

マイクロチップ電気泳動法を用いた特定原材料の確認検査法の開発

野村千枝* 梶村計志*

アレルギー物質を含む食品の検査法は、「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(通知法)に示されている。検査ではスクリーニング法として定量検査法(ELISA法)、確認法として定性検査法(ウェスタンブロット法、定性PCR法)が用いられる。通知法ではPCRの増幅物の確認法としてアガロースゲル電気泳動法が示されているが、明確なバンドが確認できず判定が困難な事例があった。そこで今回、定性PCR法による増幅物の確認法の一つとして、マイクロチップ電気泳動法を用いて検討したところ良好な結果が得られたので報告する。

キーワード: PCR、マイクロチップ電気泳動法、特定原材料、えび、かに

key words: polymerase chain reaction, microchip electrophoresis, specific raw materials, shrimp, crab

食物アレルギーによる健康被害の発生を防止する観点から現在「卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに」の7品目が重篤度・症例数により特定原材料として定められ、加工食品に対して表示が義務付けられ、表示義務品目に準ずる20品目については表示が推奨されている¹⁾。

アレルギー物質を含む食品の検査法は、「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(通知法)において示されている²⁾。検査ではスクリーニング法としてELISA法を用い、確認検査法として、小麦、そば、落花生、えび、かにの5種類については定性PCR法を用い確認する。通知法では定性PCR法の増幅物の確認法としてアガロースゲル電気泳動法が示されているが、明確なバンドが確認できず判定が困難な事例があった。

マイクロチップ電気泳動法は操作が簡便で、高感度であり、分解能も高く、再現性の高いデータが得られるという特徴がある。本研究では、定性PCR法の増幅物の確認法の一つとして、マイクロチップ電気泳動法が採用可能であるか検証するため、通知法で示された従来のアガロース電気泳動法とマイクロチップ電気泳動法を用いて検出感度の比較を行い、さらに実試料を

用いた検討を実施した。

方法

1. 試料

大阪府内流通の市販加工食品(魚肉練り製品)を用いた。

2. 試薬等

2.1 定量検査法(ELISA法)

アレルゲン検出キット: 甲殻類キット「マルハ」(マルハニチロ(株))、FAテスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬(株))

2.2 確認検査法

食品中アレルゲン検出用PCRプライマーキット(プライマー対および陽性コントロールプラスミド): アレルゲンチェッカー「小麦」「そば」「落花生」「動物共通」「植物共通」(オリエンタル酵母(株))

プライマー対(えび、かに検出用): ライフテクノロジーズジャパン(株)

プラスミド: 甲殻類検出用陽性コントロールプラスミド(ファスマック(株))

PCR反応試薬: AmpliTaq Gold DNA Polymerase & 10× PCR Buffer II/MgCl₂ with dNTPs (アプライドバイオシステムズ(ABI)社)、制限酵素 *Hae* III (タカラバイオ(株))

*大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課
Detection of Allergenic Substances in Foods by
Microchip Electrophoresis
by Chie NOMURA and Keiji KAJIMURA

電気泳動用ゲル：NuSieve 3:1 Agarose（ロンザ社）
 マイクロチップ電気泳動用キット：DNA-500またはDNA-1000（島津製作所）
 その他試薬は、試薬特級または生化学用を使用した。

3. 装置および測定条件

PCR 増幅装置：ABI 社製 Verti200
 マイクロチップ電気泳動装置：MC-202 MultiNa（島津製作所、分析モード：オンチップモード）

4. 感度の比較方法

陽性コントロールプラスミドとプライマーを用いて通知法に従い PCR 増幅反応を行った。得られた PCR 増幅反応液を TE 緩衝液で希釈した (2, 5, 10, 20, 50, 100 倍)。PCR 増幅反応液の原液及び希釈液の 5 μ L をゲル電気泳動法に、5 μ L をマイクロチップ電気泳動法に供し、バンドがどの希釈倍率まで判別可能か目視により確認し感度を比較した。

