

報 文

調理加工モデル食品を用いたアレルギー検査用
イムノクロマトキットの評価

(平成 17 年 10 月 6 日受理)

森下直樹^{*1,†} 秋山恵利^{*2} 有川奈津実^{*2} 飯田知美^{*2} 多勢加奈子^{*2}
 浜路麻衣^{*2} 平岡里海^{*2} 白柳利江子^{*2} 上條茂徳^{*3}
 松本貴之^{*1} 高畑能久^{*1} 森松文毅^{*1} 豊田正武^{*2}

Evaluation of Immunochromatographic Test Kits for Food
Allergens Using Processed Food Models

Naoki MORISHITA^{*1,†}, Eri AKIYAMA^{*2}, Natsumi ARIKAWA^{*2}, Tomomi IIDA^{*2},
 Kanako TASE^{*2}, Mai HAMAJI^{*2}, Satomi HIRAOKA^{*2}, Rieko SHIROYANAGI^{*2},
 Shigenori KAMIJOU^{*3}, Takashi MATSUMOTO^{*1}, Yoshihisa TAKAHATA^{*1},
 Fumiki MORIMATSU^{*1} and Masatake TOYODA^{*2}

(^{*1}Nippon Meat Packers, Inc.: 3-3, Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646, Japan;

^{*2}Jissen Women's University: 1-1 Oosakaue 1-chome, Hino, Tokyo 191-8510, Japan;

^{*3}Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.: 5-26 Akasaka 8-chome,
 Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan; † Corresponding author)

It has been mandatory to label five allergenic substances (AS; egg, milk, wheat, buckwheat and peanut) in all processed foods, since April 2002 in Japan. Two kinds of ELISA kits have been provided as screening test kits for the Japanese official method. The kits have many advantages but some disadvantages, *i.e.*, the kits are not necessarily suitable for daily monitoring in food manufacturing plants, because they require various analytical equipments and the use of complicated procedures. To overcome these drawbacks, we have developed other diagnostic kits based on immunochromatography that should enable more rapid and simple screening for food allergens. Then we examined the performance of these immunochromatographic test kits (IC kits) in terms of sensitivity, repeatability and cross-reactivity to AS proteins in 11 kinds of food models with various heating conditions and physical properties. We also examined processed food models including AS protein of constant concentration, using the IC kits and ELISA kits, and compared the results. The IC kits detected AS proteins at 5 $\mu\text{g/g}$ in the extracts from processed food models, and provided highly reproducible results. Cross-reactivity among the AS proteins was not observed. The results obtained using the IC kits showed performance equivalent to that of the ELISA kits we examined in unheating processed food models including AS proteins of constant concentration. The IC kits should be more suitable for daily monitoring in food manufacturing plants.

(Received October 6, 2005)

Key words: 特定原材料 allergic substance; 卵 egg; 乳 milk; 小麦 wheat; そば buckwheat; 落花生 peanut; 食物アレルギー food allergen; モデル食品 processed food model; イムノクロマトキット immunochromatographic test kit (IC kit); ELISA キット enzyme linked immunosorbent assay kit (ELISA kit)

緒 言

近年、食物アレルギー誘発物質（以下、食物アレルギー）を含む食品に起因する健康被害の増加傾向に伴い、平

† 連絡先

^{*1} 日本ハム株式会社: 〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3

^{*2} 実践女子大学: 〒191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1

^{*3} 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社: 〒107-0052 東京都港区赤坂 8-5-26

成 14 年 4 月から加工食品等に特定原材料 5 品目（卵、乳、小麦、そば、落花生）の表示が義務づけられた¹⁾。また特定原材料に準ずる原材料として、平成 16 年 12 月に追加されたバナナ²⁾を加えた 20 品目の表示が推奨されている。平成 14 年 11 月にこれらの特定原材料表示の妥当性を検証するために、厚生労働省から「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」が通知され^{1), 3), 4)}、ELISA

法によるスクリーニング検査ツールとして「FASTKIT エライザシリーズ」^{5),6)} ならびに「モリナガ特定原材料測定キット」^{7),8)} が収載されている。

より徹底した特定原材料表示の管理を行うためには、原材料から最終製品までにおいて日常的なアレルゲン検査を実施することが望まれるが、ELISA 法では操作が煩雑であり測定に数時間を要するため、時間や技術、コストなどの面から厳しい現状である。そこで、著者らはイムノクロマト（以下、IC）法の原理を応用し、FASTKIT エライザと同一の複合抗原を認識するポリクローナル抗体を用いることで、より迅速かつ簡便にアレルゲン検査を実施できる「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」⁹⁾ を開発した。本キットを ELISA キットと併用して日常的なアレルゲン検査に使用することが望まれるが、現状ではそのような管理を実施している食品メーカーは少なく、最終製品のアレルゲン検査のみの結果により、特定原材料表示の管理を実施している食品メーカーが多くを占めている。しかし最終製品のアレルゲン検査のみによる特定原材料表示の管理は、必ずしも十分ではない。現に特定原材料表示が義務化されて数年が経過するが、いまだに食品の回収事例が後をたたない。その主な原因として、製造工程におけるさまざまな調理加工による最終製品中のタンパク質の変性や不溶化などが挙げられる。

一般的にタンパク質は、加熱や凍結、高圧、乾燥、酸などのストレスを受けると変性し、立体構造やその性質が変化することが知られている。したがって、加熱処理や酸処理、乾燥、冷凍などのさまざまな調理加工は、食品中のタンパク質の構造や性質を大きく変化させるため、タンパク質の不溶化や凝集を生じさせる。食物アレルゲンは比較的其他のタンパク質に比べ、熱や酸などに耐性を有する傾向があるが、調理加工された食品中における食物アレルゲンの立体構造や性質の変化については、一部で研究はされているものの^{10)~13)}、詳細な報告はほとんどされていない。ゆえに実際の加工食品中における IC キットならびに ELISA キットの反応性について詳細に評価する必要がある。

