



PCR による食物アレルギー検査法の開発、公定法化、市販キット化

ハウス食品グループ本社株式会社

はじめに

食物アレルギーは重要な社会課題の一つである。症状を誘発する抗原量は総タンパク質として数ppm (μg/g・mL) 濃度レベルとされ、患者がアナフィラキシーショックで死に至る危険性もある。1999年にCODEX規格に食物アレルギーに関する表示が記載されて以降、患者の健康危害発生防止の観点から日本や諸外国で食物アレルギー表示制度が施行されてきた。施行により患者・家族は加工食品中のアレルギーの種類を把握可能となり、過度に食の選択の幅を狭めることなく発症原因となるアレルギーを含まない食品を選択可能となった。適正な表示には、食品企業によるトレーサビリティ管理や自主検査による検証、都道府県によるモニタリング検査と製造記録の確認による表示の妥当性監視などが必要となり、検査法の整備が不可欠となる。ここでは、ハウス食品グループの食物アレルギーへの取り組みの一つ「PCRによる食物アレルギー検査法の開発・公定法化・市販キット化」と今後の展望を述べる。

1. ハウス食品グループの食物アレルギーへの取り組み

我々は、グループ理念「食を通じて人とつながり、笑顔ある暮らしを共に作るグッドパートナーをめざします。」のもと、食物アレルギーへの取り組みとして、患者に寄り添う「食物アレルギー配慮製品の製造・販売」、診療現場における必要最小限の原因食物の除去に基づく食事指導のための「加工食品のアレルギー含有量早見表を通じた医師への自社製品中のアレルギー量の情報提供」、原料・製品の安全性検証のための「アレルギー検査法開発」などを行なっている。検査法開発については、日本の表示制度施行前からPCRに着目した技術開発に着手して、自社だけでなく世の中で活用できる信頼性の高い検査法開発・公定法化・市販キット化を進めてきた。具体的には①日本で義務表示となる特定原材料8品目のうちPCR確認検査の対象全6品目「えび」「かに」「小麦」「そば」「落花生」「くるみ」の検査法を開発、②これら検査法が国のガイドライン記載の性能を有することを国立医薬品食品衛生研究所ならびに参画機関との多機関バリデーションにより検証、日本の公定法として消費者庁通知に記載(2009年 えび・かにPCR法、2023年小麦・そば・落花生・くるみリアルタイムPCR法)、③ライセンス先の株式会社ファスマックにてこれら検査法を市販キット化して世

の中で使用できるようにした。他にも推奨表示品目「キウイフルーツ」「もも」「りんご」のPCR法開発と市販キット化、現在は特定原材料に追加検討中の「カシューナッツ」の検査法開発を進めている。以下、我々のPCR検査法開発のキーとなる設計思想と判定技術を中心に解説する。

表1. 食物アレルギー検査法(公定法とハウス開発検査法)

特定原材料 (義務表示)	公定法		
	スクリーニング試験	確認試験	
	定量	定性	ハウス開発/市販キット
小麦 そば 落花生 えびかにくるみ	ELISA	PCR	えび、かに
		リアルタイムPCR	小麦、そば、落花生、くるみ
		PCR-核酸クロマト	-
卵*乳*		ウェスタンブロット	-

★: DNAでは鶏卵/鶏肉、牛乳/牛肉を区別できない

2. PCRによる食物アレルギー検査法の開発

2-1. 検査法の設計思想(PCR標的分子選定)

食物アレルギー検査法の標的分子として「発症原因となるアレルギータンパク質」や「それをコードするDNA配列」を選定する思想には納得性があり、受入れやすい。一方、発症原因となるタンパク質は一人の患者・一つの食品で種類だけとは限らず、患者により異なることも知られている。そこで我々はこれら標的分子にこだわらず、「アレルギーを誘発する食品に特徴的なDNA配列」=「その食品の存在を示すマーカー分子」という思想で、「系統分類に用いられており生物種広範に報告されている配列」かつ「マルチコピー配列」として知られる internal transcribed spacer (ITS) や 16S rRNA gene 領域の特徴的なDNA配列をPCR標的分子とした。これら領域の選定は、表示制度で求められる「特異性」と「感度」を満たすPCR検査法を開発する上でのキーとなる。例えば、確立した検査法の「特異性」は、検出対象とした生物種・その近縁種・各種食品マトリクスなど実試料での検証が必要である。一方で、それら全てを入手しての検証は現実不可能である。今回我々が標的分子とした系統分類に用いられる領域は、検出対象生物種(例: えび300属以上、かに40属以上、小麦の食用栽培種・古代種・交雑種など)だけでなく、それらの近縁野生種を含めた配列情報も報告されている。これら情報を検査法開発の初期段階から活用することで、表示対象の生物種に加えて、収穫時の近縁野

