

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：84406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860474

研究課題名(和文) 測定阻害因子を含む食品からのアレルギー物質の測定法の改良

研究課題名(英文) Improvement of quantitative assay of allergens in processed foods containing inhibiting factors.

研究代表者

村上 太郎 (Murakami, Taro)

大阪市立環境科学研究所・調査研究課・研究主任

研究者番号：70393254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食品由来の夾雑物がELISA法によるアレルギーのスクリーニング検査に与える影響について評価を行った。原材料中の夾雑物が検査に及ぼす影響を評価した結果、果実やカカオなどのプロアントシアニジンを含む原材料によって測定阻害を受けていることが確認された。測定阻害が顕著であった小麦の測定については、プロアントシアニジンと結合性のあるポリビニルピロリドンの共存条件の最適化を行い、より信頼性の高いスクリーニング改良法を確立した。改良法はアレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドラインを元に同等性を評価し、小麦以外の特定原材料の検査にも適用できることを確認した。

研究成果の概要(英文)： Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is commonly used to detect trace amounts of food allergens; however, it is plausible that ELISA might be affected by co-existence of matrices from various food ingredients. We found that extraction solutions containing proanthocyanidins (PACs) inhibited allergens determination with ELISA, especially for gluten quantification. The methods was improved by adding polyvinylpyrrolidone (PVP), a PACs-binding agent, to the extraction buffer, and it was found that for the detection of gluten in cocoa powder, addition of 1% PVP K15 was most effective to prevent the inhibition. This new extraction method can be applied as a more precise and reliable tool for determining food allergens in processed foods.

研究分野：食品化学

キーワード：アレルギー物質 ELISA 特定原材料 ポリビニルピロリドン 小麦グルテン プロアントシアニジン

1. 研究開始当初の背景

食品によって誘発されるアレルギーは、2011年に即時型アレルギーについての国内でのモニタリング調査が行われており、鶏卵、牛乳、小麦の3食品が食物アレルギーの3大原因食品と報告されている。また、食物アレルギーの原因となる上位10食品は、3大原因食品に落花生、果物、魚卵、甲殻類(えび・かに)、種実、そば、魚を加えた10食品である。このような食物アレルギーによる健康被害を未然に防ぐため、食品衛生法では平成13年4月より、アレルギー物質を含む原材料24品目についての表示が推奨され、卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類(えび・かに)の7項目が特定原材料として表示が義務化されている。

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質の検査では消費者庁による通知(消費表第139号)によって、ELISAによる測定がスクリーニング検査として利用されている。ELISAでは検査対象となるタンパク質を抗体の特異性を利用して定量するため、一般的には特異性が高い。検査に使用されるキットの抗体については、多くの食品との交差性の有無が確認されているが、夾雑物が測定に及ぼす影響についての報告は少ない。検査対象となる加工食品の原材料は多種多様であり、測定に際しては固相カラムなどによる精製は行われなため、検査が行われる試料抽出液には多くの食品由来の夾雑物が含まれる。これらの夾雑物によって、ELISAによる測定が阻害された場合にはスクリーニング検査における偽陰性を引き起こす可能性がある。検査の偽陰性によって、食物アレルギーを引き起こすタンパク質が混入した食品が流通した場合には、食物アレルギーによる健康被害の原因となり、最悪の場合にはアナフィラキシーなどの重篤な症状を引き起こす可能性もある。

2. 研究の目的

本研究では食品原材料中の測定阻害因子によるアレルギー物質のスクリーニング検査での偽陰性を防ぐために、以下の3点について検討を行った。

(1) 測定阻害因子を含む原材料のスクリーニング

アレルギー物質の7項目について、食品原材料中の測定阻害因子のスクリーニングを行う。測定対象のタンパク質と阻害因子を含む原材料の一覧を作成することによって、測定時に注意すべき原材料の組み合わせを確認する。