加工食品を用いたキットの評価報告はいくつかなされている。ELISA キットにおいては、市場で販売されている数種類の ELISA キットについてのバリデーション試験や抗原の不溶化に関する研究などがさまざまな機関で実施されているが^{14)~18)}、IC キットに関する評価報告は、鈴木らによる外国製の輸入菓子を中心とした市販加工食品を用いた IC キットの評価¹⁹⁾ のみであり、ほとんどなされていない。しかし市販の加工食品では原材料や調理加工が明確には分からず、調理加工や食品中のマトリクスが反応性に及ぼす影響についての詳細な同定は難しい。また IC キットのみでの評価では、定量的に性能を評価することはできない。

そこで今回著者らは、市販の加工食品ではなく原材料、調理加工条件が明確な 11 種類のモデル食品を作製し、IC キットの性能評価試験および添加回収試験を行った。また

添加回収試験では同一検体を IC キットと ELISA キットの両方で測定し、IC キットの反応性を ELISA キットの測定値と比較することで、定量的に IC キットの性能評価を行った。これらの試験により、調理加工や原材料のマトリクスが IC キットの反応性や抽出効率に及ぼす影響を確認し、原材料から最終製品までの日常的な特定原材料検査への IC キットの有用性を検証したので報告する。

方 法

1. 検 体

1.1 原材料

モデル食品の作製に使用した 19 種類の原材料（ジャガイモ、キュウリ、玉ねぎ、ナス、タコ、ニンジン、しょう油、米酢、塩、みりん、グラニュー糖、小麦粉、エビ、レンコン、餃子の皮、牛挽肉、豚挽肉、トマト、サラダ油）は、主として東京都および神奈川県のスーパーマーケットおよび小売店で 2004 年 3～9 月に購入した。あらかじめ IC キットを用いて試験を行い、特定原材料由来タンパク質（卵、乳、小麦、そば、落花生）が混入していないことを確認した。

1.2 標準溶液の調製

標準溶液調製の特定原材料原末として、卵標準溶液には乾燥全卵粉末、乳標準溶液には脱脂全乳粉末、小麦標準溶液には小麦粉末、そば標準溶液にはむきそば粉末、落花生標準溶液には脱脂落花生粉末を使用した。各原末をそれぞれ 200 mg ずつ計量し抽出用緩衝液を 20 mL 加え、スターラーにて室温で 3 時間抽出した。卵、乳標準抽出用緩衝液は 100 mM PBS (pH 7.4)、小麦標準抽出用緩衝液は 4 M Urea を含む 100 mM Tris-HCl (pH 8.6)、そば、落花生標準抽出用緩衝液は 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を使用した。10,000×*g*, 4℃ で 30 分間遠心分離した後、上清を 0.45 μm のマイクロフィルターでろ過し、タンパク質量を測定した。算出したタンパク質量から、それぞれ 400 μg/mL になるように各抽出用緩衝液を用いて希釈し、標準溶液として使用直前まで 4℃ で保管した。

1.3 標準溶液の添加方法

11 種類のモデル食品は、以下に示す各モデル食品の作製法に準じて作製した。4 種類の非加熱モデル食品については、作製段階において標準溶液を食品換算濃度で 10 μg/g になるように添加した標準添加群と精製水を添加した標準未添加群を作製した。7 種類の加熱モデル食品については、加熱前の段階で標準溶液を同様に添加し均一化した標準添加群と精製水を添加した標準未添加群を各食品につきそれぞれ 2 系列ずつ作製し、1 系列をそのまま未加熱群（標準添加未加熱群ならびに標準未添加未加熱群）とし、もう 1 系列は各加熱処理を行い加熱群（標準添加加熱群ならびに標準未添加加熱群）とした。

1.4 モデル食品の作製

(1) ポテトサラダの作製法

野菜類が多い固体の非加熱モデル食品として選定した。あらかじめ茹でたジャガイモ、キュウリ、玉ねぎ、塩を、チャック付袋内で均一になるまでよく混合し、標準溶液を添加後袋内で均一化し、モデル食品とした。

(2) ナスとキュウリのしょう油漬けの作製法

弱酸性条件にさらされる固体の非加熱モデル食品として選定した。ナス、キュウリ、しょう油、みりんをチャック付袋内に入れて均一になるまでよく混合し、標準溶液を添加後袋内で均一化し、4℃で60分間静置させてモデル食品とした。

(3) タコの酢の物の作製法

酸性条件にさらされる固体の非加熱モデル食品として選定した。タコ、キュウリ、米酢を、チャック付袋内で均一になるまでよく混合し、標準溶液を添加後袋内で均一化し、4℃で60分間静置させてモデル食品とした。

(4) ニンジンシャーベットの作製法

凍結条件(-20℃)にさらされる固体の非加熱モデル食品として選定した。ニンジン、グラニュー糖、精製水を小プラスチック容器内に入れて均一になるように混合し、標準溶液を添加後容器内で均一化し、-20℃で60分間静置(30分で一度かくはん)させてモデル食品とした。

(5) クッキーの作製法

高温の加熱条件(180℃, 20分間)にさらされる固体の加熱モデル食品として選定した。小麦粉、サラダ油、水をチャック付袋でよく混合した後、4℃で30分間静置させて生地を作製し、標準溶液を添加後袋内でよくもんで再度均一化し、それを2系列作製した。1系列はそのまま未加熱群とし、もう1系列は、180℃のオーブン内で20分間加熱して加熱群とした。

