

20010875

**平成 13 年度厚生科学研究費補助金**

**(生活安全総合研究事業)**

**食品表示が与える社会的影響とその対策  
及び国際比較に関する研究**

**研究報告書**

**平成 14 年 3 月**

**主任研究者 丸井 英二**

**(順天堂大学医学部公衆衛生学教室)**



食品表示が与える社会的影響とその対策及び  
国際比較に関する研究

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究

主任研究者 丸井 英二 順天堂大学医学部公衆衛生学教室 教授

分担研究者 堀口 逸子 順天堂大学医学部公衆衛生学教室 助手

研究要旨

平成 13 年 3 月の食品衛生法改正に伴いアレルギー表示の義務化がなされた。本研究では食品表示を製造業者や販売業者と消費者とのコミュニケーションのメディアと捉え、現在の表示の問題点を抽出・分析し、その改善策について検討した。検討には、製造業者や販売業者と消費者（食物アレルギー患者）からなる「アレルギー表示検討会」を設置した。その結果、アレルギー表示における課題としてリスクコミュニケーションに関して 12 項目、リスクアセスメントに関して 5 項目の合計 17 項目が抽出された。抽出された課題について、検討により明らかになった改善策については、アレルギー表示検討会中間報告及び最終報告として報告した。アレルギー表示検討会はそれぞれの立場と状況を理解するための唯一の場であり、課題解決の場として今後も活用できると考えられた。未解決課題があるため、今後は調査を実施し、調査結果をもとにして検討を重ね研究をすすめる必要があると考えられた。

A. 研究目的

平成 13 年 3 月の食品衛生法改正に伴いアレルギー表示の義務化がなされた。本研究では食品表示を、製造業者や販売業者においては商品価値を高めるものであり、消費者と販売・製造業者との「コミュニケーション」の重要なメディアと捉えている。表示によって消費者自身が食品選択のための「リスクアセスメント」を行い、またその結果、購入した食品について適切な「リスクマネジメント」を行うために必要な情報を提供したものと位置づけている。この研究では、食品表示における「アレルギー表示」に焦点をあて、食品衛生法関連法令の改正に伴うアレルギー表示の課題を抽出し分析すること、またその改善について提

案することを目的とした。

B. 研究方法

課題の抽出方法として、製造業者、販売業者、消費者（食物アレルギー患者）、医療従事者、学識経験者からなる「アレルギー表示検討会」を設置した。参加者がそれぞれの課題をもちより、課題別の分科会を設置し、検討により改善策を見いだした。課題分析については、検討会及び分科会の記録テープ及び議事録から発言をカード化し分類する方法をとった。

C. 研究結果

1) 検討会について

検討は 7 ヶ月間行われた。第 1 回検討会

により「微量原材料表示ルール化検討グループ（以下第一分科会）」「複合原材料加工食品表示明瞭化検討グループ（以下第二分科会）」が設置された。開催回数は、検討会4回、第一分科会2回、第二分科会6回が

開催された。

2) 表示における課題について

検討において抽出されたアレルギー表示における課題を表1に示す。

表1 アレルギー表示に関する抽出された課題

リスクコミュニケーションに関する課題	
1	表示の「目的」に対する認識の違い
2	表示の「対象者」に対する認識の違い
3	表示の「限界」に対する認識の違い
4	表示方法が複雑であること
5	添加物の表示方法が不統一であること
6	ルール化するために必要な加工食品分類の困難性
7	用語の定義の不明覚醒
8	食物アレルギー患者とそうでない消費者との意識差
9	製造・販売業者の表示制度や方法についての知識・認識不足
10	消費者の表示制度についての知識・認識不足
11	食品加工過程上困難な問題の明確化
12	根拠となるデータの不足
リスクアセスメントに関する課題	
1	表示が必要な特手原材料等の「含有量」の不明確性
2	食物アレルギー患者における「感覚」の優先性
3	食物アレルギー患者の「個人差」
4	食品業界の複雑性
5	根拠となるデータの不足

#### D. 考察及び結論

今回の研究では普遍的なデータがほとんどない状況のなかで課題抽出の方法として会議での議論内容を分析する方法をとった。会議においては、その運営とコミュニケーションについても問題があると考えられた。

表示に関する課題については、「リスクマネジメント」に関する課題は抽出されなかった。「リスクコミュニケーション」では、

表示の対象者やその目的に関する認識の違いが見られたため、具体的な表示方法の議論に至るまでに時間を要した。表示によって伝達できる最低不可欠な情報内容とその量について消費者がどのように考えているのか、また、表示方法においては、表示方法によっては、商品価値を阻害する場合は生じるとの意見からそれらを調査分析する必要があると考えられた。また、リスクコ

コミュニケーションができるための基礎的知識の普及のために、食物アレルギー患者を対象とした教育媒体（パンフレット）を開発するに至った。

「リスクアセスメント」については、普遍的データの不足から、今後臨床的実験的研究の重要性が示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

