

山口県内を流通する食品中のアレルギー特定原材料検査事例について （平成16年度～平成18年度）

理化学部 食品・医薬品分析グループ

立野幸治，藤原美智子，津田元彦，三浦 泉

はじめに

近年，卵，乳，そば等を原材料とする食品でアレルギー一症状を発症する事例が発生していることから，この防止のため平成13年4月から加工食品の原材料として卵，乳，そば等を使用する場合，含有する旨の表示が食品衛生法に基づき義務付けられている。

この制度の確認のための検査法として厚生労働省は，いわゆる「公定法」として特定原材料（卵，乳，小麦，そば，落花生）に対しての検査法を通知^{1～3)}（以下，「通知法」という。）している。

本県では，平成16年度から食の安心・安全を確保する観点から県内を流通する加工食品等を対象に，「食品中のアレルギー物質実態調査」を実施している。

この調査は，各健康福祉センター食品衛生監視員が食品衛生法に基づき取去した食品について，関係健康福祉センター試験検査課でナノトラップーアレルギー検出キット（ロート製薬(株)製）による事前検査を実施する。この事前検査において陽性（疑陽性）となり，食品衛生監視員による製造所等の調査とあわせ，食品衛生法違反（表示義務）のおそれがあるものについて，当センターにおいて通知法に基づく検査を実施するものである。

平成16年度から平成18年度に各健康福祉センターから当センターに搬入された54検体の市販食品における通知法による検査結果をとりまとめたのでその状況を報告する。

検査実施方法

1. 試薬等

通知法に基づき以下の試薬を用いて，スクリーニング検査，確認検査を行った。

スクリーニング検査として位置付けられている食品中の特定原材料由来のタンパク質検出法であるELISAキットには，日本ハム(株)製 FASTKITエライザシリーズ(卵，牛乳，小麦，そば)及びFASTKITエライザVer. IIシリーズ(卵，牛乳，小麦，そば)，(株)森永生科学研究所製モリナガ特定原材料測定キット(卵白アルブミン，カゼイン，小麦グリアジン，そば)及びモリナガFASPEK特定原材料測定キット(卵白アルブミン，カゼイン，小麦グリアジン，そば)を使用した。

卵，乳の確認試験として位置付けられているウェスタンブロット法には，(株)森永生科学研究所社製モリナガ卵ウエスタンブロットキット（卵白アルブミン及びオボムコイド），同モリナガ牛乳キット（カゼイン及びβ-ラクトグロブリン）を使用した。ローディング緩衝液には，Laemmli SampleBuffer，2-mercaptoethanol (BIO-RAD 社製)を，ポリアクリルアミドゲルには，SDS-PAGE mini 15% 1.0 mm x 12well (TEFCO 社製)を，泳動用緩衝液には10 × Tris/glycine/SDS (BIO-RAD 社製)を蒸留水で10倍希釈したものをを用いた。タンパク質分子量マーカーには，Kaleidoscope Prestained Standards (BIO-RAD 社製)を，転写膜にはHybond-P(アマシャムバイオサイエンス社製)を，濾紙にはExtra Thick Filter Paper (BIO-RAD 社製)を，プロットングバッファー用には，10 × Tris/glycine (BIO-RAD 社製)，メタノール（和光純薬工業(株)製特級）を，ブロッキング溶液には，ウシ由来血清アルブミン (SIGMA社製)，Tween-20 (BIO-RAD 社製)，Tris-Buffered Saline (TBS) (BIO-RAD 社製)を，二次抗体溶液用には，VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit (VECTOR 社製)を，アルカリフォスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液用には，VECTASTAIN ABC-AP Standard Kit (VECTOR 社製)を，検出試薬にはAlkaline Phosphatase Substrate Kit IV<BCIP/NBT> (VECTOR社製)を用いた。

そば，小麦の確認試験である定性PCR法においては，DNA抽出用に，QIAGEN DNeasy Plant Mini (櫛キアゲン製)及びCTAB法用試薬では0.5 mM EDTA (pH 8.0)，1 M Tris / 塩酸 (pH 8.0)，フェノール・クロロホルム混合液は，ナカライテスク(櫛製)を，セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) はSIGMA(櫛製)を，NaClは関東化学(株)製特級を，クロロホルム，イソアミルアルコールは和光純薬工業(株)製特級を用い，水は超純水を使用した。

Taq DNA ポリメラーゼには，AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (アプライドバイオシステムズ(櫛製)を，PCR緩衝液にはPCR buffer II (アプライドバイオシステムズ(櫛製)を，分子量マーカーは100bpDNALadder (タカラバイオ(株)製)を，アガロースはAgarose for ≥ 1 Kbp Fragment (ナカライテスク(櫛製)を，PCRプライマーキット