(6) 蒸し餃子の作製法

蒸し餃子は比較的穏やかな加熱条件(100℃の蒸気, 8分間)にさらされる固体の加熱モデル食品として選定した。すり鉢でミンチ状にしたエビ、レンコンをチャック付袋内で均一になるまで混合し標準溶液を添加後袋内で均一化し、餃子の皮に包み、それを2系列作製した。1系列はそのまま未加熱群とし、もう1系列は、100℃の蒸気で8分間加熱して加熱群とした。

(7) 揚げ餃子の作製法

揚げ餃子は高温の加熱条件(180℃, 2分間)にさらされる固体の加熱モデル食品として選定した。(6)と同様にして2系列作製し、1系列はそのまま未加熱群とし、もう1系列は、180℃で2分間揚げで加熱群とした。

(8) ハンバーグの作製法

肉類が多く、均一に熱が伝わりにくい固体のモデル食品として選定した。牛挽き肉、豚挽き肉、玉ねぎを、チャック付袋内で均一になるまでよく混合し、標準溶液を添加後袋内でよくもんで再度均一化し、それを2系列作製した。1系列はそのまま未加熱群とし、もう1系列は、200℃に

熱したホットプレート上で片面5分間ずつ加熱して加熱群とした。

(9) オニオンスープの作製法

均一に熱が伝わる液体の加熱モデル食品として選定した。玉ねぎ、水をチャック付袋内で均一になるまでよく混合し標準溶液を添加後袋内で均一化し、それを2系列作製した。1系列はそのまま未加熱群とし、もう1系列は、100℃の湯の中で20分間加熱して加熱群とした。

(10) ニンジンジャムの作製法

糖類を多く含む液体の加熱モデル食品として選定した。(4)と同様の原材料を均一になるように混合し標準溶液を添加後均一になるように小ピーカー内で混合し、それを2系列作製した。1系列はそのまま未加熱群とし、もう1系列は、100℃で20分間加熱濃縮して加熱群とした。

(11) トマトソースの作製法

強い加圧加熱条件(121℃, 1.2気圧, 20分間)にさらされる液体の加熱モデル食品として選定した。玉ねぎ、トマト、オリーブオイルをチャック付袋内に入れて均一になるまでよく混合し、標準溶液を添加後袋内で均一化し、それを2系列作製した。1系列はそのまま未加熱群とし、もう1系列は、オートクレーブに入れ121℃で20分間加熱して加熱群とした。

2. 試薬および装置類

2.1 キット

特定原材料由来タンパク質のIC試験には、FASTKIT イムノクロマト卵、牛乳、小麦、そば、落花生キット(日本ハム(株)製)を使用した(Table 1)。ELISA試験にはFASTKIT エライザ卵、牛乳、小麦、そば、落花生キット(日本ハム(株)製)を使用した。タンパク質量の測定には、BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE社製)を用いた。

2.2 機器および装置類

試料の破碎および抽出にはフードミルサー(岩谷産業(株)製、ミルサーIFM-700G)、プレートの洗浄にはプレートウォッシャー(大日本製薬(株)製、BIO-WASHER 405R)、吸光度の測定にはプレートリーダー(和光純薬工業(株)製、TECAN SPECTRA CLASSIC)を使用した。器具の洗浄には、超音波洗浄器((株)ヤマト科学製、卓上型超音波洗浄 B2200)を使用した。器具を介しての特定原材料の混入を防ぐために、器具の洗浄は中性洗剤で洗浄した後、超音波洗浄機で30分間超音波洗浄し、アルカリ洗剤で一晩漬け置きした。流水洗浄によりアルカリ洗剤を洗い流し、精製水で流水洗浄した後、風乾した。

3. 試料調製法

検体の抽出には、ICキットおよびELISAキットにおいて同一の組成であるキット付属の濃縮抽出用緩衝液を使用した。濃縮抽出用緩衝液を精製水で10倍に希釈し抽出用緩衝液とした。食品検体はフードミルサーを用いて均一な状態に破碎し、破碎試料とした。破碎試料2gをミルサーカップにひょう量し、抽出用緩衝液を38mL加え、フー

Table 1. Characteristics of Immunochromatographic Test Kits

Immunochromatographic test kit	Detection sensitivity	Antigen
Egg	5 $\mu\text{g/g}$	Whole egg proteins including ovalbumin, ovomucoid, lysozyme and ovotransferrin
Milk	5 $\mu\text{g/g}$	Whole milk proteins including casein, β -lactoglobulin and α -lactoglobulin
Wheat	5 $\mu\text{g/g}$	Whole wheat proteins including gliadin and α -amylase inhibitor
Buckwheat	5 $\mu\text{g/g}$	Whole buckwheat proteins including major allergen
Peanut	5 $\mu\text{g/g}$	Whole peanut proteins including Ala h 1 and Ala h 2

Characteristics of immunochromatographic test kits (egg, milk, wheat, buckwheat and peanut).

ドミルサーで 30 秒間、3 回抽出を行った。3,000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間遠心分離を行った後、上清をろ紙でろ過し、検体抽出液とした。

4. 性能評価試験

モデル食品は、4 種類の非加熱モデル食品の標準未添加群ならびに 7 種類の加熱モデル食品の標準未添加加熱群を用いた。ただし小麦キットの試験には、原材料に小麦由来タンパク質を含むクッキー、蒸し餃子、揚げ餃子を除いた 8 種類のモデル食品を使用した。試料調製法に従い、各モデル食品の検体抽出液を調製し、それらをキット付属の希釈用緩衝液を用いて 10 倍に希釈し、性能評価試験用希釈液とした。これを用いてキット評価用標準溶液（卵、乳、小麦、そば、落花生）を各濃度に調製した。食品中の換算濃度において、検出感度試験は 5 $\mu\text{g/g}$, 200 $\mu\text{g/g}$, 2,000 $\mu\text{g/g}$, 再現性試験には、0 $\mu\text{g/g}$, 5 $\mu\text{g/g}$, 交差反応性試験には、20,000 $\mu\text{g/g}$ の標準溶液を使用した。検出感度試験、再現性試験は各キットの測定対象となるキット評価用標準溶液についてそれぞれ一重試験または三重試験

で IC 試験を行い、交差反応試験は各キットの測定対象外となる 4 種類のキット評価用標準溶液について一重試験で IC 試験を行った。なお、IC 試験の判定は目視により陽性 (+), 弱陽性 (+w), 陰性 (-) の 3 段階で判定を行い、陽性、弱陽性を陽性判定とした (Fig. 1).