(2) 測定阻害因子による阻害機序の解析

スクリーニングにより阻害が確認された原材料から測定阻害因子を分離し、測定阻害に關与する化合物を推定する。また、測定阻害因子によるELISAへの阻害機序の解析を行う。

(3) 測定法の改良とアレルギー物質の混入実態の調査

測定阻害因子を含む原材料から加工された食品中のアレルギー物質を検出するための測定法の改良を行う。また、改良した測定法によって加工食品中のアレルギー物質の混入についての実態調査を行う。

3. 研究の方法

(1) 測定阻害因子を含む原材料のスクリーニング

アレルギー物質7項目の測定阻害因子のスクリーニングのために、合計978試料の加工食品について評価を行った(表1)。

他の項目と比較して、多くの原材料から阻害が確認された小麦の測定については、阻害が確認された原材料と同属の植物種にスクリーニングの範囲を広げ、植物種ごとに特異的な阻害であるかを確認した。各試料抽出液

中の夾雑物による抗原抗体反応への影響の評価のために、試料抽出液に標準溶液を添加した際の回収率を評価した。それぞれの試料抽出液を希釈後に、森永生科学研究所製 FASPEK II と日本ハム社製 FASTKIT Ver.III の2種類のキットの標準溶液を最終濃度 6.25 ng/mL となるように添加して測定を行った。測定結果は併行して測定を行った各標準溶液に対する回収率を求めて評価した。

(2) 測定阻害因子による阻害機序の解析

小麦の測定についての測定阻害機序の解析のために、高濃度のプロアントシアニジンを含む原材料として、カカオ、シナモン、凍結乾燥品（ビルベリー、ブドウ種子抽出物、落花生種皮）を入手し、各原材料からプロアントシアニジンを抽出した。プロアントシアニジンと特異的な結合により発色する 4-Dimethylaminocinnamaldehyde

(DMAC) を利用した定量法によって抽出液中のプロアントシアニジンの濃度を測定後、抽出液を段階希釈して ELISA による小麦の測定阻害に対するプロアントシアニジン量の用量相関性を解析した。各原材料の反応阻害曲線から 50% 阻害濃度 (IC50) を算出し、測定への影響の大きい原材料を解析した。

次に、プロアントシアニジンによる小麦の測定阻害機序の解析のために、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOFMS) によって、プロアントシアニジンと小麦グリアジンの結合についての解析を行った。小麦グリアジン溶液にプロアントシアニジンを含むブドウ種子抽出物の抽出液を一定量加え、マトリクスとしてシナピン酸を混合後に MALDI-TOFMS によって測定を行った。

(3) 測定法の改良とアレルギー物質の混入実態の調査

測定阻害が確認された原材料の中でカカオとシナモンを含む食品にそれぞれ小麦グ

リアジンを 5 µg/g 添加し、抽出時に重合度の異なる PVP (K15、K25、K30、K60、K90) を 1% (w/v) 共存させて評価を行った。また、PVP の単量体である NVP と不溶性のポリマーである PVPP についても評価を行った。抽出液は適宜希釈後、FASPEK II と FASTKIT Ver. III により測定を行い、添加した標準品のタンパク質濃度に対する回収率を求めた。

次に、アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドラインを元に、改良法の性能を評価した。通知法に示されている標準品規格に基づいて、卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類（えび・かに）の7項目の標準品を調製し、添加回収試験に使用した。検査対象とする特定原材料を含有しない加工食品に標準品を一定量添加し、従来法と改良法でそれぞれ抽出を行った。抽出液は適宜希釈後、FASPEK II と FASTKIT Ver. III により測定を行い、添加した標準品に対する回収率を求めた。

検査法の妥当性の確認後、改良法を市販加工食品中の小麦タンパク質の混入実態とその表示についての検証を行った。

4. 研究成果

(1) 測定阻害因子を含む原材料のスクリーニング

表1には測定阻害因子のスクリーニングの評価結果を示した。

表1 測定阻害因子を含む原材料のスクリーニング

測定対象	評価食品数	測定阻害が確認された原材料
卵	241	落花生
乳	212	落花生
小麦	82	落花生、カカオ、ブルーベリー、ラズベリー、クランベリー、ブラックベリー、イチゴ、プラム、クロスグリ、アカスグリ
そば	120	落花生、カカオ、ブルーベリー、ラズベリー
落花生	140	-
えび・かに	183	落花生
	978	

