

ネステッドPCR法を用いた食品中の特定原材料(小麦)の検出

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	橋本,博之 眞壁,祐樹 長谷川,康行 佐二木,順子 宮本,文夫
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	49巻1号
掲載ページ	p. 23-30
発行年月	2008年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

ネステッド PCR 法を用いた食品中の特定原材料（小麦）の検出

(平成 19 年 8 月 27 日受理)

橋本博之* 眞壁祐樹 長谷川康行 佐二木順子 宮本文夫

Detection of Wheat as an Allergenic Substance in Food by a Nested PCR Method

Hiroyuki HASHIMOTO*, Yuhki MAKABE, Yasuyuki HASEGAWA, Junko SAJIKI and Fumio MIYAMOTO

Chiba Prefectural Institute of Public Health: 666-2 Nitona-cho, Chuo-ku,
Chiba 260-8715, Japan; * Corresponding author

A nested PCR method was developed for the detection of DNAs extracted from allergenic substances (here, wheat) in food. Because of DNA fragmentation, detection of wheat-specific DNA extracted from food, such as retort pouch food, is very difficult. Therefore, to improve the sensitivity of detection, a nested PCR primer pair (Wtr01NE2-5' and Wtr10NE5-3'; amplicon size 97 bp) was newly designed within the region of the PCR products amplified by the official Japanese primer pair (Wtr01-5' and Wtr10-3'; amplicon size 141 bp) for wheat. Genomic DNAs of seven kinds of commercial processed foods containing wheat, wheat flour and three kinds of wheat flours pressure-heated at 100, 121 and 131°C were extracted with a commercial ion-exchange type kit by modifying the Japanese official method. The nested PCR method involved two PCR procedures. First, PCR was performed by varying both the PCR reagents and cycling conditions of the Japanese official method. Second, PCR was performed using the first PCR products diluted 200-fold with TE buffer. The Japanese official method enabled detection of only four of the seven kinds of foods and three of the four kinds of flours (one sample was just a trace), while the nested PCR method detected all seven foods and all four flours. Investigation of the detectability of the four kinds of wheat flours depending on the size of the amplified fragment using five primer pairs showed that its size must be kept to less than approximately 100 bp. The nested PCR method significantly improved the sensitivity of detection of wheat-specific DNA.

(Received August 27, 2007)

Key words: 特定原材料 allergenic substance; 小麦 wheat; ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction; ネステッド PCR 法 nested PCR method; プライマー primer; 加工食品 processed food

緒 言

近年、食物摂取によって引き起こされる食物アレルギーの患者が急増しており*¹、重要な社会問題となってきた。このような状況のなか、平成 13 年 4 月に食品衛生法関連法令の一部改正が行われ、その後 1 年の猶予期間を経て平成 14 年 4 月から発症例数や重篤度の高い特定原材料 5 項目（卵、乳、小麦、そば、落花生）を含む食品の表示が義務づけられた*²。さらに平成 14 年 11 月には特

定原材料に対する表示の妥当性を検証するために検査法が通知*³され、現在、平成 18 年 6 月に一部改正として通知（通知法）*⁴された試験法により検査が行われている。

通知法では小麦については 2 種類の ELISA キットを用いてスクリーニング検査^{1), 2)}を実施し、どちらか一方が陽性（10 µg/g 以上）となった場合に、PCR 法（通知法 PCR）³⁾により確認検査を実施する。

著者らが、この通知法により加工食品の実態調査を行ったところ、容器包装詰加圧加熱殺菌食品（加圧加熱食品）では、スクリーニング検査で小麦陽性であるにもかかわらず、通知法 PCR で小麦陰性となる例が複数見られた⁴⁾。

* 連絡先

千葉県衛生研究所：〒260-8715 千葉市中央区仁戸名町 666-2

*¹ 厚生労働科学研究班、「食物アレルギー診療の手引き」検討委員会「厚生労働科学研究班による食物アレルギー診療の手引き 2005」（2005）。*² 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「食品衛生法施行規則および乳および乳製品の成分規格などに関する省令の一部を改正する省令の施行について」平成 13 年 3 月 15 日、食発第 79 号（2001）。*³ 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」平成 14 年 11 月 6 日、食発第 1106001 号（2002）。*⁴ 厚生労働省医薬局食品安全部長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について（一部改正）」平成 18 年 6 月 22 日、食安発第 0622003 号（2006）。

