

〔報 文〕

食品中に含まれる特定原材料(卵)の検査法の検討

石川県保健環境センター健康・食品安全科学部 小野 陽介・塚 林 裕

キーワード：特定原材料，卵，食物アレルギー，ELISA，ウェスタンブロット法

1 はじめに

近年わが国ではアレルギー疾患の増加が社会問題となっている。特に食品を原因とするアレルギー（食物アレルギー）に関しては、小児のみではなく、成人においても増加の傾向があることが明らかとなってきた。

そのため表示による情報提供の必要性から、平成13年4月の食品衛生法関連法令の改定に伴い、平成14年4月より容器包装された加工食品や添加物に特定原材料5品目（「卵、乳、小麦、そば、落花生」）を原材料として使用した場合に表示が義務付けられた。それに伴い、14年11月にアレルギー物質を含む食品（以下アレルギー食品）の検査法について通知により定められた¹⁾。この検査法では、スクリーニング検査としてELISA法、確認検査法としてウェスタンブロット法（以下WB法）、PCR法が示され、ELISA法、WB法については検査に用いるキットについても規定されている。特に、ELISA法においては複合抗原認識抗体を用いた日本ハム（株）製ELISAキットFASTKIT（以下、N社従来キット）及び単一または精製抗原認識抗体を用いた（株）森永化学研究所製ELISAキット（以下、M社従来キット）の両キットを用いて結果を判定することとなっていた。

今回この試験法が一部改正された²⁾。改正の概要は、スクリーニング法としてのELISAキットに前記2社のキットの改良品（以下N社改良キット、M社改良キット）が追加されたことである。この追加された両キットは従来キットよりも食品からのアレルギー物質の抽出効率が優れているとされている³⁾。この改正では、従来キットも使用の継続が認められている。

本報では、アレルギー患者数が多いとされる特定原材料のうち「卵」を対象とした。「卵」については、使用

されている食品も多岐にわたることや、加工された食品によっては卵タンパク質の抽出効率が非常に悪く、また加熱などの加工処理によってタンパク質自体の変性も考えられるなど、検査を進める上での問題も多い。そこで今後実際に検査法を適用するにあたっての問題点について検討を進めたので報告する。

2 材料と方法

2・1 試料

特定原材料(卵)の行政試験に係る検体として持ち込まれたさつま揚げについて検査法の検討を行った。さつま揚げを通知²⁾に従い均質化し、その後のELISA法及びWB法の試料として用いた。

2・2 試験方法

(1) ELISA法

N社従来キット(卵)、M社従来キット(卵：卵白アルブミンキット)、M社従来キット(卵：オボムコイド)、N社改良キット(卵)、M社改良キット(卵：卵白アルブミン)の5つのキットを用いて検査法を検討した。具体的な検査法に関しては通知²⁾に従い行った。使用したキットについては、表1にまとめた。

(2) WB法

WB法は、試料中のタンパク質をSodium Dodecyl Sulfate（以下、SDS）-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下SDS-PAGE）し、転写膜に転写後、特定原材料由来のタンパク質に対する特異的ポリクローナル抗体を用いて検出する定性試験法である⁴⁾。WB法の操作フローチャートを図1に示した。卵のWB法では、森永社製の卵白アルブミンWBキット（以下、M社WBキット）を用いた。具体的な検査法は主に通知²⁾に従ったが、一部変更を加え、検査法の検討を行った。通知には、

Study on the Detection Method of Allergic Substances (Egg) in Food. by ONO Yousuke and TSUKABAYASHI Hiro (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Allergic Substances, Egg, Food Allergy, ELISA, Western Blot Analysis

表 1 使用したELISAキットとその特徴

	抽出用試薬	抗原認識抗体
N社従来キット(卵)	N社独自	卵に含まれる種々のタンパク質を認識(複合抗原認識抗体)
M社従来キット(卵:卵白アルブミン)	M社独自	卵白アルブミンのみを認識(精製抗原認識抗体)
M社従来キット(卵:オボムコイド)	M社独自	オボムコイドのみを認識(精製抗原認識抗体)
N社改良キット(卵)	M社の従来キット抽出用試薬に SDS、2-ME を添加した	卵に含まれる種々のタンパク質を認識(複合抗原認識抗体)
M社改良キット(卵:卵白アルブミン)		卵白アルブミンのみを認識(精製抗原認識抗体)

