

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

| | |
|-------|---|
| 誌名 | 食品衛生学雑誌 |
| ISSN | 00156426 |
| 著者名 | 橋本,博之 伊藤,歌奈子 田中,裕之 穉山,浩 手島,玲子 眞壁,祐樹 中西,希代子 宮本,文夫 |
| 発行元 | [日本食品衛生学会] |
| 巻/号 | 50巻4号 |
| 掲載ページ | p. 178-183 |
| 発行年月 | 2009年8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



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

（平成 21 年 1 月 28 日受理）

橋本博之^{1,*} 伊藤歌奈子² 田中裕之² 穂山 浩³
手島玲子³ 眞壁祐樹¹ 中西希代子¹ 宮本文夫¹

Detection of Wheat as an Allergenic Substance in Models of Processed Foods by a Nested PCR Methods

Hiroyuki HASHIMOTO^{1,*}, Kanako ITO², Hiroyuki TANAKA², Hiroshi AKIYAMA³,
Reiko TESHIMA³, Yuhki MAKABE¹, Kiyoko NAKANISHI¹ and Fumio MIYAMOTO¹

¹Chiba Prefectural Institute of Public Health: 666-2 Nitona-cho, Chuo-ku, Chiba 260-8715, Japan;

²Morinaga Institute of Biological Science, Inc.: 2-1-16 Sachiura, Kanazawa-ku,
Yokohama 236-0003, Japan;

³National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,
Tokyo 158-8501, Japan; *Corresponding author

A polymerase chain reaction (PCR) method for verifying the allergen labeling of foods (*i.e.*, the presence of wheat, buckwheat, or peanut) was adopted as the official Japanese identification test by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan in 2002. We have verified the wheat labeling of several commercial food items by using the adopted PCR method. The study has revealed that some foods with positive results in the screening test yielded negative results in the identification test. When the result of the screening test disagrees with that of the identification test, the validation of food labeling is remarkably difficult. Therefore, we developed a nested PCR method with high sensitivity and specificity and employed this method in our routine testing as necessary. In this study, we examined 11 types of models of processed foods containing 10 $\mu\text{g}/\text{g}$ wheat protein by using the adopted PCR and nested PCR methods; these samples were prepared by various processes and had varying physical properties. The adopted and nested PCR methods enabled the detection of wheat in 8 and 10 types of food models, respectively. The reasons for the failure in detecting the food allergens include DNA fragmentation due to the processing of food and the presence of DNA from other sources in the extracted DNA. In both PCR methods, an increase in the amount of template DNA in the PCR mixture enabled the detection of wheat DNA in all the food samples, but an excessive increase in the amount of template DNA hindered PCR amplification. These results indicate that an increase in the amount of template DNA increases the efficiency of the detection of allergens in processed foods by conventional PCR. Further investigation is needed to remove factors that inhibit PCR amplification of the extracted DNA.

(Received January 28, 2009)

Key words: 特定原材料 allergenic substance; 小麦 wheat; モデル加工食品 Processed Food Model; ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction; ネステッド PCR 法 nested PCR method; ELISA enzyme linked immunosorbent assay

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 14 年 4 月に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、

