

加工食品の食物アレルギー遺伝子検査の高感度化に関する研究

宮崎, 悦子

<https://hdl.handle.net/2324/7157397>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



加工食品の食物アレルギー遺伝子検査の高感度化に関する研究

宮崎悦子

2023

目次

第1章 緒論	1
第1節 食物アレルギーの概要	1
第2節 食物アレルギーに関する食品表示及び検査法	9
第3節 本研究の目的と概要	19
第2章 福岡市における食物アレルギー（小麦）の食品混入状況	20
第1節 緒言	20
第2節 実験材料及び方法	21
第3節 結果及び考察	26
第3章 リアルタイム PCR を用いた加熱加工食品における小麦遺伝子検出の高感度化	33
第1節 緒言	33
第2節 実験材料及び実験方法	35
第3節 結果及び考察	40
第4章 開発した小麦遺伝子検査法の実用性評価.....	53
第1節 緒言	53
第2節 実験材料及び方法	55
第1項 小麦の銘柄による実用性評価	55
第2項 加熱加工食品による実態調査及び加熱モデル実験	57
第3節 結果及び考察.....	60
第1項 小麦の銘柄による実用性評価	60
第2項 加熱加工食品による実態調査及び加熱モデル実験	62
第5章 総括.....	82
謝辞.....	85
引用文献	86

第1章 緒論

第1節 食物アレルギーの概要

食物アレルギーとは、「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義（Boyce et al.,2010）され、アレルゲン曝露から症状誘発の経過時間によって、即時型反応及び非即時型反応に分類される。食物アレルギーによって誘発される症状は、表 1-1 に示すように皮膚、粘膜、呼吸器、消化器、神経、循環器等の様々な臓器に及ぶ（日本医療研究開発機構、2020）。特に、アナフィラキシーは、「アレルゲン等の侵入により、複数臓器に全身性にアレルギー症状が惹起され、生命に危機を与え得る過敏反応」と定義（海老沢ら、2021）されており、重要である。

日本では、2002 年から 2005 年までは厚生労働省、2008 年からは消費者庁により、3 年おきに即時型食物アレルギーの調査が行われている。これらの調査は全国のアレルギー専門医の協力により実施されており、アレルギーに関する行政施策の資料として活用されている。表 1-2 に示すように、直近の 4 回の調査結果の即時型食物アレルギーの報告症例数の推移から、食物アレルギーの患者数は増加傾向にあることが示されている。アレルゲンとしての小麦は、2001 年度の調査開始から、鶏卵、牛乳に次ぐ上位 3 品目の一つとされてきた。2020 年度の調査ではくるみを含めた木の実類の発症報告数の合計が小麦を抜いて、鶏卵及び牛乳に次ぐ 3 位となったが、品目別でみると小麦は 3 位となり、変わらず報告数は多い傾向にある。即時型食物アレルギーの原因品目の割合を図 1-2 に示す。初発年齢による患者の頻出度合いは患者の年代ごとに異なっており、0 歳では鶏卵、牛乳に次ぐ 3 位で多いが、1～17 歳では低く、18 歳以上では 1 位となっている。特に小麦アレルギーの

初発年齢が 18 歳以上の事例は難治性であり，食物依存性運動誘発アナフィラキシー（Food-dependent exercise-induced anaphylaxis : FDEIA）の主要原因（海老沢，2021；相原，2007）になっている。

表 1-1 即時型食物アレルギーの代表的な症状（日本医療研究開発機構 2020）

臓器	代表的な症状
皮膚	紅斑、蕁麻疹、血管性浮腫
粘膜	結膜充血・浮腫、鼻汁、くしゃみ、口唇の違和感
呼吸器	咳、喘鳴、呼吸困難
消化器	悪心、嘔吐、腹痛、下痢、血便
神経	頭痛、活気の低下、眠気、不穏、意識障害
循環器	血圧低下、頻脈、徐脈、不整脈

表 1-2 即時型の食物アレルギー報告症例数の推移

調査年度	2011	2014	2017	2020
症例数	2954	4644	4851	6080

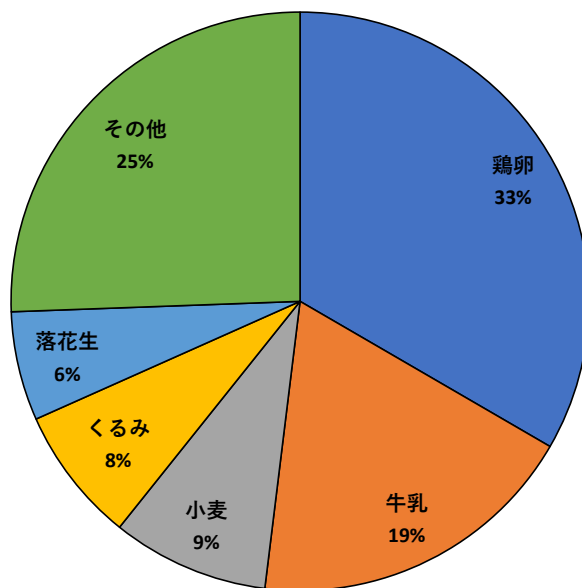


図 1-1 即時型食物アレルギーの原因品目の割合

小麦アレルギーは、多くの食物アレルギーと同様に IgE 依存型であり、アレルゲン特異的 IgE 抗体が誘導され、マスト細胞上の高親和性 IgE 受容体に結合して感作が成立する。マスト細胞上の複数のアレルゲン特異的 IgE 抗体とアレルゲンの結合により、IgE 抗体が架橋されて活性化され、脱顆粒により代表的な血管透過性亢進物質であるヒスタミンが放出され、局所では浮腫や蕁麻疹を、全身では血圧低下を引き起こす。その後、数分から数十分の間にロイコトリエン類、プロスタグランジン類等脂質メディエーターを、数時間の間には種々のサイトカイン、ケモカインを合成して分泌する（海老沢ら 2021）。アレルゲンの本体はタンパク質であり、特異的 IgE 抗体が結合するタンパク質をアレルゲンコンポーネント、その特定結合部位をエピトープ（抗原決定基）という。エピトープは一連のアミノ酸配列で構成される「連続性エピトープ」及び、立体構造によって形成された不連続なアミノ酸配列で構成される「構造的エピトープ」に分類される。連続性エピトープは加熱などの立体構造の変化でも失活せずアレルゲン性を有するとされ、小麦は連続性エピトープに分類される。異なるタンパク質間でも同じ構造をしたエピトープが存在すれば交差抗原性を示すことがあり（海老沢ら、2021）大麦は小麦と交差抗原性を示すことが知られている。小麦に含まれるタンパク質は、小麦重量の約 10%を占めており（日本食品標準成分表（八訂））、その性質により図 1-2 に示すように分類される。塩に対する溶解性によって、塩可溶性タンパク質及び塩不溶性タンパク質に大別される。塩可溶性タンパク質（画分）は小麦タンパク質の約 15%を占め、アルブミン、グロブリン、 α -アミラーゼ/トリプシンインヒビター等が含まれている。塩不溶性タンパク質（画分）はさらに、エタノール水で可溶性及び不溶性タンパク質に分けられ、エタノール水可溶性タンパク質にはグリアジン（ α/β -、 γ -、 ω -1,2-、 ω -5-）が含まれる。エタノール水不溶性画分を還元剤と緩衝液で反応させ、可溶化したタンパク質がグルテニンであり、グルテニンは、さらに、60%1-プロパ

ノールで可溶化する low-molecular weight (LMW)-グルテニン及び high-molecular weight (HMW)-グルテニンに分画できる (長尾, 2014). グルテンは, 小麦粉に水を加えて混捏することで, グルテニン同士がジスルフィド結合 (S-S 結合) して多量体を形成し, その間に単量体であるグリアジンが非共有的に結合して構成される. 調理, 加熱により小麦タンパク質中の S-S 結合がより強固になるとされ, 加熱後も強いアレルギー性を有する (田中ら, 2017). α/β -及び γ -グリアジンはあわせてグルテンの60%, ω -1,2-及び ω -5 グリアジンはそれぞれグルテンの5%程度含まれている. グルテンに含まれる主要なタンパク質の分子量及びその存在率を表 1-3 (長尾, 2014) に示す. 一般的に, アレルゲンとなりやすいタンパク質は, 可溶性を示すことが多い. しかし, 小麦の場合では, 不溶性のグルテンを形成するグリアジンが主要なアレルゲンコンポーネントとなり, 加熱によっても不溶性のグルテンが微量で強いアレルギー症状を惹起する. その要因として, ω -5 グリアジンの分子構造がある. ω -5 グリアジンは, 短い N 末端配列に続いて, 分子のほぼ全長に及ぶ反復配列構造を持ち, その大部分に IgE エピトープのモチーフが存在する (Battais et al 2008). さらに, この分子にはシステイン残基が存在せず, ジスルフィド結合によってグルテンの重合体に結合しないという特徴がある (伊藤ら, 2019).

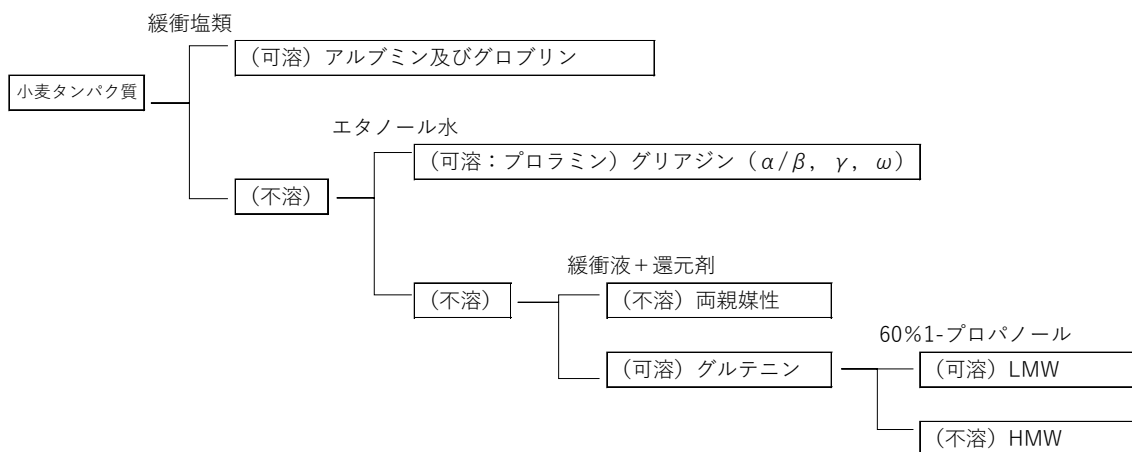


図1-2 小麦に含まれるタンパク質の分類

LMW : Low molecular weight-グルテニン, HMW : High molecular weight-グルテニン

表1-3 グルテンに含まれる主要なタンパク質の分子量及びその存在率

分類	分子量 (MW)	グルテンに対する 割合 (%)	アミノ酸組成割合				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω -グリアジン	49,000-55,000	3-6	56	20	9	1	1
ω -1,2-グリアジン	39,000-44,000	4-7	44	26	8	1	1
α/β -グリアジン	28,000-35,000	28-33	37	16	4	3	2
γ -グリアジン	31,000-35,000	23-31	35	17	5	1	3
x-HMW-グルテニンサブユニット	83,000-88,000	4-9	37	13	0	6	19
y-HMW-グルテニンサブユニット	67,000-74,000	3-4	36	11	0	5	18
LMW-グルテニン	32,000-39,000	19-25	38	13	4	1	3

小麦によって惹起されるアレルギーは複数あり、それぞれ IgE が認識するエピトープが異なる。小麦による食物アレルギーの診断には、血清中抗原特異的 IgE の検出が行われており、日本国内では、CAP-FEIA (Capsulated hydrophilic carrier polymer- Fluorescence Enzyme Immunoassay) 法が広く用いられている (海老沢ら 2021)。小麦 CAP-FEIA の抗原には塩可溶性タンパク質 (アルブミン及びグロブリン)、グルテン CAP-FEIA の抗原にはグルテンタンパク質が用いられている。また、小麦のアレルギーとして重要なものに、食物依存性運動誘発アナフィラキシー (FDEIA) がある。初発年齢のピークは 10~20 歳代であり、寛解しにくく、患者は症状に応じて小麦の除去食が必要となる。FDEIA は食後 2 時間以内の運動による発症が大部分であるが、食後最大 4 時間を経過して発症した報告事例もある。運動以外にも、アスピリン等の非ステロイド性抗炎症薬 (Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs) の内服、アルコールの摂取等も症状の惹起の要因となる。FDEIA エピトープとしては、 ω -5 グリアジン及び HMW-グルテニンが報告されており、前述の塩可溶性抗原による小麦 CAP-FEIA では診断のつきにくかった患者向けに ω -5 グリアジンを抗原とした診断法と組み合わせる診断法が広まっている (海老沢ら, 2021)。また、最近の話題として、島根大学を中心に、FDEIA の患者向けに、 ω -5 グリアジンの遺伝子座を欠損した低アレルゲン小麦品種「島根夢こむぎ」(特許 2006-126083) の実用化に向けた研究が進められている (老田, 2008; 森田, 2023)。

FDEIA には経皮感作による小麦アレルギーも含まれる。2011 年頃頃から加水分解小麦タンパク質を含有する洗顔石鹸の長期使用により経皮・経粘膜的に感作され、小麦加工品の経口摂取により食物アレルギーを誘発する事例が数多く報告された。加水分解小麦タンパク質 (HWP : Hydrolyzed Wheat Protein) は、グルテンを加熱条件下で塩酸や酵素などにより細かく分解した化合物の総称である。グルテンは加水分解することによって水溶性を増し、高い保湿性を獲得するため、化粧品や

シャンプー・石鹸などの製品に添加される。HWP に皮膚や粘膜を通じて長期間曝露された場合には HWP に特異的な抗体ができて、HWP を本来含んでいない小麦を経口摂取した場合でも、代謝の過程でトランスアミナーゼによる脱アミド化によりグルタミンがグルタミン酸に変化することで、HWP との交差反応性が生じ、小麦による経皮アレルギーを誘引したと考察されている（酒井ら，2014）。

また、食物アレルギーとは異なるが、小麦のグルテンなどによって惹起される自己免疫疾患として、セリアック病がある。日本では患者数が少なくあまり知られていないが、欧米では有症率が1%程度とされ、よく知られた疾病である（福永ら，2021）。セリアック病の症状は、慢性的な腹痛・下痢とされており、小麦摂取量の増加に伴い、日本でも患者増加の可能性はある。

第2節 食物アレルギーに関する食品表示及び検査法

食物アレルギー患者、経皮感作によるアレルギーが発症した患者及びセリアック病患者にとって、治療法は小麦及びその加工品の除去食が基本となる。また、近年はアレルギー等の患者ではなく、健康志向、ダイエット等の目的で、小麦及びグルテンを摂取しない食事を自ら選ぶ人が増加し、グルテンフリーをうたう商品も増えている。小麦は、パン、うどん等の主食だけでなく、様々な加工品の原料となることから、小麦粉を使用しない場合でも、他の原材料に小麦タンパク質、小麦加工品を含む可能性がある。また、同一製造所内における微量の小麦粉等による汚染（橋本ら、2017）も考えられる。そのため、小麦粉及び小麦タンパク質を微量以上に含む食品の摂取を避けるには、食品選択の際に根拠となる食品表示が重要となる。消費者庁の調査報告（消費者庁、2012、2015、2018、2021）では、小麦に関する不適正表示による誤食事例は直近4回の調査では2011年に18事例、2014年に23事例、2017年に21事例及び2020年度に23事例が報告されており、少なくとも年間20件程度の小麦の誤食による健康被害事例が発生していると考えられる。また、これらの報告事例は比較的重症の事例であることから、実際には、軽微な健康被害の未報告事例が数多く発生しているものと推察される。

食品表示については、科学的な根拠に基づくかつ実用的なものでなければならない。信頼性の高い表示がなされることで、疾病の治療のために小麦除去の必要がある患者及びその家族が安心して食品を選択でき、栄養面及び食事の豊かさの向上につながる。また、自ら小麦及びグルテンを避けている人々にとっても有益と考える。1999年にCODEXで食物アレルギーを引き起こす原材料に関する表示のガイドラインが示されたことを受け、国内では2001年の食品衛生法の改正に伴い2002年に特定原材料5品目（卵、小麦、乳、そば、落花生）を対象にした食品表示制度が導入され

た。2015年から食品表示に関する所管が消費者庁に移管されたことに伴い、2023年現在は内閣府令で定める8品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生、えび、かに、くるみ）については特定原材料として、表示が義務付けられている（ただし、くるみは2025年4月から）。また、通知（消費者庁次長通知2015）で定められた特定原材料に準ずる20品目（アーモンド、あわび、いか、いくら、オレンジ、カシューナッツ、キウイフルーツ、牛肉、ごま、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご及びゼラチン、50音順）については表示が推奨されている。

アレルギーに関する表示については、 $10\mu\text{g/g}$ （以下、「 mg/kg 」とする。）以上のタンパク質が検出された場合は、微量を超えて含まれていると判断され、表示が必要となる。そこで、表示が必要かどうかの行政上の判断のもととなる判断樹（図1-3に示す）及び検査法が示されている。行政検査の大きな目的として特定原材料の表示がないものに対して、微量の混入、汚染等がないかの検査を実施し、表示が適正であるかを確認することがある。まず、特定原材料の表示の有無を確認して、検査特性の異なる2種のサンドイッチELISA（Enzyme-linked immuno-sorbent assay）法によるキットを用いたスクリーニング定量検査を行う。ELISA法は、試料から抽出した液体中に存在する目的の抗原（タンパク質）を定量化する分析手法として普及している。抗原に対する抗体が固相化されたプレートに抗原を補足させ、一次抗体で抗原を補足しサンドイッチ状態にする。その後、一次抗体に結合する酵素標識した二次抗体及び基質を添加し、吸光度を測定することで定量を行うものである。これらのキットでは、より感度上昇が見込める一次抗体または二次抗体にビオチン標識をして酵素標識したストレプトアビジンによる検出法が採用されている。サンドイッチELISA法の概念図を図1-4に示す。

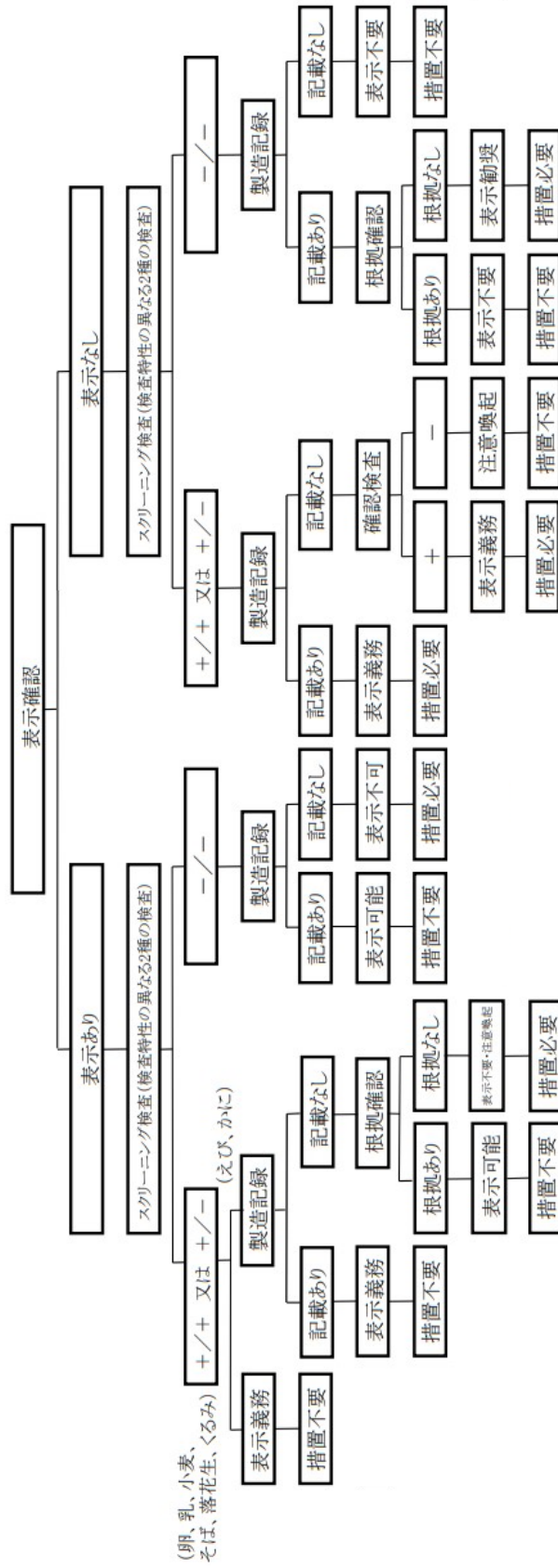


図 1-3 アレルゲンを含む食品の検査法に関する判断樹 (消費者庁通知より抜粋)

