

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究

| | | |
|-------|-------|-------------------------|
| 研究代表者 | 渡辺 卓穂 | (一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 部長 |
| 研究分担者 | 村上 太郎 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 主任研究員 |
| 研究協力者 | 紀 雅美 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 主幹研究員 |
| | 吉光 真人 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 主幹研究員 |
| | 昌山 敦 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 主任研究員 |
| | 柿本 葉 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 主任研究員 |
| | 村野 晃一 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 研究員 |
| | 徳永 佑亮 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 研究員 |
| | 山崎 朋美 | (地独) 大阪健康安全基盤研究所 研究員 |

研究要旨

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質は特定原材料として消費者庁からの通知（通知法）により、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いて測定される。検査対象となる加工食品中の原材料は多種多様であり、その夾雑物によって測定が影響を受ける場合もある。本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきたポリフェノールの一種である Proanthocyanidin (PAC) を含む試料について、測定阻害の影響を確認した。また、試料からの抽出効率を添加回収試験によって回収率として評価した。回収率の低下が確認された試料については、PAC との結合能が報告されている化合物を利用して、抽出法の改良について検討した。産地と加工法の異なるカカオまたはシナモンを含む食品について、ELISA キットの測定および抽出における夾雑物の影響を評価した。測定における評価の結果、小麦の測定では特定のタンパク質を対象としているキットで PAC による影響を受けやすい傾向が確認された。一方で、落花生の測定では複数のタンパク質を対象とするキットで PAC による影響を受けやすい傾向が確認された。抽出における影響を添加回収試験で評価した結果、十分な回収率が得られない試料が確認された。このため、PAC に結合能を示す Polyvinylpyrrolidone (PVP) と Gelatin を利用して抽出法の改良について検討した。カカオに小麦の標準溶液を添加して、重合度の異なる PVP を共存させて抽出を行ったところ、重合度の低い PVP K15 を 1% 添加することによって、最も高い回収率が確認された。一方で、シナモンについては PVP の添加では十分な回収が確認されなかったが、Cold water fish skin 由来の Gelatin を 10% 添加した場合には両キットで回収率の改善が確認された。今後は精度管理用試料の作成のために、適正資材と安定性の検討を行う必要がある。最

最終的には、改良した検査法を複数機関で評価することにより、より信頼性の高い検査法の確立に繋げる。

A. 研究目的

食品表示法による食品表示基準(平成27年3月30日消食表第139号)では、28品目の原材料がアレルギーを含む食品として加工食品への表示が推奨されている¹。28品目の原材料のうち卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かにの7品目は特定原材料と指定され、食品への表示が義務付けられている。

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質の測定には、消費者庁による通知(以下、通知法)によって、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)がスクリーニング法として利用されている¹。ELISAでは検査対象となるタンパク質に対する抗体の特異性を利用し、多くの原材料との交差性の有無が確認されているため、一般的には信頼性が高い。しかしながら、加工食品には多種多様な原材料が使用されており、その夾雑物が特定原材料の定量に影響を与える場合がある。

本課題では、これまでの研究の中で小麦と落花生の定量への影響が確認されてきたポリフェノール的一种であるプロアントシアニジン (Proanthocyanidin : 以下PAC)を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行う^{2,4}。今年度はELISAによる小麦と落花生の定量について、カカオとシナモン中の夾雑物による測定阻害と試料からの回収率を評価した。回収率の低下が確認された試料については、PACとの結

合能が報告されている化合物を利用して抽出法を改良した。また、各試料に適した化合物を確認後に、抽出条件を最適化した。

B. 方法

1. 試料

1.1. 標準品調製用試料

小麦は国産小麦粉(ホクシン種)を入手して、標準品の調製まで冷蔵庫で保存した。落花生は国産生落花生(千葉半立種)を入手し、フードプロセッサーで粉砕した後に、標準品の調製まで冷凍庫で保存した。

1.2. 測定阻害評価用試料

表1に生産国と加工法の異なるカカオを含む食品10試料(ココアパウダー5試料、ローストカカオ豆3試料、カカオニブ2試料)を、表2に生産国の異なるシナモンパウダー13試料(スリランカ産4試料、ベトナム産3試料、マレーシア産2試料、中国産2試料、インド産1試料、マダガスカル産1試料)に示す。試料は量販店もしくはインターネット通信販売サイトから購入し、測定阻害の評価のために使用した。ローストカカオ豆などの粉状ではない試料はフードプロセッサー(岩谷産業:IFM-700)によって粉砕後に冷凍庫で保存した。その他の試料は室温で保存した。

2 試薬

抽出法の改良に使用した Polyvinylpyrrolidone (以下PVP) 関連試

薬の一覧を表3に示す。GelatinはGelatin from Cold water fish skin (Merck)を使用した。N-Vinyl pyrrolidone (以下NVP)は冷蔵で保存し、その他の試薬は室温で保存した。

3 標準品

3.1.標準品の調製

通知法に示されている標準品規格に記載の方法に従って、小麦粉と落花生からタンパク質を抽出した¹。抽出には振とう機 (TAITEC : BR-23UM) と遠心機 (エッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ : himac CR 21G) を使用した。

