

山口県における食品中の特定原材料「えび」、「かに」の実態調査

山口県環境保健センター
三浦泉, 仙代真知子, 片山弘子, 藤原美智子, 立野幸治

A survey of crustacean such as “shrimp” and “crab” contents in processed food ingredients

Izumi MIURA, Machiko SENDAI, Hiroko KATAYAMA, Michiko FUJIWARA, Kouji TACHINO
Yamaguchi Prefectural Institute of Public Health and Environment

緒言

食品衛生法が平成13年に改正され小麦, そば, 卵, 乳, 落花生の5品目が特定原材料として表示が義務づけられ, さらに, 平成20年6月には「えび」, 「かに」が追加された。また, 特定原材料の検査法は, 平成22年9月に消費者庁に所管が変更されるに伴い通知された試験法(通知法)により検査が行われている。通知法では「えび」, 「かに」を含む甲殻類タンパク質であるトロポミオシンを2種類の ELISA キットを用いてスクリーニング検査を実施し, どちらか一方が甲殻類として陽性(10 μ g/g)となった場合に PCR 法(通知法 PCR)により, 「えび」又は「かに」の確認検査を実施することになっている¹⁾。

食物アレルギーは, 乳幼児期には, 卵, 牛乳が中心とされているが, 成人では甲殻類が最も多く, 「えび」, 「かに」などの特に十脚目と呼ばれる甲殻類に由来するとされる食物アレルギー症状は, 食品順位5位に入り, 食物依存性アナフィラキシーショックのような重篤な症状の頻度が多いことが知られている²⁻⁵⁾。また, 「えび」と「かに」の交叉性についても「えび」に対してアレルギー症状を誘発する患者の65%が「かに」に対しても反応するとされ, 諸外国においても「えび」, 「かに」を含む甲殻類が義務表示となっている⁶⁾。

山口県は日本海と瀬戸内海に面する地理的特性上, 水産加工業者が多いが, 加工品の中には網で分別せ

ずに捕獲された魚介類に「えび」, 「かに」を含む甲殻類を混獲, あるいは甲殻類を補食している魚介類が加工行程で消化管内容物を混入している可能性があり県内産加工品の甲殻類タンパクの実態が不明確であった。そのため県内で製造, 流通している水産加工品の「えび」, 「かに」等の甲殻類の実態調査を行った。

実験方法

1 試料

県内水産加工品のうち注意喚起表示の無い魚肉練り製品及び魚介類乾製品(表1)。

2 試薬および試液

(1) 定量検査 ELISA 法

ア 試薬

「えび」, 「かに」等の甲殻類由来のタンパク質の抽出ならびに定量は, 通知法に基づき日水製薬社製の FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」及びマルハニチロホールディングス社製甲殻類キット「マルハ」を用いた。

イ 機器

加工品の粉碎・均一化には, イワタニ社製 LM2, 振とう器にはタイテック社製 SR-2S, 超純水装置はミリポア社製 SimpliLab, マイクロプレートウォッシャーには, Biochrom Asys 社製 ATLANTIS, 吸光度の測定にはバイオラッド社製 Model680, 解析ソフトウェアにはバイオラッド社製マイクロプレートマネージャーver5.0 を用いた。

表 1 検査製品一覧

No.	分類	食品名
1		するめ足
2		さきいか
3		いりこ ^{*1}
4		焼あじ
5		ウルメバラ干し
6		田づくり
7	魚介類乾製品	サヨリみりん
8		いわし削り節 ^{*1}
9		ちりめん ^{*1}
10		いりこ ^{*1}
11		さきいか
12		平太郎
13		ちりめん ^{*1}
14		焼きちくわ
15		蒸し板かまぼこ ^{*2}
16		焼抜きかまぼこ ^{*4}
17		蒸し板かまぼこ ^{*2}
18		蒸しかまぼこ ^{*2}
19		ひら天 ^{*3}
20		焼抜きかまぼこ ^{*4}
21		天ぷら ^{*5}
22		焼ちくわ
23		焼抜きかまぼこ ^{*4}
24		焼抜きかまぼこ ^{*4}
25		焼抜きかまぼこ ^{*4}
26		焼ちくわ
27	魚肉練り製品	焼抜きかまぼこ
28		天ぷら ^{*3}
29		焼きちくわ
30		せんべい天じゃこ ^{*3}
31		焼抜きかまぼこ ^{*4}
32		てんぷら ^{*3}
33		てんぷら ^{*3}
34		てんぷら ^{*3}
35		焼ちくわ
36		てんぷら ^{*3}
37		焼抜きかまぼこ ^{*4}
38		蒸しかまぼこ ^{*2}
39		焼抜きかまぼこ ^{*4}
40		焼抜きかまぼこ ^{*4}

