため, 様々な加工食品に対応可能な, 迅速・簡便な DNA 抽出方法の開発や食品の加工行程により断片化した DNA の高感度検出法等の検討が必要となる. 本研究では, これらの問題を解決するために, 以下に示

す検討を行った。

第 2 章は、行政検査の効率的な実施や食物アレルギーの危機管理事例等において、原因食品を迅速に特定するために、1本の反応チューブで複数の PCR が実施できる Multiplex PCR (M-PCR)法の手法を用い、植物、小麦、そば、落花生の 4 品目の同時検出法について検討し、簡便、迅速かつコスト性に優れた同時検出法を確立した報告である。

第 3 章は、小麦の特定原材料検査において、スクリーニング検査陽性で確認検査陰性の事例が多数報告されたことから、確認検査における小麦 DNA の検出感度の向上を図るため、通知法⁸⁾に記載されているプライマー対の内側の領域から新たにネステッド PCR 用プライマー対を作製し、このプライマー対を用いたネステッド PCR 法により、高感度に小麦 DNA の検出を可能とした報告である。

また、小麦タンパク質を一定量含有したモデル加工食品を多様な加工条件により 11 種作製し、通知法に示された PCR (通知法 PCR) およびネステッド PCR 法による検出状況を比較し、併せて PCR を行う際の鋳型 DNA の増量効果について検討を行い、健康危害発生の頻度が高く、検出の難易度が高い小麦の高感度検出法を開発した報告である。

第 4 章では、甲殻類タンパク質が高頻度に検出された海苔製品において、えびとかいの DNA を検出するために、市販の DNA 抽出キットを一部改良し、いくつかの市販の DNA 抽出キットと DNA の収量・純度、キットの操作性を比較検討した。併せて、凍結乾燥したえびとかいの可食部を 1~10,000 µg/g 含む乾燥海苔粉末を作製し、本法で抽出された DNA を用いた PCR 法の検出感度などを比較検討し、乾燥海苔製品中のえびまたはかいの DNA を高感度に検出可能な方法を考案した報告である。

本論文はこれらの結果をまとめたものである。なお、内容については次のとおり公表済みまたは公表予定である。

論文発表

- 1) 橋本博之, 眞壁祐樹, 長谷川康行, 佐二木順子, 宮本文夫. Multiplex PCR 法を用いた食品中の特定原材料の検出. 食品衛生学雑誌, 48, 132-138 (2007).

- 2) 橋本博之, 眞壁祐樹, 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 (2008) .
- 3) 橋本博之, 伊藤歌奈子, 田中裕之, 穂山浩, 手島玲子, 眞壁祐樹, 中西希代子, 宮本文夫. モデル加工食品を用いた特定原材料 (小麦) 検査におけるネステッド PCR 法の検討. 食品衛生学雑誌, 50, 178-183 (2009) .
- 4) Hashimoto, H., Hongo, T., Hayashi, C., Nakamura, K., Nakanishi, K., Ikeda, M., Adachi, R., Akiyama, H., Teshima, R., and Yano T. A method for the detection of shrimp/prawn and crab DNAs to identify allergens in dried seaweed products. Jpn. J. Food Chem. Safety, 22, 1-10, 2015 (掲載予定).

第2章 Multiplex PCR法を用いた食品中の特定原材料の検出

通知法では、スクリーニング検査で陽性となった試料について、小麦、そば、落花生、えびおよびかにかについてはPCR法による確認試験を実施し、その試験結果および製造記録などの調査結果を基に、判断樹に従い、特定原材料の混入について最終的な行政指導の判断を行うこととなっている。

通知法に記述されているPCRでは、抽出DNAについて、検査対象検体の原材料の特性を考慮し、植物または動物DNA検出用プライマー対いずれかによるPCRを実施し、PCRでの増幅が確認されたことにより抽出DNA中の阻害物質の影響を否定することとなっている。この作業は、検出対象となる小麦、そば、落花生、えびおよびかにかの偽陰性結果を否定するために必須の確認事項である。植物または動物DNA検出用プライマー対は通知法に示されており、植物または動物を網羅的に検出可能となるようデザインされたプライマー対である。これらのプライマー対でPCRでの増幅が確認された場合、次に各種特定原材料のDNAを特異的に検出する事が可能なプライマー対を用いて2度目のPCRを実施し、特定原材料の有無を確認することとなっている。そのため、植物または動物DNA検出のためのPCRと特定原材料検出のためのPCRが必要となり、1品目の検査に2度のPCRを実施しなければならない。また、電気泳動においてもPCRの増幅反応液を流す泳動レーンの数も多くなり、検体数によっては非常に時間を要する検査となる。

食品の摂取により食物アレルギー症状が出た場合には、食品表示を確認後、患者の所在地または食品製造工場を管轄する保健所または衛生研究所等において工場への立ち入り調査および症状を起こした食品残品や工場で保管している同一ロットの参考食品等の検査を実施し、アレルギー反応を起こした特定原材料を特定することが必要となる。しかし、食物アレルギー患者は複数の特定原材料に対して症状を起こすこともあり、また、意図せざる混入の場合には特定原材料を網羅的に検査する必要性が生じる。スクリーニング検査に用いるELISAキットは高額であり、使用期限が定められていることから、食物アレルギーに関する危機管理の発生を想定し、事前にELISAキットを準備しておくことは現実的ではない。また、特定原材料毎に2キットを用い、複数の特定原材料をELISA法により個別に

検査することは検査員の確保と検査の迅速性において大きな問題となる。

ELISA キットを製造しているキットメーカー各社は、簡易検査法としてイムノクロマトキットを販売しており、1 時間程度の短時間で結果が得られるが、ELISA キットと同様に交差反応性を示すことから、原因となる特定原材料の正確な同定には不向きと考えられる。前述したように、通知法 PCR では特異性が高いことから同定が可能と考えられるが、特定原材料の品目毎にプライマーを変更した PCR の反応溶液を調製する必要がある。

食物アレルギーの発症に関する健康危機事例においては、さらなる患者の発生を防止するために食品の自主回収を行うよう食品製造者に行政指導することも多く、迅速に原因物質を特定することが最も重要となる。そのため、本研究では、1 本の反応チューブで複数の PCR が実施できる M-PCR 法による、植物、小麦、そば、落花生 4 品目の同時検出法について検討を行った。

実験方法

1. 試料

1. 1 特定原材料 (3 種)

市販の薄力小麦粉とそば粉および千葉県産の生落花生をそれぞれ小麦、そば、落花生の特定原材料として用いた。

1. 2 特定原材料に準じるもの (8 種)

バレンシアオレンジ (アメリカ産)、キウイ (ニュージーランド産)、クルミ (アメリカ産)、ダイズ (千葉県産)、モモ (山梨県産)、ヤマイモ (市販の凍結乾燥粉末製品)、リンゴ (青森県産ゴールドデンドリシャス)、バナナ(フィリピン産)を用いた。

1. 3 加工食品 (5 種)

六穀そうめん (原材料：小麦粉、食塩、黒米、そば粉、黒胡麻、黒豆、黒松の実、山芋、黒カリン、枸杞の実、赤ナツメ、甜菊糖、食用油)、よもぎそば (原材料：小麦粉、そば粉、粉末よもぎ、食塩)、南部せんべい (原材料：小麦粉、ピーナッツ、澱粉、砂糖、食塩、膨張剤、甘味料「スクラロース」)、揚げあられ (原材料：落花生、植物油脂、でん粉、米、コーン、食塩、ぶどう糖果糖液糖、粉糖、唐辛子、たん白加水分解物、加工デンプン、調

味料), およびソーセージ (原材料: 魚肉「たら, ほっけ」, 結着材料 [植物性たん白 (小麦, 大豆)], でん粉「コーンスターチ」, ゼラチン], 豚油, 食塩, 砂糖, 玉ねぎエキス, かつおエキス, 調味料「アミノ酸等」, 香辛料抽出物, 保存料「ソルビン酸 K」, リン酸塩「Na」, pH 調整剤, 着色料「赤 106」, 「原材料の一部にさば, 鮭を含む」)を用いた.

2. 試薬および試液

2. 1 DNA 抽出

DNA の抽出にはイオン交換樹脂タイプのキットである Genomic-tip20/G (QIAGEN(株)製)を用いた. 滅菌水は Millipore 社製 Milli-Q PLUS および Milli-RO5 PLUS で精製した超純水を 121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌したものをを用いた. α -アミラーゼ (Cat.No.A-6380, SIGMA(株)製)は滅菌水により 1 mg/mL となるように調製し, 濾過滅菌したものをを用いた. Proteinase K (>600 mAU/ml)および RNase A (17,500 U)は QIAGEN (株)製を用い, イソプロピルアルコールおよびエタノールは和光純薬工業 (株)製を用いた. 70 %エタノール溶液は滅菌水で調製した. DNA の溶出には滅菌水を用いた.

2. 2 プライマー

通知法に記載された植物 DNA 検出用プライマー対 (CP03-5'/CP03-3' : CP03 プライマー対), 小麦 DNA 検出用プライマー対 (Wtr01-5'/Wtr10-3'), そば DNA 検出用プライマー対 (FAG19-5'/FAG22-3'), 落花生 DNA 検出用プライマー対 (agg04-5'/agg05-3')および著者らがミトコンドリア DNA (mtDNA)の Cox I 遺伝子塩基配列情報 (GenBankTM Accession No.X14409:5265 bp)を基に設計した植物 DNA 検出用プライマー対 (Plant01-5'/Plant01-3', Plant02-5'/Plant02-3', Plant03-5'/Plant03-3', Plant04-5'/Plant04-3',)を用いた (Table 2.1). 各プライマーはグライナーージャパン社に合成委託した逆相カラム精製品を用いた.

2. 3 PCR および M-PCR

PCR 試薬として, 植物, 小麦, そば, 落花生のいずれか一品目を検出する PCR には Ampli Taq GOLD&10×PCR buffer II/MgCl₂ with dNTPs (アプライドバイオシステムズジャパン (株)製)を用い, 植物, 小麦, そば, 落花生すべてを同時に検出する M-PCR には Multiplex PCR KIT

Table 2.1 List of PCR primers

Common name	Accession No. (GenBank)	Primer name	Sequence 5'-3'	Amplicon size
Tropical tree	AF076774	CP03-5'	CGGACGAGAATAAAGATAGAGT	124 bp
		CP03-3'	TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA	
Wheat	S62630	Wtr01-5'	CATCACAATCAACTTATGGTGG	141 bp
		Wtr10-3'	TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA	
Buckwheat	AF216801	FAG19-5'	AACGCCATAACCAGCCCGATT	127 bp
		FAG22-3'	CCTCCTGCCTCCCATTCTTC	
Peanut	S42352	agg04-5'	CGAAGGAAACCCCGCAATAAAT	95 bp
		agg05-3'	CGACGCTATTTACCTTGTTGAG	
Pea	X14409	Plant01-5'	AAAACCGGTCTTCGGGTATC	161 bp
		Plant01-3'	TTCCAGTGGGGACAGCTATG	
		Plant02-5'	GCCTGGATCCGGTATCATAAG	163 bp
		Plant02-3'	GGCACGGGTATCAACGTCTA	
		Plant03-5'	GGGAGGGTACCACATTGACAT	179 bp
		Plant03-3'	GCTTGGAAGCAAGCTACCTGT	
		Plant04-5'	TTACCAGCCATTCTGGAGGAG	171 bp
		Plant04-3'	CTGTTACTGGAACGGACCACA	

(QIAGEN(株)製)を用いた。

DNA の希釈調製には TE 緩衝液 (各最終濃度 10 mmol/L Tris/塩酸, 1 mmol/L EDTA (pH8.0)) を用いた。PCR に用いた各プライマーは TE 緩衝液で溶解し、25 μ mol/L の濃度に希釈調製した。M-PCR に用いた混合プライマー溶液 (100 μ mol/L, 各プライマーの濃度 12.5 μ mol/L) は、Plant01-5', Plant01-3', Wtr01-5', Wtr10-3', FAG19-5', FAG22-3', agg04-5 および agg05-3' の 8 種のプライマーの各々を TE 緩衝液で溶解し、100 μ mol/L の濃度となるように調製した後、各溶液を等量ずつ混合して調製した。PCR 用の各種プライマー溶液および M-PCR 用の混合プライマー溶液は -30 $^{\circ}$ C で保存した。

2. 3 電気泳動

アガロースゲル電気泳動には、AgaroseL03 「Takara」を用い、0.5 \times TBE 緩衝液 (最終濃度 44.5 mmol/L Tris-Borate, 10 mmol/L EDTA) を泳動用緩衝液として用いた。また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、市販の 15%ポリアクリルアミドゲル「e-パジエル」(アトー(株)製)を用い、Tris-Glycine 緩衝液 (最終濃度 25 mmol/L Tris, 192 mol/L Glycine) を泳動用緩衝液とした。DNA マーカーは EZ Load Molecular Ruler 20 bp (バイオラッド(株)製)を用いた。PCR の増幅反応液、M-PCR の増幅反応液および DNA マーカーのアプライには、6 \times ローディング

グ緩衝液 (ニッポンジーン(株)製)を用いた。DNA の染色には、10 mg/mL のエチジウムブロマイド (インビトロジェン(株)製)を用いた。

3. 装置および器具

ミルサー : IFM-700G (イワタニ(株)製), 冷凍庫 : MDF-U442(サンヨー(株)製), 凍結乾燥機 : FDU-830 (東京理化学器械(株)製), 冷却遠心機 : 5922 (クボタ(株)製), 恒温槽 : ドライサーモバス ALB-221 (イワキ(株)製), マイクロチューブ遠心機 : 1-13 (クボタ(株)製), タッチミキサー : MT-31 (ヤマト科学(株)製), 分光光度計 : BioSpec-mini (島津製作所(株)製), サーマルサイクラー : PCR Express II (サーモエレクトロン(株)製), 電気泳動装置 : Mupid-ex (アドバンス(株)製), AE-6500 および AE-8450 (アトー(株)製), ゲル振とう機 : ベリーダンサーシェーカー (東和科学(株)製), ゲルイメージ解析装置 : FAS-III MODEL-TM2(東洋紡績(株)製)を用いた。

4. DNA 溶液の調整

小麦粉, そば粉は微細な粉末状であることから均一化処理を行わず, 市販品をそのまま調製試料とした。生落花生, クルミ, ダイズおよび加工食品はミルサーで十分に粉碎し, 調製試料として用いた。バレンシアオレンジ, キウイ, モモ, リンゴ, バナナについては, 可食部を -30°C で3日間凍結し, 約50時間凍結乾燥した後にミルサーで十分に均一になるよう粉碎し調製試料とした。凍結乾燥をした果物類, ヤマイモは1gを, その他は2gを用いて, 通知法⁸⁾に従い, Genomic-tip20/GによりDNAを抽出した。抽出DNA溶液は, 分光光度計によりDNA濃度を測定し, $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ に希釈調製した。 $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ の小麦, そば, 落花生の単一DNAもしくは小麦とそば, 小麦と落花生, そばと落花生, 小麦とそばと落花生DNAの各種等量混合DNA溶液を作製した。加工食品の抽出DNAはそれぞれ $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ に希釈調製した。抽出DNA濃度が $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ 未満のものについては, 抽出DNAそのものを鋳型DNAとして用いることとした。希釈調製したDNAは使用するまで -30°C に保存した。

5. PCR および M-PCR の条件

5. 1 PCR

PCR の反応溶液は、最終濃度が 1×PCR 緩衝液, 0.2 μmol/L プライマー, 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.625 U Taq polymerase となるように混合し, 20 ng/μL に希釈調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え, 滅菌水により全量を 25 μL とした. すべての試液を十分混合した後, 酵素の活性化のために 95 °C に 10 分間保ち, 95 °C 30 秒間, 60 °C 30 秒間, 72 °C 30 秒間を 1 サイクルとして, 40 サイクルの増幅反応を行った. その後 72 °C 7 分間最終伸張反応を行った.

5. 2 M-PCR

M-PCR の反応溶液は最終濃度が 1× Multiplex PCR Master Mix, 1.6 μmol/L 混合プライマーとなるように, 各種プライマー対を混合し, 20 ng/μL の DNA 溶液を 2.5 μL 加え, キット添付の RNase-free water により全量を 25 μL とした. すべての試液を十分混合した後, 酵素の活性化のために 95 °C に 10 分間保ち, 95 °C 30 秒間, 60 °C 30 秒間, 72 °C 30 秒間を 1 サイクルとして, 40 サイクルの増幅反応を行った. その後 72 °C 7 分間最終伸張反応を行った.

6. 電気泳動条件

アガロースゲル電気泳動では, 4 %アガロースゲルを作成し, 0.5×TBE 緩衝液を泳動用緩衝液として, 100~135 V の定電圧により 40~50 分間電気泳動した. ポリアクリルアミドゲル電気泳動では, 市販の 15 %ポリアクリルアミドゲルを用い, Tris-Glycine 緩衝液を泳動用緩衝液とし, ゲル 1 枚あたり 20 mA の定電流により約 70 分間電気泳動した. DNA マーカーは直接 5 μL, PCR の増幅反応液または M-PCR の増幅反応液は, 7.5 μL を 6×ローディング緩衝液 1.5 μL と混合し, ゲルへアプライした. DNA の染色には, アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動ともに, それぞれエチジウムブロマイド濃度が 0.5 μg/mL になるように調製した緩衝液を用いて 20 分間染色し, それぞれの緩衝液を用いて 20 分間脱色を行った. ゲルイメージ解析装置により UV (312 nm) を照射し, 増幅バンドを確認した.

実験結果および考察

1. 抽出 DNA の評価

抽出 DNA の測定結果を Table 2.2 に示した. DNA 溶液の 230 nm, 260 nm, 280 nm および 320 nm の吸光度を測定し, 320 nm の吸光度をバックグラウンド値として減算補正し, 260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した. DNA の純度を確認するため, 260 nm/280 nm の吸光度比からタンパク質の量を, 260 nm/230 nm の吸光度比から多糖などの夾雑物の混入を評価した. 特定原材料の小麦, そば, 落花生では, 吸光度比は, 260 nm/280 nm が 1.84~1.95, 260 nm/230 nm が 2.00~2.45 の範囲であり, 通知法で示されている原則的条件を満たす純度の高い DNA が抽出されたと考えられた. 特定原材料に準じるもののうち, バレンシアオレンジ, クルミ, ダイズ, ヤマイモ, リンゴ, バナナでは 260 nm/230 nm の吸光度比が 2.0 を下回り,

Table 2.2. Spectrophotometric analysis of extracted DNAs^{a)}

Sample	Ratio		Concentration of DNA(ng/μL)
	260 nm/280 nm ^{b)}	260 nm/230 nm ^{c)}	
Wheat	1.95	2.45	1200
Buckwheat	1.88	2.00	620
Peanut	1.84	2.32	92
Orange	1.93	-7.27	33
Kiwifruit	1.78	4.62	42
Tree nut	1.18	0.36	33
Soybean	1.60	1.05	98
Peach	1.90	3.03	122
Yam	1.70	1.81	29
Apple	2.06	-3.52	14
Banana	2.07	-40	29
Somen	1.90	2.36	1860
Yomogi-soba	1.92	2.33	2920
Nanbu-senbei	1.71	0.94	1460
Age-arare	1.94	1.80	63
Sousage	1.91	2.45	496

a) DNA extractions were carried out using Genomic-tip20/G kit(QIAGEN).

b) Criterion of a principle: 1.2-2.5.

c) Criterion of a principle: ≥ 2.0 .

糖などの混入が示唆されたが、その他は吸光度比において良好な結果を示した。また、リンゴでは DNA 濃度が 20 ng/μL を下回る濃度であった。

加工食品では、南部せんべいおよび揚げあられにおいて、260 nm/230 nm の吸光度比が 2.0 を下回り、夾雑物の混入の可能性が示唆されたが、その他は概ね良好な結果を示した。

2. プライマーの検討

2. 1 植物 DNA 検出用プライマー対の検討

通知法⁸⁾のプライマー対を用いた M-PCR では、増幅バンド長は植物で 124 bp, 小麦で 141 bp, そばで 127 bp, 落花生では 95 bp であり、同時検出する場合、通常のアガロースゲル電気泳動では植物とそばの 3 bp 差の分離が著しく困難だと考えられた (Fig.2.1)。そこで、小麦、そば、および落花生の増幅バンドと分離が可能な増幅バンド長として、160~180 bp の範囲で植物 DNA 検出用プライマー対を新たに設定することとした。

通知法⁸⁾の植物 DNA 検出用プライマー対は *Corythophora alta* の葉緑体 DNA (cp DNA) 上に位置する *TrnL* 遺伝子と *TrnF* 遺伝子間の非転写領域から設計されている^{43,44)}。この両遺伝子は植物において必須な葉緑体の遺伝子であることから、種や属を超えて高度に保存されている領域であるが、両遺伝子間の非転写領域は変異が大きく、進化の過程で塩基配列の挿入や欠失などが多くみられている⁴⁵⁻⁴⁸⁾ことから、増幅バンド長が一定とならない可能性がある。一方、ミトコンドリア DNA (mt DNA)は塩基の保存性も比較的高く、ゲノム DNA

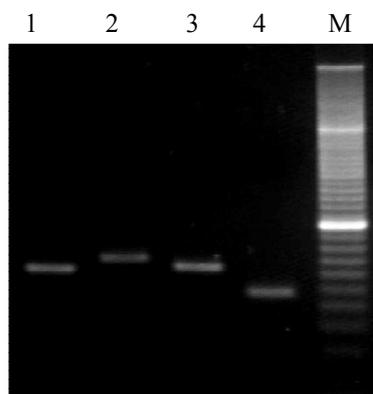


Fig. 2.1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified by notified PCR method
Lanes: M, 20bp ladder size standard; 1, Plant; 2, Wheat; 3, Buckwheat; 4, Peanut

や cp DNA と比べ、細胞あたりのコピー数が多いため、効率よく DNA を得ることが可能である。そこで、mt DNA 遺伝子領域を用いて植物検出用のプライマー対を 4 対設計した。プライマーの設計には Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>)を用い、設計条件として、プライマーのサイズは 20~22 bp, T_m 値は 57~64 °C, GC%は 50~60 %とした。

通知法の植物、小麦、そば、および落花生検出用の各プライマー対および著者らが作製した植物 DNA 検出用プライマー対の T_m 値を Table 2.3 に示した。PCR では最良の増幅効果を得るためにはプライマー対同士の T_m 値をほぼ同等に設定する必要がある。

Table 2.3. T_m values of PCR primers

Primer name	T _m value		
	NN method ^{a)}	Wallace method ^{b)}	%G+C method ^{c)}
CP03-5'	56.6	62	53.9
CP03-3'	64.1	64	55.8
Wtr01-5'	60.1	62	53.9
Wtr10-3'	63.9	62	55.6
FAG19-5'	68.8	64	57.6
FAG22-3'	65.6	64	59.5
agg04-5'	67.1	64	55.8
agg05-3'	61.0	64	55.8
Plant01-5'	62.3	60	55.4
Plant01-3'	63.4	62	57.5
Plant02-5'	62.8	64	57.6
Plant02-3'	63.2	62	57.5
Plant03-5'	63.1	64	57.6
Plant03-3'	63.1	64	57.6
Plant04-5'	63.7	64	57.6
Plant04-3'	63.3	64	57.6

a) Nearest neighbor method.

$$T_m = \frac{1000\Delta H}{10.8 + \Delta S + R \ln(Ct/4)} - 273.15 + 16.6 \log [Na^+]$$

b) Wallace method (for oligos < 18 mers).