落花生を原材料として含む試料では卵、乳、小麦、そば、えび・かにの測定時に共通して阻害が確認された。カカオ、ブルーベリー、

ラズベリーでは小麦とそばの測定時に阻害が確認された。小麦の測定時にはその他の項目と比較して、多くの原材料から阻害を受けることが確認されたため、同属の植物種にスクリーニングの範囲を広げ、測定阻害が植物種ごとに特異的であるかを確認した。原材料については果実 27 試料、種実 23 試料、ドライフルーツ 11 試料の合計 61 試料について評価を行った。原材料についての評価の結果、果実についてはバラ科のオランダイチゴ属(イチゴ)、キイチゴ属(ラズベリー、ブラックベリー)およびサクラ属(スモモ)、ツツジ科スノキ属(ブルーベリー、クランベリー)、スグリ科スグリ属(クロスグリ、アカスグリ)による測定阻害が確認された。種実についてはマメ科ナンキンマメ属(落花生)とアオイ科カカオ属(カカオ)による測定阻害が確認された。

(2) 測定阻害因子による阻害機序の解析

測定阻害因子を含む原材料のスクリーニングによる評価で、阻害が確認された原材料には共通してカテキンやエピカテキンなどのフラバノールを基本骨格とするポリフェノールの重合体であるプロアントシアニジンを含むことが確認された。このため、各原材料からプロアントシアニジンを抽出し、測定阻害機序の解析を行った。各原材料の反応阻害曲線から IC₅₀ を算出した結果、カカオ、ビルベリー、ブドウ種子抽出物に含まれるプロアントシアニジンと比較して、シナモンと落花生種皮に含まれるプロアントシアニジンの IC₅₀ は 10 倍以上低いことが確認された。プロアントシアニジンは果実類、種実類、豆類、穀類、香辛料などの食品中に広く分布しており、植物種によって基本骨格や重合度が異なることが報告されている。主要なプロアントシアニジンのフラバノール間の基本骨格は、C 環の 4 位の水酸基と A 環の 8 位が縮合した B タイプのプロアントシアニジンである。一方で、落花生、シナモ

ン、クランベリーなどの一部の植物では、フラバノール間の結合に加えて、A 環の水酸基が C 環の 2 位に結合したエーテル結合を含む A タイプのプロアントシアニジンが報告されている。プロアントシアニジンの基本骨格の構造や重合度の違いによって小麦グリアジンとの結合能が異なることがこれまでに報告されているため、A タイプのプロアントシアニジンを含むシナモンと落花生種皮では IC₅₀ が低くなったと推定される。

ブドウ種子抽出物の共存濃度ごとの小麦グリアジン由来のマススペクトルを MALDI-TOFMS によって測定した結果、プロアントシアニジンの共存濃度の増加ごとに小麦グリアジン由来のマススペクトルの減少が確認された。しかしながら、小麦グリアジンとプロアントシアニジンの結合物由来のマススペクトルは検出されなかった。このため、プロアントシアニジンによる小麦の測定阻害機序については今後も詳細な解析の必要がある。

(3) 測定法の改良とアレルギー物質の混入実態の調査

プロアントシアニジン結合物質による測定阻害に対する効果を図 1 に示す。

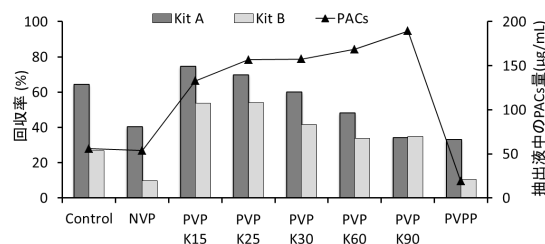


図1 プロアントシアニジン結合物質による測定阻害に対する効果
*カカオに小麦グリアジンを5 μg/g添加し、各結合物質を1%(w/v)含む抽出液により抽出後にFASPEK IIとFASTKIT Ver. IIIIによって測定
PACs: プロアントシアニジン, NVP: 1-vinyl-2-pyrrolidone, PVP: Polyvinylpyrrolidone, PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone

NVP はプロアントシアニジンによる阻害に対して効果が確認されなかった。分子量の小さい単量体では高重合度のポリマーと比較してプロアントシアニジンに対する結合能が弱いことが報告されているため、NVP では効果が確認されなかったと考える。一方

で、不溶性の PVPP についてもプロアントシアニジンによる阻害に対する効果は確認されなかった。PVPP は飲料の製造時のポリフェノールの除去のために使用されており、プロアントシアニジンと結合したタンパク質に対しても結合能があることが報告されている。このため、プロアントシアニジンと結合した小麦グリアジンは不溶性の PVPP によって除去されたと推定される。カカオのプロアントシアニジンによる測定阻害に対しては、PVP の中で分子量の最も小さい PVP K15 (平均分子量 10000) による効果が最も高かった。一方で、シナモンを含む食品中のプロアントシアニジンによる阻害に対しては、PVP の分子量の大きさによる効果の差異は確認されなかった。このため、これ以降の評価では PVP K15 を使用して、カカオのプロアントシアニジンによる阻害に対する濃度条件の検討を行った。PVP K15 の必要最小濃度を確認するために、PVP K15 の共存濃度ごとに回収率の比較を行った。評価の結果、0–1%の濃度範囲では回収率の増加が確認され、1–4%の濃度範囲では回収率の低下が確認されたため、PVP K15 の共存濃度は1%に設定した。

最適化した抽出法が小麦以外の特定原材料(乳、卵、そば、落花生、えび・かに)の検査に適用できるか確認するためにアレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドラインを元に、PVP 共存抽出法の同等性を評価した。特定原材料ごとに市販の加工食品に調製した標準品を添加し、従来法と改良法により抽出を行った。各項目ごとの従来法と改良法の定量値をプロットして、定量値の相関図から近似直線を算出した。乳、卵、落花生、そば、えび・かにの近似直線の傾きは 0.75–1.25 の範囲内であり、ガイドラインに示された基準を満たした。一方で、小麦の測定では従来法と改良法の相関図から算出した近似直線の傾きは

0.75–1.25 の範囲外となった。この結果は抽出条件の最適化で確認された結果と同様に、プロアントシアニジンを含む食品では従来法による測定時には回収率が低下したためであると推定された。このため、プロアントシアニジンを含まない食品についての従来法と改良法の定量値の相関図から近似直線の傾きを確認したところ、傾きは 0.75–1.25 の範囲内となり、ガイドラインに示された基準を満たした。このため、改良した測定法は従来法と同様に小麦以外の特定原材料の検査にも適用できることが確認された。

改良した測定法によってプロアントシアニジンを含む加工食品を合計 65 試料調査した結果、12 試料で小麦が検出された (FASPEK 0.3–4.2 µg/g、FASTKIT 0.4–1.5 µg/g)。一方で、小麦が検出された試料は従来の抽出法では測定値が低くなり (FASPEK ND:0.3 µg/g 未満、FASTKIT ND–0.4 µg/g)、小麦が検出された 12 試料のうち 4 試料では両キットで小麦が検出されなかった。このため、改良抽出法によって測定を行うことによって、小麦の検出率の向上に繋がると考えられた。本調査で小麦を検出した試料は、原材料の一部に小麦の表示がある 2 試料と小麦の混入の注意喚起表示のある 7 試料と小麦のキットで偽陽性が報告されている麦芽を原材料に含む 3 試料であったため、試料のアレルギー物質についての表示は適正であった。