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

2-ME: 2-メルカプトエタノール

WB法に用いる試料はM社従来キット(卵:卵白アルブミン)の抽出液を用いることとなっている。しかし、今回は、抽出用試薬の組成の異なるM社改良キット(卵:卵白アルブミン)での抽出液や、N社従来キットでの抽出液について、M社従来キット抽出液と同様の方法で検査が可能かを検討した。

3 結果及び考察

3・1 N社従来キット、及びM社従来キットを用いたELISA法によるスクリーニング結果

アレルギー食品検査においては検査法が一部改正され、キットが追加されたが、従来キットについても引き続き使用が認められている。そこで、検体のさつま揚げ中に卵が含まれているかをN社従来キット(卵)とM社従来キット(卵:卵白アルブミン)を用いて実施し、その検査結果を検討した(図2)。その結果、N社製従来キットでは確かに卵が含まれていることが確認できるが(さつま揚げ中の卵タンパク質量 $17\mu\text{g/g}$)、M社製従来キットでは卵が含まれないという結果(さつま揚げ中卵タンパク質量 $0.4\mu\text{g/g}$ 未満)になった。このような結果になった原因について考察してみると、1)従来キットにおいては、抽出用試薬がN社、M社によって異なるため、食品からの卵タンパク質の抽出量が異なったことによる差異、2)N社キットでは複合抗原認識抗体を用いており、M社キットは精製抗原認識抗体(卵は卵白アルブミン)を用いていることによる差異が考えられた。

そこで、まず1)について検討するため、食品からのアレルギーの抽出効率を高める事に成功した各社の改良キット(両社共通の抽出用試薬を使用)を用いて検査を再度行った。

3・2 N社改良キット、及びM社改良キットを用いたELISA法によるスクリーニング結果

改良キットでの結果を図3に示した。従来キットでは、

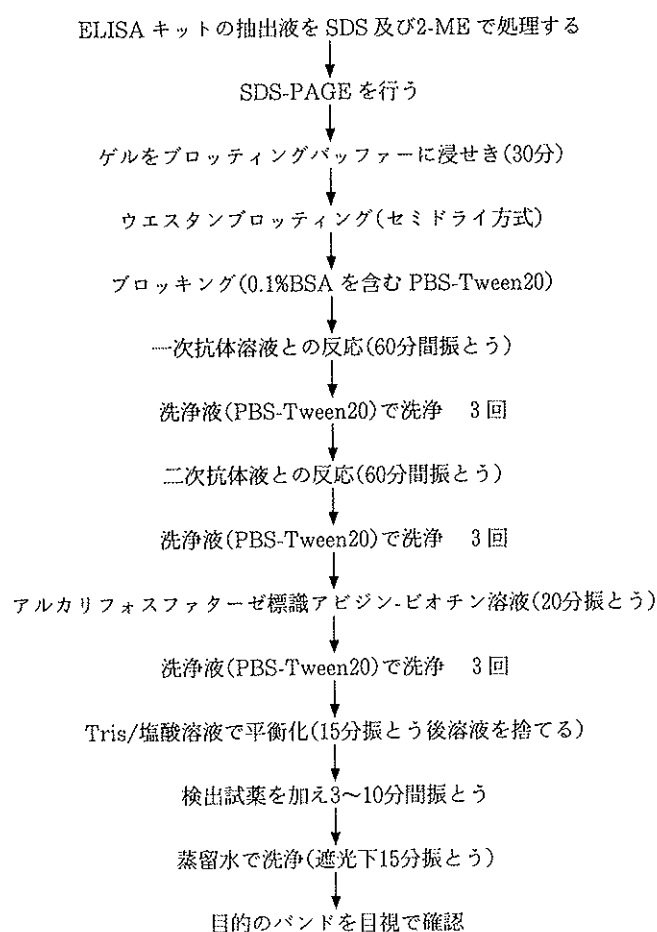


図1 ウェスタンブロット法の操作フローチャート

N社とM社で異なった検査結果を示したが、改良キットでは両社同様の結果となった(検体中の卵タンパク質量が両社のキットとも $20\mu\text{g/g}$ 以上)。つまり、M社従来キットでは卵タンパク質が検出されなかったが、M社改良キットでは卵タンパク質が検出された。このことから、改良キットが従来キットに比べ食品からのアレルギー抽出効率が改善されていることが確認された。