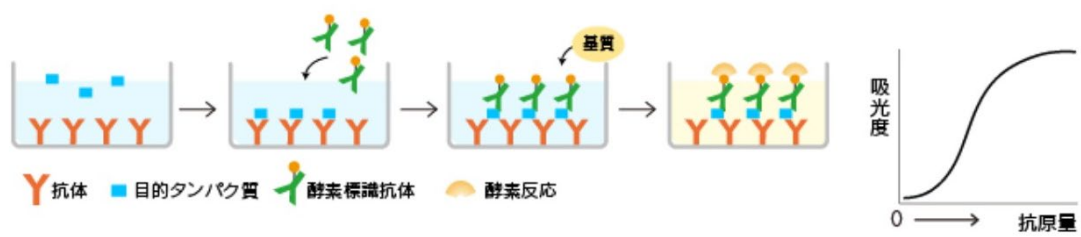


図 1-4 サンドイッチ ELISA 法の測定原理

試料は、1包装全量を均質化したものから1gを採取し、各キットに記載された方法で行う。通知（消費者庁次長通知2015）では、あらゆる加工食品を検査対象と想定されていることから性状による測定結果の変動を縮小するため以下の(1)～(7)に示す検査原則が明記されている。すなわち、(1)検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とすること。(2)試料中の特定原材料成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に均質化操作を行うこと。(3)均質化した試料を調製試料とすること。(4)検査に供する調製試料は固体や液体の性状にかかわらず、重量測定にて一定量を採取すること。(5)試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない場所で実施すること。(6)微量測定のため、粉碎器、フードカッター、秤量用器具は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きすること。又は超音波洗浄機を用い、30分間の超音波処理を行うこと。(7)試料の調製場所と検査場所は、区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐことである。通知では、定量検査法（ELISA法）においては、試験室数8以上、試料数5以上（ただし、試料に含まれる特定原材料タンパク質濃度レベルには、10mg/kgを含むこと）で実施した試験室間バリデーションで、50%以上、150%以下の回収率及び25%以下の室間精度であることが求められている。これら試験室間バリデーションの結果及び偽陽性、偽陰性のデータについて、説明書等に添付し、公表されており、これらの検査方法の評価に当たって、同通知の別添4「アレルギーを含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に準拠していることが求められている。通知に記載されたバリデーションが確認された検査キットで現在市販されているものは、複合抗原を認識するポリクローナル抗体を利用した日本ハム（株）製FASTKIT エライザ Ver.III 小麦（以下、「日ハムキット」とする。）、単一抗原を認識するポリクローナル抗体を利用した（株）森永生科学研究所製FASPEK エライザII 小麦（グリアジン）（以下、「モリナガキット」とする。）及びモノクロー

ナル抗体を利用したプリマハム（株）製アレルギーアイ ELISAI 小麦の3種がある（穂山 2003）。

通知では、抗体の性質の異なる2つのキットを用いて検査を実施することとなっており、国内で特定原材料の検査を実施している機関が参加した外部精度管理調査では、ポリクローナル抗体を利用した日ハムキット及びモリナガキットの2つの採用実績が圧倒的に多く、福岡市でもこの2つのキットを収去検査で採用している。検査では、1 gの試料に対し、日ハムキットの検体抽出液 19 mLを加えて、室温下で 12 時間以上往復振とうすることでタンパク質を抽出し、遠心後上清をろ過したものを試験溶液とする。試験溶液を2つのキットの希釈液でそれぞれ 20 倍希釈し、並行して ELISA 法による定量を行う。キットに付属の小麦タンパク質の標準品及び試験溶液を抗体固相化プレート上で反応させ、標準品の吸光度から作成した検量線を用いて試料に含まれる小麦タンパク質を定量し、定量値が 10 mg/kg 以上の場合には小麦陽性、10 mg/kg 未満の場合には小麦陰性と判定する。

ただし、定量値が 8 mg/kg 以上 12 mg/kg 未満の場合は、均質化した試料からの抽出を再度行い、1 回目と2回目の定量値の平均が 10 mg/kg 以上となった場合に小麦陽性と判定する。検量線の最小濃度は 0.78 ng/mL であるため、試料換算で 0.3 mg/kg が定量下限となる。2つのキットによる ELISA 法の定量結果で、いずれか一方でも小麦陽性と判定された場合は、判断樹に基づき製造記録の確認が行われ、る。確認検査は、記載があれば、表示義務の措置が必要となる。製造記録の記載がない場合は、確認検査が実施され小麦の場合は PCR（Polymerase Chain Reaction）法となっている。PCR 法は検体から抽出した DNA を鋳型として、目的の領域に相補的な短い一本鎖のオリゴヌクレオチドであるプライマー対ヌクレオチド、DNA 合成酵素等とともに温度を上下させることで反応を繰り返し、プライマーで挟まれた遺伝子領域を指数関数的に増幅させる手法である。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、蛍光色素で染色することで、遺伝子増幅の有無を確認でき

る。増幅したい領域に適したプライマー対を設計することで、任意の遺伝子を検出できるが、増幅領域、プライマー長、アニーリング温度、DNA 酵素等の条件により、遺伝子の増幅感度が異なる。通知に記載の検査法では、試料 2 g から 2 点並行試験で DNA を抽出し、小麦等の植物由来のアレルゲンは、植物に共通な葉緑体の遺伝子を陽性コントロールとして、増幅を確認する。その後、小麦に特異的な遺伝子 (Triticin 前駆体) の一部領域が増幅した場合に、小麦陽性と判定することとなっている。えび及びかにの場合は、スクリーニング検査の ELISA 法では、アレルゲンのタンパク質を検出するため区別されず甲殻類として検査されるが、PCR 法による確認検査では遺伝子を検出するため、えび、かにを区別して検出することが可能となる。一方、卵及び牛乳の確認検査は、遺伝子では卵と鶏肉、牛乳と牛肉を区別できないため、タンパク質を検査するウェスタンブロット法が採用されている。ウェスタンブロット法は、検体から抽出したタンパク質を還元剤及び界面活性剤 SDS と反応させ、ポリアクリルアミドゲルを電気泳動して分子量で分離する SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)を行った後に、タンパク質を疎水性メンブレンに転写させ、目的のタンパク質を抗体で検出する方法である。卵タンパク質を検出する場合は卵白アルブミン又はオボムコイド、乳タンパク質を検出する場合はカゼイン又は β ラクトグロブリンのどちらか一方の抗体を用いることとなっている。

このように、日本の食品表示法に基づく食物アレルゲンの表示制度はスクリーニング検査及び確認検査によって検査結果の信頼性が確保されている。また、タンパク質の含有量の基準値を 10 mg/kg とすることで、実際のアレルギー患者の生活を考慮した現実的な制度であるといえる。国内では、通知に記載されたバリデーションを確認済みの ELISA 法による定量検査が必須であるため、前述した 3 社のキットが使用されているが、海外のメーカーでも同様の ELISA 法のキットを

販売しており、一部の海外メーカーの ELISA 法のキットも入手が可能である。ウェブサイトで情報が得られたキットについて表 1-5 に示す。キットの抗原は、グリアジンのものとグルテンのものに二分される。定量下限は、グリアジンが 0.5~1 mg/kg, グルテンが 1~4 mg/kg であり、日本同様、微量のグリアジン又はグルテンタンパク質を検出可能であると考えられる。欧米では、セリアック病の患者のために、グルテンが 20 ppm (20 mg/kg) 未満のときに「グルテンフリー」と表示することが可能となっていることから、日本製では市販されていないグルテンを対象とした検査キットが多いものと考えられる。そのため、食品の輸入の際などに、海外製の小麦の ELISA キットによるグルテン含有量検査結果を小麦アレルギー検査の結果として採用することには注意が必要である。情報が入手できた一部のキットの販売価格は、96 回分あたり、日本製のキット平均約 80,000 円と比べて、同等か高価であった。通知法に基づく検査を実施する場合は、定量値が 8 ~12 mg/kg の場合はすぐに再検査を実施する必要があるため、2 キット掛ける 2 セット必要であり、1 回の検査に係る費用がキット代だけで 30 万円程度必要である。全国の地方衛生研究所の食品の理化学検査部門の中で、特定原材料の検査を実施しているのは、比較的規模の大きい自治体に限られている。検査人員の数、検査手法が高度、新たに検査機器を導入する必要がある等の理由もあるが、使用するキットが高額だということも検査機関が少ない理由の一つでもあると推察される。食物アレルギーは原因となる食物、患者は増加が見込まれており、食物アレルゲンの検査は健康に直結する重要な検査であり、全国に広く普及するために、より安価な検査手法の確立が望まれる。

表 1-4 海外及び日本で市販されている主な ELISA 法キット

製造者	原産国	商品名	LOD(mg/kg)	well
ELISA systems	オーストラリア	generaation 3 Gulten Residue detection kit	2	48
		Gluten Residue Detection Kit	1 (Gliadin)	48
Romer Labs	オーストラリア	AgraQuant® Gluten	4(Gluten)	96
		AgraQuant® Gluten G12®	4(Gluten)	96
GOLD STANDARD DIAGNOSTICS	ハンガリー	SENSISpec INgezim Gluten Quick 96 wells	3	96
		SENSISpec INgezim Gluten R5 96 wells	3	96
Crystal Chem	アメリカ	Wheat/Gluten (Gliadin) ELISA Kit	0.31(Wheat)	96
		Wheat/Gluten (Gliadin) ELISA Kit II	0.31(Wheat)	96
R-Biopharm AG	ドイツ	RIDASCREEN® Gliadin	0.5 (Gliadin) , 1(Gluten)	96
		RIDASCREEN® Total Gluten	4 (Gluten)	96
		RIDASCREEN® FAST Gliadin	0.5 (Gliadin) , 1(Gluten)	96
ELISA Technologies	アメリカ	ALLER-TEK™ Gluten ELISA	5	96
森永生科学研究所	日本	FASPEKエライザII小麦(グリアジン)	0.3	96
日本ハム	日本	FASTKITエライザVer.III小麦	0.3	96
プリマハム	日本	アレルゲンアイ ELISA II 小麦	0.3	96

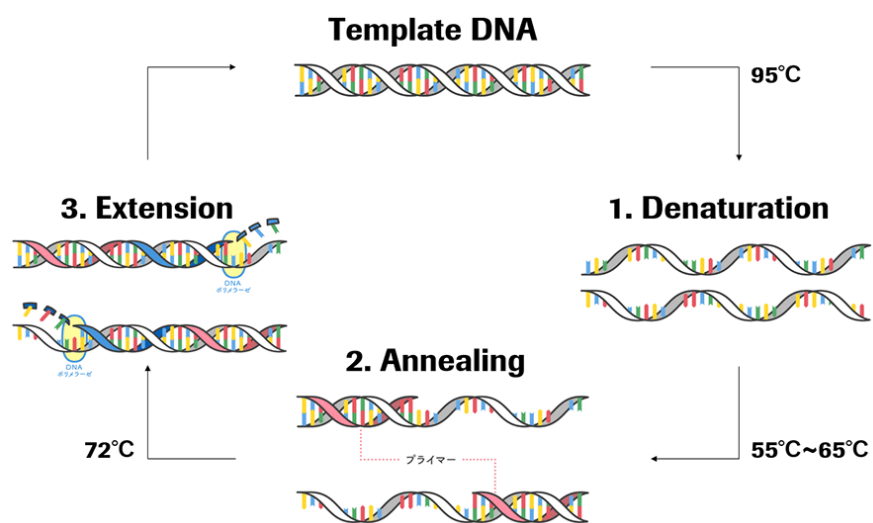


図 1-5 PCR法の原理

第3節 本研究の目的と概要

食物アレルギーを持つ患者数は年々増加傾向にあり、食物アレルギーの特効薬はなく、治療の基本は除去食である。食物アレルゲンの表示は、食物アレルギー患者にとって命に関わる必要な情報であり、科学的な根拠に基づく表示とその確認のための検査の信頼性の確保が重要である。福岡市では、2003年から20年にわたり市販食品における食物アレルゲン（特定原材料）の検査を実施してきた。食物アレルゲンの中でも、食品の原材料として広く使用されていること、比較的アレルギー患者数が多く、難治性であり、食物依存性運動誘発アナフィラキシー、経皮感作によるアレルギー、セリアック病等関連の疾病が多いことから、本論文では食品表示の重要性の高い「小麦」に注目して研究を行った。まず、2003年から2022年までの20年間の特定原材料（小麦）の検査結果をまとめた。その中で、スクリーニング検査であるELISA法で基準値以上の小麦タンパク検出（陽性）にも関わらず、確認検査のPCR法において小麦遺伝子が不検出（陰性）となり、行政上問題となった事例を経験したことから、リアルタイムPCR法を用いた小麦遺伝子検査法の高感度化についての検討を行った。そこで、開発した検査法を用いて検出下限の確認、モデル試料及び実際の試料を用いた感度確認を行った。また、検査法の実用性確認を目的として小麦の12銘柄を対象に感度確認を行った。次に、市販の容器包装詰チルド惣菜50検体を対象とした実態調査を行った。加熱加工による遺伝子検出の影響の確認を目的として食品のモデル試料を用いた検証を行った。

第2章 福岡市における食物アレルギー（小麦）の食品混入状況

第1節 緒言

日本のアレルギー表示制度は諸外国に比べて、いち早く2002年に当初は5品目（卵、小麦、乳、そば及び落花生）を対象に導入された。福岡市では、2002年からELISA法による検査体制を整え、2003年に試買検査を行い、2004年からは行政による取去検査として、厚生労働省による当時の通知に基づき本格的に特定原材料5品目（卵、小麦、乳、そば及び落花生）を対象に検査を開始した。その中でも小麦は、患者数が卵、乳に次いで多いことに加え、原材料として含まれる食品が多いことから、原材料に小麦表示のない食品又は小麦の注意喚起表示のない食品においても混入の可能性が高く、毎年検査を実施して重点的に監視している。そこで、この2003年から2022年までの20年間の福岡市における原材料に小麦表示のない加工食品を対象に実施した小麦の取去検査結果をまとめ、この期間の小麦の検出事例の変化や検査の問題点等について述べる。

第2節 実験材料及び方法

1) 実験材料

2003年4月1日から2022年3月31日の間に福岡市内で製造された食品、または流通した食品計253検体、いずれも特定原材料小麦表示及び小麦の注意喚起表示のないものを対象とした。ただし、一部の菓子類（いも飴、こめこケーキ等）には注意喚起表示のあるものが含まれていた。2003年に試買した9検体を除き、すべての検体は市内保健所の食品衛生監視員により収去された。検査に使用した食品群及び検体数を表2-1に示す。多い順に、菓子類83、穀類73、めん類・春雨17、魚肉ねり製品17、惣菜12、調味料15、レトルト21、野菜加工品20、食肉製品7、その他8であった。小麦の代替品として使用されることが多い米粉、大豆粉などの穀類を中心に春雨、ビーフンなどのめん類、小麦粉不使用の菓子類を対象とし、特に2003年から2005年までは、当時食物アレルギー表示制度が整備されていなかった国から輸入された食品を主な対象とした。

2) スクリーニング検査法（ELISA法）

検査は通知（消費者庁次長通知，2015）に記載の方法に従い実施した。特定原材料表示制度の所管は、2015年度（平成27年度）に厚生労働省から消費者庁へ移管されたが、実際の検査方法は変わっていないため、消費者庁次長通知に記載された方法（消費者庁次長通知，2015）とした。

2) -1 ELISA法の検体抽出液の調製

検体は食品一包装単位に含まれる可食部全体を試料とした。試料の全量をフードプロセッサー（パナソニック製MK-K58）で十分に破碎し、均質混和した調製試料1gをポリプロピレン製遠心管（50

mL 容) に採り、日ハムキットに付属の検体抽出液 19 mL を加え、ボルテックスミキサーを使用し、試料を分散させて混合した。遠心管を横にして、1 分間あたり 90~110 回往復、振とう幅 3 cm 程度で、20°C で、振とうしながら抽出した。室温下、 $3,000 \times g$ 、20 分間、遠心機（久保田製作所製 S500FR）で遠心分離し、上清を No.5A ろ紙(ADVANTEC 製)でろ過したものと検体抽出液とした。

2) -2 モリナガキットによる定量

検体抽出液をキットに付属の検体希釈液を用いて 20 倍希釈し、測定溶液とした。キットに付属の標準液 50 ng/mL 溶液を 2 倍ずつ段階希釈し 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 及び 0 ng/mL の検量線用標準液を調製した。抗体固相化プレートの各ウェルに標準溶液及び測定溶液を 3 ウェル並行で 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、20°C で 1 時間反応させた。プレートウォッシャー (BioRad 社製 Immuno Wash 1575) でウェル内の溶液を除去し、300 μ L 洗浄液で 6 回洗浄した後、酵素標識抗体溶液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、20°C で 30 分間反応させた。ウェル内の溶液を除去し、300 μ L 洗浄液で 6 回洗浄した後、酵素基質溶液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、20°C、遮光下で 20 分間反応させた。反応停止液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、各ウェルの 450 nm 及び 650 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad 製 iMark) で測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度から 650 nm の吸光度を差し引いた値をウェルの吸光度として、ウェルの吸光度の平均値を 4 係数 Logistic 解析により検量線を作成し、測定溶液の吸光度から濃度を求め、希釈倍率 400 倍を乗じて調製試料中に含まれる小麦タンパク質濃度 (mg/kg) を算出した。

2) -3 日ハムキットによる定量

検体抽出液をキットに付属の検体希釈液を用いて 20 倍希釈し、測定溶液とした。キットに付属の標準液 50 ng/mL 溶液を 2 倍ずつ段階希釈し 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 及び 0 ng/mL の検量線用標準液を調製した。抗体固相化プレートの各ウェルに標準溶液及び測定溶液を 3 ウェル並行で 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、20°C で 1 時間反応させた。プレートウォッシャー (BioRad 社製 Immuno Wash 1575) でウェル内の溶液を除去し、300 μ L 洗浄液で 6 回洗浄した後、ビオチン結合抗体溶液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、20°C で 1 時間反応させた。プレートウォッシャーでウェル内の溶液を除去し、300 μ L 洗浄液で 6 回洗浄した後、酵素ストレプトアビジン結合物溶液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、20°C で 30 分間反応させた。プレートウォッシャーでウェル内の溶液を除去し、300 μ L 洗浄液で 6 回洗浄した後、発色剤を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、20°C、遮光下で 30 分間反応させた。反応停止液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、軽く攪拌した後、各ウェルの 450 nm 及び 650 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad 製 iMark) で測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度から 650 nm の吸光度を差し引いた値をウェルの吸光度とし、ウェルの吸光度の平均値を 4 係数 Logistic 解析により検量線を作成し、測定溶液の吸光度から濃度を求め、希釈倍率 400 倍を乗じて調製試料中に含まれる小麦タンパク質濃度 (mg/kg) を算出した。

