

蛍光マイクロプレートリーダーを用いた 食品中アレルゲン定量分析の検討

吉野 功

Allergen quantitative analysis in the food by
using a fluorescence micro plate reader.

Isao YOSHINO

食品中のアレルゲン分析について蛍光マイクロプレートリーダーを用いた定量分析を検討した。エライザ法による市販のキットについて、抗体プレートの保存性を検証したところ開封後に感度低下は見られるもののアレルゲン定量には支障がなかった。こんにゃくを用いたアレルゲンタンパク質の添加回収試験を行ったところ、卵タンパク質の回収率が低かったが、加工によるタンパク質変性の影響が大きく、こんにゃくによる吸着の影響は少ないと推察された。

キーワード：アレルゲン、エライザ法、こんにゃく

Quantitative analysis using a fluorescence micro plate reader was considered about an allergen analysis in the food. The storage stability of the antibody plate was verified using a commercially available ELISA kit. Sensitivity decreased after opening, but allergen quantification was not affected. An addition collection test of allergen protein using konjac was performed. Egg protein recovery was low, but the cause was protein denaturation due to processing. It was assumed that the effect of adsorption by konjac was small.

Keywords: Allergen, ELISA, konjac

1 はじめに

食品中のアレルゲンはヒトの免疫機能に過剰反応（アレルギー反応）を引き起こし、時には重篤な症状を発生させる。数 $\mu\text{g/g}$ 程度の微量の混入でも症状を引き起こす可能性があるため、加工原料からの持ち込みや、製造器具からの混入も問題となっている。そこで、平成 13 年から食品衛生法により、アレルギー物質を含む食品の表示制度が導入され、特に卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かには特定原材料として表示が義務付けられている。

消費者庁の通知¹⁾には食品から特定原材料を検知する方法について、スクリーニング検査としてエライザ法が記載されている。

バイオ・微生物係

エライザ法とは抗原抗体反応を利用して定量する手法で、高感度、高特異性、多検体測定等のメリットがある。具体的にはマイクロプレートに固定化した特定のタンパク質に反応する抗原に酵素を標識した抗体ではさみこみ、酵素基質を加えたときの発色強度を測定する（図 1）。

群馬産業技術センターでは、これまで県内企業から測定の要望があったが、アレルゲン検査については依頼試験対応していなかった。その理由は、エライザ法で用いられる分析キットの試薬代が約 8 万円と高いだけでなく、有効期間が 1 年間と短い点である。さらには一つのキットに対して、一つのアレルゲン物質しか対応できないという点も依頼試験項目化を難しくしている。

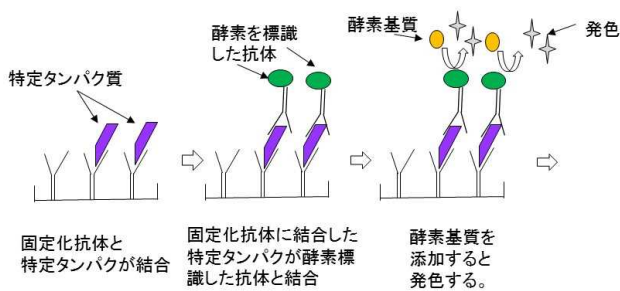


図 1 エライザ法の原理

しかしながら昨今の食の安全性への意識の高まりを鑑み、当センターでもアレルギー検査の依頼試験化は可能か調べることにした。まず、当センターが保有するマイクロプレートリーダーを用いてアレルギー検査可能か確認を行った。さらにコストダウンが可能か、開封保存後の抗体プレート利用による精度の検証を行った。また県特産物のこんにやくはアレルギーフリー食品開発素材としての利用が期待されるが、増粘性によるアレルギー回収率の低下の可能性について検証した報告事例はない。そこで分析の妥当性を検討するため併せて試験したので報告する。

2 実験方法

2.1 供試試薬と装置

エライザ法のアレルギー分析キットは FASPEK ELISA II 小麦、卵（(株)森永生科学研究所）を用いた。検量線作成用の標準タンパク質はキット付属のものを用いた。固相化プレートは、パック開封直後と、パック開封 1 ヶ月後のものを用いた。

他分析機関で定量値を検証された標準物質として、QC マテリアル小麦（(株)森永生科学研究所）（微量の小麦に酒粕粉末を混ぜたもの）を用いた。

発光強度の測定は、蛍光マイクロプレートリーダー パワースキャン HT（DS ファーマバイオメディカル）（写真 1）を用い、450nm から 620nm の吸光度の差（Delta）を定量計算に用いた。

2.2 アレルギーモデル食品の調製



写真 1 蛍光マイクロプレートリーダー

食品のミキサーによる均質化

特定タンパク質の抽出

抽出試料液、標準液の希釈

抗体固相化プレートに試験液を分注

酵素標識抗体の分注

酵素基質溶液の分注

20分遮光反応

反応停止液の分注

吸光度の測定

図 2 アレルギー分析プロトコル

こんにやく精粉（小林新次郎商店）25g に、アレルギー（小麦胚芽 200mg もしくは乾燥全卵 100mg：特定タンパク質）を懸濁させた蒸留水 800mL を加え、練り 1 時間放置後、100mL に 1g の水酸化カルシウム（関東化学試薬 1 級）を懸濁させた液を加えてさらに練りレトルト袋に詰め、沸騰水で 30 分加熱し、アレルギータンパク質添加モデルこんにやく（概ね特定タンパク質として 10 μ g/g 含有）とした。