この原因の1つとして、加圧加熱処理による小麦由来DNAの低分子化が考えられた。

ネステッドPCRは連続した2回のPCRにより、検出感度と反応特異性が高められることから、遺伝子組換えダイズの検出⁵⁾などに用いられ、検出感度、特異性の向上が確認されている手法である。今回、著者らは確認検査における小麦DNAの検出感度を向上させるため、通知法PCRを一部改良して実施したPCR反応溶液を利用し、新たに作成したネステッドPCR用プライマー対を用いたネステッドPCR法の適用を試みた。今回、小麦含有加工食品、未処理小麦粉および3種の条件で加圧加熱処理を行った小麦粉について、ネステッドPCR法の適用性を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

小麦含有加工食品として市販のクッキー、クラッカー、食パン、そうめん、マカロニ、ソーセージ、レトルトカレーを用いた。また、原材料の小麦の代表例として市販の薄力小麦粉を用いた。

2. 試薬および試液

2.1 DNA抽出

DNAの抽出にはイオン交換樹脂タイプのキットであるGenomic-Tip20/G (QIAGEN社製)を用いた。滅菌水はMillipore社製Milli-Q PLUSおよびMilli-RO5 PLUSで精製した超純水を121°Cで20分間オートクレーブ滅菌したものをを用いた。 α -アミラーゼ (SIGMA社製)は滅菌水により1 mg/mLとなるように調製し、ろ過滅菌したものをを用いた。Proteinase KおよびRNase AはQIAGEN社製を用い、イソプロピルアルコールおよびエタノールは和光純薬工業(株)製を用いた。70%エタノール溶液は滅菌水で調製した。DNAの溶出には滅菌水を用いた。

2.2 PCR反応

PCR反応にはAmpli Taq GOLD & 10×PCR buffer II/MgCl₂ with dNTPs (アプライドバイオシステムズジャパン(株)製)およびFastStart High Fidelity PCR System (ロッシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いた。DNAの希釈調製にはTE緩衝液(各最終濃度10 mmol/L Tris/塩酸, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0))を用いた。陽性コントロールとして、アレルゲンチェッカー(日立化成工業(株)製)付属の陽性コントロールテンプレートをを用いた。

2.3 電気泳動

PCR AEゲル(アドバンス社製)を用い、泳動バッファーには0.5×TBE緩衝液(最終濃度44.5 mmol/L Tris-Borate, 10 mmol/L EDTA)を用いた。DNAマーカーはEZ Load Molecular Ruler 20 bp (バイオラッド(株)製)を用いた。PCR反応液およびDNAマーカーのアプライには6×ローディング緩衝液(ニッポンジーン(株)製)を用いた。DNAの染色には0.5 μg/mLになるよ

うに調製したエチジウムブロマイド(インビトロジェン社製)を用いた。

3. 装置および器具

ミルサー: IFM-700G (イワタニ(株)製), オートクレーブ滅菌器: MLS-3780F (サンヨー(株)製), 冷却遠心機: 5922 (クボタ(株)製), 振とう機: MMS-310 (東京理化器械(株)製), インキュベーター: FMS-100 (東京理化器械(株)製), 恒温槽: ドライサーモバス ALB-221 (イワキ(株)製), マイクロチューブ遠心機: 1-13 (クボタ(株)製), タッチミキサー: MT-31 (ヤマト科学(株)製), 分光光度計: BioSpec-mini ((株)島津製作所製), サーマルサイクラー: PCR Express II (サーモエレクトロン社製), 電気泳動装置: Mupid-ex (アドバンス社製), ゲル振とう機: ベリーダンサーシェーカー (東和科学(株)製), ゲルイメージ解析装置: FAS-III MODEL-TM20 (東洋紡績(株)製)を用いた。

4. 加圧加熱処理小麦粉の調製

市販の薄力小麦粉に4倍重量の滅菌水を加えて混合し、オートクレーブ滅菌器を用いて100°C, 121°C, 131°Cの各温度で、それぞれ20分間加圧加熱処理した。121°C, 131°Cはそれぞれ加圧加熱食品であるレトルト食品、より保存性を高めたハイレトルト食品の殺菌処理温度として設定した。調製した加圧加熱処理小麦粉は使用するまで4°Cで保存した。