にはオリエンタル酵母工業㈱製アレルギーチェッカー（そば、小麦）を用いた。

2. 機器及び測定条件

検体の均一化には、グラインドミックスGM200 (Retsch製) を、ホモジナイザーは、ラボミルサーLM-2 (大阪ケミカル社製) を用い、マイクロ冷却遠心機は(株)久保田製作所製3740を用いた。

ELISA測定には、マイクロプレートリーダーパイオラッド㈱製モデル680 (主波長450nm, 副波長620nm) を用い、3ウェル併行測定し、マイクロプレートマネージャー5.2PCデータ解析ソフトウェアを用い、4係数logistic解析を行った。マイクロプレートウォシャーは、トワラボ(株)製ATLNTISを用いた。

ウェスタンブロット法では、電気泳動装置はセイフテーターセルミニSTC-808 (TEFCO社製) を、転写装置はトランスブロットSDセル (BIO-RAD社製) を、電源装置はPowerPac C (BIO-RAD社製) を用いた。

定性PCR法では、PCR増幅装置はGeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社製) を、泳動装置はGelMate2000 (東洋紡績(株)製) Mupid-S((株)アドバンスバイオ製) を、分光光度計は日本分光(株)V-550を用いた。

3. ELISA法、ウェスタンブロット法、定性PCR法測定方法

各測定は、通知法記載の測定方法に準じ実施した。

ELISA法では、均一化した検査食品を同時2併行で抽出し、測定に供しその平均値を分析値とした。なお測定結果において、3ウェル間のCV値が20%以上となった事例はなかった。

定性PCR法では、加工度合いの高い検査食品であることが予想されたためDNA抽出は、原則としてCTAB法で行うこととした。

確認検査法であるウェスタンブロット法、定性PCR法は、原則としていずれかのELISA法測定キットで10ppm以上測定されたものについて実施することとしていたが、行政要望等により随時実施した。

検査結果

表1. 検査結果一覧に、平成16年4月から平成19年3月までの3年間に実施した54件の検査結果及び検査結果報告後の健康福祉センターでの調査結果による原因と推定された理由を示した。

そばを検査特定原材料として持ち込まれたものは23件あり、ELISA法による測定結果はほとんどが1ppm以下であった。19件がそばを同一工場内で製造しているめん類製造工場の製品であるめん類であり、いずれも器具類の

洗浄不足等によるコンタミネーションと判断された。油菓子(小魚せんべい)については、検査結果及び厚生労働省通知及びELISA法測定キット製造メーカー等が提供している偽陽性情報等から偽陽性と判定した。菓子(ビスケット)については、通知法測定結果等からナノトラップ-アレルギー検出キットの偽陽性(疑い)と判定した。

小麦を検査特定原材料として持ち込まれたものは4件あり、小麦タンパク質抽出物等を添加物として使用しているにもかかわらず表示していなかったもの3件、同一工場内で小麦を使用した菓子類を製造していることに伴うコンタミネーションと判断されたものが1件であった。

乳を検査特定原材料として持ち込まれたものは10件あり、8件が同一工場内で乳、乳製品を使用した食品を製造している工場での器具等の洗浄不足等によるコンタミネーションであった。使用した食品添加物にカゼインが含まれていたものが1件であった。通知法の検査結果等によりナノトラップ-アレルギー検出キットの偽陽性(疑い)と考えられたのは、菓子(ポテトチップス)の1件であった。

卵を検査特定原材料として持ち込まれたものは17件あり、卵白を使用しない魚肉練り製品と表示しているものに間違えて卵白を使用したものが2件、同一工場内で卵を使用した製品を製造しておりコンタミネーションと判定されたものが9件であった。また、原料魚に「イトヨリダイ」を使用し、ELISA法では、偽陽性と判定されたものが4件あったが、うち2件においてはウェスタンブロット法で卵白アルブミン及びオボムコイドが検出され、その後の調査で使用が確認された。他の2件ではウェスタンブロット法で卵白アルブミン及びオボムコイドが検出されず、その後の調査においても使用は確認されなかった。杏仁フルーツについては通知法に基づく検査結果等からナノトラップ-アレルギー検出キットの偽陽性(疑い)と判定した。

なお、イトヨリダイについては、FASTKITエライザVer. IIシリーズではメーカーの偽陽性情報があったが、モリナガFASPEK特定原材料測定キットでは確認できなかったため、当センターでイトヨリダイを購入し、3枚におろし、片身の皮を除き、フードカッターですり身にした後(188g)、これに塩3.4g、砂糖5.6gをまぜ再度フードカッターで混ぜたもの(生イトヨリ)、これをラップに包み10分程度ゆでたもの(加熱イトヨリ)及びイトヨリダイすり身を原料とした蒸し蒲鉾、野菜天についてELISA測定キット2種類及びナノトラップ-アレルギー検出キット(卵)、日本ハム(株)製FASTKIT仏ノコマト(卵)の2種類の簡易測定キ