従来キットと改良キットの大きな違いは、検体からのアレルギー物質の抽出に用いる抽出用試薬の組成と、抽

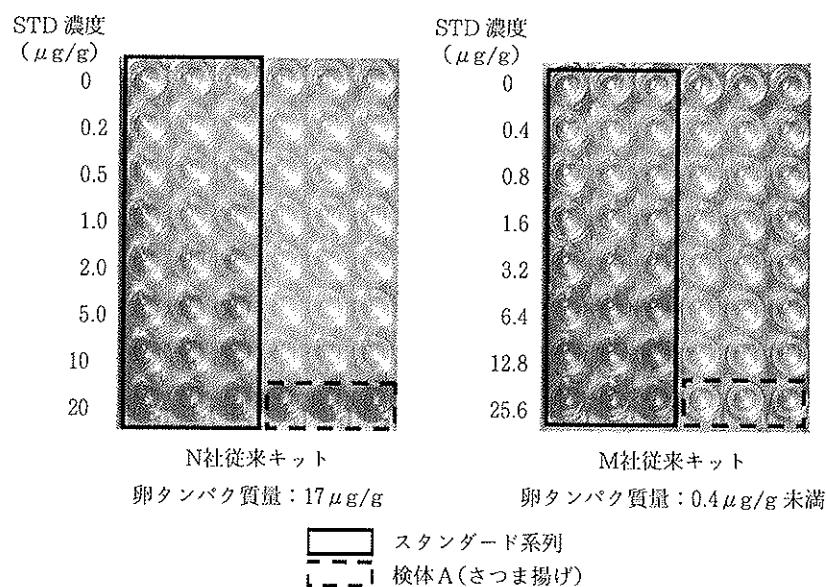


図 2 従来キットによる試験結果

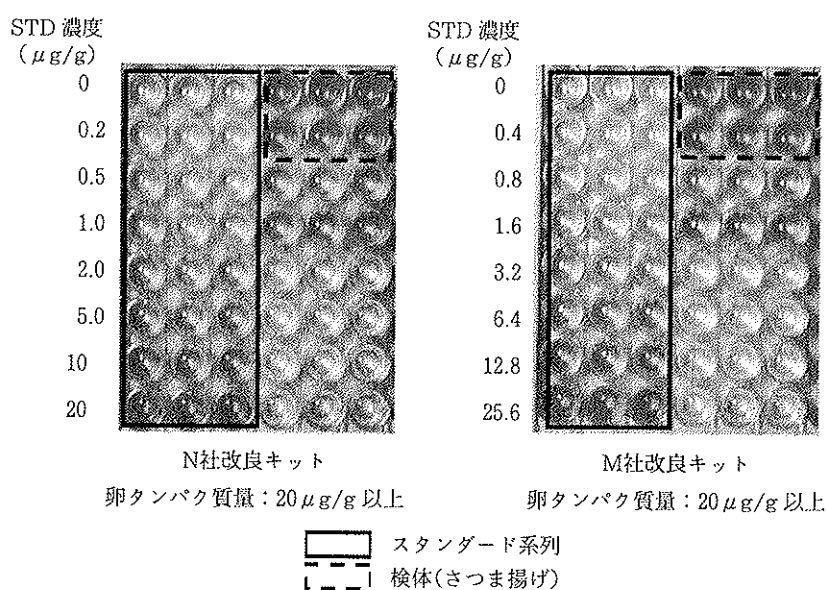
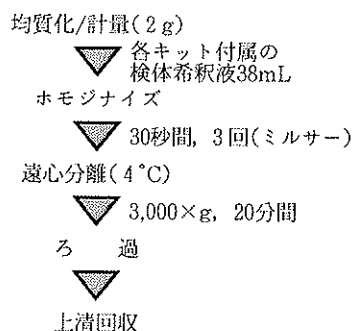