製品分類: ^{*1}いわし稚魚製品、^{*2}蒸しかまぼこ、^{*3}揚かまぼこ、^{*4}焼かまぼこ

ウ データ解析

マイクロプレートマネージャーver5.0 は通知法のとおりにデータの解析を行うと4係数ロジスティック解析では低濃度時に誤差が大きくなる事が判明したため5係数ロジスティック解析を行った⁷⁾。8 濃度の標準溶液の測定値から標準曲線を作成した。食品採取重量 1 g あたりの原材料由来のアレルゲンタンパク質含量が

10 μg (10 ppm)以上の試料については、微量を超えるアレルゲンが混入している可能性があるものと判断した。

(2) 確認検査 PCR 法

ア 試薬

DNA の抽出には、CTAB 法(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)法を用いた。CTAB には、シグマ社製、0.5mM EDTA (pH8.0), 1M Tris-塩酸 (pH8.0) 及び NaCl には、和光純薬社製を用いた。陽性対象コントロール、植物 DNA 検出用プライマー対、えび検出用プライマー対ならびにかに検出用プライマー対はファスマック(株)社製を用いた。PCR 反応試薬はアプライドバイシステムズ社製 Ampli Taq Gold & 10×PCR buffer II /MgCl₂ with dNTPs を用いた。制限酵素 HaeIII, 100bp および 20bp DNA Ladder にはタカラバイオ社製、loading Buffer, エチジウムブロミドはアルドリッチ社製を使用した。TE 緩衝液, TBE 緩衝液にはナカライテスク社製を用いた。アガロースゲルの作成には、Roche・diagnostica 社製 AgaroseLE ならびに和光純薬社製 AgaroseX を用いた。

イ 機器

抽出 DNA の濃度測定には島津製作所社製 Biospec-nano, DNA 増幅にはアプライドバイシステムズ社製サーマルサイクラー Gene Amp PCR System 9700, 電気泳動装置には Advance 社製 Mupido EX, ゲルイメージ解析装置にはアトー(株)社製 AE-6933FXCF-U を用いた。

(3) 通知法 PCR 条件

ア 植物特異的 PCR 条件

PCR 反応液は最終濃度が1×PCR 緩衝液, 0.2 μmol/L プライマーCP03-5' (5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3') および CP03-3' (5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3') 0.2 μmol/L dNTP, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.625U Taq polymerase となるように混合し, 20 ng/μL に希釈調製した DNA 溶液を 2.5 μl 加え, 滅菌水により全量を 25 μL とした。試液

表 2 特定原材料(甲殻類) 定量結果

製品	FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(μg/g)	甲殻類キット「マルハ」(μg/g)
1	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.
3	0.51	0.58
4	N.D.	N.D.
5	N.D.	N.D.
6	N.D.	N.D.
7	0.38	0.83
8	0.55	1.23
9	1.1	1.49
10	>20	>20
11	N.D.	N.D.
12	N.D.	N.D.
13	5.6	7.51
14	3.84	5.42
15	3.89	8.02
16	N.D.	N.D.
17	4.53	8.75
18	4.22	7.7
19	2.09	4.59
20	N.D.	0.46
21	1.49	3.2
22	0.53	N.D.
23	0.43	0.55
24	17.85	>20
25	0.43	2.14
26	2.18	4.18
27	1.92	2.65
28	1.07	3.89
29	1.85	4.46
30	2.78	4.74
31	0.63	1
32	>20	>20
33	3.59	5.4
34	3.62	5.35
35	2.51	2.55
36	1.93	2.5
37	N.D.	N.D.
38	1.56	1.67
39	0.51	0.63
40	N.D.	N.D.