3.2. 総タンパク質の定量による標準品規格の定量確認

抽出した標準品原液の総タンパク質濃度は2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて定量した。定量後の標準品は添加回収試験用の標準溶液として200 µg/mLとなるように、FASTKIT™ エライザVer.IIIキット (日本ハム株式会社中央研究所 : 以下FASTKIT) もしくはFASPEKエライザIIキット (森永生科学研究所 : 以下FASPEK) に付属の抽出液によって、希釈して冷凍保存した。

3.3. タンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE) による標準品規格の定性確認

SDS-PAGE は電気泳動槽 XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific : 以下Thermo) によって、NuPAGE 12 % Bis-Tris Gel (Thermo) を使用して行った。分子量マーカーにはSeeBlue® Plus2 Pre-

Stained Standard (Thermo) を使用した。電気泳動後のゲルはタンパク質染色液 Simply Blue™ Safe Stain (Thermo) で染色した。

4. 特定原材料 (落花生・小麦) タンパク質の定量

特定原材料の定量は通知法に従って、ELISAにより実施した¹。定量にはFASPEKとFASTKITを使用した。吸光度の測定はマイクロプレートリーダー Multiskan FC (Thermo) を使用し、ソフトウェアSkanIt Ver.2.51 (Thermo) を使用して、試料中のタンパク質濃度を計算した。

5 測定阻害因子の評価

5.1 ELISA測定時の抗原抗体反応への影響の評価

試料抽出液中の夾雑物によるELISA測定への評価のために、希釈後の試料抽出液にキットに付属の標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加した。標準溶液と併行して測定を行い、添加濃度に対する回収率を評価した。

5.2. 添加回収試験

試料からの抽出効率の評価のために、抽出前の各試料に標準溶液をタンパク質濃度として5 µg/gとなるように添加して抽出を行った。併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率を評価した。

5.3 回収率の評価基準

回収率は通知法の (別添4) アレルゲンを含む食品の検査方法を評価するガイドラインに示されている定量法の試験室間バリデ

ーションの評価基準を参考として、回収率が50-150%の範囲にある場合は夾雑物による影響がないと評価した¹⁾。

6. 改良抽出法の抽出条件の最適化

6.1. PVPによる抽出条件の最適化

カカオパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、1% (w/v) の重合度の異なるPVP (K15、K25、K30、K60、K90) を抽出液に添加して評価を行った。また、PVPの単量体であるN-Vinylpyrrolidone (NVP) とPVPが架橋結合した不溶性高分子のPolyvinylpolypyrrolidone (PVPP) についても同様に評価を行った。タンパク質の添加濃度に対する回収率を評価し、PACに対する結合能が高いPVPを確認した。次に、カカオパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、PVPを添加濃度0.25、0.5、1、2、4、10% (w/v) となるように調製して同様に評価を行い、回収率を比較してPVPの添加濃度を最適化した。

6.2. Gelatinによる抽出条件の最適化

シナモンからの抽出効率の改善にはCold water fish skin由来のGelatinが有効であることがこれまでに報告されている²⁾。シナモンパウダーに小麦もしくは落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、10% (w/v) のCold water fish skinを抽出液に添加して評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では実験動物や生体試料などの取扱いはないため、倫理面に配慮する研究には該当しない。

C. D. 研究結果および考察

1. 標準品の調製

1.1. 小麦検知用標準液

添加回収試験用の試料に添加する小麦タンパク質の標準品を調製するにあたって、通知法の小麦一次標準調製方法では14銘柄の小麦を混合して使用することが示されている¹⁾。しかしながら、全ての小麦の品種を入手することが困難であったため、入手可能であった北海道産ホクシン種からタンパク質を抽出した。小麦標準品原液中の総タンパク質濃度を確認したところ、タンパク質濃度は5.8 mg/mLとなり、通知法の標準品規格として示されているタンパク質濃度(4.0-6.0 mg/mL)の範囲内であった¹⁾。また、標準品原液についてSDS-PAGEを行い、泳動像を通知法の標準品規格で示されている泳動像と一致することを確認した¹⁾。

1.2. 落花生検知用標準液

添加回収試験用の試料に添加する落花生タンパク質の標準品を調製するにあたって、通知法の落花生標準品規格では千葉県産バージニア種の落花生を使用することが示されている¹⁾。このため、バージニア種として国内で流通している千葉県産千葉半立種の生落花生を入手し、タンパク質を抽出した。落花生標準品原液中の総タンパク質濃度を確認したところ、タンパク質濃度は3.4 mg/mLとなり、通知法の標準品規格として示されているタンパク質濃度(3.4 - 4.3 mg/mL)の範囲内であった¹⁾。また、落花生標準品原液についてSDS-PAGEを行い、泳動像を通知法の標準品規格で示されている泳動像と一致することを確認した¹⁾。

2. 測定阻害因子の評価

2.1. ELISAへの測定阻害の評価

2.1.1. 夾雑物による小麦ELISAキットへの影響

2.1.1.1. カカオによる測定阻害

図1に示すようにFASPEKの回収率は34-57%となり、カカオ中の夾雑物による顕著な阻害が確認された。一方で、FASTKITの回収率は90-125%となり、試料抽出液中の夾雑物による測定の阻害は確認されなかった。小麦の特定のタンパク質を測定対象としているFASPEKはカカオ由来の夾雑物からの影響を受けやすかったと考えられる。

