

ELISA法を用いたカシューナッツ検査試薬の開発

島津ダイアグノスティクス株式会社 ○大山莉央, 奥村友梨, 柴原裕亮, 櫻木直也

目 的

カシューナッツアレルギー患者は年々増加傾向があり, 重篤なショック症状を示す割合が高いことから, 今後のアレルギー表示義務化に向けた検査法の早期開発が求められている. 表示義務化にあたり, スクリーニング検査法 (ELISA法) および確認検査法 (PCR法) の整備が必要となる. そこで我々は, 加工食品中のカシューナッツタンパク質を検出するためのELISAキット開発を行い, 食品検体を用いて性能を評価した.

測 定 原 理

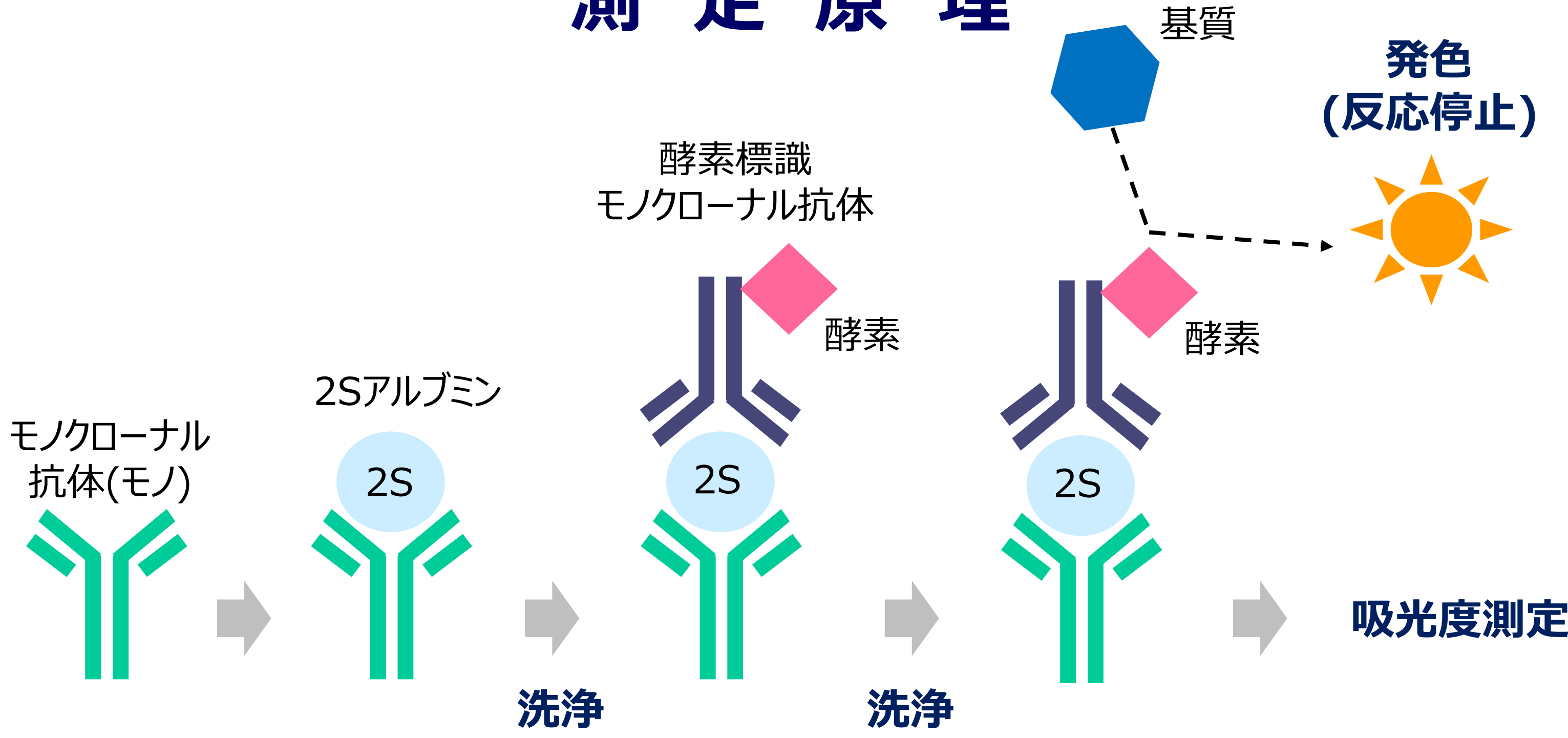


図1. カシューナッツELISA法の測定原理 (モノ/モノ系)

操 作 方 法

<抽出操作>

1. 粉碎機等により均一化した食品検体 1 gに対し, 検体抽出液を19 mL加えて混合
2. 室温で12時間以上往復振盪
3. 3,000 ×g, 20分室温で遠心分離後, 上清を濾過

<測定操作>

1. 標準溶液, 検体希釈液で20倍希釈した抽出検体液を100 μL/well添加し, 室温1時間
2. 洗浄 (300 μL/well×5)
3. 酵素標識抗体液を100 μL/well添加し, 室温1時間
4. 洗浄 (300 μL/well×5)
5. 酵素基質液を100 μL/well添加し, 遮光下で室温20分
6. 反応停止液を100 μL/well添加
7. 吸光度(主波長:450 nm, 副波長:650 mm) を測定

結 果

感度・再現性

： 50~0.78 ng/mLに段階希釈した標準品を測定 (8重測定).