5. 添加回収試験

モデル食品は、11 種類のモデル食品の標準添加未加熱群ならびに標準添加加熱群を用いた。小麦キットの試験には、性能評価試験と同様に 8 種類のモデル食品を使用した。試料調製法に従い、各モデル食品の検体抽出液を調製し、5 種類の IC キットを用いて二重試験で IC 試験を行った。また各検体抽出液について、5 種類の ELISA キットを用いて ELISA 試験を行い、ELISA キット付属の標準溶液で作製した標準曲線から特定原材料由来タンパク質の食品中換算濃度を算出した。なお、IC 試験の判定は性能評価試験と同様に行った (Fig. 1).

結果および考察

1. IC キットの性能評価試験

1.1 検出感度試験

検出感度試験の結果を Table 2 に示した。今回の試験に使用した IC キットの保証検出感度は食品中換算濃度において 5 $\mu\text{g/g}$ である (Table 1)。5 種類の IC キットはいずれも標準溶液濃度 5 $\mu\text{g/g}$ で陽性判定を示したことから、多様な食品由来成分およびマトリクスの存在下においても本キットは保証検出感度濃度の特定原材料由来タンパク質の検出が可能であることが確認された。また IC 試験において、高濃度の抗原に起因したプロゾーン現象が生じると、過剰濃度の特定原材料由来タンパク質を含む食品に対して偽陰性を起こすこととなり、特定原材料表示の見逃しの原因となる。検出感度試験の結果より、過剰な抗原濃度を想定した標準濃度 2,000 $\mu\text{g/g}$ においても 5 種類の IC キットですべて陽性判定を示したことから、本キットはプロゾーン現象に起因する偽陰性が生じず、過剰濃度の特定原材料由来タンパク質を含む食品の測定が可能であることが確認された。

1.2 再現性試験

再現性試験の結果を Table 3 に示した。IC 法は、測定時に洗浄操作が入らないため、食品中の多様な成分の影響を受けやすく、メンブランの目詰まりや粘性による流速の変化などにより、測定結果の再現性に影響を与える可能性

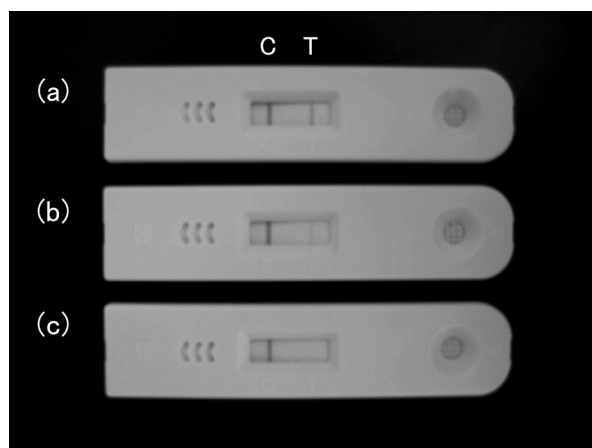


Fig. 1. Judgment of results with immunochromatographic test kits

Judgment of immunochromatographic test kit results (egg, milk, wheat, buckwheat and peanut). Two lines can be seen, of which the left is the control line and the right is the test line (a) positive (+: clearly visible test line. Concentration of standard solution=200 $\mu\text{g/g}$). (b) weakly positive (+w: faint test line. Concentration of standard solution=2.5 $\mu\text{g/g}$). (c) negative (-: no test line. Concentration of standard solution=0 $\mu\text{g/g}$). C: control line, T: test line.

Table 2. Detection Sensitivities of Immunochromatographic Test Kits

No.	Processed food models	Concentration of standard solution ($\mu\text{g/g}$)	Immunochromatographic test kits				
			Egg	Milk	Wheat	Buckwheat	Peanut
1	Potato salad	5	+	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+
2	Pickles in soy sauce	5	+w	+w	+w	+w	+w
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+
3	Pickles in vinegar	5	+	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+
4	Carrot sherbet	5	+	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+
5	Cookie	5	+	+	NT	+	+
		200	+	+	NT	+	+
		2,000	+	+	NT	+	+
6	Steamed Chinese meat dumpling	5	+	+	NT	+	+
		200	+	+	NT	+	+
		2,000	+	+	NT	+	+
7	Fried Chinese meat dumpling	5	+w	+w	NT	+	+
		200	+w	+w	NT	+	+
		2,000	+	+	NT	+	+
8	Hamburger steak	5	+w	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+
9	Onion soup	5	+	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+
10	Carrot jam	5	+	+	+	+	+
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+
11	Tomato sauce	5	+w	+w	+w	+w	+w
		200	+	+	+	+	+
		2,000	+	+	+	+	+

Detection of standard solution in extracts of 11 processed food models by immunochromatographic test kits (egg, milk, wheat, buckwheat and peanut). Concentration of standard solution = $5 \mu\text{g/g}$, $200 \mu\text{g/g}$, $2,000 \mu\text{g/g}$. +: positive, +w: weakly positive, -: negative, NT: not tested

が考えられる。また食品成分の非特異的な吸着に起因した偽陽性や阻害作用による偽陰性を生じやすい。5種類のICキットは、標準濃度 $0 \mu\text{g/g}$ では三重試験ですべて陰性を示し、標準濃度 $5 \mu\text{g/g}$ では三重試験ですべて陽性判定を示したことから、多様な食品由来成分の存在下においても、影響を受けることなく測定間において良好な再現性を示し、また食品成分に起因した偽陽性および偽陰性も生じないことが確認された。