2.3 分析方法

分析プロトコルを図 2 に示す。アレルギー

ン添加モデルこんにやくについてはミルミキサーで均質化処理を行った。アレルゲン分析試料1gに分析キットの検体抽出液19mLを加え、振とう機で一晩抽出した。抽出後のpHはこんにやくでも中性付近だったため、pH調整は行わなかった。3000rpm、20分の遠心分離の上清をキットの検体希釈液で20倍希釈し、測定溶液とした。検量線用の標準溶液は50,25,12.5,6.25,3.13,1.56,0.78,0ng/mLとなるよう特定タンパク質溶液を適宜希釈した。抗体固相化プレートに100μL分注し、1時間室温で静置反応後、溶液を除去洗浄した。酵素標識抗体溶液100μLを分注し、30分静置反応後、溶液を除去洗浄した。酵素基質溶液を100μL分注し、20分遮光下で静置反応後、反応停止液を100μL分注し、蛍光マイクロプレートリーダーで450nm、620nmの吸光度を測定しDeltaを計算した。測定は2連で行った。

3 結果と考察

3.1 標準の相関と精度

小麦アレルゲン標準液による検量線を図3に示す。0.31μg/g~20μg/g（試料溶液として0.78ng/mL~50ng/mL）の範囲において、高い相関係数（ $R^2=1$ ）（4-パラメーター $Y=(A \cdot D)/(1+(X/C)^B)+D$ による）が得られた。保存袋開封直後と開封1ヶ月後の抗体プレートの発光強度を比較したところ、最大で85%の感度低下が見られたが、相関や、2連のばらつきについては問題が無かった。検証用標準物質による同一試料の定量値測定のばらつき幅は10%以内に抑えられており、開封後しばらくの使用は問題ないと考えられた。

3.2 アレルゲン添加回収試験

モデル食品として、こんにやくの練り水に微量のタンパク質を混入させて作成したこんにやくからの回収試験をタンパク質源として小麦胚芽粉末および乾燥全卵を用いて行った（図4）。無添加のこんにやくからは、アレルゲンは検出されず偽陽性反応も見られなかった。小麦ではタンパク質添加原料水に対して84%の回収率だったが、卵では45%の回収率であった。低い回収

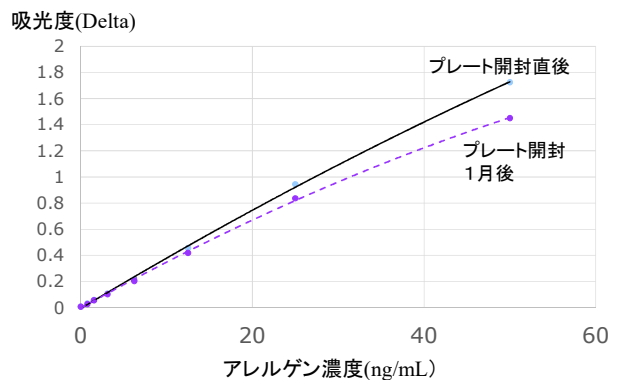


図3 小麦タンパク質の標準曲線

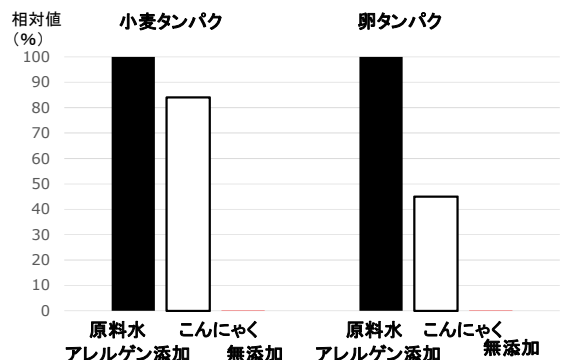


図4 アレルゲン添加回収試験

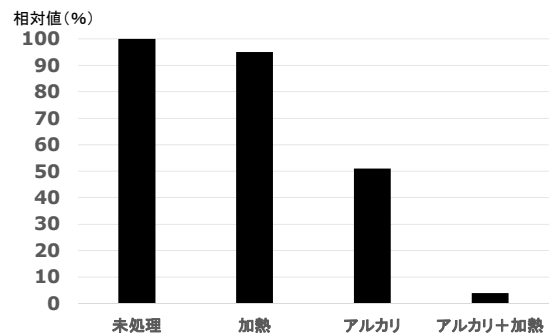


図5 加工による卵タンパク質回収率の変化

率の原因を検証するため、卵タンパク質液にこんにやく製造と同様の条件で、加熱およびアルカリ処理しアレルゲン定量分析を行った（図5）。加熱では回収率が95%までの低下にとどまったのに対しアルカリ処理では51%に低下し、アルカリ処理後の加熱によってさらに低下が促進されていた。このため、モデルこんにやく中の回収率の低下は、増粘性による抽出の妨害ではなくタンパク質変性が由来とも考えられた。

4 まとめ

アレルゲン定量キット（エライザ法）の

特定タンパク質標準液による検量線について、小麦の測定を行ったところ、高い相関が得られた。開封1ヶ月後の抗体プレートでは感度の低下が見られたものの、定量性には問題がなかった。小麦、卵を添加したこんにゃくを作成し、アレルゲンの回収試験を行ったところ、小麦タンパク質に比べ、卵タンパク質の回収率が低かった。アルカリ、熱による卵の回収率の変化を調べたところ、アルカリによるタンパク質回収率の低下が大きく、加工によるタンパク質変性が、回収率に大きく影響していると考えられた。

文 献

- 1) 消費者庁通知：消食表第286号
(2010)