* 連絡先

¹ 千葉県衛生研究所：〒260-8715 千葉市中央区仁戸名町 666-2

² 森永生科学研究所：〒236-0003 横浜市金沢区幸浦 2-1-16

³ 国立医薬品食品衛生研究所：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

*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）。

Table 1. Raw materials and preparation processes in models of processed foods

| Food | Raw materials | Processing conditions |
|-------------------|---|--------------------------------------|
| Juice | Water, Concentrated orange juice, Sugar, Potassium dihydrogen citrate, L-Ascorbyl stearate | Boiled 90°C, 10 min, pH 3.5 |
| Jelly | Water, Sugar, Agar, Muscat flavor, Trisodium citrate, Potassium dihydrogen citrate | Boiled until to 90°C, acid condition |
| Chicken meatball | Chicken, Lard, Potato starch, Water, Sugar | Boiled 100°C, 10 min |
| Tofu | Soy milk, Glucono- δ -lactone | Boiled 70°C, 50 min |
| Boiled fish paste | White fish, Salt, Potato starch | Steamed, 10 min |
| Pudding | Egg, Sugar, Milk, Vanilla essence | Steamed, 15 min |
| Tomato sauce | Tomato puree, Ketchup, Salt, Sugar, Vinegar | Boiled 90°C, 10 min, acid condition |
| Retort A | Japanese radish, Sweet potato, Onion, Carrot, String bean, Welsh onion, Hoshishiitake, Pork, Corn starch, Sugar, Konbu extract, Katsuo extract, Salt, Soy sauce | Boiled 123°C, 12 min |
| Retort B | Edamame, Corn, Carrot, Welsh onion, Ginger, Tofu, Corn, Salmon, Corn starch, Sugar, Sesame oil, Salt, Chicken extract, Glucono- δ -lactone | Boiled 123°C, 12.4 min |
| Retort C | Tomato, Onion, Corn, Broccoli, Celery, Soy bean, Tuna, Corn starch, Salt | Boiled 123°C, 12 min |
| Retort D | Onion, Japanese radish, Welsh onion, Chinese cabbage, Japanese radish (leaf), String bean, Dry mushroom, Chicken, Corn starch, Ryokuto-harusame, Hon-mirin, Abura-age, Yeast extract, Konbu extract, Salt | Boiled 123°C, 12.5 min |

落花生)を含む食品の表示が義務化された*2。その後、これまで特定原材料に準じる品目として推奨表示に指定されていた「えび」および「かに」において、表示の妥当性検証に必要となる検査法がおおむね整備されつつあることから、平成 20 年 6 月に特定原材料に追加され、義務表示品目となった。今後も定期的に食物アレルギー発症状況が検討され、義務表示項目が見直されていくものと考えられる。食物アレルギー疾患を有する患者の食品表示に対する関心は年々高まってきている。これを受けて、公的検査機関や食品メーカーなどでは平成 18 年 6 月に通知された試験法（通知法）*3により、特定原材料表示の妥当性検証を行っている。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（ELISA 法）^{1), 2)}を実施し、両方もしくはどちらか一方が陽性（10 μ g/g 以上）となった場合に、製造記録などを確認し、必要であれば PCR 法（通知法 PCR）³⁾により確認検査を実施することになっている。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、加圧加熱食品などの一部の食品では、ELISA 法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⁾。この差異は通知法作成時に用いられていた旧来のキットでの知見であ

り、界面活性剤や還元剤などの使用により蛋白質の抽出効率を向上させた現在のキット⁵⁾においては、この差異はさらに顕著になっているものと推察される。特定原材料表示の妥当性検証にはスクリーニング検査と確認検査結果および製造記録等の情報が重要であるが、製造記録で使用の有無が確認できない場合も多く、両検査結果が不一致となった場合には表示の検証が著しく困難となる可能性がある。

今回、小麦タンパク質を一定量含有したモデル加工食品を多様な加工条件により複数作製し、通知法 PCR および著者らが報告した高感度検出法であるネステッド PCR 法⁶⁾による検出状況を調べ、併せて鋳型 DNA の増量効果について検討を行ったところ、有用な知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

1.1 原材料

モデル加工食品の作製に用いた 51 種類の原材料 (Table 1) は市販品を購入した。各原材料については、モリナガ FASPEK 小麦測定キット（グリアジン）を用いて小麦が混入していないことを確認した。

