

原著

## 味噌の特定原材料検査(小麦)における大麦の影響について

一色 博, 竹川雄太, 林 克弘, 志村恭子

### Effect of Barley on Detection of Allergic Substances (Wheat) in Miso

Hiroshi ISSHIKI, Yuta TAKEKAWA, Katsuhiko HAYASHI and Kyoko SHIMURA

本県では過去の特定原材料(小麦)の収去検査において、味噌でELISA法によるスクリーニング検査陽性、確認試験(PCR法)陰性となる事例が発生している。消費者庁通知では、ELISAでスクリーニングを実施し、確認試験はPCRにより実施することになっている。検査で用いる市販の小麦ELISAキットは大麦等の麦類に交差性があり、大麦を使用した一部の味噌の検査ではスクリーニング検査陽性となる可能性が非常に高く、確認検査の実施を余儀なくされる。一方、確認試験では小麦遺伝子のみを対象としたPCRを行うため、ELISAの陽性が大麦等いずれの麦類の交差反応が原因であるかの特定には至らない。そこで、本研究では、市販の味噌および小麦不使用で大麦を使用して試作した味噌を用いて、DNAの抽出法の確認および大麦検出用プライマーによりPCRを行い、大麦遺伝子の抽出について検証した。その結果、味噌からの麦類DNA抽出には通知法のイオン交換樹脂タイプキットよりQIAGEN製DNeasy<sup>®</sup>mericon<sup>™</sup>Foodが有効であり、それを用いて確認を行なったところ、味噌の仕込みに使用される大麦由来原材料により交差反応が起こることが示唆された。

キーワード：特定原材料，ELISA，小麦，大麦，偽陽性反応，PCR

#### はじめに

近年、食品アレルギーを有する患者数は増加する傾向にあり、2012年には学校給食でも死亡事例が発生した。平成13年には食品衛生法が改正され、アレルギー発症例の多い乳、卵、小麦およびアナフィラキシーショックを起こす可能性が高く<sup>1)</sup>重篤な症状を示すそば、落花生を特定原材料として表示が義務付けられた。<sup>2)</sup>その後、平成20年に、えび・かにが特定原材料に追加された。<sup>3)</sup>食品にはこれら特定原材料がさまざまな形で含まれることが多いので、食品へのアレルギー表示および製造過程における管理が重要となっている。<sup>4)</sup>

これら特定原材料の試験方法は、現在、

消費者庁通知<sup>5)</sup>で定められ、スクリーニング検査をELISA法で実施し、確認検査を、乳、卵はウエスタンブロット法、それ以外の特定原材料はPCR法で実施することになっている。

当研究所では2009年度および2010年度の特定原材料(小麦)を目的とした食品収去検査において、味噌が6検体あり、そのうち豆味噌の4検体がスクリーニング検査陽性であったが、確認検査(PCR法)ではすべて陰性となった。これら味噌の原材料表示には、小麦のELISA法で交差性を有し、偽陽性と判定される大麦等の表示はなかった。

味噌の製造方法では、麴に大麦を使用したり、風味づけとして大麦や小麦の穀(ふ

すま)等を微量ではあるが使用する場合もあるので、味噌に使われている全ての材料を表示から読み取ることにはできない。

また、ELISA 検査キットのメーカーが公表している偽陽性反応の情報には、大麦、ライ麦、麦芽等を含む多くの原材料および加工品について示され、大麦、ライ麦、麦芽等の交差性も記されているが味噌については記載がない。<sup>6-8)</sup>

そのため、大麦を使用した一部の味噌の検査では交差性により、特定原材料(小麦)のスクリーニング検査陽性となる可能性が非常に高く、通知で定められた製造記録の確認等において小麦が使用されていないにもかかわらず、確認検査の実施を余儀なくされる。

