

## 短報

# 食品中のビニール様片の同定手法の検討

古谷貴志・新谷依子・小木曾俊孝・堀就英

福岡県内のファミリーレストランにて、喫食した料理の中にビニール様片が含まれていたとの苦情が寄せられ、異物の同定を行った。タンパク質の検出法の1つであるニンヒドリン反応試験により呈色が確認できたため、苦情品がタンパク質由来であると推定されたが、ニンヒドリンは第一級アミンを有するナイロン類も呈色する可能性がある。そこで、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR法)、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット法を用いて、ビニール様片の定性試験を検討した。その結果、ビニール様片が卵白アルブミンを主体とする物質であると同定され、当該手法が卵由来の異物同定の手法として有効であると推察された。

[キーワード：異物検査、卵、FT-IR、SDS-PAGE、ウエスタンブロット法]

## 1 はじめに

近年、食品の表示偽装や化学物質の混入など、食に関する様々な問題が発生しており、消費者の食の安全・安心に対する関心は一段と高まっている。

なかでも食品への異物混入は視覚や食感で確認できるケースが多く、問題になりやすい。食品の異物混入は、食品衛生法第6条に、「異物の混入又は添加その他の事由により、人の健康を損なう恐れのあるもの」と記されており、法令違反とされる可能性がある。一方、異物が混入することによる食品及び企業側への被害は、商品価値の低下、企業への信頼性及びイメージダウンにつながり、甚大な被害を受けかねない。このようなことから、食品に混入した異物の材質を特定することは重要である。

令和3年6月に福岡県内のファミリーレストランにて、ポテトサラダ、ブロッコリー及び鶏卵を耐熱容器で焼成した料理の喫食中に、食品中からビニール様の物質が見つかったとの苦情が保健福祉環境事務所に寄せられた。苦情を受けた同所からの依頼を受け、検査を実施した。卵料理における類似事例として、東京都健康安全研究センターによる平成25年度<sup>1)</sup>及び平成28年度<sup>2)</sup>の苦情相談事例報告があり、これらの報告事例を基に、当研究所でニンヒドリン反応試験を実施した結果、ビニール様片はタンパク質由来の物質と推定された<sup>3)</sup>。

しかし、ニンヒドリン試薬は、ポリアミド系樹脂であるナイロン類でも末端の第一級アミンと反応し呈色する可能性がある。そのため、搬入されたビニール様片の材質がナイロン類ではないことを確認するためにフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR法)、またタンパク質由来の物質であることを確認するためにポリアクリルアミド電気泳動法

(SDS-PAGE) 及びウエスタンブロット法を用いた同定手法を検討した。

## 2 方法

### 2・1 測定試料

当研究所に搬入されたビニール様物質は複数の淡黄色を帯びた透明な断片であり、大きさは最大で長軸約14 mm、短軸約5 mmのものであった。薄い膜状で一部は丸まった形状をしており、搬入された全重量は0.45 mg、搬入時の物性は、弾力は認められず、軽く押し付けると割れる状態であった (写真1)。

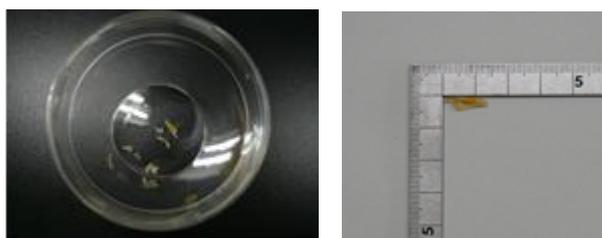


写真1 当課に搬入されたビニール様片

### 2・2 機器・装置

超純水は製造装置 MilliQ® Advantage A10 (Merck MILLIPORE (株) 製) を使用し製造した。卓上小型振とう機はインビトロシェーカー Wave-SI (TAITEC (株) 製) を使用し、泳動装置、プロテイング装置及び泳動及びプロテイング用電源は、ラピタス2連ミニスラブ電気泳動槽 AE-6530、ホライズプロット2M AE-6687及び myPower II 300 AE-8135 (いずれもアトー (株) 製) を使用した。FT-IR装置はAgilent 660 FT-IR spectrometer/ Agilent 610

FT-IR Microscope (Agilent Technologies (株) 製) を使用した。

## 2・3 試薬

メタノール (LC/MS用)、酢酸 (特級) はいずれも関東化学 (株) 製を用いた。コマジープリアントブルーはナカライテスク (株) 製を用いた。

ウエスタンブロットキットはモリナガFASPEK卵ウエスタンブロットキット (卵白アルブミン) ((株) 森永生科学研究所製) を用いた。ローディング緩衝液用試薬はEZ Apply (アトー (株) 製)、2-メルカプトエタノール (バイオラッドラボラトリーズ (株) 製) を用いた。電気泳動用有色分子量マーカー EzStandardPrestainBlue AE-1450、泳動用バッファー試薬 EzRun C+、電気泳動用既製ゲル e-PAGEL 12.5 %、ブロッティング試薬EzBlot、洗浄液EzTBS、ブロッティング試薬EzBlock BSA、Tween20はいずれもアトー (株) 製を用いた。ブロッティング用器材はブロッティング用ろ紙Absorbent Paper CB-09A、ブロッティング用PVDF膜Clear Blot Membrane-p AE-6665 (いずれもアトー (株) 製) を用いた。二次抗体はHRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research製)、検出試薬はEzWestBlue (アトー (株) 製) を用いた。