1.3 交差反応性試験

交差反応性試験の結果により、5種類のICキットは測定対象品目以外の4種類のキット評価用標準溶液に対して、標準溶液濃度 $20,000 \mu\text{g/mL}$ ですべて陰性を示した（データは示さず）。アレルギー検査において表示義務があ

る特定原材料5品目間で交差反応に起因する偽陽性が生じた場合、特定原材料表示ミスを引き起こす原因となる可能性がある。そのため、特定原材料検査においては測定対象品目のみにしか反応しない高い特異性を有する特定原材料検査キットが必要とされる。特定原材料そのものを抽出した場合の想定濃度である $20,000 \mu\text{g/g}$ の標準溶液を含むモデル食品抽出液に対して、5種類のICキットはすべて陰性を示したことから、特定原材料間での交差反応に起因する偽陽性は生じず、多様な食品由来成分の存在下においても、良好な特異性を示すことが確認された。

Table 3. Reproducibility of Immunochromatographic Test Kits

No.	Processed food models	Concentration of standard solution ($\mu\text{g/g}$)	Immunochromatographic test kit				
			Egg	Milk	Wheat	Buckwheat	Peanut
1	Potato salad	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +
2	Pickles in soy sauce	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	+ / + / +
3	Pickles in vinegar	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +
4	Carrot sherbet	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ / + / +	+ / + / +	+ w / + w / + w	+ / + / +	+ / + / +
5	Cookie	0	-/-/-	-/-/-	NT	-/-/-	-/-/-
		5	+ / + / +	+ / + / +	NT	+ / + / +	+ / + / +
6	Steamed Chinese meat dumpling	0	-/-/-	-/-/-	NT	-/-/-	-/-/-
		5	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	NT	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w
7	Fried Chinese meat dumpling	0	-/-/-	-/-/-	NT	-/-/-	-/-/-
		5	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	NT	+ / + / +	+ w / + w / + w
8	Hamburger steak	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +
9	Onion soup	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +
10	Carrot jam	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w	+ w / + w / + w
11	Tomato sauce	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-
		5	+ w / + w / + w	+ / + / +	+ / + / +	+ w / + w / + w	+ / + / +

Reproducibility (difference among 3 test strips) of response of immunochromatographic test kits (egg, milk, wheat, buckwheat and peanut) to standard solution in extracts of 11 processed food models. Concentration of standard solution = 0 $\mu\text{g/g}$, 5 $\mu\text{g/g}$. +: positive, +w: weakly positive, -: negative, NT: not tested

2. 添加回収試験による IC キットの評価

2.1 モデル食品中の卵抗原の検出

卵検出用 IC キットならびに ELISA キットの添加回収試験の結果を Table 4 に示した。モデル食品の未加熱群に対して、タコの酢の物を除き、両キットの測定結果は高い一致を示したことから、酸性処理を除く非加熱モデル食品もしくは加熱前の試料では両キットはほぼ同等の性能を示すことが確認された。しかし加熱群に対しては、あらゆる加熱条件のモデル食品において両キットともにすべて陰性を示しており、卵検出用両キットは加熱処理された食品中の卵抗原の測定が困難となる場合があることが確認された。その原因として 2 つの要因が考えられる。1 つは、食品に含まれる卵抗原が加熱処理によって熱変性され、凝集、不溶化することにより、検体抽出液中に十分に抽出されなかったことが考えられる。もう 1 つの要因として、両キットともに複合抗原を認識するポリクローナル抗体を使用しているため、卵標準溶液中に含まれる複数の卵抗原が加熱処理によって立体構造の変化または他成分との凝集などに起因した抗原性の低下を生じ、それらを対象とする抗体が認識できなくなったことが考えられる。これらの要因により両キットの反応性の低下が生じたと示唆された^{14), 20)~22)}。

今回両キットの測定結果において乖離が認められたタコの酢のものは、原材料に米酢を使用しており、モデル食品の pH は 4~5 を示した。卵標準溶液は等電点 4~5 を示すオボアルブミン、オボムコイドを主要とした全卵タンパク質を含む溶液であるため^{23)~25)}、タコの酢の物の pH 条件にさらされることで、等電点による不溶化が生じ、抽出率の低下が引き起こされたと考えられる。しかし酸性条件の影響の程度については、さらなる検討が必要であり、また両キットの測定結果の乖離についても測定系の違いに起因する原因が示唆されるが、より詳細な検討が必要と思われる。

2.2 モデル食品中の乳抗原の検出

乳検出用 IC キットならびに ELISA キットの添加回収試験の結果を Table 4 に示した。モデル食品の未加熱群に対して、両キットの測定結果は高い一致を示したことから、非加熱モデル食品もしくは加熱前の試料では両キットはほぼ同等の性能を示すことが確認された。しかし加熱群に対しては、ニンジンジャムを除いて両キットともにすべて陰性を示しており、乳検出用両キットも卵検出用両キットと同様の理由により、加熱処理された食品中の乳抗原の測定が困難となる場合があることが確認された^{26), 27)}。

