

アレルギー物質を含む食品の検査方法

Testing method for Foods containing Allergic Substances

株式会社森永生科学研究所 営業部 齋藤 恵理子

ERIKO SAITO

Sales Division, Morinaga Institute of Biological Science, Inc.

1. はじめに

近年食物アレルギー体質を持つ人は増加の一途を辿っており、アレルギー症状を引き起こす物質(以下、アレルギー物質)を含む食品による健康危害が問題視されている。食物アレルギー体質を持つ人にとって健康危害を回避するために何よりも重要なことは、原因となる食物を摂取しないことである。そこで、市販食品を容易に選択できるよう、食品衛生法によりアレルギー物質を含む食品の表示制度が導入された。

平成13年3月21日厚生労働省省令第23号「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令」により、症例数及び重篤度を基にして食品素材5品目(卵、乳、小麦、そば、落花生)が、特定原材料として表示を義務付けられた。この制度施行における表示の検証を行うため、特定原材料の検査方法が開発され、平成14年11月に厚生労働省医薬局食品保険部長通知食発第1106001号「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(以下、通知)により、スクリーニング検査としてエライザ法、確認検査としてウエスタンブロット法とPCR法を用いることが定められた。また本通知により、食品1gあたりの特定原材料由来タンパク質含量が $10\mu\text{g}$ を超える試料は、陽性と判断して指導されることとなった。また、この他に健康被害が見られた19品目が特定原材料に準ずるものとして定められ、可能な限り表示するよう努めることとされた。本表示制度は適宜見直しが行われており、平成16年に「バナナ」が特定原材料に準ずるものとして、また平成20年に「えび」および「かに」が特定原材料として表示を義務

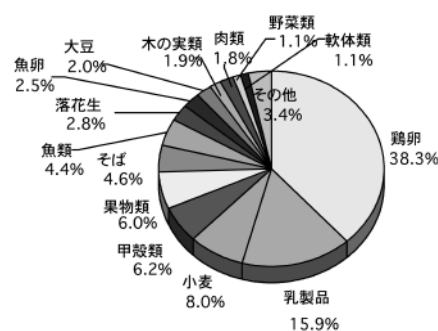
付けられた(なお、えび、かには平成22年6月3日までの猶予期間が有る)。

本稿では、特定原材料の表示制度、特定原材料を含む食品検査の概要と開発について述べる。

2. 特定原材料の表示制度

食物アレルギー体質を持つ人は、アレルギー物質を含む食品を微量摂取するだけでアレルギー症状を呈する場合がある。こうした食品による健康被害の防止を目的として、平成13年に「食品衛生法施行規則」及び「乳及び乳製品の成分規格等に関する厚生労働省令」の一部が改正され、平成14年4月から表示制度が完全実施されている。食物アレルギー体質を持つ人はアレルギー物質に関する情報提示を通じて、避けなければならない食品素材を含むのかどうかを判断することで、食品を選択できるようになった。

日本国内の全年齢における食物アレルギーの原因食物を図1に示す。原因食物は、鶏卵(卵)、乳製品(乳)、



平成14年厚生労働科学研究報告書より

図1 全年齢におけるアレルギー原因食物

小麦の順に多く、この3品目で全体の約60%を占めており、次いで甲殻類(えび、かに)、果物、そばと続いている。この中で発症数の多い卵、乳、小麦、えび、かにと、重篤度の高いそば、落花生が特定原材料として定められ、食品中に含まれる特定原材料由来タンパク質が $10\mu\text{g/g}$ を超える場合に表示が義務づけられる。一方、果物などは特定原材料に準ずるものとして可能な限り表示するよう努めることとされている(表1)。

表1 特定原材料と特定原材料に準ずるもの

分類(規定)	名称	理由
特定原材料 (省令)	卵、乳、小麦、えび、かに	症例数が多いもの
	そば、落花生	症状が重篤であり生命に関わるため、特に留意が必要なもの
特定原材料に 準ずるもの (通知)	あわび、いか、いくら、オレンジ、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご	症例数が少なく、省令で定めるには今後の調査を必要とするもの
	ゼラチン	牛肉・豚肉由来であることが多く、これらは特定原材料に準ずるものであるため、既に牛肉、豚肉としての表示が必要であるが、パブリックコメントにおいて「ゼラチン」としての単独の表示を行うことへの要望が多く、専門家からの指摘も多いため、独立の項目を立てることとする