検出限界は< 0.78 ng/mL, 定量限界は< 1.56 ng/mLとなり, 再現性 (CV値) は< 10%となった (図2, 表1).

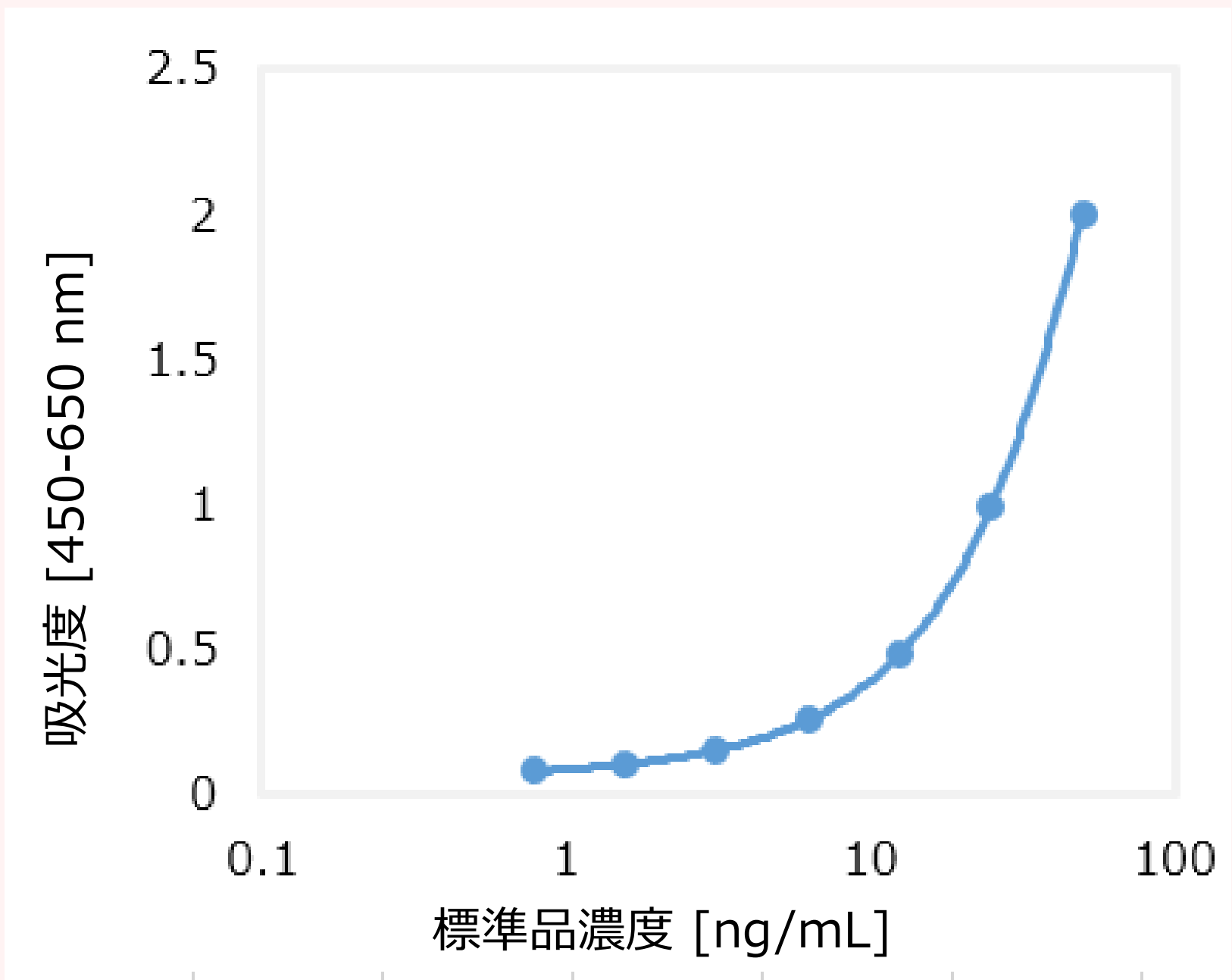


図2. 検量線 (0.78~50 ng/mL)

表1. 標準品の吸光度およびCV値

標準品濃度 : ng/mL (食品中換算濃度 : μg/g)	吸光度 450-650 nm	CV値
50 (20)	2.001	2.4%
25 (10)	0.991	2.4%
12.5 (5)	0.481	2.4%
6.25 (2.5)	0.257	1.5%
3.13 (1.25)	0.153	1.2%
1.56 (0.62)	0.101	2.7%
0.78 (0.31)	0.078	3.4%
0	0.056	2.9%

検出限界 (3.3s/a) : 0.23 ng/mL

定量限界 (10s/a) : 0.70 ng/mL

s : blankの吸光度の標準偏差

a : 検出限界付近の検量線の傾き

特異性

： 加熱や産地に関係なくすべてのカシューナッツ (4/4種) に反応し, 110種類の食品検体 (110/112種) に未反応 (表2).

