

## 特定原材料検査(卵・乳)における新・旧検査方法の比較

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	渡邊,裕子 赤星,千絵 濟田,清隆 関戸,晴子 橋口,成喜 渡部,健二郎 田中,幸生
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	52巻1号
掲載ページ	p. 71-77
発行年月	2011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



## 調査・資料

## 特定原材料検査（卵・乳）における新・旧検査方法の比較

(平成 22 年 5 月 26 日受理)

渡邊裕子<sup>1,\*</sup> 赤星千絵<sup>2</sup> 濟田清隆<sup>3</sup> 関戸晴子<sup>1</sup>  
橋口成喜<sup>2</sup> 渡部健二郎<sup>3</sup> 田中幸生<sup>2</sup>

## Comparison between Old and New Methods for Detection of Allergenic Substances (Egg and Milk)

Hiroko WATANABE<sup>1,\*</sup>, Chie AKABOSHI<sup>2</sup>, Kiyotaka SAITA<sup>3</sup>, Haruko SEKIDO<sup>1</sup>, Shigeki HASHIGUCHI<sup>2</sup>,  
Kenjiro WATABE<sup>3</sup> and Kouki TANAKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chemistry Division, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health:

1-3-1 Shimomachiya, Chigasaki-shi, Kanagawa 253-0087, Japan;

<sup>2</sup>Kawasaki City Institute for Public Health: 5-13-10 Ohshima,  
Kawasaki-ku, Kawasaki 210-0834, Japan;

<sup>3</sup>Yokohama City Institute of Public Health: 1-2-17 Takigashira,  
Isogo-ku, Yokohama 235-0012, Japan; \* Corresponding author

The old ELISA method for detection of allergenic substances (egg and milk) in Kanagawa prefecture from 2003 to 2007, employed before improvement of the food allergen labeling system, yielded detection rates of 20% for egg and 30% for milk. In 2005, after improvement of the labeling system, the detection rate using the new ELISA in solutions containing 1% SDS and 7% 2-mercaptoethanol increased by about 10% for egg, but decreased by half for milk. There were 4 positive samples (over 10 µg/g) for both egg and milk proteins, on account of contamination by ingredients at the manufacturing line and the lack of proper food labeling. In 2009, the contamination levels of egg and milk proteins in labeled commercial foods were low. In a comparison between the new and old methods with the same samples, both the new ELISA and Western-blot analyses showed an increase in the detection rate of egg protein. In relation to milk protein, the detection rates were decreased with the new ELISA, although the ELISA detection rate and consistency rates with Western-blot analysis were increased. On the other hand, in the case of a protein content below 5 µg/g, it was impossible to determine ovomucoid and casein by Western-blot analysis.

(Received May 26, 2010)

**Key words:** 市販食品 commercial food; 卵 egg; 牛乳 milk; アレルギー物質 allergic substance; 酵素免疫測定法 ELISA method; ウェスタンブロット法 Western-blot analysis

## 緒言

食物アレルギーによる健康被害を防止するため、食品のアレルギー表示制度では、平成 14 年 4 月より加工食品に使用される特定原材料 5 品目（卵・乳・小麦・落花生・そば）について、すべての流通段階での表示が義務づけられ、同年 11 月に検査方法が定められた。平成 17 年に検査法が改正され<sup>\*1</sup>、さらに平成 18 年には「アレルギー物質を含む食品の検査法を評価するガイドライン」が示され<sup>\*2</sup>、これに準拠した定量法として ELISA 法、定性検査

法としてウェスタンブロット法（以下 WB 法）、PCR 法に加え、これらと同等以上の性能を持つ検査法を用いることが可能となった。一方、検査法は設定した特定原材料中のタンパク質を抽出した標準品を基準に定量、定性検査のバリデーションを満したものである<sup>1),2)</sup>。ゆえに実際の多様な原材料や製造工程からなる市販食品に対する適応性の評価は、市場モニタリングにおける結果を参考とするほかはない。また、行政検査は主に表示の欠落やコンタミ