2.1.1.2. シナモンによる測定阻害

図2に示すようにFASPEKの回収率は14-63%となり、シナモン中の夾雑物による顕著な阻害が確認された。一方で、FASTKITの回収率は53-94%となり、FASPEKと比較して測定阻害は受けにくかった。カカオによる測定阻害と同様に、特定のタンパク質を対象としているFASPEKはシナモン由来の夾雑物からの影響を受けやすかったと考えられる。

2.1.2. 夾雑物による落花生ELISAキットへの影響

2.1.2.1. カカオによる測定阻害

図3に示すように、FASPEKの回収率は92-118%となり、カカオ中の夾雑物による阻害は確認されなかった。一方で、FASTKITの回収率は29-55%となり、複数のタンパク質を対象とするFASTKITでカカオ中の夾雑物による測定阻害の影響を受けやすかった。このことから、FASTKIT

のみで測定対象となるタンパク質がカカオ中の夾雑物からの影響を特異的に受けたと推察される。

2.1.2.2. シナモンによる測定阻害

図4に示すようにFASPEKの回収率は60-101%となり、シナモン中の夾雑物による阻害は確認されなかった。一方で、FASTKITの回収率は25-87%となり、複数のタンパク質を対象とするFASTKITでシナモン中の夾雑物からの影響を受けやすかった。FASTKITのみで対象となるタンパク質がシナモン中の夾雑物から影響を特異的に受けたと推察される。

2.2. 添加回収試験

2.2.1. 小麦

2.2.1.1. カカオを含む食品からの添加回収試験

図5のControlに示すように、FASPEKの回収率は9-27%、FASTKITの回収率は13-40%となり、両キットで回収率は50%未満となった。カカオパウダーからの抽出効率は、これまでにEUの小麦の標準物質であるPWG-Gliadinをカカオパウダーに添加して評価した場合と同様に十分な回収が得られなかった⁴。

2.2.1.2. シナモンからの添加回収試験

図6のControlに示すように、FASPEKではシナモンに添加した小麦は全く回収されなかった。複数タンパク質を対象とするFASTKITでも回収率は0-25%となり、両キットで回収率は50%未満となった。カカオパウダーと比較して、シナモンパウダーからの回収は困難であった。

2.2.2. 落花生

2.2.2.1. カカオを含む食品からの添加回収試験

図7のControlに示すように、FASPEKの回収率は51-83 %となり、カカオを含む食品からの回収率は評価基準を満たしていた。一方で、FASTKITの回収率は15-47 %となり、カカオからの回収率は50 %未満となった。

2.2.2.2. シナモンからの添加回収試験

図8のControlに示すように、FASPEKの回収率は0-17 %となり、シナモンパウダーから落花生の抽出は困難であった。また、FASTKITの回収率は0-21 %となり、複数のタンパク質を対象とするFASTKITについてもシナモンパウダーから落花生の抽出は困難であった。

3. 抽出法の改良

3.1. PVPによる抽出条件の最適化

EUでの小麦の標準物質PWG-Gliadinをカカオパウダーに添加して評価した場合には、重合度の最も小さいPVP K15によって小麦の回収率の回復に対する効果が最も高いことがこれまでに確認されている^{3,4}。

このため、落花生の添加回収試験についても重合度の異なるPVPを抽出液に添加して評価した。試料1のカカオパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、重合度の異なるPVPを1 % (w/v) 抽出液に添加して抽出を行った。図9に示すように、落花生の測定でも、小麦で評価した場合と同様に重合度の最も小さいPVP K15によって回収率の改善に対する効果が

最も高かった⁴。次に、PVP K15の抽出液への添加濃度について評価を行った結果、添加濃度が1 % (w/v)の時に落花生の回収率が最も高かった。

最適化したPVP K15を1 % (w/v) 添加した抽出液でカカオを含む食品10試料について添加回収試験による評価を行った結果、全ての試料でPVPを添加した際にFASPEKとFASTKITの回収率の回復が確認された (図5 : 小麦、図7 : 落花生)。

3.2. ゼラチンによる抽出条件の最適化

試料2のシナモンパウダーに落花生の標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、PVP K15を1 % (w/v) 抽出液に添加して抽出を行った際には十分に回収率が得られなかった。過去の報告では、シナモンからの抽出効率の改善にはCold water fish skin由来のGelatinが有効であることが報告されている²。このため、Cold water fish skin由来のGelatinを10 % (w/v) 添加した抽出液によって、シナモンを含む食品13試料の添加回収試験による評価を行った。その結果、図6に示すように小麦の測定ではFASPEKとFASTKITの回収率の改善が確認された。しかしながら、落花生の測定では、50 %の回収率を満たさない試料も確認され、一部のシナモンパウダー (図8 : 試料8、12) では回収率は改善されなかった。このため、今後も精度管理用試料の調製法や抽出条件について検討する必要がある。

E. 結論

今年度は特定原材料 (小麦・落花生) の定量について、PACを含むカカオとシナモンによる定量への影響について評価を行っ

た。カカオとシナモンによる測定阻害は各キットが測定対象とするタンパク質によって差異が確認された。添加回収試験で回収率の低下が確認された試料について、カカオはPVPを抽出液に添加することによって回収率の上昇が確認された。また、シナモンはCold water fish skin由来のGelatinを抽出液に添加することによって、回収率の上昇が確認された。シナモンについては精度管理用試料の調製法や抽出条件について引き続き検討を行う必要がある。最終的には、改良した検査法を複数機関による室間共同試験で評価することができれば、改良法の適切な科学的根拠を示すことに繋がる。

