

研究課題名	プロアントシアニジンを含む食品からの小麦タンパク質の検査法の改良
フリガナ	ムラカミ タロウ
代表者名	村上 太郎
所属機関（機関名） （役職名）	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所衛生化学部 主任研究員
本助成金による発表論文，学会発表	<p>[学会発表]</p> <p>DMAC 法による加工食品中の総プロアントシアニジンの定量 日本食品化学学会第 22 回 総会・学術大会，高知市（2016.6.2-3）</p> <p>アレルギー物質検査を含む食品検査における PVP 共存抽出法の適用性評価 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会，函館市(2016.10.27-28)</p> <p>PVP 共存抽出法のアレルギー物質を含む食品検査への応用 日本食品衛生学会近畿地区勉強会，大阪市(2016.11.2)</p> <p>チョコレートに含まれるアレルギー物質（小麦・乳）の実態調査 日本食品化学学会第 23 回 総会・学術大会，伊勢市（2017.6.1-2）</p> <p>[発表論文]</p> <p>改良した検査法の結果をまとめ、現在 Food Control 誌で査読中。</p>

研究結果要約

我々は ELISA 法によるスクリーニング検査における小麦タンパク質の検出率の向上のために、検査法の改良に取り組んできた。これまでに原材料中の夾雑物が検査に及ぼす影響を評価した結果、イチゴなどの果実や落花生、カカオなどのプロアントシアニジンを含有する原材料によって、回収率の低下などの測定阻害が確認された。このため、プロアントシアニジンと結合性のある Polyvinylpyrrolidone (PVP) を抽出時に添加することにより、測定阻害を軽減できることを見出した。本研究では、プロアントシアニジンに対する PVP の共存条件の最適化を行い、より信頼性の高い小麦タンパク質のスクリーニング検査法を確立した。改良法が小麦以外の特定原材料（乳、卵、そば、落花生、えび・かに）の検査に適用可能か確認するために、アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドラインを元に同等性を評価し、改良法は小麦以外の特定原材料の検査にも適用できることを確認した。改良法を市販加工食品中の小麦タンパク質の混入実態の調査に応用し、小麦タンパク質の混入について検出率を向上に繋がることを確認した。今後も加工食品

に混入した小麦が原因となるアレルギーによる健康被害を未然に防止するために、広範囲の食品を対象として小麦タンパク質の混入実態とその表示について引き続き検証を行っていききたい。

研究目的

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質の検査は、消費者庁による通知（消食表第 139 号）によって、Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法による測定がスクリーニング法として利用されている¹⁾。ELISA では検査対象となるタンパク質に対する抗体の特異性を利用し、多くの原材料との交差性の有無が確認されているため、一般的には信頼性が高い。しかしながら、加工食品中の原材料中の夾雑物が測定に与える影響についての報告は国内外ともに少ない。

これまでに我々は多種多様な加工食品を対象として、ELISA 法による測定に影響を及ぼす原材料の探索を行ってきた。小麦タンパク質の測定時には、イチゴ、ブルーベリー、ラズベリー、プラム、落花生、カカオなどの種々の原材料によって阻害を受けることを確認した。これらの原材料によって測定が阻害された場合には、検査での偽陰性を引き起こす可能性がある。

このため、我々はスクリーニング検査における小麦タンパク質の検出率の向上のために、検査法の改良に取り組んできた。測定阻害が確認された原材料には、エピカテキンを主な基本骨格とするポリフェノール重合体のプロアントシアニジンが含まれていたため、プロアントシアニジンと結合性のある Polyvinylpyrrolidone (PVP) を抽出時に共存させることにより、測定阻害を軽減できることを見出した。

本研究では改良した検査法の実用化のために、プロアントシアニジンに対する PVP の共存条件の最適化を行い、より信頼性の高い小麦タンパク質のスクリーニング検査法を確立することを目的とした。

研究計画及び研究手法

<実施内容及び方法>

3.1. 試料・試薬

高濃度のプロアントシアニジンを含む原材料として、カカオ、シナモン、凍結乾燥品（ビルベリー、ブドウ種子抽出物、落花生種皮）を入手し、阻害機序の解析用の試料とした。原材料にプロアントシアニジンを含む加工食品（合計 65 試料）を購入後、フードプロセッサーによって均質化したものを小麦タンパク質の混入実態の調査用の試料とした。小麦タンパク質の測定には森永生科学研究所製の FASPEK II と日本ハム中央研究所製の FASTKIT Ver.III の 2 種類のキットを使用した。PVP K25 と K30 は和光純薬より入手した。Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) は SIGMA より入手した。その他の試薬は東京化成工業より入手した。