* N.D. ≤ 0.31 μg/g

を混和後, 95°C10 分保持, 95°C30 秒間, 60°C30 秒間, 72°C30 秒間を1サイクルとして, 40 サイクルの増幅反応を行った後, 72°C7分間最終伸張反応を行った。

イ えび由来 PCR 条件

PCR 反応液は最終濃度が1×PCR 緩衝液, 0.3 μmol/L プライマーShH12-05' (5'-TTA TAT AAA GTC TRG CCT GCC-3') および ShH13-03' (5'-GTC CCT CTA GAA CAT TTA AGC CTT TTC-3' , 5'-GTC CCT TTA TAC TAT TTA AGC CTT TTC-3' ならびに 5'-GTC CCC CCA AAT TAT TTA AGC CTT TTC-3' を 1:1:1 の比率で混合) 0.3 μmol/L dNTP , 1.5mmol/L MgCl₂, 0.625U Taq polymerase となるように混合し, 20 ng/μL に希釈調製した DNA 溶液を 2.5 μL 加え, 滅菌水により全量を 25 μL とした。試液を混和後, 95°C10 分保持, 95°C1 分間, 56°C1 分間, 72°C1 分間を1サイクルとして, 45 サイクルの増幅反応を行った後, 72°C7分間最終伸張反応を行った。

ウ か)に特異的 PCR 条件

PCR 反応液は最終濃度が1×PCR 緩衝液, 0.2 μmol/L プライマーCrH16-05' (5'-GCG TTA TTT TTT TTG AGA GTT CWT ATC GTA-3' , 5'-GCG TAA TTT TTT CTG AGA GTT CTT ATC ATA-3' , 5'-GCG TTA TTT TTT TTA AGA GTA CWT ATC GTA-3' ならびに 5'-GCG TTA TTT CTT TTG AGA GCT CAT ATC GTA -3' を 10:1:6:3 の比率に混合) および CrH11-03' (5'-TTT AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA AGT-3') 0.2 μmol/L dNTP , 2.0mmol/L MgCl₂, 0.625U Taq polymerase となるように混合し, 20 ng/μL に希釈調整した DNA 溶液を 2.5 μL 加え, 滅菌水により全量を 25 μL とした。試液を混和後, 95°C10 分保持, 95°C30 秒間, 54°C30 秒間, 72°C30 秒間を1サイクルとして, 40 サイクルの増幅反応を行った。

エ えび特異的 PCR 産物の制限酵素消化

えびの検知を目的とした PCR 増幅において一部の

かに由来増幅産物が検出されることが判明しているため、PCR 増幅産物がえびに由来するものかを判断するために PCR 産物を PCR 増幅反応液 17 μ L, 制限酵素 10 \times M バッファー 2 μ L, 制限酵素 HaeIII 1 μ L を混合し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間処理しえび由来の制限酵素消化断片を確認した。

結果および考察

1 特定原材料(甲殻類)定量

各検体に含まれる「えび」、「かに」等の甲殻類由来タンパク質の結果を表 2 に示す。

魚介類乾製品では 13 検体中 6 検体に「えび」、「かに」等甲殻類由来タンパク質が検出された(陽性率 46%)。その中で 10 μ g/g 以上が 1 検体、10 μ g/g 以下で陽性となった 5 検体の平均は 1.98 μ g/g であった。

魚介類乾製品の中でしらす、ちりめんじゃこ等のいわゆる稚魚製品では陽性率が 100% であり、「えび」、「かに」の幼生等が混獲されている可能性が認められた。

魚肉練り製品では、27 検体中 24 検体に「えび」、「かに」等甲殻類由来のタンパク質が検出された(陽性率 88.9%)。その中で揚かまぼこ類は陽性率 100% であり、2 検体は、10 μ g/g 以上の甲殻類由来タンパク質が検出された。

今回の検体のうち、魚肉練り製品の原材料表示のある魚種はエソ、タラ、タチおよびグチ等が主なものであった。一般的にすり身の原料として用いられる魚種は、さまざまな甲殻類を補食しており加工行程で消化管内内容物が混入し、甲殻類タンパク質が検出された可能性が高いことが知られている⁸⁾。今回の実態調査も同様な結果であった。また、魚肉練り製品は複数の魚種を原材料として利用するためにタラなど比較的大きな魚をすり身の原材料として用いる場合とグチなどの小型の魚をすり身の原材料として用いる場合の甲殻類の混入する関連性は不明であった。