2)-4 判定方法

検量線の標準液の最小濃度から算出される定量下限値は 0.3mg/kg であるが、報告下限値を 1 mg/kg とし、検量線を超えた場合は >20 mg/kg とした。モリナガキット又は日ハムキットのいずれか一方でも小麦タンパク質の定量値が 10 mg/kg 以上の場合に小麦陽性と判定した。

3) 確認検査 (PCR 法)

3)-1 試料からの DNA の抽出方法

2) で示すスクリーニング検査の結果、小麦陽性と判定され、製造確認を行って小麦が確認できなかった場合など、必要に応じて PCR 法による確認検査を実施した。2)-1 と同様の操作で均質化した調製試料から 2 点並行で 2 g ずつをポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、DNA 抽出用の G2 緩衝液 7.5 mL を加えてボルテックスミキサーで激しく混合後、G2 緩衝液 7.5 mL 及び α -アミラーゼ (1 mg/mL) 10 μ L を加えて、ホモジナイザー (QIAGEN 社製 TissueRuptorII) で 2 分間攪拌し、37°C で 1 時間加温した。次にプロテナーゼ K (QIAGEN 社製) 100 μ L 及び RNaseA (QIAGEN 社製) 20 μ L を加えてボルテックスミキサーで混合し、50°C で 2 時間加温した。冷却遠心機 (久保田製作所製 Model6200) で 4°C, 10,000 $\times g$, 15 分間遠心分離し、得られた上清を、コンディショニング用の QBT 緩衝液 1 mL で平衡化したイオン交換樹脂である Genomic-tip 20/G (以下、「G-tip」とする) に全量負荷した。洗浄用の QC 緩衝液 2 mL で 3 回洗浄後、予め 50°C にした QF 緩衝液 1 mL で 2 回溶出した。得られた溶出液を 0.7 倍量の 2-プロパノールを加えて混合し、冷却遠心機 (久保田製作所製 Model3740) を用いて 4°C, 10,000 $\times g$, 15 分間遠心し、上清を除き 70% エタノールを加えて、4°C, 10,000 $\times g$, 10 分間遠心し、上清を除いた。得られた沈殿を乾燥させ、滅菌水を 100 μ L 加えて溶解させたものを DNA 試料原液とした。超微量分光光度計 (Thermo Fisher Scientific 製 NanoDrop One) を用いて DNA 試料原液の紫外吸収スペクトル並びに、230 nm, 260 nm, 及び 280 nm の吸光度を測定した。260 nm の吸光度に対する 280 nm の吸光度の比 (A_{260}/A_{280}) 及び 260 nm の吸光度に対すると 230 nm の吸光度の比 (A_{260}/A_{230}) から純度

を確認し、260 nm の吸光度が1 のとき 50 ng/μL として DNA 濃度を算出し、滅菌水を用いて DNA 溶液を 20 ng/μL に調整した。

3)-2 PCR 反応

PCR に用いたプライマー対の配列及び増幅長を表 2-2 に示した。植物 DNA 検知用 PCR 反応液は、1×PCR 緩衝液、0.20 mM dNTP、3.0 mM MgCl₂、0.625 Unit Taq ポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific 製 AmpliTaq Gold DNA polymerase)、並びに 0.2 μM CP03-5'プライマー及び CP03-3'プライマーを含む液に、DNA 溶液を 2.5 μL 加えて、全量を 25 μL とした。小麦 DNA 検知用 PCR 反応液は、1×PCR 緩衝液、0.20 mM dNTP、3.0 mM MgCl₂、0.625 Unit Taq ポリメラーゼ (Thermo Fisher Scientific 製 AmpliTaq Gold DNA polymerase)、並びに 0.2 μM Wtr01-5'プライマー及び Wtr10-3'プライマーを含む液に、DNA 溶液を 2.5 μL 加えて、全量を 25 μL とした。プライマー対は Thermo Fisher Scientific 社に合成委託したものをを用いた。PCR 反応液をサーマルサイクラー (BioRad 製 iCycler) にセットし、95°C に 10 分間保ち、95°C 0.5 分間、50°C 0.5 分間、72°C 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 サイクル繰返した後、72°C 7 分間保持し、4°C に保存した。保存した PCR 反応液を各 10 μL 採り、6×ローディングバッファーと混和し 4%アガロースゲルにアプライし、電気泳動後、ゲルイメージ撮影装置 (UVP 社製 BioDoc-It System) で UV を照射、撮影し、増幅の有無を確認した。

第3節 結果及び考察

1) 食品の基準値以上の小麦タンパク質汚染状況

2003年度から2021年度における特定原材料である小麦の表示のない食品又は小麦の注意喚起表示のない食品を対象としたスクリーニング検査の結果、基準値（10 mg/kg）以上で小麦陽性となった検体を表2-3に示す。検査した253検体のうち、小麦陽性となったのは19検体であり、陽性率は7%であった。陽性となった検体の内訳は製菓材料のミックス粉（大麦シフォンケーキ、白ういろミックス粉、わらべのミックス粉）3検体、米粉1検体、そば粉3検体、本十割そば（乾めん）2検体、春雨1検体、菓子類8検体であった。2005年頃までは、製菓材料のミックス粉、そば粉等の穀類に小麦が混入している事例が多かった。しかし、2012年以降では穀類での小麦陽性事例はなかった。その理由として、製造者のアレルゲン表示制度への理解と製造時のコンタミネーション対策が進んできた（中村，2006）ことが大きな要因と考えられる。一般的な傾向として、同一製造所内で小麦を取り扱うため小麦の混入が避けられない場合には、その旨を注意喚起表示することが徹底されてきている。また、米など小麦の代替として使用される穀類を製粉する場合は、工場を専用としたり日本農林規格（JAS）の工程管理（農林水産省，2020）に基づく対策を行ったりすることで小麦の混入リスクを小さくし、小麦不使用をアピールする食品表示が可能となったと考えられる。2020年6月からHACCP及びその考え方に基づく管理がすべての食品営業者に対して制度化された。生物学的危害要因である微生物と同様に、化学的要因であるアレルゲンは大きな危害要因であり、適切な工程管理が必要である。2020年にCODEX委員会で新たにアレルゲンに関する規範

(CODEX, 2020) が採択されたように、アレルギー管理に対する重要度は世界的に年々増しており、世界全体として食品業界全体として一貫した管理が求められてきている。

2) 食品の基準値未満の小麦タンパク質汚染状況

ELISA 法における検量線の最小濃度から算出される定量下限値は 0.3 mg/kg であり、基準値 (10 mg/kg) 未満の小麦タンパク質が検出された場合は小麦陰性と判定される。基準値未満の小麦タンパク質が検出された検体は 253 検体のうち 28 検体で全体の 11%であった。その内訳は、菓子類 12 検体、穀類が 8 検体、魚肉ねり製品 5 検体、惣菜及び容器包装詰加圧加熱殺菌食品が各 1 検体であった。検体名及び小麦タンパク質の検出濃度を表 2-4 に示す。日ハムキットの定量値及びモリナガキットの定量値はほぼ同等であり、基準値に近い値の小麦タンパク質について精度よく定量できていることがこれらの結果からも示された。2つのキットで小麦タンパク質が検出された食品は 19 検体、いずれか一方のキットで小麦タンパク質が検出された食品は 9 検体であった。モリナガキットのみで小麦タンパク質が検出されたのは 4 検体で、その内訳は上新粉 2 検体、ライスペーパー及びあわめん各 1 検体のいずれも穀類であった。日ハムキットのみで小麦タンパク質が検出されたのは 5 検体で、その内訳は、菓子類 3 検体、魚肉ねり製品及び辛子めんたいこが各 1 検体であった。検体別にみると、穀類 8 検体における小麦タンパク質の定量値の平均は、モリナガキットが 3.3 mg/kg、日ハムキットが 1.1 mg/kg であり、穀類ではモリナガキットの方が定量値が高い傾向が認められた。菓子類 12 検体における定量値の平均は、モリナガキットが 2.9 mg/kg、日ハムキットが 3.6 mg/kg であった。また、魚肉ねり製品 5 検体における小麦タンパク質の定量値の平均はモリナガキットが 3.0 mg/kg、日ハムキットが 4.6 mg/kg であった。菓子類では検査キットによる定量値

の差はあまりないと考えられるが、魚肉ねり製品では日ハムキットによる定量値が若干高い傾向が認められた。モリナガキットでは抗グリアジンポリクローナル抗体を、日ハムキットではグリアジン、 α -アミラーゼインヒビター等の複合タンパク質を抗原とするポリクローナル抗体を採用している（穂山、2003）。一般的には、特異ポリクローナル抗体の日ハムキットは偽陰性が多く出現する傾向があり、複合タンパク質によるポリクローナル抗体のモリナガキットは偽陰性が少なく偽陽性が多い傾向にあるが、検査対象となる食品の特性によってそれぞれのキットの抗体が認識する抗原部位の違いが検出結果の差として現れたものと考えられた。

福岡市では、定量下限（報告下限）を1mg/kgとし、基準値未満の小麦タンパク質が検出された場合は、陰性の結果とともに小麦タンパク質の定量結果を保健所に通知している。保健所では、基準値未満であっても小麦アレルギーの患者が発症する可能性があること、注意喚起表示などの対策を取る必要があることを製造者に伝えて対応を求め、必要に応じて継続した検査を実施することで、小麦アレルギーの患者の健康被害未然防止のために検査結果を役立てている。-

3) スクリーニング検査（ELISA 法）陽性検体

通知法の判断樹では、スクリーニング検査で陽性となった場合、保健所が製造記録の確認を行い製造記録に小麦がある場合は、回収、表示の指導等の行政措置がとられることとなっている。製造記録がない場合は PCR 法による確認検査を実施し、陽性となった場合に回収、表示の指導等の行政措置をとることとなる。一方、確認検査で陰性となった場合には行政措置は不要である。スクリーニング検査で陽性となった 19 検体について製造記録を確認した結果、15 検体は製造記録が確認されたことから行政措置がとられた。製造記録が確認できなかった 4 検体については、PCR 法によ

る確認検査を実施した結果、2検体は陽性、2検体が陰性となり、陽性検体の2検体は行政措置がとられた。確認検査で陰性となった2検体は同一製造者による小麦不使用をうたった焼菓子であり、原材料として小麦は使用されていなかったが、製造所内での小麦粉の混入が強く疑われる状況であったため、保健所による行政指導が行われた。しかし、製造者はスクリーニング検査の小麦陽性の結果に疑問を持っており、確認検査では陰性となり検査結果に疑問を示したことから行政指導が困難であった。これらの焼菓子2検体は、ELISA法の結果が小麦陽性であったことから、小麦が混入していることは明らかであったが、PCR法による確認検査で小麦の遺伝子を検出できなかった。その際に鋳型DNA量を通知法の2倍に増やしてPCRを行ったところ、検出が可能であった。つまり、焼菓子は加熱加工処理を経た食品であり、加工によるDNAの断片化が生じて (Mano, 2017; Miyahara, 2016)、小麦遺伝子の増幅・検出に影響がでたものと推察された。これらの検体中からは10 mg/kgを超える小麦タンパク質が検出されており、小麦タンパク質が含まれているにもかかわらず小麦遺伝子を検出できなかったことから、加熱加工食品の場合には確認検査のPCR法では、DNAの抽出及び精製又はPCR法の検出感度が十分でない場合があったと考えられる。スクリーニング検査で陽性となっても確認検査で陰性となることは行政指導上の大きな問題点でもあることから、確認検査法の検出感度を上げる必要があり、改良法の開発を試みることにした。

表 2-1 小麦アレルゲン検査に使用した食品群と検体数

食品群	検体数
菓子類	83
穀類	73
めん類・春雨	17
魚肉ねり製品	17
惣菜	12
調味料	15
レトルト	11
野菜加工品	10
食肉製品	7
その他	8
合計	253

表 2-2 植物検知用及び小麦検知用プライマー対

種類	プライマー対	配列	増幅長 (bp)
植物	CP03-5'	5'-CGGACGAGAATAAAGATAGACT-3'	124
	CP03-3'	5'-TTTTGGGGATAGAGGGACTTG-3'	
小麦	Wtr01-5'	5'-CATCACAATCAACTTATGA-3'	141
	Wtr10-3'	5'-TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA-3'	

表 2-3 小麦アレルギーのスクリーニング検査において小麦陽性となった検体

NO.	年	検体名	食品群	小麦表示
1	2004	製菓材料（大麦シフォンケーキ）	穀類	無
2	2004	白うしろミックス粉	穀類	無
3	2004	そば粉	穀類	無
4	2004	本十割そば	めん類	無
5	2004	そば粉	穀類	無
6	2004	そば粉	穀類	無
7	2005	わらべのミックス粉	穀類	無
8	2005	本十割そば	穀類	無
9	2012	飴（いも飴）	菓子類	原材料に麦芽水飴の表示あり
10	2012	菓子（しふおん けえき）	菓子類	無
11	2013	ごま団子	菓子類	無
12	2013	米粉	穀類	無
13	2013	こめこケーキ（きなこ）	菓子類	注意喚起あり・小麦フリー宣言
14	2013	こめこケーキ（れもん）	菓子類	注意喚起あり・小麦フリー宣言
15	2014	ビーフン	めん類	同一ラインで小麦製品製造。注意喚起表示あり
16	2015	はるさめ	春雨	無
17	2016	チーズクッキー	菓子類	無
18	2016	チーズフルーツケーキ	菓子類	無
19	2016	米粉ビスコッティ	菓子類	無

表2-4 基準値未満の小麦タンパク質が検出された検体と検出濃度

NO.	年	検体名	食品分類	小麦表示	小麦検査 結果	定量結果	
						日ハムキット (mg/kg)	モリナガキット (mg/kg)
1	2007	上新粉	穀類	無	陰性	2	5
2	2007	上新粉	穀類	無	陰性	(-)	3
3	2007	上新粉	穀類	無	陰性	(-)	4
4	2007	粒入りコーンスープ	穀類	無	陰性	1	6
5	2008	かぼちゃスープ	容器包装詰加圧加熱殺菌食品	無	陰性	1	1
6	2008	ライスペーパー	穀類	無	陰性	(-)	1
7	2012	桜玉子	魚肉ねり製品	無	陰性	3	(-)
8	2012	山芋粉	穀類	無	陰性	4	3
9	2012	辛子明太子	辛子明太子	無	陰性	7	(-)
10	2013	あわめん	穀類	無	陰性	(-)	2
11	2013	コーンスープ	穀類	無	陰性	2	2
12	2013	かまぼこ	魚肉ねり製品	無	陰性	9	7
13	2013	デコレーションケーキ	菓子類	無	陰性	2	(-)
14	2013	ちくわ	魚肉ねり製品	無	陰性	6	5
15	2016	もなか	菓子類	無	陰性	4	2
16	2016	コーヒー&チョコマカロン	菓子類	無	陰性	7	7
17	2016	豆大福	菓子類	無	陰性	1	1
18	2016	大豆フルーツバー	菓子類	無	陰性	4	2
19	2016	シフォンケーキ	菓子類	無	陰性	6	6
20	2016	ザッハトルテ	菓子類	無	陰性	3	3
21	2016	米粉クッキー	菓子類	無	陰性	9	7
22	2016	おからクッキー	菓子類	無	陰性	1	(-)
23	2017	ごぼう天	魚肉ねり製品	無	陰性	3	2
24	2017	コーヒー&チョコマカロン	菓子類	無	陰性	3	3
25	2019	和菓子	菓子類	無	陰性	2	4
26	2020	和菓子	菓子類	無	陰性	1	(-)
27	2021	じゃこ天	魚肉ねり製品	無	陰性	2	1
28	2022	唐揚げ	惣菜	無	陰性	3	2

(-) ; <1mg/kg

第3章 リアルタイム PCR を用いた加熱加工食品における小麦遺伝子検出の高感度化

第1節 緒言

第2章で報告したように、福岡市で実施した小麦の収去検査において ELISA 法で小麦タンパク質が基準値を超えて検出され小麦陽性と判定されたにも関わらず、確認検査の PCR 法（以下、「通知法」とする。）で陰性となった事例が認められた（宮崎ら，2017）ことから、通知法の改良及び高感度化が必要となった。通知法の改良としては、PCR 法の鋳型 DNA 量やプライマー量を増減する方法（萩野ら，2010）、PCR 反応液を用いて 2 回目の PCR 増幅を行うネステッド PCR 法（橋本ら，2008 及び 2009）、DNA 試料の再精製を行う方法（石本ら，2013）、PCR 阻害物質の作用を抑える試薬を用いる方法（石本ら，2013）等の報告がある。これらの改良法では、通常の PCR 法と同様、陽性の判定はアガロースゲル電気泳動により目的の大きさの DNA 断片の増幅を確認することで行われるため非特異反応の可能性を排除できない。また、目視で判定が行われるため、判定基準が曖昧という問題点がある。これらの問題点を解決する検査法としてリアルタイム PCR 法（以下、「qPCR 法」とする。）がある。qPCR 法は、従来の PCR 法より高感度である。特に TaqMan プローブを用いた qPCR 法は、インターカレーター法の qPCR 法に比べて特異性が高く高感度のため、遺伝子組換え食品の検査（厚生労働省食品安全部長通知，2012）等で一般的に使用されている。一方、すでにハウス食品が通知法とは異なる増幅領域を用いた高感度の qPCR 法（宮崎ら，2019）の特許（P2013-188164A）を取得しているが、商品化されておらず、検査に使うことはできない。そこで、通知法の特異性及び感度の向上を目的として、通知法で示された領域の範囲内で増幅を行う qPCR 法について検討した。また、改良にあたっては、検査時間の短縮を目的に、一般的なマス

ターミックスの他に, TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた方法の検討を行った。加熱加工食品のモデル試料として, 組成や加熱条件を変えて調製した小麦添加米粉クッキーを用いて実用性について確認を行った。

第2節 実験材料及び実験方法

1) 実験材料

米粉は、ELISA 法で小麦を含まないことを確認した共立食品（株）製「米の粉」を用いた。小麦粉は（株）日清製粉ウェルナ製薄力小麦粉「フラワー」を、バター、上白糖、及び卵は市販のものを用いた。実試料は、平成 27~28 年度に福岡市内で製造され、ELISA によるスクリーニング検査で小麦陽性と判定されたが確認試験の PCR 法で小麦陰性と判定され検査法の高感度化のきっかけとなった焼菓子 2 検体（チーズクッキー及び米粉ビスコッティ）（以下、「実試料」とする）を用いた。

2) qPCR 法のプライマー対プローブの設計

qPCR 法のプライマー対及び TaqMan-MGB プローブは、通知法の増幅部位を参考に設計した。陽性対照として植物に共通の配列を検知する植物検知用プライマー対（Chloroplast-F 及び Chloroplast-R）は、葉緑体クロロプラスト遺伝子の保存性の高い領域の塩基配列情報を参考にして、通知法のプライマー対（CP03-5'及び CP03-3'）（Watanabe et al., 2006）により増幅される内部の領域から、高等植物（GenBank アクセッションナンバーMF579001）のクロロプラスト遺伝子の配列を用いて、TaqMan-MGB プローブ（Chloroplast-T）の T_m 値がプライマー対より 10°C程度高くなるように設計した。小麦検知用のプライマー対（triticin precursor-F 及び triticin precursor-R）と TaqMan-MGB プローブ（triticin precursor-T）は、同様に塩基配列情報（GenBank アクセッションナンバーS62630）を基に設計した。TaqMan-MGB プローブは通知法のプライマー対（Wtr01-5'及び Wtr10-3'）で増幅される領域の内部配列を検知できるように設計した。なお triticin

precursor-R は Wtr10-3'と同じ配列である。プライマー対, TaqMan-MGB プローブの塩基配列及び Tm 値を表 3-1 に示す。いずれも Thermo Fisher Scientific 社に合成委託したものを用いた。