3.2. プロアントシアニジンによる阻害機序の解析

これまでに測定阻害が確認された原材料から、Payne MJ らの方法に従ってプロアントシアニジンを抽出し、4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) 法によって測定した²⁾。抽出したプロアントシアニジンを段階希釈し、測定阻害に対するプロアントシアニジン量の用量相関性を解析し、測定への影響の大きい原材料を解析した。

3.3. PVP 共存抽出法の抽出条件の最適化

測定阻害が確認された原材料の中でカカオおよびシナモンを含む食品に小麦タンパク質を 5 µg/g 添加し、抽出時に重合度の異なる PVP (K15、K25、K30、K60、K90) を 1% (w/v) 共存させて評価を行った。また、PVP の単量体である N-Vinylpyrrolidone (NVP) と不溶性ポリマーの PVPP についても同様に評価を行った。小麦タンパク質の添加濃度に対する回収率を評価し、プロアントシアニジンに対する結合能が高い PVP の重合度と共存濃度を評価した。

3.4. 改良法の妥当性評価

アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン¹⁾を元に、PVP 共存抽出法の同等性を評価した。通知法に示されている標準品規格²⁾に基づいて、卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類（えび・かに）の 6 項目の標準品を調製し、添加回収試験に使用した。検査対象とする特定原材料を含有しない加工食品に標準品を一定量添加し、従来法と改良法でそれぞれ抽出を行った。抽出液は適宜希釈後、FASPEK II と FASTKIT Ver. III によって測定した。

3.5. 市販加工食品中の小麦タンパク質の混入実態の調査

検査法の妥当性の確認後、改良法を市販加工食品中の小麦タンパク質の混入実態の調査に応用した。従来の抽出法では、プロアントシアニジンによる測定阻害によって、小麦タンパク質が十分に検出できていない可能性があるため、改良法による調査によって、小麦タンパク質の混入とその表示についての実態調査を行った。

結果と考察

4.1. プロアントシアニジンによる阻害機序の解析

本研究ではプロアントシアニジンと特異的な結合により発色する DMAC を利用した定量法についての分析条件を最適化した。分析条件の最適化により、種実、香辛料、カカオなどの広範囲の食品を対象としたプロアントシアニジンの定量法を確立できたため、高濃度のプロアントシアニジンを含む原材料として、カカオ、シナモン、凍結乾燥品（ビルベリー、ブドウ種子抽出物、落花生種皮）

を入手し、各原材料からプロアントシアニジン抽出した。DMAC 法によって抽出液中のプロアントシアニジンの濃度を測定後、抽出液を段階希釈して ELISA の測定阻害に対するプロアントシアニジン量の用量相関性を解析し、測定への影響の大きい原材料を解析した。各原材料の反応阻害曲線から IC50 (50%阻害濃度) を算出した結果、カカオ、ビルベリー、ブドウ種子抽出物に含まれるプロアントシアニジンと比較して、シナモンと落花生種皮に含まれるプロアントシアニジンの IC50 は 10 倍以上低いことが確認された。

プロアントシアニジンはカテキンやエピカテキンなどのフラバノールを基本骨格とするポリフェノールの重合体であり、果実類、種実類、豆類、穀類、香辛料などの食品中に広く分布している。プロアントシアニジンは植物種によって基本骨格や重合度が異なることが報告されており、主要なプロアントシアニジンのフラバノール間の結合は、C 環の 4 位の水酸基と A 環の 8 位が縮合した B タイプのプロアントシアニジンである (図 1B) ³⁾。一方で、落花生、シナモン、クランベリーなどの一部の植物では、フラバノール間の結合に加えて、A 環の水酸基が C 環の 2 位に結合したエーテル結合を含む A タイプのプロアントシアニジン (図 1A) が報告されている ³⁾。プロアントシアニジンの構造や重合度の違いによって小麦グリアジンとの結合能は異なることが報告されているため、A タイプのプロアントシアニジンを含むシナモンと落花生種皮では IC50 が低くなったと推定される。

