

Application Note

島津アプリケーションノート No.4 (ライフサイエンス)



Lifescience

食品中のアレルゲン物質検査 — MultiNAの活用 —

曽我部 有司¹
Y.SOGABE

1. アレルギーとは

我々の体には免疫機能があり、自分にとって異物（敵）となる物質（抗原）が体内に入ってくるとその抗原に対する抗体を作り体を防衛する働きがあります。これを「抗原抗体反応」あるいは「免疫反応」などといいます。そして、もう一度同じ抗原が体内に入ってくると、記憶されていた抗体が作用し、抗原と結びついて無害化します。

ところが、この免疫機能に狂いが生じて余分な抗体が体内に作られるようになったり、有害な抗体が作られてしまうことがあります。この狂いが原因でアレルギー疾患が起こります。

代表的な疾患としては アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎（花粉症など）、アレルギー性結膜炎、アレルギー性胃腸炎、気管支喘息、小児喘息、食物アレルギー、薬物アレルギー、蕁麻疹などがあります。

免疫は本来、体にとって害になる物から体を防御するものなのですが、体質によっては食品や花粉、ホコリなどの通常なら害のない物質にも防衛機能が働いてしまうことがあります。このような症状をおこす体質の人を「アレルギー体質」と呼んでいます。

アレルギー体質の人では、特定の物質が体に入り込むといつも抗体が異常に働いて特有の症状となって体に反応をおこさせます。

2.食物アレルギーとは

ある特定の食物を食べることで引き起こされる過敏な免疫反応を食物アレルギーといいます。蕁麻疹・湿疹などの皮膚症状、下痢・嘔吐・腹痛などの消化器症状、咳・呼吸困難の呼吸器症状などの様々な症状が起こります。ひどいときには全身性症状（アナフィラキシーショックなど）を起こす場合もあります。

食物アレルギーは、人によって原因となる”物質”やその症状を引き起こす”量”が異なります。また、体調によってもその反応は異なります。特に子供にとって、食物アレルギーで原因となりやすい食品は卵、乳、大豆で、これらは「三大アレルゲン」と呼ばれています。この中でも鶏卵は、最も食物アレルギーの原因となりやすい食品です。そのほか魚類（多くは青身の魚）や肉類（多くは豚肉）、貝類、エビ、カニ、大豆、穀類、そばなどがあります。

食物アレルギーの原因は、主に食品中の原料由来のタンパク質です。三大アレルゲンである卵、乳、小麦はいずれもタンパク質を多く含む食品です。本来食品中のタンパク質は胃や腸で分解され、アミノ酸あるいはペプチド（アミノ酸が数個連なったもの）になって吸収されます。これらの小さな分子では通常アレルギーの原因物質にはなりません。

しかし、乳幼児期には消化管とその機能が未熟なために消化が不十分な分子のままの蛋白質（オリゴペプチド）が吸収されることが多くなり、それが原因で食物アレルギーになることが多いと言われています。特に体調不良の時は消化機能が低下しているため、通常よりも多い未消化の物を消化管に通すことになります。その結果、未消化の物が吸収される頻度が増加しアレルギーが発生する率が高くなります。

アレルギーの発症数は平成17年厚生労働科学研究報告書（図1）によると、下記のようになっています。

- 1位：鶏卵（全体の約38%）
- 2位：乳製品（全体の約16%）
- 3位：小麦（全体の約8%）
- 4位：果物類（全体の約6%）
- 5位：そば（全体の約5%）
- 6位：えび（全体の約4%）
- 7位：落花生（全体の約3%）

