

頭胸部を含む非加熱甲殻類のELISA法に適した抽出方法の開発

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	柴原, 裕亮 山田, 一多 上坂, 良彦 畝尾, 規子 阿部, 晃久 大橋, 英治 塩見, 一雄
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	50巻4号
掲載ページ	p. 153-159
発行年月	2009年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

頭胸部を含む非加熱甲殻類の ELISA 法に適した抽出方法の開発

(平成 21 年 1 月 13 日受理)

柴原裕亮^{1,*} 山田一多¹ 上坂良彦¹ 畝尾規子²
阿部晃久² 大橋英治² 塩見一雄³

Extraction Method Suitable for Detection of Unheated Crustaceans
Including Cephalothorax by ELISA

Yusuke SHIBAHARA^{1,*}, Itta YAMADA¹, Yoshihiko UESAKA¹, Noriko UENO²,
Akihisa ABE², Eiji OHASHI² and Kazuo SHIOMI³

¹Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Research Division: 1075-2
Hokunanmoro, Yuki-shi, Ibaraki 307-0036, Japan;

²Nippon Suisan Kaisha, Ltd., Food Safety Research Center: 559-6
Kitano-machi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0906, Japan;

³Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science
and Technology: 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan;

*Corresponding author

When unheated whole samples of crustaceans (shrimp, prawn and crab) were analyzed with our ELISA kit (FA test EIA-Crustacean [Nissui]) using anti-tropomyosin antibodies, a remarkable reduction in reactivity was recognized. This reduction in activity was found to be due to the digestion of tropomyosin during the extraction process by proteases contained in cephalothorax. To avoid the digestion of tropomyosin by proteases, we developed an extraction method (heating method) suitable for the detection of tropomyosin in unheated crustaceans including cephalothorax. Experiments with unheated whole samples of various species of crustaceans confirmed that the heating method greatly improved the low reactivity in the standard method; the heating method gave extraction efficiencies of as high as 93-107%. Various processed crustaceans with cephalothorax, such as dry products (unheated or weakly heated products) and pickles in soy sauce (unheated products), that showed low reactivity with the standard method were confirmed to give superior results with the heating method. These results indicated that the developed heating method is suitable for detecting unheated crustaceans with cephalothorax by means of the ELISA kit.

(Received January 13, 2009)

Key words: 食物アレルギー food allergy; 特定原材料 allergenic substance; 甲殻類 crustacean; トロポミオシン tropomyosin; プロテアーゼ protease; ELISA キット ELISA kit

緒 言

アレルギー物質を含む食品の表示制度は、「卵、乳、小麦、そば、落花生」の5品目が表示義務品目(特定原材料)、「えび」および「かに」を含む19品目が特定原材料に準ずる品目(表示奨励品目)に指定され、平成14年4月より本格的に開始された¹⁾。本制度は原材料表示を通じて消費者へ情報提供をすることでアレルギーによる健康危

害を未然に防ぐことを目的としている。その後、最新の科学的知見に基づき見直しが行われ、平成16年12月には「バナナ」が表示奨励品目に、平成20年6月には「えび」および「かに」が特定原材料に格上げされ、現在は特定原材料が7品目、表示奨励品目が18品目となっている²⁾。「えび」および「かに」の表示義務化には猶予期間が2年間設けられており、平成22年6月より本格的に開始される。また、表示の範囲も見直され、「えび」については従来の「えび」の範囲である日本標準商品分類の分類番号7133えび類(いせえび・ざりがに類を除く)に加えて、7134いせえび・うちわえび・ざりがに類が追加された。「かに」については7135かに類を範囲としている。全体として「えび」および「かに」の表示範囲は、生物学的に