ピスタチオ (3.31~4.70 μg/g), 松の実 (0.46 μg/g) に反応

加工食品への反応性

： すべてのカシューナッツ含有加工食品 (11種) に反応し, 松の実の加工食品には未反応 (表3).

また, 10 μg/gのモデル加工食品には, 5~15 μg/g以内の反応性 (表4).

表2. 各種食品に対する反応性

カシューナッツ			近縁種			種実類		
Sample	測定値 (μg/g)		Sample	測定値 (μg/g)		Sample	測定値 (μg/g)	
ベトナム産・加熱	96216		穀類	コムギ, タカキビ, アワ, ヒエ, ソバ, オオムギ, オーツムギ, ライムギ, ハトムギ, トウモロコシ, ゲンマイ		落花生		
ベトナム産・非加熱	132164		いも類	ヤマイモ, サツマイモ		くるみ		
インド産・加熱	132300		野菜類	ニンニク		アーモンド		
インド産・非加熱	155440		果実類	オレンジ, キウイフルーツ, モモ(白桃), リンゴ, バナナ, レモン		マカダミアナッツ		
ピスタチオ(アメリカ産)	4.70		きのこ類	マツタケ, シイタケ, マイタケ, マツシュルーム		ヘーゼルナッツ		
ピスタチオ(イラン産)	3.31		藻類	ワカメ, コンブ, ヒジキ		ブラジルナッツ		
マンゴー			魚類	ベニザケ, マサバ, マダイ, マダラ, カツオ, アブラツノサメ, カラフトシシャモ, インドマグロ, パンガシウス, フリ		ピンクペッパー		
ピンクペッパー	< 0.31		甲殻類	クルマエビ, ブラックタイガー, ズワイガニ, ガザミ, タラバガニ, シヤコ, カメノテ		パカンナッツ		
スマック			イカ・タコ類	マダコ, ヤリイカ, スルメイカ		ゴマ		
松の実	0.46		貝類	マガキ, アサリ, ホタテガイ, ヤマトシジミ, クロアワビ, アカアワビ, サザエ	< 0.31	大豆		
落花生			その他	イクラ, タラコ, シシャモ卵, ホヤ, ナマコ		小豆		
くるみ			肉類	鶏ささみ, 鶏むね肉, 牛肉, 豚肉, ラム肉, 合鴨肉		豆乳		
アーモンド			茶類	紅茶, 緑茶, ウーロン茶, コーヒー				
マカダミアナッツ			調味料及び香辛料類	ブラックペッパー, ホホワイトペッパー, カレーパウダー, クミン, ローズマリー, パプリカ, シナモン, ナツメグ, タイム, 味噌				
ヘーゼルナッツ			増粘多糖類	キサンタンガム (×1000), グァーガム (×1000), アルギニン酸Na (×1000), タマリンドガム (×1000), タラガム (×1000), ローカストビーンガム (×1000), ベクチン (×100), ι カラギーナン (×1000), κ カラギーナン (×1000), λ カラギーナン (×1000), ジェランガム (×1000)				
ブラジルナッツ								
ピンクペッパー								
パカンナッツ								
ゴマ								
大豆								
小豆								
豆乳								
鶏卵								
温泉卵								
牛乳								
ヤギ乳								
スキムミルク								

表3. 加工食品に対する反応性

Sample	測定値 (μg/g)
カシューナッツペースト	515324
スナック菓子①	515086
スナック菓子②	514356
ごまだれ	7180
チョコレート	6034
担々麺	4288
チキンカレー	2655
ビーフカレー	1678
ジェノパーゼ	1304
ラムキーマカレー	697
ベジタブルカレー	597
クッキー(ピスタチオ)	1.02
バジルソース (松の実)	< 0.31

表4. モデル加工食品に対する反応性

Sample	測定値 (μg/g)
つみれ (10 μg/g)	9.52
つみれ (0 μg/g)	< 0.31
赤字: 表示義務品目	
青字: 推奨品目	

ま と め

検出限界・定量限界・再現性が市販の特定原材料ELISAキットと同程度であり, カシューナッツに特異性が高く, 加工食品中のカシューナッツを正確に検出可能であった.

従って, 構築したELISA法は, カシューナッツのスクリーニング検査法として有用であると考えられた.