表2. PCRによる食物アレルギー検査法の標的DNA配列

特定原材料	PCR検出標的DNA配列	
	検出対象生物種のみで報告	様々な生物種で報告
えびかに	-	16S rRNA gene*
小麦	wheat LTP gene, LMW glutenin gene, triticin precursor gene	ITS*, trnL gene, 25S-18S rRNA gene IGR
そば	major allergenic protein gene	ITS*
落花生	Ara h2, h3 gene, peanut agglutinin precursor gene	ITS*
くるみ	Jug r2, r3, r4 gene	ITS*, rbcl-accD gene, matK gene, psbM-trnD gene

★: ハウス法

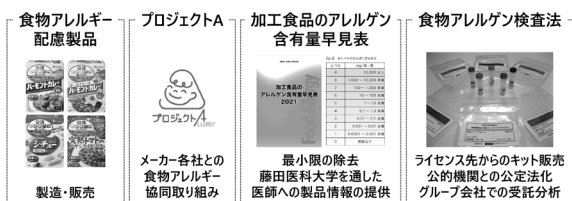


図1. ハウス食品グループの食物アレルギーへの取り組み

表3. 各種リアルタイム PCR の標的生物種

小麦 <i>Triticum</i> 属	そば <i>Fagopyrum</i> 属	落花生 <i>Arachis</i> 属	くるみ <i>Juglans</i> 属
<i>T. aestivum</i> 普通小麦*	<i>F. esculentum</i>	<i>A. hypogaea</i>	<i>J. regia</i>
<i>T. turgidum</i> リバット小麦*	普通そば*	落花生*	カシグルミなど*
<i>T. durum</i> デュラム小麦*	<i>F. tataricum</i>	他 <i>Arachis</i> 属	<i>J. nigra</i> クログルミ*
<i>T. aestivum-rye</i>	タツタンそば*		<i>J. mandshurica</i>
amphidiploid ライ小麦*	他 <i>Fagopyrum</i> 属	他 <i>Arachis</i> 属	<i>J. ailanthifolia</i>
<i>T. monococcum</i> 一粒小麦			他 <i>Juglans</i> 属
他 <i>Triticum</i> 属	近縁種 <i>Fallopia</i> 属	近縁種 <i>Carya</i> 属	
近縁種 <i>Aegilops</i> 属、他	<i>F. convovulus</i>	<i>C. illinoensis</i> ベカン*	
<i>A. speltoides</i> グザビ小麦	ソバカスラ	<i>C. cathayensis</i> 山核桃*	
<i>A. squarrosa</i> タルホ小麦			
他 <i>Aegilops</i> 属			
大麦* ライ麦* エン麦*	★: 食用栽培種 他: 野生種・古代種 [---]: PCR標的		

生種の混入リスクも踏まえて設定した検出対象とすべき生物種に柔軟に対応したPCRプライマー設計が可能となる。また「感度」には標的配列のコピー数が影響する。今回マルチコピー配列をPCR標的分子としたことで、アレルゲンタンパク質をコードするDNA配列を標的分子とした場合と比べて10~100倍高感度となった。これにより、例えば従来の小麦PCR検査法で検出困難な、加圧加熱処理を経た「レトルト食品中の10ppmタンパク質濃度(表示基準閾値)の小麦」を検出可能となった。

2-2. リアルタイム PCR の判定技術 (基準プラスミド開発)

リアルタイム PCR は遺伝子組換え作物検査法などで採用されているが、装置特性の違いにより「使用できるリアルタイム PCR 装置の機種は限定」されていた。また10ppm未満に相当するPCRサイクル後半で稀に観察される「検査環境などに存在するアレルゲン由来の微弱な増幅シグナル」が結果判定を困難にしていた。これら課題の解決のため、我々は試料の陽性/陰性を明確に判定する基準を開発し、小麦・そば・落花生・くるみリアルタイム PCR に採用した。具体的には、PCR標的分子としたDNA配列を含むプラスミドを作製、加圧加熱モデル食品中の10ppm相当量のアレルゲンを確実に陽性と判定する基準プラスミド量が50コピー/反応液となることを検証、同時測定した「試料DNA 50ng」と「基準プラスミド 50コピー」のCq値(quantification cycle)を比較して試料の陽性/陰性を判定した。これにより、リアルタイム PCR 装置の機種を限定することなく、微弱な増幅シグナルを陰性と判定した上で明確な結果を得ることのできる、実用的な検査が可能となった。