1.2 小麦タンパク質

添加用の小麦タンパク質として、通知*3の「(別添 5) 標準品規格」に記載された小麦一次標準粉末を用いた。

1.3 モデル加工食品の作製

各モデル加工食品の原材料および加工条件を Table 1 に示した。モデル加工食品は原材料を混合後、最終加工品

*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)。

における小麦タンパク質濃度が10 µg/gとなるように小麦一次標準粉末を混合し、作製した。

2. 試薬および試液

2.1 ELISA 法

(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 小麦測定キット (グリアジン) を用いた。

2.2 PCR 法

(1) DNA 抽出

試薬類は既報⁶⁾と同様のものを用いた。DNA の共沈剤としてエタチンメイト (ニッポンジーン(株)製) を用いた。

(2) 通知法 PCR およびネステッド PCR 法

試薬類は既報⁶⁾と同様のものを用いた。

3. 装置および器具

ELISA 法および PCR 法に用いる装置および器具は既報^{4), 6)}と同様のものを用いた。

4. 測定条件

モデル加工食品作製後にその全量をミルサーで粉碎し、調製試料とした。

4.1 ELISA 法

通知法^{*3)}に従った。

4.2 PCR 法

(1) DNA の抽出

既報⁶⁾に従った。DNA の共沈剤としてエタチンメイト (ニッポンジーン(株)製) をイソプロパノール沈殿の際に3 µL 使用した。

(2) 通知法 PCR およびネステッド PCR 法

通知法^{*3)}および既報⁶⁾に従った。

結果および考察

1. ELISA 法による小麦タンパク質の検出

11 種のモデル加工食品を用いて ELISA 法により小麦

タンパク質の検出を行った。結果を Table 2 に示す。ELISA 法による測定値は8.6~14.4 µg/g の範囲であった。11 種のモデル加工食品はおおむね10 µg/g 前後の値であったことから、スクリーニング検査陽性のモデル加工食品として以後の PCR 法の検討に用いた。

2. PCR 法による小麦 DNA の検出

2.1 抽出 DNA の評価

著者らは加圧加熱殺菌食品などのように加工の進んだ食品においては振とう加温反応により DNA の収量が向上することを報告している⁶⁾。また、遺伝子組換え食品で DNA 回収時の操作の簡便性および回収率向上が確認されている DNA の共沈剤^{*5)}を用いて、振とう加温反応により抽出を行った。抽出 DNA 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 nm/280 nm の吸光度比からタンパク質の量を、260 nm/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

Table 2. Detection of wheat standard protein using Morinaga FASPEK ELISA kit (Gliadin)

| Food | Gliadin protein (µg/g) |
|-------------------|------------------------|
| Juice | 10.9 |
| Jelly | 10.2 |
| Chicken meatball | 8.6 |
| Tofu | 13.2 |
| Boiled fish paste | 11.6 |
| Pudding | 14.4 |
| Tomato sauce | 11.4 |
| Retort A | 14.3 |
| Retort B | 12.0 |
| Retort C | 9.8 |
| Retort D | 13.2 |

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

| Food | Ratio | | Concentration of DNA (ng/µL) |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | 260 nm/280 nm ^{b)} | 260 nm/230 nm ^{c)} | |
| Juice | 2.46 | 1.03 | 5 |
| Jelly | 1.70 | -0.23 | 2 |
| Chicken meatball | 1.94 | 2.42 | 699 |
| Tofu | 1.95 | 2.48 | 234 |
| Boiled fish paste | 1.94 | 2.40 | 803 |
| Pudding | 1.91 | 3.87 | 9 |
| Tomato sauce | 2.21 | -0.48 | 4 |
| Retort A | 1.93 | 2.53 | 271 |
| Retort B | 1.92 | 2.42 | 321 |
| Retort C | 1.93 | 2.73 | 123 |
| Retort D | 1.93 | 2.53 | 320 |

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

b) Criterion: 1.2-2.5

c) Criterion: ≥ 2.0

*5 眞壁ら、平成17年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第18回理化学研究部会総会・研究会資料 p. 24-27 (2006).

Table 4. Detection of PCR products amplified from extracted DNA by using the adopted PCR and nested PCR methods

| Food | Plant01 ^{a)} | Wheat | |
|-------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| | | Adopted PCR ^{b)} | Nested PCR ^{c)} |
| Juice | + ^{d)} | Tr ^{e)} | + |
| Jelly | Tr | - ^{f)} | + |
| Chicken meatball | + | Tr | + |
| Tofu | + | Tr | + |
| Boiled fish paste | + | Tr | + |
| Pudding | + | + | + |
| Tomato sauce | + | + | + |
| Retort A | + | Tr | + |
| Retort B | + | Tr | + |
| Retort C | + | - | - |
| Retort D | + | - | + |

a) For confirmation the validity of DNA extracted from models for processed food containing plants (show in ref. 6)