成27年3月30日消食表第139号、別添 アレルゲン関係)による

2) 渡辺卓穂、安達玲子、鈴木達也、梅津麻実、佐藤夏岐. 平成26年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業) 報告書 149-163, 2014

3) 村上太郎. 平成26年度 科学研究費助成事業2016 年度 研究成果報告書, 2016

4) Taro Satsuki-Murakami, Ayuko Kudo, Atsushi Masayama, Masami Ki, Tetsuo Yamano. *Food Control* 84, 70–74, 2018

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

引用文献

1) 消費者庁「食品表示基準について」(平

以下 図表

表1 カカオを含む試料

| | 試料 | 生産国 |
|----|----------|--------|
| 1 | ココアパウダー | オランダ |
| 2 | ココアパウダー | オランダ |
| 3 | ココアパウダー | マレーシア |
| 4 | ココアパウダー | マレーシア |
| 5 | ココアパウダー | フランス |
| 6 | ローストカカオ豆 | タイ |
| 7 | ローストカカオ豆 | エクアドル |
| 8 | ローストカカオ豆 | インドネシア |
| 9 | カカオニブ | トーゴ |
| 10 | カカオニブ | コロンビア |

表2 シナモンを含む試料

| | 試料 | 生産国 |
|----|----------|--------|
| 1 | シナモンパウダー | スリランカ |
| 2 | シナモンパウダー | スリランカ |
| 3 | シナモンパウダー | スリランカ |
| 4 | シナモンパウダー | スリランカ |
| 5 | シナモンパウダー | ベトナム |
| 6 | シナモンパウダー | ベトナム |
| 7 | シナモンパウダー | ベトナム |
| 8 | シナモンパウダー | マレーシア |
| 9 | シナモンパウダー | マレーシア |
| 10 | シナモンパウダー | 中国 |
| 11 | シナモンパウダー | 中国 |
| 12 | シナモンパウダー | インド |
| 13 | シナモンパウダー | マダガスカル |

表3 Polyvinylpyrrolidone関連試薬

| 試薬 | 略称 | 入手先 | 分子量 ^{*1} |
|---------------------------|---------|------------|-------------------|
| N-Vinyl pyrrolidone | NVP | 東京化成工業 | 111 |
| Polyvinylpyrrolidone K 15 | PVP K15 | 東京化成工業 | 10000 |
| Polyvinylpyrrolidone K 25 | PVP K25 | 富士フィルム和光純薬 | 24000 |
| Polyvinylpyrrolidone K 30 | PVP K30 | 東京化成工業 | 40000 |
| Polyvinylpyrrolidone K 60 | PVP K60 | Merck | 160000 |
| Polyvinylpyrrolidone K 90 | PVP K90 | 東京化成工業 | 360000 |
| Polyvinylpolypyrrolidone | PVPP | Merck | NA ^{*2} |