* 連絡先

¹ 日水製薬株式会社 診断薬研究部: 〒307-0036 茨城県結城市北南茂呂 1075-2

² 日本水産株式会社 食品分析センター: 〒192-0906 東京都八王子市北野町 559-6

³ 東京海洋大学 食品生産科学科: 〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7

十脚目に分類される甲殻類をその対象としている³⁾。さらに、表示の信頼性を保障するためには、加工食品中に含まれる特定原材料を検知可能な試験法の確立が不可欠である。

このような背景から著者らは、食品中に含まれる甲殻類を検知する方法の検討を行い、甲殻類の主要アレルゲン^{4),5)}であるトロポミオシンを測定対象タンパク質としたELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) キット“FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」”を開発した⁶⁾。本キットは抗甲殻類トロポミオシンモノクローナル抗体を用いることで特異性を向上させており、食品を用いた検討で甲殻類に対して特異的に反応することを確認している。さらに、厚生労働省通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(平成 18 年 6 月 22 日食安発第 0622003 号)における「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に従って試験室間バリデーション(試験施設数: 10 施設, 試料数: 5 種類)を実施し、検査キットの基準(回収率: 50~150%, 室間精度: 25% 以下)を満たしていることを確認している⁷⁾。

本キットは「えび」および「かに」の表示義務化に先駆けて開発し、食品検査に広く用いられるようになったが、ある施設において頭胸部や外殻を含む生のサルエビの全身(以後、whole)を検体に用いて測定を行ったところ、検出限界以下となる事例が発生した。本キットは主に最終製品の検査に用いられ、最終製品の大部分は甲殻類の一般的な可食部である筋肉部分のみを使用して加熱処理も施されているため、これまでに検討した市販の加工品では良好な反応性が確認されている⁸⁾。しかしながら、本事例の施設ではサルエビなどの生の小エビを食品原料として whole のままミンチ肉に使用していることや、他社の甲殻類検出キットにおいても同様の反応性低下が確認されたことから、whole の非加熱甲殻類の測定を想定した対策が必要と考えられた。そこで著者らは厚生労働科学研究費補助金の一環として検討を行った。その結果、サルエビ以外の数種類の「えび」を頭胸部や外殻を含む whole で測定したときにも同様に反応性が低下することを確認した。また、このような測定値低下の現象は甲殻類の頭胸部に含まれるプロテアーゼによるトロポミオシンの分解に起因することを明らかにした。さらに、プロテアーゼの影響を回避し、信頼性ある測定値を得るために有効な抽出方法として加熱抽出法を開発したので報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

スーパーマーケットならびに市場で甲殻類 10 種類および甲殻類加工品 8 種類を購入した。甲殻類は whole で購入可能な非加熱の「えび」7 種類(ブラックタイガー: *Penaeus monodon*, クルマエビ: *Penaeus japonicus*, ホッコクアカエビ: *Pandalus eous*, アカエビ: *Metapenaeopsis barbata*, サルエビ: *Trachysalambria curvirostris*,

サクラエビ: *Sergia lucens*, アカザエビ: *Metapheprops japonicus*) および「かに」3 種類(ガザミ: *Portunus trituberculatus*, サワガニ: *Geothelphusa dehaani*, アサヒガニ: *Ranina ranina*) を用いた。甲殻類加工品としては釜揚げサクラエビ, 素干しサクラエビ, 遠赤外線乾燥アキアミ(*Acetes japonicus*), 釜揚げ後に干したクルマエビ, ホッコクアカエビの沖漬け, ホッコクアカエビのすり身, シラエビ(*Metapenaeopsis lata*)のすり身およびシバエビ(*Metapenaeopsis jaoyneri*)のすり身を用いた。すり身を除く加工品は、いずれも whole の甲殻類が含まれている。使用するまで、乾燥加工品は室温に、その他の試料はすべて -80°C で冷凍保存した。

食品からのタンパク質の抽出には FA テスト抽出用試薬「ニッスイ」(日水製薬(株)製: 以後、抽出用試薬)を、測定には FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬(株)製: 以後、ELISA キット)を用いた。プロテアーゼインヒビター(以後、PI)は Halt Protease Inhibitor Cocktail および EDTA Solution (Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit, Thermo Fisher Scientific 社製)を用いた。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以後、SDS-PAGE)では、ゲルに NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gels, ローディング緩衝液に LDS Sample Buffer, 分子量マーカーに SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, 泳動用バッファーに MES SDS Running Buffer (いずれも Invitrogen 社製), ゲルの染色に Coomassie Brilliant Blue R-250 を用いた。