アレルギー食品表示研究の1年間  
食品衛生研究 第52巻 5号 7-14  
2002

アレルギー食品の表示に関する研究  
食品衛生研究 第52巻 5号 15-24  
2002

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### H. 研究協力者

太田

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究

アレルギー食品表示に関する国際比較研究

分担研究者 近藤 正英 筑波大学社会医学系講師

研究要旨

我が国のアレルギー食品表示制度のあり方を検討するために、アメリカ、イギリス、フランスおよび EU の各政府の食品表示担当者を中心とした関係者に対して、アレルギー食品表示制度の現況と課題を中心にヒアリングを行い、各国の現況と課題を比較した。各政府ともアレルギー食品表示は法制化を準備中であり、現況としては消費者の意見を反映しようとする産業による自主規制が大手食品企業を中心に行われていた。規制の形態としてはコーデックス委員会で合意された 8 種類の原材料を中心とした特定原材料が指定され、それらを含む加工食品等には原材料名を表示するというものであった。表示の要不要の基準は原材料を含む可能性があれば表示するというものであり、我が国で禁止されている可能性表示も行われていた。具体的な表示の形態としては、複数の食品を組み合わせる包装したような食品の場合においても、個別表示ではなく一括表示が主流であった。こうした現況は、食物アレルギー患者による抗原回避を可能にするという原則に基づいているものであろうと考えられた。

A. 研究目的

我が国では、アレルギー物質を含む食品の表示に関する政策として、食品が引き起こす健康危害を未然に防止するために、平成 13 年 3 月に食品衛生法施行規則が改正され、容器包装された加工食品・食品添加物の原材料の表示において、過去にアレルギーに伴う健康危害を引き起こした実績のある特定の原材料を表示することとなった。アレルギー食品表示は平成 14 年 4 月より完全実施されることとされており、指定された 24 品目の特定原材料（うち表示が義務づけられているのは 5 品目）を含む加工食品等においては、具体的な表示方法に関する準備・検討が進められているが、その

あり方については、消費者、産業、行政などの立場によって、考え方や利害などが異なり、制度として成熟するためには、様々な課題において広く合意がえられていく必要があると考えられる。この意味においては、アレルギー食品表示制度は形成途上であるといえよう。

一方、アレルギー食品表示に関する国際的な政策動向としては、FAO/WHO 合同食品規格委員会（コーデックス委員会）が平成 11 年の総会においてアレルギー物質として知られている 8 種類の原材料を含む食品にあたっては、それらを含む旨を表示することで合意し、加盟国においては各国の制度に適した形での具体的な表示をするこ

とが求められた。これを受けて諸外国も表示の制度化に取り組みつつあるところであるが、その過程においては我が国での表示制度の形成過程に生じてきている課題と同様の課題にも直面しているであろうと考えられる。

本研究では、こうした諸外国のアレルギー食品表示の制度化への取り組みを調査し、比較検討して、具体的な表示方法のあり方の相違を明らかにすること、制度化の背景にある考え方を明らかにすることの2点を通じて、我が国のアレルギー食品表示制度の成熟に向けた形成過程での議論に寄与する知見を得ることを目的とする。

## B. 研究方法

アメリカ、イギリス、フランスの3カ国およびEUの各政府の食品表示担当者を中心に、一部、消費者団体（患者団体）、食品産業関係者を対象に、各国（地域）でのアレルギー食品表示制度の現況と課題に関するヒアリング調査を行った。各国での訪問先は表1の通り。

表1 ヒアリング調査訪問先

	種別	名称
アメリカ	政府	農務省
		厚生省
		環境保護庁
		メリーランド州政府
	産業	日系食品企業
	消費者	食物アレルギー患者団体
イギリス	政府	食品基準庁
	産業	日本貿易振興会

フランス	政府	雇用社会連帯省
	産業	日本貿易振興会
EU	政府	食品安全庁

ヒアリング調査を通じて得た情報に基づき、各国のアレルギー食品表示制度の現況と課題を比較検討した。

## C. 研究結果

アレルギー食品表示の前提として訪問先政府が一般の食品表示として規定している義務的表示項目を表2に示す。

表2 義務的表示項目

	義務的表示項目
アメリカ	品名、検査履歴・製造所、取扱法、内容量、原材料（※原則悉皆表示）、販売者所在地、栄養成分
イギリス	品名、原材料（※25%未満のもの省略可）、品質保持期限、保存条件・使用条件、販売業者・製造業者の名称・住所、原産地、使用方法 遺伝子組換え食品
フランス	欧州共同体の規定に準ずる
EU	品名、原材料（※25%未満のもの省略可）、成分量、内容量、使用期限、特殊な保存・使用条件、製造者・包装者・販売所の所在地、原産地、使用方法、アルコール濃度

アレルギー食品表示に関わる事項として



は、各国とも原材料の表記を義務的に定めているが、アメリカでは（一部添加物等の微量に含有される原材料の場合に省略表記が認められているものの）原則的にすべての原材料を表示することとされているのに対し、ヨーロッパでは、原材料として含有量が全体の 25%未満のものは原則としては省略可能とされている点が対照的であった。

### 3 カ国および EU における食品アレルギー

一表示の現況をまとめたのが表 3 である。

特定原材料としては、おおむねコーデックス委員会で合意された 8 種類に準拠した原材料が取り上げられていた。3 カ国では、我が国で認められていない可能性表示が製造工程上やむを得ない場合に限ってはあがるが認められていた。また、特定原材料の表示に関しては個別表示ではなく一括表示が主流であった。