*1 PVPは重量平均分子量を記載

*2 PVPPは不溶性のポリマーのため、算出不能

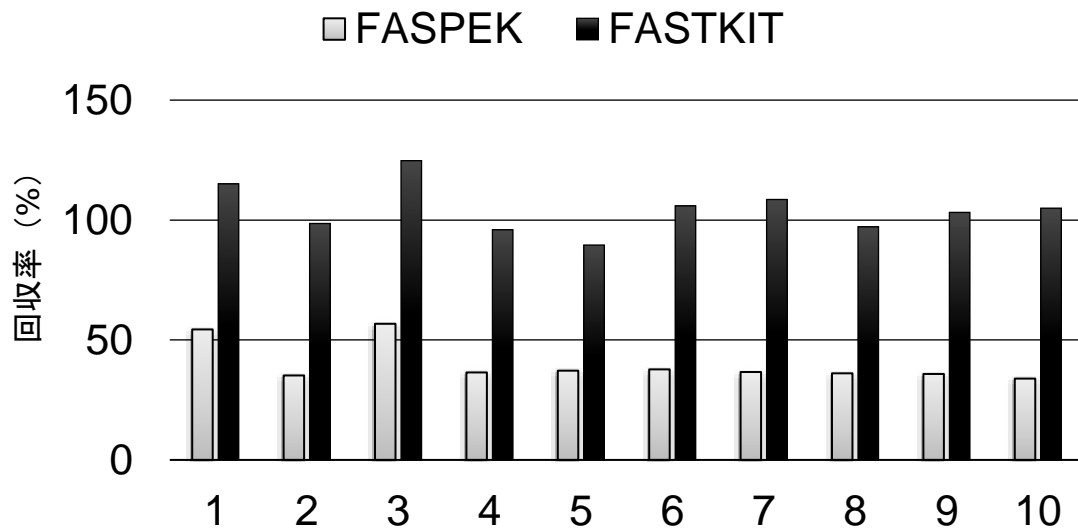


図1 カカオによる小麦の測定への影響

希釈後の試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定

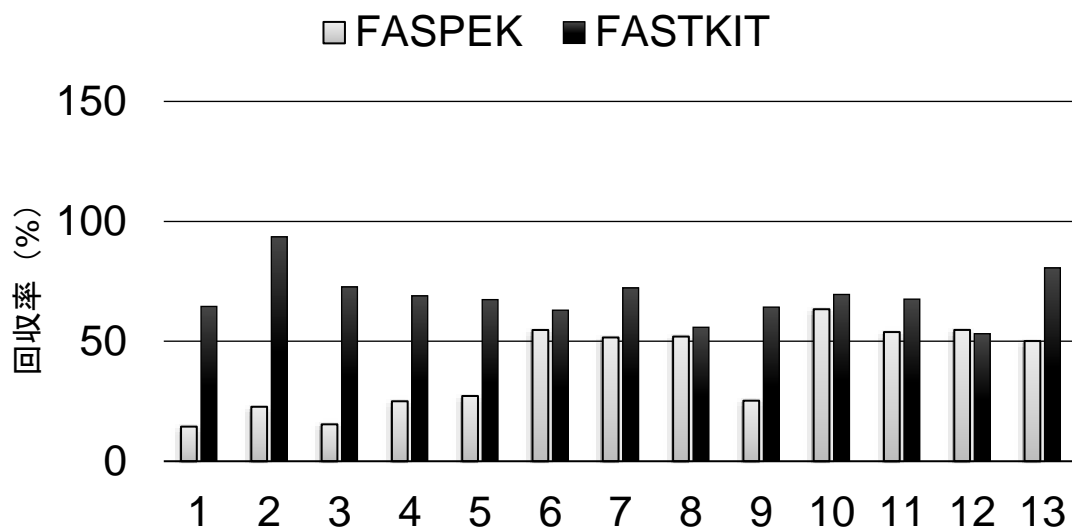


図2 シナモンによる小麦の測定への影響

希釈した試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定

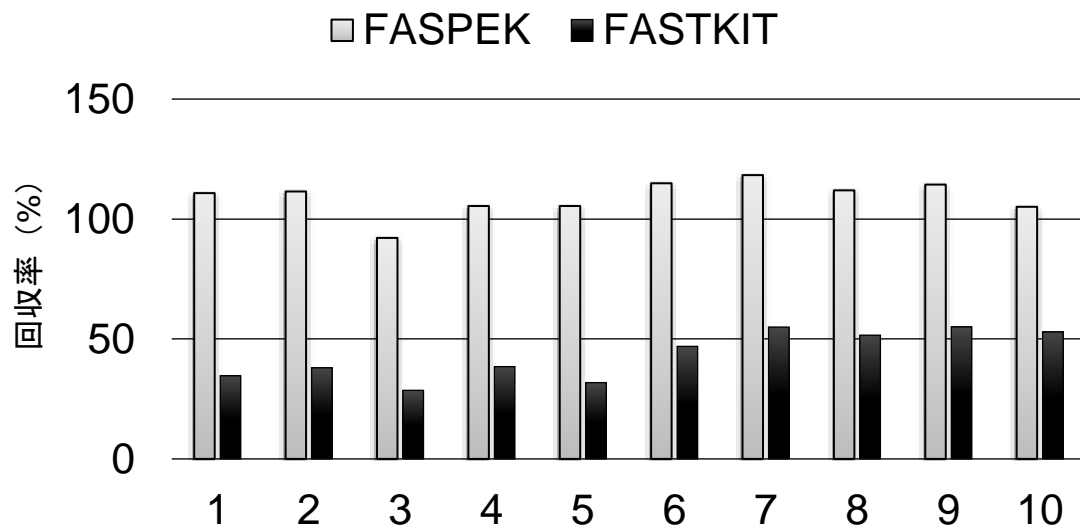


図3 カカオによる落花生の測定への影響

希釈後の試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定

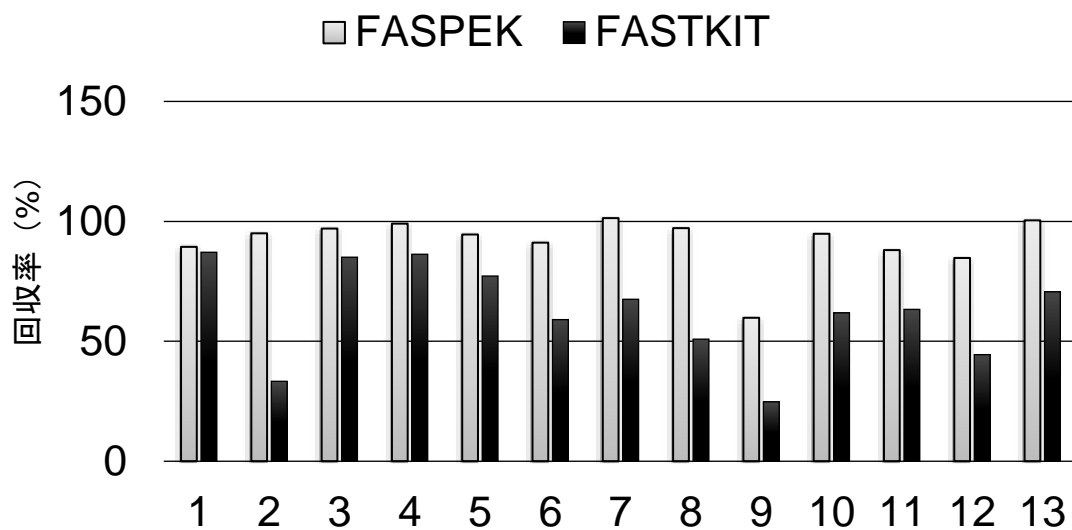
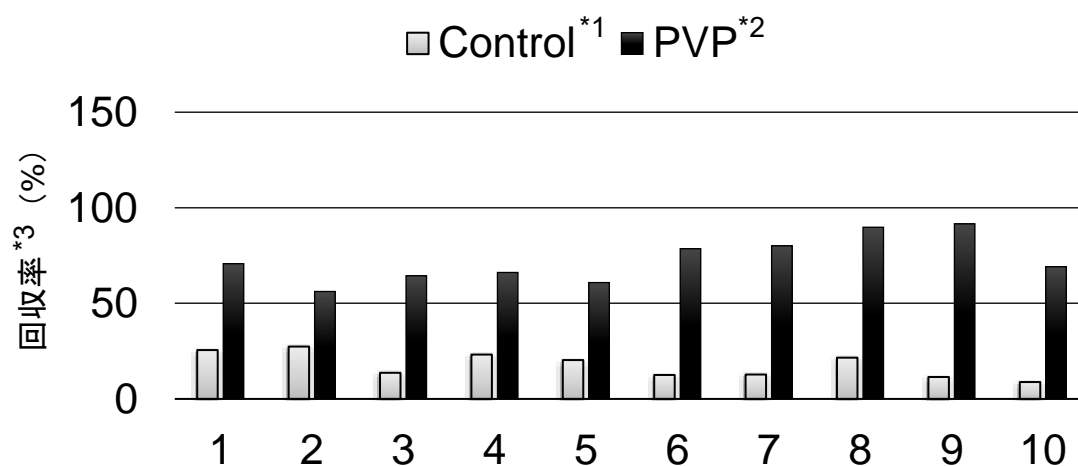