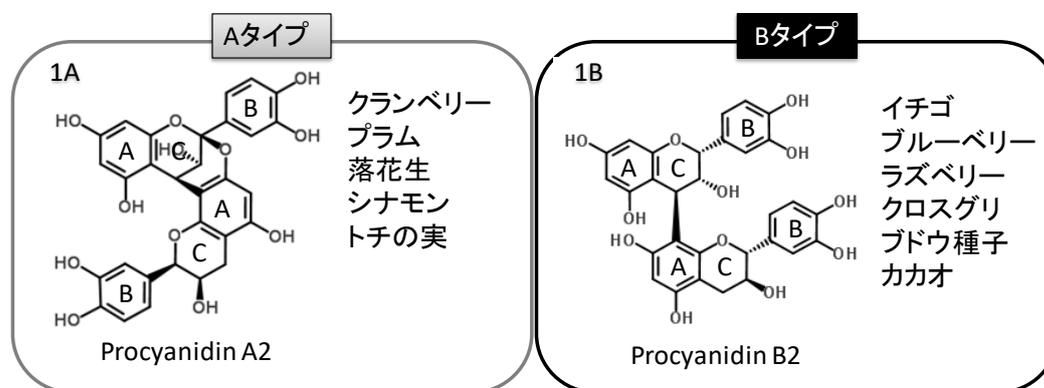


図1 食品に含まれるプロアントシアニジンの基本骨格

4.2. PVP 共存抽出法の抽出条件の最適化

測定阻害が確認された原材料の中でカカオとシナモンを含む食品にそれぞれ小麦タンパク質を 5 μg/g 添加し、抽出時に重合度の異なる PVP (K15、K25、K30、K60、K90) を 1% (w/v) 共存させて評価を行った。また、PVP の単量体である NVP と不溶性のポリマーである PVPP についても評価を行った。

図 2 に示すように、NVP はいずれの原材料のプロアントシアニジンによる阻害に対して効果が確認されなかった。高重合度のポリマーと比較して分子量の小さい単量体ではプロアントシアニジン

に対する結合能が弱いことが報告されているため⁴⁾、NVP では効果が確認されなかったと考える。一方で、不溶性のPVPPについてもプロアントシアニジンによる阻害に対する軽減は確認されなかった。PVPPは飲料の製造時のポリフェノールの除去のために使用されており、プロアントシアニジンと結合したタンパク質に対しても結合能があることが報告されている⁵⁾。このため、プロアントシアニジンと結合した小麦グリアジンは不溶性のPVPPによって除去されたと推定される。カカオのプロアントシアニジンによる測定阻害に対しては、PVPの中で分子量の最も小さいPVP K15(平均分子量10000)による効果が最も高かった(図2)。

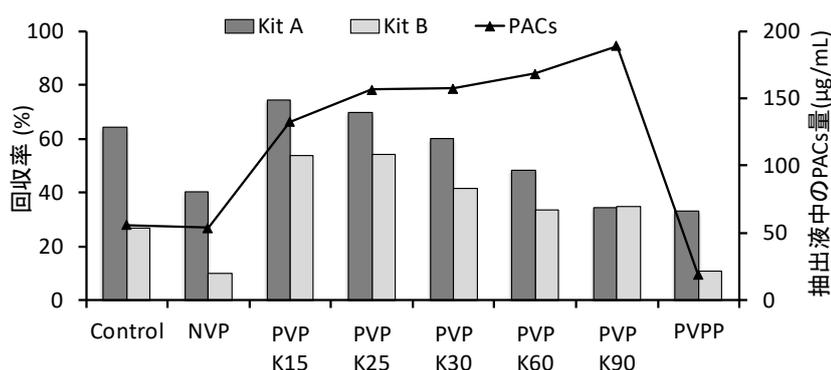


図2 プロアントシアニジン結合物質による測定阻害に対する効果

*カカオに小麦グリアジンを5 µg/g添加し、各結合物質を1%(w/v)含む抽出液により抽出後にFASPEK IIとFASTKIT Ver. IIIIによって測定

PACs: プロアントシアニジン, NVP: 1-vinyl-2-pyrrolidone, PVP: Polyvinylpyrrolidone

PVPP: Polyvinylpolypyrrolidone

一方で、シナモンを含む食品中のプロアントシアニジンによる阻害に対しては、PVPの分子量の大きさによる効果の違いは確認されなかった。このため、これ以降の評価ではPVP K15を使用して、カカオ中のプロアントシアニジンによる阻害に対する濃度条件の検討を行った。PVP K15の必要最小使用濃度を確認するためにPVP K15の共存濃度ごとに回収率の比較を行った。評価の結果、0-1%の濃度範囲では回収率の増加が確認され、1-4%の濃度範囲では回収率の低下が確認されたため、PVP K15の共存濃度は1%に設定した。