3) モデル試料の調製

バター25 g, 砂糖 20 g, 及び卵黄 15 g の混合液 60 g に米粉 40 g を加え, 次に小麦粉 1 mg を少量の超純水に懸濁した液を加え, よく混合し, 5 mm の厚さとなるようクッキー用型 (11.2 cm×13.3 cm のステンレス製寒天容器) に入れ, 小麦粉を 10 mg/kg 含有する米粉クッキー生地を調製した。同様に, 混合液 60 g 及び米粉 40 g に小麦粉を 2 mg, 3 mg 及び 10 mg 加え, それぞれ小麦粉を 20 mg/kg, 30 mg/kg, 及び 100 mg/kg 含有する米粉クッキー生地を調製した。さらに, 陰性対照として小麦粉を含まない米粉クッキー生地を調製した。調製した生地を横 3.7 cm×縦 4.4 cm のクッキーとなるように 9 等分し, 全量を, マッフル炉 (アドバンテック製 KM-420) を用いて 20 分間焼成した。180°C, 200°C, 及び 220°C の 3 つの温度で焼成後, 常温で 30 分間静置冷却し, フードプロセッサー (パナソニック製 MK-K48) を用いて約 30 秒間粉碎したものを試料とした。試料は使用するまで, -30°C で保存した。

4) ELISA 法による小麦タンパク質の定量

実試料及びモデル試料の小麦タンパク質の定量は, モリナガキット及び日ハムキットを用いて第 2 章第 2 節 2) のとおりに行った。

5) 試料からの DNA 溶液の調製

DNA 溶液の調製は、第2章第2節3) -1 のとおり行った。ただし、検出下限を決定するための DNA 溶液の希釈には Tris-EDTA(TE)緩衝液 (pH8.0) (以下、「TE 緩衝液」とする。)を用いて DNA 濃度が 20 ng/μL となるように調整し、ニシン精子 10 mg/mL (プロメガ社製) を 50 μg/mL 含有するように調製したキャリア DNA 含有 TE 緩衝液を用いて 10 倍または 2 倍段階希釈した。プラスミド (オリエンタル酵母工業(株)製アレルゲンチェッカー「小麦」に付属の陽性コントロールテンプレート (小麦, そば, 落花生, 植物)) は、キャリア DNA 含有 TE 緩衝液を用いて 0.01 pg/μL から、0.01 fg/μL まで 10 倍段階希釈、0.01 fg/μL~0.000625 fg/μL までは 2 倍段階希釈した。これらの鋳型 DNA は反応液 25 μL あたりいずれも 2.5 μL ずつ加えた。

6) 通知法の PCR 条件と小麦遺伝子の検出判定方法

PCR 反応は 1 反応あたり 3 並行試験で行い、方法は前章のとおりとした。植物遺伝子の検出を確認した後、対応する DNA 溶液が、小麦検知用 PCR 反応で 2 点並行試験のいずれか一方以上で小麦遺伝子が検出された場合に小麦陽性と判定した。小麦遺伝子が不検出の場合には小麦陰性と判定し、植物遺伝子が不検出の場合は検知不能と判定した、

7) Standard モードでの qPCR 反応条件

qPCR 反応は 96 ウェル反応プレートを用いて 1 反応あたり 3 ウェル並行で行った。一般的なマスターミックスを使用するモード (以下、「Standard モード」とする。) は、植物検知用反応液は 1 ウェルあたり 25 μL とし、最終濃度が 1×Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社製), 0.9 μmol/L の植物検知用の F-プライマー及び R-プライマー, 0.25 μmol/L TaqMan-MGB プロー

ブ、鋳型 DNA 液を 2.5 μ L 加えて滅菌水で混合調製した。50°Cで 2 分間、95°Cで 10 分間保持した後、95°Cで 15 秒の熱変性、60°Cで 2 分間のアニーリングと伸長反応を 1 サイクルとして 50 サイクルの増幅反応を qPCR 装置 (Thermo Fisher Scientific 社製 QuantStudio5) を用いて行った。小麦検知用反応液は、プライマー対及びプローブ濃度を植物検知用反応液と同様に調製した。

8) Fast モードでの qPCR 反応条件

温度保持を短時間で実施可能な専用のマスターミックスを用いて qPCR 法を行うモード (以下、「Fast モード」とする。) では、Universal Master Mix の代わりに TaqMan Fast Advanced Master Mix を用いて Standard モードと同様に反応液を調製し、qPCR 装置 (Thermo Fisher Scientific 社製 QuantStudio5) のランモードを Fast モードとして、95°Cで 20 秒間保持した後、95°Cで 1 秒間の熱変性、60°Cで 20 秒間のアニーリングと伸長反応を 1 サイクルとして 50 サイクル反応した。

9) Standard モード及び Fast モードでの qPCR による結果の判定方法

Standard モード及び Fast モードでの qPCR 法による結果の判定では、安全性未審査の遺伝子組換え食品の検査法 (厚生労働省食品安全部長通知, 2012) の基準を準用した。まず、植物検知用の Threshold line を 0.2, baseline を 3~15 と設定したときに、増幅曲線と Threshold line が交差したサイクル数である Ct 値が 3 ウェル並行でいずれも 43 未満のときに植物遺伝子検出 (陽性) と判定した。植物遺伝子検出 (陽性) を確認した後、対応する DNA 溶液が、小麦検知用の Threshold line を 0.2, baseline を 3~15 と設定したときの Ct 値が 3 ウェル並行でいずれも 43 未満となったとき

小麦遺伝子検出（陽性）判定し、それ以外の場合を不検出（陰性）と判定した。2点並行試験のどちらか一方でも検出（陽性）の場合に小麦陽性、それ以外を小麦陰性と判定した。

第3節 結果及び考察

1) qPCR法のStandardモード及びFastモード間の比較

前節で設計したプライマー対及びTaqMan-MGBプローブを用いて、小麦DNAを20~0.02 ng/ μ Lまで段階希釈したものを鋳型として、前節に示したStandardモード及びFastモードでqPCR法を行った。Threshold lineを0.2, baselineを3~15と設定したときに得られたCt値を小麦DNAとの対数グラフにしたときに得られた検量線の直線性及び増幅率を比較した。図3-1~3-4に検量線を示す。検量線の決定係数は、Standardモードでは植物検知用が1.000, 小麦検知用が0.988であった。Fastモードの決定係数は植物検知用が0.998, 小麦検知用が0.997であり、Standardモード及びFastモードのいずれも直線性は良好であった。増幅率は、Standardモードでは植物検知用が98%, 小麦検知用90%であり、小麦検知用の増幅率の方が植物検知用の増幅率より低かった。Fastモードは、植物検知用98%, 小麦検知用95%であり、植物検知用の方が小麦検知用の増幅率よりやや高かった。FastモードとStandardモード間で比較すると、植物検知用では差が認められなかったが、小麦検知用PCRの増幅率は、Fastモードの方が100%に近かった。よって、植物検知用及び小麦検知用のいずれも検量線の直線性は良好で、増幅率100%に近いことに加え、PCRの反応時間が2時間40分から約50分へ大きく短縮されることから、本研究ではFastモードを採用した。

2) 通知法とqPCRの検出下限の比較

市販プラスミドを段階希釈して陽性となる1反応25 μ Lあたりの最少量(fg)を検出下限として、通知法及びqPCR法での植物検知用と小麦検知用の増幅をそれぞれ行い、検出下限を比較した。そ

の結果を表 3-2 に示す。植物検知用の検出下限は 1 反応あたり通知法が 0.25 fg, qPCR では 0.025 fg であった。小麦検知用の検出下限は通知法が 2.5 fg, qPCR では 0.006 fg であった。いずれも通知 PCR 法に比べて qPCR 法による検出感度の方が高かった。同様に、小麦粉から抽出した DNA 溶液を段階希釈して、陽性となる 1 反応 25 μ L あたりの最少鑄型量(ng)を検出下限として、通知法と qPCR 法との検出下限の比較を行った。その結果を表 3-3 に示す。植物検知用の検出下限は通知法が 5 ng, qPCR 法が 0.003 ng であった。小麦検知用の検出下限は通知法が 0.05 ng, qPCR 法が 0.0125 ng であった。市販のプラスミド及び小麦粉から抽出した DNA のいずれを鑄型とした場合でも、植物検知用及び小麦検知用の検出下限は通知法より低かったことから、qPCR 法は通知法より高感度であることが示された。

3) モデル試料における小麦タンパク質定量

加熱加工食品モデル試料として、小麦粉含有量と焼成温度条件を変更して調製した米粉クッキー(表 3-4 の No.1~13 に示す) が設定どおりに小麦タンパク質を含有するように調製できているかを確認するため、日ハムキット及びモリナガキットを用いて小麦タンパク質の定量を行った。その結果を表 3-4 に示す。小麦粉を 100, 30, 20 及び 10 mg/kg 含有する試料中の小麦タンパク質の定量値の平均は、それぞれ 9, 2, 1 及び 0.5 mg/kg であった。この結果から小麦粉中の小麦タンパク質の割合は 4~11%であり、これらの定量値は、日本食品標準成分表 (2020) から推定される小麦タンパク質量 8%と概ね合致したため、試料調製には問題がなかったと判断された。

4) DNA 抽出に対する焼成温度の影響

180, 200 及び 220°Cの温度条件下, 各 20 分間焼成したモデル試料から, それぞれ 2 点並行で抽出した DNA 量と純度を表 3-5 に示す. 各試料から抽出された DNA 量は 3.0~10.6 µg であった. 焼成温度ごとの DNA 量の平均は 180°Cでは 8.7 µg, 200°Cでは 7.1 µg, 220°Cでは 4.8 µg と, 焼成温度が上昇すると抽出される DNA 量は減少する傾向が認められた. 得られた DNA 溶液について DNA の純度を確認した結果, タンパク質の混入の指標となる A_{260}/A_{280} は 1.6~1.9 であり, PCR に適した値 1.7~2.0 を概ね満足した. 一方, 多糖類の混入の指標となる A_{260}/A_{230} は 0.7~1.5 で PCR に適した値 1.8~2.0 を満足しなかった. その理由として, モデル試料には, ショ糖が重量比で 20% 含まれていることに加え, 炭水化物を 80%以上含む米粉 (日本食品標準成分表, 2020) が重量比で 40%含まれており, α -アミラーゼ処理が不完全だったことが推察された.

5) 通知法と qPCR 法間の検出感度の比較

米粉クッキーモデル試料を用いて qPCR 法と通知法の検出感度を比較した結果を表 3-6 に示す. 小麦粉を含まない陰性対照試料 (No.13) は通知法及び qPCR 法のいずれでも小麦陰性と判定された. 小麦の基準値は小麦タンパク質として 10 mg/kg であるが, これに該当する小麦粉 100 mg/kg 含有のモデル試料 (No.1~3) はすべて小麦陽性と判定された. つまり, 通知法及び qPCR 法のいずれの方法でも基準値を検出できたことから, 試料における小麦の添加, 無添加を正しく判定出来ることが示された. 基準値の 1/5 (2 mg/kg), 1/10 (1 mg/kg) 及び 1/20 (0.5 mg/kg) に相当する小麦タンパク質を含むことが示された小麦粉 30 mg/kg, 20 mg/kg, 及び 10 mg/kg 含有のモデル試料 (No.4~12) は, 通知法では全て小麦陰性と判定されたのに対し, qPCR 法では, 小麦粉 30 mg/kg 含有のモデル試料 (No.4~6) は全て小麦陽性と判定され, 通知法より感度が高いことが示された.

しかし、焼成温度が 220°C (No.6) では 2 点並行試験で、1 つが小麦遺伝子検出となり小麦陽性と判定されたが、もう 1 つでは小麦遺伝子検出されず小麦陰性となった。また、小麦粉 20 mg/kg 含有のモデル試料 (No.7~9) の場合、焼成温度が 180°C では 2 点並行試験で、1 つが小麦遺伝子検出となり小麦陽性と判定されたが、200°C 及び 220°C では (No.7) 2 点並行試験でいずれも小麦遺伝子は検出されず、小麦陰性と判定された。これらの結果から、食品からの小麦遺伝子の検出には、小麦の含有量だけでなく、製品の焼成温度も影響することが示唆された。宮原ら (Miyahara et al., 2016 ; Uchino et al., 2004) は加熱工程で DNA の断片化が進行しやすいことを報告しており、焼成温度が 180°C から 220°C と高くなると PCR 法による小麦遺伝子検出率が低下することが示された。

6) 実試料からの qPCR 法による小麦タンパク質遺伝子の検出

実際の食品試料を用いて、通知法と qPCR 法での検査結果の比較を行い、実際の食品における実用性を調べた。試料として、ELISA 法で小麦タンパク質が基準値を超えて検出され小麦陽性となったにもかかわらず、通知法による確認検査で小麦陰性となった実試料 2 検体を用いた。その結果を表 3-7 に示した。通知法ではいずれも小麦陰性となったが、qPCR 法ではいずれも小麦陽性と判定され、qPCR 法は通知法よりも検出感度が高く、ELISA 法の判定結果と同じ結果が得られることが示された。加熱加工工程を経たモデル試料だけでなく実試料においても通知法に比べ qPCR 法は検出感度が高く、ELISA 法と同じ結果が得られたことから、qPCR 法は実際の加熱加工食品における小麦の遺伝子検査法として有効であることが示唆された。

表 3-1 プライマー対及びプローブ

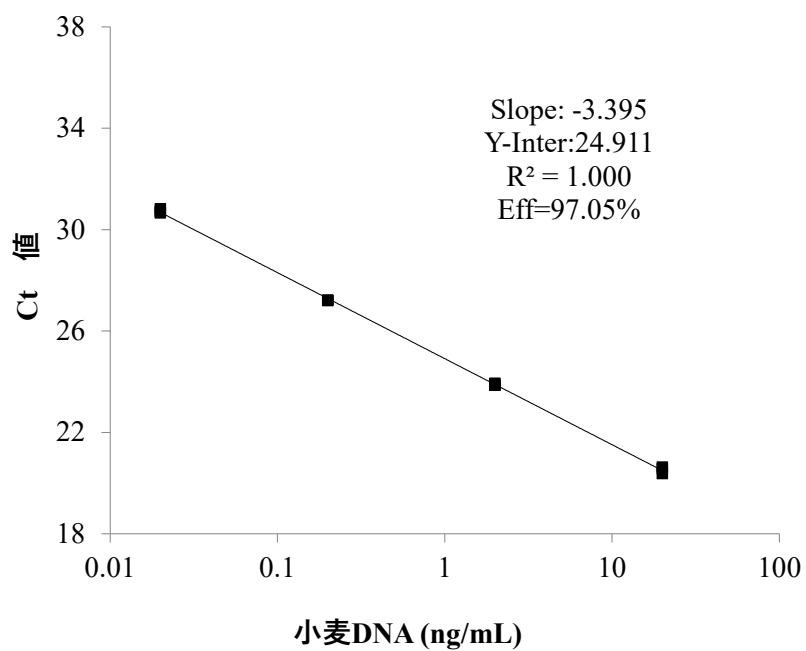
種類	プライマー対及びプローブ	配列	T _m (°C)	増幅長 (bp)	根拠
植物	CP03-5'	5'-CGGACGAGAATAAAGATAGACT-3'			通知法
	CP03-3'	5'-TTTTGGGGATAGAGGGACTTG-3'			通知法
	Chloroplast-F	5'-AAGATAGAGTCCCCTTCTACATGTCAAT-3'	60	77	this study
	Chloroplast-R	5'-TTTTAAGTCGACGGATTTTCCTCTTA-3'	60		this study
	Chloroplast-T	5'-(FAM)-CTGGCAACAATGAAATT-(NFQ)-(MGB)-3'	70		this study
小麦	Wtr01-5'	5'-CATCACAAATCAACTTATGA-3'			通知法
	Wtr10-3	5'-TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA-3'			通知法
	triticin precursor-F	5'-ACTTATGGTGGTTGAA TGGTTTAG-3'	58	130	this study
	triticin precursor-R (Wtr10-3')	5'-TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA-3'	58		this study
	triticin precursor-T	5'-(FAM)-AACATCGACGATCCCAGTC-(NFQ)-(MGB)-3'	70		this study