図4 シナモンによる落花生の測定への影響

希釈後の試料抽出液に各キットの標準溶液を6.25 ng/mLとなるように添加して測定

FASPEK



FASTKIT

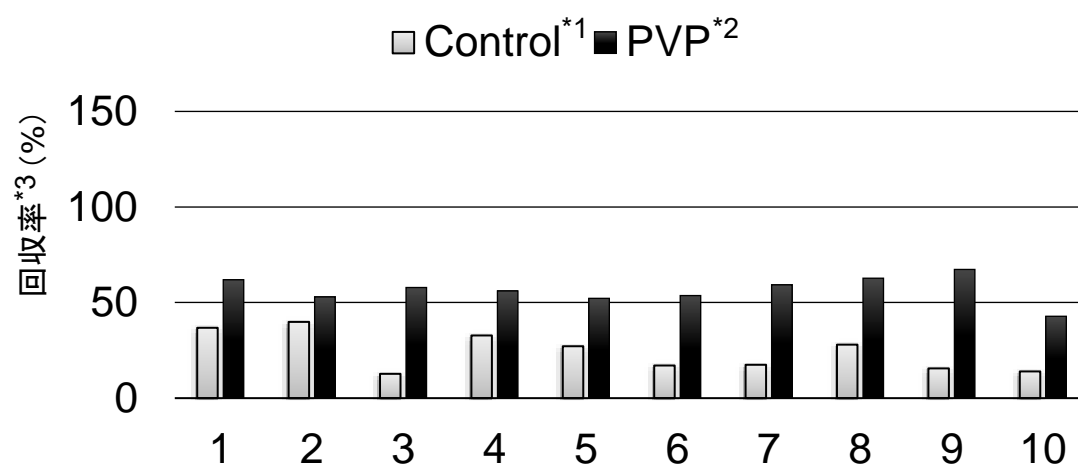


図5 カカオを含む食品からの小麦の添加回収試験

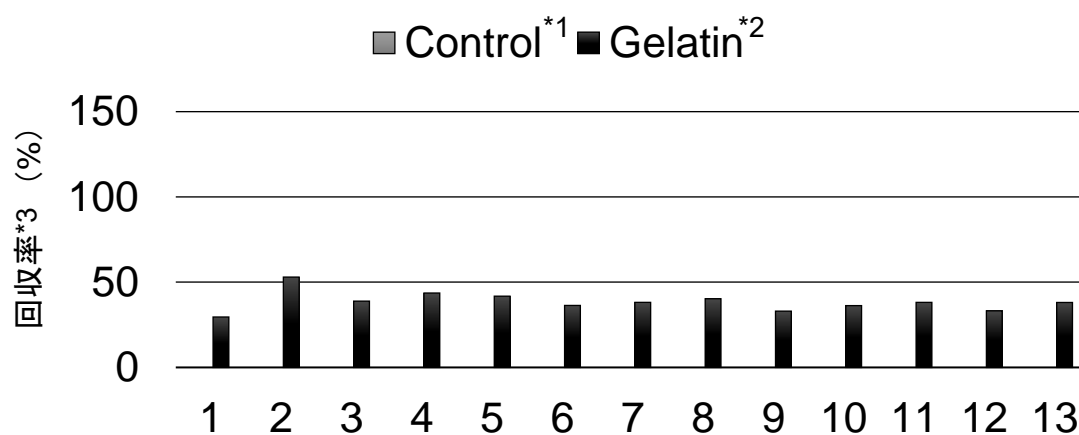
各試料に標準溶液をタンパク質濃度として5 µg/gとなるように添加して抽出

*1 キットの抽出液によって抽出

*2 抽出液にPVPを1% (w/v)添加して抽出

*3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

