

特定原材料（えび及びそば）の確認検査における シリカモノリススピンカラムを用いた DNA 抽出法の検討

渡邊 さやか, 原田 利栄, 羽生 琢真, 太田 茂徳¹⁾, 古庄 義明¹⁾, 鶴岡 則子

Study of DNA Detection Method using Monolithic Silica Columns for Allergenic Substances such as Shrimp and Buckwheat

Sayaka WATANABE, Rie HARADA, Takuma HANYU, Shigenori OTA, Yoshiaki FURUSHO, and Noriko TSURUOKA

キーワード：特定原材料、えび、そば、シリカモノリス、DNA 抽出法

Keywords : Allergenic Substance, Shrimp, Buckwheat, Monolithic Silica, DNA Detection Method

(平成 30 年 6 月 13 日受付 平成 30 年 7 月 3 日受理)

はじめに

食物アレルギーを持つ人にとって食べられる食品かどうかを判断するためには、食品表示の情報が重要である。食物アレルギーを引き起こす食品のうち、症例数が多い又は症状が重篤である卵、乳、小麦、えび、かに、落花生、そばの 7 品目については食品表示法により特定原材料として表示が義務付けられている。

千葉県では、食物アレルギーによる健康被害を未然に防ぐため、平成 16 年度から県内で製造又は流通している加工食品を対象に検査を実施し、特定原材料表示が適正であるかを検証している。通知¹⁾に示されている検査方法は、スクリーニング検査として ELISA 法を行い、食品 1 g 当たり特定原材料由来のタンパク質を 10 µg 以上含有する場合はスクリーニング検査陽性と判定し、小麦、えび、かに、落花生、そばについては、DNA を抽出し PCR 法で確認検査を行うこととなっている。通知に記載の 3 つの DNA 抽出精製法のうち、加工程度が高く糖や油脂成分含量の高い検体ではイオン交換樹脂タイプキット法（以下 G-Tip 法）が推奨されており、千葉県では G-Tip 法を第一選択としている。しかし、G-Tip 法は操作全体で時間がかかり、粘性のある検体では自然滴下が困難などの問題点がある。

そこで、特殊な製造法により高速処理が可能で通液性に優れるという利点をもつシリカモノリススピンカラムを用いた DNA 抽出法²⁾に着目した（以下、シリカモノリス法）。

今回、平成 26 年度から 29 年度の特定原材料検査において確認検査を実施した項目である「えび」及び「そば」を含む加工食品を対象に、G-Tip 法とシリカモノリス法の比較を行い、特定原材料の確認検査におけるシリカモノリス法の有用性を検討した。

実験方法

1. 試料

えびタンパク質を含む加工食品として、平成 26 年度から 29 年度に実施した特定原材料検査において 10 µg/g 以上のえびタンパク質を含むことが確認された 6 検体、1 µg/g 以上 10 µg/g 未満であった 4 検体及び、原材料に「えび」の表示がある市場流通食品 4 検体の計 14 検体を試料とした。そばタンパク質を含む加工食品も同様に、平成 26 年度から 29 年度に実施した特定原材料検査において 10 µg/g 以上のそばタンパク質を含むことが確認された 1 検体、1 µg/g 以上 10 µg/g 未満であった 1 検体及び、原材料に「そば」の表示がある市場流通食品 5 検体の計 7 検体を試料とした。詳細は表 1 に示した。

2. 試薬

1) ELISA 法

ELISA キットは（株）マルハニチロ食品製甲殻類キット II 「マルハニチロ」、日水製薬（株）製 FA テスト EIA-甲殻類 II 「ニッスイ」、（株）森永生化学研究所製 FASPEK エライザ II （そば）及びブリマハム（株）製アレルギーアイ ELISAII （そば）を用いた。

2) DNA 抽出法

シリカモノリス法には、ジーエルサイエンス（株）製の MonoFas[®]食品中アレルギー検出用 DNA 抽出キット XIII の改良品を使用した。従来品は試料 0.2 g から DNA を抽出する仕様であったが、改良品では試料 2.0 g から抽出できるようカラムサイズを大きくした。キットには抽出試薬として Buffer A、B、C、D、E の 5 種類の Buffer と Proteinase K が付属している。DNA の精製には、（株）ニッポンジーン製エタ沈メイト、（株）QIAGEN 製 Nuclease-Free Water、和光純薬工業（株）製イソプロピルアルコール及びエタノール（分