\* 連絡先 Watanabe.jnsd@pref.kanagawa.jp

<sup>1</sup> 神奈川県衛生研究所理化学部: 〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋 1-3-1

<sup>2</sup> 川崎市衛生研究所: 〒210-0834 川崎市川崎区大島 5-13-10

<sup>3</sup> 横浜市衛生研究所: 〒235-0012 横浜市磯子区滝頭 1-2-17

\*<sup>1</sup> 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 17 年 10 月 11 日食安発第 1011002 号 (2005)

\*<sup>2</sup> 厚生労働省医薬食品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)

ネーションの監視に対する検査であるため、検査法に示された判断樹の製造記録を参考としながらも、表示との整合性を判断するうえでデータの信頼性を確保することが重要となる。

神奈川県では平成15年より加工食品におけるアレルギー物質の調査<sup>3)</sup>・検査を行い、平成17年の検査法の改正に対応し検査を進めてきた。県内では現在3機関がアレルギー物質の検査を行っており、各機関の検査結果から検査法の問題点を共有化し、県内検査レベルの向上に努めている。そこで、検査法改正の前後である平成15年から19年の5年間の県内アレルギー物質(卵・乳)調査・検査結果の推移から検査法の適応性について考察した。また、同一サンプルを用いて検査法改正前後の検出率を比較した。

なお、検査法改正前の検査法を旧検査法、改正後の変性タンパク質の抽出に対応した検査法を新検査法とした。

## 実験方法

### 1. 試料

神奈川県内で流通した食肉製品、水産物加工品、菓子類を用いた。卵・乳表示のない食品は市場調査を行い、製造過程のコンタミネーションの可能性が考えられる製品や卵・乳を原材料として使用する可能性がある製品を選定した。

### 2. 試薬

ELISA測定の新検査法では(株)森永生科学研究所製モリナガ卵測定キット(卵白アルブミン)(以下OVA)、同牛乳測定キット(カゼイン)(以下CN)、日本ハム(株)製FASTKIT<sup>TM</sup>卵エライザキット、同牛乳エライザキットを用いた。新検査法は(株)森永生科学研究所製モリナガFASPEK卵測定キット(OVA)、同牛乳測定キット(CN)、日本ハム(株)製FASTKITエライザVer.II卵キット、同牛乳キットを用いた。なお、新検査法は定性・定量いずれの検査法も変性タンパク質を可溶化するため、1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、7%2-メルカプトエタノール(2-ME)を含む抽出液を用いた方法である<sup>4)</sup>。WB法は旧検査法では(株)森永生科学研究所製モリナガ卵WBキット(OVA)および(オボムコイド(以下OVM))、同牛乳キット(CN)および( $\beta$ -ラクトグロブリン(以下 $\beta$ -LAG))を用いた。新検査法では(株)森永生科学研究所製モリナガFASPEK卵WBキット(OVA)および(OVM)、同牛乳キット(CN)および( $\beta$ -LAG)を用い、これらはいずれもポリクローナル抗体を用いた方法である。モノクローナル抗体を用いた検出では日本ハム(株)製FASTKITウエスタンブロットOVA、同OVM、同CN、同 $\beta$ -LAGおよびATTO社製EzWestKit Mini Aを用いた。OVMはシグマアルドリッジ(株)製TypeII-Oを用い、CNはシグマアルドリッジ(株)製を用いた。水は超純水を用いた。

### 3. 測定方法

使用機器および測定条件は既法<sup>3)</sup>と同様に行った。

### 4. 検量線の作成

ELISA測定用の検量線は、各キットのマニュアルに従い、3ウェル併行で測定を行い、マイクロプレートマネージャー5.2 PCデータ解析ソフトウェアを用いて、4係数logistic解析により作成した。定量限界については、日本薬局方の基準を準用した。