5. プライマー

プライマーは逆相カラム精製品をグライナージャパン社に合成委託した。各プライマー溶液はTE緩衝液で25 μmol/Lの濃度に希釈調製し、-30°Cで保存した。

6. DNA溶液の調製

試料はミルサーで粉碎し、調製試料とした。加圧加熱処理小麦粉は処理終了後に均一化し、調製試料とした。通知法PCRではDNA抽出時に2回の静置加温反応があるが、この操作を振とう機およびインキュベーターを用いた振とう加温反応(70 rpm)に変更した。それ以外の操作は通知法に従い、Genomic-Tip20/Gを用いて抽出した。抽出DNA溶液はTE緩衝液で20 ng/μLに希釈調製し、使用するまで-30°Cで保存した。

7. PCR条件

7.1 通知法PCR

PCR反応液は最終濃度が1×PCR緩衝液(アプライドバイオシステムズジャパン(株)製), 0.2 μmol/Lのプライマー Wtr01-5' (5'-CATCACAATCAACTTATGGTGG-3') および Wtr10-3' (5'-TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA-3'), 0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.625 U Taq polymerase となるように混合し、20 ng/μLに希釈調製したDNA溶液を2.5 μL加え、滅菌水により全量を25 μLとした。すべての試液を十分混合した後、95°Cに10分間保ち、95°C30秒間、60°C30秒間、72°C30秒間を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行った。その後72°C7分間最終伸張反応を行った。

Table 1. List of PCR primers

Primer name	Sequence (5'-3')	T_m value ^{a)}	Reference
Tria05-5'	GGTGGTTGGAATGGTTTAGAGG	61.3	This study
Tria04-3'	GGGATCGTCGATGTTCCACACT	64.6	This study
Tria09-5'	ACCACTTCGTCAAGTGAGGTC	61.6	This study
Tria06-3'	CACGAGGTTCGATTACACGAC	62.8	This study
Wtr01-5'	CATCACAATCAACTTATGGTGG	60.1	Footnote No. 4
Wtr10-3'	TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA	63.9	Footnote No. 4
Tria04-5'	ATCTCAGGCAGGGCCATATC	63.6	This study
Tria05-3'	TAAGGATGGGGAACGTTTGG	62.3	This study
DX5-5'	GCCTAGCAACCTTCACAATC	59.7	6), 7)
DX5-3'	GAAACCTGCTGCGGACAAG	64.3	6), 7)
Wtr01NE2-5'	TGGTGGTTGGAATGGTTTAGA	62.4	This study
Wtr10NE5-3'	GGCACGCGGATTGTATATGT	63.0	This study
CP03-5'	CGGACGAGAATAAAGATAGAGT	56.6	8)
CP03-3'	TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA	64.1	8)
Plant01-5'	AAAACCGTCTTCGGGTATC	62.3	9)
Plant01-3'	TTCCAGTGGGGACAGCTATG	63.4	9)

a) Nearest neighbor method.

$$T_m = \frac{1,000\Delta H}{-10.8 + \Delta S + R \cdot \ln(C_i/4)} - 273.15 + 16.6 \log [\text{Na}^+]$$

ΔH (kcal/mol): sum of nearest-neighbor enthalpy changes.

ΔS (kcal/mol·K): sum of nearest-neighbor entropy changes.

R (cal/deg·mol): gas constant = 1.987.

C_i (mol/L): total concentration of oligonucleotide (calculated as 0.2 $\mu\text{mol/L}$).

$[\text{Na}^+]$ (mol/L): concentration of $[\text{Na}^+]$ (calculated as 50 mmol/L).

7.2 ネステッド PCR 法

7.2.1 1st PCR

PCR 反応液は最終濃度が 1×PCR 緩衝液（ロッシュ・ダイアグノスティックス社製）、0.4 $\mu\text{mol/L}$ のプライマー Wtr01-5' および Wtr10-3', 0.2 mmol/L dNTP, 1.8 mmol/L MgCl_2 , 1.25 U Taq polymerase となるように混合し、20 ng/ μL に希釈調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え、滅菌水により全量を 25 μL とした。すべての試液を十分混合した後、95°C に 2 分間保ち、95°C 30 秒間、60°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行った。その後 72°C 7 分間最終伸張反応を行った。

7.2.2 2nd PCR

1st PCR の反応液を TE 緩衝液で 200 倍に希釈したものを鋳型 DNA として 2.5 μL 使用した。ネステッド PCR 用プライマー対として Wtr01NE2-5' (5'-TGGTGGTTGGAATGGTTTAGA-3') および Wtr10NE5-3' (5'-GGCACGCGGATTGTATATGT-3') を用いた。PCR 反応液は 1st PCR と同様の組成を用いた。PCR サイクルはサイクル数を 20 サイクルとし、その他は 1st PCR と同条件で行った。