ニンジンジャムにおいて両キットで高い反応性が得られ

Table 4. Detection of Standard Solution in Processed Food Models

No.	Processed food models	Heating conditions	Egg		Milk		Wheat		Buckwheat		Peanut	
			IC	ELISA ($\mu\text{g/g}$)	IC	ELISA ($\mu\text{g/g}$)	IC	ELISA ($\mu\text{g/g}$)	IC	ELISA ($\mu\text{g/g}$)	IC	ELISA ($\mu\text{g/g}$)
1	Potato salad	No heating	+	6.0	+	4.9	+	4.3	+	7.2	+w	8.1
2	Pickles in soy sauce	No heating	+w	4.8	+w	5.1	+w	<1.0	+	3.9	+	6.2
3	Pickles in vinegar	No heating	+w	<1.0	+w	2.5	+	4.4	+w	1.7	+	4.2
4	Carrot sherbet	No heating	+w	5.6	+	8.1	+	5.1	+	6.0	+	8.0
5	Cookie	No heating	+	7.9	+	10.2	NT	NT	+	4.4	+	8.7
		Heating	-	<1.0	-	<1.0	NT	NT	-	<1.0	-	<1.0
6	Steamed Chinese meat dumpling	No heating	+	3.1	+w	6.7	NT	NT	-	3.1	+	2.5
		Heating	-	<1.0	-	<1.0	NT	NT	-	<1.0	-	<1.0
7	Fried Chinese meat dumpling	No heating	+w	3.3	+	5.3	NT	NT	+	2.3	+	2.8
		Heating	-	<1.0	-	<1.0	NT	NT	-	<1.0	-	<1.0
8	Hamburger steak	No heating	+w	7.2	+	8.5	+	6.7	+	6.7	+w	7.7
		Heating	-	<1.0	-	<1.0	+	3.4	+	2.8	-	1.1
9	Onion soup	No heating	+	5.6	+	1.9	+	3.8	+	4.3	+	4.4
		Heating	-	<1.0	-	<1.0	+w	2.4	-	<1.0	-	<1.0
10	Carrot jam	No heating	+	5.8	+	11.4	+	4.7	+	7.4	+	8.4
		Heating	-	<1.0	+	10.1	+w	4.7	+w	4.2	+w	6.7
11	Tomato sauce	No heating	+w	4.1	+	7.7	+	1.5	+	5.1	+	6.1
		Heating	-	<1.0	-	<1.0	+w	<1.0	-	<1.0	-	<1.0

Detection of standard solution in 11 processed food models by immunochromatographic test kits (egg, milk, wheat, buckwheat and peanut) and ELISA kits (egg, milk, wheat, buckwheat and peanut). The standard solution (1–100 ng/mL) in ELISA kit was used for ELISA. +: positive, +w: weakly positive, -: negative. IC: results of immunochromatographic test kits, ELISA: ELISA kits, NT: not tested

たのは、ニンジンジャムに使用したグラニュー糖によるタンパク質保護作用によるためと考えられる。今回作製したニンジンジャムには、グラニュー糖が10%程度含まれている。グラニュー糖の主成分はショ糖であり、ショ糖はタンパク質溶液の保護剤として1~10%の濃度で使用されることが多く、今回作製したニンジンジャムはタンパク質保護作用に十分な量のショ糖を含んでいる。またニンジンシャーベットも同一の組成であるため、ニンジンシャーベット中のショ糖によって凍結による乳抗原の変性が保護されたと推測された。今回ニンジンジャム、ニンジンシャーベットについては、卵検出用キットを除いた4種類のキットにおいて非常に高い反応性が得られており、これらは上述したとおりショ糖による保護作用のためと推測された。

2.3 モデル食品中の小麦抗原の検出

小麦検出用 IC キットならびに ELISA キットの添加回収試験の結果を Table 4 に示した。モデル食品の未加熱群に対して、ナスとキュウリのしょう油漬けを除き、両キットの測定結果は高い一致を示したことから、一部の食品を除いた非加熱モデル食品もしくは加熱前の試料では両キットはほぼ同等の性能を示すことが確認された。また加熱群に対しても、トマトソースを除く3種類のモデル食品において、両キットともに陽性を示したことから、小麦検出用両キットは加熱処理された食品中に含まれる小麦抗

原を測定可能であることが確認された。また両キットで測定結果に乖離が認められたトマトソースは、レトルト食品を想定した強い加圧加熱条件（121℃, 1.2 気圧, 20 分間）にさらされるモデル食品である。小麦抗原は加圧加熱処理のような強い加熱処理条件にさらされると、卵、乳抗原と同様に加熱による影響を受け、不溶化による抽出率の低下または立体構造の変化などに起因した抗原性の低下により、小麦検出用両キットで測定が困難になることが確認された。またナスとキュウリのしょう油漬けについては、両キットで測定結果に乖離が認められているが、これも卵検出用キットと同様に、測定系の違いに起因した原因が示唆されるが、詳細な検討が必要であると思われる。

2.4 モデル食品中のそば抗原の検出

そば検出用 IC キットならびに ELISA キットの添加回収試験の結果を Table 4 に示した。モデル食品の未加熱群に対して、蒸し餃子を除き、両キットの測定結果は高い一致を示したことから、非加熱モデル食品もしくは加熱前の試料では両キットはほぼ同等の性能を示すことが確認された。しかし加熱群に対しては、ハンバーグ、ニンジンジャムを除いて両キットともにすべて陰性を示しており、そば検出用両キットも卵、乳検出用キットと同様に、加熱処理の程度によって食品中のそば抗原の測定が困難となる場合があることが確認された。両キットで高い反応性が認められたハンバーグは、表面温度と中心温度で差があり、

均一に熱が伝わりにくく、全体的に加熱ムラが生じやすいという特徴がある。今回良好な結果が得られたのは、そば抗原が十分に加熱条件にさらされず、熱変性しなかったそば抗原が存在したためと推測された。また IC キットで陰性を示した蒸し餃子は、未加熱試料の段階では、揚げ餃子の未加熱試料と同一の組成であり、揚げ餃子では問題なく陽性を示していることから、試料の均一化や抽出操作といった試料調製時の手技的な要因によるものと思われる。