結果および考察

1. 感度の比較

増幅サイズが小さく (62bp)、PCR 増幅物の確認が難しい「かに」について、ゲル電気泳動法およびマイクロチップ電気泳動法を用いて PCR 増幅物の確認を

行ったところ、ゲル電気泳動法では、PCR 増幅物のバンドを明確に認めることができなかった。一方、マイクロチップ電気泳動法では、明確にバンドを確認することが可能であった (図 1)。さらに表示義務品目 5 品目について、陽性コントロールプラスミドを 1~100 倍に希釈してゲル電気泳動法およびマイクロチップ電気泳動法により確認を行ったところ、マイクロチップ電気泳動法は、すべての品目においてゲル電気泳動法に比べて高感度に確認することが可能であった (表 1)。図 2 にマイクロチップ電気泳動法における代表的なゲルイメージを示す。図 1 では DNA-1000 キットを用いたが、図 2 では低分子の分析により適した DNA-500

表 1. PCR 増幅物を目視で確認可能な最高希釈倍率

	増幅バンド長 (bp)	4%アガロースゲル電気泳動	マイクロチップ電気泳動
植物	124	×5	×20
小麦	141	×5	×20
そば	127	×5	×20
落花生	95	×5	×10
動物	370-470	×1	×5
かに	62	×1	×5
えび	187	×1	×10
酵素処理えび	149	×1	×5

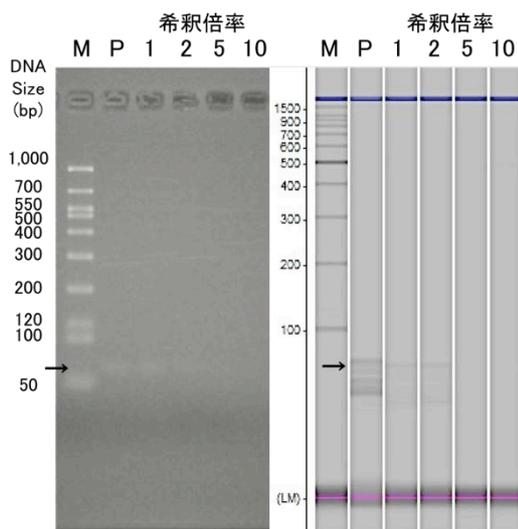


図 1. かに陽性コントロールプラスミドを用いたゲル電気泳動法 (左) とマイクロチップ電気泳動法 (右) の比較
 増幅バンド長：かに 62bp、P：陽性コントロール、M: サイズマーカー

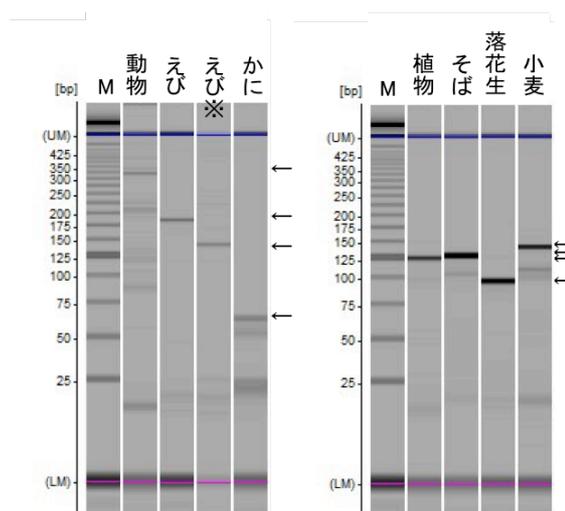


図 2. 陽性コントロールプラスミドを用いたマイクロチップ電気泳動結果 (ゲルイメージ)
 増幅バンド長：動物 370-470bp、えび 187bp、※酵素処理えび 149bp、かに 62bp、植物 124bp、そば 127bp、小麦 141bp、落花生 95bp、M: サイズマーカー

キットを用いた。

2. 実試料の測定結果

えびを含む試料（魚肉練り製品、ELISA 定量値 マルハ：12.2ppm、ニッスイ：7.6ppm）から通知法に従って得られた PCR 増幅反応液をマイクロチップ電気泳動法で分析したところ、動物、植物、えび、酵素処理えびそれぞれに由来する PCR 増幅物を明確に確認することが可能であった。図3にエレクトロフェログラム、図4にゲルイメージを示す。