表 3 食品アレルギー表示の現況

	アメリカ	イギリス	フランス	EU
法制化	準備中	EU において準備中	EU において準備中	準備中
現行の法的原材料省略規定	原則省略不可	25%未満省略可	25%未満省略可	25%未満省略可 (撤廃検討中)
自主規制主体	食品アレルギー問題連盟	食料雑貨流通協会	食品産業全国協会	
特定原材料	(自主規制に掲げられているもの) 甲殻類、卵、魚、乳、落花生、大豆、木の実、小麦	(自主規制に掲げられているもの) 落花生、木の実、ごま、牛乳、卵、魚、甲殻類、軟体動物・貝、大豆、小麦	(自主規制に掲げられているもの) 落花生、木の実、卵、魚、牛乳、甲殻類・軟体動物・貝、ごま、大豆、グルテン、小麦	(法規制を検討されているもの) 落花生、木の実、卵、魚、牛乳、甲殻類・軟体動物・貝、ごま、大豆、亜硫酸塩、グルテン
可能性表示	(自主規制において) 条件付きで可能	(自主規制において) 条件付きで可能	(自主規制において) 条件付きで可能	不詳

#### D. 考察及び結論

今回ヒアリング調査した 3 カ国及び EU でのアレルギー食品表示の現況を比較すると、規制の手段としては、原材料の省略を

禁止することと、健康危害を引き起こす頻度が高いと考えられる特定の原材料のポジティブ・リストを作成して、加工食品にその原材料が含有あるいは含有される可能性

がある場合はその旨を表記するという形態が共通してみられた。こうした規制に従った食品表示が消費者の正しい情報に基づいた適切な食品の選択を可能にするという考え方は、我が国のアレルギー食品表示制度の背景にある考え方と共通といえよう。

我が国の制度との相違点としては、可能性表示が条件付きながらも認められている点と、ポジティブ・リストに挙げられた原材料の表示に関しては個別表示が主流である点であった。これらは、基本的に消費者が抗原回避を確実にできるような表示を行うという原則に根ざしているものと考えられる。一方、我が国の食品表示研究班アレルギー表示検討会では、軽度の食物アレルギーを持つ患者の食品中に含まれるアレルギー物質の推定に基づく選択つまり摂食行動を想定しての個別表示の有用性も、3カ国と類似した一括表示を主体とした表示方法に加えて検討された。これは健康危害に及ばない範囲での最大限の食物摂取を可能にするという、確実な抗原回避とは異なる原則に基づく考え方であると考えられる。対して3カ国では、非常に微量な抗原量でも時に致死的な健康危害が生じうるとの医学的な知見に基づいて、後者の原則は規制に取り入れられていないとのことであった。

このアレルギー表示のあり方に関する背反する2つの原則に対する態度の違いは、我が国と3カ国の消費者文化・食文化の相違にも根ざしたものであるとも考えられるが、我が国の表示制度の成熟に当たっては、原則のあり方に関して消費者、産業、行政による、より明示的な合意形成が必要な事項であろうと考えられる。

また、3カ国及びEUの直面している課

題は法制化であり、その含意は現行の大手企業を中心とした自主規制から比較的小規模の食品企業にまで規制の網を掛けていくことに伴う問題であるといえよう。この問題は我が国でも引き続き取り組んでいかなければならない事項であると考えられ、3カ国での今後の政策過程の推移を引き続き観察検討していくことは、我が国でのアレルギー食品表示制度の成熟に有意義な知見をもたらすと考えられる。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

#### H. 研究協力者

丸井英二（順天堂大学公衆衛生学教室）

堀口逸子（順天堂大学公衆衛生学教室）

食品表示に関する国際比較（一例）

食品表示に関する法律等と所管官庁	米 国	欧州共同体	フランス	イギリス
表示項目	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 連邦食品医薬品化粧品法</li> <li>○ 栄養表示・教育法</li> <li>◎ 厚生省 (DHHS)</li> <li>○ 連邦食肉検査法</li> <li>○ 連邦鳥肉製品検査法</li> <li>○ 卵製品検査法</li> <li>◎ 農務省 (USDA)</li> <li>○ 公正包装・表示法</li> <li>◎ 公正取引委員会 (FTC)</li> </ul> <p>&lt;義務表示&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>DHHS</li> <li>○ 品名</li> <li>○ 原材料</li> <li>○ 内容量</li> <li>○ 製造者・包装者・流通者の名称と所在地</li> <li>○ 栄養成分</li> <li>○ 魚でのカンタキサンチン着色</li> <li>USDA</li> <li>○ 品名</li> <li>○ 検査履歴・製造所</li> <li>○ 取扱法</li> <li>○ 内容量</li> <li>○ 原材料</li> <li>○ 販売者所在地</li> <li>○ 栄養成分</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ EU 指令 1990/496/EC</li> <li>○ EU 指令 2000/13/EC</li> <li>○ EU 指令 2001/101/EC</li> <li>○ EU 規則 (EC) No 1825/2000</li> <li>◎ 保健・消費者保護総局</li> </ul> <p>&lt;義務表示&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 品名</li> <li>○ 原材料</li> <li>○ 成分量</li> <li>○ 内容量</li> <li>○ 使用期限</li> <li>○ 特殊な保存・使用条件</li> <li>○ EU 域内の製造者・包装者・販売者の所在地</li> <li>○ 原産地、</li> <li>○ 使用方法に関し説明がないと適切な使用をすることが難しい場合には当該使用上の説明</li> <li>○ アルコールを 1.2%以上含有する場合はその濃度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ EU 指令 2000/13/EC に準拠した国内法</li> <li>◎ 経済財政産業省 (MINFEL)</li> </ul> <p>&lt;義務表示&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 欧州共同体の規定に準ずる。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 食品安全法 (食品表示規則)</li> <li>○ 重量計量法</li> <li>○ 取引表示法</li> <li>◎ 食品基準庁 (FSA)</li> </ul> <p>&lt;義務的表示事項&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 食品の名称</li> <li>○ 原材料のリスト</li> <li>○ 適切な品質保持期限</li> <li>○ 特殊な保存条件又は使用条件</li> <li>○ EU 域内における販売業者又は製造業者 (あるいは包装業者) の名称 (あるいは商号) 住所 (あるいは登録地)</li> <li>○ 食品の原産地又は生産地に関する詳細を示さないと購入者に誤解を与えかねない場合には当該原産地又は生産地の詳細</li> <li>○ 使用方法に関し説明がないと適切な使用をすることが難しい場合には当該使用上の説明</li> </ul>