2.5 モデル食品中の落花生抗原の検出

落花生検出用 IC キットならびに ELISA キットの添加回収試験の結果を Table 4 に示した。モデル食品の未加熱群に対して、両キットの測定結果は高い一致を示したことから、非加熱モデル食品もしくは加熱前の試料では両キットはほぼ同等の性能を示すことが確認された。しかし加熱群に対しては、ニンジンジャムを除く 6 種類のモデル食品で両キットともにすべて陰性を示し、ハンバーグについては ELISA キットにおいて定量限界値に近い 1.1 $\mu\text{g/g}$ を示したことから、落花生検出用両キットも卵、乳、そば検出用キットと同様に、加熱処理された食品中の落花生抗原の測定が困難となる場合があることが確認された。また、反応性低下の要因の 1 つとして、モデル食品の調理加工条件も大きく関与していると考えられる。落花生の主要アレルゲンとして、Ara h 1 と Ara h 2 が知られており、これらは加熱によって抗原性が変化することが知られている^{28), 29)}。落花生をローストすると、メイラード反応により Ara h 1, Ara h 2 の抗原性は高まるが^{10)~12)}、同じ加熱調理においても、落花生をフライまたはボイルした場合、未加熱の状態と比較してアレルゲン性が低下するという性質を有している¹³⁾。今回作製した加熱モデル食品はボイルやフライといった加熱処理を行うものがほとんどであり、調理加工条件により、Ara h 1, Ara h 2 の抗原性が低下することで、両キットの反応性も低下したと推測される。

3. IC キットと ELISA キットの一致率

添加回収試験で実施した 11 種類のモデル食品に対する IC キットと ELISA キットの測定結果について一致率を算出した (Table 5)。標準溶液を一定濃度添加したモデル食品を IC キットのみで評価を行った場合、IC 試験は定性試験であるため、モデル食品の標準溶液濃度を測定することはできない。しかし今回は IC 試験に使用した抽出液を用いて ELISA 試験を実施したため、両キットの測定結果を比較することで、定量的に IC キットの評価をすることが可能である。また添加回収試験に使用した IC キットおよび ELISA キットは各品目で同一のポリクローナル抗体を使用しており、同一の検体抽出液を両キットで測定することで、抽出効率や抗体の反応性を考慮することなく、純粋に測定系の違いを比較することが可能である。

添加回収試験における IC キットと ELISA キットの測定結果の一致率は、ELISA キットの測定結果を IC キットの保証検出感度である 5 $\mu\text{g/g}$ で分類した場合、5 種類のキットにおいて 58.3~96.7% を示し、キットの品目によって一致率に幅のある結果が得られた。しかし、いずれのキットにおいても不一致を示した検体はすべて IC キットで陽性判定を示し、ELISA キットで 5 $\mu\text{g/g}$ 未満を示した検体であり、IC キットは保証検出感度である 5 $\mu\text{g/g}$ 未満の検体についても検出が可能であることが明らかとなった。そこで ELISA キットの測定結果を ELISA キットの検出感度である 1 $\mu\text{g/g}$ で分類したところ、5 種類のキットにおいて 91.7~100% と非常に高い一致率を示した。一般的に IC キットは測定時に洗浄操作が入らず、また抗原抗体反応もメンブランを通過する瞬間しかないため、同一抗体を用いて作製した ELISA キットと検出感度を比較すると、IC キットは ELISA キットよりも若干検出感度が低くなる傾向がある。今回試験に使用した両キットは各品目で同一の抗体を使用しているが、今回の試験結果において IC キットは ELISA キットの測定結果と 90% 以上の一

Table 5. Consistency between the Results of Immunochromatographic Test Kits and ELISA Kits

Immunochromatographic test kit		ELISA kit		Consistent results/ total	Consistency rate
		>5 $\mu\text{g/g}$ (>1 $\mu\text{g/g}$)	<5 $\mu\text{g/g}$ (<1 $\mu\text{g/g}$)		
Egg	+ ~ +w	7 (10)	4 (1)	32/36	93.9%
	—	0 (0)	25 (25)	(35/36)	(97.2%)
Milk	+ ~ +w	9 (12)	3 (0)	33/36	96.7%
	—	0 (0)	24 (24)	(36/36)	(100%)
Wheat	+ ~ +w	2 (10)	10 (2)	14/24	58.3%
	—	0 (0)	12 (12)	(22/24)	(91.7%)
Buckwheat	+ ~ +w	5 (12)	7 (0)	29/36	80.5%
	—	0 (1)	24 (23)	(35/36)	(97.2%)
Peanut	+ ~ +w	8 (12)	4 (0)	32/36	93.9%
	—	0 (1)	24 (23)	(35/36)	(97.2%)

Consistency between the results of immunochromatographic test kit and ELISA kit. The result of ELISA kits at 5 $\mu\text{g/g}$ (detection limit of ELISA kits) +: positive, +w: weakly positive, -: negative. (): The result of ELISA kits at 1 $\mu\text{g/g}$ (detection limit of immunochromatographic test kits)

致率を示したことから、IC キットは測定系の違いによる検出感度の低下が生じることなく、ELISA キットと同等の性能を示すことが明らかとなった。

ま と め

食品メーカーの製造現場において、現状では最終製品に対するアレルゲン検査のみの結果で特定原材料表示を実施している施設が多く、原材料や中間製品に対する特定原材料検査まで実施している施設は少ない。しかし今回の試験において、検体によっては加熱処理の前後で両キットともに測定が困難になる場合があることが確認されたため、製造現場においてアレルゲン検査を実施する際には、最終製品だけではなく、原材料入庫時や製造工程における加熱工程前の段階の中間製品においてもアレルゲン検査を実施することが望ましい。今回評価を行った IC キットは、加熱前の試料であれば保証検出感度である $5 \mu\text{g/g}$ 未満の特定原材料由来タンパク質を検出可能であり、また食品由来成分の存在下においてもマトリクスなどの影響を受けることなく十分な性能を発揮することが確認された。最終製品における ELISA 試験に加え、簡便で迅速にアレルゲン検査を行える IC キットを原材料や加熱前の中間製品におけるアレルゲン検査に使用することで、より正確な特定原材料表示の管理が可能になると考えられる。したがって、IC キットは食品メーカーの製造現場における日常的検査ツールとして有用であると考えられる。