¹⁾ジーエルサイエンス株式会社

表1 試料一覧

No.	試料名	種類	項目	ELISA定量値 ($\mu\text{g/g}$)	原材料表示
1	いか揚げ	魚肉練り製品	えび	11.5	- ^{a)}
2	さつま揚げ	魚肉練り製品	えび	>20	-
3	さつま揚げ(枝豆入り)	魚肉練り製品	えび	>20	-
4	焼きちくわ	魚肉練り製品	えび	13.4	-
5	いわしつみれ	魚肉練り製品	えび	14.1	-
6	いわしハンバーグ	魚肉練り製品	えび	16.5	-
7	いいだこ(中華和え)	そうざい	えび	6.8	-
8	魚肉ソーセージ	魚肉練り製品	えび	3.1	-
9	魚肉ソーセージ(無着色)	魚肉練り製品	えび	2.3	-
10	カワハギ珍味	水産珍味	えび	4.8	-
11	えびだし	調味料	えび	>20	○ ^{b)}
12	えび天ぷら	チルド食品	えび	>20	○
13	オマール海老のトマトソース	レトルトパウチ食品	えび	>20	○
14	えびそば	チルド食品	えび	>20	○
15	うどん	ゆでめん	そば	10.1	-
16	うどん	ゆでめん	そば	2.4	-
17	そば茶	ペットボトル飲料	そば	3.3	○
18	ゆでそば	ゆでめん	そば	>20	○
19	そば	乾めん	そば	>20	○
20	そばがゆ	レトルトパウチ食品	そば	>20	○
21	そばぼうろ	焼き菓子	そば	>20	○

a) - : 原材料表示なし

b) ○ : 原材料表示あり

子生物学用)を用いた。G-Tip法は、通知法に記載されている(株)QIAGEN製 Genomic-Tip 20/Gを使用した。

3) PCR法

プライマー対は、オリエンタル酵母工業(株)製アレルゲンチェッカー(植物共通、動物共通、そば)、(株)ファスマック製えび検出用プライマー対を用いた。また、PCR試薬には、ライフテクノロジーズジャパン(株)製 Ampliqa Gold[®] DNA Polymerase with Buffer II and MgCl₂、Gene Amp[®] dNTP Mixを用いた。制限酵素にはタカラバイオ(株)製 Hae IIIを用いた。

電気泳動には、タカラバイオ(株) AgaroseL03「TAKARA」、(株)ニッポンジーン製 5×TBEを用いた。DNAの染色には、インビトロジェン(株)製エチジウムブロミドを用いた。

3. 機器

冷却遠心機:ユニバーサル冷却遠心機 5922(クボタ(株)製)、プレートウォッシャー:ウェルウォッシュ AC(サーモエレクトロン製)又は、BIOWASHER 50/8(DS PHARMA BIOMEDICAL製)、プレートリーダー:マルチスキャン JX(サーモエレクトロン(株)製)、ホモジナイザー:ULTRA TURREX T25 basic(IKA(株)製)、サーマルサイクラー:Gene Atlas((株)アステック製)、恒温槽:ドライサーモバス ALB-221(イワキ(株)製)、分光光度計:BioSpec-mini(島津製作所(株)製)、電気泳動装置:Mupidex(アドバンス(株)製)、ゲルイメージ解析装置:FAS-III MODEL-TM2(東洋紡績(株)製)を用いた。

4. 方法

1) ELISA法

原材料に「えび」の表示がある市場流通食品については(株)マルハニチロ食品製甲殻類キット II「マ

ルハニチロ」を用いて甲殻類タンパク質濃度を測定し、「そば」の表示がある市場流通食品は(株)森永化学研究所製 FASPEK エライザ II (そば)を用いてそばタンパク質濃度を測定した。平成26年度から29年度の特定期間検査の検体は、通知法に基づき、甲殻類又はそばについてそれぞれ2種類のキットを用いてスクリーニング検査を実施した。