FASPEK



FASTKIT

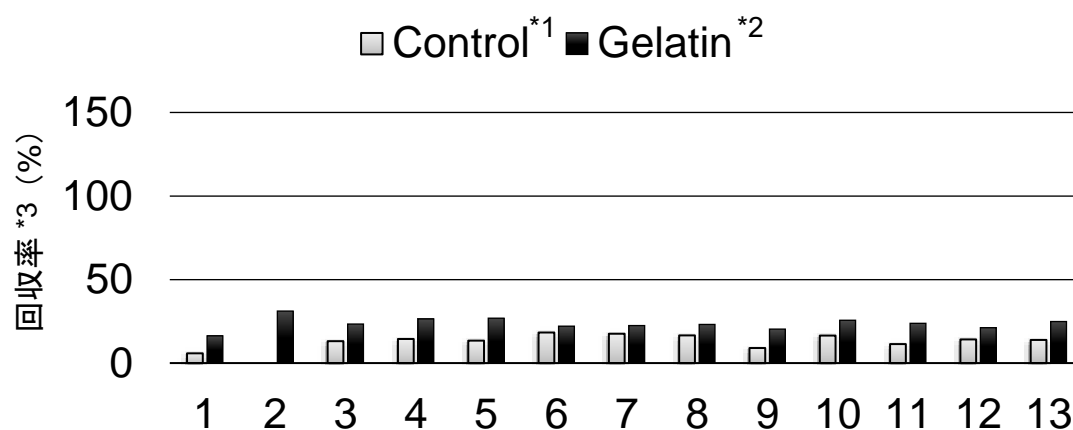
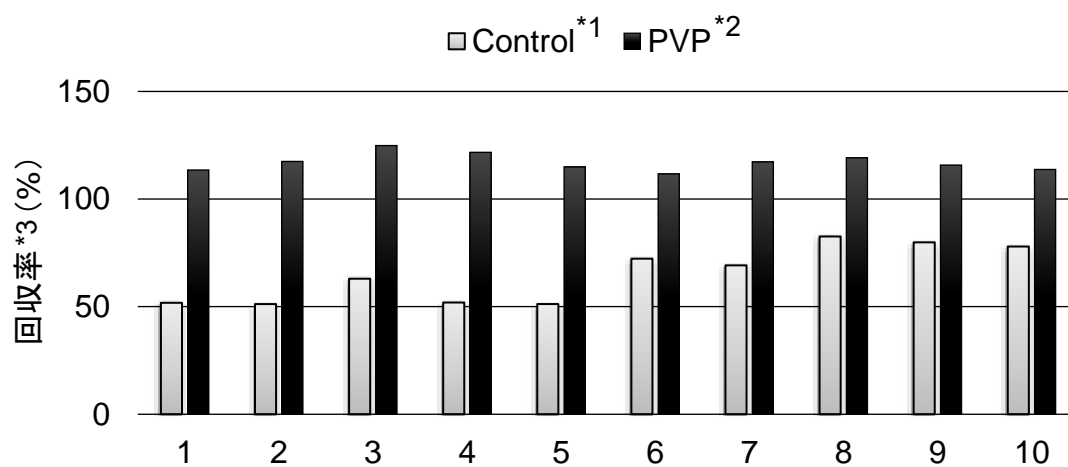


図6 シナモンを含む食品からの小麦の添加回収試験

- *1 キットの抽出液によって抽出
- *2 抽出液にGelatin を10 % (w/v)添加して抽出
- *3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

FASPEK



FASTKIT

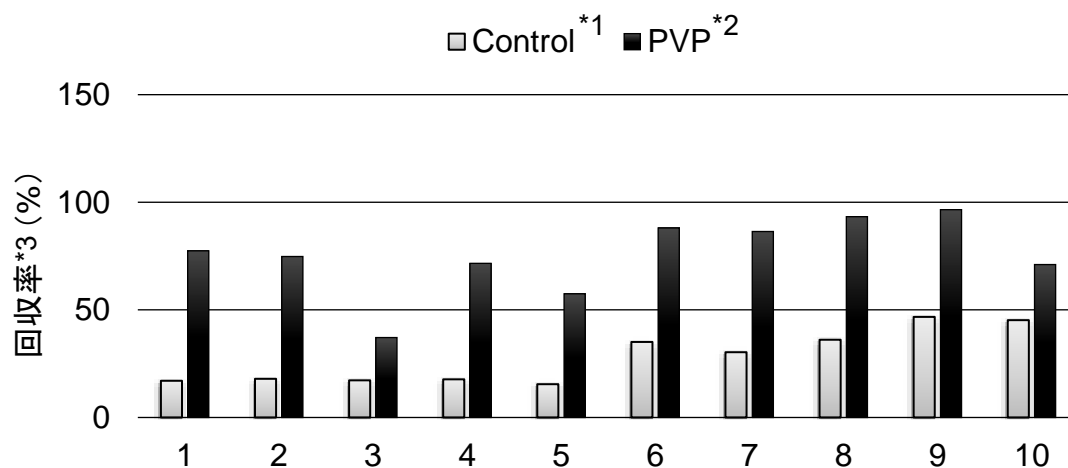
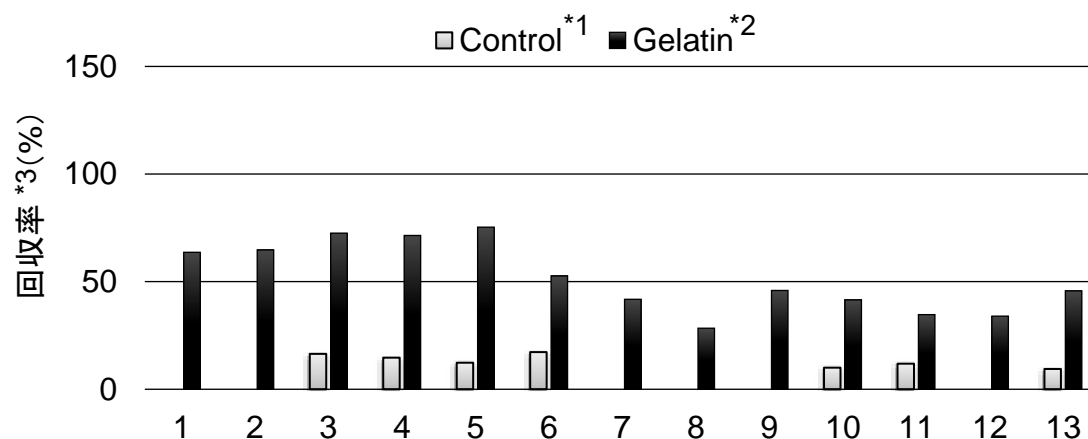