ットを使用し、偽陽性確認試験を実施した。

表 1. 検査結果一覧

No	検査食品名	検査特定 原材料	M社製ELISAキット結果 (μg/g) 注1)	N社製ELISAキット結果 (μg/g) 注2)	PCR又はウェスタンブロット結果 注3)	原因等	備考
1	生ラーメン	そば	2.23	1.80	DNA(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
2	生うどん	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
3	生チャンボン	そば	N.D.	N.D.	DNA(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
4	生ラーメン	そば	N.D.	N.D.	DNA(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
5	生ラーメン	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
6	乾麺	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
7	乾麺	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
8	乾麺	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
9	乾麺	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
10	乾麺	そば	N.D.	1.01	DNA(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
11	生ラーメン	そば	2.30	1.25	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
12	うどん	そば	1.59	1.52	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
13	ラーメン	そば	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
14	ちゃんめん	そば	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
15	生中華	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
16	ゆでうどん	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
17	中華生めん	そば	N.D.	N.D.	DNA(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
18	油菓子(小魚せんべい)	そば	2.96	N.D.	DNA(-)		偽陽性
19	菓子(ビスケット)	そば	N.D.	N.D.			偽陽性(フタラップ) 疑い
20	ドレッシング	そば	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
21	米粉ミックス	そば	N.D.	N.D.	-	同一工場内でそば粉を小分け	
22	めん類	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
23	うどん	そば	N.D.	N.D.	DNA(-)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
24	菓子(みかん最中)	小麦	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
25	魚肉練り製品(蒸し蒲鉾)	小麦	25.6	16.5	-	原材料の確認ミス(小麦デンプンを使用)	
26	魚肉練り製品	小麦	20以上	20以上	DNA(+)	原材料の確認ミス(小麦タンパク抽出物を使用)	
27	魚肉練り製品	小麦	20以上	20以上	DNA(+)	原材料の確認ミス(小麦タンパク抽出物を使用)	
28	清涼飲料水(アイスヒー)	乳	2.04	1.32	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
29	ゆでうどん	乳	1.55	2.05	-	原材料の確認ミス(使用した乳化剤の成分にカゼイン)	
30	菓子(みかん最中)	乳	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
31	菓子(みかん最中)	乳	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
32	菓子(みかん最中)	乳	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
33	メロンパン	乳	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
34	菓子(ポテトチップ)	乳	N.D.	N.D.	-		偽陽性(フタラップ) 疑い
35	ドレッシング	乳	N.D.	N.D.	-	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
36	米粉ミックス	乳	N.D.	N.D.	-	小分け施設内で、粉乳等を使用した菓子を製造していることによるコンタミネーション	
37	菓子(やぶれまんじゅう)	乳	3.54	2.54	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
38	魚肉練り製品	卵	25.60	20.00	ウエスタン(+)	卵白を使用しない製品に卵白を使用	
39	魚肉練り製品	卵	4.57	1.70	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
40	生うどん	卵	N.D.	N.D.	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
41	生チャンボン	卵	N.D.	N.D.	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
42	魚肉練り製品	卵	N.D.	N.D.	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
43	生中華	卵	25.6	20以上	ウエスタン(+)	原材料の確認ミス(卵白を使用)	
44	ゆで中華	卵	N.D.	N.D.	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
45	杏仁フルーツ	卵	N.D.	N.D.	ウエスタン(-)		偽陽性(フタラップ) 疑い
46	かく天	卵	N.D.	1.49	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
47	丸天	卵	N.D.	1.47	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
48	魚肉練り製品(蒸し蒲鉾)	卵	25.6	20	-	卵白を使用しない製品に卵白を使用	
49	魚肉練り製品	卵	判定不能	判定不能	ウエスタン(-)		イトヨリダイによる偽陽性
50	魚肉練り製品	卵	判定不能	判定不能	ウエスタン(-)		イトヨリダイによる偽陽性
51	魚肉練り製品	卵	判定不能	判定不能	ウエスタン(+)	ELISA法では偽陽性反応のため判定不能であったがウエスタンブロット法で卵白アルブミン、林'ムコイト'を検出し調査の結果、使用を確認	イトヨリダイによる偽陽性
52	魚肉練り製品	卵	判定不能	判定不能	ウエスタン(+)	ELISA法では偽陽性反応のため判定不能であったがウエスタンブロット法で卵白アルブミン、林'ムコイト'を検出し調査の結果、使用を確認	イトヨリダイによる偽陽性
53	そば	卵	4.49	9.23	ウエスタン(+)	器具等の洗浄不足によるコンタミネーション	
54	うどん	卵	N.D.	N.D.	-	同一工場内で卵を使用した製品を製造	