表 3 特定原材料確認検査結果

測定対象	核酸濃度 (ng/ μ L)	えび	かに	HaeIII
1	49.39	—	—	
2	41.63	—	—	
3	179.59	+	—	+
4	42.27	—	—	
5	1059.8	—	—	
6	682.29	—	—	
7	180.37	—	—	
8	393.21	—	+	
9	591.52	—	+	
10	55.98	+	+	+
11	42.68	—	—	
12	44.02	—	—	
13	69.25	+	+	+
14	45.28	+	—	+
15	36.37	+	—	+
16	106.65	—	—	
17	40.67	+	—	+
18	57.23	+	—	+
19	118.19	+	—	+
20	39.76	—	—	
21	47.04	+	—	+
22	19.84	—	+	
23	30.19	—	+	
24	55.98	+	+	+
25	40.64	—	+	
26	21.46	+	+	+
27	41.63	—	+	
28	44.4	+	+	+
29	47.04	+	+	+
30	171.46	+	—	+
31	48.36	+	—	+
32	4.73	+	—	+
33	4.67	+	—	+
34	13.58	+	—	+
35	28.03	+	+	+
36	36.77	+	+	+
37	9.42	—	—	
38	43.69	+	—	+
39	29.5	—	+	
40	16.02	—	+	

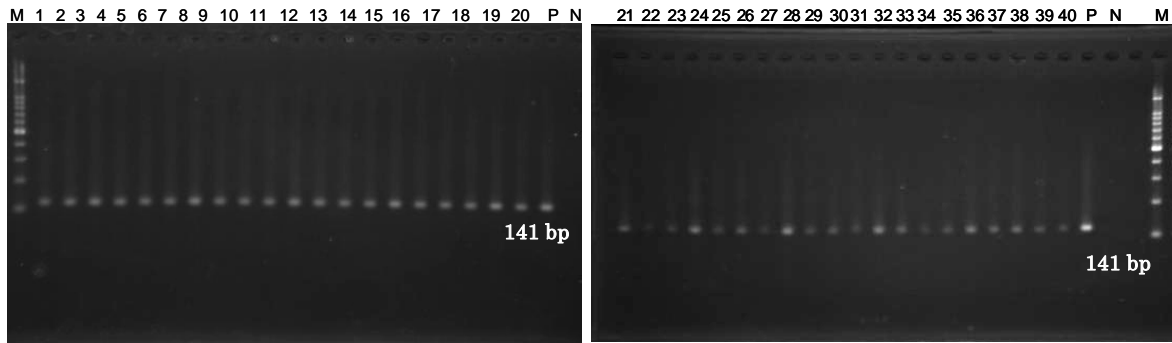


図 1 県内産水産加工食品の通知法確認検査 (植物)

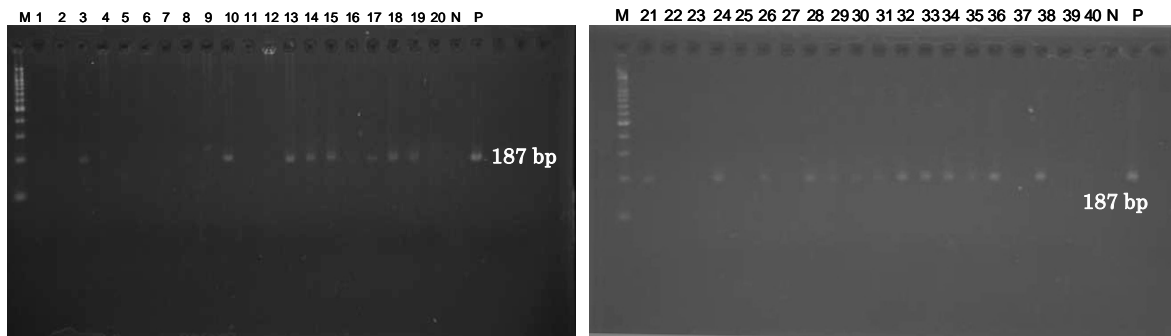


図 2 県内産水産加工食品の通知法確認検査 (えび)

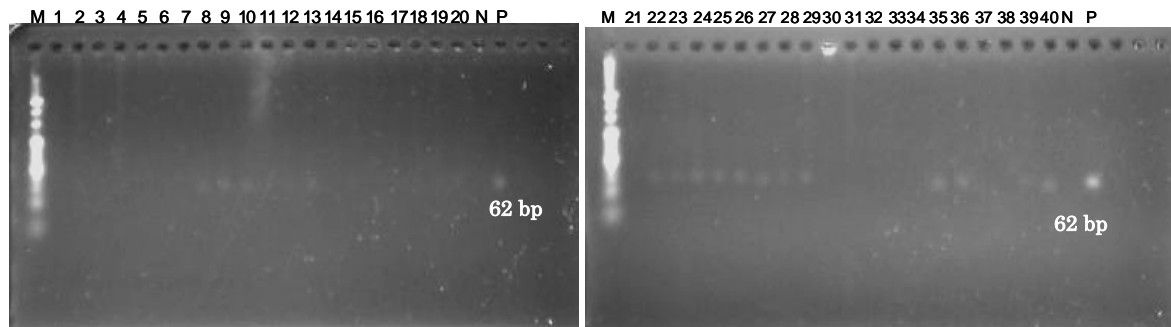


図 3 県内産水産加工食品の通知法確認検査 (かに)