<p>その他の食品に関する所管省庁</p>	<p>◎環境保護庁(EPA) (食品残留農薬基準等を所管)</p>	<p>◎農業総局 (原産地表示等を所管) ◎企業総局 (食品産業等を所管) ◎欧州食品安全機関 (食品安全等を所管)</p>	<p>◎食品衛生安全庁(AFSSA) (食品の安全性に関するリスク評価等を所管) ◎農漁業省 (食品衛生の確保等を所管) ◎雇用社会連帯省 (補助食品の衛生等を所管)</p>	<p>◎環境・食料・農村地域省(DEFRA) (食品産業の振興等を所管)</p>
<p>参考事項</p>	<p>食品表示は DHHS と USDA 分担して管掌。おおよその管轄区分としては 2%以上の肉または鳥肉を含む食品と未加工卵は USDA, その他の食品は FDA.</p>			

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

（食品分野 食品由来の健康被害に関する研究）

分担研究報告書

「食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に対する研究」

（略称：食品表示研究班）

分担研究課題 食物アレルギー表示に伴う特定原材料の検出法検討会

（略称；特定原材料検出法検討会）

分担研究者 豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

**研究要旨** 特定原材料5品目（卵、乳、小麦、そば、落花生）検出法の開発を検討した。人血清を用いた卵、乳のサンドイッチELISA法及びイムノブロットイング法を確立した。患者のアレルギー反応に即した食品中の特定原材料混入を検出するためには有効な手段であると思われる。特定原材料の総タンパク質を定量する方法として複合抗原認識抗体を用いたELISA法と精製抗原認識抗体を用いたELISA法の2種類の方法を開発した。また、その両方法を食品の抽出液に添加する方法で10機関によるinter-laboratory validationを検討した。また実際に10 µg/gのモデル加工食品を作製し、同様に4機関によるinter-laboratory validationを行った。さらに卵、乳の2品目の総タンパク質を定性する方法としてイムノクロマト法、ウエスタンブロットイング法を確立した。小麦、そば、落花生の3品目に関しては特異的遺伝子を定性的に検知するPCR法を確立した。ウエスタンブロットイング法とPCR法はELISA法の確認分析に有用であると思われる。

協力研究者：小川正（京都大学大学院農学研究科）田辺創一（広島大学生物生産学部）松田幹（名古屋大学生命農学研究科）宇理須厚雄（藤田保健衛生大学）赤澤晃、田中和子（国立小児病院アレルギー科）穂山浩、渡邊敬浩、張替直輝、五十鈴川和人、和久井知世子（国立医薬品食品衛生研究所）丸井英二、堀口逸子（順天堂大学医学部）

支援研究者：萩原清和、山内淳（（独）健康栄養研究所）渡辺裕子（神奈川県衛生研究所）高畑能久、森松文毅（日本ハム（株）中央研究所）佐藤秀隆、山本美保、三嶋隆、渡井正俊、吉田篤史（（財）日本食品分析センター多摩研究所）尾畑暁英（森永製菓株式会社研究所）本庄勉、豆越慎一、村岡嗣朗（（株）森永生科学研究所）、布藤聡、小川真智子（（株）フ

ァスマック）飯塚太由、吉川礼次（（財）食品環境検査協会）山川宏人、野村諭（（株）日清製粉グループ）小笠原健、荒川史博（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）古井聡（（株）ニッポンジーン）小池哲央（ロート製薬株式会社）加藤久（昭和産業（株））

#### A.研究目的

平成13年度厚生科学研究補助金生活安全総合研究事業「食品分野 食品由来の健康被害に関する研究 食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に対する研究」（以下食品表示研究班）における研究の一環として行うものであり、アレルギー表示に向けて、特定原材料（省令5品目に限る）の検出法の開発、評価、整備を行うことを目的とする。また遺伝子組換え食品の定量検査法におけ

る機器のバリデーションに関しても行うことを目的とする。

## B.研究方法

1)人血清を用いた方法：RAST2及びRAST6のプール血清を用いてサンドイッチELISA法及びイムノブロットリング法により測定する。

2) 動物血清を用いた方法：

2.1.複合抗原認識抗体を用いた ELISA キットの実験操作

均一化された試料 2g を抽出用緩衝液 40mL に加え、ホモゲナイザーで 2 分間攪拌する。その試料を 10000 x g で 30 分間室温遠心し、その上清を濾過して得られた溶液 50  $\mu$ L に付属の緩衝液 450  $\mu$ L を加え、試料液とする。ウェルを洗浄液で 3 回洗浄し、試料液を 100  $\mu$ L ずつ加え、室温で 90 分間放置する。その後、洗浄液で 3 回洗浄し、ビオチン結合抗体溶液 100  $\mu$ L を加え、室温で 90 分間放置する。その後、洗浄液で 3 回洗浄し、アルカリフォスファターゼ-アビジン結合物溶液 100  $\mu$ L を加え、室温で 30 分間放置する。その後、洗浄液で 3 回洗浄し、発色剤 100  $\mu$ L 加え、室温で 20 分間放置する。反応停止液 100  $\mu$ L を加え、マイクロプレートリーダーを用い、波長 405nm で測定する。