注1) N社製ELISAキット：(株)森永生科学研究所 モリナガ特定原材料測定キット(卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば)、モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット(卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば) N.D. 1ppm未満

注2) M社製ELISAキット：日本ハム(株)FASTKITエライザシリーズ(卵、牛乳、小麦、そば)、FASTKITエライザVer. IIシリーズ(卵、牛乳、小麦、そば) N.D. 1ppm未満

注3) : DNA(+): 検査対象のそば、小麦のDNAを検出。DNA(-): 検査対象のそば、小麦のDNAを不検出。ウエスタン(+): 検査対象のカゼイン、β-ラクトグロブリン、卵白アルブミン、オボムコイドの明確なバンドを確認。ウエスタン(-): 検査対象のタンパク質不検出。-: 検査未実施

この結果を表2に示した。

抽出効率の差もあると考えられるが、生イトヨリ、加熱イトヨリでは簡易測定キットで陽性となったのは生イトヨリに対するナノトラップだけであった。検査食品である蒸し蒲鉾、野菜天では、ナノトラップ(卵)はいずれも陽性（偽陽性）であったが、FASTKITイムノクロマト(卵)では、蒸し蒲鉾は陰性、野菜天は陽性となった。ELISA法の両キットでは、他の原材料の影響等も考えられるが、生イトヨリ、加熱イトヨリでは、2ppm以下の測定値を示したのに対し、検査食品である蒸し蒲鉾、野菜天においては400倍希釈の抽出液について、吸光度が検量線の範囲を超えて高い値を示した。

表2 偽陽性確認試験結果

	生イトヨリ	加熱イトヨリ	蒸し蒲鉾	野菜天
日本FASTKITエラテ [®] Ver. II (卵)	0.3 µg/g	0.6 µg/g	20 µg/g以上	20 µg/g以上
モリカ [®] FASPEK特定原材料測定キット(卵白アルブミン)	1.8 µg/g	2.1 µg/g	20 µg/g以上	20 µg/g以上
ナノトラップ(卵)	陽性	陰性	陽性*	陽性
FASTKITイムノクロマト(卵)	陰性	陰性	陰性	陽性

陽性：明確な赤線

陽性*：不明瞭な赤線

考察

通知法の序文にあるように当該検査方法は、特に重篤なアレルギー症状を示すとされる特定原材料5品目の表示制度を科学的に検証する目的で、現時点でもっとも信頼性が高いと考えられる検査手法により構成されたものである。

しかし、様々な食品が検査対象であり、常に偽陽性、偽陰性反応のおそれが存在している。イトヨリダイを原料とする魚肉練り製品の事例では、偽陽性情報よりもはるかに強い卵タンパク質の偽陽性反応が二種類のELISAキットで認められた。従って確認検査であるウェスタンブロット法、定性PCR法の実施は重要であり、偽陽性情報の蓄積及びすみやかな公開が必要と考えられた。

めん類、菓子、清涼飲料水、魚肉練り製品などの製造工場においては多種多様な食品を製造しており、数µg/mL濃度レベル又は数µg/g含有レベル程度の特定制材料のコンタミネーションを起こす可能性があることが推定され、注意喚起表示実施の指導が必要と考えられる。

しかし、この対応では、アレルギー体質者の摂食できる食品の幅を狭めることとなる可能性があり、器具等の

洗浄の徹底、製造工程の見直し等の指導によりコンタミネーションを防ぐことも必要と考えられる。

検査対象食品となった事例のうち、製造者の原材料確認ミス等によりアレルギー物質の表示の欠落があった事例は8件であったが、このような事例は続発しており健康福祉センター食品衛生監視員による製造業者への科学的根拠に基づく指導のためにも継続して調査を行うことが必要と考えられた。

(この調査報告は、平成16年度・平成17年度・平成18年度生活衛生課「食品中のアレルギー物質実態調査」の一環として実施したものをとりまとめたものである。)

文献

- 1) 厚生労働書医薬局食品保健部長通知、アレルギー物質を含む食品の検査法について、平成14年11月16日、食発第110601号(2002)
- 2) 厚生労働書医薬局食品保健部長通知、アレルギー物質を含む食品の検査法について、平成17年10月11日、食安発第1011002号(2005)
- 3) 厚生労働書医薬局食品保健部長通知、アレルギー物質を含む食品の検査法について、平成18年6月22日、食安発第622003号(2006)