図 3 改良キットによる試験結果

【従来キットの抽出法】



【改良キットの抽出法】

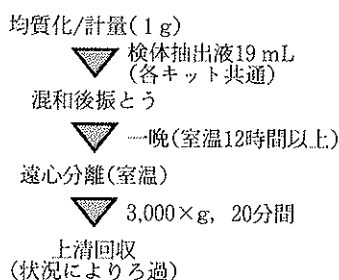


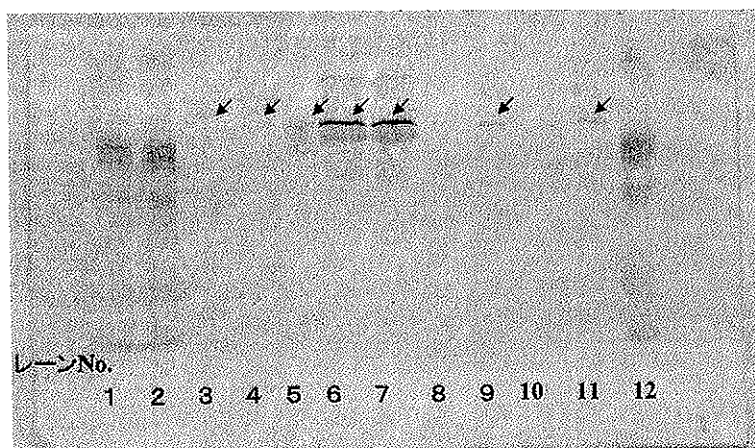
図 4 従来キット, 改良キットでの抽出法の違い

出法である。抽出法の違いについては図 4 に示した。従来キットでは、ミルサーを用いて抽出用試薬と検体をホモジナイズすることで抽出を行っていた。改良キットではこれを一晩の振とうによる抽出に変更している。これは、今回の検体であるさつま揚げのような練り製品などの頑健なマトリックスにも対応するためとされている³⁾。また、抽出用試薬は従来キットでは N 社、M 社で異なるものを使用していたが、改良キットでは共通な抽出用試薬を使用している。改良キットの抽出用試薬には元来の抽出液の成分に加え、SDS 及び 2-メルカプトエタノール (以下 2-ME) が加えられている。このことにより、抗原の変性による不溶化を抑え、抽出効率を改善している³⁾。

3・3 WB 法による確認検査

アレルギー食品検査法において、スクリーニング検査である ELISA 試験で陽性 (特定原材料として検体中に 10 µg/g 以上含まれる) となった場合、確認検査法として WB 法または PCR 法を行うこととなっており、卵に関しては WB 法で確認検査を行う。検査法の一部改正を示した通知²⁾では、改良された ELISA キットの追加を行っているにもかかわらず、WB 法を行う場合は M 社従来キットの抽出液を用いることとなっている。今回は、抽出用試薬の組成の異なる改良キット抽出液および N 社従来キットにおいて WB 法が適応できるかを確認した。

結果を図 5 に示した。結果では、M 社従来キット抽出液、及び改良キット抽出液では卵白アルブミンに由来するバンド (図 5 中の矢印) が確認され、N 社従来キット抽出液では卵白アルブミンに由来するバンドは検出されなかった。なお、WB 法は ELISA 法に比べ感度が劣る。にもかかわらず、ELISA 法で卵白アルブミンが検出されなかった M



レーンNo.
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

レーン1, 2, 12: レインボーマーカー レーン3: スタンダード0.5 $\mu\text{g/mL}$
 レーン4: スタンダード1 $\mu\text{g/mL}$ レーン5: スタンダード10 $\mu\text{g/mL}$
 レーン6, 7: 改良キット抽出液 レーン8, 10: N社従来キット抽出液
 レーン9, 11: M社従来キット抽出液

図5 WB (卵白アルブミンキット) での確認試験

表2 さつま揚げにおけるM社ELISAキット別卵タンパク量の測定結果

($\mu\text{g/g}$)