FAM: 6-carboxyfluorescein

NFQ: non-fluorescent quencher

MGB: minor groove binder

(1) 植物



(2) 小麦

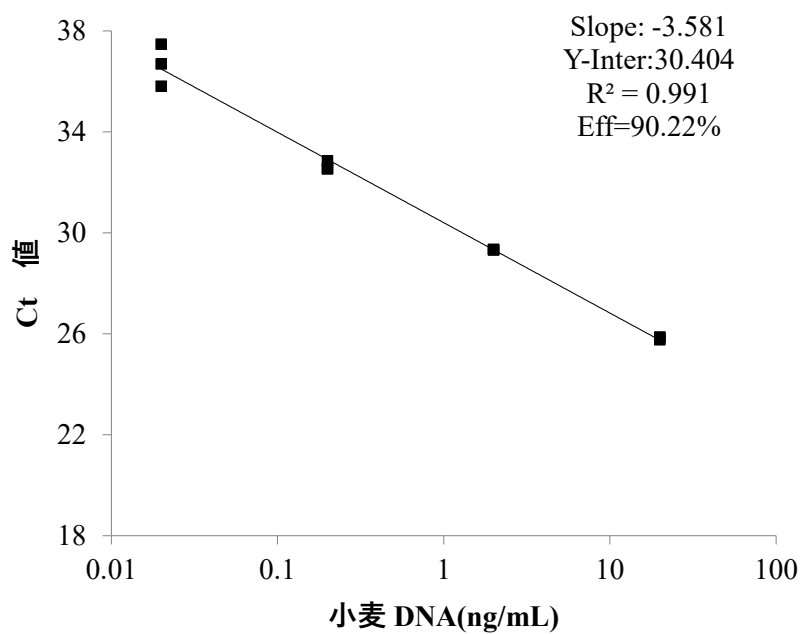


図3-1 小麦DNAを用いて作成されたStandardモードにおける(1)植物検知用及び(2)小麦検知用qPCRの検量線

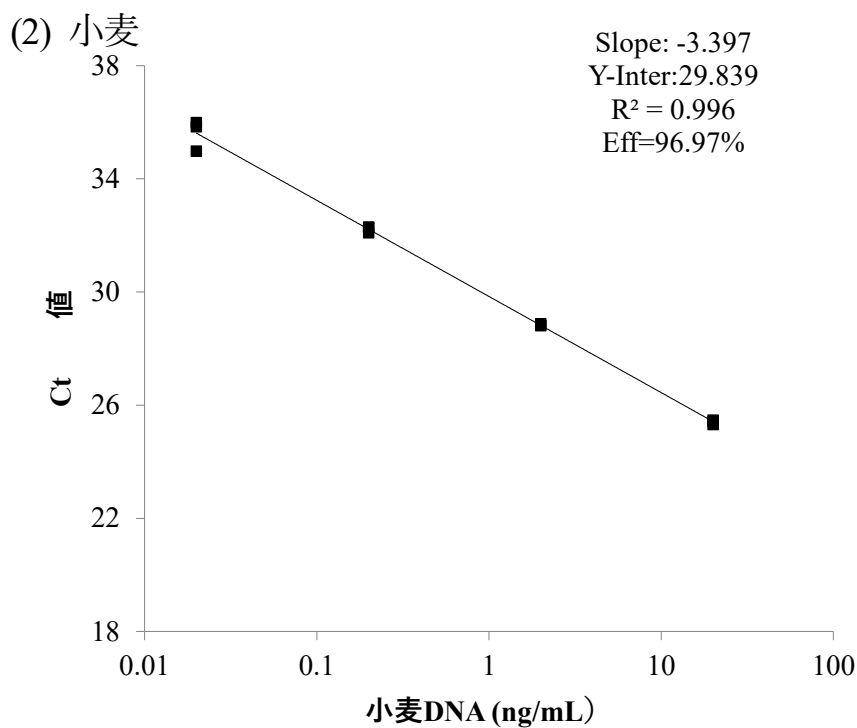
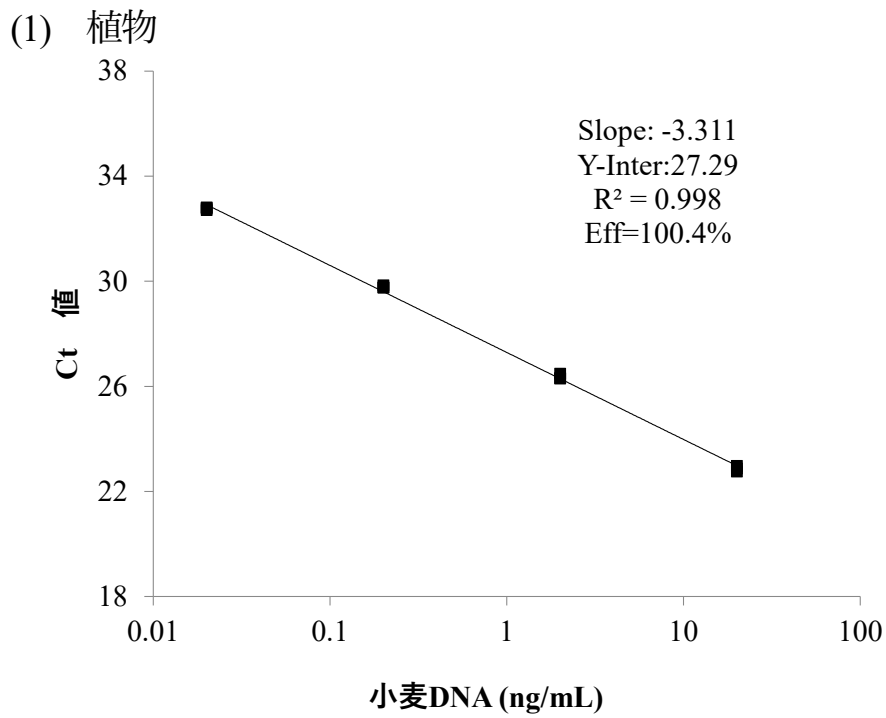


図3-2 小麦 DNA を用いて作成された Fast モードにおける (1) 植物検知用及び (2) 小麦検知用の qPCR の検量線

表 3-2 市販の小麦遺伝子含有プラスミドを用いた通知法及び pPCR 法の小麦遺伝子検出下限

プラスミド (fg)	qPCR法 (Ct 値)		通知法 (PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
25	35.53 ±0.08	25.52 ±0.20	+	+
2.5	38.94 ±0.06	29.00 ±0.01	+	+
0.25	42.24 ±0.35	32.54 ±0.20	-	+
0.025	46.37 ±1.17	35.40 ±0.31	-	+
0.0125	no Ct	36.99 ±0.09	-	-
0.006	no Ct	36.82 ±0.19	-	-
0.003	no Ct	no Ct	-	-
0.0016	no Ct	no Ct	-	-

(n=3)

表 3-3 小麦抽出 DNA を用いた通知法及び pPCR 法による小麦遺伝子検出下限

小麦DNA (ng)	qPCR (Ct 値)		通知法 (PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.35 ±0.07	25.91 ±0.05	+	+
5	26.92 ±0.04	29.30 ±0.04	+	+
0.5	30.29 ±0.10	32.34 ±0.33	-	+
0.05	33.61 ±0.06	36.21 ±1.13	-	+
0.025	34.65 ±0.12	36.63 ±0.30	-	-
0.013	35.80 ±0.17	40.03 ±1.40	-	-
0.006	36.83 ±0.15	no Ct	-	-
0.003	37.92 ±0.17	no Ct	-	-

(n=3)

表3-4 モリナガキット及び日ハムキットによるモデル試料（米粉クッキー）中の
定量結果

No.	小麦粉含有量 (mg/kg)	焼成温度 (°C)	定量結果 (mg/kg)	
			モリナガ キット	日ハム キット
1	100	180	7.8	10.1
2	100	200	8.2	10.2
3	100	220	8.2	10.8
4	30	180	1.5	1.4
5	30	200	2.3	2.4
6	30	220	2.5	2.4
7	20	180	1.2	1.2
8	20	200	0.8	0.9
9	20	220	0.8	0.9
10	10	180	0.6	0.6
11	10	200	0.6	0.7
12	10	220	0.4	0.4
13	0	180	(-)	(-)

(-): <0.3 mg/kg

モリナガキット：(株) 森永生科学研究所製 FASPEK エライザII 小麦（グリアジン）

日ハムキット：日本ハム（株）製 FASTKIT エライザ Ver.III 小麦

表 3-5 焼成温度の異なる試料から 2 点並行で抽出された DNA 量及び純度の結果

No.	小麦粉 含有量 (mg/kg)	焼成温度 (°C)	抽出DNA量 ($\mu\text{g}/2\text{g sample}$)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	100	180	9.6	1.8	1.1
			10.0	1.8	1.0
2	100	200	5.1	1.9	1.5
			7.2	1.8	1.2
3	100	220	5.4	1.8	1.1
			4.8	1.7	1.1
4	30	180	9.6	1.8	1.0
			9.7	1.8	1.0
5	30	200	4.3	1.8	1.2
			9.9	1.7	1.0
6	30	220	5.3	1.8	1.0
			8.1	1.6	0.8
7	20	180	6.2	1.8	1.3
			10.1	1.8	1.3
8	20	200	9.6	1.6	0.7
			8.0	1.7	0.8
9	20	220	4.1	1.7	1.1
			4.6	1.6	1.0
10	10	180	8.2	1.8	1.0
			7.9	1.7	1.1
11	10	200	6.9	1.7	0.9
			6.3	1.8	1.2
12	10	220	3.0	1.7	0.9
			3.0	1.8	0.9
13	0	180	4.8	1.9	1.3
			10.6	1.7	1.1

表 3-6 焼成温度が通知法及びqPCR法の検査結果に及ぼす影響

No.	小麦粉含有量 (mg/kg)	焼成温度 (°C)	qPCR法						通知法 (PCR法)							
			植物			小麦			植物			小麦				
			Ct値	結果	小麦判定	Ct値	結果	小麦判定	Ct値	結果	植物判定	Ct値	結果	小麦判定		
1	100	180	20.60	20.61	20.71	36.08	37.17	35.11	+	+	+	+	+	+	+	+
2	100	200	20.75	20.58	21.09	37.59	37.06	35.39	+	+	+	+	+	+	+	+
3	100	220	19.84	19.66	19.79	35.30	34.52	35.07	+	+	+	+	+	+	+	+
4	30	180	19.80	19.84	19.89	35.22	35.37	35.95	+	+	+	+	+	+	+	+
5	30	200	20.52	20.59	20.58	35.15	35.84	35.76	+	+	+	+	+	+	+	+
6	30	220	20.64	20.28	20.46	35.87	35.97	34.86	+	+	+	+	-	-	-	-
7	20	180	20.13	19.86	20.00	36.70	38.37	37.86	+	+	+	+	+	+	+	-
8	20	200	19.97	19.67	19.85	37.27	37.16	38.30	+	+	+	+	-	-	-	-
9	20	220	20.72	20.95	20.94	36.19	37.00	37.05	+	+	+	+	+	+	+	-
10	10	180	19.91	20.31	20.22	35.93	37.43	36.51	+	+	+	+	+	+	+	-
11	10	200	21.29	21.09	21.19	38.04	37.42	37.34	+	+	+	+	+	+	+	-
12	10	220	20.72	20.57	20.93	38.19	no Ct	38.93	-	+	+	+	-	-	-	-
13	0	180	20.60	20.75	20.58	38.20	37.72	38.04	+	+	+	+	+	+	+	-
14	0	200	20.09	20.11	20.05	38.15	no Ct	37.16	-	+	+	+	-	-	-	-
15	0	220	21.34	21.14	21.20	38.02	37.80	no Ct	-	+	+	+	+	+	+	-
16	10	180	20.84	20.63	20.68	no Ct	39.04	40.52	-	+	+	+	-	-	-	-
17	10	200	21.50	21.61	21.59	42.05	39.09	no Ct	-	+	+	+	+	+	+	-
18	10	220	21.56	21.50	21.57	no Ct	39.42	40.61	-	+	+	+	-	-	-	-
19	10	180	20.19	20.00	20.18	no Ct	38.34	37.96	-	+	+	+	+	+	+	-
20	10	200	20.04	20.09	20.13	38.91	no Ct	38.89	-	+	+	+	+	+	+	-
21	10	220	20.26	20.26	20.37	38.36	no Ct	no Ct	-	+	+	+	-	-	-	-
22	10	180	19.92	19.70	19.82	37.31	no Ct	37.52	-	+	+	+	+	+	+	-
23	10	200	20.88	20.60	20.70	38.98	37.69	no Ct	-	+	+	+	+	+	+	-
24	10	220	20.92	20.99	21.14	no Ct	no Ct	no Ct	-	+	+	+	-	-	-	-
25	0	180	19.91	19.83	20.04	no Ct	no Ct	no Ct	-	+	+	+	+	+	+	-
26	0	200	20.22	20.03	20.05	no Ct	no Ct	no Ct	-	+	+	+	+	+	+	-

表 3-7 ELISA 陽性-通知法で小麦陰性と判定された実試料の qPCR 法による検査結果

No.	試料	小麦タンパク質 定量結果(mg/kg)		DNA量 ($\mu\text{g}/2\text{g}$ sample)	qPCR法		通知法(PCR法)												
		モリナガキッ ト	日ハム キット		A_{260}/A_{230}	A_{260}/A_{230}	Ct 値	植物	小麦	植物	小麦	結果	小麦判定	結果					
1	チーズクッキー	17	17	54.9	1.8	1.7	20.63	19.85	20.24	38.04	39.4	37.97	+	+	+	+	+	-	-
				98.4	1.8	1.2	20.89	21.00	21.10	39.26	38.2	no Ct	-	+	+	+	+	-	-
2	米粉ビスケット	>20	>20	33.4	1.2	0.4	20.92	21.04	21.28	36.96	37.2	36.94	+	+	+	+	+	-	-
				62.6	1.3	0.3	20.97	20.76	23.06	37.11	37.1	36.89	+	+	+	+	+	-	-

第4章 開発した小麦遺伝子検査法の実用性評価

第1節 緒言

前章では通知⁴⁴⁾の確認検査法であるPCR法の高感度化を目的としてqPCR法を用いた改良法(以下、qPCR法)とする。)を開発し、焼菓子のモデル試料及び実試料における感度の上昇を確認した。前章では感度確認の標準品として薄力小麦粉を使用した。小麦粉は、強力粉、準強力粉、中力粉及び薄力粉の種類に応じて複数の小麦銘柄が配合されたものであり、小麦の単一銘柄による感度の確認はできていなかった。一方、消費者庁の通知では新たな検査法の妥当性確認の際は、14銘柄の小麦を均等に混合し小麦一次標準粉末標準品とするように記載されている。現在では通知記載の銘柄の中には作付面積の減少等の理由により入手困難な銘柄もあったことから、入手可能な小麦の銘柄による感度確認を行うこととした。次に、加熱加工食品である惣菜を対象に実用性の評価を実施した。試料には、ここ数年で大手コンビニエンスストアのプライベートブランド等で販売数が増加している容器包装詰低酸性食品(以下、「チルド惣菜」とする)を用いた。これらの食品は、「気密性のある容器包装に入れられ、pHが4.6を超え、かつ、水分活性0.94を超える食品で、中心部120°C、4分の殺菌条件に満たない加熱殺菌されたもの」と定義(厚生省食品保健課長通知、1999)されており、10°C以下保存を前提とした衛生管理がなされ、賞味期限は製造後1か月程度と容器包装詰加圧加熱殺菌食品より短く設定されている。チルド惣菜のメリットとして、加圧加熱殺菌がなされていないことから食味の面では通常の惣菜に近く、加圧加熱殺菌方法に向かない惣菜にも適用できるため種類が豊富なことが挙げられる。容器包装詰めで製造、販売されるため、流通段階におけるコンタミの可能性が非常に低いこと、また、食品表示基準に基づく表示がなされており、中に

はホームページで特定原材料及び特定原材料に準ずる食品の情報を公開されている食品もあることから、食物アレルギー患者の食品の選択肢が広がる食品例として期待される。

本章では、前章で開発したqPCR法による小麦遺伝子検出法の実用性を確認することを目的とし、小麦の銘柄による感度確認を行った。次に実際の加工食品 50 検体を対象とした小麦混入実態調査を行った。具体的には、コンビニエンスストアで市販されているチルド惣菜について、小麦に関する表示の調査及び ELISA 法及び qPCR 法による小麦混入実態調査を行った。さらに、牛ミンチ肉の加熱モデル試料を用いて行った小麦遺伝子検出試験から得られた知見についても報告する。

第2節 実験材料及び方法

第1項 小麦の銘柄による実用性評価

1) 実験材料

入手可能であった小麦（原麦）9 銘柄及び製粉された小麦粉3 銘柄の計 12 検体とした。表 4-1 に 12 検体の銘柄，産地，種類，主な用途を示す。原麦は粉碎機（Retsch 製 GM200）で 2 分間粉碎し均質化したものを試料とし，小麦粉はそのまま試料として用いた。

2) 試料からの DNA 抽出及び DNA 希釈

均質化した試料 2g を前章と同様に操作して DNA を抽出し，TE 緩衝液 100 μ L で溶解した DNA 溶液を得た。吸光度を測定し，TE 緩衝液で DNA 濃度が 20 ng/ μ L となるように調整し，ニシン精子 10 mg/mL（プロメカ社製）を 50 μ g/mL 含有するように調製したキャリア DNA 含有 TE 緩衝液を用いて 10 倍または 2 倍段階希釈した。

3) PCR 法

前章とのとおりとした。

4) リアルタイム PCR (qPCR)

前章のとおりとし，植物検知用及び小麦検知用の qPCR 反応を同じ 96 ウェルプレート上で行った。

5) 判定方法

植物検知用の Threshold line を 0.2, baseline を 3~15 と設定したときに, 増幅曲線と Threshold line が交差したサイクル数を Ct (Threshold cycle) 値としたとき, 3 ウェル並行試験の全てのウェルで増幅が認められ 3 ウェルの平均 Ct 値が 43 未満のときを植物遺伝子検出と判定した. 植物検知用検出を確認した同じ DNA に対して, 小麦検知用の増幅で 3 ウェル並行試験の全てのウェルで増幅が認められ 3 ウェルの平均 Ct 値が 43 未満のとき「小麦遺伝子検出」と判定し, 2 点並行試験のいずれか一方でも小麦遺伝子検出と判定された場合には「小麦遺伝子陽性」と判定した.

第2項 加熱加工食品による実態調査及び加熱モデル実験

1) 実験材料

2021年11月から2022年3月に福岡市内の大手コンビニエンスストアチェーン3社の販売店から入手した惣菜計50検体を試料とした。そのうち47検体が10°C以下保存のチルド惣菜、残り3検体が容器包装詰加圧加熱殺菌された常温保存可能品であった。各試料は、1包装の全量を、フードプロセッサ（パナソニック製MK-K48）を用いて常温で約1分間粉碎し、均質化したものを試料とし、測定まで-30°Cで保存した。

2) 試料の表示確認

試料の裏面の食品表示欄に記載の原材料表示、食品表示基準に基づく食物アレルギーの代替表記及び特定原材料に準ずるものの表示を確認した。また、別途、欄外及び表面に食物アレルギー表示がある場合にはそれらの表示についても確認した。

3) ELISA 法

均質化した試料1gをモリナガキット及び日ハムキットを用いて第2章のとおりに行った。

4) 試料からのDNA抽出及びDNA希釈

均質化した試料2gを第3章第2節5)と同様に操作してDNAを抽出し、滅菌水で調整して100 μ L DNA溶液を調製した。吸光度を測定し、TE緩衝液でDNA濃度が20ng/ μ Lとなるよう調製した。

5) リアルタイム PCR (qPCR)

前節のとおりとした。

6) 判定方法

前節のとおりとした。

7) ビーフシチューのモデル実験

ビーフシチューなどの煮込み料理を想定し、牛肉 100%のミンチ肉 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50mL 容) に採り、小麦遺伝子の検出が十分可能な濃度である 1,000 mg/kg 相当の小麦粉 2mg 及び蒸留水 5mL を加えて良く混合した後、中心温度が 95°C となるように 105°C の恒温乾燥機 (アドバンテック社製, DRM620DE) で加温したものをモデル試料とした。加熱時間は 24 時間とし、途中の 3, 6, 9, 12 時間経過後にサンプリングして検査を行った。検査は、小麦タンパク質量を定量するため、ELISA 法は 2 つのキットを用いて、希釈倍率を 800 倍となるように操作した以外は前節と同様の操作を行った。次に、2 点並行で前項と同様に DNA 抽出を行い、前節と同様に qPCR 法の操作を行い、植物遺伝子及び小麦遺伝子の検出を行った。

8) 統計処理

ビーフシチューのモデル試験において、モデル試料の加熱時間ごとに 2 点並行で抽出した DNA を用いて qPCR 法を行い、植物遺伝子及び小麦遺伝子の検出を行った結果得られた 3 ウェル並行の

平均 Ct 値と加熱時間との関係性を散布図にした。最小二乗法により直線回帰し、相関係数及び決定係数を求めた。

第3節 結果及び考察

第1項 小麦の銘柄による実用性評価

1) 銘柄ごとのDNA収量結果

12銘柄の小麦から抽出されたDNA量、DNAの純度の指標である $A_{260}/_{280}$ 及び $A_{260}/_{230}$ を表4-2に示す。12銘柄の試料2gから抽出されたDNAは平均203 μ gで、いずれも $A_{260}/_{280}$ は1.8~1.9、 $A_{260}/_{230}$ は2.3であり、銘柄及び製粉加工による差は認められなかった。

2) 検出下限の比較結果

12銘柄の小麦から抽出されたDNAを段階希釈し、qPCR法及び通知法(PCR法)でそれぞれ増幅し、植物遺伝子及び小麦遺伝子の検出下限を確認した。銘柄ごとの結果の詳細を表4-3に、12銘柄の検出下限のまとめを表4-4に示す。qPCR法の植物遺伝子の検出下限は12銘柄全てにおいて0.003ngであり、通知法の検出下限の1/160~1/16,000の範囲内であり、陽性対照として十分な感度であることが示された。qPCR法の小麦遺伝子の検出下限は、前章の小麦粉では0.013ngであったが、銘柄ごとの確認では0.5ngが1銘柄、0.05ngが4銘柄、0.025ngが4銘柄、及び0.013ngが3銘柄であり、銘柄による検出感度の差が認められた。通知法の小麦遺伝子の検出感度についても、前章の小麦粉では0.05ngであったが、銘柄ごとの確認では0.5ngが6銘柄、0.05ngが6銘柄であり、銘柄による感度の差が認められた。同じ銘柄の小麦遺伝子の検出下限をqPCR法及び通知法とで比較した結果では、No.1 Canada Western Red Spring, US Hard Red Winter-Semi Hard, US Western White (White Club + Soft White), Australian Premium White for Japan, Australian Prime Hard, チクゴイズミ, シロガネ, チクシ W2 及びサトノソラの計9銘柄は、検出下限が小さくなり、感度上昇が認められた。qPCR法及び通知法の検出下限が同等だったのはUS No.2 Dark