一方、確認検査では小麦遺伝子のみを対象としたPCRを行うため、ELISAの陽性が大麦等いずれの麦類の交差反応に起因するかの特定には至らない。

また、検査試料からのDNA抽出の成否については、植物検出用プライマーによるPCRの増幅により確認を行っているが、味噌のような発酵食品では、原材料の種類や配合量および製造方法の違い等によりDNAの分解度合いが異なる<sup>9)</sup>と考えられる。小麦あるいは交差性のある麦類のDNAがどの程度抽出できているかの確認を行うことで、交差性のある麦類が検出されれば、製造業者への指導等にも貢献できると考えている。

本研究では、過去の食品収去検査の中から味噌に着目し、市販の味噌および小麦不使用で大麦を使用して試作した味噌を用いて、スクリーニング検査および確認検査を行い、大麦の影響およびDNA抽出について検証した。

また、給食施設、食品製造工場等、多くの現場で使用されているイムノクロマトを用いた簡易検査法の麦類交差性についても報告する。

## 方法

### 1. 試料

市販味噌は豆味噌、米味噌、麦味噌お

よび調合味噌を量販店および地場産品取扱店から購入した。試作味噌は、市販大豆、塩および使用原材料が確認できる麴を用いて一般的な味噌の仕込み方法により作製した。

また、味噌の成熟に伴う大麦による交差反応物質の消長を見るために、試作味噌の仕込みはじめに2%程度の大麦由来の香煎(主に大麦を炒った粉末)、大麦麴および小麦麴を添加し、味噌の熟成途中(仕込み直後、62日目および103日目)でサンプリングしたものをを用いた。

### 2. 試薬

1) ELISA法によるスクリーニング検査検査キットは、(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)および日本ハム(株)製FASTKIT エライザ Ver. II小麦を使用した。

2) DNA抽出

QIAGEN製QIAGEN Genomic-tip 20/GおよびDNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>™</sup> Foodを使用した。

3) PCRによる確認検査

AmpliAq<sup>®</sup> Gold, PCR Buffer II, MgCl<sub>2</sub> および dNTP はアプライドバイオシステムズ製、植物DNA検出用プライマーは(株)ファスマック製、小麦検出用プライマーはオリエンタル酵母工業(株)製、大麦( $\gamma$ -hordein 遺伝子)検出用プライマーは既報<sup>10)</sup>の塩基配列により合成したものをを使用した。

4) イムノクロマト法簡易検査キット

(株)森永生科学研究所製 ナノトラップ II R 小麦、日本ハム(株)製 FASTKIT スリム 小麦を使用した。

### 3. 装置

マイクロプレートリーダーはThermo Scientific製 Multiskan FC、サーマルサイクラーはアプライドバイオシステムズ製 GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700、電気泳動装置はコスモバイオ株式会社製 i-Mupid<sup>®</sup> システムを使用した。

#### 4. 検査方法

- 1) スクリーニング検査および確認検査  
消費者庁通知 (H22.9.10消食表第286号)<sup>5)</sup> (以下, 通知法) により行った.
- 2) 大麦DNA抽出およびPCR  
DNA抽出は, QIAGEN製 DNeasy<sup>®</sup>mericon<sup>™</sup>Food (以下, mericon法) を用い, 大麦のPCR条件は, 既報<sup>10)</sup> の方法により行った.
- 3) 簡易検査  
各キットの取扱い説明書により行った.

#### 結果および考察

図1に小麦を対象としたスクリーニング検査で調べた試作味噌の仕込み時に添加した香煎, 大麦麩および小麦麩の抗原タンパク質濃度が味噌成熟過程でどのように変化するかを示した. 添加した仕込み直後から103日目において, 抗原タンパク質は, 香煎と大麦麩で約76%に, 小麦麩で約27%に減少したが, 消滅することはなかった.