b) Adopted detection method for wheat

c) Original detection method for wheat

d) +: positive

e) Tr: trace band

f) -: negative

DNA の吸光度比は、260 nm/280 nm が 1.70~2.46, 260 nm/230 nm が -0.48~3.87 の範囲であった。抽出 DNA 濃度は 2~803 ng/ μ L の範囲であった。十分な DNA 量を抽出することができると考えられる動植物原材料がほとんど使用されていないジュースおよびゼリーでは DNA の収量が低かったことから、小麦一次標準粉末 10 μ g/g のみの添加では検査に必要となる 20 ng/ μ L 以上の濃度の DNA が抽出できないことが確認された。プリンでは動物性原材料である卵と牛乳、トマトソースでは植物性原材料であるトマトピューレ、ケチャップが用いられていることから DNA が抽出可能と推定していたが、抽出困難であった。DNA 収量が低いこれらの加工食品では、DNA 共沈剤の使用によりイソプロパノール沈殿操作が簡便になった。ゼリーとトマトソースにおいては、260 nm/230 nm の吸光度比が原則的基準値の範囲外であったが、多糖などの夾雑物の存在を示す 230 nm の吸光度値が負の値になっていることから、それらの夾雑物量は少ないものと考えられた。また、260 nm/280 nm の吸光度比がおおむね原則的基準値の範囲内であったことから、11 種類のモデル加工食品から抽出した DNA ではタンパク質の夾雑はほぼ認められないものと考えられた。

2.2 通知法 PCR とネステッド PCR 法による検出

通知で示されている植物検出用プライマー対を用いて抽出した DNA を評価した。植物検出用プライマー対 (CP 03) ではレトルト食品 A が検出困難であったことから、より高感度に検出可能と考えられる Plant01⁷⁾ を用いて植物定性の PCR を実施したところ、すべてのモデル加工食品の抽出 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。

著者らが報告したネステッド PCR 法⁵⁾ および比較対象

として通知法 PCR による検出を行った。抽出 DNA 濃度が 20 ng/ μ L 未満の抽出 DNA については、通知法に従い原液をそのまま使用して両 PCR を実施した。小麦 DNA 検出結果を Table 4 に示す。

(1) 通知法 PCR

通知法の小麦 DNA 検出用のプライマー対を用いて通知法 PCR を実施したところ、ゼリー、レトルト食品 C および D の抽出 DNA からは増幅バンドが検出されなかった。また、ジュース、鶏肉団子、豆腐、かまぼこ、レトルト食品 A および B については検出可能ではあるものの増幅バンドが不明瞭であった。小麦検出用プライマー対を用いた通知法 PCR の検出下限値は、トウモロコシ粉に小麦粉を添加した未加熱処理の粉体レベルで 50 μ g/g と報告されている⁸⁾。今回作製したモデル加工食品は既報の検出下限値より低い濃度である 10 μ g/g の小麦一次標準粉末を添加しており、さらにレトルト加工処理などにより DNA が低分子化して、増幅可能な鋳型 DNA 量が微量であることが想定される。そのため、一部の食品において検出不可能となったものと考えられた。

(2) ネステッド PCR 法

通知法 PCR では検出不可能であったゼリー、レトルト D はネステッド PCR 法により検出可能となった。また、通知法 PCR では増幅バンドが不明瞭であったジュース、鶏肉団子、豆腐、かまぼこおよびレトルト食品 A, B において、明瞭な増幅バンドが確認された。しかし、レトルト食品 C の抽出 DNA からは増幅バンドの検出が不可能であった。

3. 小麦 DNA の検出に対する鋳型 DNA の増量の効果

動植物由来原材料の使用割合が高い鶏肉団子やかまぼこなどにおいては十分な量の DNA 収量が得られているが、原材料配合比から推察すると、その抽出 DNA 中には小麦

Table 5. Comparison of the results between the adopted PCR and nested PCR methods for wheat by change of the amount of template DNA extracted from seven types of models of processed foods

| Food | Adopted PCR | | | | Nested PCR | | | |
|-------------------|-------------------|-----|-----|----|-------------------|-----|-----|----|
| | Template DNA (ng) | | | | Template DNA (ng) | | | |
| | Max ^{a)} | 200 | 100 | 50 | Max | 200 | 100 | 50 |
| Chicken meatball | Tr | Tr | Tr | Tr | + | + | + | + |
| Tofu | + | Tr | Tr | Tr | + | + | + | + |
| Boiled fish paste | - | Tr | Tr | Tr | + | + | + | + |
| Retort A | + | Tr | Tr | Tr | + | + | + | + |
| Retort B | + | + | Tr | Tr | + | + | + | + |
| Retort C | + | - | Tr | - | + | - | - | - |
| Retort D | Tr | Tr | - | - | + | + | + | + |

a) Stock solution of each extracted DNA
Abbreviations and symbols are as in Table 4.

