

【調査研究】特定原材料（食物アレルギー原因物質）の 確認検査法の検討

河田康克 永井佳恵子* 板野美和子 西山美江 山口貴史**

平成 27 年度に特定原材料（小麦）の検査で収去したくずきを消費者庁次長通知（以下、通知法）に準拠して検査したところ、スクリーニング検査の ELISA 法で陽性となり、確認検査の PCR 法では植物 DNA・小麦 DNA 共に検出されず、検知不能となった。通知法で検知不能となったくずきに対し、DNA を高感度検出できる平板型キャピラリー電気泳動やネステッド PCR を試みたところ小麦 DNA が検出された。通知法で検知不能となったくずきと成分が類似するくずきを用いて検討したところ、通知法ではくずきに含まれる PCR 阻害物質により DNA が検出できなくなるが、PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼや緩衝液を用いることによりくずきに含まれる PCR 阻害物質の作用の低減が可能であった。

Key words : 特定原材料 平板型キャピラリー電気泳動 ネステッド PCR
PCR 阻害物質 PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼ

はじめに

わが国の食物アレルギーの有病率は乳児で約 5~10%、幼児で約 5%、学童期以降が 1.5~3% と考えられている¹⁾。食物アレルギーの誘発症状は多岐にわたり、特に皮膚症状（じんましん、紅斑など）が多いが、呼吸器症状やアナフィラキシーショックなど生命に危険を及ぼすことも少なくない。

食物アレルギーの発症は、アレルギー原因物質を摂らないことで防げるため、アレルギー原因物質を含む食品に関する表示制度が施行されている²⁾。臨床的に発症件数及び重篤度を勘案し、小麦、そば、乳、卵、落花生、えび、かこの 7 品目を特定原材料として表示を義務づけ、その他 20 品目の特定原材料に準じるものが表示推奨品目とされている。

当センターでは、消費者庁次長通知²⁾（以下、通知法）に準拠して、特定原材料の検査を実施している。スクリーニング検査は検査特性の異なる 2 種の ELISA キットで、確認検査はウエスタンブロット法（卵、乳）又は PCR 法（小麦、えび、かに、そば、落花生）で実施してい

る。

平成 27 年度に実施した小麦のスクリーニング検査では、原材料に小麦表記のない「くずき」の検査結果は、2 種類のキットのうち 1 キットで陽性となった。保健所が製造記録を確認したところ、「くずき」に小麦を使用していなかったため、通知に従い、当センターで確認検査を実施した結果は検知不能となった。

確認検査の PCR 法で検知不能となる原因として、DNA の抽出不良や DNA の断片化がある。これらを解決する方法として、DNA の高感度検出、PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼ・緩衝液の利用などが行われている³⁻⁵⁾。今回、検知不能となった「くずき」に対して平板型キャピラリー電気泳動やネステッド PCR の適用した事例や PCR 阻害物質に対する PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼ及び緩衝液について検討を行ったので報告する。

材料と方法

1 試料

原材料欄に小麦の表記が無く検知不能となったくずき（以下、くずき A）、くずき A と同工場で製造され、原材料が類似するくずき（以下、くずき B）を用いた。各試料に含

* 現 群馬県衛生環境研究所

** 現 群馬県水質検査センター

まれる原材料は、表 1 に示した。

(Agilent technologies 製)

2 機器

ミキサー：6630（オスター製）、遠心機：H-30R（コクサン製）、5930（久保田商事製）、CF15D2（日立工機製）、マイクロチューブ遠心機：BSR-Mini6000KS（バイオメディカルサイエンス製）、ホモジナイザー：AM-1（日本精機製作所製）、凍結乾燥機：FD-5N（東京理化学器械製）、インキュベーター：DTU-18（タイテック製）、サーマルサイクラー：TP650（タカラバイオ製）、GeneAmp PCR System 9600（アプライドバイオシステムズ製）、恒温水槽：TR-3AR（アズワン製）、恒温器：DFS82（ヤマト科学製）、分光光度計：BioSpec-nano（島津製作所製）、電気泳動装置：Mupid-21（コスモ・バイオ製）、ゲル振とう機：NR-3（タイテック製）、ゲル撮影装置：NLM-20E、IP-DP-CF-011（UVP 製）、平板型キャピラリー電気泳動装置：Agilent2100 バイオアナライザー