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

c) %G+C method.

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 41(G/n + C/n) - 500/n$$

ΔH (kcal/mol): sum of nearest-neighbor enthalpy changes.

ΔS (kcal/mol · K): sum of nearest-neighbor entropy changes.

R (cal/deg · mol): gas constant = 1.987.

Ct (mol/L): total concentration of oligonucleotide
(calculate as 0.2 μmol/L).

[Na⁺] (mol/L): concentration of [Na⁺] (calculate as 50 mmol/L).

n: length of oligonucleotide.

A, T, G and C: number of base.

Tm 値はプライマーの塩基組成や反応溶液の塩濃度、プライマー長やその使用濃度などから、Wallace 法⁴⁹⁾、%G+C 法⁵⁰⁾、最近接塩基対法 (NN 法)^{51,52)}などの計算式により計算されるが、計算法により Tm 値が大きく異なることがある。これらの計算式のうち、NN 法は塩基の組成や塩濃度に加え隣接塩基間の熱力学エネルギー安定性を考慮しているため、信頼性の高い計算方法である⁵³⁾。以上のことから、NN 法による Tm 値の算出が最良と考えられた。

通知法⁸⁾の植物 DNA 検出用プライマー対である CP03 プライマー対での Tm 値の差は NN 法では 7.5 °C であり、また、通知法⁸⁾の小麦、そば、および落花生検出用プライマー対の Tm 値の差は 3.2~6.1 °C で、大きな差がみられた。一方、植物検出用に作製した Plant01~04 プライマー対は Tm 値の差が NN 法で最大 1.1 °C と小さく、また、Wallace 法、%G+C 法においてもほぼ同等の値となっている。そのため、Tm 値、プライマー長、増幅バンド長において理論上最適なデザインのプライマー対であると考えられた。

2. 3 植物 DNA 検出用プライマー対の比較

小麦粉、そば粉、および生落花生から抽出した DNA を鋳型とし、通知法の植物 DNA 検出用プライマー対および作製した Plant01~04 プライマー対を用いて PCR を行い、各プライマー対の増幅を比較した。各プライマー対の PCR における増幅結果の一覧を Table2.4 に示す。通知法の植物 DNA 検出用プライマー対、Plant01、Plant02 および Plant04 プライマー対では、3 種の特定原材料由来 DNA から増幅産物が得られたが、Plant03 プライマー対では、落花生 DNA からは増幅産物が得られなかった。

また、増幅バンドの濃淡を比較したところ、Plant01 プライマー対を用いた増幅が 3 種の特定原材料由来 DNA において最も良好であった。また、特定原材料に準じる品目に対する定性 PCR 法の開発が将来的に予想されることから、本検討を実施した平成 19 年度時点で特定原材料に準じる品目であったもののうち、植物種であるバレンシアオレンジ、キウイフルーツ、クルミ、ダイズ、モモ、ヤマイモ、バナナから抽出した DNA を用いて、通知法⁸⁾の CP03 プライマー対および Plant01 プライマー対により PCR 増幅を行った。その結果、両プライマー対ともにすべての DNA で増幅が確認されたが、CP03 プライマー対ではバレンシアオレンジから抽出した DNA で他の増幅バンド長より長いバンド長が確認され、また、

Table 2.4. Detection of PCR products amplified from extracted DNAs using 5 kinds of primer-pairs

Primer Name	Wheat	Buckwheat	Peanut
CP03-5' CP03-3'	Tr ^{a)}	+	+
Plant01-5' Plant01-3'	+	+	+
Plant02-5' Plant02-3'	+	+	+
Plant03-5' Plant03-3'	+	+	-
Plant04-5' Plant04-3'	+	+	+

a) Tr: trace band

小麦とリンゴでは増幅量が少なかった (Fig.2.2). Plant01 プライマー対ではすべての抽出 DNA で、均一なバンド長を示し、また増幅量の多いバンドが確認された。

以上の結果より、特定原材料由来 DNA で増幅が可能であり、特定原材料に準じる 7 品目においても良好な増幅を示したことから、M-PCR 法の植物 DNA 検出用プライマー対は Plant01 プライマー対とした。

3. M-PCR 法のアニーリング温度の検討

PCR サイクルの温度条件のうち、アニーリング温度の設定は感度と特異性の点で重要となるが、1 回の PCR には 2~3 時間要することから至適温度条件を決定するには多くの時間を要する。本検討で用いたサーマルサイクラーのグラジエント機能を利用することで PCR チューブを設置するウェル間に温度勾配を設定することが可能となる。そこで、M-PCR 法の至適アニーリング温度を決定するために、一回の反応でアニーリング温度の勾配をかけた M-PCR (グラジエント M-PCR) を行った。20 ng/μL に調製した小麦、そば、および落花生の DNA 溶液を各種等量混合した DNA 溶液を鋳型として使い、グラジエント M-PCR を行い、アニーリング温度の違いによる各プライマー対の特異性および感度を調べた (Fig. 2.3)

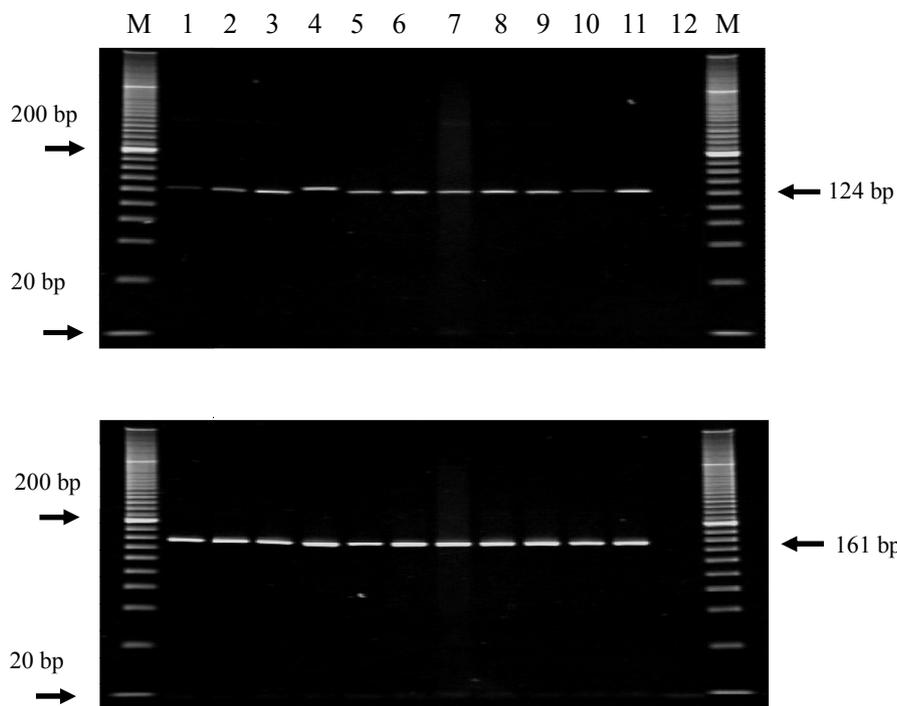


Fig. 2.2. Polyacrilamide gel electrophoresis of PCR products amplified from DNAs extracted from allergenic substances and subspecific allergenic ingredients

PCR products were generated by CP03 (above) or Plant01 (below) primer pairs

Lanes: M, 20bp ladder size standard; 1, Wheat; 2, Buckwheat, 3, Peanut; 4, Orange; 5, Kiwifruit; 6, Walnut; 7, Soybean; 8, Peach; 9, Yam; 10, Apple; 11, Banana; 12, No template control.

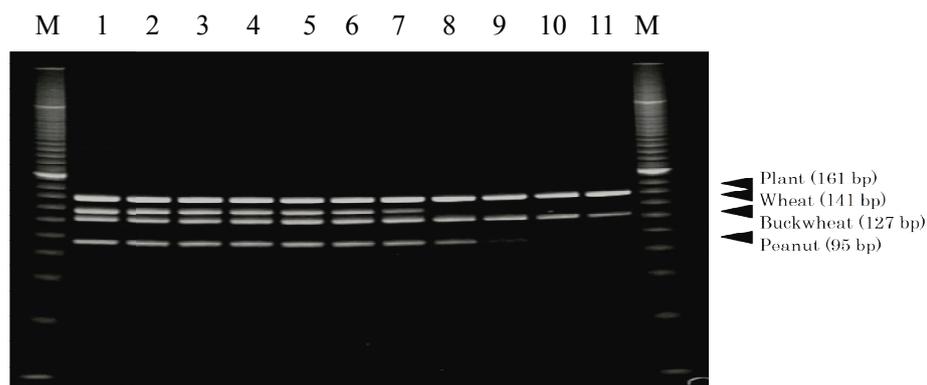


Fig. 2.3. Effects of annealing temperature (54.1-68.8) on the sensitivity and specificity of a M-PCR method using 4 primer pairs

M-PCR was performed using 4 primer pairs (Plant01-5' and Plant01-3', Wtr01-5' and Wtr10-3', FAG19-5' and FAG22-3' and agg04-5' and agg05-3') in one tube with M-PCR kit (QIAGEN). PCR products were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis.

Lanes: M, 20bp ladder size standard; 1, 54.1 °C; 2, 54.9 °C; 3, 56.3 °C; 4, 58.0 °C; 5, 60.0 °C; 6, 61.9 °C; 7, 63.9 °C; 8, 66.2 °C; 9, 67.6 °C; 10, 68.3 °C; 11, 68.8 °C.

その結果、54.1 °Cおよび54.9 °Cではアニーリング温度が理論上の値より低いため、プライマーのミスプライミングが生じ、300 bp 付近に非特異バンドが検出されたが、56.3～63.9 °Cの範囲では、植物、小麦、そば、落花生の予測される長さの増幅バンドが4本検出された。以上の結果から、PCR の増幅効率とプライマーのミスプライミングによる非特異反応の抑制を考慮し、M-PCR 法におけるアニーリング温度は60 °Cに設定した。

4. M-PCR による特定原材料由来 DNA の検出

鋳型 DNA として小麦、そば、落花生の単独 DNA、もしくは各種等量混合 DNA 溶液を用いて M-PCR を実施した。また、加工食品から抽出した DNA を用いて、加工食品への適用性を確認した。単独 DNA、もしくは各種混合 DNA 溶液の結果を Fig.2.4A に、加工食品の結果を Fig.2.4B に示す。

各種混合 DNA 溶液では、予測されるバンド長の増幅バンドが鋳型となる DNA の種類により2～4本検出された。また、加工食品から抽出した DNA を用いた検討では、いずれの DNA においても食品に記載された表示のとおり、2～3本の増幅バンドが良好に検出された。以上の結果から、加工食品への適用は十分可能と考えられた。

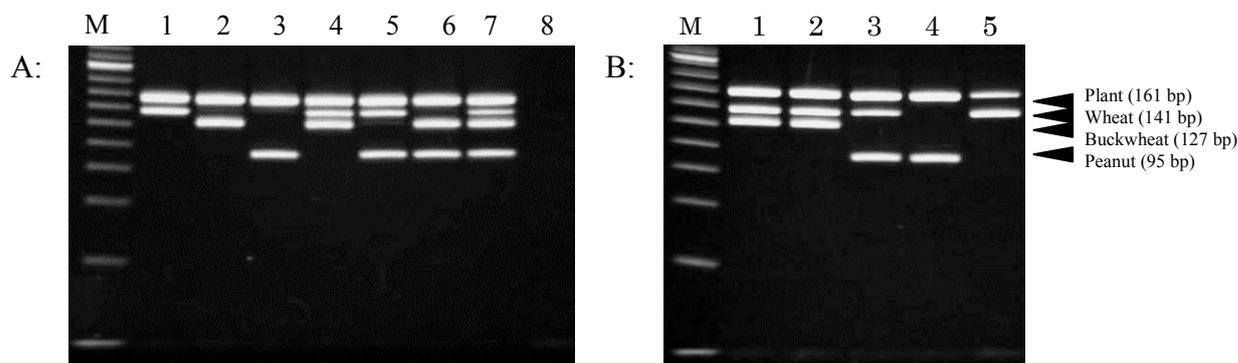


Fig. 2.4. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products amplified from allergenic substances by a M-PCR method

A: Extracted DNA from allergenic substances.

Lanes: M, 20bp ladder size standard; 1, wheat; 2, buckwheat; 3, peanut; 4, wheat and buckwheat; 5, wheat and peanut; 6, buckwheat and peanut; 7, wheat, buckwheat and peanut; 8, negative control (without DNA).

B: Extracted DNA from processed foods.

Lanes, M, 20bp ladder size standard; 1, Somen (containing wheat and buckwheat); 2, Yomogi-soba (containing wheat and buckwheat); 3, Nanbu-senbei (containing wheat and peanut); 4, Age-arare (containing peanut); 5, Sausage (containing wheat).

M-PCR 法では増幅バンド数が多くなることから、特異性や増幅効率の向上のため、PCR 試薬、プライマー対の設計、鋳型 DNA 量、dNTP 量、プライマー濃度および PCR サイクル条件などについて今後詳細な検討が必要と思われる。

5. まとめ

M-PCR 法を用いた特定原材料の同時検出法を確立した。新たに mt DNA 遺伝子から M-PCR 法に適した植物 DNA 検出用プライマー対を 4 対設計した。小麦、そば、および落花生の原材料について適用性を検討した結果、Plant01 プライマー対が植物 DNA 検出用プライマー対として最も良好であった。また、Plant01 プライマー対は、特定原材料に準じるものである、バレンシアオレンジ、キウイ、クルミ、ダイズ、モモ、ヤマイモ、リンゴ、バナナから抽出した DNA においても、均一なバンド長および良好な増幅量を示したことから、今後、これらの食品の定性 PCR 法が開発された時には、抽出 DNA の評価に用いることが可能と考えられた。

Plant01 プライマー対および小麦、そば、落花生プライマー対を用いて M-PCR を行った。その結果、植物、小麦、そば、落花生において予測されるバンド長の増幅バンドが鋳型 DNA 種の種類により 2~4 本検出された。また、加工食品を用いて M-PCR 法の適用性を検討したところ、表示されている特定原材料と一致した増幅バンドが得られたことから、加工食品においても有用な検査法であることが確認された。

本検出法は、簡便、迅速かつコスト性に優れた植物および特定原材料の小麦、そば、落花生の同時検出法であり、定期的な行政検査や食物アレルギーの健康危機事例等において、迅速・簡便に原因物質を特定することが可能となると考えられた。

第3章 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

著者らが通知法に従い、市販加工食品の予備的な小麦含有実態調査を行ったところ、容器包装詰加圧加熱殺菌食品(加圧加熱食品)では、スクリーニング検査で小麦陽性であるにも関わらず、確認検査法である通知法 PCR において、小麦陰性となる事例が複数みられた¹⁰⁾。同様に、通知法を用いて表示の妥当性検証を行っている他県等の地方衛生研究所においても、スクリーニング検査と確認検査の不一致事例が多数報告されている^{42,54-57)}。両検査結果の不一致の原因としては、小麦のスクリーニング検査において偽陽性反応が報告されている大麦、ライ麦、エン麦、ハト麦、ビール麦芽などが検査対象試料に原材料として使用されている場合や、ELISA 法と PCR 法の感度の違い、抽出 DNA 中の PCR 阻害物質の影響や食品加工における加圧加熱処理等による小麦由来 DNA の低分子化等が想定される。

PCR 法において、スクリーニング検査結果と相反する陰性の結果が得られた場合、通知法の判断樹では、「スクリーニング検査が偽陽性でないことを確認できていないことから表示の訂正を指導できず、また原材料欄の外への注意喚起表記を指導することしかできない」となっている。通知法で示されている特定原材料検査法の条件として、定性検査法である PCR 法は定量検査法(ELISA 法)より特異性が高いことが求められているが、感度に関する条件は記載されていない。しかし、保健所などで行政指導を行う場合、確認検査である定性 PCR 法はスクリーニング検査である ELISA 法より高感度であることが望ましい。

ネステッド PCR は、最初のプライマー対で増幅された DNA を鋳型とし、その増幅領域の内側のプライマー対で2回目の増幅を行うことから、検出感度と反応特異性が高められ、遺伝子組換えダイズの検出などでも報告されている手法である⁵⁸⁾。しかし、連続した2回の PCR を実施するため、検査に時間がかかり、また、検査上のクロスコンタミネーションに対して十分な配慮が要求される方法である。

ELISA 法の定量下限値はキット付属の説明書によると 0.31 $\mu\text{g/g}$ であるが、小麦検出用プライマー対を用いた通知法 PCR の検出下限値は、トウモロコシ粉に小麦粉を添加した未加熱処理の粉体レベルで 50 $\mu\text{g/g}$ と報告されている⁵⁹⁾。そのため、定性 PCR 法の感度が ELISA 法より低いことが両検査結果の不一致の原因の一つと考えられた。そこで、本研究では、

小麦 DNA の高感度検出法を開発するため、通知法 PCR を一部改良して実施した PCR の増幅反応液を利用し、新たに作製したネステッド PCR 用プライマー対を用いたネステッド PCR 法の適用を試みた。また、小麦由来 DNA の低分子化に対する PCR の増幅影響を評価するために、3 種の加圧加熱条件で処理を行った小麦粉と未処理小麦粉について、DNA を抽出し、ネステッド PCR 法の検出状況を検討した。小麦を含有した複数の市販加工食品に対する本法の適用性についても併せて検討した。

また、最初の通知法³⁾が施行された平成 14 年時に用いられていたキットに比べ、現在用いられている改良キットは平成 17 年に検査法の一部改正により、界面活性剤や還元剤などが変更され、蛋白質の抽出効率が向上している⁶⁰⁾。この改良キットにおいては、モリナガ製の FASPEK 小麦および日本ハム製の FASTKIT 小麦ともに旧来キットと比較し、2~3 倍の ELISA 測定値を示している^{54,61)}ことから、ELISA 法で小麦陽性であり、定性 PCR 法で陰性となる事例がさらに増加するものと推察された。そのため、小麦タンパク質を表示の基準である 10 µg/g 含有したモデル加工食品を多様な加工条件により複数作製し、通知法 PCR およびネステッド PCR 法による検出状況を調べ、併せて鋳型 DNA の増量効果について検討を行った。

実験方法

1. 試料

1. 1 小麦加工食品 (7 種)

市販のクッキー (原材料:小麦粉, 砂糖, 牛乳, とうもろこしでん粉, ショートニング, バターオイル, 全粉乳, 植物油, マーガリン, ぶどう糖果糖液糖, 食塩, たんぱく質濃縮ホエイパウダー, 膨脹剤, 乳化剤「大豆由来」, 香料), クラッカー (原材料:小麦粉, 植物油, 砂糖, ぶどう糖果糖液糖, 食塩, モルトエキス, 膨脹剤), 食パン (原材料:小麦粉, 糖類, ショートニング, マーガリン, 牛乳, パン酵母, 卵, 脱脂粉乳, 食塩, ナチュラルチーズ, 発酵種, 乳清ミネラル, 乳化剤, イーストフード, 香料, V.C, 「原材料の一部に乳成分, 卵, 小麦, 大豆を含む」), そうめん (原材料:小麦粉, 食塩, 食用植物油),

マカロニ (原材料:デュラム小麦のセモリナ), ソーセージ (原材料:魚肉「たら, ほっけ」, 結着材料 [植物性たん白 (小麦, 大豆)], でん粉「コーンスターチ」, ゼラチン], 豚油, 食塩, 砂糖, 玉ねぎエキス, かつおエキス, 調味料「アミノ酸等」, 香辛料抽出物, 保存料「ソルビン酸 K」, リン酸塩「Na」, pH 調整剤, 着色料「赤 106」, 「原材料の一部にさば, 鮭を含む」), レトルトカレー (原材料:野菜「じゃがいも, にんじん」, 小麦粉, 牛脂豚脂混合油, 牛肉, 砂糖, トマトペースト, カレーパウダー, 食塩, ココナッツペースト, ソテーオニオン, ぶどう糖, でんぶん, 酵母エキス, りんごペースト, しょう油, 香辛料, オニオンパウダー, ガーリックパウダー, チキンブイヨン, 調味料 (アミノ酸等), カラメル色素, 酸味料, 香料, 「原材料の一部に乳成分を含む」)を用いた. また, 特定原材料としての小麦の代表例として市販の薄力小麦粉を用いた.

1. 2 加圧加熱処理小麦粉の調整

市販の薄力小麦粉に 4 倍重量の滅菌水を加えて十分に混合し, オートクレーブ滅菌器を用いて 100 °C, 121 °C, 131 °C の各温度で, それぞれ 20 分間加圧加熱処理を行った. 121 °C, 131 °C はそれぞれ加圧加熱食品であるレトルト食品および, より保存性を高めたハイレトルト食品の殺菌処理温度を想定し, それぞれの処理温度を設定した. 調製した加圧加熱処理小麦粉は使用するまで 4 °C で保存した.

1. 3 モデル加工食品 (11 種)

モデル加工食品の作製に用いた 51 種類の原材料は市販品を購入し, モリナガ FASPEK 小麦測定キット (グリアジン)を用いて小麦が混入していないことを確認してモデル加工食品の作製に用いた. 各モデル加工食品の原材料および加工条件を Table 3.1 に示した.

モデル加工食品は原材料を混合後, 最終加工品における小麦タンパク質濃度が 10 µg/g となるように通知法の別添 4 で示されている標準品規格に記載された小麦一次標準粉末を混合し, 作製した.

2. 試薬および試液

2. 1 ELISA 法

(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 小麦測定キット (グリアジン)を用いた.