Northern Spring, キタホナミ及び Canada Western Amber Durum- *Triticum durum* の3銘柄であった。これらの結果から、qPCR法では、小麦の銘柄による感度は通知法といずれも同等以上であることを確認した。

第2項 加熱加工食品による実態調査及び加熱モデル実験

1) 試料の食物アレルギー表示調査結果

小麦遺伝子検査 qPCR 法の実用性評価試料 50 検体の内訳及び食物アレルギー表示を表 4-5 に示す。検体は、魚介類を主原料としたもの（さばの塩焼、銀だらの塩照り焼き、銀鮭の塩焼き、エビチリソース）が 5 検体、肉類を主原料としたもの（ハンバーグ、肉団子、酢豚、角煮、ビーフシチュー、カレー等）が 16 検体、野菜を主原料としたもの（肉じゃが、ひじき煮、きんぴらごぼう、五目煮豆、卵の花、ポテトサラダ等）が 26 検体、鶏卵を主原料としたもの（卵焼き、卵サラダ）が 3 検体であった。検体に表示された特定原材料（えび・かに・小麦・そば・卵・乳成分・落花生）7 品目の内訳は、小麦が 40 検体と一番多く、次いで多い順に乳成分 23 検体、卵 16 検体、えび 4 検体、落花生 1 検体であった。なお、かきの表示はなかったが甲殻類としてえびと合わせて計上した。特定原材料 7 品目いずれも表示がなかったものは、さばの塩焼、銀鮭の塩焼、野菜と大豆ミートのタコスミート、黒豆、金時豆、蒸しサラダ豆の 6 検体であり、特定原材料 7 品目及び特定原材料に準ずるもの 21 品目のいずれの表示がない検体は金時豆だけであった。これらの結果から、食品表示を基に小麦アレルギー患者が市販の惣菜を用いて小麦の除去食を実施する場合、小麦を含まない食品を選択するのは困難であることが予想された。

2) ELISA 法による小麦タンパク質の検出結果

試料の ELISA による小麦タンパク質（スクリーニング）検査結果を表 4-6 に示す。食物アレルギーン小麦表示のない 10 検体はすべて、日ハムキット及びモリナガキットのいずれの検査結果においても小麦の定量下限（0.3 mg/kg）未満であり、表示は適正であると考えられた。小麦の表示がある

40 検体のうち、小麦タンパク質が基準値以上となり小麦陽性と判定された検体は 14 検体であった。

これらはハンバーグ、ビーフシチュー、ミートボール、海老チリソース、卵サラダなど、多くの試料で原材料に小麦粉表示があり、つなぎ等として小麦粉そのものが使用された惣菜であると推察された。一方、特定原材料小麦の表示がある 26 検体では、日ハムキット及びモリナガキットのいずれにおいても小麦タンパク質は定量下限未満であった。これらの惣菜の多くは、肉じゃが、きんぴらごぼうなどのしょう油を使用した煮物であった。しょう油は原料として小麦を使用するため現状の表示制度では特定原材料小麦の記載が必要である。しかし、しょう油に含まれる小麦アレルゲンが醸造工程を経て消失すること（古林ら、2005）から、実際に含まれる小麦タンパク質量は ELISA 法の定量下限未満であったと考えられる。また、臨床現場での小麦アレルギー患者の指導では、しょう油の原材料としての小麦では通常症状は発現しないとされている（伊藤、2009）ことから、特定原材料小麦の表示がしょう油由来のみであれば喫食可能な患者が多いと考えられる。しかし、食品表示上では、小麦タンパク質が基準値以上に含まれる食品としょう油由来の小麦が含まれる場合も区別はできず、結果的に患者の選択肢の幅を狭めていることになるのではないかと危惧される。

令和 5 年 4 月から遺伝子組換え食品表示制度が改正され、従来分別流通生産管理されていた大豆で可能であった「遺伝子組換えでない」等の任意表示は、分別流通生産管理されかつ検査で遺伝子組換え大豆が検出されないものに限って表示可能となった（消費者庁次長通、2015）。この遺伝子組換え食品の表示制度では、検査による検出の有無で表示を選択することとなる。そこで、特定原材料の表示においても検査による検出の有無で表示を選択する新制度に変更することを提言したい。つまり、しょう油を使用した場合に、信頼性のある検査法による検査で小麦タンパク質が検出されない場合については、原材料に含まれる場合とは区別する表示にすることが小麦アレルギーの患者

にとって有益であると考えられる。実際に、特定原材料表示で小麦の下にかっこ書きで「小麦はし
ょう油由来です」等と併記している加工食品の例もある。食品のアレルゲンに関する表示基準は患
者のためにという観点から、科学的知見をもとに行政及び食品業界全体が取組み、改善していく必
要がある。

4) チルド惣菜試料からの DNA 抽出結果

検査試料から抽出された DNA の収量を表 4-7 に示す。試料を主な原材料ごとに肉系試料、魚系
試料、卵系試料及び野菜系試料と分類したとき、各試料 2 g から 2 並行で抽出された DNA 量は、平
均で肉系試料が 100 µg、魚系試料が 60 µg、野菜系試料が 15 µg、卵系試料が 1.2 µg であった。肉系
及び魚系試料と比較して、野菜系試料から抽出された DNA 量が少なかったのは、植物の細胞壁が
DNA の抽出効率の低下させていることも要因の一つであると推察された。細胞壁のある野菜系試
料より細胞壁をもたない卵系試料から抽出された平均 DNA 量が少なかったのは、これらの試料は
すべて加工食品であり、原材料及び調理工程による DNA の分解、抽出方法への影響等が考えられ
たが原因は不明であった。なお、抽出された DNA の純度を示す A_{260}/A_{280} は平均 1.8 ± 0.2 (最小値
1.0, 最大値 1.9) であり、qPCR に適した純度であった。

5) チルド惣菜試料の qPCR 法による小麦遺伝子検査結果

チルド惣菜試料の qPCR 法による小麦遺伝子検査結果を表 4-8 に示す。また、表 4-8 における ELISA
法で小麦陽性と判定された 14 検体についての qPCR 法による小麦遺伝子の検出結果を表 4-9 に抜粋
して示す。多くの試料の小麦遺伝子検査結果は ELISA 法による小麦の結果と同じであった。魚、肉

のみを主原料とするような惣菜では、植物の遺伝子が増幅せず検出されなかったことから、適正な管理下で製造されているものと推察された。ひじき煮では、小麦使用の表示があるにもかかわらず、2種類のうち1種類で植物遺伝子及び小麦遺伝子のいずれも不検出であった。遺伝子が不検出となった原因は、DNAの抽出量が少なかったことにあると考えられたが、2種類のひじき煮において結果が異なったのは加工の違いによるものと推察された。ELISA法で小麦陽性と判定された14検体のうち6検体からは小麦遺伝子が検出され、小麦陽性と判定された。しかし8検体からは小麦遺伝子を検出できず、小麦陰性と判定された。これらの8検体はいずれもビーフシチュー、ビーフカレーなどの煮込み工程のある惣菜であった。この結果から、他の惣菜に比べて長時間の加熱工程のある食品ではDNA変性の可能性が推察された。

6) ELISA法及びqPCR法による小麦検査に対する加熱処理の影響

モデル試料におけるELISA法及びqPCR法による小麦検査に対する加熱処理の影響を表4-10に示す。モデル試料には、牛肉ミンチ肉に対し、1,000 mg/kgの小麦粉（小麦タンパク質として約100 mg/kg相当）が含まれていた。2つのキットに基づくELISA法による小麦タンパク質の定量結果から、加熱によるタンパク質の変性の影響を確認した。日ハムキットによる小麦タンパク質の定量結果は、加熱時間0～12時間までは>20 mg/kg、加熱24時間で17 mg/kgであった。モリナガキットによる小麦タンパク質の定量結果は、加熱0～3時間では17 mg/kg、加熱6～9時間で13 mg/kg、12時間で11 mg/kg、24時間で8 mg/kgと加熱時間が長くなるほど定量値は減少する傾向が認められた。ELISA法での特定原材料小麦の結果は基準値10 mg/kg以上を陽性と判定し、2つのキットの両方もしくはどちらか一方でも陽性の場合には陽性と判定するため、今回の条件である中心温度95°Cで0～24時間

常圧加熱を行った場合、すべての条件で小麦陽性と判定され、加熱による判定結果に差は認められなかった（表 4-12）。モデル試料 2g から得られた DNA 収量は、加熱 3 時間後では加熱前と比べていずれも約 40 μg と差は認められなかったが、6、9、12 及び 24 時間と加熱時間の経過とともに、23 μg から 0.6 μg まで徐々に減少した（図 4-1）。また、抽出した DNA の純度の指標である 260nm の吸光度に対する 280nm の吸光度比 (A_{260}/A_{280}) は、加熱 12 時間後までは 1.8~1.9 と PCR に適している純度であったものが、24 時間後には A_{260}/A_{280} が 1.5~1.6 となり純度の低下が認められた（表 4-12）。抽出した DNA の濃度を 20ng/ μL に調整し、これに満たない場合はそのまま鋳型 DNA として用いて qPCR 法を行った。その結果、モデル試料の加熱時間が 3、6、9、12、24 時間と長くなると Ct 値が大きくなった（図 4-2）。また、24 時間後は Ct 値が 43 を超えたため、不検出と判定された。加熱時間と Ct 値の回帰分析では相関係数が 0.996 となり、正の相関があった。一方、小麦の遺伝子については、増幅部位がアレルゲン部位であり、コピー数が少ないため、もともと Ct 値は植物遺伝子より大きかったが、加熱後 0~3 時間は Ct 値が得られたが、3 時間を超えると Ct 値が得られず検知不能であった（表 4-12）。モデル試料によるこれらの結果から、ELISA 法では小麦タンパク質が検出可能な試料であっても、qPCR 法で小麦 DNA の検出が困難な事例があることが判明した。一般的なビーフシチューの製造では長時間の煮込み工程があり、チルド惣菜を製造する場合でも条件は異なっても煮込み、もしくは類似する工程はあると考えられる。その煮込み工程が DNA 収量を低下させ、qPCR 法で小麦遺伝子を検出できなかったものと推察された。また、同じビーフシチューでも容器包装詰加圧加熱殺菌では植物検知用 qPCR の Ct 値が 30 を超えており DNA の断片化等の影響が推察された（表 4-12）。製造工程での加熱にさらに圧力が加わることで、DNA の断片化が促進されると推察される。このことは曾根らの報告（Mano et al 2017, 曾我ら 2018）とも矛盾しな

い結果であった。今回開発した qPCR 法は焼菓子では高感度化に成功し、ELISA 法と同じ結果を得ることが可能となった。しかし、煮込み工程のあるビーフシチュー及びカレーでは、ELISA 法で基準値以上の小麦タンパク質が検出されても qPCR 法で小麦遺伝子が不検出となる事例があることが判明した。ELISA 法の市販キットは高額なため、安価な qPCR 法をスクリーニング検査に採用するとコスト的にメリットがあるが、ビーフシチューに代表される加熱方法の類似した食品群については、qPCR 法と並行して ELISA 法による小麦タンパク質の検査を実施する等、qPCR 法の特徴を考慮した運用が必要なことが示唆された。

表 4-1 評価に用いた小麦 12 銘柄の内訳

No	小麦の銘柄	原産国	種類	特徴	主な用途
1	No.1 Canada Western Red Spring	カナダ	原麦	硬質赤色春小麦	パン用
2	US No.2 Dark Northern Spring	アメリカ	原麦	硬質赤色冬小麦	パン用
3	US Hard Red Winter-Semi Hard	アメリカ	原麦	硬質赤色春小麦	中華めん, 即席めん
4	US Western White (White Club + Soft White)	アメリカ	原麦	軟質白小麦	菓子用
5	Australian Premium White for Japan	オーストラリア	原麦	白小麦	めん用
6	Australian Prime Hard	オーストラリア	原麦	硬質白小麦	中華めん, パン用
7	チクゴイズミ	国産	原麦	冬小麦	日本めん用
8	シロガネ	国産	原麦	冬小麦	日本めん用
9	チクシ W2	国産	原麦	硬質冬小麦	ラーメン用
10	キタホナミ	国産	小麦粉	冬小麦	日本めん用
11	Canada Western Amber Durum Triticum durum	カナダ	小麦粉	春小麦	パスタ用
12	サトノソラ	国産	小麦粉	冬小麦	日本めん用

表 4-2 12 銘柄の試料から抽出した小麦 DNA の収量及び純度

No	小麦の銘柄	原産国	種類	DNA収量 (μg /試料2g)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	No.1 Canada Western Red Spring	カナダ	原麦	195	1.8	2.3
2	US No.2 Dark Northern Spring	アメリカ	原麦	161	1.8	2.3
3	US Hard Red Winter-Semi Hard	アメリカ	原麦	251	1.9	2.3
4	US Western White (white Club + Soft White)	アメリカ	原麦	216	1.9	2.3
5	Australian Premium White for Japan	オーストラリア	原麦	202	1.9	2.3
6	Australian Prime Hard	オーストラリア	原麦	232	1.9	2.3
7	チクゴイズミ	国産	原麦	225	1.9	2.3
8	シロガネ	国産	原麦	214	1.9	2.3
9	チクシ W2	国産	原麦	234	1.9	2.3
10	キタホナミ	国産	小麦粉	161	1.9	2.3
11	Canada Western Amber Durum Triticum durum	カナダ	小麦粉	174	1.9	2.3
12	サトノソラ	国産	小麦粉	169	1.9	2.3

表 4-3 小麦 12 銘柄の試料を用いた通知法及び qPCR 法の小麦遺伝子検出下限

(1) No.1 Canada Western Red Spring

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.91 ± 0.10	25.90 ± 0.03	+	+
5	27.51 ± 0.07	29.32 ± 0.13	+	+
0.5	30.99 ± 0.05	32.83 ± 0.38	+	+
0.05	34.44 ± 0.04	37.44 ± 1.16	-	-
0.025	35.19 ± 0.07	37.34 ± 0.49	-	-
0.013	36.27 ± 0.11	no Ct	-	-
0.006	37.35 ± 0.08	no Ct	-	-
0.003	38.57 ± 0.11	no Ct	-	-

(2) US No.2 Dark Northern Spring

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.42 ± 0.07	25.79 ± 0.07	+	+
5	27.03 ± 0.07	29.30 ± 0.07	+	+
0.5	30.55 ± 0.09	32.70 ± 0.33	-	+
0.05	33.91 ± 0.08	36.27 ± 1.22	-	+
0.025	34.67 ± 0.10	no Ct	-	-
0.013	35.89 ± 0.08	no Ct	-	-
0.006	36.86 ± 0.04	no Ct	-	-
0.003	37.67 ± 0.28	no Ct	-	-

(3) US Hard Red Winter-Semi Hard

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.57 ± 0.08	25.97 ± 0.03	+	+
5	27.09 ± 0.09	29.33 ± 0.05	+	+
0.5	30.61 ± 0.21	32.80 ± 0.21	-	+
0.05	34.03 ± 0.08	36.56 ± 0.95	-	+
0.025	34.94 ± 0.28	37.80 ± 0.35	-	-
0.013	35.93 ± 0.07	no Ct	-	-
0.006	37.23 ± 0.18	no Ct	-	-
0.003	38.03 ± 0.14	no Ct	-	-

(4) US Western White (White Club + Soft White)

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 值)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.24 ± 0.08	26.14 ± 0.08	+	+
5	26.93 ± 0.06	29.62 ± 0.08	+	+
0.5	30.46 ± 0.15	33.48 ± 0.30	-	+
0.05	33.94 ± 0.11	35.41 ± 0.58	-	-
0.025	35.41 ± 0.05	no Ct	-	-
0.013	36.26 ± 0.09	no Ct	-	-
0.006	37.25 ± 0.08	no Ct	-	-
0.003	38.22 ± 0.24	no Ct	-	-

(5) Australian Premium White for Japan

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 值)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.46 ± 0.04	26.09 ± 0.03	+	+
5	27.17 ± 0.12	29.64 ± 0.12	+	+
0.5	30.41 ± 0.14	33.14 ± 0.38	-	+
0.05	33.72 ± 0.09	35.81 ± 0.04	-	-
0.025	35.19 ± 0.19	36.98 ± 1.32	-	-
0.013	35.73 ± 0.07	38.88 ± 2.97	-	-
0.006	36.81 ± 0.19	no Ct	-	-
0.003	38.08 ± 0.35	no Ct	-	-

(6) Australian Prime Hard

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 值)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.01 ± 0.05	26.06 ± 0.04	+	+
5	26.55 ± 0.03	29.50 ± 0.06	+	+
0.5	29.99 ± 0.07	32.42 ± 0.24	-	+
0.05	33.50 ± 0.24	37.24 ± 0.78	-	+
0.025	34.37 ± 0.11	38.79 ± 1.17	-	-
0.013	35.53 ± 0.16	no Ct	-	-
0.006	36.63 ± 0.14	no Ct	-	-
0.003	37.62 ± 0.26	no Ct	-	-

(7) チクゴイズミ

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.33 ± 0.07	26.09 ± 0.04	+	+
5	26.86 ± 0.08	29.50 ± 0.03	+	+
0.5	30.40 ± 0.08	32.83 ± 0.02	-	+
0.05	33.72 ± 0.12	38.86 ± 0.43	-	-
0.025	34.73 ± 0.14	38.26 ± 2.45	-	-
0.013	35.72 ± 0.09	no Ct	-	-
0.006	36.62 ± 0.37	no Ct	-	-
0.003	38.03 ± 0.51	no Ct	-	-

(8) シロガネ

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	24.23 ± 0.10	26.05 ± 0.06	+	+
5	27.65 ± 0.14	29.32 ± 0.37	-	+
0.5	31.13 ± 0.05	32.12 ± 1.17	-	+
0.05	34.58 ± 0.19	36.32 ± 0.39	-	-
0.025	35.34 ± 0.12	no Ct	-	-
0.013	36.56 ± 0.21	no Ct	-	-
0.006	37.42 ± 0.25	no Ct	-	-
0.003	38.56 ± 0.35	no Ct	-	-

(9) チクシ W2

小麦 DNA(ng)	qPCR法 (Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	23.45 ± 0.07	25.95 ± 0.07	+	+
5	26.75 ± 0.05	29.32 ± 0.06	+	-
0.5	30.22 ± 0.06	32.75 ± 0.22	-	+
0.05	33.55 ± 0.13	36.30 ± 1.31	-	+
0.025	34.39 ± 0.13	37.17 ± 1.69	-	-
0.013	35.69 ± 0.28	40.97 ± 5.79	-	-
0.006	36.72 ± 0.08	no Ct	-	-
0.003	37.90 ± 0.30	no Ct	-	-

(10) キタホナミ

小麦 DNA(ng)	qPCR法(Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	22.32 ± 0.14	26.19 ± 0.02	+	+
5	25.76 ± 0.10	29.75 ± 0.08	+	+
0.5	29.11 ± 0.03	32.88 ± 0.23	-	-
0.05	32.44 ± 0.17	36.58 ± 1.08	-	+
0.025	33.42 ± 0.16	no Ct	-	-
0.013	34.43 ± 0.11	no Ct	-	-
0.006	36.65 ± 0.27	no Ct	-	-
0.003	35.42 ± 0.05	no Ct	-	-