8. 電気泳動条件

PCR 反応溶液の 7.5 μL を 6×ローディング緩衝液 1.5 μL と混合後、PCR AE ゲルにより 0.5×TBE 緩衝液を泳動バッファーとし、100~135 V の定電圧により 40~50 分間電気泳動した。泳動終了後、0.5 $\mu\text{g/mL}$ エチジウムブロマイド溶液で 20 分間染色し、0.5×TBE 緩衝液で 20 分間脱色した後、ゲルイメージ解析装置により UV (312

nm) を照射し、増幅バンドを検出した。

結果および考察

1. プライマーの設計

ネステッド PCR 用プライマー対は通知法 PCR の小麦検出用プライマー対が作成された tritacin precursor 遺伝子の塩基配列情報 (GenBank™ Accession No. S62630: 1567 bp) を基に、通知法 PCR のプライマー対により増幅される領域 (1,171~1,311 bp) の内側の配列から Primer 3^{*5} を用いて、プライマーのサイズは 18~27 bp、 T_m 値は 57~63°C、GC% は 20~80% で設計した。また、Tria04-5', Tria04-3', Tria05-3', Tria05-5' は同遺伝子の 1,100~1,400 bp の範囲からプライマーのサイズは 20~22 bp、 T_m 値は 60~65°C、GC% は 50~60% で設計し、Tria09-5', Tria06-3' は同遺伝子の全領域からプライマーのサイズは 20~22 bp、 T_m 値は 59~61°C、GC% は 50~60% で設計した。既存の小麦検出用プライマー対として、通知法 PCR のプライマー対 (Wtr01-5', Wtr10-3') および既報^{6), 7)} のプライマー対 (DX5-5', DX5-3') を用いた。植物検出用プライマー対として、通知法 PCR のプライマー対 (CP03-5', CP03-3')⁸⁾ および著者らが作成したプライマー対 (Plant01-5', Plant01-3')⁹⁾ を用いた。使用したプライマーの一覧を Table 1 に示す。また、各プライマーを組み合わせたプライマー対の番号 (No. 1~8) と増幅バンド長を Table 2 に示す。

*5 http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi (2007/03/27 16:00)

Table 2. Primer pair number for detection of wheat-specific DNA and size of amplicon obtained by PCR

No.	Primer pair	Amplicon size (bp)
1	Tria05-5'+Tria04-3'	66
2	Tria09-5'+Tria06-3'	113
3	Wtr01-5'+Wtr10-3'	141
4	Tria04-5'+Tria05-3'	209
5	DX5-5'+DX5-3'	450
6	Wtr01NE2-5'+Wtr10NE5-3'	97
7	CP03-5'+CP03-3'	124
8	Plant01-5'+Plant01-3'	161

2. DNA 溶液中の DNA 濃度

これまで著者らが行った実態調査において、容器包装詰加圧加熱殺菌食品のレトルトカレー 3 試料から抽出した DNA の濃度は 2~11 ng/ μ L と非常に低濃度であった。そこで、DNA 収量の低いレトルトカレーを用いて、通知法の抽出法と本報告で用いた抽出法の比較検討を行ったところ、通知法では抽出 DNA 濃度が 11 ng/ μ L であったレトルトカレーにおいて、本報告で用いた抽出法では 59 ng/ μ L の収量が得られた。また、著者らがバナナ、リンゴおよびオレンジなどの果物から抽出した DNA においても、同様に収量の向上が見られた。DNA 収量の向上は、DNA 抽出時の静置加温反応を振とう加温反応に変更することにより、抽出に用いる G2 緩衝液、 α -アミラーゼおよび Proteinase K と試料との攪拌が効率的に行われ、試薬の反応性が向上したことによるものと推察された。小麦含有加工食品 7 種、未処理小麦粉および加圧加熱処理小麦粉 3 種の抽出 DNA 濃度の測定結果を Table 3 に示す。

DNA 溶液の 230 nm, 260 nm, 280 nm および 320 nm の吸光度を測定し、320 nm の吸光度をバックグラウンド値として減算補正し、260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した。DNA の純度を確認するため、260/280 nm の

吸光度比からタンパク質の量を、260/230 nm の吸光度比から多糖などの夾雑物の量を評価した。抽出 DNA の吸光度比は、260/280 nm が 1.84~1.99, 260/230 nm が 2.04~4.25 の範囲であった。抽出 DNA 濃度は 59~2,480 ng/ μ L の範囲であった。いずれの抽出 DNA においても、鋳型として使用する濃度である 20 ng/ μ L 以上であり、また吸光度比においてはタンパク質および多糖の夾雑は認められなかった。