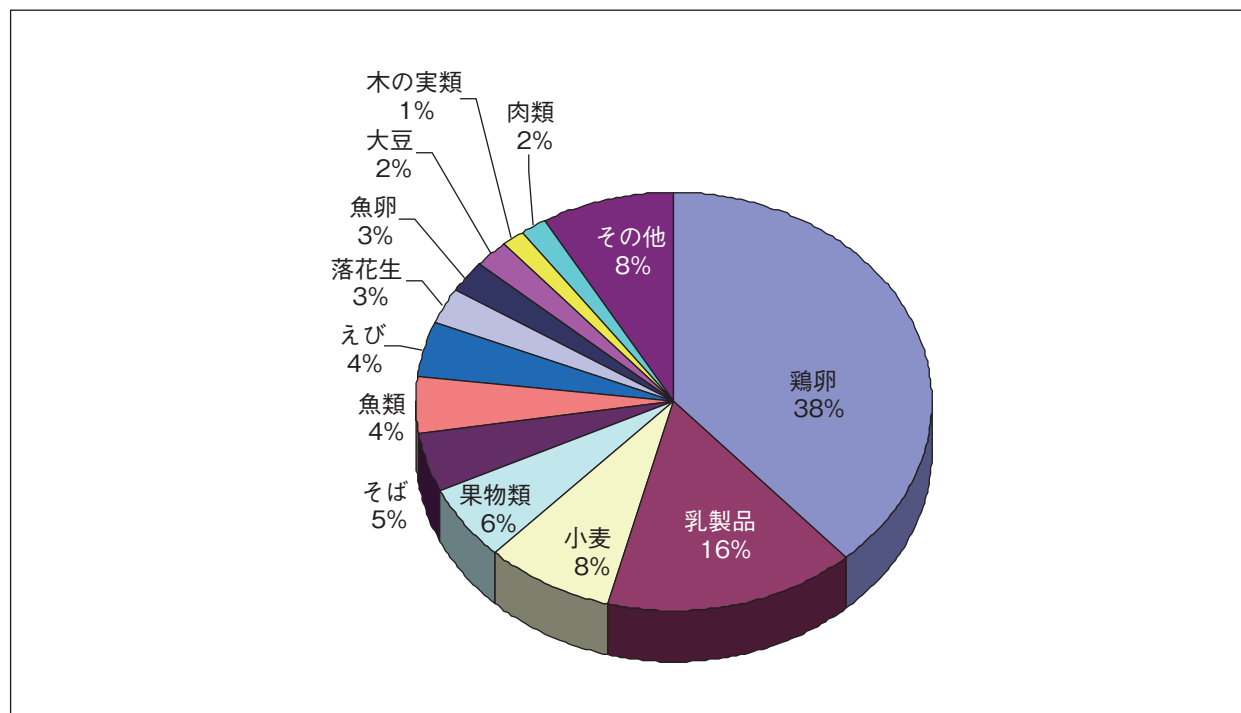


図1 アレルギー原因食物の割合（平成17年厚生労働科学研究報告書より）

3.食品への表示

日本では世界に先駆けてアレルギーを含む食品の表示制度が導入されています(図2)。

アレルギー物質を含む食品の表示には、「義務(特定原材料7品目)」のものと「奨励(特定原材料18品目)」の2つがあります(表1)。

近年の調査で、食物アレルギーを引き起こすことが明らかになった食品のうち、発症数・重篤度が特に高い品目として、卵、乳、小麦、そば、落花生の5品目が、食品衛生法施行規則で「特定原材料」として定められ、これらを含む加工食品については、2002(平成14)年4月からその表示が義務化されています。2008(平成20)年6月には「えび」と「かに」の2品目が追加されました。これら特定原材料7品目については、製造工程における混入であっても $10\mu\text{g/g}$ 以上の含有がある場合には表示が必要となります。また、「入っているかもしれない」といった可能性を表示することは禁止されています。

また、通知で表示が奨励されている品目(特定原材料に準ずるもの)として、あわび、いか、いくら、オレンジ、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、サケ、サバ、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、マツタケ、桃、山芋、リンゴ、ゼラチンの18品目があげられています(表1)。表示による消費者への情報提供は、アレルギーによる健康危害を未然に防ぐことを目的としています。したがって、極微量であっても特定原材料が含有もしくは混入している場合は、その事実を明示する事が求められます。

(※ただし、2010(平成22)年6月3日までに製造・加工・輸入された加工食品については、表示の義務付けは猶予されます。)