2. 機器および装置

試料の均一化用のホモジナイザーとしてラボミルサー LM-2 (大阪ケミカル(株)製)を、抽出操作にはボルテックスシェーカー VR-36 (タイテック(株)製), 高速冷却遠心機 himac CF7D (日立工機(株)製)を用いた。ELISA 測定では、洗浄操作にマイクロプレートウォッシャー BIO-WASHER 405RS (DS Pharma Biomedical 社製), 吸光度の測定にマイクロプレートリーダー SpectraMax 250 (Molecular Devices 社製)を用いた。SDS-PAGE の泳動装置としては Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen 社製), 泳動用電源装置には Bio-Rad 3000Xi Computer Controlled Electrophoresis Power Supply (Bio-Rad Laboratories 社製)を用いた。

3. 抽出操作および測定方法

3.1 試料抽出液の調製(通常抽出法)

ホモジナイザーで均一化した試料 1 g に抽出用試薬より調製した抽出液 19 mL を混合して室温で一晩(16 時間)振とう抽出(振とう回数 100 往復/回, 振とう幅 3 cm)を行った。次いで $3,000\times g$ で 20 分間遠心分離して上清を回収し、試料抽出液を得た。PI の効果を検討する場合には、Halt Protease Inhibitor Cocktail および EDTA Solution を 10, 20 または $50\ \mu\text{L}/\text{mL}$ になるように添加した抽出液を用いた。

Table 1. Determination of protein in extracts from whole body and abdominal muscle of four species of crustaceans with the ELISA kit

Sample	Concentration of crustacean protein ($\mu\text{g/g}$)	
	Whole body	Abdominal muscle
<i>Penaeus monodon</i> (black tiger)	<0.31	37,474
<i>Pandalus eous</i> (hokkoku-akaebi)	2,616	117,183
<i>Metapenaeopsis barbata</i> (akaebi)	<0.31	14,150
<i>Trachysalambria curvirostris</i> (saruebi)	<0.31	109,155

3.2 試料抽出液の調製 (加熱抽出法)

ホモジナイザーで均一化した試料 1 g に抽出用試薬より調製した抽出液 19 mL を加え、よく振り混ぜて固形分を均等に分散させた後、速やかに沸騰浴中で 30 分間加熱した。加熱までの操作は、プロテアーゼの影響を防ぐために実験器具、抽出液および試料を氷冷しながら行った。室温に戻した後、 $3,000 \times g$ で 20 分間遠心分離して上清を回収し、試料抽出液を得た。

3.3 測定方法

ELISA キットの測定操作は既報^{(6)~(8)}に従って、試料抽出液をキット付属の検体希釈液で 20 倍に希釈して測定溶液を調製し、甲殻類総タンパク質濃度を求めた。測定溶液の測定値が検量線の上限を超えた場合、測定溶液をさらに 10~10,000 倍まで 10 倍階段希釈して希釈試験を実施した。その際、希釈液には抽出液と検体希釈液を 1:19 の割合で混合した溶液を用いた。

4. 電気泳動条件

試料抽出液 $3 \mu\text{L}$ に 0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) $12 \mu\text{L}$ 、ローディング緩衝液 $5 \mu\text{L}$ を混合後、沸騰水浴中で 10 分間加熱変性し、 $10 \mu\text{L}$ を各ウェルにアプライした。泳動は 200 V の定電圧により、35 分間行った。泳動後のゲルは 0.6% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 で 10 分間染色し、その後 25% (v/v) メタノール、1.2 mol/L 酢酸溶液を用いて 1 時間の脱色を 3 回行い明瞭な泳動像を得た。