アレルギー物質を含む食品の表示は、容器包装された加工食品および添加物で、流通過程のものにも義務づけられている。一方で、①食品の容器・包装ではなく運搬容器と見なされる場合、②対面販売や量り売りなど注文を受けたその場で飲食料品を製造、もしくは加工し、一般消費者に直接販売する場合、③容器包装の面積が30平方センチメートル以下の場合、は表示が省略できる。

3. アレルギー物質を含む食品の検査方法

食品中に含まれる特定原材料タンパク質を科学的に検証する方法として、免疫測定法やPCR法が開発され^{1,2)}、行政機関が行う検査法を統一するため、通知によってスクリーニング検査(エライザ法)と確認検査(ウエスタンブロット法とPCR法)が指定されている(表2)。行政機関では通知に則って検査をし、通知別添の判断樹に従い表示の確認を行い、必要ならば食品メーカーの指導を行う。一方、食品メーカーでは、これらの検査法に加えてイムノクロマト法を使用してアレルギー物質の検査を行っている。

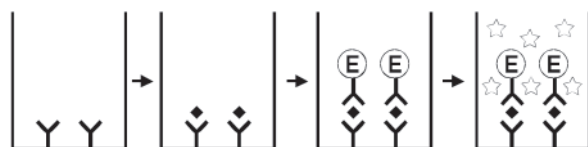
以下、各検査方法について述べる。

表2 ガイドラインに準拠している特定原材料の検査法

検査方法	製造元	キット名
スクリーニング検査 (エライザ法)	株式会社 森永生化学研究所	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、落花生)
	日本ハム㈱	FASTKITエライザVer. II シリーズ(卵、乳、小麦、そば、落花生)
	日水製薬㈱	FAテスト EIA-甲殻類「ニッスイ」
	㈱マルハニチロ食品	甲殻類キット「マルハ」
確認検査	ウエスタンブロット法	森永生化学研究所 モリナガFASPEK特定原材料ウエスタンブロットキット (卵白アルブミン、オボムコイド、カゼイン、β-ラクトグロブリン)
	PCR法	オリエンタル酵母工業㈱ アレルギーチェッカー(小麦、そば、落花生)
		㈱ファスマック えび検出用プライマー、かに検出用プライマー

3.1 スクリーニング検査

スクリーニング検査は定量法を用いて行うこととされており、エライザ法が通知に記載されている。また通知では、検査特性の異なる2種のエライザ法を用いて検査を行うことが記載されている。エライザ法とは、検体中に含まれる微量の目的物質を、抗体と、酵素標識抗体または酵素標識抗原を用いて検出する免疫測定法である。エライザ法の一例を図2に示す。エライザ法は、①抗原を高感度で検出することができ、定量性に優れている、②抗原抗体反応の高い特異性により、目的物質の精製や前処理を省略し粗抽出物で測定できる、③短時間で多数の検体を測定できる、などのメリットがある。通知に従うと、いずれかのエライザ法において食品1g中の特定原材料由来タンパク質含量が $10\mu\text{g}$ を超える場合、通知別添の判断樹で陽性と判定され、特定原材料の表示が必要となる。



◆ 卵白アルブミン

Y 抗卵白アルブミン抗体



酵素標識抗卵白アルブミン抗体

☆ 酵素反応産物

図2 2ステップ・サンドイッチ・エライザ法の原理(例:卵)

通知が公布された平成14年当初の測定法³⁾では加工食品の測定において測定対象タンパク質の回収率が低く、偽陰性となる場合があった。これは、①食品加工の過程における加熱、加圧等の処理に伴い、測定対象タンパク質が変性不溶化し、抽出率が低下する^{4,5,6)}、②加工に伴う変性により測定対象タンパク質の構造が変化し、抗体との反応性が低下する、という2つの原因によるもの

のであり、より真の含有量に近い測定値を得るための改良が必要だった。

この改良のため、まず抽出液の改良による食品中のタンパク質の高回収率化を目指した。一般に不溶化したタンパク質を溶解させるには、尿素、グアニジン、界面活性剤などの可溶化剤が高濃度で用いられる。しかし、これらの可溶化剤をそのままエライザ法に適用した場合、抗原抗体反応が阻害されるため測定前に希釈する必要があるが、尿素、グアニジンによって一度可溶化したタンパク質は希釈により再度不溶化することが多く、不適であった。一方、強力な界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は希釈しても可溶化したタンパク質は不溶化せず、エライザ測定に応用できた。また、小麦グルテンや卵白アルブミンのようにSH基を持つタンパク質は、加工中にS-S結合で重合不溶化する場合があることから、S-S結合を開裂し可溶化を促進させるため、SH還元剤である2-メルカプトエタノール(2-ME)を用いることとし、SDS/2-MEを含む抽出液を開発した。