また、最近では、特定原材料のうち、卵・乳・小麦・そば・落花生などのアレルギー物質を含まない製品の開発、原材料の選定、生産ラインの洗浄(洗浄後の検査)、製品各ロット毎の検査(厚生労働省の公定法に従った方法)などを実施している企業が増えてきています。

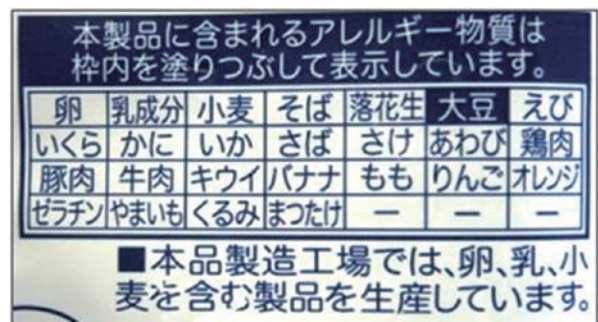


図2 某メーカーの食品への表示例

表1 アレルギー表示対象品目

(厚生労働省 「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21年3月改訂版より)

表示	用語	名称
義務付け	特定原材料(7品目)	卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに
奨励	特定原材料に準ずるもの(18品目)	あわび、いか、いくら、オレンジ、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、サケ、サバ、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、マツタケ、桃、山芋、リンゴ、ゼラチン

※特定原材料等の範囲は、原則として日本標準商品分類の番号で指定されている範囲のものをさします。詳しくは「アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック(2009(平成21)年3月改訂版)厚生労働省」をご参照ください。

4. アレルゲン物質の分析

現在までに検査法が確立している品目は、卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに、あわび、いか、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、サケ、サバ、大豆、鶏肉、豚肉、山芋、リンゴ、バナナの合計20品目となります。

その検査方法は厚生労働省通知法（厚生労働省通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」2006(平成18)年6月22日 食安発第0622003号）に記載されています。

食品中の特定原材料由来タンパク質の定量検査法として、抗原抗体反応を利用したELISA法（※1）、定性検査法としてはウェスタンブロット法（※2）やPCR法（※3）が用いられます（表2）。

定量検査法であるELISA法では特定原材料7品目の卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かにおよび特定原材料に準ずるものとして挙げられている大豆のスクリーニング検査に用いられています。

また、定性検査法のウェスタンブロット法は一般に卵、乳の分析に用いられています。

PCR法は遺伝子の特異的な配列を利用して卵、乳以外の特定原材料である小麦、そば、落花生、えび、かにおよび特定原材料に準ずるものとして挙げられている大豆、牛肉、豚肉、鶏肉、サケ、サバ、あわび、いか、キウイフルーツ、くるみ、山芋、リンゴ、バナナの確認検査に用いられています。

表2 アレルゲンの検査方法

検査方法	用途
ELISA法	スクリーニング検査（定量）
ウェスタンブロット法	確認検査（定性）
PCR法	確認検査（定性）

表3に各対象品目における検査方法をまとめました。

表3 各対象品目の検査方法

	対象品目	検査方法
特定原材料 表示義務品目	卵	ELISA法 ウェスタンブロット法
	乳	ELISA法 ウェスタンブロット法
	小麦	ELISA法 PCR法
	そば	ELISA法 PCR法
	落花生	ELISA法 PCR法
	えび	ELISA法 PCR法
	かに	ELISA法 PCR法
特定原材料に 準ずるもの 表示奨励品目	大豆	ELISA法 PCR法
	牛肉	PCR法
	豚肉	PCR法
	鶏肉	PCR法
	サケ	PCR法
	サバ	PCR法
	あわび	PCR法
	いか	PCR法
	キウイ フルーツ	PCR法
	くるみ	PCR法
	山芋	PCR法
	リンゴ	PCR法
	バナナ	PCR法

（※1）ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法：
酵素免疫測定法と呼ばれる分析方法で、免疫反応（抗原抗体反応）と酵素基質反応が組み合わされたものです。試料中に含まれる抗体あるいは抗原の濃度を検出・定量する際に用いられます。「イライザ法」、「エライザ法」と呼ばれています。