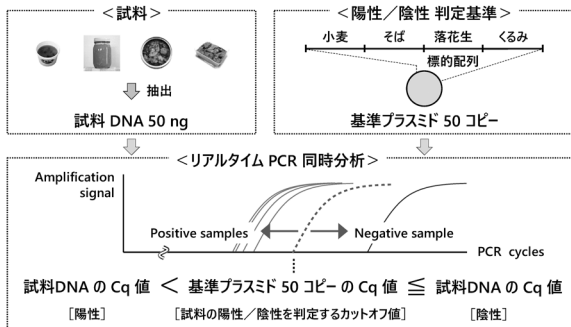


図2. 基準プラスミドを用いたリアルタイム PCR 判定

おわりに

我々は「特異性と感度を確保するためのPCR検査法の設計思想」、「実用的検査法とするための基準プラスミドを用いたリアルタイムPCR判定技術」により、食物アレルゲン検査法の

開発を進めてきた。開発した検査法は多機関バリデーションにより消費者庁「食品表示基準について—アレルゲンを含む食品の検査方法—別添4 アレルゲンを含む食品を評価するガイドライン」に記載の性能を有することを確認して、公定法化した。また、市販キット化により検査用試薬の品質安定化を図り、広く世の中で使える技術とした。我々の技術が、えび・かにを区別した表示や2023年3月のくるみ表示の法制化、食物アレルゲン検査の公定法へのリアルタイムPCR導入など、日本の食物アレルギー表示制度と公定法の進展の一助となり、患者・家族の食の選択の幅を広げることに繋がるものと信じている。

表示制度施行から20年以上が経過した現在、臨床における食事指導もアレルゲンの完全除去(食べない)から必要最小限の除去(食べられる量は食べる)へと変遷している。医師や患者・家族が求める情報も、アレルゲンの有無から含有量へと変わることも想定される。事実、医師向け「加工食品中のアレルゲン含有量早見表」ではppmから%レベルの測定値が求められており、今後も世の中の変化に対応した技術開発を進めたい。

(引用文献)

- Hirao T., Imai S., Sawada H., Shiomi N., Hachimura S., Kato H. PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 724-731 (2005).
- Hirao T., Hiramoto M., Imai S., Kato H. A novel PCR method for quantification of buckwheat by using a unique internal standard material. *J. Food Prot.*, 69, 2478-2486 (2006)
- Taguchi H., Watanabe S., Hirao T., Akiyama H., Sakai S., Watanabe T., Matsuda R., Urisu A., Maitani T. Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 1649-1655 (2007)
- Hirao T., Watanabe S., Temmei Y., Hiramoto M., Kato H. Qualitative PCR methods for detecting major food allergens (peanut, soybean, and wheat) by using internal transcribed spacer region. *J. AOAC Int.*, 92, 1464-71 (2009)
- Taguchi H., Watanabe S., Temmei Y., Hirao T., Akiyama H., Sakai S., Adachi R., Sakata K., Urisu A., Teshima R. Differential detection of shrimp and crab for the food labeling using polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3510-3519 (2011)
- Watanabe S., Taguchi H., Temmei Y., Hirao T., Akiyama H., Sakai S., Adachi R., Urisu A., Teshima R. Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 2108-2115 (2012)
- 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)
- Miyazaki A., Watanabe S., Ogata K., Nagatomi Y., Kokutani R., Minegishi Y., Tamehiro N., Sakai S., Adachi R., Hirao T. Real-time PCR detection methods for food allergens (wheat, buckwheat, and peanuts) using reference plasmids. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 5680-5686 (2019)
- 宮崎明子, 田口大夢, 渡辺聡, 緒方京子, 永富靖章, 上田涼太, 清水賢, 平尾宜司 小麦・そば・落花生の定性リアルタイムPCR検査法に関する適用性評価. *食品衛生学雑誌*, 64, 34-46 (2023)
- 平尾宜司 PCRによるアレルギー原因食品の検出技術. *化学と生物*, 47, 853-860 (2009)
- 田口大夢, 永富靖章 特定原材料「えび」「かに」のPCR確認試験法. *食品衛生学雑誌*, 52, J349-J354 (2011)

謝辞 本賞にご推薦いただきました女子栄養大学 加藤久典先生, 検査法開発・多機関バリデーション・公定法化・キット化でご指導・共創いただいた皆様方に心より感謝いたします。