(11) Canada Western Amber Durum- Triticum durum

小麦 DNA(ng)	qPCR法(Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	21.71 ± 0.13	26.75 ± 0.04	+	+
5	25.12 ± 0.161	30.29 ± 0.06	+	+
0.5	28.36 ± 0.072	33.89 ± 0.25	-	+
0.05	31.79 ± 0.143	no Ct	-	-
0.025	32.61 ± 0.13	no Ct	-	-
0.013	33.92 ± 0.071	no Ct	-	-
0.006	34.96 ± 0.099	no Ct	-	-
0.003	35.76 ± 0.151	no Ct	-	-

(12) サトノソラ

小麦 DNA(ng)	qPCR法(Ct 値)		通知法(PCR法)	
	植物	小麦	植物	小麦
50	21.63 ± 0.05	26.23 ± 0.03	+	+
5	24.93 ± 0.03	29.73 ± 0.10	+	+
0.5	28.39 ± 0.11	33.08 ± 0.16	-	+
0.05	31.62 ± 0.12	35.89 ± 0.29	-	+
0.025	32.59 ± 0.07	37.68 ± 1.67	-	-
0.013	33.69 ± 0.12	39.43 ± 0.22	-	-
0.006	34.87 ± 0.07	no Ct	-	-
0.003	27.58 ± 11.42	no Ct	-	-

表 4-4 12 銘柄の小麦の検出下限値まとめ

No.	小麦の銘柄	種類	検出下限値 (DNA量(ng))			
			qPCR法		通知法(PCR法)	
			植物	小麦	植物	小麦
1	No.1 Canada Western Red Spring	原麦	0.003	0.025	0.5	0.5
2	US No.2 Dark Northern Spring	原麦	0.003	0.05	5	0.05
3	US Hard Red Winter-Semi Hard	原麦	0.003	0.025	5	0.05
4	US Western White (White Club + Soft White)	原麦	0.003	0.05	5	0.5
5	Australian Premium White for Japan	原麦	0.003	0.013	5	0.5
6	Australian Prime Hard	原麦	0.003	0.025	5	0.05
7	チクゴイズミ	原麦	0.003	0.025	5	0.5
8	シロガネ	原麦	0.003	0.05	50	0.5
9	チクシ W2	原麦	0.003	0.013	5	0.05
10	キタホナミ	小麦粉	0.003	0.05	5	0.05
11	Canada Western Amber Durum- Triticum durum	小麦粉	0.003	0.5	5	0.5
12	サトノソラ	小麦粉	0.003	0.013	5	0.05

(n=3)

表 4-5 小麦遺伝子検査 qPCR 法の実用性評価試料

No.	品名	主原料による 分類	表示		
			特定原材料	特定原材料に準ずるもの	小麦（再掲）
1	さばの塩焼	魚介類	無	さば	無
2	銀だらの照り焼き	魚介類	小麦	大豆	有
3	銀鮭の塩焼	魚介類	無	さけ	無
4	海老チリソース	魚介類	卵・乳成分・小麦・えび	大豆・鶏肉・りんご	有
5	海老チリソース	魚介類	えび・小麦・卵・乳成分	大豆・豚肉・鶏肉	有
6	和風ハンバーグ	肉類	卵・乳成分・小麦	牛肉・大豆・鶏肉・豚肉	有
7	ハンバーグ	肉類	卵・乳成分・小麦	牛肉・大豆・鶏肉・豚肉・ゼラチン	有
8	ミートボール（肉だん	肉類	卵・乳成分・小麦	大豆・鶏肉	有
9	酢豚	肉類	えび・小麦・卵・乳成分	大豆・鶏肉・豚肉・もも・りんご	有
10	豚角煮	肉類	小麦・卵・乳成分	大豆・豚肉	有
11	ビーフシチュー	肉類	乳成分・小麦	牛肉・大豆・鶏肉・豚肉	有
12	ビーフシチュー	肉類	小麦・乳成分	牛肉・大豆・鶏肉・豚肉・ゼラチン	有
13	ビーフシチュー	肉類	小麦・乳成分	牛肉・大豆・鶏肉・豚肉	有
14	ビーフシチュー	肉類	小麦・乳成分	牛肉・ごま・大豆・鶏肉・豚肉・りんご・ゼラチン	有
15	ビーフシチュー	肉類	小麦・乳成分	牛肉・大豆・鶏肉・豚肉・ゼラチン	有
16	牛タンシチュー	肉類	小麦	牛肉・鶏肉・豚肉	有
17	ビーフカレー	肉類	小麦・乳成分・落花生	牛肉・ごま・大豆・鶏肉・豚肉・りんご	有
18	ビーフカレー	肉類	小麦・乳成分	オレンジ・牛肉・ごま・大豆・鶏肉・バナナ・豚肉・もも・りんご	有
19	グリーンカレー	肉類	えび・小麦・乳成分	大豆・鶏肉	有
20	ボルシチ	肉類	小麦	牛肉・ごま・大豆・鶏肉・豚肉・りんご	有
21	砂肝スモーク	肉類	乳成分	鶏肉	無
22	肉じゃが	野菜	小麦	牛肉・大豆	有
23	肉じゃが	野菜	小麦	大豆・鶏肉	有
24	肉じゃが	野菜	小麦・乳成分	大豆・豚肉	有
25	きんぴらごぼう	野菜	小麦	ごま・さば・大豆	有
26	きんぴらごぼう	野菜	小麦	ごま・大豆	有
27	ひじき煮	野菜	小麦	さば・大豆	有
28	ひじき煮	野菜	小麦	ごま・大豆	有
29	筑前煮	野菜	乳成分・小麦	さば・大豆・鶏肉	有
30	切干大根	野菜	小麦	さば・大豆	有
31	里芋の煮っころがし	野菜	小麦	大豆	有
32	さつまいも煮	野菜	小麦	大豆	有
33	筍の土佐煮	野菜	小麦	大豆	有
34	うの花	野菜	卵・小麦	さば・大豆・鶏肉	有
35	うの花	野菜	小麦	さば・大豆	有
36	黒豆	野菜	無	大豆	無
37	野菜豆	野菜	小麦	さば・大豆	有
38	金時豆	野菜	無	なし	無
39	蒸しサラダ豆	野菜	無	大豆	無
40	五目白和え	野菜	小麦	ごま・大豆	有
41	かぼちゃサラダ	野菜	卵	オレンジ・大豆	無
42	ポテトサラダ	野菜	卵	大豆	無
43	ポテトサラダ	野菜	卵	大豆	無
44	ベーコンポテトサラダ	野菜	卵・乳成分・小麦	大豆・鶏肉・りんご	有
45	ごぼうサラダ	野菜	卵・乳成分・小麦	ごま・大豆	有
46	野菜と大豆ミートのタコ	野菜	無	大豆	無
47	やわらか穂先メンマ	野菜	小麦	ごま・大豆	有
48	だし巻き卵	鶏卵	卵・乳成分・小麦	大豆	有
49	厚焼き玉子	鶏卵	卵・乳成分・小麦	大豆	有
50	たまごサラダ	鶏卵	卵・乳成分・小麦	大豆・りんご・ゼラチン	有

表 4-6 チルド惣菜のスクリーニング検査結果

No.	品名	主原料	小麦の表示	日ハムキット (mg/kg)	モリナガキット (mg/kg)
1	さばの塩焼	魚介類	無	(-)	(-)
2	銀だらの照り焼き	魚介類	有	(-)	(-)
3	銀鮭の塩焼	魚介類	無	(-)	(-)
4	海老チリソース	魚介類	有	(-)	(-)
5	海老チリソース	魚介類	有	>20	>20
6	和風ハンバーグ	肉類	有	>20	>20
7	ハンバーグ	肉類	有	>20	>20
8	ミートボール (肉だんご)	肉類	有	>20	>20
9	酢豚	肉類	有	>20	>20
10	豚角煮	肉類	有	(-)	(-)
11	ビーフシチュー	肉類	有	>20	>20
12	ビーフシチュー	肉類	有	>20	>20
13	ビーフシチュー	肉類	有	>20	>20
14	ビーフシチュー	肉類	有	>20	>20
15	ビーフチュー	肉類	有	>20	>20
16	牛タンシチュー	肉類	有	12.9	>20
17	ビーフカレー	肉類	有	>20	>20
18	ビーフカレー	肉類	有	>20	>20
19	グリーンカレー	肉類	有	(-)	(-)
20	ボルシチ	肉類	有	(-)	(-)
21	砂肝スモーク	肉類	無	(-)	(-)
22	肉じゃが	野菜	有	(-)	(-)
23	肉じゃが	野菜	有	(-)	(-)
24	肉じゃが	野菜	有	(-)	(-)
25	きんぴらごぼう	野菜	有	(-)	(-)
26	きんぴらごぼう	野菜	有	(-)	(-)
27	ひじき煮	野菜	有	(-)	(-)
28	ひじき煮	野菜	有	(-)	(-)
29	筑前煮	野菜	有	(-)	(-)
30	切干大根	野菜	有	(-)	(-)
31	里芋の煮っころがし	野菜	有	(-)	(-)
32	さつまいも煮	野菜	有	(-)	(-)
33	筍の土佐煮	野菜	有	(-)	(-)
34	うの花	野菜	有	(-)	(-)
35	うの花	野菜	有	(-)	(-)
36	黒豆	野菜	無	(-)	(-)
37	野菜豆	野菜	有	(-)	(-)
38	金時豆	野菜	無	(-)	(-)
39	蒸しサラダ豆	野菜	無	(-)	(-)
40	五目白和え	野菜	有	(-)	(-)
41	かぼちゃサラダ	野菜	無	(-)	(-)
42	ポテトサラダ	野菜	無	(-)	(-)
43	ポテトサラダ	野菜	無	(-)	(-)
44	ベーコンポテトサラダ	野菜	有	(-)	(-)
45	ごぼうサラダ	野菜	有	(-)	(-)
46	野菜と大豆ミートのタコス ミート	野菜	無	(-)	(-)
47	やわらか穂先メンマ	野菜	有	(-)	(-)
48	だし巻き卵	鶏卵	有	(-)	(-)
49	厚焼き玉子	鶏卵	有	(-)	(-)
50	たまごサラダ	鶏卵	有	>20	>20

表4-7 チルド惣菜からのDNA抽出結果 (n=2)

No.	品名	小麦の 表示	1			2		
			DNA量 (μg / 試料 2g)	A260/A280	A260/A230	DNA量 (μg / 試料 2g)	A260/A280	A260/A230
1	さばの塩焼	無	108	1.9	2.4	113	1.9	2.2
2	銀だらの照り焼き	有	45.3	1.9	2.3	52.3	1.9	2.4
3	銀鮭の塩焼	無	67.8	1.9	2.2	72.6	1.9	2.3
4	海老チリソース	有	34.7	1.9	2.4	45.5	1.9	2.4
5	海老チリソース	有	28.2	1.9	2.3	32.6	1.9	2.1
6	和風ハンバーグ	有	63.0	1.9	2.3	78.7	1.9	2.4
7	ハンバーグ	有	90.1	1.8	2.3	50.0	1.9	2.1
8	ミートボール (肉だんご)	有	261	1.9	2.3	274	1.9	2.4
9	酢豚	有	106	1.9	2.4	96.0	1.9	2.4
10	豚角煮	有	144	1.9	2.4	158	1.9	2.4
11	ビーフシチュー	有	76.4	1.9	2.3	71.9	1.9	2.3
12	ビーフシチュー	有	50.0	1.9	2.3	83.6	1.9	2.2
13	ビーフシチュー	有	47.1	1.9	2.2	79.6	1.9	2.1
14	ビーフシチュー	有	37.9	1.7	1.4	47.2	1.8	1.6
15	ビーフシチュー	有	31.9	1.8	2.2	39.0	1.8	2.2
16	牛タンシチュー	有	73.5	1.9	2.2	96.4	1.9	2.2
17	ビーフカレー	有	62.4	1.9	2.2	74.9	1.9	2.3
18	ビーフカレー	有	46.4	1.9	2.2	48.5	1.9	2.3
19	グリーンカレー	有	56.7	1.9	2.0	76.6	1.9	2.3
20	ボルシチ	有	6.3	2.0	2.9	17.5	1.8	1.9
21	砂肝スモーク	無	476	1.9	2.4	324	1.9	2.4
22	肉じゃが	有	20.5	1.9	2.3	21.7	1.9	2.3
23	肉じゃが	有	12.2	1.8	2.2	13.5	1.9	2.2
24	肉じゃが	有	19.1	1.8	2.3	10.6	1.8	1.8
25	きんぴらごぼう	有	15.6	1.7	1.4	11.5	1.8	1.6
26	きんぴらごぼう	有	5.6	1.7	1.6	5.6	1.7	1.4
27	ひじき煮	有	8.5	1.6	0.9	4.8	1.5	0.8
28	ひじき煮	有	5.5	1.3	0.6	6.4	1.3	0.5
29	筑前煮	有	77.9	1.9	2.4	89.4	1.9	2.4
30	切干大根	有	5.2	1.8	2.1	6.2	1.8	1.9
31	里芋の煮っころがし	有	5.4	1.8	2.2	9.5	1.8	1.7
32	さつまいも煮	有	1.1	1.7	2.8	1.4	1.6	1.3
33	筍の土佐煮	有	0.3	1.5	4.4	0.2	1.6	2.6
34	うの花	有	10.6	1.9	1.7	19.4	1.9	1.8
35	うの花	有	0.2	1.6	3.6	10.9	1.8	1.6
36	黒豆	無	18.6	1.8	2.0	26.5	1.9	1.8
37	野菜豆	有	13.0	1.8	1.4	19.8	1.8	1.4
38	金時豆	無	0.1	1.5	4.3	8.9	1.8	1.9
39	蒸しサラダ豆	無	74.5	1.8	2.2	71.9	1.9	2.2
40	五目白和え	有	0.7	1.5	0.5	16.9	1.9	1.8
41	かぼちゃサラダ	無	4.4	1.8	1.9	1.6	1.9	1.9
42	ポテトサラダ	無	2.8	1.7	1.5	3.2	1.8	1.6
43	ポテトサラダ	無	2.6	1.7	1.5	3.8	1.7	1.5
44	ベーコンポテトサラダ	有	10.0	1.8	2.0	8.2	1.7	1.5
45	ごぼうサラダ	有	4.8	1.7	1.6	6.7	1.7	1.7
46	野菜と大豆ミートのタコスミート	無	53.6	1.9	2.3	35.8	1.9	2.3
47	やわらか穂先メンマ	有	3.0	1.6	2.0	3.6	1.7	1.5
48	だし巻き卵	有	2.5	1.4	0.1	1.7	1.2	0.1
49	厚焼き玉子	有	1.2	1.1	0.1	0.6	1.0	0.1
50	たまごサラダ	有	0.8	1.3	0.3	0.6	1.3	0.3

表 4-8 チルド惣菜試料の qPCR 法による小麦遺伝子検査結果 (n=2)

No.	品名	小麦の 表示	1			2		
			Ct値		小麦判定	Ct値		小麦判定
			植物	小麦		植物	小麦	
1	さばの塩焼	無	-	-	-	-	-	
2	銀だらの照り焼き	有	37.11	-	-	37.68	-	
3	銀鮭の塩焼	無	-	-	-	-	-	
4	海老チリソース	有	27.06	-	-	27.24	-	
5	海老チリソース	有	24.60	28.39	+	24.92	27.86	
6	和風ハンバーグ	有	22.61	32.44	+	23.32	32.52	
7	ハンバーグ	有	22.91	33.60	+	22.46	32.85	
8	ミートボール (肉だんご)	有	28.63	35.04	+	28.10	34.20	
9	酢豚	有	27.64	32.25	+	27.422	32.109	
10	豚角煮	有	46.63	-	-	22.24	-	
11	ビーフシチュー	有	29.30	-	-	28.83	-	
12	ビーフシチュー	有	25.58	-	-	26.44	-	
13	ビーフシチュー	有	28.31	-	-	28.84	-	
14	ビーフシチュー	有	27.91	-	-	28.86	-	
15	ビーフチュー	有	30.41	-	-	30.77	-	
16	牛タンシチュー	有	35.08	-	-	35.53	-	
17	ビーフカレー	有	27.98	-	-	28.21	-	
18	ビーフカレー	有	28.15	-	-	28.00	-	
19	グリーンカレー	有	21.84	-	-	22.66	-	
20	ボルシチ	有	38.70	-	-	39.69	-	
21	砂肝スモーク	無	32.42	-	-	-	-	
22	肉じゃが	有	20.70	-	-	20.34	-	
23	肉じゃが	有	19.79	-	-	20.24	-	
24	肉じゃが	有	19.37	-	-	19.68	-	
25	きんぴらごぼう	有	15.95	-	-	16.03	-	
26	きんぴらごぼう	有	16.98	-	-	17.09	-	
27	ひじき煮	有	29.58	-	-	48.33	-	
28	ひじき煮	有	-	-	-	-	-	
29	筑前煮	有	22.17	-	-	22.25	-	
30	切干大根	有	19.16	-	-	19.84	-	
31	里芋の煮っころがし	有	23.89	-	-	24.29	-	
32	さつまいも煮	有	20.46	-	-	21.09	-	
33	筍の土佐煮	有	23.75	-	-	40.17	-	
34	うの花	有	20.65	-	-	18.55	-	
35	うの花	有	23.63	-	-	19.82	-	
36	黒豆	無	21.13	-	-	21.37	-	
37	野菜豆	有	28.77	-	-	21.36	-	
38	金時豆	無	39.45	-	-	23.00	-	
39	蒸しサラダ豆	無	25.19	-	-	24.80	-	
40	五目白和え	有	20.62	-	-	18.48	-	
41	かぼちゃサラダ	無	-	-	-	-	-	
42	ポテトサラダ	無	16.99	-	-	17.93	-	
43	ポテトサラダ	無	19.47	-	-	21.50	-	
44	ベーコンポテトサラダ	有	23.20	-	-	23.92	-	
45	ごぼうサラダ	有	16.77	-	-	16.84	-	
46	野菜と大豆ミートのタコスミート	無	18.19	-	-	19.22	-	
47	やわらか穂先メンマ	有	25.87	-	-	24.81	-	
48	だし巻き卵	有	34.78	-	-	37.856	-	
49	厚焼き玉子	有	35.26	-	-	36.78	-	
50	たまごサラダ	有	26.50	32.43	+	28.00	33.62	

表 4-9 ELISA で小麦陽性となったチルド惣菜試料の qPCR 法による小麦遺伝子検査結果

No.	品名	小麦表示	ELISA法結果			qPCR法結果					
			日ハム キット (mg/kg)	モリナガ キット (mg/kg)	判定	1			2		
						Ct値		判定	Ct値		判定
植物	小麦	植物	小麦	判定							
5	海老チリソース	小麦	>20	>20	+	24.60	28.39	+	24.92	27.86	+
6	和風ハンバーグ	小麦	>20	>20	+	22.61	32.44	+	23.32	32.52	+
7	ハンバーグ	小麦	>20	>20	+	22.91	33.60	+	22.46	32.85	+
8	ミートボール (肉だんご)	小麦	>20	>20	+	28.63	35.04	+	28.10	34.20	+
9	酢豚	小麦	>20	>20	+	27.64	32.25	+	27.42	32.11	+
11	ビーフシチュー	小麦	>20	>20	+	29.30	-	-	28.83	-	-
12	ビーフシチュー	小麦	>20	>20	+	25.58	-	-	26.44	-	-
13	ビーフシチュー	小麦	>20	>20	+	28.31	-	-	28.84	-	-
14	ビーフシチュー	小麦	>20	>20	+	27.91	-	-	28.86	-	-
15	ビーフチャー	小麦	>20	>20	+	30.41	-	-	30.77	-	-
16	牛タンシチュー	小麦	13	>20	+	35.08	-	-	35.53	-	-
17	ビーフカレー	小麦	>20	>20	+	27.98	-	-	28.21	-	-
18	ビーフカレー	小麦	>20	>20	+	28.15	-	-	28.00	-	-
50	たまごサラダ	小麦	>20	>20	+	26.50	32.43	+	28.00	33.62	+