2.2.精製抗原認識抗体を用いた ELISA キットの实验操作

均一化された試料2gを検体希釈液 40mL に加え、ホモゲナイザーで 30 秒間の攪拌を 3 回行う。10000 x g で 10 分間室温遠心し、その上清を試料液とする。ウェルに試料液を 100  $\mu$ L ずつ加え、室温で60分間放置する。その後、洗浄液で 6 回洗浄し、酵素標識抗体溶液 100  $\mu$ L を加え、室温で 30 分間放置する。その後、洗浄液で 6 回洗浄し、酵素基質溶液 100  $\mu$ L を加え、室温遮光下で 10 分間放置する。反応停止液

100  $\mu$ L を加え、マイクロプレートリーダーを用い、主波長 450nm、副波長 600-650nm で測定する。

(倫理面への配慮) 本研究に供した患者血清は、本研究の目的と内容を提供者が理解した上で提供されたものであり、文書によるインフォームドコンセントが得られている。研究遂行にあたっては個人情報漏洩防止に配慮し、提供者に不利益が生じないように注意している。従って、倫理面の問題はないものと考えられる。

3) Polymer Chain Reaction (PCR) 法

各粉体試料より、QIAGEN DNeasy Plant Mini KitあるいはQIAGEN Genomic-tip を用いて抽出精製したDNAを滅菌蒸留水で希釈したものをDNA試料溶液とし、各実験に供した。一方、特定原材料3品目の近縁種についてはQIAGEN Genomic-tip を用い、大豆については上記Plant Mini kitを用いてそれぞれDNAを抽出精製した。PCR反応組成液は、1×PCR緩衝液(アプライドバイオシステムズ社製：ABI社製)、0.20 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ mol/Lプライマー及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼになるように混合し、DNA試料溶液(20 ng/ $\mu$ L) 2.5  $\mu$ Lを加え、全量を25  $\mu$ Lにした。

4) 新マイクロタイタープレート型リアルタイム PCR を用いた遺伝子組換え食品の定量検知法の開発の検討とその方法による内標比試験

現行の通知法に記載された遺伝子組換え食品の定量分析法にある実験法を基本とし、ABI PRISM 7000ならびに同7900を定量的 PCR 装置としてそれぞれ用いた場合に最適の値が得られるための反応液組成ならびに PCR 条件等の変更を行い検討した。内標比は各機関3回の実験

を行い、各回ごとに算出された数値の平均値として求めている。

### C. 研究結果

#### 1) ヒト血清を用いた検出法の開発

ヒト血清を用いたウエスタンブロッティング法及び ELISA 法を開発した。ウエスタンブロッティング法では RAST 6 のプール血清を用いた結果、5 µg/ml まで測定可能であった。competitive ELISA 法では、RAST 2 の患者プール血清で 100 ng/ml、RAST 6 の患者プール血清で 10 ng/ml まで検出可能であった。

#### 2) 動物抗体を用いた方法の開発

##### 2-1) 複合抗原を認識する抗体を用いた ELISA 法

複合抗原を認識する抗体を用いた 5 品目の ELISA 法を開発した。特定原材料中の各種蛋白質成分に対する患者血清中のアレルギー特異的 IgE 抗体の結合パターンをウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、従来から報告されているメジャーアレルゲンの他に、多くのマイナーバンドとも反応することを明らかにした。特定原材料蛋白質を複合抗原としてウサギに免疫し、患者 IgE 抗体とアレルゲンとの結合パターンに相関性を持つ動物ポリクローナル抗体を作製した。

これら抗体を用いて各特定原材料 5 品目の ELISA キットを確立した。一般の市販されている ELISA キットは単一の蛋白質に対する抗体を用いるが、複合抗原を認識するポリクローナル抗体系を開発することで、下記に示した多くの患者 IgE 抗体結合蛋白質を同時に検出可能となった。

卵 ELISA キット：オボアルブミン、オボムコイド、リゾチーム、トランスフェリン

牛乳 ELISA キット：カゼイン、β-ラクトグロブリン、ラクトアルブミン

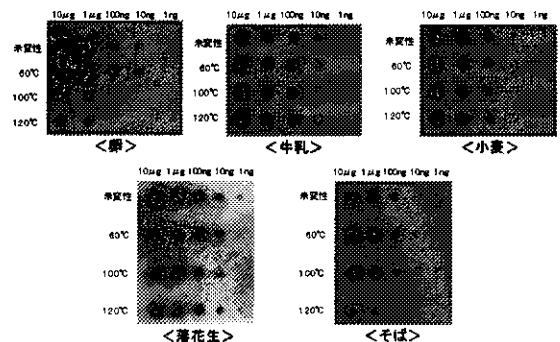
小麦 ELISA キット：グリアジン、α-アミラーゼインヒビター

落花生 ELISA キット：132kDa タンパク質、84kDa タンパク質、57kDa タンパク質、27kDa タンパク質、15kDa タンパク質

そば ELISA キット：107kDa タンパク質、89kDa タンパク質、72kDa タンパク質、35kDa タンパク質、28kDa タンパク質

確立した方法の測定原理は、サンドイッチ ELISA 法を採用しており、1 ng/ml から 100 ng/ml の範囲で良好な標準曲線を示し (Fig.1)、再現性は CV 値 10 % 以内の良好であった。交差反応性の検討では、卵 ELISA キットにおいて鶏卵のみでなく特定原材料の表示義務対象のウズラ卵及びアヒル卵も反応することが明らかとなった。しかし、小麦 ELISA キットでは、ライ麦、大麦及びオオツ麦で反応性を示した (Table 1)。はんぺん (卵キット)、漬け物 (牛乳キット)、米粥 (小麦キット)、クッキー (落花生キット)、ソーセージ (そばキット) 等のモデル加工食品へ応用した結果、それぞれ回収率が 79.7%、42.8%、26.6%、41.3%、62.0% となり、食品から変性及び未変性タンパク質の総量を求めた回収率としては、良好な結果を得たと考えられる。