3 試薬

(1) 確認検査試薬

通知法²⁾に準拠した。

(2) 平板型キャピラリー電気泳動用試薬

Agilent DNA1000 試薬キット（Agilent technologies 製）

(3) ネステッド PCR 用プライマー

Wtr01NE2-5'（5'-TGGTGGTTGGAATGGTTT-AGA-3'）、Wtr10NE5-3'（5'-GGCACGCGGATT-GTATATGT-3'）（ファスマックへ合成委託）

(4) PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼ

KAPA3G Plant（KAPA BIOSYSTEMS 製）

(5) PCR 阻害耐性緩衝液

Ampdirect Plus（島津製作所製）

(6) 陽性コントロールテンプレート

アレルゲンチェッカー「小麦」付属の陽性コントロールテンプレート（オリエンタル酵母工業製）

表 1 試料に含まれる原材料

試料名	原材料名
くずきり A ^{*1}	エリスリトール、りんご酢、りんご濃縮果汁、寒天、くず粉、ゲル化剤（増粘多糖類）、乳酸 Ca、pH 調整剤、甘味料（アスパルテーム・L-フェニルアラニン化合物、アセスルファム K、スクラロース）、香料、乳化剤、カロテノイド色素
くずきり B ^{*2}	エリスリトール、ぶどう酢、ぶどう濃縮果汁、寒天、くず粉、りんご酢、ゲル化剤（増粘多糖類）、乳酸 Ca、酸味料、着色料（アントシアニン、カラメル）、甘味料（ステビア、アセスルファム K、スクラロース）、pH 調整剤、香料、乳化剤、酸化防止剤（ヤマモモ抽出物）

*1：収去検査にて検知不能となった検体

*2：くずきり A と同工場で製造され、原材料が類似するくずきり

表 2 PCR 反応溶液の組成

通知法	ネステッド PCR	Ampdirect Plus	KAPA3G Plant
0.025U/μL AmpliTaq Gold	0.025U/μL AmpliTaq Gold	0.025U/μL BIOTAQ HS DNA Polymerase	0.02U/μL KAPA3G Plant DNA Polymerase
1×PCR Buffer II	1×PCR Buffer II	1× Ampdirect Plus	1× KAPA Plant PCR Buffer
0.2mM dNTP	0.2mM dNTP	0.5μM F-プライマー	0.3μM F-プライマー
1.5mM MgCl ₂	1.5mM MgCl ₂	0.5μM R-プライマー	0.3μM R-プライマー
0.2μM F-プライマー	0.2μM F-プライマー	テンプレート DNA	テンプレート DNA
0.2μM R-プライマー	0.2μM R-プライマー		
テンプレート DNA	通知法 PCR 産物		

4 方法

(1) DNA 抽出法

通知法²⁾に準拠した。

(2) 平板型キャピラリー電気泳動

平板型キャピラリー電気泳動を用いて確認検査時のくずきり A の PCR 産物の測定を行った。

(3) ネステッド PCR

確認検査時のくずきり A の PCR 産物の原液をテンプレートとして 2.5 μ L 使用した。ネステッド PCR 用プライマー対 (Wtr01NE2-5'&Wtr10NE5-3') を用いた。PCR 反応液組成や PCR 条件は通知法と同様の組成を用いた (表 2)。ネステッド PCR 後はアガロースゲル電気泳動を行った。

(4) 通知法 PCR に対するくずきり B の PCR 阻害効果

くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液を 1 倍~256 倍希釈したものをテンプレート DNA として 2.5 μ L 使用した。陽性コントロールテンプレートを終濃度が 1,000 倍希釈になるように添加した。プライマーは通知の小麦検出用プライマー対 (Wtr01-5'&Wtr10-3') を用いた。通知法に準拠して、PCR を行った。