## 2・4 検査方法

### 2・4・1 FT-IR試験

ビニール様片と比較する食品として、市販の鶏卵を湯浴中で加温し、得られた卵白部分を測定に使用した。

ビニール様片の表面を適宜削り、FT-IR測定に用いた。測定はATR法で実施し、分解能を $4\text{ cm}^{-1}$ 、積算回数を16回に設定して行った。

### 2・4・2 SDS-PAGE

SDS-PAGEは消費者庁通知の別添アレルギー関係<sup>4)</sup>を参考に実施した。ポリアクリルアミドゲルは12.5%の市販のゲルを使用した。ビニール様片の参考品として鶏卵アルブミン (富士フィルム和光純薬 (株) 製) を超純水で $0.5\text{ mg/mL}$ に調製したものを使用した。ビニール様片をピンセットで一部取り、2-メルカプトエタノールを加えたローディング緩衝液に溶解、 $95^{\circ}\text{C}$ で5分加温し、さらにこの溶解液をローディング緩衝液で10倍希釈したものを使用した。

### 2・4・4 ウエスタンブロット法

ウエスタンブロット法は消費者庁通知の別添アレルギー関係<sup>4)</sup>に記載の方法に準じて実施した。一次抗体及び卵白アルブミン標準溶液 ( $10\text{ ng/mL}$ ) はモリナガFASPEK卵ウエスタンブロットキット (卵白アルブミン) に付属して

いる試薬を用いた。

## 3 結果

### 3・1 FT-IR試験

ビニール様片と加温した鶏卵卵白のFT-IR測定を実施した。黒線は鶏卵卵白、灰色線はビニール様片のスペクトル結果を示す (図1)。

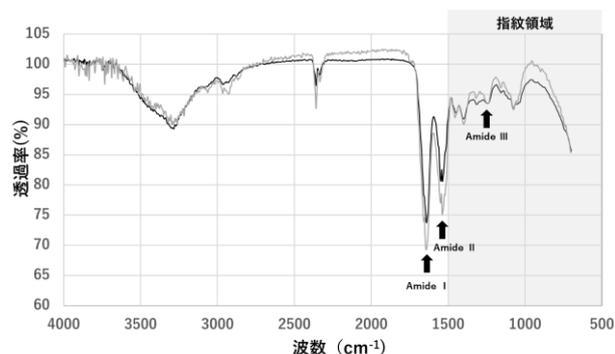


図1 FT-IR試験結果

タンパク質を測定した場合、ペプチド結合 (アミド結合) に特徴的なピークであるAmide I ( $1650\text{ cm}^{-1}$ 付近)、Amide II ( $1540\text{ cm}^{-1}$ 付近) 及びAmide III ( $1240\text{ cm}^{-1}$ 付近) において、ビニール様片及び鶏卵卵白で、それらのピークを確認することができた。また、 $1500\text{ cm}^{-1}$ 以下の指紋領域において、ビニール様片とタンパク質を主成分とする鶏卵卵白の波形は酷似していた。また、ナイロン類のFT-IR結果<sup>5)</sup>と比較した結果、 $3300\text{ cm}^{-1}$ 付近の波形はポリアミド系樹脂類と明らかに異なる形状をしていた。以上のことから、当該ビニール様片がポリアミド系樹脂を主成分とするナイロン類ではないことが確認された。

### 3・2 SDS-PAGE

食品中に含まれるタンパク質由来のビニール様片は、過去に同様の報告があり、共通して卵を用いた調理食品で報告されている<sup>1),2),6),7)</sup>。今回対象となった食品も、加熱した卵白を含む食品であった。このことから、今回のビニール様片が卵由来のタンパク質であることを調べるため、SDS-PAGEを行った (図2)。

対照品として泳動した鶏卵アルブミン (以下卵白アルブミン) は分子量が約 $45,000$ であり、卵白を構成するタンパク質の54%を占めている<sup>8)</sup>。搬入されたビニール様片のSDS-PAGEの結果、分子量 $45,000$ 付近にタンパク質のバンドが確認され、また参考として同時に電気泳動した卵白アルブミンと同じ分子量であった。よって、当該ビニール様片は卵白アルブミンが大部分を占める卵白由来のタンパク質で形成された物質と確認された。