（※2）ウェスタンブロット法：
電気泳動によって試料を分離した後、メンブレンに転写・固定化します。これを目的タンパク質に対する抗体（一次抗体）を反応させます。酵素で標識した二次抗体を一次抗体に反応させ、発光や蛍光により目的物を検出する方法です。

（※3）PCR(Polymerase Chain Reaction)法：
試料となるDNAを鋳型として、DNAのある一部分だけを選択的に増幅させる方法です。増幅したい領域の両端と配列特異的な短い1本鎖DNA（プライマー）とDNA合成酵素（DNAポリメラーゼ）を用いて、サイクル反応（DNA二本鎖の解離→プライマーの結合→DNA合成反応）を行うことにより任意のDNA領域を増幅する方法です。原理的にはDNAが1分子でもあれば反応サイクルの乗数だけDNAが増えます。プライマーを挟む領域の増幅の有無を利用して目的物の有無が判断できます。

5.PCR法による分析

1)食品試料中からのDNA抽出・精製

DNAの抽出・精製法には界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB)法, シリカゲル膜, イオン交換樹脂を用いた方法などがあり, それぞれに特長があります。CTAB法は食品中に含まれるPCR阻害物質が残存しにくい特長があります。また, シリカゲル膜, イオン交換樹脂を用いた抽出精製法には市販のキットがあり比較的簡便に操作が可能です。前者は小麦粉やそば粉などの加工程度の低い検査対象検体に適用が可能です。後者は加糖, 油脂処理, 加熱混合, 発酵などの加工程度の高い検査対象検体に適用が可能です。

2)DNA精製度の確認と定量

抽出精製したDNA試料原液を10倍希釈し, 230 nm, 260 nmおよび280 nmの吸光度を測定します。原則としてDNA試料液は20 ng/ μ Lの濃度で調製します。

3)PCR法

抽出精製したDNAに含まれる目的塩基配列領域を, 各検査対象生物特異的なプライマーを用いてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行うことにより増幅します (表4)。その増

幅産物を電気泳動法により分離, 検出することにより, 検査対象検体中における特定原材料の有無を判定します。検出手順を図3に示しました。

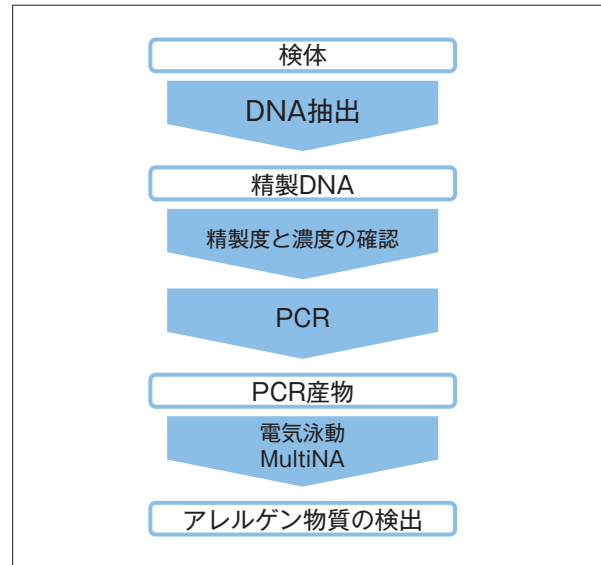


図3 アレルゲン物質の検出手順

表4 アレルゲン検出用プライマー

(厚生労働省「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」平成21年7月24日食安発第0724第1号)(注★)