SDS/2-ME抽出液を用いてタンパク質を抽出した場合、食品中の未変性タンパク質、変性タンパク質いずれも抽出液成分により変性するため、未変性抗原を免疫して作製した抗体では反応性が低く、高感度な測定系を構築することが困難だった。これを解決するために、SDS/2-MEで変性させたタンパク質を免疫し、反応系に適した抗体を用いることで、測定系の構築に成功した^{7,8)}。回収率を大幅に改善したエライザ法は、厚生労働省の平成17年11月10日付の改正通知(食安発第1011002号)に記載された。

通知に準拠しているエライザ法は、卵・乳・小麦・そば落花生測定においては、(株)森永生科学研究所製モリナガFASPEK特定原材料測定キット、及び日本ハム(株)製FASTKITエライザVer.Ⅱシリーズ、えび・かにでは(株)マルハニチロ食品製甲殻類キット「マルハ」及び日水製薬(株)製FAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」がある。

3.2 確認検査(ウエスタンブロット法、PCR法)

行政機関では、通知別添の判断樹に従い、特定原材料の表示がなく、スクリーニング検査で陽性、製造記録で特定原材料使用の記載がない場合には、確認検査を実施することとなっている。確認検査は定性検査を用いて行うこととされており、ウエスタンブロット法、PCR法が通知に記載されている。卵、乳についてはウエスタンブロット法が用いられ、小麦、落花生、そば、えび、かにについては

PCR法が用いられる。ウエスタンブロット法は(株)森永生科学研究所製モリナガウエスタンブロットキットが、PCR法はオリエンタル酵母工業(株)製アレルゲンチェッカー(小麦、らっかせい、そば)、(株)ファスマック製えび、かに検出用プライマーが通知に記載されている。なお、ウエスタンブロット法については抽出液が平成14年当初の組成であり、加工食品の抽出が十分ではない場合があるため、偽陰性が生じる可能性があった。これを改良し、抽出液をエライザ法と一致させたウエスタンブロットキットが開発され、平成21年7月、(株)森永生科学研究所製モリナガFASPEK特定原材料ウエスタンブロットキットがガイドラインに準拠するものとして通知された(食安発第0724第1号)。

3.3 イムノクロマト法

特定原材料の自主検査の一例としてイムノクロマト法が挙げられる。イムノクロマト法はインフルエンザの診断や妊娠検査薬に用いられ、簡便かつ迅速に使用できるため、工場での製造ライン洗浄前後の確認検査やエライザ法に供すべき検体のスクリーニング検査に用いられている。

イムノクロマト法はサンプル溶液を供与した後、判定部のラインの有無を確認することで陽性・陰性を判断する定性試験法である。このラインは、毛細管現象により検体がメンブレン上を移動し、検体中の抗原と着色粒子(金コロイドや着色ラテックス標識が一般的)標識抗体および補足抗体の3者により抗原抗体反応複合体が形成されることで出現する。原理を図3に示す。テストスティックの滴下部に測定溶液を滴下すると、着色粒子標識抗体が溶解すると共に測定溶液中に存在する特定原材料由来タンパク質と結合し、複合体を形成する。この複合体は、毛細管現象により移動し、テストスティック中央の判定部に固定化された抗体に補足されて、赤紫色のラインとなって判定

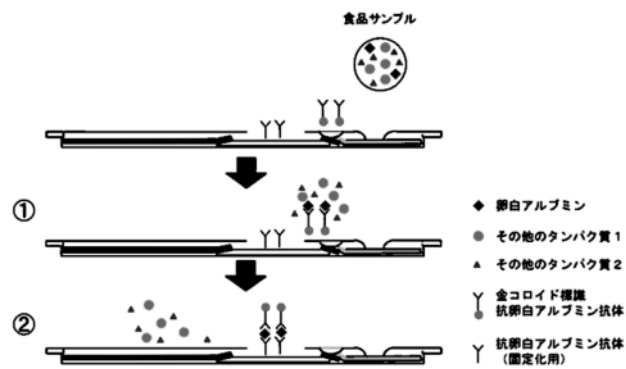


図3 イムノクロマト法の原理(例:卵)