2) DNA抽出法

(1) シリカモノリス法

均一化した試料 2.0 g に Buffer A を 6 mL 添加し、3 分間ホモジナイザーを用いて混合した。Proteinase K を 40 μ L 添加し、65 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。Buffer B を 1 mL 添加し、7500 \times g で 10 分間遠心後、全ての上清を 1.5 mL の遠心チューブ数本に分注した。再度 20000 \times g で 5 分間遠心し、上清およそ 4 mL と Buffer C 4 mL を転倒混合し、混合液をシリカモノリススピニングカラムに負荷した。7500 \times g で 5 分間遠心し、溶出液を廃棄後、Buffer D 1 mL を添加し 7500 \times g で洗浄した。Buffer E 400 μ L を添加後、7500 \times g で 5 分間遠心し、DNA を溶出した。溶出液にエタ沈メイト 3 μ L 及びイソプロピルアルコール 280 μ L を加え、10000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上清を除き、70 %エタノール 1 mL を加え、10000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した。上清を除き、沈殿を乾燥させ、水 50 μ L で溶解した。DNA 濃度は通知に従って算出し、DNA 精製度は O.D.260/O.D.280 の吸光度比が 1.2-2.5 であるかどうかを確認した。

(2) G-Tip 法

操作は通知に従って実施した。DNA 濃度及び精製度はシリカモノリス法と同様に確認した。

3) PCR 法

PCR は通知に従って実施した。DNA 試料液は 20 ng/ μ L の濃度に調整し、20 ng/ μ L に満たない場合には抽出した DNA 試料原液をそのまま用いた。原材料表示に「えび」の記載がある検体については制限酵素処理を実施しなかった。電気泳動は TBE 緩衝液で作製した 3 %アガロースゲルを用いた。電気泳動後、10 mg/mL エチジウムブロミド溶液を加えた TBE 緩衝液で 20 分間染色し、TBE 緩衝液で 20 分間脱色した。紫外線 (312 nm) を照射し、増幅バンドを確認した。

結果及び考察

1. ELISA 定量

全 21 検体について、定量結果を表 1 に示した。検査項目えびについては、14 検体中スクリーニング検査陽性の基準値である 10 μ g/g 以上は 10 検体であった。そのうち、検量線範囲外となった 6 検体は

20 μ g/g 以上とした。10 μ g/g 未満は 4 検体で、最も低濃度の検体は No.9 魚肉ソーセージ(無着色)の 2.3 μ g/g であった。そばを含む食品 7 検体について、10 μ g/g 以上は 5 検体で、そのうち検量線範囲外となった 4 検体は 20 μ g/g 以上とした。10 μ g/g 未満は No.16 うどんの 2.4 μ g/g 及び No.17 そば茶の 3.3 μ g/g であった。

2. DNA 濃度及び精製度

抽出した DNA 濃度及び精製度について、えびを含む加工食品(検体 No.1~14)の結果を表 2 に、そばを含む加工食品(検体 No.15~21)の結果を表 3 に示した。

1) えびを含む加工食品

G-Tip 法では、抽出した 14 検体の DNA の濃度は、22.9 ng/ μ L から 1390.0 ng/ μ L の範囲であった。DNA 精製度はすべて 1.2-2.5 の範囲内であった。濃度について、PCR に適した 20 ng/ μ L 以上ではあるものの、検体 No.10、13 は他の検体に比べると低い濃度であった。検体 No.10 のカワハギ珍味は繊維がほぐれにくい状態で、抽出が不十分であったと推測された。検体 No.13 のオマール海老のトマトソースはレトルトパウチ食品であり、加熱加圧殺菌処理が施されている。レトルトパウチ食品は DNA の収量が低い³⁾という報告があり、その報告と一致する結果であった。

シリカモノリス法では、検体 No.10 を除く 13 検体の DNA 濃度範囲が 25.0 ng/ μ L から 337.3 ng/ μ L で、20 ng/ μ L 以上であることが確認できた。検体 No.10 は 5.6 ng/ μ L で 20 ng/ μ L に満たず、精製度についても、No.10 のみ条件を満たさなかった。検体 No.10 で十分な濃度の DNA が抽出できなかったのは、G-Tip 法と同様に、繊維によりホモジナイザーによる混合が困難で、抽出が不十分であったことが原因の一つと考えられた。検体 No.10 の ELISA 定量値は 4.8 μ g/g で基準の 10 μ g/g 以下であり、通常は確認検査の対象とはならない。今回、表示の義務がある 10 μ g/g 以上の検体では、シリカモノリス法を用いて確認検査に必要な濃度及び精製度の DNA を抽出することができた。