	植物DNA	動物DNA	小麦	そば	落花生	えび	かに
PCR増幅産物のサイズ (bp)	124	370-470	141	127	95	187	62
	F-Primer			R-Primer			
植物DNA	CP03-5' : 5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'			CP03-3' : 5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3'			
動物DNA	AN1-5' : 5'-TGA CCG TGC GAA GGT AGC-3' AN2-5' : 5'-TAA CTG TGC TAA GGT AGC-3' AN1-5'及びAN2-5'を1 : 1の比率で混合して使用する。			AN-3' : 5'-CTT AAT TCA ACA TCG AGG TC-3'			
小麦	Wtr01-5' : 5'-CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3'			Wtr10-3' : 5'-TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3'			
そば	FAG19-5' : 5'-AAC GCC ATA ACC AGC CCG ATT-3'			FAG22-3' : 5'-CCT CCT GCC TCC CAT TCT TC-3'			
落花生	agg04-5' : 5'-CGA AGG AAA CCC CGC AAT AAA T-3'			agg05-3' : 5'-CGA CGC TAT TTA CCT TGT TGA G-3'			
えび	ShH12-05' : 5'-TTA TAT AAA GTC TRG CCT GCC-3' ShH12-05' は3' 末端から8塩基目をAとGの混合塩基(R)として合成する。			ShH13-03'-1: 5'-GTC CCT CTA GAA CAT TTA AGC CTT TTC-3' ShH13-03'-2: 5'-GTC CCT TTA TAC TAT TTA AGC CTT TTC-3' ShH13-03'-3: 5'-GTC CCC CCA AAT TAT TTA AGC CTT TTC-3' ShH13-03'-1, ShH13-03'-2, ShH13-03'-3を1:1:1の比率で混合して使用			
かに	CrH16-05'-1: 5'-GCG TTA TTT TTT TTG AGA GTT CWT ATC GTA-3' CrH16-05'-2: 5'-GCG TAA TTT TTT CTG AGA GTT CTT ATC ATA-3' CrH16-05'-3: 5'-GCG TTA TTT TTT TTA AGA GTA CWT ATC GTA-3' CrH16-05'-4: 5'-GCG TTA TTT CTT TTG AGA GCT CAT ATC GTA-3' CrH16-05'-1 及びCrH16-05'-3 は3'末端から8 塩基目をA とT の混合塩基 (W) として合成する。 CrH16-05'-1, CrH16-05'-2, CrH16-05'-3, CrH16-05'-4 を10:1:6:3 の比率で混合して使用する。			CrH11-03' : 5'-TTT AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA AGT-3'			

※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, ワタリガニはえびの検出を目的としたPCRにおいて増幅産物が検出されることがあります。得られた増幅産物がえび由来かかに由来か判断がつかない場合にはPCR産物を制限酵素処理することにより判断します。詳しくは「厚生労働省通知法 (厚生労働省通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」)をご参照ください。

(注★) 詳細は裏表紙をご参照ください。

6. マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 “MultiNA”

アガロースゲル電気泳動は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA” はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。

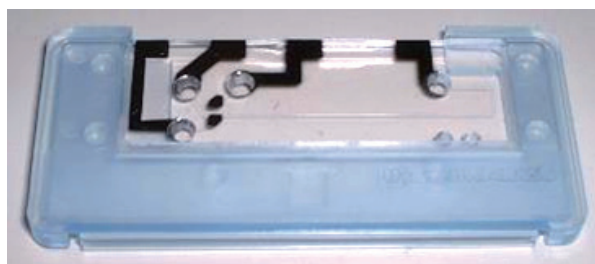


図4 MultiNA 専用マイクロチップ



図5 MultiNA 専用試薬キット

MultiNA特長

- MultiNA によるマイクロチップ電気泳動ではアガロースゲル電気泳動と比べて、より優れた感度、分離、再現性、定量性を実現しています。
- 試料と試薬をセットするだけで、あとは最大120分析まで無人で自動分析できます。分析前処理と分析泳動の並列処理により1分析あたりの時間はわずか約80秒^(※)です。
- MultiNAによる分析操作は非常に簡便です。分析スケジュールを作成したら、あとは試料と試薬をセットしてスタートボタンをクリックするだけです。
- 繰り返し利用可能な高性能マイクロチップがアガロースゲル電気泳動法と同等以下の安価なランニングコストを実現しました。