表4-10 モデル試料におけるELISA法およびqPCR法による小麦検査に対する加熱処理の影響

No.	試料	加熱時間 (時間)	ELISA結果			DNA抽出結果						qPCR法結果				
			日ハム キット (mg/kg)	モリナガ キット (mg/kg)	判定	DNA量 ($\mu\text{g}/\text{試料 } 2\text{g}$)		DNA量 ($\mu\text{g}/\text{試料 } 2\text{g}$)		Ct値		Ct値		判定		
						A_{260}/A_{380}	A_{360}/A_{230}	A_{260}/A_{380}	A_{360}/A_{230}	植物	小麦	植物	小麦	植物	小麦	
1	肉、0H	0	0	0	-	33.8	1.8	2.2	39.8	1.9	2.3	>43	-	-	-	-
2	肉、0H、2mg/2g	0	>20	17	+	40.9	1.9	2.2	39.3	1.9	2.3	31.51	34.20	+	31.18	33.73
3	肉、3H、2mg/2g	3	>20	17	+	35.1	1.9	2.2	41.9	1.9	2.2	32.61	36.29	+	32.56	36.46
4	肉、6H、2mg/2g	6	>20	13	+	24.7	1.8	2.1	22.6	1.8	2.2	35.31	-	-	35.50	-
5	肉、9H、2mg/2g	9	>20	13	+	12.4	1.8	2.1	13.0	1.8	2.0	35.74	-	-	36.17	-
6	肉、12H、2mg/2g	12	>20	11	+	4.9	1.8	1.7	5.7	1.8	2.1	38.61	-	-	37.62	-
7	肉、24H、2mg/2g	24	17	8	+	0.6	1.5	1.1	0.6	1.6	1.6	44.36	-	-	44.97	-

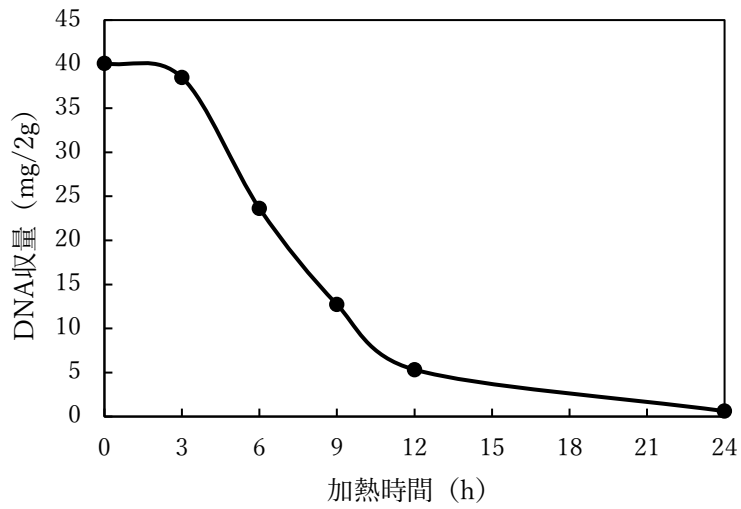


図 4-11 モデル試料における加熱時間と DNA 収量の関係

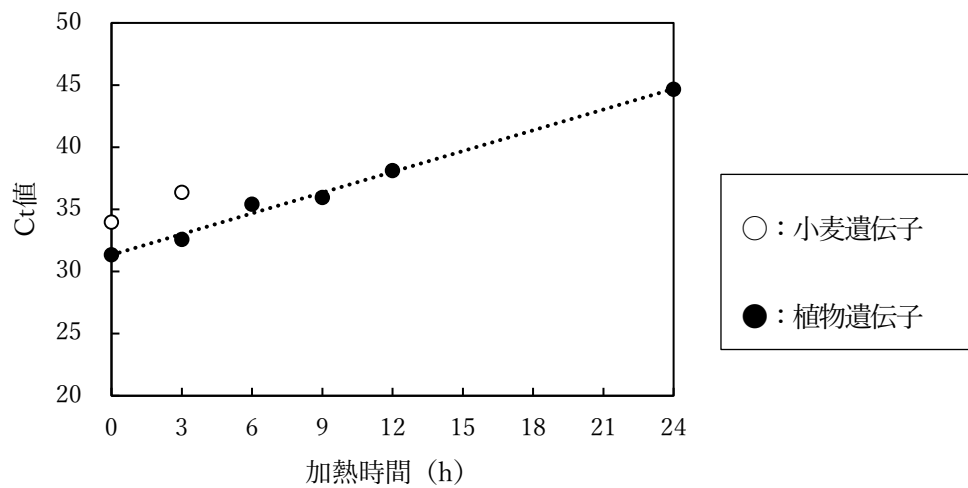


図 4-12 植物遺伝子及び小麦遺伝子検査における Ct 値と加熱時間の関係

第5章 総括

食物アレルギーの患者数は年々増えている。食物アレルゲン表示制度の対象である特定原材料は、2002年の表示制度開始当初は、「卵、乳、小麦、そば及び落花生」の5品目であったが、「えび・かに」の追加に続いて、2023年3月には、消費者庁食品表示基準の一部改正により、「くるみ」が追加され、現在8品目となった（2025年3月末までは経過措置期間）。この20年余りの間に、食物アレルギーに対する食品事業者の理解は進んできており、特定原材料表示のない食品から該当する特定原材料のタンパク質が基準値10mg/kg以上検出される事例は減少している。しかし、違反事例はなくなっておらず、健康被害の事故報告事例も発生している。特定原材料の表示については、患者にとっては、命に係わる重要な情報であるが、患者本人及び家族以外では、その重要性があまり認識されていない現実がある。そこで、重要となるのは、科学的な根拠に基づく表示とその確認のための検査の信頼性そして情報発信による啓発活動である。福岡市では、2003年から市販食品における特定原材料の検査を実施してきた。その中でも、食品の原材料として広く使用されていること、比較的アレルギー患者数が多く、難治性であり、食物依存性運動誘発アナフィラキシー、経皮感作アレルギー、セリアック病等関連の疾病が多いことから、本研究では食品表示の重要性の高い小麦に注目して研究を行った。第2章では、2003年から2022年までの20年間の特定原材料（小麦）の検査結果とその間の変化をまとめた。その中で、スクリーニング検査であるELISA法で10mg/kg以上の小麦タンパク質を検出したにも関わらず、確認検査のPCR法で小麦遺伝子が陰性となり行政上問題となった事例を経験したことから、小麦遺伝子検査法の高感度化について検討を行った。第3章ではリアルタイムPCR法（qPCR法）による小麦遺伝子の高感度な検出法の開発を行い、検

出下限の確認、加熱加工食品である米粉クッキーを用いた感度の確認及び遺伝子検査の高感度化の契機となった確認検査の PCR 法で小麦遺伝子陰性となった実試料による感度上昇を確認した。第 4 章では、入手可能であった小麦計 12 銘柄を用いて、開発した qPCR 法が通知法に比べて同等以上の感度であることを確認した。さらに、市販の容器包装入りチルド惣菜等 50 検体について、アレルギー表示の調査及び小麦汚染の実態調査を実施した。その結果、50 検体中 40 検体に特定原材料の小麦の表示がなされており、特定原材料の中で最も表示が多かった。しかし、原材料として小麦粉が使用されておらず、原材料のしょう油由来小麦表示の場合では、いずれの検体からも小麦タンパク質及び小麦遺伝子は検出されなかった。しょう油由来の小麦については、一般的にもアレルギーは起きにくいとされ、小麦アレルギー患者でも食べることができるとされている。今後、しょう油由来の小麦については、しょう油由来であることを明記して、原材料に小麦を含む場合と区別するなど食品表示制度を見直すことで、アレルギー患者の食品の選択肢を増やせるように改善が十分可能であり、また必要であると考え。しかし一方で、チルド惣菜の中で、原材料に小麦が含まれており、ELISA 法で小麦タンパク質が 10mg/kg 以上検出された複数のビーフシチュー試料については、qPCR 法で遺伝子を検出することが困難であった。牛ミンチ肉を用いた再現実験から、常圧、100°C以下の温度であっても長時間の加熱工程がある場合、小麦遺伝子及び植物に共通な遺伝子は断片化等のダメージを受け、qPCR 法では小麦遺伝子の検出が困難となることが判明した。このような場合でも、第一義に正しい原材料表示を行うことで、健康被害につながる事故は未然防止できると考えられるが、遺伝子検出上の問題点であり、今後の課題になろう。検査法の新たな動きとして、2023 年 3 月の特定原材料にくるみが追加されたと同時に、通知法が改正され、小麦の確認検査は、従来の植物遺伝子及び小麦遺伝子の PCR 法に加えて、定性リアルタイム PCR 法が追加され

た。従来と同じく植物検知用の PCR 法を行い、植物遺伝子の検出を確認した後で、定性リアルタイム PCR 法による小麦遺伝子の増幅を行う。増幅領域は ITS 領域であり、基準となるプラスミドの Ct 値より試料の Ct 値が小さいときに増幅と判定する。プラスミドとの比較を行うことで、カットオフ値を設定し、環境中からの偽陽性を排除している。本研究で開発した qPCR 法では小麦アレルギーの原因となるタンパク質の遺伝子の塩基配列のうち、アレルゲンとなるアミノ酸配列部分をコードする配列の内部領域を増幅していることから、通知法の定性リアルタイム PCR とは増幅部位が異なっている。検査の際に検査法が複数あることは、様々な検体に対応する際に役立つと考えられることから、今後も実際の行政の現場で役立つように、他のアレルゲンの検出及び同定のために重要な方法の改良や開発について研究を行っていく所存である。

謝辞

本研究の実施と論文執筆にあたり、懇切なるご指導とご校閲を賜りました九州大学農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学研究室 宮本敬久教授に心より感謝申し上げます。

本論文作成にあたり丁寧な査読をして頂き、有意義なご指摘を賜りました食料化学工学講座食品製造工学研究室 井倉則之教授並びに食料化学工学講座食品衛生化学研究室 本城賢一准教授に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多大なるご協力いただきました福岡市保健環境研究所中牟田啓子前所長、川崎恵研究員、宮本道彦主任研究員、小出石千明研究員、近藤芳和子研究員はじめ歴代の保健科学課食品化学担当の研究員の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご支援とご理解をいただきました福岡市保健環境研究所城戸裕子所長、保健科学課日高千恵元課長、佐野由紀子前課長、宮尾義浩課長並びに環境科学課船越吾朗課長に深く感謝申し上げます。

参考文献

Boyce, JA et al.. (2016): Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID sponsored Expert Panel Report. The Journal of Allergy Clinical Immunology. 126, S1-S58

Battais, F., Mothes, T., Moneret-Vautrin, D A., Pineau, F., Kanny, G., Popineau, Y., Bodinier, M., Denery-Papini, S. (2005) : Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat, Allergy, **60** (6), 815-21

CODEX Alimentarius International Food Standards (2020) : Code of Practice on Food Allergen Management For Food Business Operators, CXC 80-2020

Ito, K., Futamura, M., Borres, M P., Takaoka, Y, Dahlstrom, J., Sakamoto, T., Tanaka, A., Kohno, K., Matsuo, H., Morita, E. (2008) : IgE antibodies to omega-5 gliadin associate with immediate symptoms on oral wheat challenge in Japanese children, Allergy, **63** (11), 1536-1542

Mano, J., Nishitsuji Y., Kikuchi Y., Fukudome, S., Hayashida, T., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. (2017) : Quantification of DNA fragmentation in processed foods using real-time PCR, Food Chemistry, **226**(1), 149-155

Miyahara, T., Miyake, N., Sawahuji, K., Kitta, K., Nakamura, K., Kondo, K., Ozeki, Y. (2016) :
Wheat DNA fragmentation of commercial processed foods, *Japanese Journal of Food Chemistry
and Safety*, **23**(3), 141-148

Miyazaki, A., Watanabe, S., Ogata, K., Nagatomi, Y., Kokutani, R., Minegishi, Y., Tamehiro, N., Sakai,
S., Adachi, R., and Hirao, T. (2019) : Real-time PCR Detection Methods for Food Allergens
(Wheat, Buckwheat, and Peanuts) Using Reference Plasmids, *Journal of Agricultural and Food
Chemistry*, **67**, 5680-5866

Morita, E, Matsuo, H, Chinuki Y., Takahashi, H., Dahlstrom, J., Tanaka, A. (2009) : Food-
Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis -Importance of Omega-5 Gliadin and HMW-Glutenin as
Causative Antigens for Wheat-dependent Exercise-induced anaphylaxis-. *Allergology International*,
58 (4), 493-498

Shoji, M., 2018, Adachi, R., Akiyama, H., (2018) : Japanese Food Allergen Labeling Regulation: An
Update, *Journal of AOAC International* **101**(1),8-13

Uchino, M., Noguchi, T., Takano, K (2004) : Thermostability of DNA from wheat in heated food
products, *Food Preservation Science* **30** (4), 195-198

Watanabe, T., Akiyama, H., Maleki, S., Yamakawa, H., Iijima, K., Yamazaki, F., Matsumoto, T., Futo, S., Arakawa, F., Watai, M., Maitani, T. (2006) : A Specific Qualitative Detection Method for Peanut (*Arachis Hypogaea*) In Foods Using Polymerase Chain Reaction, *Journal of Food Biochemistry*, **30**, 215-233

相原雄幸 (2007) : 食物依存性運動誘発アナフィラキシー, *アレルギー*, 56 (5), 451-456X

穂山浩 (2003) : 食品中のアレルギー物質検出試験法について(特定原材料検出法について), *日本小児アレルギー学会誌*, **17**(1), 23-30

穂山浩, 安達玲子 (2021) : 我が国の食物アレルギー表示のリスクアナリシスと国際貢献への展望, *国立医薬品食品衛生研究所報告*, **139**, 10-19

石本聖, 浅田征彦, 小西秀則, 金戸恵子 (2013) : アレルギー物質を原材料として含む加工食品からの DNA 検出法に関する検討, *石川県保健環境研究センター研究報告書*, **50**, 30-32

伊藤節子 (2009) : 食物アレルギー患者指導の実際, *アレルギー*, **58** (11) 1490-1496

伊藤浩明 (2019) : 専門医のためのアレルギー講座 36. 食物アレルギー (成人含む) 2.食物アレルギーコンポーネント研究の進歩, *アレルギー*, **68** (9), 1095-1101

海老沢元宏, 伊藤浩明, 藤澤隆夫監修 (2021) : 食物アレルギー診療ガイドライン 2021, 一般社団法人日本小児アレルギー学会, 協和企画

老田茂 (2008) : 小麦カルボキシペプチダーゼによる小麦アレルゲンタンパク質の分解, 東北農業研究, **61**, 205-206

香西はな, 矢野博己, 加藤保子 (2006) : 小麦タンパク質とアレルギー—小麦依存性運動誘発アナフィラキシーに注目して—, 川崎医療福祉学会誌, **16** (1), 11-19

古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一 (2005) : 醤油醸造における小麦アレルゲンの分解機構, 日本醸造協会誌, **100** (2), 96-101

厚生省生活衛生局食品保健課長通知, 「気密性のある容器包装詰めのを冷蔵食品に係る取扱いについて」衛食第 120 号, 平成 11 年 8 月 30 日

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 : 「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」別添, 食安発 1116 第 3 号, 平成 24 年 11 月 16 日

酒井信夫, 中村里香, 中村亮介, 安達玲子, 手島玲子 (2014) : 加水分解コムギの経皮感作によるアレルギー, 化学と生物 52 (7) 431-437

消費者庁, 加工食品の食物アレルギー表示ハンドブック, 2023

消費者庁, 平成 24 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書

消費者庁, 平成 27 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書

消費者庁, 平成 30 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書

消費者庁, 令和 3 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書

消費者庁次長通知 : 「食品表示基準について」, 別添 アレルゲンを含む食品の検査方法, 消食表第 139 号, 平成 27 年 3 月 30 日

曾我慶介, 中村公亮, 岸根雅宏, 高嶋康晴, 宮原平, 木俣真弥, 真野潤一, 高畠令王奈, 小関良宏, 橘田和美, 近藤一成 (2018) : リアルタイム PCR を用いたコーンフレーク中のとうもろこしゲノム DNA 検出について, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 136, 31-39

高橋仁, 森田栄伸 (2008) : 専門医のためのアレルギー講座IV.アレルゲンから見たアレルギー疾患

5. 小麦アレルゲンの免疫生物学とアレルギー疾患, アレルギー, 57 (11), 1094-1101

田中賀治代, 蟹江悠紀, 内藤宙大, 鈴木美沙, 榎村春江, 田上和憲, 酒井一徳, 古田朋子, 山田千佳子, 和泉秀彦, 横大路智治, 松尾裕明 (2017) : 加工食品における小麦タンパク質の不溶化とアレルギー性の変化について, アレルギー, **66** (3) 222-230

特開 2006-126083 (P2006-126083A) : 即時型小麦アレルギーの診断方法, 国立大学法人島根大学

特開 2013-188164 (P2013-188164A) : 小麦の検出方法, ハウス食品グループ

長尾精一 (2014) : 食物と健康の科学シリーズ小麦の機能と科学, 朝倉書店

中村健人 (2006) : 食物アレルギー誘引物質を含む食品の表示制度と検査法ならびに自主管理について, 日本食品保蔵科学会誌, **32** (1) 13-22

日本医療研究開発機構 (AMED), 研究開発代表者海老沢元弘 (2020) : 食物アレルギーの診療の手引き 2020

萩野賀世, 松本ひろ子, 牛山博文, 高野伊知郎 (2010) : 加工食品中の特定原材料検査 (小麦) における PCR 法の検討, 化学生物総合管理, **6** (1), 36-42

橋本博之, 眞壁祐樹, 長谷川康行, 佐二木順子, 宮本文夫 (2008) : ネスティッド PCR 法を用いた食品中の特定原材料 (小麦) の検出, 食品衛生学雑誌, **49** (1), 23-30

橋本博之, 伊藤歌奈子, 田中裕之, 穂山浩, 手島玲子, 眞壁祐樹, 中西希代子, 宮本文夫

(2009) : モデル加工食品を用いた特定原材料 (小麦) 検査におけるネステッドPCR法の検討, 食品衛生学雑誌, **50** (4), 178-183

橋本博行, 吉光真人, 清田恭平 (2017) : 小麦ふるい操作後の小麦アレルゲンの飛散動態の解析, アレルギー, **66** (3), 209-221

福永真衣, 石村典久, 石原俊治 (2021) : 特集 主題 II : 最近注目されている腸の炎症性疾患 I. セリアック病, 日本大腸肛門病会誌, **74** : 572-580

宮崎悦子, 川崎恵, 牟田朱美, 宮本道彦 (2017) : 加熱加工食品における特定原材料 (小麦) の遺伝子検査法の検討, 福岡市保健環境研究所報, **42**, 121-124

森田栄伸 (2023) : 教育講演 1 小麦アレルギーを克服する (リコンビナント小麦アレルゲンによる診断から低アレルゲン小麦の開発まで), 日本農村医学会雑誌, **71** (6), 458-461

文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会報告 (2020) : 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)