2) そばを含む加工食品

両抽出法とも、No.17 そば茶を除く 6 検体で、濃度、精製度とも通知の条件を満たす DNA が抽出できた。DNA 濃度範囲は、G-Tip 法及びシリカモノリス法それぞれ、129.6~1610.0 ng/ μ L 及び 82.4~455.2 ng/ μ L であった。どちらの抽出法も、No.20、21 のそばがゆとそばぼうろが他の検体に比べて低濃度であった。DNA 濃度について、焼成温度が高いほど抽出される DNA 濃度が減少するとの報告がある⁴⁾。そばがゆは高温高圧滅菌処理、そばぼうろ

表2 えびを含む加工食品のDNA濃度、精製度及びPCR結果

No.	試料名	G-Tip法				シリカモノリス法			
		DNA濃度 (ng/μL)	O.D.260/ O.D.280	PCR		DNA濃度 (ng/μL)	O.D.260/ O.D.280	PCR	
				動物 又は 植物	えび			動物 又は 植物	えび
1	いか揚げ	1390.0	1.9	+ ^{a)}	+	28.8	2.2	+	+
2	さつま揚げ	1090.0	1.9	+	+	36.7	2.2	+	+
3	さつま揚げ(枝豆入り)	942.1	1.9	+	+	65.7	2.0	+	+
4	焼きちくわ	657.8	1.9	+	+	34.7	2.2	+	+
5	いわしつみれ	702.8	1.9	+	+	31.3	2.3	+	+
6	いわしハンバーグ	1060.0	1.9	+	+	337.3	1.9	+	+
7	いいだこ(中華和え)	1240.0	1.9	+	+	63.9	2.1	+	+
8	魚肉ソーセージ	1200.0	1.9	+	+	135.1	2.0	+	+
9	魚肉ソーセージ(無着色)	499.9	1.9	+	+	68.1	2.0	+	+
10	カワハギ珍味	29.5	2.3	+	+	5.6	0.6	+	+
11	えびだし	93.3	2.1	- ^{b)}	-	139.4	1.7	+	+
12	えび天ぷら	651.7	1.9	+	-	72.0	2.1	+	-
13	オマール海老のトマトソース	22.9	2.3	+	+	25.0	2.5	+	+
14	えびそば	995.5	1.9	+	+	113.2	2.1	+	+

a) + : PCR増幅産物検出(植物:124 bp、動物:370-470 bp、えび:187 bp)

b) - : PCR増幅産物非検出

表3 そばを含む加工食品のDNA濃度、精製度及びPCR結果

No.	試料名	G-Tip法				シリカモノリス法			
		DNA濃度 (ng/μL)	O.D.260/ O.D.280	PCR		DNA濃度 (ng/μL)	O.D.260/ O.D.280	PCR	
				植物	そば			植物	そば
15	うどん	1190.0	1.9	+ ^{b)}	+	338.0	1.9	+	+
16	うどん	1060.0	1.9	+	+	455.2	1.9	+	+
17	そば茶	ND ^{a)}	ND	NT ^{c)}	NT	ND	ND	NT	NT
18	ゆでそば	1310.0	1.9	+	+	214.2	2.0	+	+
19	そば	1610.0	1.4	+	+	290.4	2.0	+	+
20	そばがゆ	176.7	2.0	+	+	82.4	2.1	+	+
21	そばぼうろ	129.6	2.0	+	+	85.3	1.8	+	+

a) ND : Not detected (紫外吸収スペクトルが認められず検出不能)

b) + : PCR増幅産物検出(植物:124 bp、そば:127 bp)

c) NT : Not tested (PCR実施せず)

はオープンでの高温加熱処理が影響していると考えられた。No.17 そば茶は、200-320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルが得られなかった。そばの実からお茶を抽出するまでの加工工程が多い⁵⁾上に、ペットボトルへ充填するための高温殺菌処理によって、どちらの方法でも DNA が抽出できなかつたと考えられた。そば茶は ELISA 定量で 3.3 μg/g とそばタンパク質の含有量が少ない。確認検査の対象となる 10 μg/g 以上の検体では、両抽出法とも検査可能な DNA を抽出することができた。