(※)DNA標準分析 (DNA-100キット/プレミックス) でマイクロチップを4枚使用時。ただし、初期洗浄・後洗浄の時間および初回分析は含まれません。

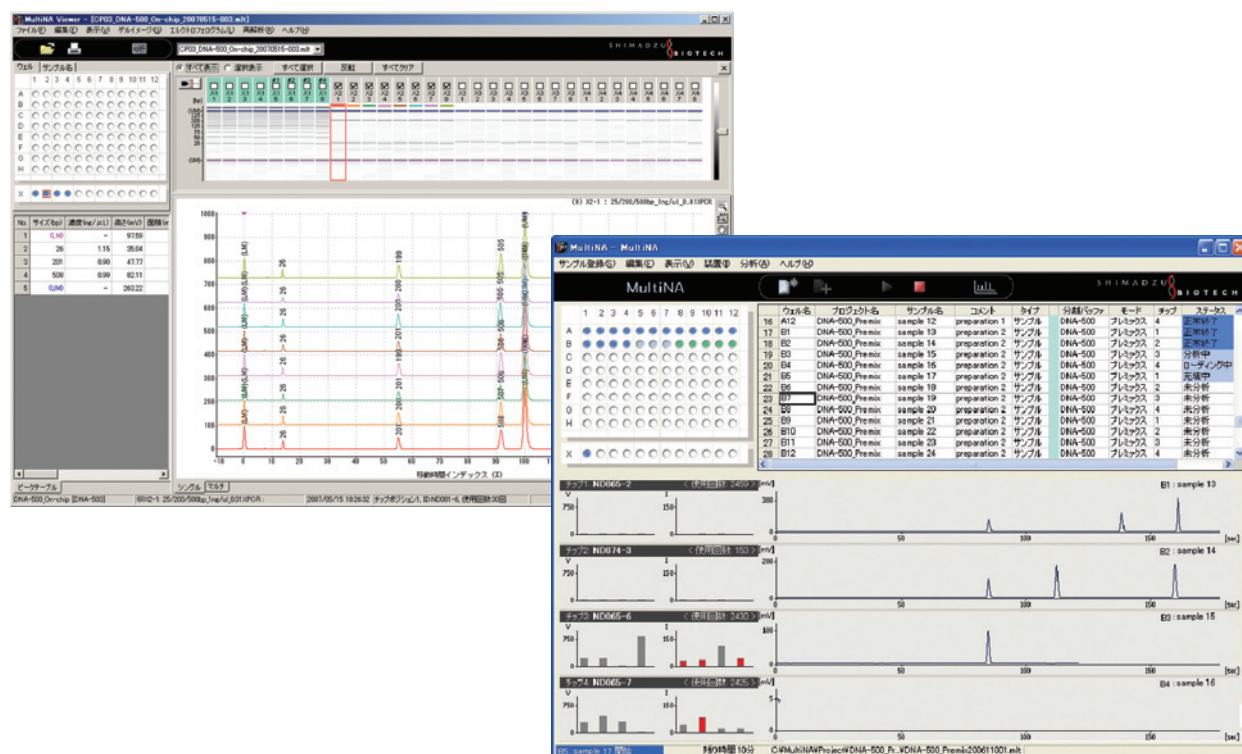


図6 MultiNA操作画面

7.MCE-202 “MultiNA” によるアレルゲン物質の検出例

小麦、そば、落花生、えび、かにを含む食品由来のDNAからのPCR増幅産物をMultiNAで分析した結果を図7に示します。小麦、そば、落花生、えび、かに、それぞれに由来するPCR増幅産物をMultiNAによって明瞭に検出することができました(図中のサイズ推定値は本実験によるものです)。同じPCR増幅産物をアガロースゲル電気泳動で分析した結果を図8【参考】に示します。

アガロースゲル電気泳動ではPCR増幅物のサイズが不明確で客観性に乏しい結果となってしまいます。

しかし、MultiNAでは、エレクトロフェログラム(図7-b)に加えてゲルイメージ(図7-a)も得られるのでデータとしての確証も高いものとなります。また、小麦とそば増幅産物は近接していますが、それぞれを分離できています。MultiNAはアガロースゲル電気泳動と比べて分解能と感度が優れているのでこれらを明確に検出することが可能です。図9には、マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 “MultiNA” の外観写真を示します。