結果および考察

1. 測定値低下の原因および改善方法の検討

1.1 4 種類の「えび」を用いた測定部位の比較

ある施設で、非加熱のサルエビを whole で測定すると ELISA 反応が検出限界以下となる事例があったが、筋肉試料のみでの試験は行われていなかった。また、他の「えび」でもサルエビと同様な現象が見られるか否かについても不明であった。これらの点を明らかにするために、サルエビを含む 4 種類の「えび」の whole および一般的な可食部である外殻を除いた腹部筋肉から通常抽出法で調製した試料抽出液を用いて検討した。ELISA キットおよび SDS-PAGE による分析結果を Table 1 および Fig. 1 に示す。ブラックタイガー、アカエビ、サルエビの whole では、ELISA キットは検出限界以下 ($<0.31 \mu\text{g/g}$)、SDS-PAGE においてもタンパク質バンドはほとんど検出され

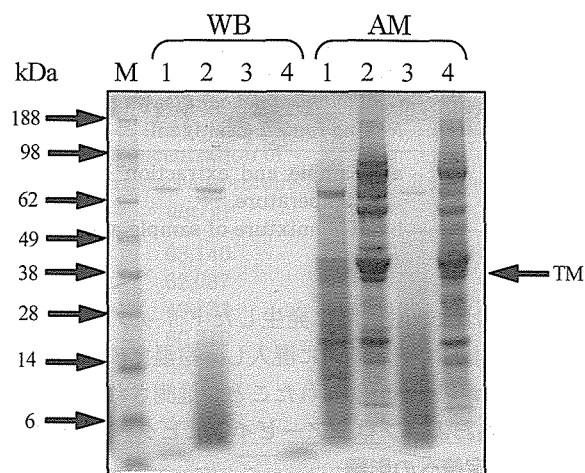


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of extracts from the whole body (WB) and abdominal muscle (AM) of four species of crustaceans

Lanes: M, protein standard; 1, *Penaeus monodon* (black tiger); 2, *Pandalus eous* (hokkoku-akaebi); 3, *Metapenaeopsis barbata* (akaebi); 4, *Trachysalambria curvirostris* (saruebi)

なかった。ホッコクアカエビの場合、弱い ELISA 反応は確認されたものの、SDS-PAGE ではトロポミオシン (約 38 kDa) より低分子のスメア状のバンドのみであった。一方、腹部筋肉では、whole の測定値と比較して最も差の少ないホッコクアカエビにおいても ELISA キットは 40 倍以上の高い反応性を示し、SDS-PAGE ではアカエビを除いてトロポミオシンを含む高分子タンパク質のバンドが確認された。また、SDS-PAGE においては、ELISA キットの測定値が高いほどトロポミオシンおよび高分子タンパク質のバンドは強く検出された。

本研究により、サルエビだけでなく他の「えび」においても whole 試料では ELISA キットの著しい反応性低下が確認された。whole 試料と筋肉試料では、頭胸部を含むかどうかの大きな違いがある。甲殻類のプロテアーゼ活性は、頭胸部、特に肝臓で高いことが報告されている⁽⁹⁾ことから、ELISA キットにおける反応性の低下は、頭胸部に含まれるプロテアーゼによって抽出操作中にトロポミオシンが分解されることが原因と推測された。

プロテアーゼの影響は腹部筋肉のみでは受けにくいものの、アカエビのように SDS-PAGE のバンドがスメア状で ELISA キットの反応性がやや低い事例も確認された。この原因として、腹部筋肉を採取する際に、消化管 (背わ

Table 2. Effect of extraction methods on the determination of protein in crustaceans with the ELISA kit

Sample	Concentration of crustacean protein ($\mu\text{g/g}$)	
	Standard method ^{a)}	Heating method ^{b)}
<i>Penaeus monodon</i> (black tiger)	<0.31	47,254
<i>Penaeus japonicus</i> (kurumaebi)	2	49,042
<i>Pandalus eous</i> (hokkoku-akaebi)	3,600	48,829
<i>Metapenaeopsis barbata</i> (akaebi)	3	41,681
<i>Trachysalambria curvirostris</i> (saruebi)	<0.31	47,155
<i>Sergia lucens</i> (sakuraebi)	218	45,085
<i>Metanephrops japonicus</i> (akazaebi)	956	37,175
<i>Portunus trituberculatus</i> (gazami)	8	35,278
<i>Geothelphusa dehaani</i> (sawagani)	<0.31	9,020
<i>Ranina ranina</i> (asahigani)	<0.31	19,340

a) Sample and extraction buffer were shaken horizontally overnight (16 hr) at room temperature.

b) The mixture of sample and extraction buffer was heated at 100°C for 30 min.