### 5. 抽出溶液の調製

旧検査法では均質化されたサンプルを約2g採り、キット付属の抽出用緩衝液を38mL加え抽出液を調製した。新検査法ではサンプルを約1g採り、キット付属の抽出用緩衝液を19mL加え抽出溶液を調製した。

### 5. ELISA法およびWB測定方法

ELISA法およびWB法は既報<sup>1),3),5)</sup>およびキット付属のプロトコルに従い行った。また、WB法において当該タンパク質の分子量付近にバンドが多数存在し、判定不能となったOVMおよびCNサンプルについて、阻害試験を行った。阻害試験は、一次抗体(0.5 $\mu$ g/mL)とOVMあるいはCN(50 $\mu$ g/mL)を1時間反応させた後にその一次抗体を転写膜と反応させ、以下の操作は通常の方法と同様に行った。

## 結果および考察

### 1. 卵・乳の調査・検査結果

神奈川県において平成15年から19年に行った卵表示のない加工食品の卵調査・検査数は228検体、乳表示のない加工食品の乳調査・検査数は165検体であった。なお、検査結果はELISA法で1 $\mu$ g/g以上検出された検体のうち、WB法で卵・乳が確認された検体のみを検出とした。また、WB法は検査法に則り、(株)森永生科学研究所製キットの抗体を用い、すべて旧検査法による抽出液を用いた。

卵の検出率は、平成15、16年は約20%であった。平成17年に旧検査法で検査した結果は10%であったが、新検査法では29%となり、約20%の差がみられた。しかし、平成18、19年はそれぞれ13%、21%となり、旧検査法による検出率とほぼ同様となった。また、5年間のうち、10 $\mu$ g/g以上の陽性検体は4検体であった。このうち3検体が魚肉練り製品、1検体が中華麺であった。卵混入の原因は、原材料の輸入先の変更による卵表示の欠落と製造所におけるコンタミネーションであった。

一方、乳の検出率は平成15年27%、平成16年36%であったが、平成17年の新検査法への変更後17%となり約半分の検出率となった。さらに平成19年には8%となった。乳が検出された検体のうち10 $\mu$ g/g以上の陽性となったのは4検体であり、中華菓子、子供用スナック菓子、チョコレートクッキー、豆乳アイスクリームであった。これらはいずれも製造所におけるコンタミネーションが原因であった。

ELISA法の検出率を、変更前の平成15年から17年と変更後の平成17年から19年でその推移を見ると、旧検

**Table 1.** Results of examination of allergenic substances (egg, milk) from 2003 to 2007 in Kanagawa

Allergenic substances	Year	No. of samples	No. of detections <sup>1), 2)</sup>	% of detection	No. of positive samples <sup>2), 3)</sup>
Egg	2003 (H15)	36	7	19	1 (Fish paste products (tsumire))
	2004 (H16)	24	5	21	0
	2005 (H17)	30	3	10	1 (Fish paste products)
		24*	7*	29*	
	2006 (H18)	56*	7*	13*	1 (Chinese noodle)
2007 (H19)	58*	12*	21*	1 (Fishpaste products (satsumaage))	
Milk	2003 (H15)	33	9	27	3 (Chinese confectionery, snack, cookie)
	2004 (H16)	36	13	36	0
	2005 (H17)	24*	4*	17*	0
	2006 (H18)	36*	5*	14*	1 (Soybean milk ice cream)
	2007 (H19)	36*	3*	8*	0

<sup>1)</sup> 1 µg/g ≤

<sup>2)</sup> These data were confirmed by Western blotting analysis.