3. 小麦含有加工食品および加圧加熱処理小麦粉に対する通知法 PCR の適用性

これまで、通知法 PCR の加工食品に対する適用性については十分に検討されていない。そこで、小麦含有加工食品 7 種、未処理小麦粉および加圧加熱処理小麦粉 3 種を用いて、通知法 PCR の適用性を確認した。結果を Table 4 に示す。

抽出した DNA の PCR 阻害作用を評価するために、植物検出用プライマー対 No. 7 を用いて、通知法条件に従い PCR を実施したところ、131°C 処理小麦粉の抽出 DNA からは増幅バンドが検出されなかった。そこで、著者らが作成した植物検出用プライマー対 No. 8⁹⁾ を用いて通知法条件に従い PCR を実施したところ、すべての試料の抽出 DNA において 161 bp 付近に予想される長さの増幅バンドが検出された。以上の結果から、いずれの抽出 DNA も検査に適した品質であると考えられた。

小麦 DNA 検出用のプライマー対 No. 3 により通知法 PCR を実施したところ、レトルトカレーおよび 131°C 処理小麦粉の抽出 DNA からは増幅バンドが検出されなかった。通知法 PCR の条件検討時においても、小麦含有レトルト製品からは小麦 DNA の検出が不可能であった*6 ことから、現行の通知法 PCR は加圧加熱食品の一部には適用困難である可能性が示唆された。

Table 3. Spectrophotometric analysis of extracted DNAs^{a)}

No.	Sample	Ratio		Concentration of DNA (ng/ μ L)
		260/280 nm ^{b)}	260/230 nm ^{c)}	
1	Cookie	1.84	2.04	281
2	Cracker	1.93	2.27	1,930
3	Bread (Syokupan)	1.92	2.18	1,360
4	Thin noodle (Somen)	1.90	2.20	2,480
5	Macaroni	1.93	2.29	2,190
6	Sausage	1.90	2.78	199
7	Retort pouch curry	1.88	4.25	59
8	Wheat flour (WF)	1.89	2.29	1,940
9	Steamed WF at 100°C	1.99	2.58	220
10	Steamed WF at 121°C	1.96	2.19	256
11	Steamed WF at 131°C	1.92	3.13	75

a) DNA extractions were carried out by using Genomic-Tip20/G kit (QIAGEN).

b) Criterion: 1.2-2.5

c) Criterion: \geq 2.0

*6 山川ら, 日本食品衛生学会第 84 回学術講演会講演要旨集, p. 104 (2002).

Table 4. Detection of PCR products amplified from extracted DNAs using three kinds of primer-pairs

No.	Sample	Plant		Wheat
		CP03 ^{a)}	Plant01 ^{b)}	Wtr01+Wtr10 ^{c)}
		124 bp	161 bp	141 bp
1	Cookie	+ ^{d)}	+	+
2	Cracker	+	+	+
3	Bread (Syokupan)	+	+	+
4	Thin noodle (Somen)	+	+	+
5	Macaroni	+	+	+
6	Sausage	+	+	+
7	Retort pouch curry	+	+	- ^{e)}
8	Wheat flour (WF)	+	+	+
9	Steamed WF at 100°C	+	+	+
10	Steamed WF at 121°C	+	+	Tr ^{f)}
11	Steamed WF at 131°C	-	+	-

a) Primer pair No. 7

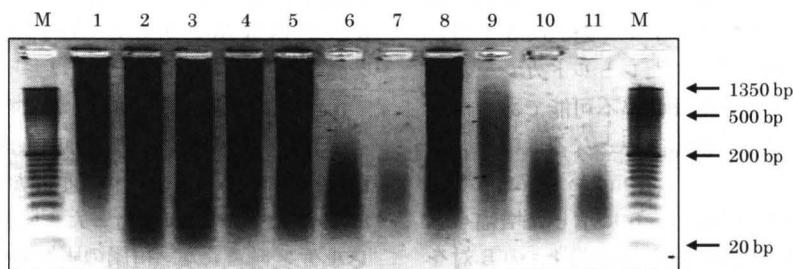
b) Primer pair No. 8

c) Primer pair No.3

d) +: positive

e) -: negative

f) Tr: trace band

**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of DNAs extracted from 11 samples

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, Cookie; 2, Cracker; 3, Bread (Syokupan); 4, Thin noodle (Somen); 5, Macaroni; 6, Sausage; 7, Retort pouch curry; 8, Wheat flour (WF); 9, Steamed WF at 100°C; 10, Steamed WF at 121°C; 11, Steamed WF at 131°C