Table 3.1 モデル加工食品を作製した原材料と加工条件

モデル加工食品	原材料	加工条件
ジュース	水, 濃縮オレンジジュース, 砂糖, クエン酸二水素カリウム, アスコルビル酸	90 °C加熱, 10 min, pH3.5
ゼリー	水, 砂糖, 寒天, マスカット香料, クエン酸ナトリウム, クエン酸二水素カリウム	90 °Cまで加熱, 酸性条件
鶏肉団子	鶏肉, ラード, 馬鈴薯澱粉, 水, 砂糖	100 °C加熱, 10 min
豆腐	豆乳, グルコノデルタラクトン	70 °C加熱, 50 min
かまぼこ	白身魚, 塩, 馬鈴薯澱粉	蒸気処理, 10 min
プリン	卵, 牛乳, 砂糖, バニラエッセンス	蒸気処理, 15 min
トマトソース	トマトピューレ, ケチャップ, 塩, 砂糖, 酢	90 °C加熱, 10 min, 酸性条件
レトルト A	大根, スイートポテト, タマネギ, ニンジン, サヤエンドウ, ネギ, 干し椎茸, 豚肉, トウモロコシ澱粉, 砂糖, 昆布抽出液, かつお抽出液, 塩, 醤油	123 °C加熱, 12 min
レトルト B	枝豆, トウモロコシ, ニンジン, ネギ, ショウガ, 豆腐, 鮭, トウモロコシ澱粉, 砂糖, セサミオイル, 塩, 鶏抽出物, グルコノデルタラクトン	123 °C加熱, 12.4 min
レトルト C	トマト, タマネギ, トウモロコシ, ブロッコリー, セロリ, 大豆, ツナ, トウモロコシ澱粉, 塩	123 °C加熱, 12 min
レトルト D	タマネギ, 大根, ネギ, ハクサイ, 大根の葉, サヤエンドウ, 乾燥マッシュルーム, 鶏肉, トウモロコシ澱粉, 緑豆春雨, 本みりん, 油揚げ, 酵母抽出物, 昆布抽出物, 塩	123 °C加熱, 12.5 min

2. 2 PCR 法

(1)DNA 抽出

DNA の抽出にはイオン交換樹脂タイプのキットである Genomic-tip20/G (QIAGEN(株)製)を用いた。滅菌水は Millipore 社製 Milli-Q PLUS および Milli-RO5 PLUS で精製した超純水を用いた。121 °Cで 20 分間オートクレーブ滅菌したものを用いた。α-アミラーゼ (Cat.No.A-6380, SIGMA (株)製)は滅菌水により 1 mg/mL となるように調製し、濾過滅菌したものを用いた。Proteinase K (>600 mAU/ml)および RNase A (17,500 U)は QIAGEN (株)製を用い、イソプロピルアルコールおよびエタノールは和光純薬工業 (株)製を用いた。70 %エタノール溶液は滅菌水で調製した。DNA の溶出には滅菌水を用いた。DNA の共沈剤としてエタチンメイト (ニ

ッポンジーン(株)製を用いた.

(2)プライマー

使用したプライマーの一覧を Table 3.2 に示す. 通知法に記載された植物 DNA 検出用プライマー対 (CP03-5'/CP03-3' : CP03 プライマー対), 小麦 DNA 検出用プライマー対 (Wtr01-5'/Wtr10-3' : Wtr プライマー対)を用いた. また, 著者らが設計した植物 DNA 検出用プライマー対 (Plant01-5'/Plant01-3' : Plant01 プライマー対), ネステッド PCR 用プライマー対 (Wtr01NE2-5'/Wtr10NE5-3' : WtrNE プライマー対) を用いた. PCR 増幅バンド長の検討には, 本検討で作製した Tria04-5', Tria04-3', Tria05-3', Tria05-5', Tria09-5', Tria06-3' および既報^{62,63}のプライマー対 (DX5-5', DX5-3')を用いた. 各プライマーはグライナーージャパン社に合成委託した逆相カラム精製品を用いた.

Table 3.2. List of PCR primers

Primer name	Sequence (5'-3')	Tm value ^{a)}
Tria05-5'	GGTGGTTGGAATGGTTTAGAGG	61.3
Tria04-3'	GGGATCGTCGATGTTACACT	64.6
Tria09-5'	ACCACTTCGTCAAGTGAGGTC	61.6
Tria06-3'	CACGAGGTTTCGATTACACGAC	62.8
Wtr01-5'	CATCACAATCAACTTATGGTGG	60.1
Wtr10-3'	TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA	63.9
Tria04-5'	ATCTCAGGCAGGGCCATATC	63.6
Tria05-3'	TAAGGATGGGGAACGTTTGG	62.3
DX5-5'	GCCTAGCAACCTTCACAATC	59.7
DX5-3'	GAAACCTGCTGCGGACAAG	64.3
Wtr01NE2-5'	TGGTGGTTGGAATGGTTTAGA	62.4
Wtr10NE5-3'	GGCACGCGGATTGTATATGT	63.0
CP03-5'	CGGACGAGAATAAAGATAGAGT	56.6
CP03-3'	TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA	64.1
Plant01-5'	AAAACCGGTCTTCGGGTATC	62.3
Plant01-3'	TTCCAGTGGGGACAGCTATG	63.4

a) Nearest neighbor method.

$$T_m = \frac{1000\Delta H}{-10.8 + \Delta S + R \cdot \ln(Ct/4)} - 273.15 + 16.6 \log[Na^+]$$

ΔH (kcal/mol): sum of nearest-neighbor enthalpy changes.

ΔS (kcal/mol · K): sum of nearest-neighbor entropy changes.

R (cal/deg · mol): gas constant = 1.987.

Ct (mol/L): total concentration of oligonucleotide (calculate as 0.2 μ mol/L).

[Na⁺] (mol/L): concentration of [Na⁺] (calculate as 50 mmol/L).

(3)通知法 PCR およびネステッド PCR 法

通知法 PCR には Ampli Taq GOLD & 10×PCR buffer II/MgCl₂ with dNTPs (アプライドバイオシステムズジャパン(株)製)を用い, ネステッド PCR には FastStart High Fidelity PCR System (ロッシュ・ダイアグノスティックス (株)製)を用いた. DNA の希釈調製には TE 緩衝液 (各最終濃度 10 mmol/L Tris/塩酸, 1 mmol/L EDTA (pH8.0))を用いた. 陽性コントロールとして, アレルゲンチェッカー (日立化成工業 (株)製)付属の陽性コントロールテンプレートを用いた. 各プライマー溶液は TE 緩衝液で 25 μmol/L の濃度に希釈調製し, -30 °Cで保存した.

(4)電気泳動

アガロースゲルは, PCR AE ゲル (アドバンス(株)製)を用い, 泳動バッファーには 0.5×TBE 緩衝液 (最終濃度 44.5 mmol/L Tris-Borate, 10 mmol/L EDTA)を用いた. DNA マーカーは EZ Load Molecular Ruler 20 bp (バイオラッド (株)製)を用いた. PCR の反応増幅液および DNA マーカーのアプライには 6×ローディング緩衝液 (ニッポンジーン (株)製)を用いた. DNA の染色にはエチジウムブロマイド (インビトロジェン (株)製)を用いた.

3. 装置および機器

ミルサー : IFM-700G (イワタニ(株)製), オートクレーブ滅菌器 : MLS-3780F (サンヨー(株)製), 冷却遠心機 : 5922 (クボタ(株)製), 振とう機 : MMS-310 (東京理化工械(株)製), インキュベーター : FMS-100 (東京理化工械(株)製), プレートリーダー : MULTISKAN JX (サーモエレクトロン(株)製), プレートウォッシャー : Wellwash Plus (サーモラボシステムズ(株)製), 恒温槽 : ドライサーモバス ALB-221 (イワキ(株)製), マイクロチューブ遠心機 : 1-13 (クボタ(株)製), タッチミキサー : MT-31 (ヤマト科学(株)製), 分光光度計 : BioSpec-mini (島津製作所(株)製), サーマルサイクラー : PCR Express II (サーモエレクトロン (株)製), 電気泳動装置 : Mupid-ex (アドバンス(株)製), ゲル振とう機 : ベリーダンサーシェーカー (東和科学(株)製), ゲルイメージ解析装置 : FAS-III MODEL-TM20 (東洋紡績(株)製)を用いた.

4. 測定条件

4. 1 ELISA 法

(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 小麦測定キット (グリアジン)を用い、通知法⁸⁾およびキット付属の説明書に従い測定した。

4. 2 PCR 法

(1)DNA 抽出

試料はすべてミルサーで十分に粉碎、均質化し、調製試料とした。通知法⁸⁾で示されている Genomic-tip20/G を用いた DNA 抽出では、DNA 抽出時にドライサーモバスを使用した 2 回の静置加温反応があるが、この操作を振とう機およびインキュベーターを用いた振とう加温反応 (70 rpm)に変更した。エタノール沈殿操作において、操作性を向上させるために、DNA の共沈剤であるエタチンメイトを用いた。それ以外の操作は通知法⁸⁾に従った。抽出 DNA 溶液は TE 緩衝液で 20 ng/μL に希釈調製し、使用するまで -30 °C で保存した。

(2)通知法 PCR およびネステッド PCR

通知法 PCR では、PCR の反応溶液は最終濃度が 1×緩衝液、0.2 μmol/L の Wtr プライマー対、0.2 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L MgCl₂、0.625 U Taq polymerase となるように混合し、20 ng/μL に希釈調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、滅菌水により全量を 25 μL とした。すべての試液を十分混合した後、95 °C に 10 分間保ち、95 °C 30 秒間、60 °C 30 秒間、72 °C 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った。その後 72 °C 7 分間最終伸張反応を行った。

ネステッド PCR においては、1st PCR では、PCR の反応溶液は最終濃度が 1×PCR 緩衝液、0.4 μmol/L の Wtr プライマー対、0.2 mmol/L dNTP、1.8 mmol/L MgCl₂、1.25 U Taq polymerase となるように混合し、20 ng/μL に希釈調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、滅菌水により全量を 25 μL とした。すべての試液を十分混合した後、95 °C に 2 分間保ち、95 °C 30 秒間、60 °C 30 秒間、72 °C 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った。その後 72 °C 7 分間最終伸張反応を行った。2nd PCR では、1st PCR の増幅反応液を TE 緩衝液で 200 倍に希釈したものを鋳型 DNA として 2.5 μL 使用した。ネステッド PCR 用プライマー対として WtrNE プライマー対を用いた。PCR の反応溶液は 1st PCR と同様の組成を用いた。PCR は

サイクル数を 20 サイクルとし、その他は 1st PCR と同条件で行った。

(3)電気泳動条件

PCR の増幅反応液の 7.5 μ L を 6 \times ローディング緩衝液 1.5 μ L と混合後、PCR AE ゲルにより 0.5 \times TBE 緩衝液を泳動バッファーとし、100 \sim 135 V の定電圧により 40 \sim 50 分間電気泳動した。電気泳動終了後、0.5 μ g/mL 濃度になるようにエチジウムブロマイドを添加した 0.5 \times TBE 緩衝液で 20 分間染色し、0.5 \times TBE 緩衝液で 20 分間脱色した後、ゲルイメージ解析装置により UV(312 nm)を照射し、増幅バンドを検出した。

実験結果および考察

1. プライマーの設計

ネステッド PCR 用プライマー対の WtrNE プライマー対は、通知法 PCR の小麦検出用プライマー対が作製された triticin precursor 遺伝子の塩基配列情報 (GenBankTM Accession No.S62630:1567 bp)を基に、通知法 PCR のプライマー対により増幅される領域 (1171 \sim 1311 bp)の内側の配列から Primer3 を用いて、プライマーのサイズは 18 \sim 27 bp, Tm 値は 57 \sim 63 $^{\circ}$ C, GC%は 20 \sim 80%で設計した(Fig.3.1)。

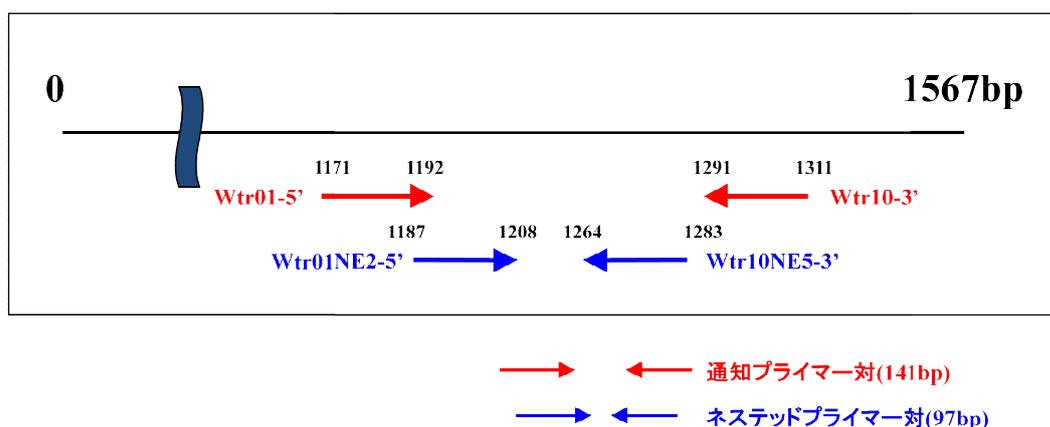


Fig.3.1. ネステッドプライマー対の設計

また、Tria04-5', Tria04-3', Tria05-3', Tria05-5'は同遺伝子の1100~1400 bpの範囲からプライマーのサイズは20~22 bp, Tm値は60~65 °C, GC%は50~60%で設計し、Tria09-5', Tria06-3'は同遺伝子の全領域からプライマーのサイズは20~22 bp, Tm値は59~61 °C, GC%は50~60%で設計した。

各プライマーを組み合わせたプライマー対の番号 (No.1~8)と増幅バンド長を Table 3.3 に示す

2. 抽出 DNA の評価

これまで我々が予備的に実施した加工食品中の小麦含有実態調査において、DNA抽出方法として Genomic-tip20/G を用いレトルトカレー3 試料から抽出した DNA の濃度は2~11 ng/μL と非常に低濃度であった。そこで、DNA 収量の低かったレトルトカレーを用いて、Genomic-tip20/G を用いた通知法⁸⁾の DNA 抽出方法と本報告で用いた振とう加温抽出法の比較検討を行ったところ、通知法⁸⁾では抽出 DNA 濃度が 11 ng/μL であったが、本報告で用いた抽出法により抽出した DNA では 59 ng/μL の濃度を示し、大幅な収量の増加が確認された。また、著者らがバナナ、リンゴおよびオレンジなどの果物から抽出した DNA においても、同様に 2~3 倍の収量の増加がみられた。DNA 収量の増加は、DNA 抽出時の静置加温抽出を振とう加温抽出法に変更することにより、抽出に用いる G2 緩衝液、α-アミラーゼおよび Proteinase K と試料との分散、試薬との攪拌が効率的に行われ、試薬の反応性が向上したことによるものと推察された。

複合原材料を用いた加工食品においては、抽出 DNA 中における対象となる特定原材料由

Table 3.3 Primer pair number for detection of wheat specific DNA and size of amplicon obtained by PCR

No.	Primer pair	Amplicon size (bp)
1	Tria05-5' + Tria04-3'	66
2	Tria09-5' + Tria06-3'	113
3	Wtr01-5' + Wtr10-3'	141
4	Tria04-5' + Tria05-3'	209
5	DX5-5' + DX5-3'	450
6	Wtr01NE2-5' + Wtr10NE5-3'	97
7	CP03-5' + CP03-3'	124
8	Plant01-5' + Plant01-3'	161

来の DNA の存在が僅少になり，目的とする DNA の検出が困難となることが考えられる．また，食品試料からの DNA の収量の向上により，PCR の反応溶液に添加する鋳型 DNA の希釈倍数が大きくなることから，抽出 DNA 溶液中の PCR 阻害物質の影響が少なくなり，効率的に PCR が実施できるものと考えられる．そのため，振とう加温抽出法は，軽微な変更のみで抽出 DNA の収量の増加が可能であることから，非常に有用と考えられる．

小麦含有加工食品 7 種，未処理小麦粉および加圧加熱処理小麦粉 3 種の抽出 DNA 濃度の測定結果を Table 3.4 に示す．DNA 溶液の 230 nm，260 nm，280 nm および 320 nm の吸光度を測定し，320 nm の吸光度をバックグラウンド値として減算補正し，260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した．DNA の純度を確認するため，260 nm/280 nm の吸光度比からタンパク質の量を，260 nm/230 nm の吸光度比から多糖などの夾雑物の量を評価した．抽出 DNA の吸光度比は，260 nm/280 nm が 1.84～1.99，260 nm/230 nm が 2.04～4.25 の範囲であった．また，抽出 DNA 濃度は 59～2480 ng/μL の範囲であった．いずれの抽出 DNA においても，鋳型として使用する濃度である 20 ng/μL 以上であり，また吸光度比においては，通知法に示されている原則の吸光度比を満たし，PCR 阻害に対するタンパク質および多糖の影響は少ないものと考えられた．

Table 3.4. Spectrophotometric analysis of extracted DNAs ^{a)}

No.	Sample	Ratio		Concentration of DNA (ng/μL)
		260 nm/280 nm ^{b)}	260 nm/230 nm ^{c)}	
1	Cookie	1.84	2.04	281
2	Cracker	1.93	2.27	1930
3	Bred (Syokupan)	1.92	2.18	1360
4	Thin noodle (Somen)	1.90	2.20	2480
5	Macaroni	1.93	2.29	2190
6	Sausage	1.90	2.78	199
7	Retort pouch curry	1.88	4.25	59
8	Wheat flour (WF)	1.89	2.29	1940
9	Steamed WF at 100°C	1.99	2.58	220
10	Steamed WF at 121°C	1.96	2.19	256
11	Steamed WF at 131°C	1.92	3.13	75

a) DNA extractions were carried out by using Genomic-tip20/G kit (QIAGEN).

b) Criterion: 1.2-2.5.

c) Criterion: ≥ 2.0 .

3. 小麦含有加工食品および加圧加熱処理小麦粉に対する通知法 PCR の適用性

これまで、通知法 PCR の加工食品に対する適用性については十分に検討されていない。そこで、小麦含有加工食品 7 種、未処理小麦粉および加圧加熱処理小麦粉 3 種を用いて、通知法 PCR の適用性を確認した。結果を Table 3.5 に示す。

DNA 抽出液中の PCR 阻害作用を直接評価するために、通知法の植物検出用プライマー対を用いて PCR を実施したところ、131 °C 処理小麦粉の抽出 DNA からは増幅バンドが検出されなかった。そこで、著者らが作製した植物検出用プライマー対 No.8 (Table 3.3)を用いて通知法条件に従い PCR を実施したところ、すべての試料の抽出 DNA において 161 bp 付近に予想される長さの増幅バンドが検出された。以上の結果から、いずれの抽出 DNA も検査に適した品質であると考えられた。

小麦の通知法 PCR を実施したところ、レトルトカレーおよび 131 °C 処理小麦粉の抽出 DNA からは増幅バンドが検出されなかった。通知法の小麦 DNA 検出用のプライマー対の作製を報告した既報⁵⁹⁾においても、小麦含有レトルト製品からは小麦 DNA の検出が不可能

Table 3.5. Detection of PCR products amplified from extracted DNAs using three kinds of primer-pairs

No.	Sample	Plant		Wheat
		CP03 ^{a)}	Plant01 ^{b)}	Wtr01+Wtr10 ^{c)}
		124 bp	161 bp	141 bp
1	Cookie	+	+	+
2	Cracker	+	+	+
3	Bred (Syokupan)	+	+	+
4	Thin noodle (Somen)	+	+	+
5	Macaroni	+	+	+
6	Sausage	+	+	+
7	Retort pouch curry	+	+	-
8	Wheat flour (WF)	+	+	+
9	Steamed WF at 100°C	+	+	+
10	Steamed WF at 121°C	+	+	Tr ^{d)}
11	Steamed WF at 131°C	-	+	-

a) Primer pair No.7 shown in table 3.3

b) Primer pair No.8 shown in table 3.3

c) Primer pair No.3 shown in table 3.3

d) Tr : trace band.

であったことから、現行の通知法 PCR は加圧加熱食品の一部には適用困難である可能性が示唆された。

4. 加工処理による原材料由来 DNA および小麦 DNA の低分子化

遺伝子組換え食品の検査では、食品の加工処理による DNA の低分子化が報告されている³³⁻³⁷⁾。抽出した DNA において、食品加工等により DNA が低分子化し、プライマー対により増幅される領域が分断されていた場合、PCR での増幅が不可能となり、検出が困難となる。このことから、検出対象 DNA の低分子化の程度および検出用プライマー対の増幅バンド長の設定は、DNA 検出の可否を決める重要な要因と考えられる。

小麦含有加工食品では、加熱処理による小麦 DNA の低分子化の報告^{10,11,64)}はいくつかあるが、加圧加熱処理による小麦 DNA の低分子化の報告はない。そこで、加工処理の異なる小麦含有加工食品 7 種、加圧加熱処理小麦粉 3 種および未処理小麦粉から抽出した DNA を用いて、電気泳動と PCR により小麦 DNA の低分子化を評価した。

4. 1 電気泳動による低分子化の評価

DNA の低分子化を電気泳動により評価した (Fig. 3.2)。

小麦含有加工食品では、焙焼加工処理されたクッキー、クラッカー、食パンおよび水練り乾燥加工処理されたそうめん、マカロニでは高分子の DNA が比較的多く残存していた。一方、加圧加熱処理されたソーセージ、レトルトカレーでは、それぞれ 300 bp 以上、200 bp 以上の DNA はほとんど確認されなかった。

加圧加熱処理小麦粉では 100 °C、121 °C、131 °C 処理の順に DNA の低分子化が進み、131 °C 処理では 180 bp 以上の DNA はほとんど確認されなかった。クッキーやクラッカーなどの焙焼加工処理は通常 200~300 °C 程度の高温度で実施されるが、高分子の DNA が比較的多く残存していた。一方、加圧加熱処理されたソーセージやレトルトカレーおよび加圧加熱処理小麦粉の 121 °C、131 °C 処理では 200 bp 以上の高分子 DNA は検出されなかった。

以上の結果から、DNA の低分子化は加熱温度よりも加圧加熱の影響が大きいことが示唆された。本研究において検討した試料では 131 °C 処理小麦粉が最も高度に低分子化していた。

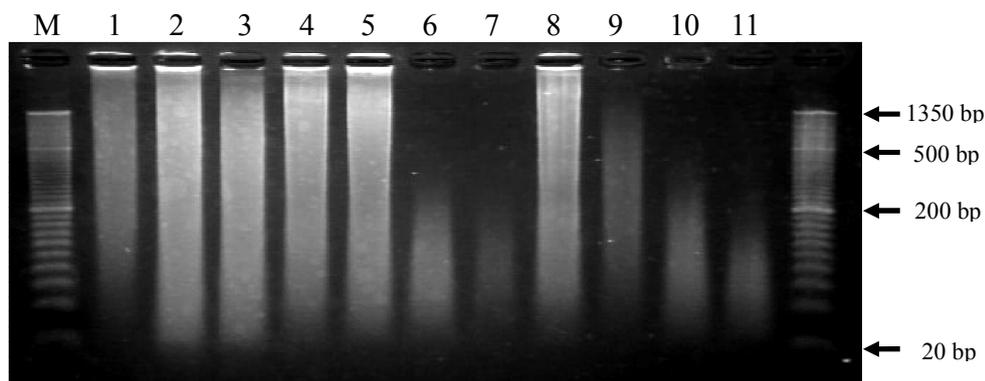


Fig. 3.2. Agarose gel electrophoresis of DNAs extracted from 11 samples

Lanes: M, 20bp ladder size standard; 1, Cokie; 2, Cracker; 3, Bred (Syokupan); 4, Thin noodle (Somen); 5, Macaroni; 6, Sausage; 7, Retort pouch curry; 8, Wheat flour (WF); 9, Steamed WF at 100°C; 10, Steamed WF at 121°C; 11, Steamed WF at 131°C.