<sup>3)</sup> 10 µg/g ≤

\* Measured by new ELISA kit with extraction buffer containing surfactant and reducing agent

査法では卵 17% (15/90 検体), 乳 30% (21/69 検体) であり, 新検査法では卵 19% (26/138 検体), 乳 13% (12/96 検体) となった。

卵・乳の検査結果から, 表示がなく 10 µg/g 以上の陽性を示した 8 検体のうち 7 検体は製造所におけるコンタミネーションが原因であった。平成 20 年 11 月 28 日食安監発第 1128002 号「加工食品のアレルギー表示制度の徹底について」において, 注意喚起表示のある食品の喫食による有症事例が示された。そこで, コンタミネーションのレベルを把握するため, 平成 21 年に注意喚起表示のある食品の卵・乳の定量検査を行った。注意喚起表示はいずれも製造所におけるコンタミネーションの注意喚起であった。卵は菓子類 13 検体, パン粉 1 検体, パン用混合小麦粉 1 検体, 水産物加工品 2 検体, 食肉製品 1 検体の計 18 検体を測定した。このうちチョコレートスナック (OVA 1.9 µg/g, Egg 2.8 µg/g) とパン粉 (OVA 1.1 µg/g, Egg 1.5 µg/g) から卵が検出されたが, いずれも 10 µg/g 以下であった。乳は菓子類 9 検体, パン粉 1 検体, パン用混合小麦粉 1 検体, 水産物加工品 6 検体, 食肉製品 3 検体の計 20 検体の測定を行った。このうちパン用混合小麦粉から CN が 1.1 µg/g 検出された。今回の調査結果では, 卵・乳いずれもその検出率および検出値は低かった。注意喚起表示は, 消費者の感覚としてコンタミネーションの濃度がアレルギー症状を起こさない程度の低濃度であるという認識がある。しかし, 表示制度では注意喚起表示に対する量規制はなく, 事業者の自主努力に任されている。ゆえに, 本調査結果が表示制度に対する事業者の理解が進んでいることを示すものと期待したい。

## 2. 抽出法の違いによる検出率の比較

新検査法では測定対象とする卵タンパク質は変わらないが, SDS やメルカプトエタノールを用いた可溶化により, その三次構造が変化したタンパク質についても検出されることが推測される。前述した新検査法による検出率の推移では, 卵は変更後の平成 17 年に検出率が約 10% 上がり, 乳では約半分となった。この結果は検査方法に則り, 定量検査では新抽出法, 定性検査では旧抽出法を用いている。そこで, 同一の市販食品において新旧それぞれに定量・定性検査を行い, その検出率を比較した。さらに新検査法の定性検査では, モノクローナル抗体により検出する日本ハム(株)製のキットによる検出と比較した。

### 2.1 卵測定結果

卵は卵表示のある 6 検体および卵表示のない 24 検体の計 30 検体について測定を行った。抽出液に可溶化剤を用いた場合では, 変性タンパク質の抽出効率が上がり, ハンバーグやパンなどの食品において ELISA 法における定量値が大きく増加することが報告されている<sup>3), 4)</sup>。旧検査法で数 µg/g 検出された卵表示のある 6 検体 (No. 1~6) は新検査法ではいずれも 20 µg/g 以上と大幅に値が上がった。

卵表示がなく旧検査法で卵 0.5 µg/g あるいは OVA 0.4 µg/g 以上検出された 4 検体 (No. 7~10) のうち No. 7 (さつまあげ), No. 8 (マッシュマロ) は新検査法では不検出となった。この 2 検体は旧検査法の定性検査で卵の混入が確認されていることから, 新検査法の抽出では検出できない卵タンパク質であることが示された。一方, No. 9, 10 の生餃子は旧検査法の卵キットでそれぞれ 5.6 µg/g, 5.2 µg/g 検出されたが, 定性検査により精肉による交差

Table 2. Detection of egg protein by using old and new methods in commercial foods