以外の DNA が多量に含まれているものと考えられる。一般に PCR 法における最終的な増幅バンド量は PCR 反応液中に存在する「目的とする DNA 領域のコピー数」に依存すると考えられているため、本検討で作製したモデル加工食品のように、目的原材料以外の DNA を多量に含む抽出 DNA 溶液 50 ng (通知量) を鋳型として用いた場合には、その PCR 反応液中の小麦由来 DNA の量が著しく低値になり、アガロースゲルで可視可能なレベルまで DNA が増幅できないことが考えられる。比較的緩やかな加工条件であり、標的 DNA の分解が少ないと考えられる鶏肉団子およびかまぼこにおいて増幅バンドが不明瞭であったことは、これらが原因の一つである可能性が高い。そこで、PCR 反応溶液中の小麦 DNA 量を増量し、増幅バンドを明瞭化することを目的としてネステッド PCR 法により鋳型 DNA 量の検討を行った。同時に通知法 PCR との比較検討を行った。

3.1 高濃度抽出 DNA における検討

抽出 DNA 濃度が 80 ng/ μ L (200 ng/2.5 μ L) 以上のモデル加工食品 7 種の抽出 DNA 溶液を用いて検討を行った。鋳型量は通知量 (50 ng)、その 2 倍量、4 倍量および抽出 DNA 溶液 (原液) の 4 種類を用いた。結果を Table 5 に示す。

通知法では検出不可能であったレトルト食品 C では、100 ng および原液 (308 ng) に増量したところ検出可能となった。またレトルト食品 D では、200 ng および原液 (800 ng) に増量したところ検出可能となり、レトルト食品 C と D の両食品において、鋳型量の増量が有効であることが確認された。しかし、通知法で増幅バンドが検出されていたかまぼこにおいては、原液 (2,008 ng) に増量したところ、バンドの増幅が不可能となった。鋳型量の増量に伴う PCR 阻害物質の増加もしくは過剰な DNA の存在による PCR 反応の物理的な阻害などがその原因と考えられた。一方、ネステッド PCR 法で検出不可能であったレトルト食品 C では、原液 (308 ng) に増量したところ、検出可能となった。レトルト食品 4 種は、ほぼ同等の加工

条件であり、抽出される小麦一次標準粉末由来 DNA の量や加工による DNA の低分子化などの影響もほぼ同等であると考えられるが、両 PCR 法において検出状況に違いが見られた。その原因として増幅可能な鋳型 DNA 量が少ないこと、または 4 種のレトルト食品中の原材料の違いによる PCR 反応の阻害などが考えられた。

1 回の PCR 反応により増幅バンドを検出する通知法 PCR では鋳型量を増量した場合、PCR 阻害物質が大きく影響し、その結果増幅バンドが不明瞭になることが確認された。一方、2 回の PCR 反応を実施するネステッド PCR 法では、1st PCR の増幅において PCR 阻害物質が影響するものの、その増幅産物を TE 緩衝液で 200 倍に希釈して 2nd PCR 反应用鋳型に用いることから PCR 反応阻害作用が低減され、明瞭な増幅バンドが確認可能となった。

3.2 低濃度抽出 DNA における検討

抽出 DNA 濃度が 20 ng/ μ L 以下のモデル加工食品 4 種の抽出 DNA 溶液を用いて検討を行った。これらの抽出 DNA は原液をそのまま使用し、添加する鋳型 DNA 容量の増量を検討した。PCR 反応溶液に添加する鋳型 DNA 容量として通知容量 (2.5 μ L)、その 2 倍容量および 4 倍容量の 3 種類を用いて植物定性 PCR および通知法の小麦定性 PCR を実施した。結果を Table 6 に示す。