4. 2 加工食品における検出限界増幅バンド長の検討

加工食品から抽出した DNA は高度に低分子化しているが、150 bp 以下の DNA は残存していると考えられている^{10,43)}。そのため、通知法 PCR のプライマー対は 95~141 bp の範囲で設計されている。しかし、141 bp の増幅バンド長をもつ通知法⁸⁾の Wtr プライマー対を用いて PCR を実施したところ、加圧加熱処理されたレトルトカレーおよび 131 °C 処理小麦粉の小麦 DNA は検出不可能であった。そこで、各種加工食品における検出限界となる増幅バンド長を検討した。

プライマー対は Table 3.3 の No.1~5 に示した増幅バンド長の異なる 66, 113, 141, 209 および 450 bp の 5 対を用いた。プライマー対以外の条件は通知法 PCR に従った。結果を Table 3.6 に示す。焙焼加工処理されたクッキー、クラッカー、食パンおよび水練り乾燥加工処理されたそうめん、マカロニではすべてのプライマー対で検出可能であった。しかし、加圧加熱処理されたソーセージでは 450 bp の増幅バンドが検出不可能であった。また、レトルトカレーではすべてのプライマー対で検出不可能であった。一方、未処理小麦粉および 100 °C 処理小麦粉ではすべてのプライマー対で検出可能であったが、121 °C 処理小麦粉では 66~141 bp、131 °C 処理小麦粉では 66~113 bp の範囲の増幅バンドのみが検出され、それより大きな増幅バンドは検出不可能であった。

以上の結果から、レトルトカレーを除いた加工食品および加圧加熱処理小麦の検出限界

Table 3.6. Detection of PCR products amplified from extracted DNAs using five kinds of primer-pairs shown in Table 3.3 (No.1-5)

No.	Sample	Amplicon size (bp)				
		66 bp	113 bp	141 bp	209 bp	450 bp
1	Cookie	+ ^{a)}	+	+	+	+
2	Cracker	+	+	+	+	+
3	Bred (Syokupan)	+	+	+	+	+
4	Thin noodle (Somen)	+	+	+	+	+
5	Macaroni	+	+	+	+	+
6	Sausage	+	+	+	+	- ^{b)}
7	Retort pouch curry	-	-	-	-	-
8	Wheat flour (WF)	+	+	+	+	+
9	Steamed WF at 100 °C	+	+	+	+	+
10	Steamed WF at 121 °C	+	+	Tr ^{c)}	-	-
11	Steamed WF at 131 °C	+	+	-	-	-

a) +: positive.

b) -: negative.

c) Tr: trace band.

増幅バンド長は概ね 113 bp 以下であった。ジャガイモ加工食品中の遺伝子組換えジャガイモを高感度に検出するためには、標的増幅産物が 51~101 bp 以下となるように PCR プライマー対を設計する必要性が報告されており⁶⁵⁾、本検討結果と同等の結果が得られている。

5. ネステッド PCR 法による検出

小麦含有加工食品および加圧加熱処理小麦粉を用いて検出限界増幅バンド長の検討を行ったところ、レトルトカレーにおいては増幅バンド長を 66 bp に設定した場合においても検出不可能であった。また、プライマー対 No.6 (Table 3.3)を用いて通知法⁸⁾およびネステッド PCR 法の 1st PCR 条件により検出を試みたところ、通知法⁸⁾では検出不可能であり、ネステッド PCR 法の 1st PCR においてもバンドが不明瞭で判定が難しかった。そこで、新たに作製したネステッド PCR 用プライマー対を用いたネステッド PCR 法を試みた。

小麦含有加工食品および加圧加熱処理小麦粉から抽出した 11 種の DNA を用いて通知法 PCR およびネステッド PCR 法の 1st PCR を行った。陽性コントロールとして、通知法に示されているアレルゲンチェッカー付属の陽性コントロールテンプレートをを用い、陰性コントロールとして DNA の含まれていない滅菌水を用いた。通知法 PCR の結果を Fig. 3.3A に、ネステッド PCR 法の 1st PCR の結果を Fig. 3.3B に示した。通知法 PCR ではレトルトカレ

ーおよび 131 °C 処理小麦粉が検出不可能であったが、ネステッド PCR 法の 1st PCR では検出可能であった。小麦 DNA の検出において、PCR 試薬の変更により検出可能となった報告⁵⁶⁾があり、また、本研究においても PCR 試薬を FastStart High Fidelity PCR System に変更することで増幅効率が向上したことから、小麦 DNA を高感度に検出するためには PCR 試薬の選択も重要であると考えられた。

ネステッド PCR の 1st PCR において、すべての試料の検出が可能となったが、レトルトカレーおよび 131 °C 処理小麦粉増幅の増幅バンドは不明瞭であり、結果の判定が困難であった。そこで、1st PCR の増幅反応液を直接鋳型として 2nd PCR を実施したところ、エキストラバンドが複数検出された。エキストラバンドの検出は 1st PCR で使用したプライマー対の影響と考えられたため、その影響を低減させるために 1st PCR の増幅反応液を TE 緩衝液で 200 倍に希釈し、2nd PCR を実施した (Fig. 3.3C)。2nd PCR では全ての試料から増幅バンドが明瞭に確認され、容易に判定可能となった。また、アレルゲンチェッカー付属の陽性コントロールテンプレートが 2nd PCR において検出可能であったことから、ネステッド PCR 法の陽性コントロールとして使用可能であることが確認された。

一般的に、ネステッド PCR 法は目的とする DNA を高感度に検出可能であるため、通常の PCR 法に比べてクロスコンタミネーションの危険性が増加するものと考えられている。抽出 DNA の取扱い、PCR 試薬の混合調製、1st PCR の増幅反応液の希釈操作などには細心の注意を払う必要がある。そのため、試験検査の妥当性を確認するためには、試料の検査と同時に Non-template control および陽性コントロールを用いることが重要と考えられる。

6. ELISA 法によるモデル加工食品中の小麦タンパク質の検出

通知法 PCR とネステッド PCR 法の検出状況を比較するために、表示の基準レベルである 10 µg/g となるよう小麦一次標準粉末を添加して作製した 11 種のモデル加工食品の小麦タンパク質の測定を行った。結果を Table 3.7 に示す。11 種のモデル加工食品の ELISA 法による測定値は 8.6~14.4 µg/g の範囲であり、概ね 10 µg/g 前後の値であったことから、スクリーニング検査陽性のモデル加工食品として以後の PCR 法の検討に用いることとした。

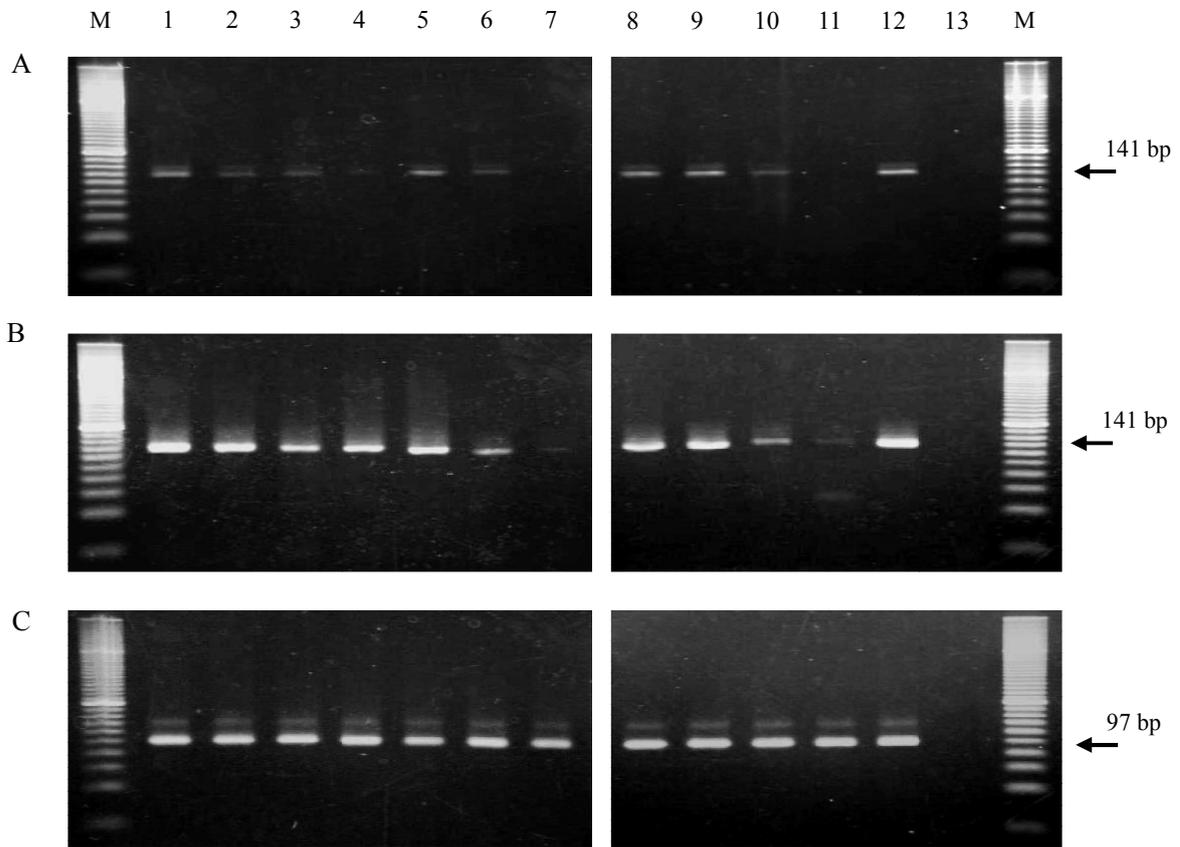


Fig. 3.3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNAs extracted from 11 samples

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

A: Japanese official PCR method, primer pair No.3.

B: Nested PCR (1st PCR) method, primer pair No.3.

C: Nested PCR (2nd PCR) method, primer pair No.6.

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, Cokkie; 2, Cracker; 3, Bred (Syokupan); 4, Thin noodle (So-men); 5, Macaroni; 6, Sausage; 7, Retort pouch curry; 8, Wheat flour (WF); 9, Steamed WF at 100 °C; 10, Steamed WF at 121 °C; 11, Steamed WF at 131 °C; 12, Positive control; 13, Non-template control.

Table 3.7. Detection of wheat standard protein using morinaga FASPEK ELISA kit (Gliadin)

Food	Gliadin protein ($\mu\text{g/g}$)
Juice	10.9
Jelly	10.2
Chicken meatball	8.6
Tofu	13.2
Boiled fish paste	11.6
Pudding	14.4
Tomato sauce	11.4
Retort A	14.3
Retort B	12.0
Retort C	9.8
Retort D	13.2

7. PCR 法によるモデル加工食品中の小麦 DNA の検出

7. 1 抽出 DNA の評価

著者らは加圧加熱殺菌食品等のように加工の進んだ食品においては、振とう加温反応により DNA の収量が向上することを報告している⁶⁶⁾。また、遺伝子組換え食品で DNA 回収時の操作の簡便性および回収率向上が確認されている⁶⁷⁾ DNA の共沈剤であるエタチンメイトを用いて、振とう加温反応により抽出を行った。抽出 DNA の測定結果を Table 3.8 に示す。DNA 溶液の 230 nm, 260 nm, 280 nm および 320 nm の吸光度を測定し、320 nm の吸光度をバックグラウンド値として減算補正し、260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した。DNA の純度を確認するため、260 nm/280 nm の吸光度比からタンパク質の量を、260 nm/230 nm の吸光度比から多糖などの夾雑物の量を評価した。抽出 DNA の吸光度比は、260 nm/280 nm が 1.70~2.46, 260 nm/230 nm が -0.48~3.87 の範囲であった。また、抽出 DNA 濃度は 2~803 ng/ μL の範囲であった。十分な DNA 量を抽出することが可能と考えられる動植物原材料がほとんど使用されていないジュースおよびゼリーでは DNA の収量が低かったことから、小麦一次標準粉末 10 $\mu\text{g/g}$ のみの添加では検査に必要となる 20 ng/ μL 以上の濃度の DNA が抽出できないことが確認された。

Table 3.8 Spectrophotometric analysis of extracted DNAs ^{a)}

Food	Ratio		Concentration of DNA (ng/μL)
	260 nm/280 nm ^{b)}	260 nm/230 nm ^{c)}	
Juice	2.46	1.03	5
Jelly	1.70	-0.23	2
Chicken meatball	1.94	2.42	699
Tofu	1.95	2.48	234
Boiled fish paste	1.94	2.40	803
Pudding	1.91	3.87	9
Tomato sauce	2.21	-0.48	4
Retort A	1.93	2.53	271
Retort B	1.92	2.42	321
Retort C	1.93	2.73	123
Retort D	1.93	2.53	320

a) DNA extractions were carried out by using Genomic-tip20/G kit (QIAGEN).

b) Criterion: 1.2-2.5.

c) Criterion: ≥ 2.0 .

プリンでは動物性原材料である卵と牛乳，トマトソースでは植物性原材料であるトマトピューレ，ケチャップが用いられていることから，通知法で示されている抽出 DNA の諸条件を満たす DNA が抽出可能と想定していたが，条件を満たすことができなかった。DNA 収量が低いこれらの加工食品では，DNA 精製時のイソプロパノール沈殿操作において DNA の沈査が目視確認できないことから，操作の難易度が高い。しかし，DNA 共沈剤を使用することにより目視確認が可能となりイソプロパノール沈殿操作が簡便となった。ゼリーとトマトソースにおいては，260 nm/230 nm の吸光度比が原則的基準値の範囲外であったが，多糖などの夾雑物の存在を示す 230 nm の吸光度値が負の値になっていることから，それらの夾雑物量は少ないものと考えられた。また，260 nm/280 nm の吸光度比が概ね原則的基準値の範囲内であったことから，7 種類のモデル加工食品および 4 種の市販レトルト食品から抽出した DNA ではタンパク質の夾雑はほぼ認められないものと考えられた。

7. 2 通知法 PCR およびネステッド PCR 法による検出

通知法で示されている植物検出用 CP03 プライマー対を用いて抽出した DNA を評価した。抽出 DNA 濃度が 20 ng/μL 未満のジュース，ゼリー，プリンおよびトマトソースの抽出 DNA

については、抽出 DNA 溶液の原液をそのまま使用して実施した。その結果、CP03 プライマー対ではレトルト食品 A が検出困難であった (Fig.3.4A)ことから、より高感度に検出可能と考えられる Plant01⁶⁸⁾を用いて植物定性の PCR を実施したところ、すべてのモデル加工食品の抽出 DNA において 161 bp 付近に予想される長さの増幅バンドが検出された (Fig.3.4B)。以上の結果から、いずれの抽出 DNA も検査に適した品質であると考えられた。

通知法 PCR および我々が報告したネステッド PCR 法⁶⁶⁾による小麦 DNA の検出を行った。通知法⁸⁾の Wtr プライマー対を用いて PCR を実施したところ、ゼリー、レトルト食品 C および D の抽出 DNA からは増幅バンドが検出されず、またジュース、鶏肉団子、豆腐、かまぼこ、レトルト食品 A および B については検出可能ではあるものの増幅バンドが不明瞭であった (Fig.3.4C)。Wtr プライマー対を用いた通知法 PCR の検出下限値は、トウモロコシ粉に小麦粉を添加した未加熱処理の粉体レベルで 50 µg/g と報告されている⁵⁹⁾。

本研究により作製したモデル加工食品は既報の検出下限値より低い濃度である 10 µg/g の小麦一次標準粉末を添加しており、さらにレトルト加工処理等により DNA が低分子化していることから、増幅可能な鋳型 DNA 量が微量であることが想定される。そのため、ゼリー、レトルト食品 C および D において検出不可能となったものと考えられた。通知法 PCR では検出不可能であったゼリー、レトルト D はネステッド PCR 法により検出可能となり、また通知法 PCR では増幅バンドが不明瞭であったジュース、鶏肉団子、豆腐、かまぼこおよびレトルト食品 A、B において、明瞭な増幅バンドが確認された (Fig.3.4D)。しかし、レトルト食品 C の抽出 DNA からは増幅バンドの検出が不可能であった。

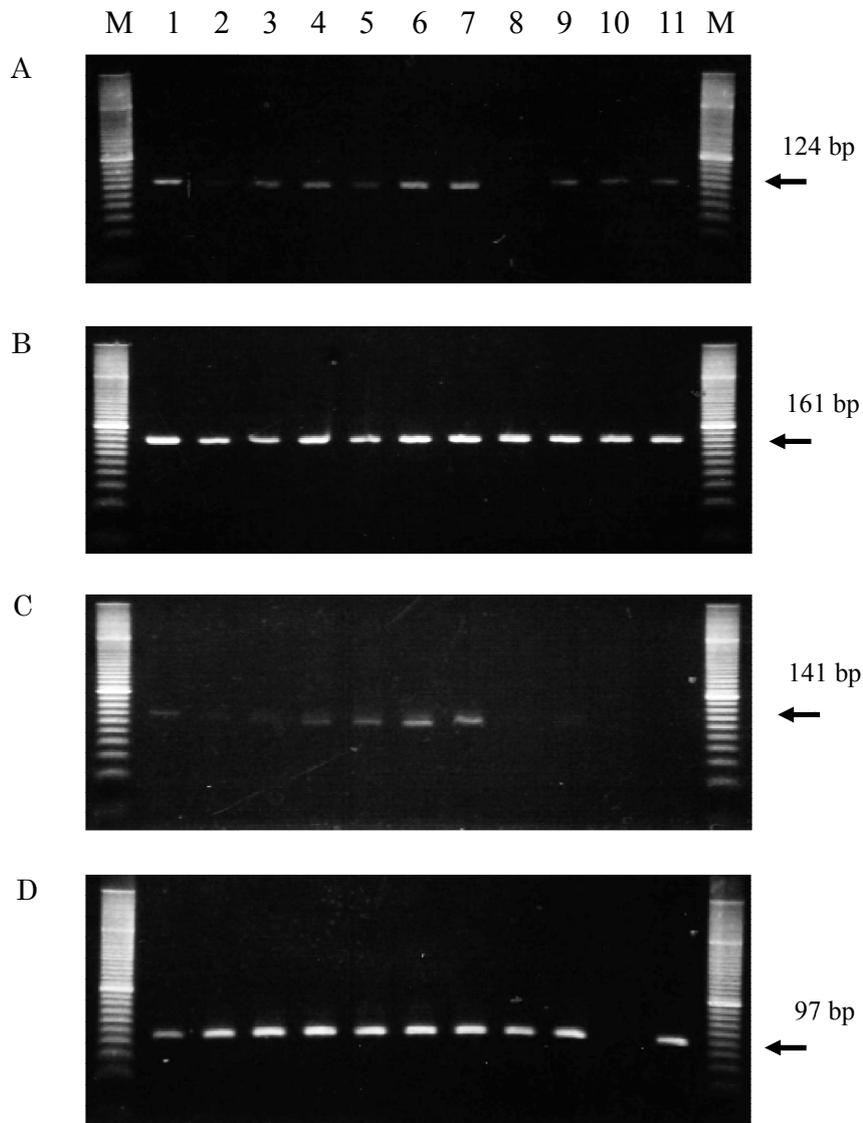


Fig. 3.4 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNAs extracted from 11 samples

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

A: Japanese official PCR method for plant, CP03-5'/CP03-3' primer pairs.

B: Original PCR method for plant, Plant01-5'/Plant01-3' primer pairs.

C: Japanese official PCR method for wheat, Wtr01-5'/Wtr10-3' primer pairs.

D: Nested PCR method for wheat, Wtr01NE2-5'/Wtr10NE5-3' primer pairs.

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, Juice; 2, Jelly; 3, Chicken meatball; 4, Tofu; 5, Boiled fish paste; 6, Pudding; 7, Tomato sauce; 8, Retort A; 9, Retort B; 10, Retort C; 11, Retort D.