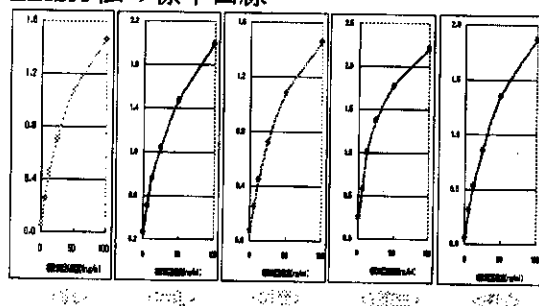
Fig. 1 抗体の各抗原に対する反応性



従来の市販 ELISA キットが単一の蛋白質

質成分に対する抗体を用いているのに対し、複合抗原を認識するポリクローナル抗体を採用することにより、患者IgE抗体が認識する多くの蛋白質成分を1回の測定で同時に検出可能とした。標準曲線の範囲は1 ng/mLから100 ng/mLである。確立したELISAキットの標準曲線をFig. 2に示す。

Fig.2 複合抗原を認識する抗体を用いたELISA法の標準曲線



アレルギー表示の必要性を検査する場合、最終製品での検査が最も望ましいが、多くの加工食品では衛生的あるいは調理目的に加熱処理が施されているため、加熱変性された特定原材料蛋白質を認識することが重要な課題である。作製したポリクローナル抗体は複合抗原を免疫する際、未変性抗原と加熱変性抗原を混合して免疫することにより、いずれの特定原材料においても未変性及び加工条件として一般的な60℃から120℃で加熱変性された当該蛋白質を検出可能であった。

Table 1 複合抗原認識抗体の交差反応性

	米	アワ	ライ麦	大麦	オオツ麦	大豆	トウモロコシ	ナタネ	イクラ	鱈子	鶏の子
卵キット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
牛乳キット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
小麦キット	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
落花生キット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
そばキット	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<抗原濃度 1000ng/ml のときの測定値>

- : <1ng/ml, + : 1?10ng/ml, ++ :

10?100ng/ml, +++ : >100ng/ml

## 2-2) 精製抗原を認識する抗体を用いたELISA法

特定原材料5品目の精製抗原を認識する抗体を用いたELISA法キットを開発した。単一タンパク質または出来るだけ精製された複合タンパク質に対する抗体を使用して、測定系の特異性を高め、検査で陽性と出た場合の混入原材料のウェスタンブロット等による確認試験が容易であると思われた。ELISAキットは下記に示す5品目合計7種類となっている。卵測定キット(鶏卵白アルブミン測定キットとオボムコイド測定キットの2種)牛乳測定キット( $\beta$ -ラクトグロブリン測定キットと $\alpha$ -カゼイン測定キットの2種)小麦測定キット(グリアジン)落花生測定キット(Ara h2を含む落花生低分子タンパク質複合体)そば測定キット(そば主要タンパク質複合体)

標準曲線の範囲は1 ng/mLから64 ng/mLであった。(Fig. 3, Fig. 4) 試料を20倍量の抽出液で処理したとき、回収率が2%の場合、1 ppmの検出が可能であり、ビスケットのような高温加熱処理した試料中の原材料にも応用が可能である。また、全てのELISA法はコート抗体および酵素標識抗体にウサギポリクローナル抗体を使用した単純な2ステップサンドイッチELISA法で、より広く抗原タンパク質を検出することが可能であった。



Fig3. 精製抗原を認識する抗体を用いたELISA法（牛乳カゼイン）の標準曲線

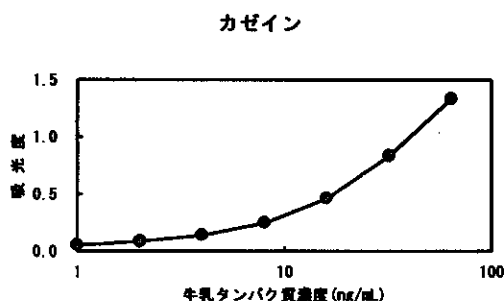
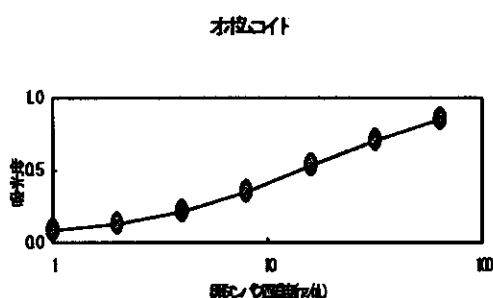