まとめ

マイクロチップ電気泳動法はゲル電気泳動法に比べ、2~10倍高感度であった。また分子サイズの小さいバンドも検出可能であった。さらに、えびを含む実試料を用いて検討したところ、明確に確認可能であった。

マイクロチップ電気泳動法は操作が簡便で、高感度であり、分解能も高く、再現性の高いデータが得られるという特徴がある。また、最大96試料を約2時間で自動分析が可能であることから、多検体を処理する場合はマイクロチップ電気泳動法を検査に活用することが有効と考えられた。

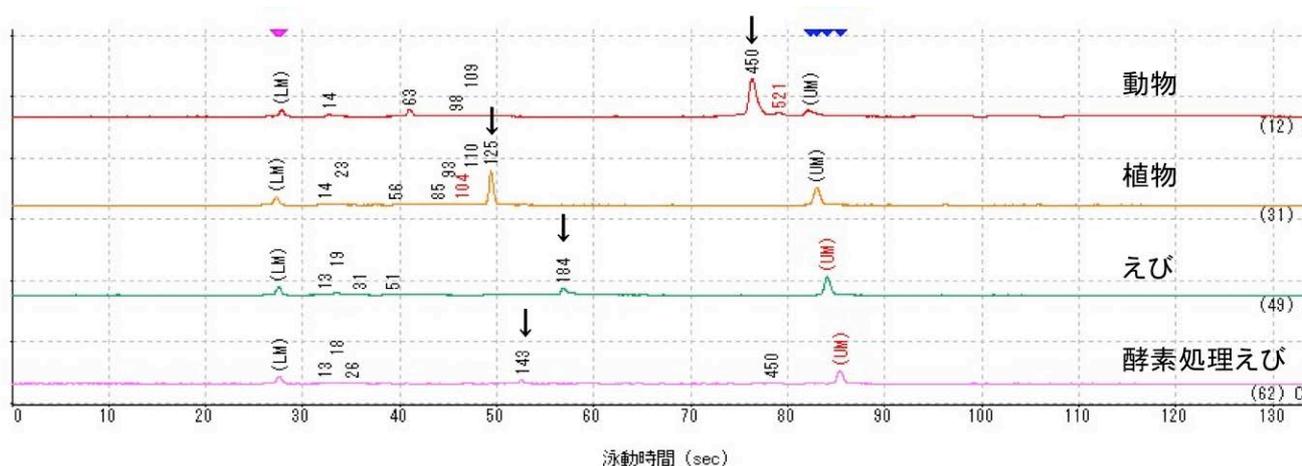


図3. えびを含む試料より得られた PCR 増幅物のマイクロチップ電気泳動結果 (エレクトロフェログラム)
増幅バンド長：動物 370-470bp、植物 124bp、えび 187bp、※酵素処理えび 149bp、M：サイズマーカー

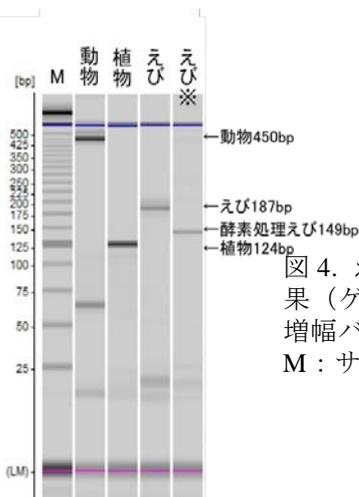


図4. えびを含む試料より得られた PCR 増幅物のマイクロチップ電気泳動結果 (ゲルイメージ)
増幅バンド長：動物 370-470bp、植物 124bp、えび 187bp、※酵素処理えび 149bp、M：サイズマーカー

文献

- 1) 平成 25 年 9 月 20 日付付け消食表第 257 号消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」別添 1「アレルギー物質を含む食品に関する表示指導要領」
- 2) 平成 22 年 9 月 10 日消食表第 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」（最終改正平成 26 年 3 月 26 日消食表第 36 号）