8. 小麦 DNA の検出に対する鋳型 DNA の増量効果

動植物由来原材料の使用割合が高い鶏肉団子やかまぼこなどにおいては十分な量の DNA 収量が得られているが、原材料配合比から推察すると、その抽出 DNA 中には小麦以外の DNA が多量に含まれているものと考えられる。一般に PCR 法における最終的な増幅バンド量は PCR の反応溶液中に存在する「目的とする DNA 領域のコピー数」に依存すると考えられているため、本検討で作製したモデル加工食品のように、目的となる原材料以外の DNA を多量に含む抽出 DNA 溶液を鋳型として用いた場合には、その PCR の反応溶液中の小麦由来 DNA の量が著しく低値になり、PCR においてアガロースゲルで可視可能なレベルまで DNA が増幅できないことが考えられる。比較的緩やかな加工条件であり、標的 DNA の分解が少ないと考えられる鶏肉団子およびかまぼこにおいて増幅バンドが不明瞭であったことは、これらが原因の一つである可能性が高い。小麦標準一次粉末を 10 µg/g 添加したモデル加工食品において検出できない場合、表示の妥当性検証が著しく困難となる。そこで、PCR の反応溶液中の小麦 DNA 量を増量し、増幅バンドを明瞭化することを目的としてネステッド PCR 法により鋳型 DNA 量の検討を行った。併せて通知法 PCR との比較検討を行った。

8. 1 高濃度抽出 DNA における検討

抽出 DNA 濃度が 80 ng/µL (200 ng/2.5 µL)以上のモデル加工食品 7種の抽出 DNA 溶液を用いて検討を行った。鋳型量は通知⁸⁾に示された DNA 量(50 ng)、その 2 倍量、4 倍量および抽出 DNA 溶液 (原液)の 4 種類を用いた。結果を Table 3.9 に示す。通知法⁸⁾では検出不可能であったレトルト食品 C では、100 ng および原液 (308 ng)に増量したところ検出可能となった。またレトルト食品 D では、200 ng および原液 (800 ng)に増量したところ検出可能となり、レトルト食品 C と D の両食品において、鋳型量の増量が有効であることが確認された。しかし、通知法⁸⁾で増幅バンドが検出されていたかまぼこにおいては、原液 (2008 ng)に増量したところ、バンドの増幅が不可能となった。鋳型量の増量に伴う PCR 阻害物質の増加もしくは過剰な DNA の存在による PCR の物理的な阻害などがその原因と考えられた。一方、ネステッド PCR 法で検出不可能であったレトルト食品 C では、原液 (308 ng)に増量したところ、検出可能となった。レトルト食品 4 種は、ほぼ同等の加工条件であり、抽出

Table 3.9. Comparison of the results between the Adopted PCR and nested PCR methods for wheat by change of the amount of template DNA extracted from seven types of models for processed foods

Foods	Adopted PCR				Nested PCR			
	template DNA (ng)				template DNA (ng)			
	Max ^{a)}	200	100	50	Max	200	100	50
Chicken meatball	Tr ^{b)}	Tr	Tr	Tr	+	+	+	+
Tofu	+	Tr	Tr	Tr	+	+	+	+
Boiled fish paste	—	Tr	Tr	Tr	+	+	+	+
Retort A	+	Tr	Tr	Tr	+	+	+	+
Retort B	+	+	Tr	Tr	+	+	+	+
Retort C	+	—	Tr	—	+	—	—	—
Retort D	Tr	Tr	—	—	+	+	+	+

a) Stock solution of each extracted DNA.

b) Tr : trace band.

される小麦一次標準粉末由来 DNA の量や加工による DNA の低分子化などの影響もほぼ同等であると考えられるが、両 PCR 法において検出状況に違いが見られた。その原因として増幅可能な鋳型 DNA 量が少ないこと、または 4 種のレトルト食品中の原材料の違いによる PCR の阻害などが考えられた。

1 回の PCR により増幅バンドを検出する通知法 PCR では鋳型量を増量した場合、DNA 抽出液中の PCR 阻害物質が影響する可能性があり、その結果増幅バンドが不明瞭になることが推察された。一方、2 回の PCR を実施するネステッド PCR 法では、1st PCR の増幅において PCR 阻害物質が影響するものの、その増幅産物を TE 緩衝液で 200 倍に希釈して 2nd PCR 用鋳型に用いることから PCR 阻害作用が低減され、明瞭な増幅バンドが確認可能となったものと考えられる。

8. 2 低濃度抽出 DNA における検討

抽出 DNA 濃度が 20 ng/μL 以下であったジュース、ゼリー、プリン、トマトソースの 4 種のモデル加工食品から抽出した DNA 溶液を用いて検討を行った。これらの抽出 DNA 溶液は 20 ng/μL 以下と低濃度なため、鋳型 DNA を増加させるために、PCR の反応溶液に添加する鋳型 DNA 容量を増量する方法で検討を行った。PCR の反応溶液に添加する鋳型 DNA 容量として通知⁸⁾に示された DNA 容量 (2.5 μL)、その 2 倍容量および 4 倍容量の 3 種類を用いて植物定性 PCR および通知法⁸⁾の小麦定性 PCR を実施した。結果を Fig.3.5 に示す。プ

リンとトマトソースでは3種のプライマー対および全ての鋳型 DNA 添加容量において明瞭なバンドが検出された。ジュースでは通知法 PCR において鋳型 DNA 添加容量を 10 μL に増量したところ明瞭な増幅バンドが確認された。一方、ゼリーでは通知法⁸⁾の CP03 を用いた植物定性 PCR において、通知⁸⁾の2倍容量である 5.0 μL へ増量することにより増幅バンドが明瞭になった。また、通知法⁸⁾の小麦定性 PCR においては 5.0 μL への増量により検出可能となった。しかし、両プライマー対ともに 10 μL まで増量したところ検出不可能となった。ゼリー抽出 DNA では、Plant01 プライマー対を用いた植物定性 PCR を行ったところ、鋳型 DNA 容量の増量に反比例して増幅バンドが薄くなっていた。このことから、ゼリーから抽出した DNA では、何らかの PCR 阻害物質が混入し、他のモデル加工食品に比べて PCR 阻害作用が強いことが推察された。

法科学領域では生物学的試料を用いた PCR 検査において正確な結果を導くためには、目的とする DNA 量の推定が重要だと報告されている⁶⁹⁾。本検討の結果からも、様々な加工が施され、かつ多種多様な原材料を用いた加工食品を対象とした PCR 検査を実施する際には、食品の原材料組成から目的とする DNA の量および質等を推定し、PCR に用いる鋳型 DNA 量を適切に増量することが検出のための有効な手段の一つになると考えられた。しかし、加工食品は複数の原材料を使用していることが多いため、鋳型 DNA 量を増量する場合には DNA の抽出法の検討等を行い、PCR 阻害物質の低減を図ることが今後重要と考えられる。

9. まとめ

ネステッド PCR 法を用いた特定原材料 (小麦)の高感度検出法を確立した。市販の小麦加工食品 7 種を用いて、小麦の通知法 PCR とネステッド PCR 法を比較検討したところ、小麦定性 PCR では 7 種の加工食品の内 6 種検出可能であったが、レトルトカレーのみ検出不可能であった。一方、ネステッド PCR 法ではすべての加工食品で検出可能であった。また、未処理小麦粉、100 $^{\circ}\text{C}$ 、121 $^{\circ}\text{C}$ 、131 $^{\circ}\text{C}$ 加圧加熱処理をした加圧加熱処理小麦粉を作製し、両 PCR 法を比較検討したところ、ネステッド PCR 法ではすべて検出可能であったが、通知法 PCR では 131 $^{\circ}\text{C}$ 処理小麦粉で検出が不可能であった。

DNA の検出限界となる増幅バンド長を検討したところ、プライマー対はおおよそ 100 bp

以下で設定することが有効と考えられた。また、小麦 DNA の低分子化は温度の影響よりも加圧加熱の影響が大きいことが示唆された。本研究で確立したネステッド PCR 法は、加圧加熱処理により高度に低分子化した DNA においても検出可能であったことから、通常の加工食品および多くのレトルト食品、ハイレトルト食品においても適用可能な検査法と考えられる。定性 PCR 法の感度に起因する ELISA 法との検査結果の不一致事例については、ネステッド PCR の利用により改善が可能と考えられた。

小麦のスクリーニング検査陽性モデル加工食品を 11 種類作製し、通知法 PCR およびネステッド PCR 法による検出状況を調べ、併せて鋳型 DNA の増量効果について検討を行った。現行の通知法 PCR では 8 種類が、ネステッド PCR 法では 10 種類のモデル加工食品が検出可能であった。これらのモデル加工食品では、鋳型 DNA を増量させることにより両 PCR 法で検出可能となった。しかし、過剰増量による PCR 阻害により増幅が不可能となることが、かまぼこおよびゼリーで確認された。以上の結果から、加工食品を対象とした PCR 検査法を実施する際には、PCR に用いる鋳型 DNA 量を適切に増量することが正確な結果を導き出すための有効な手段の一つになると考えられた。また DNA の抽出方法を検討することにより抽出 DNA 中に存在する PCR 阻害物質の低減を図ることが今後必要と考えられた。

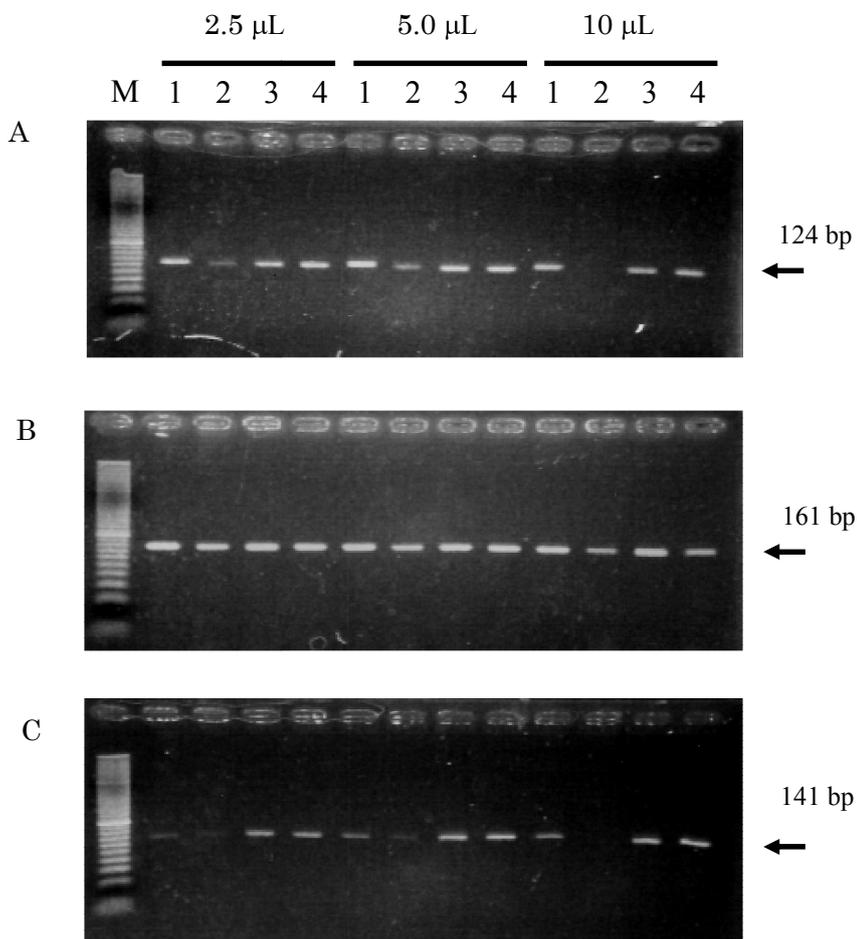


Fig. 3.5 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNAs extracted from 4 samples

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

A: Japanese official PCR method for plant, CP03-5'/CP03-3' primer pairs.

B: Original PCR method for plant, Plant01-5'/Plant01-3' primer pairs.

C: Japanese official PCR method for wheat, Wtr01-5'/Wtr10-3' primer pairs.

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, Juice; 2, Jelly; 3, Pudding; 4, Tomato sauce.

第4章 特定原材料検査における乾燥海苔製品中のえび・かに DNA 検出法の検討

食品製造者、食品衛生法による登録検査機関、公的試験研究機関である保健所、衛生研究所等では、通知法により原材料、半製品、加工品など様々な食品の検査を実施している。2002年4月に表示義務となった5品目については相当数の検査実績が積まれているが、「えび」および「かに」については2008年6月に特定原材料に追加されたことから、検査実績も十分ではなく、どのような原材料や食品へ混入しているか不明な点が多かった。2008年に食品中に含まれる甲殻類タンパク質含有実態調査が実施され、甲殻類を補食している魚介類を原材料として製造される魚肉すり身、およびそれを使用して製造される加工食品において高濃度の甲殻類タンパク質が検出された⁷⁰⁾。また、海苔製品では、85検体中27検体(31.8%)と高頻度に甲殻類タンパク質が検出された。

甲殻類タンパク質が10 µg/g以上検出された食品では製造記録の確認後に必要な場合には確認検査を実施しなければならない⁸⁾。実態調査として、魚肉すり身およびその加工品やいわし稚魚製品、海苔製品などで確認検査を実施した報告がいくつかみられるが⁷¹⁻⁷⁴⁾、高頻度に甲殻類タンパク質が検出されている海苔製品では確認検査が適用できなかったとの報告がある⁷⁴⁾。そこで、特定原材料検査や遺伝子組換え食品等の検査で実施事例が多く、様々な加工食品で適用実績のあるDNA抽出キットであるGenomic-tip20/Gを用いて予備試験を実施したところ、海苔の吸水性、DNA抽出時の抽出液の粘張性などによりDNA抽出および定性PCRの適用が著しく困難であることが確認された。甲殻類アレルギーの発症は、学童期から成人期に多く、卵や牛乳と異なり経年的に漸減することがない¹⁶⁾。また、小麦と同様にFDEIAの原因抗原であることからアナフィラキシーショックの発症の可能性も高い。そのため、意図せずに乾燥海苔製品中へ混入したえびまたはかにを高感度に検出する方法は必要不可欠と考えられる。

本研究では、「えび」または「かに」を一定量含有した海苔試料を作製し、乾燥海苔製品からのDNA抽出方法および「えび」または「かに」定性PCR法による検出下限値などの詳細な検討を行った。また、市販海苔製品を用いて、その適用性についても検討した。

実験方法

1. 試料

1. 1 「えび」または「かに」含有海苔試料の作製

市販の板海苔を購入し、ミルサーにより粉碎，均一化して海苔粉末試料を調製した。調製した海苔粉末試料は，FA テストイムノクロマト甲殻類「ニッスイ」(検出下限 1 $\mu\text{g/g}$)を用いて甲殻類のタンパク質の含有がないことを確認した(Fig.4.1)。「えび」および「かに」の標準原料として，それぞれ市販の冷凍ブラックタイガー (インド産)およびボイル冷凍毛ガニ (北海道産)を購入した。ブラックタイガーおよび毛ガニはそれぞれ殻を取り除き，可食部を $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ で一晩凍結させた後に凍結乾燥機を用いて3日間凍結乾燥を行い，ミルサーで粉碎，均一化し「えび」または「かに」粉末試料とした。「えび」または「かに」粉末試料をそれぞれ 10,000 $\mu\text{g/g}$ になるように甲殻類タンパク質の含有がないことを確認した海苔粉末試料に添加し，その後それぞれ 100 $\mu\text{g/g}$ ，10 $\mu\text{g/g}$ ，5 $\mu\text{g/g}$ ，1 $\mu\text{g/g}$ となるようにミルサーで攪拌しながら海苔粉末試料で段階希釈し，1~10,000 $\mu\text{g/g}$ まで5濃度の「えび」または「かに」含有海苔試料をそれぞれ作製した。FA テストイムノクロマト甲殻類「ニッスイ」を用いて，「えび」または「かに」含有海苔試料の最低濃度である 1 $\mu\text{g/g}$ および表示の基準値である 10 $\mu\text{g/g}$ 含有海苔試料が検出可能なことを確認した (Fig.4.1)。

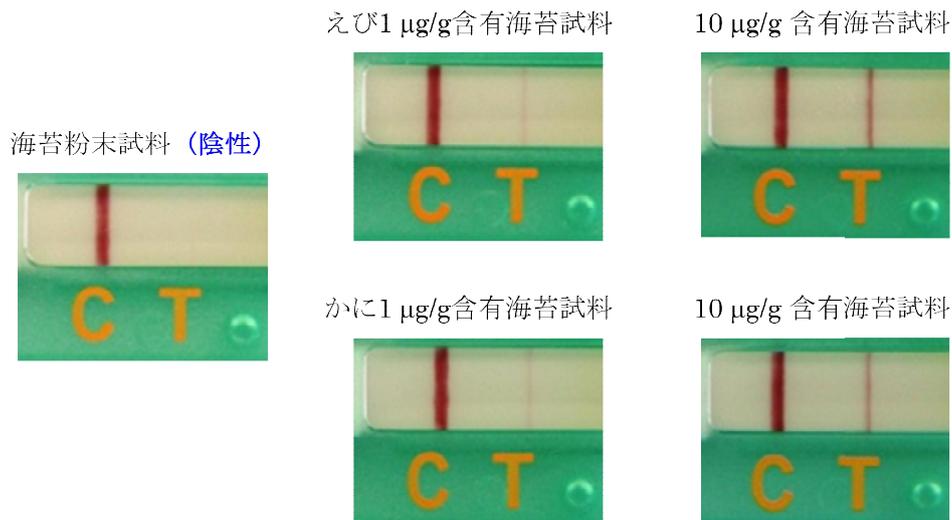


Fig.4.1 FAテストイムノクロマト甲殻類「ニッスイ」の結果

1. 2 市販の乾燥海苔製品

乾燥海苔 8 検体を千葉県内スーパーマーケットなどから購入した(Fig.4.2).

2. プライマー

動物 DNA 検出用プライマー対として通知法⁸⁾の AN1-5'/AN2-5'/AN-3' (AN プライマー対)⁷⁵⁾を用いた. 植物 DNA 検出用プライマー対として通知法⁸⁾の CP03-5'/CP03-3' (CP03 プライマー対)⁴⁴⁾および既報の Plant01-5'/Plant01-3' (Plant01 プライマー対)⁶⁸⁾, さらにプロメガ社製 Placon プライマー対⁷⁶⁾を用いた. 現在生産されている乾燥海苔製品は紅藻類スサビノリ (*Pyropia yezoensis*)の仲間であるナラワスサビノリ (*Pyropia yezoensis form. narawaensis*)が主流である⁷⁷⁾ことから, スサビノリの葉緑体 *rbcL* 遺伝子の塩基配列情報 (GenBankTM Accession No.AB243204:1441 bp)を基に, Primer3 を用いて海苔 DNA 検出用プライマー対 PyrbcL プライマー対(PyrbcL01-5' : 5'-GGT CCT GCA ACT GGA TTG AT-3', PyrbcL01-3' : 5'-AGG AAA TCA AGA CCG CCT TT-3' : 152 bp)を設計した. (Table 4.1). えびおよびかに検出用プライマー対は通知法⁸⁾に示された既報²³⁾のプライマー対 (ShH プライマー対, CrH プライマー対)をそれぞれ用いた. アキアミプライマー対およびシャコプライマー対はファス



Fig.4.2. 購入した市販の海苔製品

Table 4.1 List of PCR primers

Target	F or R ¹⁾	Primer name	Sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)	Ref.
Animal ²⁾	F	AN1-5'	TGACCGTGCGAAGGTAGC	370-470	75
	F	AN2-5'	TAAGTGTGCTAAGGTAGC		
	R	AN-3'	CTTAATTCAACATCGAGG		
Plant	F	CP03-5'	CGGACGAGAATAAAGATAGAGT	124	44
	R	CP03-3'	TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA		
	F	Plant01-5'	AAAACCGGTCTTCGGGTATC	161	68
	R	Plant01-3'	TTCCAGTGGGGACAGCTATG		
	F	Plaon5	ATGTTAGAAGGAGCTAAATC	140	76
	R	Plaon3	CCGAATGATTGTTTAGCCAA		
Nori	F	PyrbcL01-5'	GGTCCTGCAACTGGATTGAT	152	This study
	R	PyrbcL01-3'	AGGAAATCAAGACCGCCTTT		
Shrimp ³⁾	F	ShH12-05'-1,2	TTATATAAAGTCTRGCCCTGCC	187	23
	R	ShH13-03'-1	GTCCCTCTAGAACATTTAAGCCTTTTC		
		ShH13-03'-2	GTCCCTTTATACTATTTAAGCCTTTTC		
		ShH13-03'-3	GTCCCCCAAATTATTTAAGCCTTTTC		
Crab ⁴⁾	F	CrH16-05'-1,2	GCGTTATTTTTTTTGAGAGTTCWTATCGTA	62	23
		CrH16-05'-3	GCGTAATTTTTTCTGAGAGTTCATTATCATA		
		CrH16-05'-4,5	GCGTTATTTTTTTTAAGAGTACWTATCGTA		
		CrH16-05'-6	GCGTTATTTCTTTTGAGAGCTCATATCGTA		
	R	CrH11-03'	TTTAATTCAACATCGAGGTCGCAAAGT		
Akiami	F	AsH11-05'	GGTTGTACAAAAAGAAAGCTGTCTCA	82	23
	R	ShH13-03'-1,2,3 ⁵⁾			
Shako	F	StH12-05'-1,2	TTGTATGAATGGTCSGACAAGAT	95	23
	R	StH12-03'-1,2	ATCGTCCCTCCATATYATTTAAGCTTTTTT		

1)F: forward primer, R: reverse primer.

2),3),4):Each primer pairs are mixed according to each reference.

5)A mixture of primers of equal parts of ShH13-03'-1,2,3.