た)あるいは凍結融解時に発生したドリップよりプロテアーゼが溶出して腹部筋肉に混入し、室温での抽出操作中にトロポミオシンが分解されたことが推測された。

1.2 加熱およびプロテアーゼインヒビター (PI) 添加による測定値への影響

プロテアーゼの影響を確認するために、サルエビの whole 試料を用いて加熱および PI の効果について検討した。加熱の検討のためには whole 試料を 100°C で 30 分間加熱後に均一化し、通常抽出法により試料抽出液を調製した。PI の検討には、PI を添加した抽出液を用いて通常抽出法により試料抽出液を調製した。whole 試料から通常抽出法により抽出した場合には ELISA キットでは検出限界以下であったが (Table 1), 加熱した whole 試料から抽出した場合には 42,348 $\mu\text{g/g}$, PI を添加した抽出液 (PI 濃度は 10 $\mu\text{L/mL}$) を用いた場合には 2,111 $\mu\text{g/g}$ の測定値が得られた。これらの結果は加熱によるプロテアーゼの失活, PI によるプロテアーゼの阻害を意味しており, whole 試料から通常抽出法により抽出した場合の測定値低下の原因はプロテアーゼの影響であると判断した。

甲殻類の消化酵素としてはセリンプロテアーゼ, メタロプロテアーゼなど種々のプロテアーゼが報告^{10)~13)}されていることから, 本研究では PI の効果を検討するにあたり各種プロテアーゼを阻害する PI の混合液を用いた。whole 試料の加熱処理と比較して抽出液への PI 添加効果が低かったため, PI 添加量を 2 倍, 5 倍に上げて検討したところ, 4,681, 13,609 $\mu\text{g/g}$ と濃度に依存して ELISA 測定値の上昇が認められた。しかし, 加熱処理より低い測定値であったことから「えび」に含まれるプロテアーゼの量が多量なために十分な効果を得ることが困難であると判断した。一方, 加熱処理では高い測定値が得られ, whole 試料の測定値低下の改善法として加熱処理は有効と思われた。そこで, 以下に述べるように加熱処理の効果をさらに詳しく検討した。

2. ELISA キットにおける加熱抽出法の有用性の検証

2.1 10 種類の甲殻類を用いた通常抽出法との比較

「えび」7 種類, 「かに」3 種類を用いて加熱抽出法の評価を行った。それぞれの whole 試料 (ホモジナイザーへの過度の負担を避けるためアサヒガニのみ背甲を除去) をホモジナイザーで均一化後, 通常抽出法と加熱抽出法で測定溶液を作製し, ELISA キットを用いて測定した。Table 2 に示すように, 通常抽出法では種類によって測定値に差があるものの, 加熱抽出法と比較してすべての種類で反応性の著しい低下が認められた。各種甲殻類由来のプロテアーゼは, pH¹³⁾ や界面活性剤, 還元剤^{10)~12)} によって異なる反応性を示すことが報告されているので, 種類間の測定値の差は用いた抽出液に対するプロテアーゼの挙動が異なり, タンパク質の分解度に差が生じたためと考えられた。

一方, 加熱抽出法では通常抽出法と比較して非常に高い測定値が得られた。「えび」は種類にかかわらず同程度の値であったが, 「かに」は種類によって異なる値を示した。これは, 検討に用いた「かに」は種類によって頭胸部, 鉗脚, 歩脚の重量比が異なっており, whole で測定した場合にはトロポミオシンを多く含む鉗脚および歩脚が占める割合が違う, または種類によってトロポミオシンの含有量が違うため測定値に差が生じたと考えられた。なお, ELISA キットの特異性は各種甲殻類の精製トロポミオシンに対して同等の反応性が確認されている⁶⁾。