Fig4. 精製抗原を認識する抗体を用いたELISA法（卵オボムコイド）の標準曲線



認識抗体の交差反応性を調べた結果、小麦キットにライ麦、大麦及びオオツ麦の交差反応性を示した。そばキットには若干、麦類とナッツ類に交差反応性が認められた。

Table 2 にその結果を示す。

Table 2 精製抗原認識抗体の交差反応性

	鶏卵	牛乳	ヤギ乳(羊乳)	そば(苧製品)	オーツ麦(苧製品)	ライ麦(苧製品)	小麦(苧製品)	大豆	コーン(苧製品)	落花生	クルミ	マカダミアナッツ	アーモンド	ヘーゼルナッツ	カシューナッツ
鶏卵	100	100	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
牛乳	0.001 未検	0.001 未検	100	100	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
ヤギ乳(羊乳)	0.001 未検	0.001 未検	0.14	0.10	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
そば(苧製品)	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
オーツ麦(苧製品)	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
ライ麦(苧製品)	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
小麦(苧製品)	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
大豆	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
コーン(苧製品)	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
落花生	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
クルミ	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
マカダミアナッツ	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
アーモンド	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
ヘーゼルナッツ	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検
カシューナッツ	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検	0.001 未検

単位は %

0.001% 未満:100 μg/mLの抽出液を測定した場合、測定感度未満

### 2-3)イムノクロマト法

卵、乳の2品目に関して、複合抗原認識抗体を用いたイムノクロマト法及び精製抗原認識抗体を用いたイムノクロマト法を開発した。両方法とも標準物質による評価は10 μg/ml - 100 μg/mlの範囲まで良好に検出可能であった。

### 2-4)ウエスタンブロットティング法

卵、乳の2品目に関して、複合抗原認識抗体を用いたウエスタンブロットティング法及び精製抗原認識抗体を用いたウエスタンブロットティング法を確立した。両方法とも10 - 100 μg/mlの卵、乳のタンパク質の検出が可能であった。

### 3)PCR法

小麦、ソバ、落花生の3品目に関して、各特異的遺伝子をPCRで増幅する方法を開発した。ターゲット遺伝子として、小麦はグルテン遺伝子、そばでは特異アレルゲンタンパク質遺伝子、落花生ではアグルチニン前駆体遺伝子を用いた。

DNA抽出はシリカ膜カラムキットあるいは陰イオン交換カラムキットを用いて行った。加工食品においては、加工過程の熱や圧力によりDNAが高度に分解している。しかし、150 bp以下のサイズのDNA断片は残存していることが多いため、PCR産物の長さが100 bp程度になるように各プライマーセットを設計した。そば及び小麦の検知プライマーについては、小麦、デュラム小麦、ライ麦、大麦、オオツ麦、そば、米、トウモロコシ、大豆、粟、落花生、アーモンド、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ、大豆などを用いて行った。その結果、それぞれのプライマーセットは、非常に高い特異性を有していることが確認された。

4) 新マイクロタイタープレート型リアルタイムPCRを用いた遺伝子組換え食品の定量検知法の開発の検討とその方法による

## 内標比試験

### 4-1) ABI PRISM 7000 によって検討された条件

最適なPCR条件を検討した。反応液組成としてUniversal PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L、対象プライマー0.75  $\mu$ mol/L、対象プローブ0.25  $\mu$ mol/L、20 ng/ $\mu$ L DNA試料溶液を2.5  $\mu$ Lとした。これらを混合し最終液量を25  $\mu$ Lとした。PCR条件は[50°C 2 min - 95°C 10 min (95°C 30 sec - 61°C 2 min) X45 サイクル]が最適であった。

### 4-2) ABI PRISM 7900 にて検討された条件

最適なPCR条件を検討した。反応液組成としてUniversal PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L、対象プライマー0.3  $\mu$ mol/L、対象プローブ0.1  $\mu$ mol/L、20 ng/ $\mu$ L DNA試料溶液2.5  $\mu$ Lとした。これらを混合し最終液量を25  $\mu$ Lとした。PCR条件は[50°C 2 min - 95°C 10 min (95°C 30 sec - 61°C 2 min) X45 サイクル]が最適であった。

## D 考察

### 1) ヒト血清を用いた検出法の開発

ヒト血清を用いた方法は、患者の臨床症状と特定原材料の量の相関性を直接的に検証できるため、患者のアレルギー反応に即した食品中の特定原材料混入を検出するためには有効な手段であると思われる。しかし、実際、各血清による特定原材料による反応は、患者個人によって異なるため、検査の統一性を考えるとプール血清を用いた方法が望まれるが、プール血清は混合することによりIgE力価が減少することや、資源を特定の患者群に依存するため血清の貯蓄に限界あること、またヒト血清を用いる危険性を考慮に入れると食品会社及び検査機関での検

査が困難等の問題点がある。従って、特定原材料検出法検討会では、下記に示す動物ポリクロナール抗体を用いたELISA法、電気泳動・ブロットニング法及び特異的な遺伝子を検出する方法を第一次及び第二次検査法として考え、両検査法でも検出できず、その当該食品で患者に症状が現れた場合に、患者血清を用いて検証する最終手段の方法として考えている。