(5) PCR 阻害物質作用の低減

くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液を 4 倍~128 倍希釈したものをテンプレート DNA とし 2.5 μ L 使用した。陽性コントロールテンプレートを終濃度が 1,000 倍希釈になるように添加した。通知法の AmpliTaq Gold と PCR 阻害耐性をもつ KAPA3G Plant、Ampdirect Plus を用いて PCR を行った。なお、PCR 反応液組成は、通知法 PCR では通知に準じ、Ampdirect Plus、KAPA3G Plant は試薬メーカーの推奨値を 25 μ L 反応系とし用いた (表 2)。プライマーは通知の小麦検出用プライマー対 (Wtr01-5'&Wtr10-3') を用いて、PCR 反応条件は通知法と同条件とした。

結果と考察

1 平板型キャピラリー電気泳動を用いた DNA 高感度検出

DNA を高感度に検出できる平板型キャピラリー電気泳動を用いて確認検査時の PCR 産物の分析を行った。イオン交換樹脂タイプキット法、シリカゲル膜タイプキット法の PCR 産物からピークは検出されなかったが、CTAB 法の PCR 産物から植物 DNA、小麦 DNA ともにピークが検出された (図 1)。このことから、確認検査時のアガロースゲルでは DNA の検出感度が足りず、検知不能となったと考えられた。

2 ネステッド PCR を用いた小麦 DNA の確認

確認検査時の PCR 産物からネステッド PCR を行ったところ、CTAB 法の PCR 産物から増幅バンドが検出された (図 2)。通知法のアガロースゲルでは DNA を検出できず、平板型キャピラリー電気泳動やネステッド PCR により DNA が検出されたことから、通知法の PCR 産物の DNA 濃度が微量であった。

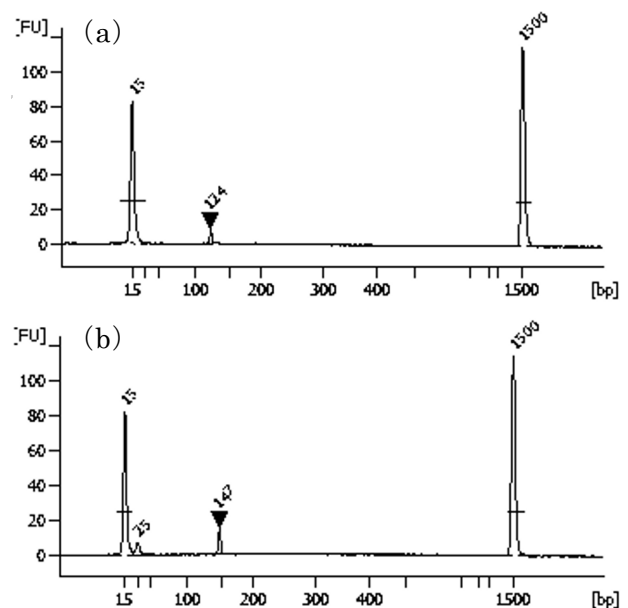


図 1 くずきり A の CTAB 法の平板型キャピラリー電気泳動を用いたエレクトロフェログラム

(a) 植物 DNA 検出用プライマー対の PCR 産物

(b) 小麦検出用プライマー対の PCR 産物

3 通知法 PCR に対するくずきり B の PCR 阻害効果

くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液の原液や 4 倍、16 倍希釈した DNA 試料液から増幅バンドが検出されなかった (表 3)。DNA 試料液を 64 倍まで希釈することによって増幅バンドが検出された。くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液を希釈することによってバンドが検出されることから、くずきり A と成分が類似するくずきり B の DNA 試料液には PCR 阻害物質が含まれていると考えられた。くずきり A も同様に PCR 阻害物質が含まれ、通知法で検知不能になった原因と考えられた。

4 PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼ等を用いた PCR 阻害物質作用の低減

通知法の AmpliTaq Gold では、くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液を 32 倍希釈するまで増幅バンドが検出されなかったが、KAPA3G Plant、Ampdirect Plus では