2.2 抽出時間の短縮による抽出効率への影響

加熱抽出法は加熱後, 室温に戻した後すぐに遠心分離を行うため, 通常抽出法と抽出時間が大きく異なり抽出効率に差が生じることが懸念された。そこで 3 種類の「えび」を用い, 上記 1.2 の加熱操作と同様に先に試料を加熱して通常抽出法により調製した試料抽出液と, 加熱抽出法により調製した試料抽出液について ELISA キットで測定した。Table 3 に示すように, 先に試料を加熱して通常抽出法を行ったときの測定値を 100% とすると, 加熱抽出法の

Table 3. Effect of heating on the determination of protein in crustaceans with the ELISA kit

Sample	Concentration of crustacean protein ($\mu\text{g/g}$)		Extraction efficiency ^{c)} (%)
	Heated sample ^{a)}	Heating method ^{b)}	
<i>Penaeus monodon</i> (black tiger)	55,233	51,318	93
<i>Metapenaeopsis barbata</i> (akaebi)	44,680	45,457	102
<i>Trachysalambria curvirostris</i> (saruebi)	42,348	45,262	107

a) Sample was heated at 100°C for 30 min. After having been cooled to room temperature, the sample was extracted by the standard method.

b) See Table 2.

c) Extraction efficiency was expressed as the ratio of the value obtained with the heating method to that obtained with the heated sample.

Table 4. Effect of storage conditions on the determination of protein in *Penaeus japonicus* with the ELISA kit

Storage condition of <i>Penaeus japonicus</i>	Concentration of crustacean protein ($\mu\text{g/g}$)	Recovery ^{a)} (%)
No storage (live sample)	63,146	100
Keeping at 4°C for one day	62,037	98
Keeping at 4°C for two days	49,133	78
Freezing and thawing (once)	60,210	95
Freezing and thawing (three times)	55,779	89
Keeping at 4°C for one day after freezing and thawing (once)	57,859	92
Keeping at 4°C for two days after freezing and thawing (once)	46,106	73

a) The value for a live sample was taken as 100%.

測定値は 93~107% とほぼ同程度であった。測定対象タンパク質のトロポミオシンは熱に安定な可溶性タンパク質であるため¹⁴⁾、原材料レベルからの抽出は比較的容易かつ熱の影響を受けないと考えられた。また、ELISA キットも加熱処理したトロポミオシンにも反応する抗体を使用しているため、加熱の影響を受けにくいことが確認されている⁶⁾。

以上の結果より、加熱抽出法は抽出液の調製を短縮できかつ抽出効率も良好であるので、非加熱で whole の「えび」および「かに」を測定する際に適した方法であると判断した。

3. 測定値低下が懸念される事例の検討

3.1 測定値に対する鮮度の影響

甲殻類では頭胸部のプロテアーゼによる自己消化が起こる可能性があるため、甲殻類試料の鮮度も測定値に影響すると考えられた。そこで活きたクルマエビの whole 試料を対照とし、種々の条件で保存したクルマエビの whole 試料について加熱抽出法における測定値を比較した。試料の保存条件は、①水揚げ後冷蔵保存で流通、②水揚げ後すぐに冷凍し解凍して流通、③水揚げ後すぐに冷凍し一度解凍して小分けした後に再び冷凍して流通のようなケースを想定し、7条件 (Table 4 参照) を設定した。温度条件は、冷蔵は 4°C、冷凍は急速に冷凍するために -80°C とした。ELISA キットの測定結果は Table 4 のとおりであり、冷蔵保存の期間と凍結融解の回数が測定値の低下に多少影響することが判明した。また、凍結融解後に冷蔵保存した場合は融解時にドリップが発生しており大幅な低下が予想されたが、生き締め後に冷蔵保存した場合と大きな差