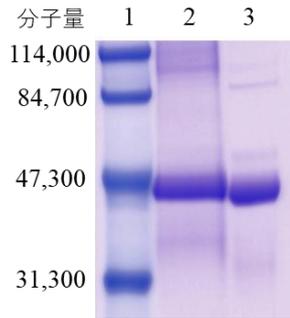


図2 SDS-PAGE結果

1：マーカー 2：ビニール様片溶解液（10倍希釈） 3：卵白アルブミン溶液（0.5 mg/mL）

### 3・3 ウェスタンブロット法

SDS-PAGEの結果から、今回のビニール様片が卵白由来であると同定するため、より選択性の高いウェスタンブロット法を用いて、卵白アルブミンの同定を行った（図3）。ビニール様片においては、SDS-PAGEで使用した溶液をローディングバッファーで1,000倍希釈及び5,000倍希釈し、使用した。

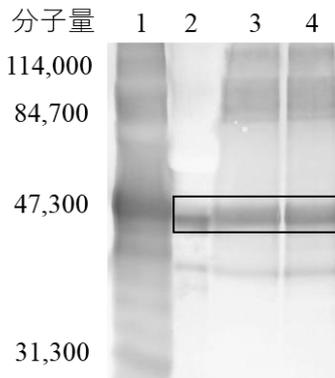


図3 ウェスタンブロット結果

1：マーカー 2：卵白アルブミン標準物質（10µg/mL） 3：ビニール様片溶解液（1,000倍希釈） 4：ビニール様片溶解液（5,000倍希釈）

ウェスタンブロットの結果、ビニール様片溶解液は分子量45,000付近に明瞭なバンドが確認でき、また、標準品である卵白アルブミンも同様の分子量の位置でバンドが確認出来たため、当該ビニール様片が卵白由来の物質であると確認された。

このことから、アレルギーの定性検査に使用するウェスタンブロットキットを用いることで、当該ビニール様片が卵白由来の物質であると同定することが可能であった。

## 4 考察及びまとめ

FT-IR 測定、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット法の結果より、料理に混入していたビニール様片は、ポリアミド系樹脂のようなビニールではなく、卵白由来のタンパク質を主成分とする物質と同定した。また、これらの手法は卵由来のビニール様片の同定手法として有効であると考えられた。

当該ビニール様片は東京都<sup>1)</sup>や神奈川県<sup>6)</sup>で報告されていた過去の事例と同様に卵白部分が加熱によりビニール様に変化したものと推定された。ニンヒドリン反応試験はタンパク質の同定試験として有効であるが、タンパク質以外の第一級アミンを有する物質とも反応する可能性があるため、ニンヒドリン反応試験のみでは不十分であると考えられる。そこで、FT-IR 法、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット法を組み合わせることで、今回のような食品中のビニール様片の材質を同定する方法を検討した。

その結果、ニンヒドリン反応試験だけでなく、いずれかの手法と複数組み合わせることにより、食品中に含まれる異物検査を迅速に対応できると考えられた。

## 謝辞

今回の検査にあたり、協力して頂きました嘉穂・鞍手保健環境福祉事務所に感謝いたします。

## 文献

- 1) 下井俊子ら：東京都健康安全研究センター年報，65，161-166，2014.
- 2) 木村圭介ら：東京都健康安全研究センター年報，68，151-157，2017.
- 3) 古谷貴志ら：第69回福岡県公衆衛生学会，福岡，2022年5月.
- 4) 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（消食表題139号）別添アレルギー関係，平成27年3月30日.
- 5) 食品衛生検査指針 理化学編 追補2019 第10章 異物，公益財団法人日本食品衛生協会，2019.
- 6) 平成27年度食品等の苦情品検査，横浜市衛生研究所検査情報月報 2016年4月号（<https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/kenko-iryo/eiken/geppo/2016/1604.files/160402.pdf>）.
- 7) 食品等の苦情品検査（平成30年度），横浜市衛生研究所検査情報月報 2019年5月号（<https://www.city.yokohama.lg.jp/kurashi/kenko-iryo/eiken/geppo/2019/1905.files/190504.pdf>）.
- 8) 西川研次郎：食品機能性の科学，株式会社テクノシステム，2008年.

(英文要旨)

## **Evaluating a method for identifying vinyl-like fragments in food**

**Takashi FURUTANI, Yoriko SHINTANI, Toshitaka KOGISO and Tsuguhide HORI**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,*

*Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

A restaurant in Fukuoka Prefecture received a complaint that there was a piece of vinyl-like material in a dish they had consumed. On investigation, the restaurant identified the foreign material from its color using the ninhydrin reaction test, a protein detection method. While it was presumed that the material was derived from protein, it is known that ninhydrin may also stain nylons with primary amines. Therefore, the vinyl-like fragments were tested qualitatively using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), SDS-PAGE, and western blotting. Through this testing, the vinyl-like fragments were identified as a substance mainly composed of egg white albumin. Further, the results suggest that this method is useful for identifying foreign substances originating from egg.

[Key words ; Foreign substance examination , Egg , FT-IR , SDS-PAGE , Western Blotting ]