図7 カカオを含む食品からの落花生の添加回収試験

- *1 キットの抽出液によって抽出
- *2 抽出液にPVPを1% (w/v)添加して抽出
- *3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

FASPEK



FASTKIT

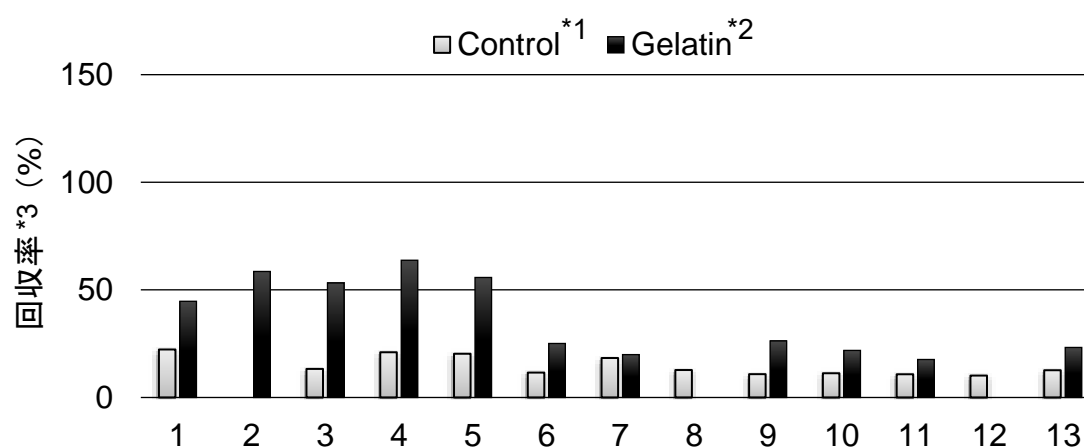


図8 シナモンを含む食品からの落花生の添加回収試験

- *1 キットの抽出液によって抽出
- *2 抽出液にGelatinを10 % (w/v)添加して抽出
- *3 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率

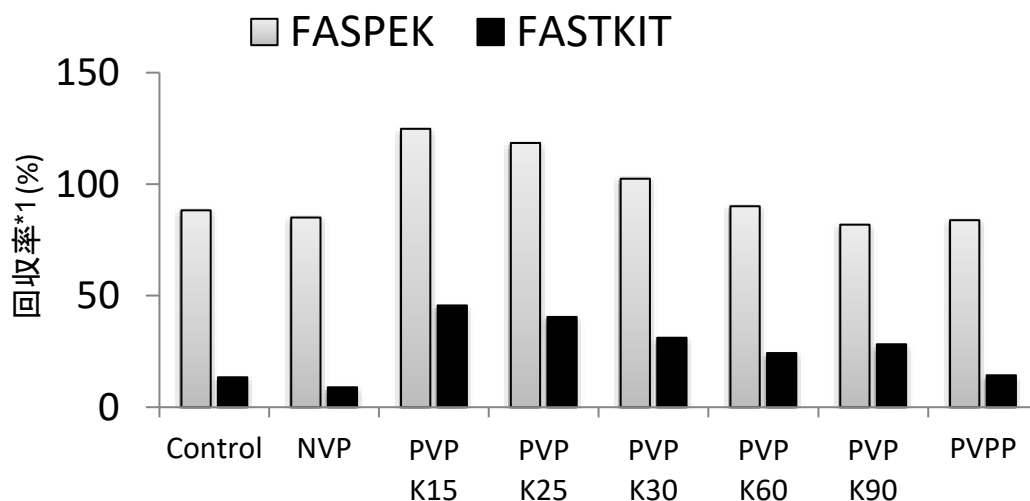


図9 Polyvinylpyrrolidone関連試薬の添加によるカカオからの落花生の添加回収試験

カカオに落花生規格標準品を5 µg/g添加し、各化合物を1 % (w/v)含む抽出液で抽出後にFASPEK とFASTKIT によって測定

Control : 通常の抽出液、NVP : 1-vinyl-2-pyrrolidone、PVP: Polyvinylpyrrolidone, PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone

*1 併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率