は認められなかった。これはプロテアーゼが低温では活性が低いことに起因していると考えられた^{11)~13)}。

3.2 各種甲殻類加工品を用いた通常抽出法との比較

生鮮甲殻類の whole 試料の場合、通常抽出法ではプロテアーゼによるトロポミオシンの分解のため ELISA キットの測定値が著しく低下することが明らかになった。甲殻類は whole で加工されることも多く、このような加工品においても通常抽出法ではプロテアーゼの作用による測定値の低下が懸念される。そこで、8種類の「えび」の加工品 (すり身3種類以外は whole の加工品) を用いてこの点を検討した。ホモジナイザーで均一化した加工品からそれぞれ通常抽出法と加熱抽出法で測定溶液を調製し、ELISA キットにおける測定値を比較した。ELISA キットの測定結果を Table 5 に示した。通常抽出法による測定値の著しい低下は素干しのサクラエビ、遠赤外線乾燥のアカアミ、沖漬けのホッコクアカエビで認められた。一方、釜揚げのサクラエビ、釜揚げ後に干したクルマエビ、すり身の加工品では通常抽出法と加熱抽出法は同程度の測定値を示した。

加工品の測定結果より、素干しのような非加熱の乾燥品や弱い加熱の遠赤外線乾燥品ではプロテアーゼが失活せずに残存していると考えられた。著者らの検討では、加熱温度を 60, 80, 100°C で検討したとき、60, 80°C では測定値の低下が抑えられないという結果が得られている。プロテアーゼを失活させるには十分な加熱が必要であると考えられた。沖漬けは活きたままホッコクアカエビを丸ごと醤油とみりんに漬けている。このような高塩濃度下においても失活せずプロテアーゼの活性が残存していることが示唆

Table 5. Effect of extraction methods on the determination of protein in crustacean processed products with the ELISA kit

Raw material	Processing method	Concentration of crustacean protein ($\mu\text{g/g}$)	
		Standard method ^{a)}	Heating method ^{b)}
<i>Sergia lucens</i> (sakuraebi)	Boiled	89,033	86,080
<i>Sergia lucens</i> (sakuraebi)	Dried (non-heated)	9	33,285
<i>Acetes japonicus</i> (akiami)	Dried (FIR ^{c)})	370	5,578
<i>Penaeus japonicus</i> (kurumaebi)	Boiled and dried	374,976	403,280
<i>Pandalus eous</i> (hokkoku-akaebi)	Pickled in soy sauce	1,878	17,834
<i>Pandalus eous</i> (hokkoku-akaebi)	Surimi (raw)	24,009	24,544
<i>Metapenaeopsis lata</i> (Shiraebi)	Surimi (raw)	8,833	9,587
<i>Metapenaeus joyneri</i> (Shibaebi)	Surimi (raw)	106,710	113,039

a) Sample and extraction buffer were shaken horizontally overnight (16 h) at room temperature.

b) See Table 2.

c) FIR: far infrared radiation dryer.

された。また、加熱抽出法においても Table 2 の未加工のホッコクアカエビよりも低い測定値であった。これは漬けている間に受けたプロテアーゼの影響、あるいは調味液中にトロポミオシンが溶出したためと考えられた。

抽出操作によって測定値が変動しなかった釜揚げのサクラエビや釜揚げ後に干したクルマエビの場合、沸騰した湯に「えび」を入れて茹で上げる方法であるため、十分な加熱によりプロテアーゼが失活したと考えられた。すり身については、プロテアーゼの影響を受けにくい腹部筋肉のみを使用していることに加えて、他の原材料によりプロテアーゼの活性が抑制されていることが考えられた。これまでに卵白や小麦タンパク質がプロテアーゼ活性を抑制することが報告されており^{15), 16)}、用いたすり身には「えび」以外に、魚肉、小麦デンプン、卵や調味料が原材料として表示に記載されていた。

以上の結果より、甲殻類の whole の加工品のうち非加熱または弱い加熱の製品の場合、ELISA キットで測定するためには非加熱の whole 試料の場合と同様に加熱抽出法を採用することが望ましいと考えられた。