加工食品の製造時には原材料としてアレルギー物質を使用していない食品を製造する場合であっても、製造工程上の問題等によりコンタミネーションが発生する可能性がある。改良した測定法によって従来法では検出が困難な小麦タンパク質の混入を検出できるため、スクリーニング検査での検出率の向上が期待される。改良法による測定は、スクリーニング検査での偽陰性を減らせる可能性があるため、食物アレルギーの発症予防に繋がると考える。

謝辞

測定阻害因子のスクリーニングのための試料の一部は農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所と千葉県農林総合研究センターから提供を受けました。MALDI-TOFMSによる測定は文部科学省のナノテクノロジープラットフォーム(課題番号:S15-NR-0044)を利用し、奈良先端科学技術大学院大学の装置により測定を行いました。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

- (1) 紀雅美, 村上太郎, 工藤鮎子, 昌山敦, 山野哲夫, 清水充. 特定原材料(卵・乳)のスクリーニング検査における内部品質管理手法の検討. 大阪市立環境科学研究所報告 調査・研究年報 75, 35-39 (2013) 査読有

[学会発表](計 9件)

- (1) 村上太郎, 工藤鮎子, 清田恭平, 山野哲夫. チョコレートに含まれるアレルギー物質(小麦・乳)の実態調査. 2017. 6.1-2, 伊勢志摩ロイヤルホテル(三重県・志摩市)
- (2) 村上太郎, 清田恭平, 工藤鮎子, 昌山敦, 紀雅美, 山野哲夫. PVP 共存抽出法のアレルギー物質を含む食品検査への応用. 日本食品衛生学会近畿地区勉強会, 2016.11.2, 大阪府立公衆衛生研究所(大阪府・大阪市)
- (3) 村上太郎, 清田恭平, 工藤鮎子, 昌山敦, 紀雅美, 山野哲夫. アレルギー物質検査を含む食品検査における PVP 共存抽出法の適用性評価. 第112回日本食品衛生学会学術講演会, 2016.10.27-28, 函館国際ホテル(北海道・函館市)
- (4) 村上太郎, 工藤鮎子, 清田恭平, 紀雅美, 山野哲夫. DMAC法による加工食品中の総プロアントシアニジンの定量. 日本食品化学学会第22回総会・学術大会, 2016.6.2-3, 高知市文化プラザかるぼーと(高知県・高知市)
- (5) 村上太郎, 紀雅美, 工藤鮎子, 昌山敦, 清田恭平, 山野哲夫. ELISA法による特

定原材料の検査における内部品質管理手法の検討. AOAC International 日本セクション 2015年度年次大会 AOAC International 日本セクション 2015年度年次大会, 2015.6.1, きゅりあん(東京都・品川区)

- (6) 村上太郎, 工藤鮎子, 昌山敦, 紀雅美, 山野哲夫. カカオを含む食品からのELISA法による小麦タンパク質の検出法の改良. 日本食品化学学会第21回総会・学術大会, 2015.5.20-22, 東京ビックサイト(東京都・江東区)
- (7) 村上太郎, 工藤鮎子, 紀雅美, 昌山敦, 山野哲夫. ELISA法による小麦タンパク質の検出における測定阻害因子の解析. 第108回日本食品衛生学会学術講演会, 2014.12.4-5, 金沢歌劇座(石川県・金沢市)
- (8) 村上太郎, 工藤鮎子, 紀雅美, 昌山敦, 山野哲夫. 小麦グリアジンタンパク質との抗原抗体反応を阻害する食品因子の解析. 日本食品化学学会 第20回総会・学術大会, 2014.5.21-23, 東京ビックサイト(東京都・江東区)
- (9) 村上太郎, 工藤鮎子, 紀雅美, 昌山敦, 山野哲夫. 小麦グリアジンタンパク質の測定を阻害する食品原材料の解析. 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 2013.11.21-23, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 太郎 (MURAKAMI TARO)

大阪市立環境科学研究所・調査研究課・研究主任

研究者番号: 70393254