表1に味噌の製造で使用する麩, 大麦由来の香煎, 麩および偽陽性(交差性)を示す可能性のある麦類についてのスクリーニング検査および簡易検査の結果を示した. 大麦, はと麦, ライ麦のうち, はと麦は反応がほとんどなかった. 通常, 豆麩の製造には香煎が使用されているが, 今回検討した豆麩(番号5)では香煎が使用されていないために陰性となり, 麩の中では麦麩(番号6)のみ反応した. 表1における番号1,3,6,7,8のモリナガの簡易検査では, イムノクロマト法の原理上, 多量の抗原蛋白が抽出液に含まれる場合に起こる反応性の低下が見られた.<sup>4)</sup> 味噌からのDNA抽出を検討したところ, 通知法のイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出液ではPCRの増幅が見られなかったが, より短いフラグメントDNAの抽出に適したmericon法<sup>11)</sup><sup>12)</sup> では増幅が確認できた. そこで, 本研究ではmericon法によるDNA抽出を行い, 確認検査を実施した. 図2に味噌原料等のmericon法によるDNA抽出液のPCR結果を

示した. 大麦のDNAが検出されたのは, D社製市販豆味噌, 大麦, 飼料用麦であり, 小麦, ライ麦とは明らかに区別できた.

表2に市販の味噌および自家製の試作味噌についてスクリーニング検査および簡易検査を実施し, スクリーニング検査で反応があったものについて確認検査の結果を示した. 豆味噌では8検体中7検体(番号1,2,3,5,7,10,12)で検査キットの検出限界以上となり, うち3検体(番号1,2,3)でスクリーニング検査陽性であった. 確認検査の結果, 小麦はすべて陰性で, 大麦が検出されたものが5検体あった. このうち, 豆味噌の4検体は豆麩の製造時に香煎が使用されたと考えられる. また, 米味噌1検体(番号15)についてはモリナガのELISAキットで弱い反応があり, 製造段階での麦, 豆味噌等の混入の可能性が考えられた. なお, 試作の自家製味噌については, 麦麩使用味噌(番号18)のみモリナガのELISAキットで反応した. 簡易検査については, 検出下限が5 $\mu$ g/gであることから, 番号15のようにELISAの定量値が低いものについては検出されなかった. 図3に味噌のmericon法によるDNA抽出液のPCRを示した. 大麦が検出されたのは, 大麦由来の香煎を添加した試作味噌, F社製豆味噌, G社製豆味噌, H社製豆味噌, I社製豆味噌の5検体であり, A社製豆味噌, C社製豆味噌, J社製麦味噌, K社製麦味噌, L社製米味噌の5検体からは検出されなかった.

スクリーニング検査法と簡易検査法の結果を比較すると, スクリーニングに用いたELISAキットのメーカー間の定量値の差が簡易検査の感度にもほぼそのまま反映する結果となった.