No.	Commercial foods	Indication	ELISA ( $\mu\text{g/g}$ )				Western blotting					
			Old		New*		Old				New*	
							Polyclonal antibody				Monoclonal antibody	
			Egg kit	OVA kit	Egg Ver. II kit	Faspek OVA kit	OVM	OVA	M/OVM	M/OVA	N/OVM	N/OVA
1	Chinese steamed shrimp dumpling	Egg white	2.7	4.6	20<	20<	+	+	Nt	Nt	Nt	Nt
2	Chinese steamed crab dumpling	Egg white	1.4	1.9	20<	20<	+	+	Nt	Nt	Nt	Nt
3	Stewed pork (Retort packing)	Egg white	<0.5	<0.4	20<	20<	+	+	Nt	Nt	Nt	Nt
4	Vienna sausage ①	Egg white	2.4	3.9	20<	20<	+	+	+	+	+	+
5	Hamburger steak	Egg white, Egg powder	0.8	<0.4	20<	20<	+	+	Nt	Nt	Nt	Nt
6	Stewed pork (before Retort packing)	Egg white	0.5	1.2	20<	20<	+	+	Nt	Nt	Nt	Nt
7	Fried fish dumpling (Satsumaage)	—	0.9	1.4	<1	<1	+	+	±	±	—	—
8	Cream in marshmallow	—	1.1	1.0	<1	<1	+	+	+	+	—	—
9	Chinese meat dumplings (before cooking)	—	5.6	<0.4	1.7	<1	—	—	±	—	±	—
10	Chinese vegetable dumplings (before cooking)	—	5.2	<0.4	<1	<1	—	—	±	—	±	—
11	Pork cutlet (frozen foods)	—	<0.5	<0.4	<1	22	+	—	±	+	±	—
12	Roll cabbage covered with bacon	—	<0.5	<0.4	1.0	<1	Tr	—	±	—	—	—
13	Chinese meat dumplings	—	<0.5	<0.4	1.1	<1	+	—	±	—	±	—
14	Chinese steamed meat dumplings	—	<0.5	<0.4	2.6	<1	+	—	±	+	±	Tr
15	Chinese meat dumplings (Wonton)	—	<0.5	<0.4	1.7	<1	—	—	±	+	±	Tr
16	Cracker	—	<0.5	<0.4	4.8	<1	Tr	—	±	+	±	—
17	Rusk	—	<0.5	<0.4	<1	1.8	Tr	—	±	+	±	—
18	Bean-jam bun	—	<0.5	<0.4	<1	1.3	Tr	—	±	+	±	—
19	Wafer	—	<0.5	<0.4	1.2	<1	Tr	—	+	+	—	—
20	Spring roll	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
21	Chinese steamed meat dumpling	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
22	Vienna sausage ②	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
23	Shrimp in Chinese meat dumplings (Wonton)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
24	Fillet of white fish fry	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
25	Chinese meat dumplings	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
26	Chinese almond jelly	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
27	Strawberry cream sandwich biscuit	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
28	Japanese sweets (Chestnuts in shigure)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
29	Japanese sweets (Sesami in Monaka)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
30	Cream sandwich chocolate wafer	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt

OVA: ovalbumin, OVM: ovomucoid, M: Morinaga kit, N: Nippon Ham kit

\*: by using extraction buffer containing surfactant and reducing agent

+: detected, —: not detected, Tr: trace, ±: impossible to determine, Nt: not tested

ELISA data represent mean values of 3 wells

Table 3. Detection of milk protein by using old and new methods in commercial foods