① するめ足 ② さきいか ③ いらいこ ④ 焼あじ ⑤ ウルメバラ干し ⑥ 田づくり ⑦ サヨリみりん ⑧ いわし削り節 ⑨ ちりめん ⑩ いらいこ
⑪ さきいか ⑫ 平太郎 ⑬ ちりめん ⑭ 焼ちくわ ⑮ 蒸し板かまぼこ ⑯ 焼抜きかまぼこ ⑰ 蒸し板かまぼこ ⑱ 蒸しかまぼこ ⑲ ひら天 ⑳ 焼抜きかまぼこ
㉑ 天ぷら ㉒ 焼ちくわ ㉓ 焼抜きかまぼこ ㉔ 焼抜きかまぼこ ㉕ 焼抜きかまぼこ ㉖ 焼ちくわ ㉗ 焼抜きかまぼこ ㉘ 天ぷら ㉙ 焼ちくわ ㉚ せんべい天じゃこ
㉛ 焼抜きかまぼこ ㉜ てんぷら ㉝ てんぷら ㉞ てんぷら ㉟ 焼ちくわ ㊱ てんぷら ㊲ 焼抜きかまぼこ ㊳ 蒸しかまぼこ ㊴ 焼抜きかまぼこ ㊵ 焼抜きかまぼこ
M: DNA 分子量マーカー, P: ポジティブコントロール, N: ネガティブコントロール

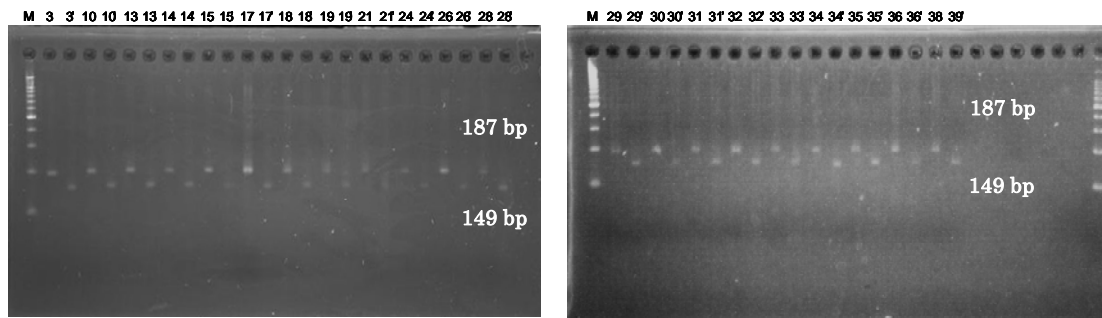


図 4 県内産水産加工食品のえび特異的PCR産物と制限酵素HaeIIIによる消化

③いりこ ⑩いりこ ⑬ちりめん ⑭焼ちくわ ⑮蒸し板 かまぼこ ⑰蒸し板 かまぼこ ⑱蒸しかまぼこ ⑲ひら天 Ⅱ天ぷら Ⅲ焼抜きかまぼこ Ⅳ焼ちくわ Ⅴ天ぷら
Ⅵ焼ちくわ Ⅶせんべい天じゃこ Ⅷ焼抜きかまぼこ Ⅷてんぷら Ⅸてんぷら Ⅹてんぷら Ⅺ焼ちくわ Ⅻてんぷら Ⅼ蒸しかまぼこ Ⅽ焼抜きかまぼこ
M: DNA 分子量マーカー

2 植物特異的 PCR 反応

通知法 PCR のとおり、検体中の DNA が確実に抽出された事を確認するため、植物特異的 PCR を行った。魚介類乾製品は概ね良好な抽出結果であった(表 3)。しかし、一部の魚肉練り製品では原材料の一部に多糖類や増粘剤が含まれており抽出が困難であったが明瞭な増幅バンドが得られ DNA が抽出されていることが確認できた(図 1)。