4.3 改良法の妥当性評価

最適化した抽出法が小麦以外の特定原材料(乳、卵、そば、落花生、えび・かに)の検査に適用できるか確認するためにアレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン¹⁾を元に、PVP共存抽出法の同等性を評価した。特定原材料ごとに市販の加工食品に調製した標準品を添加し、従来法と改良法により抽出を行った。項目ごとの従来法と改良法の定量値をプロットして定量値の相関図から算出したところ、乳、卵、落花生、そば、えび・かにの近似直線の傾きは0.75-1.25の範囲内であり、ガイドラインに示された基準を満たした。一方で、小麦の測定では従来

法と改良法の相関図から算出した近似直線の傾きは 0.75–1.25 の範囲外となった。この結果は抽出条件の最適化で確認された結果と同様に、プロアントシアニジンを含む食品では従来法による測定時に回収率が低下したためであると推定された。このため、プロアントシアニジンを含まない食品の従来法と改良法の定量値をプロットして近似直線の傾きを確認したところ、定量値の相関図から算出した近似直線の傾きは 0.75–1.25 の範囲内となり、ガイドラインに示された基準を満たした。このため、改良した検査法は従来法と同様に小麦以外の特定原材料の検査にも適用できることが確認された。

4.4 市販加工食品中の小麦タンパク質の混入実態の調査

改良法によるプロアントシアニジンを含む合計 65 試料の調査の結果、12 試料で小麦が検出された (FASPEK 0.3–4.2 µg/g, FASTKIT 0.4–1.5 µg/g)。一方で、小麦が検出された試料は従来の抽出法では測定値が低くなり (FASPEK ND : 0.3 µg/g 未満, FASTKIT ND–0.4 µg/g)、小麦が検出された 12 試料のうち 4 試料では両キットで小麦が検出されなかった。このため、改良抽出法によって検査を行うことによって、小麦の検出率の向上に繋がると考えられた。本調査で小麦を検出した試料は、原材料の一部に小麦の表示がある 2 試料と小麦の混入の注意喚起表示のある 7 試料と小麦のキットで偽陽性が報告されている麦芽^⑥を原材料に含む 3 試料であったため、試料のアレルギー物質についての表示は適正であった。

加工食品の製造時には原材料としてアレルギー物質を使用していない食品を製造する場合であっても、製造工程上の問題等によりコンタミネーションが発生する可能性がある。改良した検査法では従来法では検出が困難な小麦タンパク質の混入を検出できる可能性があるため、スクリーニング検査での偽陰性を防ぎ、小麦タンパク質の混入について検出率を向上することに繋がる。今後も加工食品に混入した小麦が原因となるアレルギーによる健康被害を未然に防止するために、広範囲の食品を対象として小麦タンパク質の混入実態とその表示について引き続き検証を進めていきたい。

今後の研究活動について

プロアントシアニジンによる阻害機序の解析によって、プロシアニジンの構造や重合度の違いによって、小麦グリアジンに対する結合能が異なることが確認された。しかしながら、その阻害機序については明らかでないため、今後も詳細な解析が必要である。本研究で実施した改良法の妥当性評価は単一試験室内での評価であるため、今後は改良した検査法を複数機関による室間共同試験で評価することができれば、より信頼性の高い検査法の確立できる。消費者庁によるスクリーニング検査法の改定の際には、改良法の妥当性評価の結果は適切な科学的根拠を示すことに繋がる。

参考文献

- 1) 消費者庁. 食品表示基準について 別添アレルギー関係. 平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号.
- 2) Payne MJ, Hurst WJ, Stuart DA, Ou B, Fan E, Ji H, Kou Y. Determination of total procyanidins in selected chocolate and confectionery products using DMAC. *Journal of AOAC International* 2010 ;93(1):89-96.
- 3) Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior R L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of nutrition* 2004;134(3):613-7.
- 4) Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 1981;256(9):4494-4497.
- 5) Siebert KJ, Lynn PY. Comparison of polyphenol interactions with polyvinylpyrrolidone and haze-active protein. *J Am Brew Chem* 1998;56 (1) :24-31.
- 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* 2010;17(1):12-17.

以上