マック(株)から購入した。市販の Plaon プライマー対, アキアミプライマー対およびシャコ
プライマー対を除き, 各プライマーは, グライナージャパン社に合成委託した逆相カラム
精製品を用いた。

3. 試薬および試液

3. 1 ELISA 法

日水製薬株式会社製 FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」および(株)マルハニチロホールディングス製甲殻類キット「マルハ」を用いた。

3. 2 PCR 法

(1) DNA 抽出

DNA の抽出には、通知法に記載されているシリカゲル膜タイプキットとして QIAGEN 製 DNeasy Plant mini kit, イオン交換樹脂タイプキットとして同社製 Genomic-tip20/G を用いた。CTAB 法には、和光純薬工業(株)製の CTAB, 0.5M EDTA, 塩化ナトリウム, クロロホルム, イソアミルアルコール PCI (25:24:1), エタノール, TE 緩衝液(各最終濃度 10 mmol/L Tris/塩酸, 1 mmol/L EDTA (pH8.0))を用いた。CTAB 法を応用したキットとして QIAGEN(株)製 DNeasy *mericon* Food kit を用いた。Genomic-tip20/G を用いた方法および CTAB 法では DNA の共沈剤としてエタチンメイト (ニッポンジーン(株)製)を用いた。滅菌水は DNase フリー水 (GIBCO:Ultra Pure Distilled Water)を用いた。α-アミラーゼ(SIGMA 社製 Cat.No.A-6380 1 mg/mL)は滅菌水により 1 mg/mL となるように調製し、濾過滅菌したものを用いた。Proteinase K (>600 mAU/ml)および RNase A (17,500 U)は QIAGEN (株)製を用いた。

(2) PCR 法

通知法に記載されている PCR の反応試薬であるアプライドバイオシステムズ(株)製 AmpliTaq Gold® (AmpliTaq 試薬)および (株)島津製作所製の Ampdirect® Plus (Ampdirect 試薬)を用いた。DNA の希釈調製には TE 緩衝液を用いた。PCR に用いた各プライマーは TE 緩衝液で溶解し、25 μmol/L の濃度に希釈調製した。PCR 用の各種プライマー溶液は使用するまで-30℃で保存した。

(3) 電気泳動

アガロースゲル電気泳動には、AgaroseL03「Takara」(タカラバイオ(株)製)を用い、0.5×TBE 緩衝液 (最終濃度 44.5 mmol/L Tris-Borate, 10 mmol/L EDTA)を泳動用緩衝液として用いた。DNA マーカーは EZ Load Molecular Ruler 20 bp (バイオラッド(株)製)を用いた。PCR の増幅反応液および DNA マーカーのアプライには、6×ローディング緩衝液 (ニッポンジーン(株)

製)を用いた。DNA の染色には、10 mg/mL のエチジウムブロマイド (インビトロジェン(株)製)を用いた。

4. 装置および機器

凍結乾燥機：FDU-830 (東京理科器械(株)製)，ミルサー：IFM-700G (イワタニ(株)製)，プレートリーダー：MULTISKAN JX (サーモエレクトロン(株)製)，プレートウォッシャー：Wellwash Plus (サーモラボシステムズ(株)製)，冷凍庫：MDF-U442(サンヨー(株)製)，冷却遠心機：5922 (クボタ(株)製)，恒温槽：ドライサーモバス ALB-221 (イワキ(株)製)，マイクロチューブ遠心機：1-13 (クボタ(株)製)，タッチミキサー：MT-31 (ヤマト科学(株)製)，分光光度計：BioSpec-mini (島津製作所(株)製)，サーマルサイクラー：Veriti サーマルサイクラー (ライフテクノロジーズジャパン(株)製)，電気泳動装置：Mupid-ex (アドバンス(株)製)，ゲル振とう機：ベリードンサーシェーカー (東和科学(株)製)，ゲルイメージ解析装置：FAS-III MODEL-TM2 (東洋紡績(株)製)を用いた。

5. 測定条件

5. 1 ELISA 法

日水製薬株式会社製 FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(以下 N キットとする)および(株)マルハニチロホールディングス製甲殻類キット「マルハ」(以下 M キットとする)のキットを用い、通知法⁸⁾およびキット付属の説明書に従い測定した。

5. 2 PCR 法

(1) 試料の前処理

乾燥海苔製品の主流な種類である「あまのり (焼き海苔)」は 2.3%の水分含有率を示す⁷⁸⁾ことから、乾燥海苔製品は高度な乾燥食品と考えられる。コンニャク製粉含有米粉等のような乾燥食品では DNA の抽出液が試料に吸水され、試料の攪拌が十分実施できず、また多糖成分が多いことから抽出液自体がゲル化し、その後の精製作業に支障をきたすことが報告されている⁷⁹⁾。乾燥海苔製品も同様に DNA 抽出液が試料に吸収され、多糖を多く含むことから DNA 粗抽出液の粘性が高く、精製作業が困難であった。そこで、試料由来の影響を

低減するために、すべての DNA 抽出法において、通知法で定めている試料採取量の半分の 1.0 g を用いることとした。さらに DNA 抽出液量を確保し、抽出効率を高めるために CTAB 法以外の方法では含水処理として試料 1.0 g に DNase フリー水を 20 mL 加え、十分攪拌した後、3,000×g で 10 分間室温にて遠心分離し、上清を取り除いたものを DNA 抽出用の含水処理試料とした。

(2) DNA の抽出

Genomic-tip20/G を用いた DNA 抽出方法では、抽出に用いる G2 Buffer を 20 mL に増量し、またその他は通知法に従った (以下 GT 法とする)。DNeasy Plant mini kit (以下 DPM 法とする) および CTAB 法は通知法に従い実施した。GT 法および CTAB 法では、エタノール沈殿の際の操作性を高めるため、DNA の共沈剤としてエタチンメイトを用いた。

加工食品では DNA の断片化が報告されている³³⁻³⁷⁾ことから、DNeasy *mericon* Food kit では、添付プロトコールのうち、DNA が断片化した加工食品用にデザインされた「短い DNA フラグメント精製用プロトコール」を一部改良した方法を用いた (以下 DMF-mSFP 法とする)。すなわち、以下の操作方法により実施した。

含水処理済みの試料に 10 mL の Food Lysis Buffer と 25 μ L の Proteinase K 溶液を添加し、十分攪拌する。60 $^{\circ}$ C で 30 分間、途中何度か攪拌しながら加温し、氷上で室温まで冷ます。2,500×g で 5 分間遠心後、上清 700 μ L を採取し、クロロホルム 500 μ L と混合する。15 秒間激しく攪拌し、14,000×g で 15 分間遠心する。上清 450 μ L と 1,800 μ L の Buffer PB を十分混合し、QIAquick Spin Column に 750 μ L ずつ添加し、17,900×g で 1 分間遠心する。混合液がなくなるまで遠心操作を繰り返し、カラムに全量添加する。500 μ L の Buffer AW2 を QIAquick Spin Column に添加し、17,900×g で 1 分間遠心する。再度 17,900×g で 1 分間遠心し、メンブランを乾燥させる。100 μ L の Buffer EB を QIAquick Spin Column に添加し、室温で 1 分間インキュベーションした後に 17,900×g で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 溶液とした。

各抽出法により得られた DNA 溶液は、分光光度計により 230 nm, 260 nm, 280 nm および 320 nm の吸光度を測定し、320 nm の吸光度をバックグラウンド値として減算補正し、260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した。DNA の純度を確認するため、260 nm/280 nm の吸光度比からタンパク質の量を、260 nm/230 nm の吸光度比から多糖などの夾雑物の量を評価した。

(3) PCR

PCR に用いる試薬として、AmpliTaq 試薬および Ampdirect 試薬の 2 種類を利用した。PCR の反応溶液は、下記に示す各種 PCR 試薬に TE 緩衝液で 20 ng/ μ L に希釈調製した DNA 溶液を 2.5 μ L 加え、DNase フリー水により全量を 25 μ L とした。

AmpliTaq 試薬による反応では、動物、植物 (CP03 プライマー対)、えび、かに定性 PCR については、それぞれ通知法 PCR の試薬組成およびサイクル条件に従った。植物検出用の Placon プライマー対については、試薬組成およびサイクル条件はキットに添付の条件に従った。植物検出用の Plant01 プライマー対⁶⁸⁾および海苔検出用の Pyrbcl プライマー対は、通知法⁸⁾記載の植物定性 PCR 法の諸条件に従った。サーマルサイクラーは Veriti サーマルサイクラーを用い、9600 Emulation Mode に設定して使用した。

一方、Ampdirect 試薬による反応では、PCR 試薬組成は、最終濃度が 1×Ampdirect Plus, 0.4 μ mol/L のフォワード、リバースプライマー, 0.025 Units DNA polymerase となるように調製した。PCR サイクル条件は 95 °C に 10 分間保ち, 94 °C 30 秒間, 各アニーリング温度で 1 分間(動物: 50 °C, 植物 CP03, Plant01, Placon: 60 °C, えび: 56 °C, かに 54 °C, 海苔: 60 °C, アキアミ: 56 °C, シヤコ: 54 °C), 72 °C 1 分間を 1 サイクルとして, 40 サイクルの増幅反応を行った。その後 72 °C で 7 分間最終伸張反応を行った。Veriti サーマルサイクラーは Emulation Mode を使用せず, 通常モードに設定した。

6. 電気泳動条件

PCR の増幅反応液の 7.5 μ L を 6×ローディング緩衝液 1.5 μ L と混合後, 4%アガロースゲルにより 0.5×TBE 緩衝液を泳動バッファーとし, 100 または 135 V の定電圧により 40~50 分間電気泳動した。泳動終了後, 染色液で 20 分間染色し, 脱色液で 20 分間脱色した後, ゲルイメージ解析装置により UV (312 nm) を照射し, 増幅バンドを検出した。

実験結果および考察

1. 海苔 DNA 検出用プライマー対の設計

通知法の GT 法, DPM 法, CTAB 法により数種類の市販の乾燥海苔を用いて, DNA 抽出の予備試験を実施したところ, 通知法の 3 種の抽出法では海苔の吸水性および抽出液の粘張性などにより DNA の抽出が困難であった. そこで, 採取試料量を 1 g に減量し, 抽出バッファーを増量させた GT 法により DNA を抽出し, 通知法の植物 DNA 検出用プライマー対である CP03 プライマー対による増幅を試みたところ, 良好な DNA 収量, 精製度を示した抽出 DNA においても PCR での増幅が確認されなかった. そこで, 別の植物 DNA 検出用プライマー対である, Plant01 および placon プライマー対の 2 種のプライマー対を用いたところ, いずれのプライマー対においても増幅が確認されなかった.

通知法に示された植物または動物 DNA 検出用プライマー対による PCR の増幅確認は, 検査対象となる特定原材料由来 DNA の検出の前に, 抽出された DNA 中に PCR 阻害物質などの混入の影響がないかを評価し, 偽陰性の可能性を否定することを目的としている. 本研究では, 異なる 3 種の植物 DNA 検出用プライマー対において増幅が確認されなかったことから, これらの植物 DNA 検出用プライマー対では抽出 DNA の評価は困難と判断した. そのため, 乾燥海苔製品に特化した抽出 DNA 評価用のプライマー対として海苔 DNA 検出用のプライマー対を新たに作製した. 市販の乾燥海苔製品を複数用いて DNA を抽出し, 増幅を試みたところ, いずれの乾燥海苔製品においても良好な増幅産物が確認された. 以上のことから, 本プライマー対は乾燥海苔製品から抽出した DNA の評価に用いるプライマー対として使用可能なことが確認された.

2. CTAB 法応用キットによる DNA 抽出法 (DMF-mSFP 法)の検討

通知法には 3 種の DNA 抽出方法が記載されているが, これまで CTAB 法のみキット化されていなかった. CTAB 法は適用範囲が広い上, PCR 阻害物質が残存されにくく, 純度の高い DNA を得ることが可能な優れた方法である⁸⁾が, 抽出操作が煩雑であることから抽出に時間を要し, また収量が低いことが難点であった. 乾燥海苔製品は PCR 阻害物質となる硫

酸化粘性多糖類を多量に含む⁸⁰⁾ことから、PCR の阻害が予測される。そのため、CTAB 法による DNA の抽出は乾燥海苔製品においては最適な方法の一つと考えられる。

本研究では、CTAB 法を応用したキットである DNeasy *mericon* Food kit を用いて乾燥海苔製品に適用可能な DNA 抽出法の検討を行った。本キットの説明書には「通常プロトコール (SP)」と「短い DNA フラグメント精製用プロトコール (SFP)」が記載されており、それぞれに試料採取量を 2 g または 200 mg とする計 4 種類のプロトコールが示されている。SP と SFP の両プロトコールでは、DNA を保持するカラムである QIAquick Spin Column に負荷する際の上清液と Buffer PB の混合比、上清液のカラムへの負荷量および最終的な DNA 溶出量等の違いがあった。SP では上清液と Buffer PB の混合比が 1:1 であるのに対し、SFP では短い DNA フラグメントを最大限回収するために、カラムへの DNA 結合条件として混合比を 1:4 と設定されている。また、Buffer PB への抽出液の混合量は SP で 350 μ L、SFP では 250 μ L であり、カラムへの負荷量に差があった。本研究では、本キットの DNA 抽出条件として、試料採取量は 1 g とし、添付書に記載の SP および SFP の抽出条件に加え、DNA 収量を増加させるために、上清液と Buffer PB との混合比を 1:4 に維持したまま上清液を 350 μ L に増量した SFP の改良プロトコール (mSFP) の 3 種の抽出条件を設定した。併せて、上記 3 種の抽出条件に含水処理操作を加えた計 6 種の条件で DNA 抽出法の比較検討を行った (Table 4.2)。

本検討には「えび」または「かに」含有海苔試料の作製に用いた海苔粉末試料を用いた。事前の検討により、乾燥海苔 1 g あたり約 7 mL の蒸留水を吸水することが確認されていたため、含水処理操作未実施の抽出条件では十分量の上清液を得るために、抽出に用いる Food Lysis Buffer を 10 mL 増量して 20 mL とした。各種プロトコールにより抽出した DNA の収量、精製度の結果を Table 4.2 に示す。含水処理を実施した条件では、抽出液が試料に吸水されることなく、試料が抽出液中で効率的に分散し、遠心分離時においても良好な分離を示した。また、十分量の上清液を得ることが可能であった。収量については含水処理の有無に関わらず SP (SP2)、SFP (SFP2) および mSFP (mSFP2) の順で収量が増加したが、いずれのプロトコールにおいても含水処理操作の実施により DNA 収率の増加がみられた。抽出の操作性が良く、収量の増加がみられたことから含水処理の有効性が確認された。

次に、抽出 DNA 中の PCR 阻害物質の影響を直接評価するために、PCR 試薬として AmpliTaq および Ampdirect の両試薬を用いて、pyrbcL プライマー対による海苔定性 PCR を実施した。その結果、両試薬ともに 6 条件すべてにおいて増幅が確認された (Fig.4.3)。Ampdirect 試薬の使用により、AmpliTaq 試薬と比べ、より明瞭な増幅バンドが確認された。

Table 4.2. Conditions of DNA extraction and spectrophotometric analysis of extracted DNAs

Protocol	Condition ^{a)}				Extracted DNA	
	Food Lysis Buffer (mL)	Supernatant (μL)	Buffer PB (μL)	Elution (μL)	DNA (μg)	A260/280
SP	10	350	350	150	1.38	1.89
SFP	10	250	1000	100	2.06	2.01
mSFP	10	350	1400	100	3.13	1.98
SP2	20	350	350	150	0.47	3.00
SFP2	20	250	1000	100	0.95	1.76
mSFP2	20	350	1400	100	1.92	1.98

a) DNA extractions were carried out by DMF method.

SP, SFP and mSFP were treated for water absorption of samples with DNase free water, whereas SP2, SFP2 and mSFP2 were not.

SP (SP2) and SFP (SFP2) indicate standard protocol and small fragment protocol in DNeasy *mericon* Food Handbook, respectively.

mSFP (mSFP2) varied in volume of supernatant as compare to SFP (SFP2).

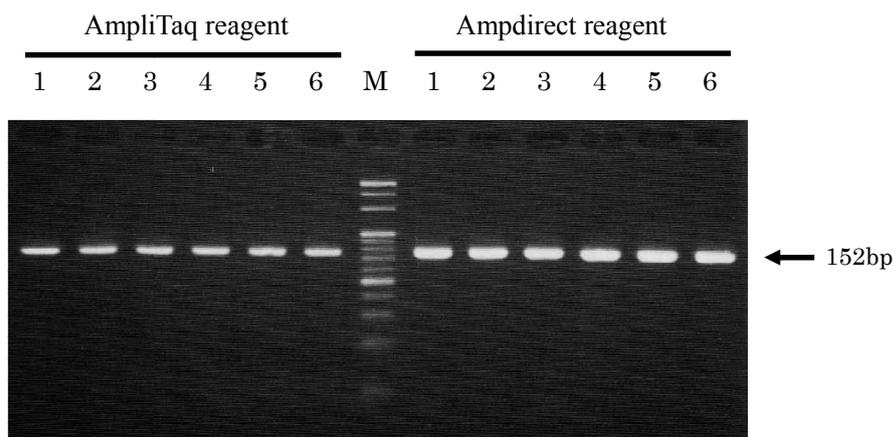


Fig.4.3. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNAs extracted from sheet of dried nori product

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, SP; 2, SFP; 3, mSFP; 4, SP2; 5, SFP2; 6, mSFP2

6つの抽出条件すべてにおいて良好な DNA が抽出されたが、DNA の収量、精製度および抽出時の操作性の点において、mSFP が最も良好な結果を示した (Table 4.2)。以上の結果を基に、DNA のさらなる収量増加を考慮し、上清液を 450 μ L に、Buffer PB を 1800 μ L に増量した方法を DMF-mSFP 法とした。

3. 「えび」または「かに」含有海苔試料による検討

3. 1 DNA の抽出

「えび」または「かに」含有海苔試料について、DPM 法、GT 法、DMF-mSFP 法および CTAB 法により各濃度 2 試行で DNA を抽出した。DNA の収量および精製度の結果をそれぞれ Table 4.3 および Table 4.4 に示した。「えび」含有海苔試料では DPM 法、GT 法、DMF-mSFP 法および CTAB 法の順で DNA 収量は 2.2~4.8 μ g, 19.5~24.5 μ g, 5.7~8.8 μ g および 1.5~2.9 μ g であり、GT 法が最も高い DNA 収量を示した。蛋白質混入の指標である吸光度比 (260/280 nm) は全抽出法で概ね良好な結果を示した。多糖類などの混入指標である吸光度比 (260/230 nm) において、DMF-mSFP 法のみが 2 以上の吸光度比を示し、2 試行間でのばらつきも小さい傾向を示した。また、「かに」含有海苔試料においても収量、精製度ともに「えび」含有海苔試料と同様の傾向を示した。以上の結果から、DMF-mSFP 法はその他の抽出法に比べ、効果的に多糖類等の除去が可能であり、DNA 抽出の再現性が高いことが示唆された。GT 法は収量が高いものの海苔の粘張性により、既報^{73,74)}で報告されているように DNA 抽出カラムへの DNA の吸着・洗浄および DNA の溶出を自然流下で実施することから、著しく時間を要した。また、CTAB 法は操作工程が多いことから同様に時間を要した。DPM 法および DMF-mSFP 法はスピнкаラムを用いる方法であるため、卓上遠心機等を用いることで多数検体を簡便、迅速に抽出することが可能であったが、DPM 法では精製度の点で十分な結果が得られなかった。通知に示された CTAB 法に比べ、DMF-mSFP 法は平均で約 4 倍の DNA 収量を示した。DMF-mSFP 法は多数検体処理が可能であり、簡便迅速に収量、精製度の良い抽出 DNA が得られることが確認された。

以上の結果から、以降の検討においては、DMF-mSFP 法により DNA を抽出することとした。なお、「えび」および「かに」含有海苔試料から抽出した DNA をそれぞれ、「えび」試料 DNA および「かに」試料 DNA とする。

Table 4.3. Spectrophotometric analysis of DNAs extracted from model foods (nori containing shrimp)

Shrimp Conc. ($\mu\text{g/g}$)	DPM method ^{a)}			GT method ^{b)}			DMF method ^{c)}			CTAB method ^{d)}		
	DNA (μg)	Ratio		DNA (μg)	Ratio		DNA (μg)	Ratio		DNA (μg)	Ratio	
		A260/280	A260/230		A260/280	A260/230		A260/280	A260/230		A260/280	A260/230
10,000	4.8	1.85	9.29	19.7	1.89	2.17	5.9	1.93	11.56	1.6	1.67	0.74
	2.3	1.75	-2.00	22.3	1.87	1.92	6.8	1.93	13.27	1.9	1.70	0.89
100	3.9	1.89	-9.79	20.7	1.88	2.03	5.7	1.93	6.57	2.8	1.61	0.55
	3.1	1.86	-18.48	21.7	1.86	1.87	7.3	1.95	8.68	1.7	1.72	0.93
10	2.9	1.90	-6.79	23.4	1.86	1.95	8.8	1.97	5.94	1.9	1.71	0.89
	3.3	1.86	10.50	22.6	1.85	1.82	8.3	1.97	5.98	1.5	1.78	0.98
5	4.1	1.89	37.70	21.3	1.86	1.88	7.3	1.95	8.08	2.9	1.70	0.64
	2.2	1.82	-2.54	19.5	1.86	1.86	7.5	1.96	7.62	1.5	1.69	0.89
1	2.6	1.78	-3.75	21.4	1.87	1.91	6.9	1.89	10.11	1.7	1.72	0.70
	2.9	1.78	18.11	24.5	1.85	1.88	7.0	1.96	15.35	1.8	1.71	1.02

a) Modified method using DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)

b) Modified method using Genomic-tip 20/G (Qiagen)

c) Modified method using DNeasy *mericon* Food kit (Qiagen)

d) The Japanese official method described in reference No.2

Table 4.4. Spectrophotometric analysis of DNAs extracted from model foods (nori containing crab)

Crab Conc. (µg/g)	DPM method ^{a)}			GT method ^{b)}			DMF method ^{c)}			CTAB method ^{d)}		
	DNA (µg)	Ratio		DNA (µg)	Ratio		DNA (µg)	Ratio		DNA (µg)	Ratio	
		A260/280	A260/230		A260/280	A260/230		A260/280	A260/230		A260/280	A260/230
10,000	4.5	1.89	5.49	23.8	1.83	1.67	7.2	1.90	6.12	2.6	1.77	0.77
	3.6	1.79	3.59	23.4	1.83	1.75	6.7	1.88	5.86	1.7	1.66	1.11
100	4.4	1.85	4.26	22.9	1.85	1.86	7.0	1.90	5.85	1.8	1.79	0.66
	3.7	1.76	1.82	23.7	1.84	1.75	8.4	1.95	4.98	2.2	1.71	1.00
10	3.8	1.81	1.90	27.5	1.84	1.78	9.3	1.91	3.95	2.1	1.78	0.82
	3.8	1.87	7.86	27.2	1.83	1.75	8.8	1.95	6.19	2.0	1.74	1.09
5	4.4	1.82	6.52	27.4	1.83	1.76	8.8	1.97	5.50	1.7	1.79	0.76
	4.8	1.81	-49.06	27.2	1.84	1.74	6.9	1.89	5.69	1.4	1.69	1.13
1	3.9	1.93	32.00	20.1	1.86	2.01	6.1	1.94	12.90	1.5	1.74	0.77
	3.8	1.86	10.20	21.0	1.86	2.04	7.3	1.95	7.33	2.0	1.82	1.17

Abbreviations and symbols are as in Table 4.3

3. 2 抽出 DNA 中の PCR 阻害物質の評価

「えび」および「かに」試料 DNA を用いて動物定性 PCR を実施した。AmpliTaq 試薬では、えび試料 DNA において複数の非特異バンドが検出され、かに試料 DNA ではほとんどバンドが検出されなかった。また Ampdirect 試薬では、「えび」および「かに」試料 DNA とともに複数の非特異増幅バンドが検出された (Fig.4.4).