3. PCR による DNA 増幅結果

1) えびを含む加工食品

植物プライマー対又は動物プライマー対、及びえびプライマー対の PCR 結果について表 2 に示した。検体 No.10 のカワハギ珍味は、シリカモノリス法で DNA 濃度が 20 ng/μL 以下、精製度も範囲外であったが、PCR で増幅バンドを検出することができた。検体 No.11 えびだしは、G-Tip 法で抽出した DNA は条件を満たしていたにもかかわらず、植物プライマー対、動物プライマー対、えびプライマー対のいずれも増幅

バンドを検出できなかった。一方、シリカモノリス法では植物とえびの増幅バンドを検出することができた。えびだしの主成分であるエビパウダーは PCR 阻害作用を有することが報告されており⁹⁾、G-Tip 法では阻害物質が除去しきれなかった可能性が考えられた。検体 No.12 のえび天ぷらは、両抽出法とも植物プライマー対では増幅バンドが検出されたものの、えびプライマー対では検出されなかった。加熱加工食品では DNA の断片化により PCR 増幅産物が検出されない事例が報告されている⁴⁾⁷⁾。このえび天ぷらはチルド食品の乾燥天ぷらであり、揚げた後に乾燥冷却をしており、これらの工程により DNA が損傷し、検出できる量までえびの DNA が増幅できなかったと考えられた。その他の 12 検体は、両抽出法で目的の増幅バンドが検出された。

2) そばを含む加工食品

植物プライマー対及びそばプライマー対の PCR 結果について表 3 に示した。検体 No.17 のそば茶については、検査に適した DNA が抽出できなかったため、PCR を実施しなかった。残りの 6 検体は、両抽出法において、植物プライマー対及びそばプライマー対の増幅バンドが検出された。

まとめ

シリカモノリススピンカラムを用いた DNA 抽出法について、抽出に要する時間は G-Tip 法の 3 分の 1 であった。抽出した DNA については、えびを含む加工食品 14 検体中 13 検体で目的の DNA を検出することができ、G-Tip 法で対応困難なえびだしについても良好な結果が得られた。そばを含む加工食品では、7 検体中 6 検体でそば DNA が検出され、そば茶は G-Tip 法でもシリカモノリス法でも検出できなかった。シリカモノリス法は G-Tip 法と同等の結果が得られ、検査に要する時間も大幅に短縮できることから、特定原材料（えび及びそば）の確認検査における DNA 抽出法として有用であると考えられた。

謝辞

本研究を実施するにあたり御協力いただいたジーエルサイエンス株式会社に深謝する。

引用文献

- 1) 食品表示基準について 別添 アレルゲンを含む食品の検査方法, 消食表第 139 号, 平成 27 年 3 月 30 日
- 2) ジーエルサイエンス株式会社, DNA などの分離精製機構, WO2005/078088, 2005.8.25
- 3) 新家薫子, 清水隆二, 芹川俊彦, 安田和弘, 竹田正美, 大西道代: 特定原材料検査における DNA 抽出法の検討 (第 2 報) - 小麦・そば・落花生について -, 石川保健環境センター研究報告書, 48, 42-48 (2011)
- 4) 宮崎悦子, 川崎恵, 牟田朱美, 宮本道彦: 加熱加工食品における特定原材料(小麦)の遺伝子検査法の検討,

福岡市保健環境研究所報, 42, 121-124

(2017)

- 5) 後藤操, 川元達彦, 赤松成基, 竹中麻希子, 服部涼子, 稲田忠明: そば(特定原材料)検査における簡易迅速な DNA 抽出法の検討, 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 第 6 号, 32-37 (2015)
- 6) 田口大夢, 永富靖章, 菊池亮, 平尾宜司: 特定原材料えび・かきの PCR 確認検査法の適用性, 食品衛生学雑誌, 55, 1-12 (2014)
- 7) 橋本博之, 眞壁祐樹, 長谷川康行, 佐二木順子, 永田知子, 宮本文夫: 食物アレルギーを誘発する特定原材料(小麦)の検査法に関する検討, 千葉県衛生研究所年報, 54, 53-57 (2005)