プリンとトマトソースでは 3 種のプライマー対および全容量において明瞭なバンドが検出された。ジュースでは通知法 PCR において鋳型 DNA 添加容量を 10 μ L に増量したところ明瞭な増幅バンドが確認された。一方、ゼリーでは通知法の CP03 を用いた植物定性 PCR において、通知の 2 倍容量である 5.0 μ L へ増量することにより増幅バンドが明瞭になった。また、通知法の小麦定性 PCR においては 5.0 μ L への増量により検出可能となった。しかし、両プライマー対ともに 10 μ L まで増量したところ検出不可能となった。ゼリー抽出 DNA では、Plant01 プライマー対を用いた植物定性 PCR を行ったところ、鋳型 DNA 容量の増量に反比例して増幅バンドが薄くなっていた。このことから、ゼリーから抽出した DNA は他のモデル加工食

Table 6. Detection of PCR products amplified from template DNA by change of the volume in four types of models for processed foods

| Food | PCR for Plant | | | | | | Adopted PCR for wheat | | |
|--------------|--------------------|-----|----|---------|-----|----|-------------------------|-----|----|
| | CP03 ^{a)} | | | Plant01 | | | Template DNA (μ L) | | |
| | 2.5 | 5.0 | 10 | 2.5 | 5.0 | 10 | 2.5 | 5.0 | 10 |
| Juice | + | + | + | + | + | + | Tr | Tr | + |
| Jelly | Tr | + | - | + | + | + | - | Tr | - |
| Pudding | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tomato sauce | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

a) Official Japanese primer-pair for specific detection of plant
Abbreviations and symbols are as in Table 4.

品に比べて PCR 阻害作用が強いことが考えられた。

法科学領域では生物学的試料を用いた PCR 検査において正確な結果を導くためには、目的とする DNA 量の推定が重要だと報告されている⁹⁾。本検討の結果からも、さまざまな加工が施され、かつ多種多様な原材料を用いた加工食品を対象とした PCR 検査を実施する際には、食品の原材料組成から目的とする DNA の量および質などを推定し、PCR に用いる鋳型 DNA 量を適切に増量することが検出のための有効な手段の 1 つになると考えられた。しかし、加工食品は複数の原材料を使用していることが多いため、鋳型 DNA 量を増量する場合には DNA の抽出法の検討などを行い、PCR 阻害物質の低減を図ることが今後重要と考えられる。

まとめ

小麦のスクリーニング検査陽性モデル加工食品を 11 種類作製し、通知法 PCR およびネステッド PCR 法による検出状況を調べ、併せて鋳型 DNA の増量効果について検討を行った。現行の通知法 PCR では 8 種類が、ネステッド PCR 法では 10 種類のモデル加工食品が検出可能であった。これらのモデル加工食品では、鋳型 DNA を増量させることにより両 PCR 法で検出可能となった。しかし、過剰増量による PCR 反応阻害により増幅が不可能となることが、かまぼこおよびゼリーで確認された。以上の結果から、加工食品を対象とした PCR 検査法を実施する際には、PCR に用いる鋳型 DNA 量を適切に増量することが正確な結果を導き出すための有効な手段の 1 つになると考えられた。また DNA の抽出方法を検討することにより抽出 DNA 中に存在する PCR 阻害物質の低減を図ることが今後必要と考えられた。

なお、本研究の一部は日本食品衛生学会第 95 回学術講演会（2008 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) Watanabe, Y., Aburatani, K., Mizumura, T., Sakai, M., Muraoka, S., Mamegoshi, S., Honjoh, T. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. *Journal of Immunological Methods*, **300**, 115-123 (2005).
- 6) Hashimoto, H., Makabe, Y., Hasegawa, Y., Sajiki, J., Miyamoto, F. Detection of wheat as an allergenic substances in food by a nested PCR method. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn)*, **49**, 23-30 (2008).
- 7) Hashimoto, H., Makabe, Y., Hasegawa, Y., Sajiki, J., Miyamoto, F. Detection of allergenic substances in foods by a multiplex PCR method. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, 132-138 (2007).
- 8) Yamakawa, H., Akiyama, H., Endo, Y., Miyatake, K., Sakata, K., Sakai, S., Toyoda, M., Urisu, A. Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2561-2564 (2007).
- 9) Nakahara, H., Fujii, K., Mizuno, N., Yoshida, K., Kasai, K. Evaluation of DNA quantification methods for forensic biological samples. *Houkagaku Gijyutsu Gakkaishi (Jpn. J. Forensic Sci. Tech.)*, **12**, 13-26 (2007).