No.	Commercial foods	Indication	ELISA (µg/g)				Western blotting					
			Old		New*		Old				New*	
			Milk kit	CN kit	Milk Ver. II kit	Faspek CN kit	Polyclonal antibody		Monoclonal antibody			
						LAG	CN	M/LAG	M/CN	N/LAG	N/CN	
1	Sausage	Lactose	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
2	Stewed pork (Retort packing)	Milk protein	20<	<0.4	20<	2.5	Tr	+	+	-	+	±
3	Stewed pork (before Retort packing)	Milk protein	20<	<0.4	<1	4.8	+	+	+	-	+	+
4	Vienna sausage ①	Milk protein	20<	<0.4	20<	20<	+	+	Nt	Nt	Nt	Nt
5	Pie	Contamination	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
6	Marshmallow	Contamination	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
7	Sliced ham	—	1.8	0.5	1.3	<1	-	-	+	±	-	-
8	Vienna sausage ②	—	<0.5	1.8	<1	1.3	Tr	-	+	+	-	-
9	Cupcake	—	0.8	2.3	1.3	1.6	-	Tr	+	+	-	-
10	Japanese snack (Fugashi)	—	<0.5	0.9	1.1	1.0	-	Tr	+	+	-	-
11	Ham	—	0.8	<0.4	<1	<1	+	Tr	+	±	-	-
12	Hamburger steak	—	0.5	<0.4	<1	<1	-	-	+	±	-	-
13	Curry (Retort packing)	—	2.0	1.1	<1	<1	Tr	-	-	-	-	-
14	Corn snack	—	<0.5	0.8	<1	<1	-	Tr	-	-	-	-
15	Strawberry marshmallow	—	<0.5	0.9	<1	<1	-	Tr	-	-	-	-
16	Macaroon	—	<0.5	0.6	<1	<1	-	-	+	Tr	+	Tr
17	Chinese steamed shrimp dumpling	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
18	Fried fish dumpling (Satsumaage)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
19	Smoked ham	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
20	Vienna sausage ③	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
21	Vienna sausage ④	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
22	Vienna sausage ⑤	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
23	Vienna sausage ⑥	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
24	Vienna sausage ⑦	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
25	Vienna sausage ⑧	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
26	Vienna sausage ⑨	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
27	Hamburger steak (baby food)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
28	Meatball (Retort packing)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Tr	-	Nt	Nt	Nt	Nt
29	Corned stewed beef	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
30	Fried chicken (Frozen food)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
31	Mushroom spaghetti (baby food)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
32	Chinese sauce (ma-boo-nasu no moto) (Retort packing)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
33	Marshmallow	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
34	Fruit marshmallow	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
35	Cracker	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
36	Cornflakes	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
37	Wafer	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
38	Boro	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
39	Biscuit	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt

Table 3. Continued

No.	Commercial foods	Indication	ELISA ( $\mu\text{g/g}$ )				Western blotting					
			Old		New*		Old				New*	
			Milk kit	CN kit	Milk Ver. II kit	Faspek CN kit	Polyclonal antibody		Monoclonal antibody			
						LAG	CN	M/LAG	M/CN	N/LAG	N/CN	
40	Rusk	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
41	Cake (Kasutera)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
42	Japanese beans sweet (Manjyuu)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt
43	Japanese beans sweet (Morokoshi)	—	<0.5	<0.4	<1	<1	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt	Nt

LAG:  $\beta$ -lactoglobulin, CN: casein, M: Morinaga kit, N: Nippon Ham kit

\*: by using extraction buffer containing surfactant and reducing agent

+: detected, -: not detected, Tr: trace,  $\pm$ : impossible to determine, Nt: not tested

ELISA data represent mean values of 3 wells

反応であることを確認した。また、新 ELISA 法では精肉と交差反応を示さないことを確認した。さらに No. 9 は新検査法の卵キットで  $1.7 \mu\text{g/g}$  検出されたため定性検査を行ったが、OVM の分子量付近に多数のバンドが現れ判定不能となった。

卵表示がなく旧検査法の定量検査で不検出となった 20 検体のうち、新検査法では 9 検体が  $1 \mu\text{g/g}$  以上検出された。このうち、旧検査法による定性検査では 3 検体が OVM で確認となったが、新検査法では OVA により 7 検体が確認できた。しかし、これらの検体は前述の No. 9 と同様に OVM では多数のバンドが現れ判定不能となった。