4. 加工処理による原材料由来 DNA および小麦 DNA の低分子化

大豆含有加工食品では加工処理による大豆 DNA の低分子化が報告されている¹⁰⁾. PCR 法では、抽出した DNA がプライマー対により増幅される領域よりも短く低分子化していた場合、検出が困難になると考えられる. このことから、検出対象 DNA の低分子化の程度および検出用プライマー対の増幅バンド長の設定は DNA 検出の可否を決める重要な要因となっている.

小麦含有加工食品では、加工処理による小麦 DNA の低分子化が十分に検討されていない. そこで、加工処理の異なる小麦含有加工食品 7 種、未処理小麦粉および加圧加熱処理小麦粉 3 種から抽出した DNA を用いて、電気泳動と PCR により小麦 DNA の低分子化を評価した.

4.1 電気泳動による低分子化の評価

DNA の低分子化を電気泳動により評価した結果を Fig. 1 に示す.

小麦含有加工食品では、焙焼加工処理されたクッキー、クラッカー、食パンおよび水練り乾燥加工処理されたそう

めん、マカロニでは高分子の DNA が比較的多く残存していた. 一方、加圧加熱処理されたソーセージ、レトルトカレーでは、それぞれ 300 bp 以上、200 bp 以上の DNA はほとんど確認されなかった.

加圧加熱処理小麦粉では 100°C、121°C、131°C 処理の順に DNA の低分子化が進み、131°C 処理では 180 bp 以上の DNA はほとんど確認されなかった.

クッキーやクラッカーなどの焙焼加工処理は通常 200~300°C 程度の高温度で実施されるが、高分子の DNA が比較的多く残存していた. 一方、加圧加熱処理されたソーセージやレトルトカレーおよび加圧加熱処理小麦粉の 121°C、131°C 処理では 200 bp 以上の高分子 DNA は検出されなかった. 以上の結果から、DNA の低分子化は加工温度よりも加圧加熱の影響が大きいことが示唆された. 今回検討した試料では 131°C 処理小麦粉が最も高度に低分子化していた.

4.2 加工食品における検出限界増幅バンド長の検討

加工食品から抽出した DNA は高度に低分子化しているが、150 bp 以下の DNA は残存していると考えられてい

Table 5. Detection of PCR products amplified from extracted DNAs using five kinds of primer-pairs shown in Table 2 (No. 1-5)

No.	Sample	Amplicon size (bp)				
		66 bp	113 bp	141 bp	209 bp	450 bp
1	Cookie	+ ^{a)}	+	+	+	+
2	Cracker	+	+	+	+	+
3	Bread (Syokupan)	+	+	+	+	+
4	Thin noodle (Somen)	+	+	+	+	+
5	Macaroni	+	+	+	+	+
6	Sausage	+	+	+	+	- ^{b)}
7	Retort pouch curry	-	-	-	-	-
8	Wheat flour (WF)	+	+	+	+	+
9	Steamed WF at 100°C	+	+	+	+	+
10	Steamed WF at 121°C	+	+	Tr ^{c)}	-	-
11	Steamed WF at 131°C	+	+	-	-	-

a) +: positive

b) -: negative

c) Tr: trace band

る^{4), 11)}. そのため、通知法 PCR のプライマー対は 95~141 bp の範囲で設計されている。しかし、141 bp の増幅バンド長を持つ通知法 PCR のプライマー対 No. 3 を用いた検討において、加圧加熱処理されたレトルトカレーおよび 131°C 処理小麦粉の小麦 DNA は検出不可能であった。そこで、各種加工食品における検出限界となる増幅バンド長を検討した。

プライマー対は Table 2 の No. 1~5 に示した増幅バンド長の異なる 66, 113, 141, 209 および 450 bp の 5 対を用いた。プライマー対以外の条件は通知法 PCR に従った。結果を Table 5 に示す。