文 献

- 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).
- 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”，平成 16 年 12 月 24 日，食安発 1224002 号 (2004).
- 亀山 浩，豊田正武，食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要. 食品衛生研究, **52**(6), 65-73 (2002).
- 亀山 浩，アレルギー物質を含む特定原材料の検出について. 食衛誌, **44**, J-168-J-177 (2002).
- 高畑能久，ELISA による特定原材料の検出について (1). 食衛誌, **43**, J-275-J-277 (2002).
- 高畑能久，森松文毅，特定原材料検査キット「FASTKIT エライザ」の開発と応用. FFI J., **206**, 23-32 (2002).
- 豆越慎一，ELISA による特定原材料の検出について (2). 食衛誌, **43**, J-277-J-279 (2002).
- 本庄 勉，村岡嗣朗，豆越慎一，境 雅寿，ELISA 法による特定原材料の検出. FFI J., **2**, 00-00 (2000).
- 帯刀美紀子，野仲 功，食品アレルギー物質迅速検出キット「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」. ジャパンフードサイエンス, **43**, 70-76 (2004).
- Kopper, R. A., Odum, N. J., Sen, M., Helm, R. M., Stanley, J. S., Burks, A. W., Peanut Protein Allergens: The Effect of Roasting on Solubility and Allergenicity. Int. Arch. Allergy Immunol., **136**, 16-22 (2005).
- Burks, A. W., Williams, L. W., Thresher, W., Connaughton, C., Cockrell, G., Helm, R. M., Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. J. Allergy Clin. Immunol., **90**, 889-897 (1997).
- Maklei, S. J., Chung, S.-Y., Champagne, E. T., Raufman, J.-P., The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. J. Allergy Clin. Immunol., **106**, 763-768 (2000).
- Beyer, K., Morrow, E., Li, X.-M., Bardina, L., Bannon, G. A., Burks, A. W., Sampson, H. A., Effects of cooking methods on peanut allergenicity. J. Allergy Clin. Immunol., **107**, 1,077-1,081 (2001).
- 亀山 浩，五十鈴川和人，張替直輝，渡邊裕子，飯島賢，山川宏人，水口岳人，吉川礼次，山本美保，佐藤秀隆，渡井正俊，荒川史博，小笠原 健，西原理久香，加糖久，山内 淳，高畑能久，森松文毅，豆越慎一，村岡嗣郎，本庄 勉，渡 敬浩，和久井千世子，今村知明，豊田正武，米谷民雄，特定原材料 (卵) 測定の厚生労働省通知 ELISA 法の複数機関による評価研究. 食衛誌, **44**, 213-219 (2003).
- Park, D. L., Coates, S., Brewer, V. A., Garber, E. A. E., Abouzied, M., Johnson, K., Ritter, B., McKenzie, D., Performance tested method multiple laboratory validation study of ELISA-based assays for the detection of peanuts in food. J. AOAC Int., **88**, 156-160 (2005).
- Nogueira, M. C. L., McDonald, R., Westphal, C., Maleki, S. J., Yeung, J. M., Can commercial peanut assay kits detect peanut allergens? J. AOAC Int., **87**, 1,480-1,484 (2004).
- Whitaker, T. B., Williams, K. M., Trucksess, M. W., Slate, A. B., Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. J. AOAC Int., **88**, 161-174 (2005).
- Westphal, C. D., Pereira, M. R., Raybourne, R. B., Williams, K. M., Evaluation of extraction buffers using the current approach of detecting multiple allergenic and nonallergenic proteins in food. J. AOAC Int., **87**, 1,458-1,465 (2004).
- 鈴木 剛，松浦健治，前田 守，長崎俊夫，瀬上幸子，渡邊路子，渡辺久美子，白柳利江子，西田佳奈子，豊田正武，イムノクロマトキットによる輸入食品中の特定原材料の測定. 日本食品科学工学会誌, **51**, 691-697 (2004).
- Matsuda, T., Watanabe, K., Sato, Y., Independent thermal unfolding of ovomucoid domains. Biochem. Biophys. Acta, **669**, 109-112 (1981).
- Honma, K., Kohno, Y., Saito, K., Shimojo, N., Tsunoo, H., Niimi, H., Specificities of IgE, IgG and IgA antibodies to ovalbumin. Int. Arch. Allergy Immunol., **103**, 28-35 (1994).
- Gu, J., Matsuda, T., Nakamura, R., Ishiguro, H., Ohkubo, I., Sasaki, M., Takahashi, N., Chemical deglycosylation of hen ovomucoid: Protective effect of carbohydrate moiety on tryptic hydrolysis and heat denaturation. J. Biochem., **106**, 66-70 (1989).
- Desert, C., Guerin-Dubiard, C., Nau, F., Jan, G., Val, F., Mallard, J., Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. J. Agric. Food

- Chem., **49**, 4,553–4,561 (2001).
- 24) Hoffman, D. R., Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**, 481–486 (1983).
- 25) Holen, E., Elsayed, S., Characterization of four major allergens of hen egg-white by IEF/SDS-PAGE combined with electrophoretic transfer and IgE-immunoautoradiography. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **86**, 136–141 (1990).
- 26) Lee, Y.-H., Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. *J. Pediatr.*, **121**, S47–S50 (1992).
- 27) Pervaiz, S., Brew, K., Homology of β -lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. *Science*, **228**, 335–337 (1985).
- 28) Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T. J., Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **88**, 172–179 (1991).
- 29) Burks, A. W., Williams, L. W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T. J., Helm, R. M., Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h 2, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 962–969 (1992).