部に現れる。測定溶液中に特定原材料由来タンパク質が存在しない場合は、判定部にラインは現れない。

4. 改良抽出液を用いた測定系の開発

平成20年7月1日にエライザ法で使用している還元剤の2-MEが医薬用外毒物に指定されたため、使用現場での毒物取扱や管理、廃液処理の問題などが生じた。また、2-MEは臭気が強く、以前より食品工場内での使用に抵抗感が出ていた。これらの問題の回避を目的として、我々は新しい抽出液の開発を行った。

新抽出液の開発にあたり、

- ①通知準拠のエライザ法で用いられている抽出液と同等レベルの性能を有する
 - ②使用者にとって安全で使いやすい
 - ③環境負荷が少ない
- という3点を解決することを目標とした。

4.1 新しい還元剤を含む抽出液の開発

SDSは、洗剤や歯磨き粉に使用されており毒劇物にも指定されていないことから環境負荷が少ないと考え、この使用を前提とし、医薬用外毒物である2-MEに代わる還元剤の探索を行うこととした。SDS/2-ME抽出液と同等の効率を有する抽出液を検討するため、各特定原材料タンパク質10 μ g/gを含むモデル加工食品をSDSと各種還元剤を含む抽出液で抽出し、(株)森永科学研究所製モリナガFASPEK特定原材料測定キットを用いて回収率を測定した結果、亜硫酸ナトリウムを用いた場合、2-MEを含む抽出液と同等の抽出効率が得られることが示された。次に、SDS、亜硫酸ナトリウムの至濃度を検討したところ、SDS 0.6%、亜硫酸ナトリウム 100mMが最適濃度であることが明らかとなった⁹⁾。

亜硫酸ナトリウムと2-MEの法規制・安全性の比較を表3に示す。亜硫酸ナトリウムは食品添加物としても利用され

表3 亜硫酸ナトリウムと2-MEの比較

	2-ME	亜硫酸ナトリウム
適用法令		
消防法	危険物第4類 第2石油類 危険等級3	非該当
毒物及び劇物取締法	毒物 包装等級2	非該当
労働安全衛生法	非該当	非該当
船舶安全法	毒物類	非該当
航空法	毒物	非該当
その他		
国連分類	クラス6.1(毒物)	非該当
急性毒性 経口 ラット	LD50:244mg/kg	LD50:3560mg/kg

ており、このようにして開発された亜硫酸ナトリウムを用いた抽出液は特定原材料測定キットの使い勝手を飛躍的に高めるものとして期待される。

4.2 SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いた短時間エライザ法の開発

通知に準拠しているエライザ法は、検査結果を得るまで足かけ2日間を要するため、検査時間の短縮が望まれている。この2日間とは、①12時間以上のサンプル抽出液調製時間と、②2時間程度のエライザ操作時間より成る。検査時間の大幅な短縮化には抽出液調製の時間短縮が不可欠と考え、抽出液調製の短時間化に開発の焦点をあてた(以下短時間抽出法と略)。短時間抽出法は図4に示すように、12時間以上の往復浸とうによる抽出作業を①ボルテックスミキサーで30秒間攪拌し検体を均質に分散後、②100℃の湯浴で10分間加熱する方法を行った。通知準拠の方法と、SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いた短時間抽出法を用いて特定原材料タンパク質10 μ g/gを含むモデル加工食品の回収率を比較した結果を図5に示す。SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いた短時間抽出法は、通知準拠の方法と同等の抽出効率が達成され、短時間抽出法が適応可能なことが示された⁹⁾。