以上の結果から、卵表示のある  $10 \mu\text{g/g}$  以下の偽陰性検体は新検査法ではいずれも  $10 \mu\text{g/g}$  以上の陽性となり、抽出効率の向上が確認された。卵表示のない 24 検体のうち旧検査法で検出 (卵  $0.5 \mu\text{g/g}$  以上、あるいは OVA  $0.4 \mu\text{g/g}$  以上かつ WB 法で確認) された検体は 2 検体、定性・定量検査の検出率は 8% (No. 9, 10 を除く) であった。一方、新検査法の定量検査で  $1 \mu\text{g/g}$  以上検出された検体は 10 検体で検出率は 42% となり、このうち定性検査で確認されたのは 8 検体、検出率は 33% となったことから、検査法の変更により検査の信頼性は向上したと考えられた。しかし、No. 7, 8 は旧検査法でのみ卵の混入が確認され、No. 13 (しゅうまい) では旧検査法の定性検査でのみ卵の混入 (OVM) を確認した。ゆえに新検査法では検出できない場合があることが示された。また、新検査法では  $5 \mu\text{g/g}$  以下の場合、13 検体中 11 検体が OVM の分子量付近にバンドが多数現れ、判定不能となった。そこで、これらの 11 検体について阻害試験を行った。卵標準品は OVM と一次抗体との反応により、OVM のバンドが消失したが、検体は OVM の分子量付近に非特異的なバンドが残存し、阻害試験においても判定不能となった。

新抽出液を用いた定性検査におけるポリクローナル抗体とモノクローナル抗体による確認の比較では、タンパク質量が  $5 \mu\text{g/g}$  以下で違いが見られた。すなわち、モノク

ローナル抗体では 10 検体中 2 検体で OVA が痕跡程度となったが、ポリクローナル抗体では 7 検体で OVA を確認することができた。

## 2.2 乳測定結果

乳表示のある 6 検体と乳表示のない 37 検体、計 43 検体の測定を行った。乳の原材料表示のある 4 検体のうち乳糖表示 (No. 1) では新旧いずれも不検出となり、乳タンパク質表示 (No. 2~4) では新検査法で検出値が上がった。注意喚起表示の 2 検体 (No. 5, 6) は新旧いずれも不検出であった。

乳表示のない 37 検体のうち、旧検査法の定量検査で乳  $0.5 \mu\text{g/g}$  以上、あるいは CN  $0.4 \mu\text{g/g}$  以上検出された検体は 10 検体、検出率は 27% となり、このうち定性検査で確認されたのは 1 検体、検出率は 3% であった。一方、新検査法は定量検査で  $1 \mu\text{g/g}$  以上検出された検体は 4 検体、検出率は 11% となり、いずれも定性検査で確認された。No. 11 (ハム)、No. 12 (ハンバーグ)、No. 16 (マカロン) は定量検査では旧検査法のみで検出され、定性検査では No. 12, 16 は確認できなかったが、新検査法の定性検査では 3 検体いずれも  $\beta$ -LAG を確認した。したがって、旧検査法で確認できなかった 6 検体を、新検査法では  $\beta$ -LAG で確認することができた。一方、CN では低濃度の場合 (No. 7, 11, 12) に分子量付近にバンドが多数現れ、3 検体いずれも判定不能となった。CN は均一のタンパク質ではないことから<sup>6)</sup>、変性が進んだ最終製品のみでその分子量変化を予測し判定を行うことは困難と考えられた。

新抽出液を用いた定性検査におけるポリクローナル抗体とモノクローナル抗体による確認の比較では、卵と同様にタンパク質量が  $1 \mu\text{g/g}$  の定量限界付近で違いが見られた。ポリクローナル抗体では 4 検体 (No. 7~10) すべてで  $\beta$ -LAG を確認したが、モノクローナル抗体では  $\beta$ -LAG, CN いずれも確認できなかった。一方、ポリクローナル抗体では、CN の分子量付近にバンドが多数現れ、3 検体