	改良キット 卵白アルブミン	従来キット 卵白アルブミン	従来キット オボムコイド
さつま揚げ	>20	<0.4	16.1

社従来キット抽出液においてWB法で卵白アルブミンが確認された要因としては、SDS-PAGEの前処理により卵白アルブミン認識抗体との反応性が変化したことが考えられる。今回検体としたさつま揚げのような検体では、卵白アルブミンと小麦タンパク質であるグリアジンが「S=S結合」する事が考えられる。このような状態では、卵白アルブミン認識抗体との反応性は失われる。その試料液をSDS-PAGEの前処理である2-MEと混合し煮沸を行うことで、「S=S結合」が切れて、抗体との反応性を復活させた可能性が考えられた。

一方、ELISAで卵タンパク質が検出されたN社従来キット抽出液で卵白アルブミンに由来するバンドが検出されなかった原因については、N社製ELISAキットの特性が関与していると考えられる。M社製ELISAキット(卵:卵白アルブミン)中の抗体は従来キット、改良キットともに、卵白アルブミンのみに反応する抗体であるのに対し、N社製ELISAキット(卵)中の抗体は、従来キット、改良キットともに卵白アルブミン以外の卵タンパク質にも反応する抗体となっている。卵中の主なタンパクとしては卵白アルブミンが挙げられ、卵全タンパク質のおよそ25%をしめる。しかし、前にも述べたが

今回のさつま揚げでは、卵白アルブミンが変性し抗体との反応性を失っていた可能性がある。このことによって、M社従来キットで陰性となり、卵白アルブミン以外のタンパク質にも反応しうる抗体を用いたN社従来キットでは陽性を示したと考えられる。一方、WB法では、卵白アルブミンのみを認識する抗体を用いているため、N社従来キット抽出液では陰性の結果になったと考える。またN社の抽出用試薬では卵白アルブミン-グリアジン結合体が抽出されにくいことも今回の結果の要因であると考えられる。

以上の結果や3・1で述べた「用いたキットの抗体反応性の差異から生ずる要因」を確認するために、卵中のタンパク成分のうち含有量は卵白アルブミンより微量であるが、卵白アルブミンよりも安定なタンパク質であるオボムコイドを対象にしてさらにELISA法によって検討を進めた。

3・4 オボムコイドキットを用いた検査結果

公定法では採用されていないが、M社ではオボムコイドのみを認識する抗体を用いたELISAキット(卵:オボムコイド)を市販している。このキットの抽出用試薬はM社従来キットと同様のものである(そのため、表記はM社従来キット(卵:オボムコイド)とする)。ELISA法を用いた結果を表2に示した。表2には比較のためこれまでの結果も合わせて記載した。この結果より、さつま揚げからはオボムコイドが検出された。オボムコイドは卵白アルブミンに比べ安定であるため、タンパク量は微量ながらも抽出され、抗体と反応することが可能であったと考えられ、N社従来キットで陽性となった要因が、このオボムコイドであった可能性が確認された。M社に問い合わせたところ、このように同社従来キットにおいて卵白アルブミンが検出されずにオボムコイドが検出されることは稀なケースであるとの事であった。

このようにたとえ陰性の結果であったとしても、タンパク質の種類によって結果が異なることも考えられるため、「卵」の検出については、その存在の有無について慎重な対応が必要であると考えられた。

5 ま と め

(1) さつま揚げように高度に加工された食品のアレルギー物質試験においては、使用するスクリーニング検査用のELISAキットは、改良キットのほうが望ましい。

(2) 通知法には記載されていないが、確認検査法の WB 法には、M 社従来キット抽出液以外でも使用できる可能性があった。今後検討を重ねることで、検出感度の高い改良キットで検査を行い、その抽出液を WB 法に直接用いることが可能と考えられる。

(3) オボムコイドは卵白アルブミンに比べ安定であるため、卵白アルブミンの変性による偽陰性が考えられるような場合はオボムコイドキットでの確認が有効である。

文 献

- 1) 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」平成14年11月6日、食発第1106001号(2002)
- 2) 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(一部改正)」平成17年10月11日、食安発第1011002号(2005)
- 3) WATANABE Yumiko, ABURATANI Keniti, MIZUMURA Tasuku, SAKAI Masatoshi, MURAOKA Shiroo, MAMEGOSI Shinichi, HONJOH Tsutomu: J. of Immun. Methods, 300, 115—123 (2005)
- 4) 豆越慎一: 日本食品衛生学会第84回学術大会要旨集, 107 (2002)