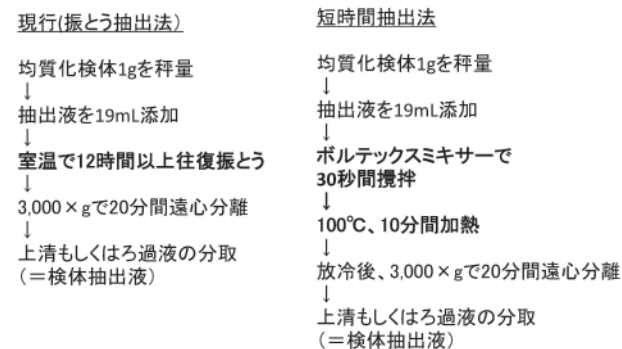


図4 抽出法の比較

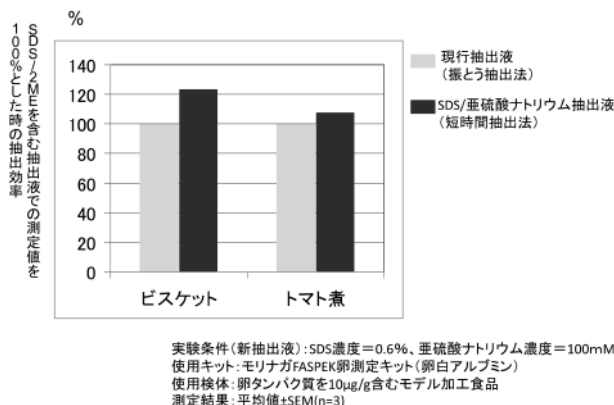


図5 SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液による短時間抽出法の検討

4.3 SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いたイムノクロマト法の開発

我々の現行のイムノクロマトキットは、改良前のエライザ法と同じ抽出液を使用しているため回収率が低く、偽陰性判定となる場合があった。また、SDS/2-ME抽出液は金コロイドを用いたイムノクロマトに適用すると、偽陽性反応を示すため応用することはできなかった。この偽陽性反応回避を目標として、先ほど述べた通知準拠と同等の結果を得られるSDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を検討した。

まず、SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液により偽陽性反応が示されるかどうか検討したところ、判定部にラインの出現は確認されず、使用可能と判断された。

次に、市販食品3種類について、現行のイムノクロマト法とSDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いた新イムノクロマト法、通知準拠のエライザ法を用い小麦タンパク質を測定した結果を図6に示す。現行のイムノクロマト法では小麦を含む食品であるにもかかわらず偽陰性と判定されたが、SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いた新イムノクロマト法では偽陰性はなく、さらに通知準拠のエライザ法による測定値とも良い相関を得ることができた¹⁰⁾。

食品名	現行イムノクロマト法	新イムノクロマト法	通知準拠エライザ法
プリン	陰性	陰性	<0.31 µg/g
レトルトソース	陰性	陽性	8.0 µg/g
固形スープ	陰性	陽性	>20 µg/g

図6 SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いた新イムノクロマト法の検討

現行のイムノクロマト法は、原材料や未加工食品の製造ラインの洗浄確認等に用いられているが、この度我々が開発したSDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を用いる新イムノクロマト法は、今まで測定が困難だった以下の工程でも用いられると考える。

- ①加工された中間製品、最終製品中の特定原材料の確認
- ②加工食品製造ラインの洗浄確認

SDS/亜硫酸ナトリウム抽出液を広く用いることで、未加工原材料から高度に加工された最終製品まで応用可能なイムノクロマト法が開発されたこととなり、工程管理が容易となり、最終製品への特定原材料混入のリスクを大幅に減らすことが可能になると考える。

5. まとめ

アレルギー物質を含む食品の検査は、抽出液の改良や使用する抗体の調製法の改良により偽陰性反応が減少し、検査精度が大幅に向上した。このことにより、特定原材料管理のレベルが向上し、食物アレルギー体質を持つ人へ、より正確な情報を提供することが可能となった。

一方で、食品メーカーでは、入手可能なデータを基にしていかに食品中の特定原材料を管理していくかが重要となる。そのためには最終製品での特定原材料タンパク質の含量確認はもちろんのこと、原材料や中間製品での混入、ライン切り替え時の汚染など全工程で発生するリスクの改善が必要である。各検査法を活用し、効率のよい工程管理の手法を構築することが、安定な製造、さらには企業価値の向上につながると考える。

引用文献

- 1) Fergus M. Clydesdale *et al.*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**(3), 197-229, (1992)
- 2) R. E. Poms *et al.*, *Food Additives and Contaminants*, **21**(1), 1-31, (2004)
- 3) 本庄勉:食品工業, **45**(14), (2002)
- 4) Carmen D. Westphal *et al.*, *Journal of AOAC International*, **87**(6):1458-1465, (2004)
- 5) Roland E. Poms *et al.*, *Mol. Nutr. Food. Res.*, **48**, 459-464, (2004)
- 6) Christiane K. Faeste *et al.*, *Journal of AOAC International*, **90**(2), 427-436, (2007)
- 7) Y. Watanabe *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, **300**, 115-123, (2005)
- 8) 油谷賢一 他:アレルギーの臨床, **26** (6), 72-77, (2006)
- 9) 伊東花織 他:第97回日本食品衛生学会学術講演会, (2009)
- 10) 鶴間理恵子 他:第15回日本食品化学学会総会・学術大会, (2009)