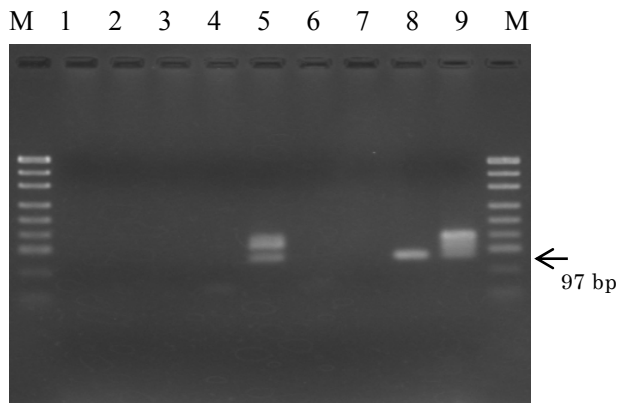


図 2 くずきり A のネステッド PCR のアガロースゲル電気泳動結果

レーン: M, マーカー;
 レーン:1,2, イオン交換樹脂タイプキット法;
 レーン:3,4, シリカゲル膜タイプキット法;
 レーン:5,6, CTAB 法;
 レーン:7, ネガティブコントロール;
 レーン:8, ポジティブコントロール
 (ネステッド PCR 用プライマーのみ);
 レーン:9, ポジティブコントロール

表 3 くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液の希釈率と陽性コントロールテンプレートを加えた通知法 PCR の DNA 検出

試料液の希釈率	1	4	16	64	256
通知法 PCR	-	-	-	+	+

+ : 陽性 - : 陰性

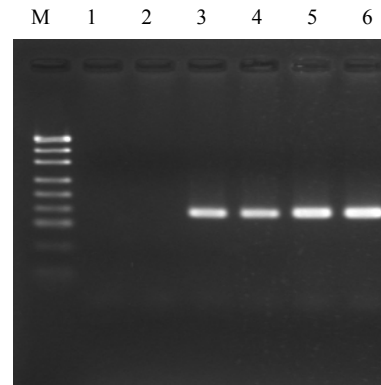


図 3 くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液を 4 倍希釈し陽性コントロールテンプレートを加えた時の通知法 PCR と PCR 阻害耐性ポリメラーゼ及び緩衝液を用いた PCR の比較

レーン:M, マーカー;
 レーン:1,2, AmpliTaq Gold (通知法);
 レーン:3,4, KAPA 3G Plant
 (PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼ);
 レーン:5,6, Ampdirect Plus
 (PCR 阻害耐性緩衝液)

表 4 くずきり B のイオン交換樹脂タイプキット法の DNA 試料液の希釈率と陽性コントロールテンプレートを加えた通知法 PCR と PCR 阻害耐性ポリメラーゼの PCR 産物の検出について

試料液の希釈率	4	8	16	32	64	128
AmpliTaq Gold	-	-	-	+	+	+
KAPA3G Plant	+	+	+	+	+	+
Ampdirect Plus	+	+	+	+	+	+

4 倍希釈した DNA 試料液から増幅バンドが検出された (図 3、表 4)。KAPA3G Plant、Ampdirect Plus は、通知法の AmpliTaq Gold より、くずきり B の PCR 阻害物質が 8 倍濃い DNA 試料液であっても増幅バンドを検出することが可能であった。PCR 阻害耐性ポリメラーゼや緩衝液は、くずきり B に含まれる PCR 阻害物質の PCR 阻害作用を低減できることがわかった。

まとめ

通知法に準拠して行った確認検査で検知不能となったくずきりに対して、平板型キャピラリー電気泳動やネステッド PCR を用いることによって小麦 DNA が検出された。くずきりが通知法で検知不能となった一因がくずきりに含まれる PCR 阻害物質によるものだと考えられ、PCR 阻害耐性 DNA ポリメラーゼや緩衝液は有用であった。

謝辞

試薬のサンプルを提供して頂いた日本ジェネティクス株式会社及び株式会社島津製作所並びに、機器装置の使用について協力頂いたアジレント・テクノロジー株式会社及び群馬県衛生環境研究所に深謝いたします。

文献

- 1) 日本小児アレルギー学会：食物アレルギー診察ガイドライン 2012 ダイジェスト版、<http://www.jspaci.jp/jpgfa2012/>
- 2) 消費者庁次長通知「食品表示基準について」、消食表第 139 号、平成 27 年 3 月 30 日
- 3) 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研究年報、**59**、149-152、2008.
- 4) 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** (1)、23-30、2008.

- 5) 石本聖、浅田征彦、小西秀則、金戸恵子：アレルギー物質を原材料として含む加工食品から DNA 検出法に関する検討、石川県保健環境センター研究報告書、**50**、30-32、2013.