まとめ

頭胸部を含む非加熱の「えび」および「かに」を ELISA キットで測定したとき、頭胸部に多く含まれるプロテアーゼの影響により抽出操作中に測定対象タンパク質のトロポミオシンが分解されて反応性が低下することが判明した。そこで、プロテアーゼの影響を回避するための検討を行い、頭胸部を含む非加熱の「えび」および「かに」を測定する際の抽出方法（加熱抽出法）を確立した。また、甲殻類加工品の測定結果から、頭胸部を含む非加熱の「えび」や「かに」、または加熱が不十分な「えび」や「かに」が使用されている食品（乾燥品を含む）の測定においては、加熱抽出法が適していた。加熱抽出法はロット管理を目的とした原材料検査で非加熱の「えび」や「かに」を whole で用いる場合に有用である。さらに、ミンチ肉や粉末加工品といった主に最終製品の中間原料として使用され、外見では判別不可能な非加熱の「えび」や「かに」を含む恐れのある食品の検査を行う場合にも適した方法と考えられる。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）の一環として行われたものである。本研究を実施するに当たり、ご指導、ご助言いただきました研究班の協力研究者および支援研究者の諸氏に深く感謝いたします。

文献

- 1) Akiyama, H., Toyoda, M. Outline of detection method of allergic substances. *Shokuhin Eisei Kenkyu* (Food Sanitation Research), **52**, 65-73 (2002).
- 2) Adachi, R., Sakai, S., Akiyama, H., Teshima, R. Tokutei genzairyō hyōji to kensahō (Japanese food allergy labeling system and detection method). *Japan Food Science*, **47**, 27-31 (2008).
- 3) Nishijima, Y. Kouseiroudousyō ni okeru syokuhin hyōji ni kansuru torikumi (The action about Japanese food allergy labeling system in Ministry of Health, Labour and Welfare). *Gekkan HACCP*, **5**, 25-33 (2008).
- 4) Reese, G., Ayuso, R., Lehrer, S. B. Tropomyosin: An invertebrate pan-allergen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **119**, 247-258 (1999).
- 5) Lehrer, S. B., Ayuso, R. Seafood allergy and allergens: a review. *Mar. Biotechnol.*, **5**, 339-348 (2003).
- 6) Shibahara, Y., Oka, M., Tominaga, K., Ii, T., Umeda, M., Uneo, N., Abe, A., Ohashi, E., Ushio, H., Shiomi, K. Determination of crustacean allergen in food products by sandwich ELISA. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* (Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology), **54**, 280-286 (2007).
- 7) Sakai, S., Matsuda, R., Adachi, R., Akiyama, H., Maitani, T., Ohno, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Shiomi, K., Urisu, A. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *J. AOAC Int.*, **91**, 123-129 (2008).
- 8) Shibahara, Y. Shokuhinchū no koukakurui allergen no kenshutsuhō (Detection method of crustacean allergen in food products). *Shokuhin to Gijutsu*, **436**, 10-18 (2007).

- 9) Konagaya, S. Protease activity and autolysis of antarctic krill. *Nippon Suisan Gakkaishi* (Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries), **46**, 175-183 (1980).
- 10) Asahara, M. Studies on proteolytic enzyme in the liver of the shrimp, *Trachypenaeus curvirostris*. *Nippon Suisan Gakkaishi* (Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries), **39**, 987-991 (1973).
- 11) Galgani, F., Nagayama, F. Characteristic of digestive proteolysis of the crabs *Portunus trituberculatus*, *Portunus sanguinolentus* and *Charybdis japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi* (Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries), **52**, 2183-2188 (1986).
- 12) Jiang, S., Moody, M., Chen, H., Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Sci.*, **56**, 322-326 (1991).
- 13) Vonk, H., Western, J. Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion. Academic Press. Inc., London, 1984, p. 200-207.
- 14) Hoffman, R., Day, D. Jr., Miller, J. S. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann. Allergy*, **47**, 17-22 (1981).
- 15) Weerasinghe, V., Morrissey, M., Chung, Y., An, H. Whey protein concentrate as a protease inhibitor in pacific whiting surimi. *J. Food Sci.*, **61**, 367-371 (1996).
- 16) Eakpetch, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijroongrojana, K. Autolysis of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) meat: Characterization and the effects of protein additives. *J. Food Sci.*, **73**, S95-S103 (2008).