動物 DNA 検出用プライマー対は広く動物 DNA を検出することを目的に設計されているが、動物間で塩基配列の挿入や欠損がみられることがある。そのため、動物定性 PCR 実施時の予想される増幅バンド長は 370~470 bp とされている⁸⁾。PCR 法により海苔のリボゾーム小サブユニット r RNA(SSU rRNA)やそれに続く ITS 領域を増幅させた場合、原因は不明だが複数の増幅バンドが生じることが報告されている⁷⁾。

本研究においても原因は不明であるが、複数の非特異バンドが検出されたことから、動物定性 PCR では抽出 DNA を評価することは困難と判断した。そこで、抽出 DNA の評価のために、PCR 試薬に Ampdirect 試薬を用い、「えび」および「かに」試料 DNA を用いて新規に考案した海苔定性 PCR を実施した。結果を Fig.4.5 に示す。

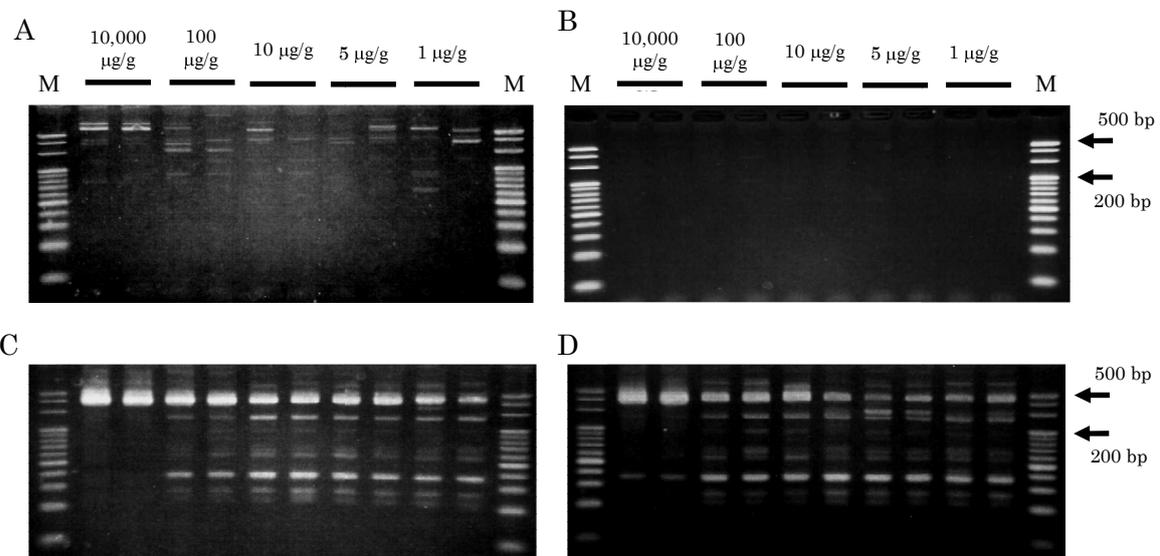


Fig.4.4. Agarose gel electrophoresis of PCR products using AN primer pairs amplified by AmpliTaq reagent (A, B) or Ampdirect reagent (C, D) from DNAs extracted from samples containing 1, 5, 10, 100, or 10,000 μg/g of shrimp (A, C) or crab (B, D) in powder nori products.

Lanes: M, 20 bp ladder size standard

各濃度 2 試行で抽出したすべての「えび」および「かに」試料 DNA で 152 bp の明瞭な増幅バンドが確認された。

以上の結果から、すべての抽出 DNA で PCR 阻害活性の影響のない良好な DNA が抽出されたものと判断した。

3. 3 「えび」および「かに」定性 PCR の検出下限値

「えび」および「かに」試料 DNA を用いて、AmpliTaq 試薬および Ampdirect 試薬における検出下限値を確認した。結果を Fig. 4.6 に示す。えび定性 PCR の検出下限値は、海苔粉末 1 g に対するかに凍結乾燥粉末の重量として、AmpliTaq 試薬では 5 $\mu\text{g/g}$ 、Ampdirect 試薬では 1 $\mu\text{g/g}$ であった。一方、かに定性 PCR の検出下限値は AmpliTaq 試薬では 100 $\mu\text{g/g}$ 、Ampdirect 試薬では 1 $\mu\text{g/g}$ となった。えび定性 PCR では両試薬で検出下限値に大きな違いは見られなかったが、かに定性 PCR では大きな差がみられた。Ampdirect 試薬で良好な結果が得られた原因として、Ampdirect 試薬の添付バッファーに添加されている PCR 阻害物質に対する中和物質の効果^{81,82)}、または PCR 試薬の変更により小麦 DNA の検出が改善した報告⁵⁶⁾もあることから、Ampdirect 添付酵素の高増幅性等が原因として考えられるが、今後の詳細な検討が必要と考えられる。

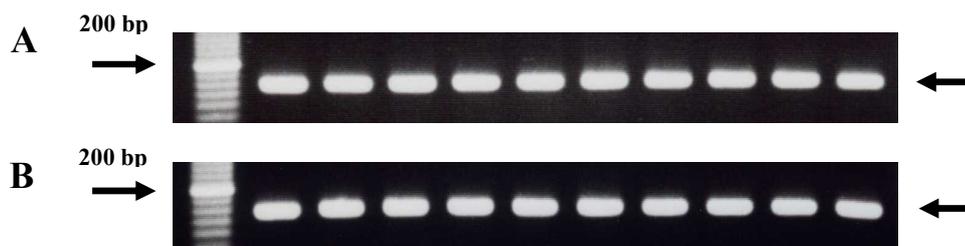


Figure 4.5. Agarose gel electrophoresis of PCR products (*rbcL*) using the PyrbcL01–5′/PyrbcL01–3′ primer pair from samples containing 1, 5, 10, 100, or 10,000 $\mu\text{g/g}$ of shrimp (A) or crab (B) in powder nori products.

Arrows indicate the expected PCR amplification products for the *Pyropia yezoensis* chloroplast *rbcL* (152 bp). Lanes M, 20 bp ladder size standard

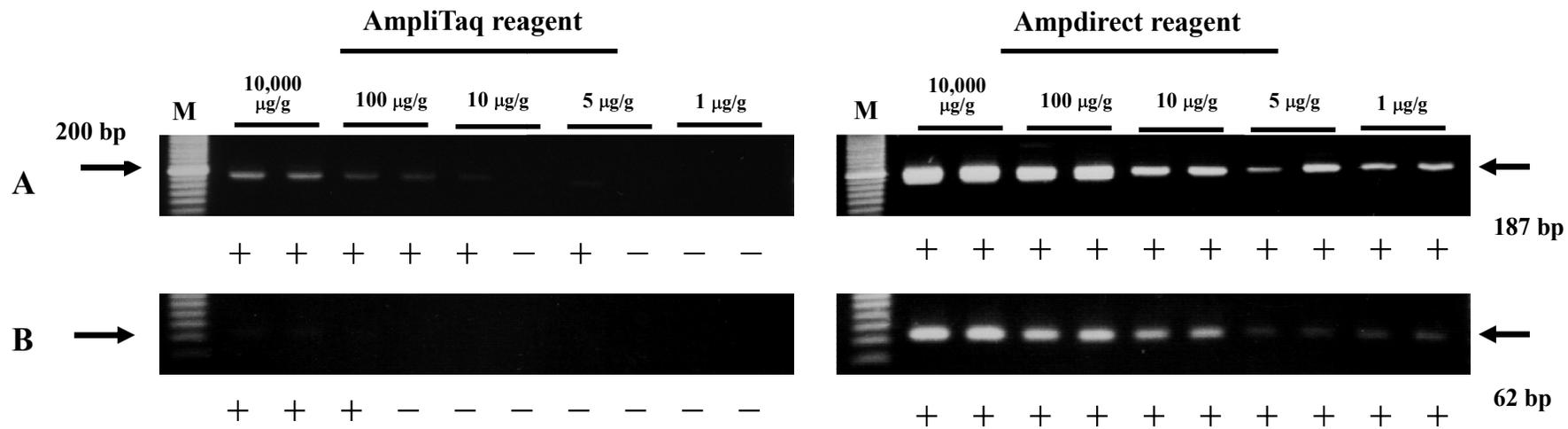


Fig. 4.6. Sensitivity of the specific detection method for shrimp (A) or crab (B) in powder nori products using two different PCR reagents.

Arrows indicate the expected PCR amplification products. AmpliTaq reagent, AmpliTaqGold (Life Technologies). Ampdirect reagent, Ampdirect plus (Shimadzu). Lanes M, 20 bp ladder size standard

以上の結果から、DMF-mSFP 法により DNA を抽出し、PCR 試薬として Ampdirect 試薬を用いることで、「えび」および「かに」DNA を高感度に検出することが可能と考えられた。

4. 市販の乾燥海苔製品による検討

市販の乾燥海苔製品 8 検体について、N キットおよび M キットにより甲殻類タンパク質の含有量を測定した。結果を Table 4.5 に示す。乾燥海苔製品 8 検体の甲殻類タンパク質含有量は、N キットでは 0.3-8.8 $\mu\text{g/g}$ 、M キットでは 1.3-8.0 $\mu\text{g/g}$ の含有量を示し、表示の基準となる 10 $\mu\text{g/g}$ を超える検体は確認されなかった。しかし、本研究に用いた 8 検体すべてにおいて、甲殻類タンパク質が微量検出されたことから、既報⁷⁰⁾の結果と同様に、市販の乾燥海苔中には高頻度に甲殻類タンパク質が混入していることが確認された。

甲殻類タンパク質の含有量に関わらず、すべての検体について確認試験である「えび」および「かに」定性 PCR を実施した。DNA 抽出法は DMF-mSFP 法を用い 1 試行で抽出し、PCR 試薬には Ampdirect 試薬を用いた。本抽出法を用いることにより、すべての乾燥海苔製品から迅速かつ簡便に DNA を抽出することが可能であり、操作性は良好であった。また、

Table 4.5. Detection of crustacean proteins and DNA (crab or shrimp) in powder nori products and spectrophotometric analysis of extracted DNA by DMF-mSFP

Sample No.	ELISA ($\mu\text{g/g}$)		PCR			Extracted DNA		
	N Kit ^{a)}	M Kit ^{b)}	Control ^{c)} (Seaweed)	Shrimp ^{d)}	Crab ^{e)}	DNA (μg)	Ratio	
							A260/280	A260/230
1	0.4	1.3	+	+	+	31	2.19	3.53
2	0.8	2.1	+	+	+	13	2.00	4.89
3	7.6	8.0	+	—	—	95	2.21	2.80
4	0.5	1.4	+	—	—	22	2.03	3.36
5	8.8	6.8	+	+	+	15	2.09	4.51
6	4.2	4.2	+	+	+	60	2.19	2.78
7	5.8	7.4	+	—	—	27	2.20	3.29
8	0.3	1.9	+	—	—	22	2.03	3.21

a) FA test EIA-crustacean (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd, Ibaraki, Japan).

b) Crustacean kit (Maruha Nichiro Holdings, Inc., Ibaraki, Japan).

c) To evaluate the validity of DNA extracted from seaweed products for the PCR.

d) For specific detection of shrimp using the ShH12-05'/ShH13-03' primer pair.

e) For specific detection of crab using the CrH16-05'/CrH11-03' primer pair.

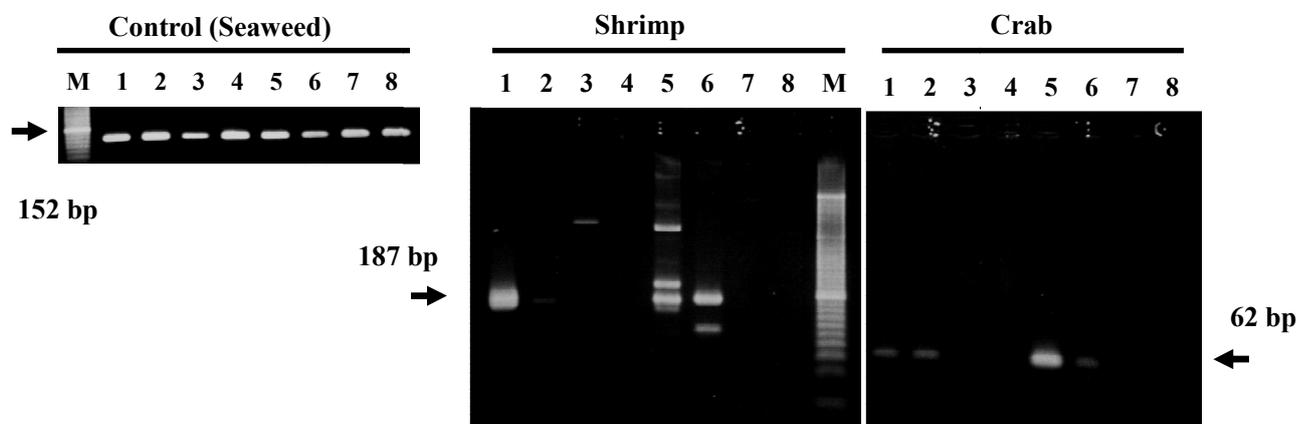


Figure 4.7. Investigation of commercial seaweed products. Control (seaweed) evaluation of the validity of DNA extracted from seaweed products for PCR reactions using the PyrbcL01–5′/PyrbcL01–3′ primer pair. Arrows indicate expected PCR amplification products. The lane numbers correspond to the sample numbers from Table 4.5. Lane M, 20 bp ladder size standard

すべての抽出 DNA において、通知法で示されている条件である DNA の収量および精製度が得られた (Table 4.5). 海苔定性 PCR ではすべての検体で増幅バンドが得られたことから、PCR 阻害活性の影響がない良好な抽出 DNA であることが確認された。

次に、「えび」および「かに」定性 PCR をそれぞれ実施したところ、検体番号 1, 2, 5 および 6 で「えび」と「かに」が共に陽性の結果であった (Fig.4.7). えび定性 PCR では、アキアミが偽陰性となり、かに定性 PCR ではシャコが偽陽性となることが報告されている²³⁾ため、えび定性 PCR において陰性の結果を示した検体番号 3, 4, 7, 8 およびかに定性 PCR で陽性を示した検体番号 1, 2, 5, 6 について、それぞれ既報²³⁾のアキアミプライマーおよびシャコプライマーを用いて PCR を実施したが、いずれも増幅はみられなかった。

以上の結果から、検体番号 3, 4, 7, 8 には表示が必要となるアキアミは含まれておらず、また検体番号 1, 2, 5, 6 には表示が不要なシャコが含まれていないことが確認された。

「えび」と「かに」は近縁種であるため、タンパク質を指標とした ELISA 法による個別分析が不可能なことから、ELISA 法では「えび」と「かに」を区別せずに甲殻類タンパク質の一つであるトロポミオシンの含有量を測定している^{21,22)}。一方、確認試験では「えび」

と「かに」の個別分析が可能となっており、分類学上、根鰓亜目のクルマエビ・サクラエビ上科および抱卵亜目のコエビ・ザリガニ・イセエビ下目をえびとして検出し、短尾下目、異尾下目のタラバガニ科をかにとして検出可能となるように、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 遺伝子から PCR の増幅領域が選択されている²³⁾。

先の検討結果から、えびおよびかに定性 PCR 共に、乾燥海苔粉末 1 g あたり凍結乾燥可食部含有量として 1 $\mu\text{g/g}$ 以上含む「えび」または「かに」含有試料から DNA を検出可能であったが、1 $\mu\text{g/g}$ 以上の甲殻類タンパク質を検出した検体番号 3, 4, 7, 8 で「えび」および「かに」定性 PCR がともに陰性の結果を示した。ヨコエビ類やワレカラ類などの甲殻類は海藻を生息域としており、混獲による海苔製品への混入が報告されている^{83,84)}。これらの甲殻類は「えび」または「かに」定性 PCR の検出対象外となっている。高濃度の甲殻類タンパク質が検出された乾燥海苔製品 (検体番号 3, 7)において、えび、かに定性 PCR とともに不検出であったことから、定性 PCR 法の検査対象外であるワレカラを含むアミ科やオキアミ科およびシャコ科などの甲殻類の混入の可能性が考えられた。甲殻類タンパク質濃度と定性 PCR の結果の乖離については、上記理由などまだ解明されていない問題が多くあることから、今後詳細な検討が必要と考えられ、市販乾燥海苔製品において本法の DNA 抽出法の適用性が概ね確認された。

2. まとめ

CTAB 法を応用したキットである DNeasy *mericon* Food kit を用いて乾燥海苔中の「えび」または「かに」DNA の検出法を検討した。本キットと複数の DNA 抽出キットとの比較検討を行ったところ、操作性および DNA の精製度において DMF-mSFP 法が最も良好な結果を示した。「えび」または「かに」含有海苔試料を作製し、DMF-mSFP 法により抽出した DNA を用いて検討したところ、乾燥海苔粉末 1 g あたり凍結乾燥可食部含有量で「えび」、「かに」とともに検出下限値は 1 $\mu\text{g/g}$ であった。併せて市販の乾燥海苔製品を用いて適用性を確認したところ、いずれの乾燥海苔製品からも良好な DNA を抽出することが可能であった。本法は乾燥海苔製品中の「えび」または「かに」DNA の迅速、簡便な検出法として有用であると考えられた。また、本 DNA 抽出法は様々な加工食品からの DNA 抽出において

も有効と考えられることから、今後詳細な検討を行い、適用可能な食品の範囲を拡大していくことが重要であると考えられた。

第5章 総括

アレルギー物質の表示制度が開始されてから10年以上が経過し、その間、甲殻類である「えび」と「かに」の特定原材料への追加、バナナ、ごま、カシューナッツの特定原材料に準じるものへの追加など、定期的な実態調査を基に表示制度の見直しが行われてきた。流通市場等においてアレルギー物質の表示の徹底が行われているものの、今なお表示違反による食品の回収事例が後を絶たない⁹⁾。さらに、一部の企業では企業努力により任意の原材料情報の提供を行っているものの、レストランなどの外食産業や通信販売では表示の義務がない²⁴⁾ことから、アレルギー患者は摂食時には注意が必要となる。また、平成21年に小麦の不溶性蛋白であるグルテンを酵素や酸、アルカリにより処理した加水分解小麦タンパク質を用いた石鹸の使用により、小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis:WDEIA)を発症した事例⁸⁵⁾や食品、医薬品、化粧品、染料などに使用されているコチニール色素によるアレルギーの発症事例、天然の糖質であるエリスリトールによるアレルギー発症事例⁸⁶⁾など食物アレルギーに関する発症事例は少なくない。さらに、研究の背景のTable 2に示したように、7%程度の学童で即時型アレルギー症状を発症していることから、学校給食においても食物アレルギーの問題は避けて通れない。平成24年12月に発生した調布市立小学校での食物アレルギーによる死亡事故は学校関係者、医療従事者、食品業界、食物アレルギー研究に関与する多くの関係者等に衝撃を与えた⁸⁷⁾。

食物アレルギーは、生命の維持に必要な不可欠な食品の摂取により発症することから、非常に身近な問題であり、症状が激しい場合には死亡事例に至ることもある重大な課題である。食物アレルギーを持つ患者が、安全に食品を選択し、摂取できるようにするためには、第一義的には食品製造者が正確なアレルギー表示を実施することが必要であり、工程管理や最終製品の自主検査等を任意で実施している。また、表示ミスや意図せざる混入があることから、都道府県の保健所の監視や立ち入り調査、衛生研究所の試験検査による恒常的なモニタリング検査も重要となる。また、食物アレルギー発症による健康危害発生事例などにおいては、信頼性のある、簡便・迅速な検査法を用いることが商品の自主回収を指導する上で必要不可欠となる。

そのため、第2章では、食品中の特定原材料を簡便・迅速に検出するために Multiplex PCR 法の開発を行った。植物および特定原材料（小麦、そば、落花生）を同時検出する M-PCR 法を確立するために、植物 DNA 検出用プライマー対 Plant01-5'/Plant01-3'（増幅バンド長；161bp）を作製した。この植物検出用プライマー対および公定法の特定原材料検出プライマー対を用い、特定原材料由来の DNA を鋳型とし、同一チューブ内で Multiplex PCR を行ったところ、植物および特定原材料に特異的な4つの増幅バンドが検出され、それらは互いに区別可能であった。また、加工食品への適用性を検討した結果、表示されている特定原材料が良好に検出された。本法を用いることにより、食物アレルギーに関する健康危害発生事例において簡便、迅速かつ安価に植物および特定原材料（小麦、そば、落花生）の DNA の検出が可能となり、またモニタリング検査においても利用することが可能となった。

第3章では、加圧加熱加工食品などは抽出 DNA の収量が少なく、また抽出された DNA も加工により断片化し、検出が困難な事例が報告されていることから、食品中の特定原材料（小麦）由来 DNA を高感度に検出するために、ネステッド PCR 用プライマー対を設計し、ネステッド PCR 法を開発した。通知法に示されている PCR 試薬を変更して1回目の PCR を実施し、その増幅反応液を用いて2回目の PCR を実施したところ、通知法に比べ、ネステッド PCR 法の検出感度が高いことが確認された。本研究により確立したネステッド PCR 法は、高度に低分子化した加圧加熱食品の DNA が検出可能となったことから、レトルト食品、ハイレトルト食品を含む加工食品において有効な検査法と考えられる。加工食品における小麦 DNA の検出限界バンド長を検討したところ、加圧加熱加工食品に適用するためにはプライマー対はおおよそ 100 bp 以下で設定することが必要と考えられた。また、スクリーニング検査で陽性、確認試験で陰性となる事例が報告されたことから、小麦のスクリーニング検査陽性モデル加工食品を11種類作製し、スクリーニング検査と確認検査の比較検討を行った。両検査が一致しない場合には表示の妥当性検証は著しく困難となることからモデル加工食品を用いて、通知法 PCR およびネステッド PCR 法による検出状況を調べたところ、モデル加工食品11種中、通知法 PCR では8種類が、ネステッド PCR 法では10種類のモデル加工食品が検出可能であった。定性 PCR では3種類、ネステッド PCR 法では1種類のモデル加工食品で検出不可能であったが、鋳型 DNA を増量することにより両 PCR 法ですべての

モデル加工食品の検出が可能となった。しかし、過剰増量による PCR 阻害により増幅が不可能となることが、かまぼこおよびゼリーで確認された。以上の結果から、加工食品を対象とした PCR 検査法を実施する際には、PCR に用いる鋳型 DNA 量を適切に増量することが有効な手段の一つになると考えられた。併せて、抽出 DNA 中に存在する PCR 阻害物質の低減を図ることも重要と考えられた。