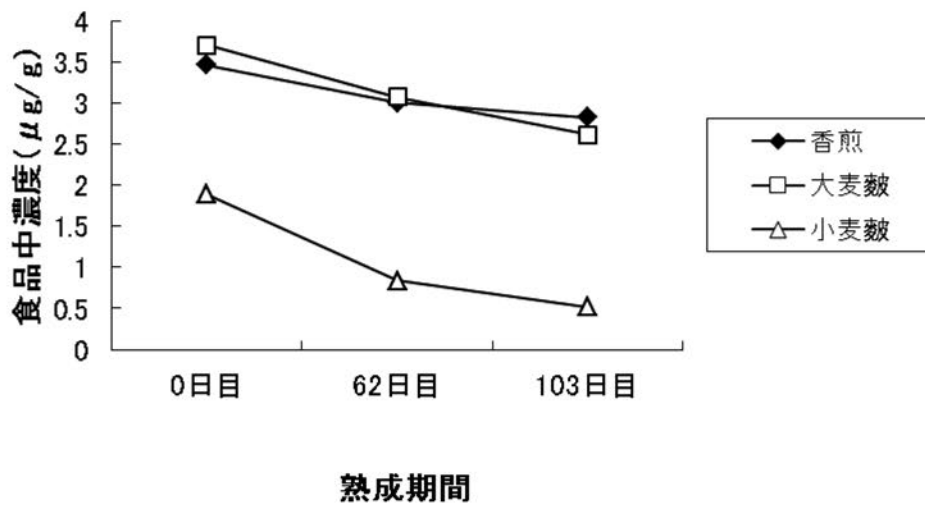


図1 豆味噌の熟成中における抗原タンパク質濃度変

表1 味噌製造原料におけるアレルギー物質（小麦）の反応性

| 番号 | 検体     | ELISAキットによる定量値(μg/g) |      | スクリーニング検査 | 簡易検査(定性) |      |
|----|--------|----------------------|------|-----------|----------|------|
|    |        | 日本ハム                 | モリナガ |           | 日本ハム     | モリナガ |
| 1  | 大麦     | 9.6                  | 20以上 | +         | +        | ±    |
| 2  | はと麦    | 0.6                  | 0.7  | ± ※1      | -        | -    |
| 3  | ライ麦    | 20以上                 | 20以上 | +         | +        | ±~-  |
| 4  | R社米麩   | ND ※2                | ND   | -         | /        | /    |
| 5  | R社豆麩   | ND                   | ND   | -         | /        | /    |
| 6  | R社麦麩   | 3.2                  | 14.9 | +         | -        | ±~-  |
| 7  | 香煎(大麦) | / ※3                 | 20以上 | +         | +        | ±    |
| 8  | 小麦麩    | /                    | 20以上 | +         | +        | ±~-  |

※1: ±は通知上陰性; ※2: NDは不検出; ※3: /は未測定.

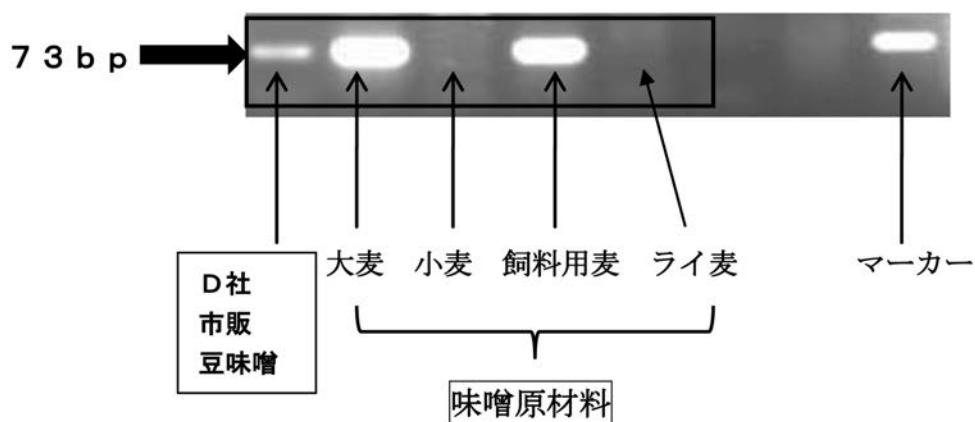
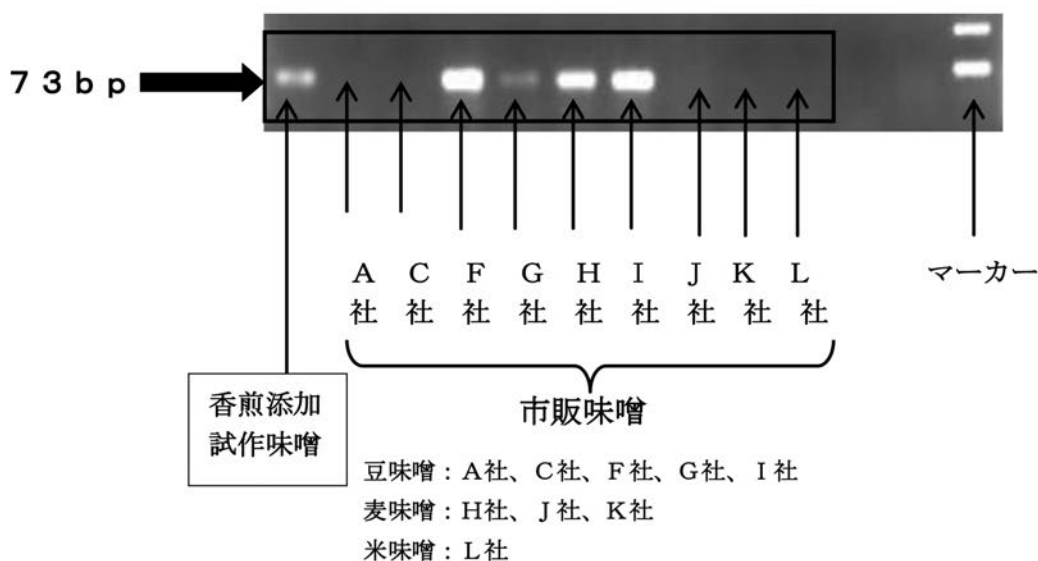