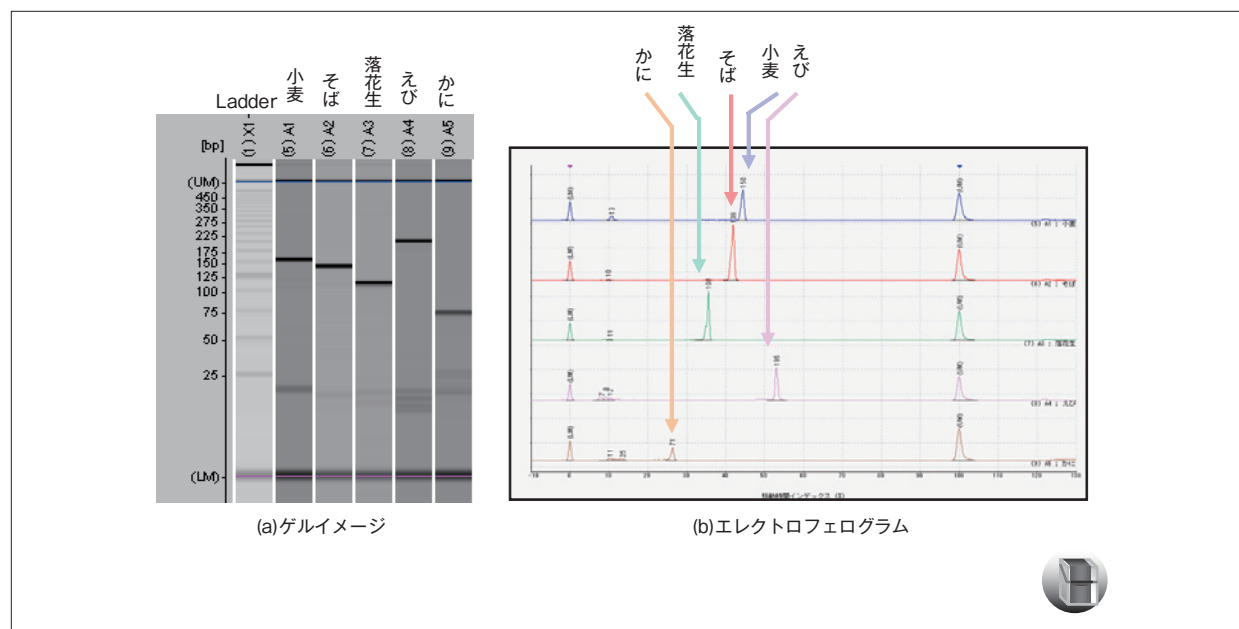


図7 アレルゲン物質の分析結果

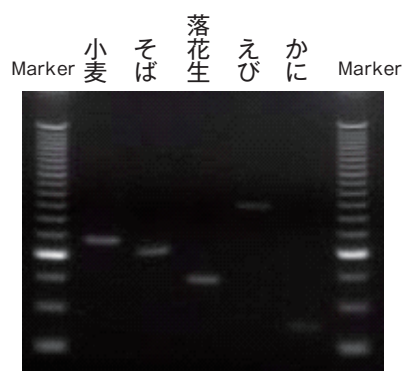


図8 【参考】アガロースゲル電気泳動によるアレルゲン物質の分析結果



図9 マイクロチップ電気泳動装置MCE-202 “MultiNA”

[参考文献]

「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」平成21年7月24日食安発第0724第1号 厚生労働省
「アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック」(2009(平成21)年3月改訂版) 厚生労働省
「知っておきたい食品の表示」(2009(平成21)年3月版) 厚生労働省・農林水産省・公正取引委員会

(注★)

公的機関を除く分析機関におきまして、本文記載のプライマーを使用した受託試験を商業目的として実施する場合には、別途協議が必要です。関係各社にご連絡ください。また、このプライマーを試験研究のために合成、使用することについての制限はありません。

- ・動物：日清食品株式会社
- ・小麦、そば、大豆：株式会社日清製粉グループ本社
- ・エビ、カニ：ハウス食品株式会社

*本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初 版 発 行：2010年2月

 **島津製作所** 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

- ☎ 0120-131691 (携帯電話不可)
- 携帯電話専用番号 (075) 813-1691

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。