### 2) 動物抗体を用いた方法の開発

動物により作製したポリクロナール抗体を用いたELISA法は、抗体の大量調整も可能であり、操作の上でも比較的簡便で、各検査機関において統一的な測定結果を示す点で最も重要な実際的方法と考えられる。しかし、ELISA法が抗原抗体反応を利用している以上、交差反応による擬陽性あるいは反応阻害等による見逃しが起こりうることを十分に考慮しておく必要がある。免疫抗原を複合抗原にするか単一抗原にするかにより、次の二種類の検出系が考えられる。複合抗原を認識する抗体を用いる検出系は、多くの加工食品に適用できるため適合性に優れており、特定原材料の混入を見逃しにくい。逆に単一抗原を認識する抗体を用いる検出系では特異性に優れており、擬陽性は起こりにくい。単一抗原に対する反応阻害やそれを含まない食品では特定原材料の混入を見逃してしまう可能性が高い。両検出系とも、優れた長所を持っており、お互いの欠点を相補う関係にある。従って特定原材料検出法検討会では、両検出系とも重要であると考え、開発及び評価を検討している。また併せて両検出系の各抗体を用いた電気泳動・ブロットニング法及びラテラルフロー法（イムノクロ

マト法)も確立した、来年度食品への適用を検討したい。

### 3)PCR法

動物ポリクロナール抗体を用いてタンパク質を測定する方法は、特異性を増したとしても、植物性食品では近縁種原材料との交差反応性は免れない。しかし、義務表示とされる5品目の中で、植物である小麦、ソバ、落花生に関しては、各特異的な遺伝子情報を探し、その特異的遺伝子領域を(PCR)増幅反応により短時間に増殖して検出することが可能である。PCR法は加工品への適用が、ある程度可能であることから、最終製品の検査には有効な手段と考えられる。一方、操作が煩雑で、特殊な機器を必要とする等の欠点がある。

PCR法を開発する上で、重要な点はプライマーの設計であると思われる。各特定原材料のみに存在する特異的な遺伝子をターゲットとし、加工食品にも応用可能であるように、できるだけ増幅断片長が短くなるようにプライマーを設計することが必要である。この点を考慮しながら、タンパク質検出法では、交差反応性が強く確定できないような原材料を用いている食品の検査における方法として、特異的に検出できるPCR法を開発している。

### 4)新マイクロタイタープレート型リアルタイムPCRを用いた遺伝子組換え食品の定量検知法の開発の検討とその方法による内標比試験

今回の検討により、ABI PRISM 7000ならびに同7900について、現行の組換えDNA応用技術食品の通知法に記載されている内標比に近似した内標比が算出されることが示された。またこの結果から、ABI PRISM 7000ならびに同7900につい

ても、ABI PRISM 7700同様に再現性の高い安定した定量系の作成が可能であると考えられた。しかし、2機関において検討したABI PRISM 7900については、各機関において算出された内標比のうち、測定対象によっては差違が認められるものがある。特に、GA21に関してはその差違が大きく、これは実験に使用されたDNA試料が同一のものでなかったことに起因する可能性が高い。また、トウモロコシの測定全般において、内部標準として用いたプラスミドに起因するものと思われる測定値のばらつきが認められるなどの現象もあり、これに関しても、品質管理といった部分での質の向上が望まれる。

### E.結論

特定原材料5品目(卵、乳、小麦、そば、落花生)検出法の開発を検討した。人血清を用いた卵、乳のサンドイッチELISA法及びイムノブロットィング法を確立した。患者のアレルギー反応に即した食品中の特定原材料混入を検出するためには有効な手段であると思われる。特定原材料の総タンパク質を定量する方法として複合抗原認識抗体を用いたELISA法と精製抗原認識抗体を用いたELISA法の2種類の方法を開発した。また、その両方法を食品の抽出液に添加する方法で10機関によるinter-laboratory validationを検討した。また実際に10 µg/gのモデル加工食品を作製し、同様に4機関によるinter-laboratory validationを行った。さらに卵、乳の2品目の総タンパク質を定性する方法としてイムノクロマト法、ウエスタンブロットィング法を確立した。小麦、そば、落花生の3品目に関しては特異的遺伝子を定性的に検知するPCR法を確立した。ウエスタンブロットィング法とPC

R法はELISA法の確認分析に有用であると思われる。

また、新マイクロタイタープレート型リアルタイム PCR を用いた遺伝子組換え食品の定量検知法の開発の検討し、最適な PCR 条件を確立した。今回の検討結果を踏まえ、他機関参加型の内標比試験を実施することで最終的な内標比を決定し、得られた内標比を用いたブラインドテストを行うことで定量系の精度を確認し、その上で ABI PRISM 7700 に同等とし、通知法に記載できるものと判断される。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 穉山浩、豊田正武 食品衛生研究 in press
2. 学会発表 1) ヒト血清による食物アレルギーの検出について 田中和子 食品衛生学会シンポジウム(2002), 2)ELISA による特定原材料の検出について(1), 高畑能久 食品衛生学会シンポジウム(2002)、3) ELISA による特定原材料の検出について(2), 豆越慎一 食品衛生学会シンポジウム(2002), 4)PCR 法による特定原材料の検出について、布藤聡 食品衛生学会シンポジウム(2002)5) ELISA 法による特定原材料の検出について(1) 森松文毅 日本食品化学会食品化学シンポジウム(2002) 6) ELISA 法による特定原材料の検出について(2) 本庄勉 日本食品化学会食品化学シンポジウム(2002) 7) 食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法について 穉山浩 日本食品保全研究会(2002) 8) 卵・牛乳・小麦・そば・ピーナッツの高感度検出キットの開発 高畑能久、宮沢いづみ、松本貴之、森松文毅、柴田

瑠美子 日本アレルギー学会(2002) 9) 食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法について(1) 日本薬学会第 122 会大会(2002) 10)食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法について(2) 本庄勉 日本薬学会第 122 会大会(2002)