図2 味噌原材料等の mericon 法によるDNA抽出液のPCR

表2 各種味噌におけるアレルギー物質（小麦）の検出状況

| 試料番号 | 検体         | ELISAキットによる定量値(μg/g) |      | スクリーニング検査 | 簡易検査 |      | 確認検査 |    |
|------|------------|----------------------|------|-----------|------|------|------|----|
|      |            | 日本ハム                 | モリナガ |           | 日本ハム | モリナガ | 小麦   | 大麦 |
| 1    | A社豆味噌1     | 14.0                 | 20以上 | +         | /    | /    | -    | /  |
| 2    | A社豆味噌2     | 14.2                 | 20以上 | +         | /    | /    | -    | /  |
| 3    | A社豆味噌3     | 6.5                  | 20以上 | +         | -    | +    | -    | -  |
| 4    | B社豆・米調合味噌  | 3.6                  | 8.9  | ± ※1      | ±~-  | +    | / ※3 | /  |
| 5    | C社豆味噌      | 12.7                 | 14.3 | +         | -    | +    | -    | -  |
| 6    | C社米味噌      | ND ※2                | ND   | -         | /    | /    | /    | /  |
| 7    | D社豆味噌      | 2.7                  | 10.6 | +         | ±~-  | +    | -    | +  |
| 8    | E社豆味噌      | ND                   | ND   | -         | /    | /    | /    | /  |
| 9    | F社豆・米調合味噌  | 2.2                  | 9.5  | ±         | -    | +    | -    | +  |
| 10   | G社豆味噌      | 1.3                  | 3.5  | ±         | -    | +    | -    | +  |
| 11   | H社麦味噌      | 4.5                  | 20以上 | +         | ±~-  | +    | -    | +  |
| 12   | I社豆味噌      | 3.1                  | 14.2 | +         | -    | +    | -    | +  |
| 13   | J社麦・豆調合味噌  | 3.3                  | 18.8 | +         | -    | +    | -    | -  |
| 14   | K社麦・米調合味噌  | 2.8                  | 11.7 | +         | ±~-  | +    | -    | -  |
| 15   | L社米味噌      | ND                   | 1.6  | ±         | -    | -    | -    | -  |
| 16   | R社米麴使用試作味噌 | /                    | ND   | -         | /    | /    | /    | /  |
| 17   | R社豆麴使用試作味噌 | /                    | ND   | -         | /    | /    | /    | /  |
| 18   | R社麦麴使用試作味噌 | /                    | 20以上 | +         | ±    | +    | /    | /  |

※1: ±は通知上陰性; ※2: NDは不検出; ※3: /は未測定.



※香煎添加試作味噌、市販味噌すべて ELISA で反応性のあった試料

図3 味噌のmericon法によるDNA抽出液のPCR

まとめ

今回、主に量販店等で市販されている各種味噌の特定原材料（小麦）を調査した結果、スクリーニング検査で陽性であったものも、確認検査ではすべて陰性で

あった。また、大麦 DNA 抽出液の PCR の結果、ELISA 法によるスクリーニング検査での偽陽性反応は、大麦に由来する香煎や、麦味噌の原材料として的大麦が原因であると推測された。

イムノクロマト法による特定原材料

(小麦)の簡易検査は食品製造施設等で使用されているが、抗原が多量であると反応性が下がることと、大麦等にも反応することに注意が必要である。また、簡易検査キットは、メーカー間で反応性が異なることから、製造する食品にあわせた簡易検査キットの選定が必要である。