焙焼加工処理されたクッキー、クラッカー、食パンおよび水練り乾燥加工処理されたそうめん、マカロニではすべてのプライマー対で検出可能であった。しかし、加圧加熱処理されたソーセージでは 450 bp の増幅バンドが検出不可能であった。また、レトルトカレーではすべてのプライマー対で検出不可能であった。一方、未処理小麦粉および 100°C 処理小麦粉ではすべてのプライマー対で検出可能であったが、121°C 処理小麦粉では 66~141 bp, 131°C 処理小麦粉では 66~113 bp の範囲の短い増幅バンドのみが検出され、それより大きな増幅バンドは検出不可能であった。

以上の結果から、レトルトカレーを除いた加工食品および加圧加熱処理小麦の検出限界増幅バンド長はおおむね 113 bp 以下であったことから、プライマー対はおおよそ 100 bp 以下で設計することが有効と考えられた。

5. ネステッド PCR 法による検出

小麦含有加工食品および加圧加熱処理小麦粉を用いて検出限界増幅バンド長の検討を行ったところ、レトルトカレーにおいては増幅バンド長を 66 bp に設定した場合においても検出不可能であった。また、プライマー対 No. 6 を用いて通知法およびネステッド PCR 法の 1st PCR 条件により検出を試みたところ、通知法では検出不可能であ

り、ネステッド PCR 法の 1st PCR においてもバンドが不明瞭で判定が難しかった。そこで、新たに作成したネステッド PCR 用プライマー対を用いたネステッド PCR 法を試みた。

5.1 1st PCR

小麦含有加工食品および加圧加熱処理小麦粉から抽出した 11 種の DNA を用いて通知法 PCR およびネステッド PCR 法の 1st PCR を行った。陽性コントロールとしてアレルゲンチェッカー付属の陽性コントロールテンプレートをを用い、陰性コントロール (Non-template control) として DNA の含まれていない滅菌水を用いた。通知法 PCR の結果を Fig. 2A に、ネステッド PCR 法の 1st PCR の結果を Fig. 2B に示した。通知法 PCR ではレトルトカレーおよび 131°C 処理小麦粉が検出不可能であったが、ネステッド PCR 法の 1st PCR では検出可能であった。この理由としては、PCR に用いる試薬を通知法の試薬から Fast-Start High Fidelity PCR System に変更することで増幅効率が向上したものと推察された。

5.2 2nd PCR

1st PCR において、すべての試料の検出が可能となったが、レトルトカレーおよび 131°C 処理小麦粉増幅の増幅バンドは不明瞭であり、結果の判定が困難であった。そこで、1st PCR の反応液を直接鋳型として 2nd PCR を実施したところ、エキストラバンドが複数検出された。エキストラバンドの検出は 1st PCR で使用したプライマー対の影響と考えられたため、その影響を低減させるために 1st PCR 反応液を TE 緩衝液で 200 倍に希釈し、2nd PCR を実施した。結果を Fig. 2C に示す。2nd PCR ではすべての試料から増幅バンドが明瞭に確認され、容易に判定可能となった。また、アレルゲンチェッカー付属の陽性コントロールテンプレートが 2nd PCR において検出可能であったことから、ネステッド PCR 法の陽性コントロールとして使用可能であることが確認された。

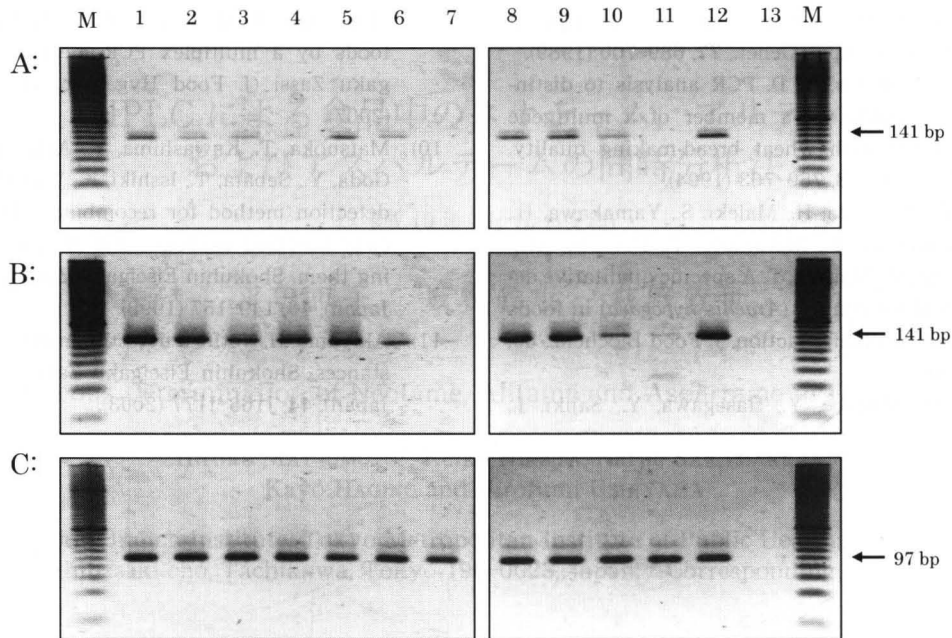


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from DNAs extracted from 13 samples

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

A: Japanese official PCR method, primer pair No. 3.