第 4 章では、海苔製品中には高頻度で「えび」または「かに」由来のタンパク質が検出されることから、海苔製品中の「えび」または「かに」DNA の抽出方法および凍結乾燥したえびとかにの可食部を 1~10,000 $\mu\text{g/g}$ 含む乾燥海苔粉末をモデル食品として用い、それぞれの検出感度を検討した。ELISA 法は甲殻類タンパク質としてトロポミオシンを検出することから、「えび」と「かに」を区別できない。そのため、甲殻類タンパク質が「えび」または「かに」由来かどうかを確認するために、PCR 法により判別することが必要となる。CTAB 法を応用したキットである DNeasy *mericon* Food kit と複数の DNA 抽出キットとの比較検討を行ったところ、操作性および DNA の精製度において DNeasy *mericon* Food kit を改良した DMF-mSFP 法が最も良好な結果を示した。モデル食品を用いて、DMF-mSFP 法により抽出した DNA により検出感度の検討を行ったところ、Ampdirect 試薬の使用により、可食部の含有量で「えび」、「かに」ともに検出下限値は 1 $\mu\text{g/g}$ であった。併せて市販の乾燥海苔製品を用いて適用性を確認したところ、PCR 法については改善しなければならない課題があるが、DNA 抽出については良好な結果を示した。以上の結果から、本法は乾燥海苔製品中の「えび」または「かに」DNA の迅速、簡便な検出法として有用であると考えられた。

検査の対象となる加工食品は、加工工程において加圧加熱処理、pH の変化、乾燥など様々な加工処理を経て製品化されることから、検査の標的となる DNA は激しい分解を受けている可能性が高い。また、原材料の種類、製品の水分、タンパク質、脂質などの含量も異なり、検出の対象となる DNA の抽出において柔軟に対応することが必要となる。そこで、多くの種類の食品に適用可能な DNA 抽出法の確立、または食品の特徴を把握し、適切な DNA 抽出方法を選択することが、特定原材料由来 DNA の検出のための定性 PCR 法の確立には最重要と考えられる。

千葉県が所管する菓子工場が製造したコーンフレークの特定原材料（小麦）検査で、スクリーニング検査で陽性、確認検査で陰性の結果であったため、他県から製造記録の確認要請があった事例があり、本研究成果を効果的に活用することが可能であった。本事例では、保健所担当職員の立ち入り調査結果、当該食品の製造工程には小麦の使用は認められず、また製造ラインはコーンフレーク専用であったことから、製造ラインでのコンタミネーションが原因とは考えられなかった。また、原料規格表を確認したところ、原材料のモルトエキスの規格表に小麦のコンタミネーションの記載があったが、製造者は、コンタミネーションの可能性を排除できないと判断し、コーンフレーク専用の製造ラインを使用しているにもかかわらず、「小麦を含む製品と共通の設備で製造しています」という注意喚起表記を行っていたことが判明した。スクリーニング法と定性 PCR 法の結果の相違の原因を究明するために、コーンフレーク製品の原材料 12 種類、各種製造工程の中間製品 6 種類、最終製品の計 19 検体をサンプリングし、検査を行った。スクリーニング検査ではモルトエキス以外の原材料はすべて陰性であり、中間製品 6 種類、最終製品は陽性であった。しかし、通知法の確認検査ではすべて陰性もしくは検査不能であった。通知法の小麦定性 PCR の感度不足の可能性を考慮し、第 3 章で述べた小麦 DNA の高感度検出法であるネステッド PCR を実施したところ、原材料のモルトエキス、中間製品、最終製品で陽性の結果が得られ、小麦の混入が推定された。この結果を受け、製造者は原材料欄に小麦の表示を行い、適正な表示へと変更を行った⁸⁸⁾。

保健所は県内の食品製造者に対し、定期的な監視指導、違反疑い等の場合に食品衛生法に基づき食品添加物の規格基準や使用基準、食物アレルギーの表示などについて規制の立場で立ち入り調査を行っており、上記コーンフレーク事例のように、不適切な表示を行っている製造者には改善の指導を行う。しかし、食品製造を行っている中小企業等においては、十分に食物アレルギー表示制度を理解していないこともあり、保健所の監視指導では、表示違反などが起きる前に積極的に表示に関する推進指導を行っていくことも重要である。千葉県は、日本で唯一の落花生育種指定試験地であり、また日本の落花生の栽培面積の 75 % (2011 年) を占める⁸⁹⁾ことから、特定原材料である落花生を使用した菓子の販売も多い。また、2012 年の魚介藻類生産量の全国順位では、イセエビは 2 位、特定原材料に準じるサバ類は 5 位で

あり水産物の漁獲量も多く、海苔の養殖も 8 位と盛んである⁹⁰⁾。千葉県の中企業は県内企業の約 99.8 %を占めており、仕入れ・販売などの企業活動を行っていることが多く、地域経済を支える屋台骨となっている⁹¹⁾。そのため、特定原材料検査を担っている健康福祉部局のみならず、千葉県水稻奨励品種の識別法の検討⁹²⁾などの同様な手法を用いた研究を実施している農林水産部局などと連携協力を深め、本研究成果の活用およびさらなる研究の進展を図り、地域経済の発展、振興につなげていくことが必要である。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「食品中のアレルギー物質の検査法開発に関する研究」および「科学的知見に基づく食品表示に関する研究」の一環として行われたものである。本研究の遂行に当たり、種々のご指導、ご助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所の穂山浩食品添加物部長、手島玲子食品部長、安達玲子代謝生化学部第三室長、研究班の協力研究者および支援研究者の諸氏に深謝いたします。また、論文作成に当たってご丁寧なご指導ならびにご校閲を賜りました、三重大学大学院地域イノベーション学研究科矢野竹男教授に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 海老澤元宏, 池松かおり, 小松真紀, 田知本寛, 食物アレルギーの増加について, 日本小児科学会雑誌, 106, 1609-161 (2002).
- 2) 渡辺一彦, 鈴木和仁, 飯倉洋治, 小児ソバアレルギー35例の臨床的検討, アレルギー, 42, 458 (1993).
- 3) 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および乳および乳製品の成分規格などに関する省令の一部を改正する省令の施行について”平成13年3月15日, 食発第79号(2001).
- 4) 伊藤節子, 食物アレルギーの治療, 食物アレルギー研究会会誌, 12, 71-74 (2012).
- 5) 井上祐三郎, 経口免疫療法の現状, 食物アレルギー研究会会誌, 14, 100-102 (2014).
- 6) 金子哲夫, 低アレルゲンミルクについて, 日本食生活学会誌, 6, 16-22 (1995).
- 7) 小川正, 篠原和毅, 新本洋士, 抗アレルギー食品開発ハンドブック, サイエンスフォーラム, ISBN978-4-916164-76-6 (2007).
- 8) 消費者庁次長通知“「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, 消食表第36号 (2014).
- 9) 消費者庁, アレルギー表示に関する情報, アレルギー表示違反事例 (<http://www.caa.go.jp/foods/index8.html>).
- 10) 橋本博之, 眞壁祐樹, 長谷川康行, 佐二木順子, 永田知子, 宮本文夫, 食物アレルギーを誘発する特定原材料(小麦)の検査法に関する検討, 千葉県衛生研究所所報, 54, 53-57 (2005).
- 11) 内野昌孝, 食品原材料検出のためのPCRプライマー開発に関する基礎的研究, 日本食品保蔵学会誌, 36, 89-94 (2010).
- 12) 馬場実, 食品に起因するアレルギー-3. 食物アレルギーとその臨床, 26, 41-44 (1988).
- 13) 河野陽一, 最新医学別冊新しい診断と治療のABC26 食物アレルギー免疫 4, 最新医学社, ISSN0370-8241 (2005).
- 14) 佐々木義楼, 日本人(成人)の乳糖不耐症, 日本消化器学会雑誌, 68, 37-49 (1971).

- 15) 海老澤元宏, 有田昌彦, 伊藤節子, 宇理須厚雄, 小倉英郎, 河野陽一, 近藤直実, 柴田瑠美子, 古庄卷史, 眞弓光文, 向山徳子: 食物アレルギー委員会報告 第2報 食物アレルギーの定義と分類について, 日本小児アレルギー学会誌, 17, 558-559 (2003).
- 16) 中村晋, 飯倉洋治, 最新食物アレルギー, 永井書店, ISBN-8159-1651-9 (2004).
- 17) 厚生労働科学研究班による食物アレルギーの診療の手引き 2011, 厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 食物アレルギーの発症要因の解明および耐性化に関する研究, 研究代表者海老澤元宏 (2011).
- 18) 今井孝成, 即時型食物アレルギー疫学調査, 日本小児アレルギー学会誌, 18, 53-58 (2004).
- 19) 丸井英二, アレルギー食品表示研究の1年間, 食品衛生研究, 52, 7-13 (2002).
- 20) 穂山浩, 豊田正武, 食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要, 食品衛生研究, 52, 65-73 (2002).
- 21) Seiki, K., Oda, H., Yoshioka, H., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., Ohno, Y., A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods., J. Agric. Food Chem., 55, 9345-9350 (2007).
- 22) 柴原裕亮, 岡道弘, 富永桂, 猪井俊敬, 梅田衛, 畝尾規子, 阿部晃久, 大橋英治, 潮秀樹, 塩見一雄, サンドイッチ ELISA 法による食品中の甲殻類アレルギーの検出, 日本食品化学工学会誌, 54, 280-286 (2007).
- 23) Taguchi, H., Watanabe, S., Temmei, Y., Hirao, T., Akiyama, H., Sakai, S., Adachi, R., Sakata, K., Uris, A., Teshima, R.: Differential detection of shrimp and crab for food labeling using polymerase chain reaction, J. Agric. Food Chem. 59, 3510-3519 (2011).
- 24) 消費者庁次長通知“アレルギー物質を含む食品に関する表示について”平成 25 年 9 月 20 日, 消食表第 257 号 (2013).
- 25) 消費者庁食品表示課, アレルギー表示の見直しについて, 平成 25 年 5 月 30 日, (http://www.cao.go.jp/consumer/history/02/kabusoshiki/syokuhinhyouji/doc/130530_gaiyou.pdf).
- 26) 総務省, 日本標準商品分類, (http://www.soumu.go.jp/toukei_toukatsu/index/seido/syohuin/2index.htm)
- 27) 消費者庁, 加工食品製造・販売業のみなさまへ アレルギー物質を含む加工食品の表示

- ハンドブック，平成 22 年 3 月改訂 (<http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin19.pdf>).
- 28) 農林水産省大臣官房食糧安全保障課，平成 25 年度可能食品の生産量等調査・分析業務食品産業動態調査，(http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_doutai/pdf/2500.pdf).
- 29) 穂山浩，豊田正武，食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要，食品衛生研究，52，65-73 (2002).
- 30) 丸井英二，食品表示研究班アレルギー表示検討会中間報告（概要）食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究，食品衛生研究，51，90-95 (2001).
- 31) 梅津麻実，米澤夏岐，鈴木達也，渡辺卓穂，特定原材料の外部精度管理用調査試料の作製検討～落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす原材料についての検討～，第 108 回食品衛生学雑誌講演要旨集，166 (2014).
- 32) 村上太郎，工藤鮎子，紀雅美，昌山敦，山野哲夫，ELISA 法による小麦タンパク質の検出における測定阻害因子の解析，第 108 回食品衛生学雑誌講演要旨集，56 (2014).
- 33) Ogasawara, T., Arakawa, F., Watanabe T., Akiyama, H., Hino, A., Maitani, T., Goda, Y. Genomic DNA Fragmentation of genetically modified corn during food processing. Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.), 11, 137-144 (2004).
- 34) 小笠原健，荒川史博，渡邊敬浩，穂山浩，日野明寛，米谷民雄，合田幸広，小関良宏，遺伝子組換えトウモロコシの食品加工過程における核 DNA の断片化，日本食品化学学会誌，11, 137-144 (2004).
- 35) 高橋邦彦，石井里枝，松本隆二，堀江正一，加工モデル実験によるコメ内在性 DNA が検出されなかったビーフンに関する一考察，食品化学学会誌，51，37-42 (2010).
- 36) Nakamura K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama H. Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. Jpn. J. Food Chem. Safety, 20, 161-169 (2013).
- 37) 松岡猛，川島よしみ，穂山浩，三浦裕仁，合田幸広，瀬畑環，一色賢司，豊田正武，日野明寛，ダイズおよびダイズ加工品からの組換え遺伝子の検知法（第 1 報）食品衛生学雑誌，40，149-157 (1999).

- 38) Westphal, Carmen D., Pereira, Marion R., Raybourne, Richard B., Williams, Kristina M. Evaluation of extraction buffers using the current approach of detecting multiple allergenic and nonallergenic proteins in food. *J. AOAC Int.*, 87, 1458-1465 (2008).
- 39) Roland E. Poms, Claudia Capelletti, Elke Anklam Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Mol.Nutr. Food Res.*,48.459-464 (2004).
- 40) Fste, Christiane K, Lvberg, Kjersti E, Lindvik, Helene Egaas, Eliann Extractability, Stability, and Allergenicity of Egg White Proteins in Differently Heat-Processed Foods *J. AOAC Int.*, 90, 427-436 (2007).
- 41) 下井俊子, 田口信夫, 観公子, 大石充男, 食品中の特定原材料 (卵, 乳, 小麦, そば, 落花生, 甲殻類) の検査結果—平成 23~24 年度—, 東京都健康安全センター年報, 64, 95-99 (2013).
- 42) 一色博, 林克弘, 原有紀, 佐々木恵, 志村恭子, 食品収去検査におけるアレルギー物質の検出状況 (2004 年度~2011 年度), 三重保健環境研究所年報, 57, 31-34 (2012).
- 43) 穂山浩, アレルギー物質を含む食品の検査方法について, 食品衛生学雑誌, 44, J168-177 (2003).
- 44) Watanabe, T., Akiyama, H., Maleki, S., Yamakawa, H., Iijima, K., Yamazaki, F., Matsumoto, T., Futo, S., Arakawa, F., Watai, M., Maitani, T., A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 215-233(2006).
- 45) Palmer, J., Jansen, R., Michaels, H., Chase, M.Manhart, J., Chloroplast DNA variation and plant phylogeny.*Ann. Missouri Bot. Garden.*, 75, 1180–1206(1988).
- 46) Clegg, M.T., G.H.Learn, E.H., Golenberg.”Molecular evolution of chloroplast DNA. Chapter7 In *Evolution at the Molecular Level* (eds R. K. Selander, A. G.Clark, T. S. Whittam)”Sunderland, Sinauer Associates, 135–149 (1999).
- 47) Ogiwara, Y., Terachi, T., Sasakuma, T., Structural analysis of length mutations in a hot-spot region of wheat chloroplasts DNAs. *Curr. Genet.* , 22, 251–258 (1992).
- 48) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. Universal primer for amplification of three

- non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109 (1991).
- 49) Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K., Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to $\phi\chi 174$ DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.*, 6, 3543-3557 (1979).
- 50) Meinkoth, J., Wahl, G., Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem*, 138, 267-284 (1984).
- 51) Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E., Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6409-6412 (1990).
- 52) Breslauer, K.J., Frank, R., Blocker, H., Marky, L.A., Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83, 3746-3750 (1986).
- 53) CW Dieffenbach, T M Lowe, G S Dveksler, General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl.*, S30-37 (1993).
- 54) 曾根美千代, 手代木年彦, 柳田則明, アレルギー物質 (小麦) を含む食品の検知法について, 宮城県保健環境センター年報, 24, 67-71 (2006).
- 55) 肥前昌一郎, 林原亜紀, 福崎睦美, 食品中の特定原材料小麦実態調査および PCR 法における小麦の検出限界, 32, 81-84 (2006).
- 56) 萩野賀世, 松本ひろ子, 牛山博文, 加工食品中の特定原材料検査 (小麦) における PCR 法の検討, 東京都健康安全研究センター年報, 59, 149-153 (2008).
- 57) 新家薫子, 清水隆二, 芹川俊彦, 安田和弘, 竹田正美, 大西道代, 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).
- 58) Brod, F. C. A., Ferrari, C. dos S., Valente, L. L., Arisi, A. C. M. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 748-751 (2007).
- 59) Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., Sakai, S., Toyoda, M., Urisu, A. Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2561-2564 (2007).
- 60) 齋藤恵理子, アレルギー物質を含む食品の検査方法, THE CHEMICAL TIMES, 214, 12-16

- (2009).
- 61) 肥塚加奈江, 田邊英子, 山本淳, 山辺真一, 今中雅章, 原田卓郎, 岡山県のアレルギー物質を含む食品調査について (I), 岡山県環境保健センター年報, 30, 135-140 (2006).
 - 62) Anderson, O. D., Greene, F. C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 689-700 (1989).
 - 63) D'ovidio, R., Anderson, O. D. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. *Theor. Appl. Genet.*, 88, 759-763 (1994).
 - 64) 藤田由美子, 村上恭子, 原口浩幸, 市販キットを用いたコムギ加工食品からの DNA 抽出法の検討, 日本食品科学工学会誌, 59, 414-421 (2012).
 - 65) Nakamura K., Minamitake Y., Nakamura K., Kobayashi T., Noguchi A., Takabatake R., Kitta K., Hashimoto H., Kawakami H., Kondo K., Teshima R., Akiyama H., Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 20, 161-169 (2013).
 - 66) 橋本博之, 眞壁祐樹, 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 (2008).
 - 67) 眞壁祐樹, 橋本博之, 永田知子, 平成 17 年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第 18 回理化学研究部会総会・研究会資料, 24-27 (2006).
 - 68) 橋本博之, 眞壁祐樹, 長谷川康行, 佐二木順子, 宮本文夫, Multiplex PCR 法を用いた食品中の特定原材料の検出, 食品衛生学雑誌, 48, 132-138 (2007).
 - 69) 中原 弘明, 藤井 宏治, 水野 なつ子, 吉田 日南子, 笠井 賢太郎, 法生物学的試料由来の DNA に対する定量法の検証, 日本法科学技術学会誌, 12, 13-26 (2007).
 - 70) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡道弘, 阿部晃久, 清木興介, 織田浩司, 吉岡久史, 塩見一雄, 宇理須厚雄, 穂山浩, 手島玲子, 食品原材料中に含まれる [えび], [かに] 等の甲殻類タンパク質の実態調査, 日本食品化学学会誌, 15, 12-17 (2008).
 - 71) 中村厚, 酒井信夫, 川浦知子, 小林政人, 安達玲子, 穂山浩, 手島玲子, すり身および

- その加工食品中に自然混入する甲殻類の実態調査, 日本食品化学学会誌, 17, 213-220 (2010).
- 72) 三浦泉, 仙代真知子, 片山弘子, 藤原美智子, 立野幸治, 山口県における食品中の特定原材料「えび」、「かに」の実態調査, 53, 52-59 (2010).
- 73) 田口大夢, 永富靖章, 菊池亮, 平尾宜司, 特定原材料えび・かにの PCR 確認検査法の適用性, 食品衛生学雑誌, 55, 1-12 (2014).
- 74) 渡邊裕子, 濟田清隆, 赤星千絵, 大澤伸彦, 橋口成喜, 宮澤眞紀, 魚介類加工食品に含まれるアレルギー物質 (えび・かに) の検出, 食品衛生学雑誌, 55, 41-54 (2014).
- 75) Ishizaki, S., Sakai, Y., Yano, T., Nakano, S., Yamada, T., Nagashima, Y., Shiomi, K., Nakao, Y., Akiyama, H. Specific detection by the polymerase chain reaction of potentially allergenic salmonid fish residues in processed foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 980-985 (2012).
- 76) Kusama T., Nomura, T., Kadowaki, K. Development of Primers for Detection of Meat and Bone Meal in Ruminant Feed and Identification of the Animal of origin. *Journal of Food Protection*, 67, 1289-1292 (2004).
- 77) 能登谷正浩, 海苔の生物学, 成山堂書店 ISBN4-425-82891-7 (2000).
- 78) 香川 芳子, 五訂増補食品成分表 2010, 女子栄養大学出版部 ISBN978-4-7895-1010-3(2009)
- 79) 峰松和彦, 中村公亮, 穂山浩, 張替直輝, 中島治, 橘田和美, 手島玲子, 飯塚太由, コシニャク製粉含有コメ粉からのコメ DNA 抽出精製法の検討, 食品衛生学雑誌, 51, 247-252 (2010).
- 80) 濱洋一郎, 常田尚正, 杉本良子, 中川浩毅, 乾海苔に含まれる多糖含量とポルフィランの性質, 日本水産学会誌, 77, 881-886 (2011).
- 81) Nishimura, N., Nakayama, T., Tonoike, H., Kojima, K., Kato, S. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Ann. Clin. Biochem.*, 37, 674-680 (2000).
- 82) Nishimura, N., Nakayama, T., Tonoike, H., Kojima, K., Shirasaki, Y., Kondoh, K., Yamada, T. Various applications of direct PCR using blood samples. *Clin. Lab.*, 48, 377-384 (2002).
- 83) 塩見一雄, 「えび」、「かに」のアレルギー表示の義務化, 日本水産学会誌, 75, 495-499

- (2009).
- 84) Motoyama, K., Hamada, Y., Nagashima, Y., Shiomi, K. Allergenicity and allergens of amphipods found in nori (dried laver). *Food. Additives and Contaminants*, 24, 917-922 (2007).
- 85) 福富友馬, 「(旧) 茶のしずく石けん」による小麦アレルギーの総括, *食物アレルギー研究会会誌*, 13, 19-25 (2013).
- 86) 穂山浩, 海老澤元宏, 低分子化合物の食物アレルギー, *日本小児アレルギー学会誌*, 28, 25-30 (2014).
- 87) 調布市立学校児童死亡事故検証委員会, 調布市立学校児童死亡事故検証結果報告書, 平成25年3月, (<http://www.city.chofu.tokyo.jp/www/contents/1363069358235/files/kensyou.pdf>).
- 88) 長谷川弘祥, 竹内博文, 大井優味子, 笹山実, 橋本博之, 眞壁祐樹, 中西希代子, 宮本文夫, 長谷川康行, アレルギー物質(小麦)を含む食品に対する不正確な注意喚起表示への指導, *食品衛生研究*, 61, 29-31 (2011).
- 89) 桑田主税, 黒田幸浩, 清島浩之, 長谷川誠, 鈴木茂, 落花生育種における簡易ショ糖分析の確立と高ショ糖含有系統の選別, *千葉県農林総研研究センター研究報告*, 5, 125-129 (2013).
- 90) 千葉県, 千葉県農林水産業の動向 平成26年度版, (<http://www.pref.chiba.lg.jp/nousui/toukeidata/nourin/documents/zenbun.pdf>).
- 91) 千葉県, 第3次ちば中小企業元気戦略, 平成26年11月3日発表 (<http://www.pref.chiba.lg.jp/keisei/genkist/houdou.html>).
- 92) 小原麻里, 鎌形民子, 大越一雄, 千葉県水稻推奨品種のDNAによる識別方法, *千葉県農林総研研究センター研究報告*, 6, 117-124 (2007).