今回、スクリーニング検査で反応があった検体で小麦、大麦ともに検出できなかった味噌があったことから、今後は、麦類のDNAを確実に抽出する最適条件を検討するとともに、一部の地域で製造されているような地場産の豆味噌等を調査する必要がある。

## 文 献

- 1) 海老澤元宏：食物アレルギーについて，食品衛生研究，Vol. 59，No. 1，17-25 (2009)。
- 2) 平成13年3月15日付け食発第79号厚生労働省通知「食品衛生法施行規則及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」。
- 3) 平成20年6月3日付け食発第0603001号厚生労働省通知「食品衛生法施行通知の一部を改正する省令の施行について」。
- 4) 布藤 聡：アレルギー食品の検査技術，食品工業，Vol. 53，No. 6，43-51 (2010)。
- 5) 平成22年9月10日付け消食表第286号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」
- 6) 土井啓利，高橋美津子，山本貴之，柴田治樹：偽陽性反応を低減した特定原材料小麦測定ELISA法の開発及び複数機関による評価研究，日本食品化学学会誌，17，12-17 (2010)。
- 7) モリナガFASPEK特定原材料測定キット：森永生科学研究所ホームページ (<http://www.miobs.com/product/tokutei/faspek/index.html>)。
- 8) 日本ハム中央研究所：特定原材料検査キットFASTKIT Ver. IIシリーズホームページ ([http://www.rdc.nipponham.co.jp/fastkit/fastkit\\_elisa.html](http://www.rdc.nipponham.co.jp/fastkit/fastkit_elisa.html))。
- 9) 萩野賀世，松本ひろ子，牛山博文：加工食品中の特定原材料検査（小麦）におけるPCR法の検討，東京都健康安全研究センター研究年報，59，149-153 (2008)。
- 10) HERNANDEZ, M., T. ESTEVE, M. PLA. : Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Assays for Quantitative Detection of Barley, Rice, Sunflower, and Wheat, J. Agric. Food Chem. 53, 7003-7009 (2005)。
- 11) 橋本博之，本郷 猛，中西希代子，宮本文夫，林 千恵子，石井俊靖：特定原材料検査におけるDNA抽出キット(DNeasy<sup>®</sup>mericon<sup>™</sup>Food)の検討，第49回全国衛生化学技術協議会年会講演集，172-173，(2012)。
- 12) 橋本博之，本郷 猛，中西希代子，宮本文夫，石井俊靖，安達玲子，穂山 浩，手島玲子：特定原材料検査における海苔製品中のえび・かにDNA検出法の検討（第2報），第48回全国衛生化学技術協議会年会講演集，86-87 (2011)。

## **Effect of Barley on Detection of Allergic Substances (Wheat) in Miso**

Hiroshi ISSHIKI, Yuta TAKEKAWA, Katsuhiro HAYASHI, and Kyoko SHIMURA

**Keywords** : allergic substance, ELISA, wheat, barley, false-positive reaction, PCR

Recently in Mie Prefecture, when sampling of miso was performed to test for allergic substances (wheat) in accordance with the Food Sanitation Act, the screening test by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was positive but the confirmation test by polymerase chain reaction (PCR) assay was negative. According to a Notice of the Consumer Affairs Agency regarding the detection of allergic substances (wheat), screening by ELISA is performed first, followed by a confirmation test by PCR assay. Since the commercially available ELISA kit for wheat has cross-reactivity with barley, some kinds of miso that contain barley are likely test positive in screening for wheat. In the mandated confirmation test, however, only a PCR assay for specifically detecting wheat is presently used. Therefore, the assay is unable to determine what kinds of wheat and barley are responsible for the cross-reactivity. In the present study, miso purchased from a market and miso produced in the laboratory, which contained barley but not wheat, were used for DNA extraction and PCR testing using a primer for barley gene detection. The results show that, compared with the official method using an anion-exchange resin, DNeasy® *mericon*™ Food Kit (QIAGEN) was more suitable for screening miso for allergic substances (wheat). These findings implicate barley in the reported false-positive screening tests for wheat in miso.