(No. 7, 11, 12)が判定不能となった。この3検体について阻害試験を行ったところ、No. 12のハンバーグは分子量バンドが消失したが、その他は非特異的なバンドが残存し判定不能となった。

#### ま と め

平成15年から19年の5年間の神奈川県におけるアレルギー物質（卵・乳）の調査・検査の結果、卵・乳表示のない市販食品におけるELISA法変更前の卵の検出率は約20%、乳の検出率は約30%となった。新検査法による検出率の推移では、卵は変更後の平成17年に検出率が約10%上がり、乳では約半分となった。このうち、10 $\mu$ g/g以上の陽性を示した検体は卵4検体、乳4検体であった。これらは製造所におけるコンタミネーションと原材料の表示の欠落が原因であった。そこで、平成21年に注意喚起表示のある食品の調査を行ったところ、コンタミネーションのレベルは3 $\mu$ g/g以下と低かった。

同一サンプルを用いた新・旧検査法による検出の比較では、卵は定性・定量検査いずれも検出率が向上した。乳では定量検査の検出率は低下したが、定性検査との整合性が向上した。ゆえに検査法の変更により、検査の信頼性が向上したと考えられた。一方、新検査法のOVMとCNの定性検査では5 $\mu$ g/g以下と含有量が少ない場合に、変性によるタンパク質の分子量変化や非特異的なバンドの影響により判定不能となる場合が見られた。今後、これらのデー

タを蓄積し、定性検査における判定限界を明確にしていきたい。

#### 文 献

- 1) Akiyama, H., *et al.* Inter-laboratory evaluation studies of notified ELISA methods for allergic substances (egg). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 213-219(2003).
- 2) Akiyama, H., *et al.* Inter-laboratory evaluation studies of notified ELISA methods for allergic substances (milk). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **45**, 120-127(2004).
- 3) Watanabe, H., Kai, S., Mitani, T., Yokoyama, H., Kishi, M. Study on detection of allergic substances (egg and milk) in processed meat products and frozen foods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 139-147 (2005).
- 4) Watanabe, Y., Aburatani, K., Mizumura, T., Sakai, M., Muraoka, S., Mamegosi, S., Honjoh, T. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. *J. Immunol. Methods*, **300**, 115-123 (2005).
- 5) Akiyama, H. Notified detection method for allergic substances. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, J-168-J-177 (2003).
- 6) Kaminogawa, S. ed. *Nyuu No Kagaku*, 7<sup>th</sup> Ed., Tokyo, Asakura Shoten, 2004, p. 10. (ISBN 4-254-43040-XC 3061)



特定原材料検査（卵・乳）における新・旧検査方法の比較  
（調査・資料）

渡邊裕子\* 赤星千絵 濟田清隆 関戸晴子  
橋口成喜 渡部健二郎 田中幸生  
食衛誌 52(1), 71~77 (2011)

平成 15 から 19 年の県内アレルギー物質（卵・乳）調査・検査の結果，ELISA 法変更前の卵の検出率は約 20%，乳は約 30% となり，変更後の平成 17 年では卵の検出率は約 10% 上がり，乳では約半分となった．10  $\mu\text{g}/\text{g}$  以上の陽性検体は卵 4 検体，乳 4 検体であり，これらは製造所のコンタミネーションと原材料表示の欠落が原因であった．一方，平成 21 年の注意喚起表示の調査ではコンタミネーションのレベルは低かった．同一サンプルを用いた新・旧検査方法の検出率の比較では，新検査法の卵の検出率は向上した．乳では ELISA 法の検出率は低下したが，ウェスタンブロット法との整合性は向上した．一方，オボムコイドとカゼインの定性検査ではタンパク質量が 5  $\mu\text{g}/\text{g}$  以下で判定不能となる場合が見られた．

\* 神奈川県衛生研究所 理化学部