B: Nested PCR (1st PCR) method, primer pair No. 3.

C: Nested PCR (2nd PCR) method, primer pair No. 6.

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, Cookie; 2, Cracker; 3, Bread (Syokupan); 4, Thin noodle (So-men); 5, Macaroni; 6, Sausage; 7, Retort pouch curry; 8, Wheat flour (WF); 9, Steamed WF at 100°C; 10, Steamed WF at 121°C; 11, Steamed WF at 131°C; 12, Positive control; 13, Non-template control

一般的にネステッド PCR 法は検出感度が高感度であるため、通常の PCR 法に比べてクロスコンタミネーションの危険性が増加するものと考えられている。抽出 DNA の取扱い、PCR 試薬の混合調製、1st PCR 反応溶液の希釈操作などには細心の注意を払う必要がある。試験検査の妥当性を確認するために、試料の検査と同時に Non-template control および陽性コントロールを用いることが重要と考えられる。

まとめ

ネステッド PCR 法を用いた特定原材料（小麦）の検出法を確立した。

DNA の検出限界となる増幅バンド長を検討したところ、プライマー対はおおよそ 100 bp 以下で設定することが有効と考えられた。また、小麦 DNA の低分子化は温度の影響よりも加圧加熱の影響が大きいことが示唆された。

現行の通知法 PCR では一部の加圧加熱食品などで検出不可能であったが、ネステッド PCR 法の 1st PCR により増幅バンドは不明瞭ではあるが検出可能となった。また、1st PCR 反応液を鋳型としてネステッド PCR 法の 2nd PCR を実施したところ、すべての試料で明瞭な増幅バンドが検出可能となった。

今回確立したネステッド PCR 法は、加圧加熱処理により高度に低分子化した DNA においても検出可能であったことから、通常の加工食品および多くのレトルト食品、ハ

イレトルト食品においても適用可能な検査法と考えられる。

なお、本研究の一部は日本食品衛生学会第 93 回学術講演会（2007 年 5 月、東京）において発表した。

文 献

- 1) Takahata, Y. Detection methods for allergic substance in food by enzyme linked immunosorbent assay (1). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, J275-J277 (2002).
- 2) Mamegoshi, S. Detection methods for allergic substance in food by enzyme linked immunosorbent assay (2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, J277-J279 (2002).
- 3) Futo, S. PCR testing for food allergens in food products. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, J280-J282 (2002).
- 4) Hashimoto, H., Makabe, Y., Hasegawa, Y., Sajiki, J., Miyamoto, F. Study on the method for detection of allergenic substance (wheat). *Annual Report of Chiba Institute of Public Health*, **54**, 53-57 (2005).
- 5) Brod, F. C. A., Ferrari, C. dos S., Valente, L. L., Arisi, A. C. M. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, **40**, 748-751 (2007).
- 6) Anderson, O. D., Greene, F. C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight

- glutenin genes from genomes A and B of hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **77**, 689–700 (1989).
- 7) D'ovidio, R., Anderson, O. D. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. *Theor. Appl. Genet.*, **88**, 759–763 (1994).
 - 8) Watanabe, T., Akiyama, H., Maleki, S., Yamakawa, H., Iijima, K., Yamazaki, F., Matumoto, T., Futo, S., Arakawa, F., Watai, M., Maitani, T. A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. *J. Food Biochem.*, **30**, 215–233 (2006).
 - 9) Hashimoto, H., Makabe, Y., Hasegawa, Y., Sajiki, J., Miyamoto, F. Detection of allergenic substances in foods by a multiplex PCR method. *Shokuhin Eiseigaku Zassi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, 132–138 (2007).
 - 10) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *Shokuhin Eiseigaku Zassi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 149–157 (1999).
 - 11) Akiyama, H. Notified detection method for allergic substances. *Shokuhin Eiseigaku Zassi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, J168–J177 (2003).