3 えび、かに特異的 PCR 反応

魚介類乾製品のうち、えび特異的 PCR では甲殻類由来タンパク質陽性検体 6 検体中 3 検体が検出された(図 2)。また、かに特異的 PCR は 4 検体で検出された(図 3)。甲殻類由来タンパク質が高濃度であるほど、えび、かにいずれもが検出されることが判った。特に、いわし稚魚類は全てに検出されることから、魚類の生息域における混獲により甲殻類のコンタミネーションが多いと推測できた。

一方、魚肉練り製品のうち、えび特異的 PCR では甲殻類由来タンパク質陽性検体 24 検体中 18 検体が検出された(図 2)。また、かに特異的 PCR では 12 検体が検出された(図 3)。その中で揚かまぼこ類では、えびが全て検出されたが、その他の魚肉練り製品では明確な検出頻度の違いは見いだせなかった。表 4 のように同じ魚種を使用した別の製品で、えび又はかにの検出頻

度の違いは無かったために消化管内容物の処理工程に依存することが考えられた。

4 えび特異的 PCR 増幅産物の制限酵素による消化

えび由来 PCR 産物は一部のかにも同様に増幅する事が知られており、制限酵素による増幅産物を消化し確認する必要がある。そこで魚介類乾製品、魚肉練り製品中でえびが検出された検体の PCR 増幅産物を -GGCC-部位を切断する HaeIII 制限酵素を用いて消化した全ての検体で増幅産物の消化が認められた(図 4)。また、シャンハイガニのみ制限酵素を用いてもえびと同様に消化されることが判っているが、原材料の魚種から、かに由来 PCR 増幅産物ではないと判断できた。

表 4 魚肉練り製品中の魚種

16	焼抜きかまぼこ	タラ, グチ
28	天ぷら	タチ, エソ
30	せんべい天じゃこ	スケソウダラ
31	焼抜きかまぼこ	タラ, エソ, レンゴダイ
32	てんぷら	タラ, タチ, エソ
33	てんぷら	エソ, グチ, トラハゼ, ジャコ
34	てんぷら	エソ, グチ, トラハゼ, ジャコ
35	焼ちくわ	スケソウダラ, イトヨリ
36	てんぷら	イトヨリ, ヒメジ
37	焼抜きかまぼこ	スケソウダラ, ミナミダラ
38	蒸かまぼこ	スケソウダラ, イトヨリ

*記載されたもののみ

結語

県内水産加工品のうち注意喚起表示の無い魚肉練り製品及び魚介類乾製品中の「えび」、「かに」等甲殻類の実態調査を目的とし通知法に基づき ELISA 法による定量分析と PCR 法による確認検査を行った。定量分析は 40 検体中 30 検体（魚介類乾製品 13 検体中 6 検体，魚肉練り製品 27 検体中 24 検体）より「えび」、「かに」由来の甲殻類タンパク質が検出された。確認検査では 40 検体中 29 検体（魚介類乾製品 13 検体中 5 検体，魚肉練り製品 27 検体中 24 検体）より「えび」、「かに」特異的 PCR 増幅バンドが検出された。

ELISA 定量結果と PCR 結果を比較したところ，結果はほぼ一致していた。一部の試料では ELISA で検出，PCR で不検出等の結果が見られたが，ELISA で偽陽性を示すオキアミ等のその他の甲殻類がコンタミネーションを起こしている可能性又は PCR 法との感度の差が原因であるとされる同様な事例があり⁹⁾，ELISA での定量結果は定量下限値付近のため検査結果に影響を与える可能性は低いと考えられた。

実態調査結果から，魚介類乾製品ではちりめんじやこ等のイワシ稚魚類，魚肉練り製品のうち揚かまぼこ類は高頻度で混獲もしくは甲殻類の補食により「えび」、「かに」等の甲殻類が混入していることが明らかになった。同時に甲殻類タンパク質が高濃度の場合「えび」、「かに」いずれもが検出される傾向にあることが判った。

水産加工品は，原料である魚種等の生息環境，捕獲時期や方法，加工行程により「えび」、「かに」等の甲殻類が混入する可能性は常にある。しかし厚生労働省の Q&A¹⁰⁾にあるようにコンタミネーションの恐れ等がある場合は表示の義務は無いが，本実態調査の結果にあるようにイワシ稚魚類や揚かまぼこ類などは比較的高濃度の甲殻類タンパク質が検出されている。そのため，加工時に確実にコンタミネーションを低下させる工程や注意喚起表示など

の対策をとることが望ましいと考えられた。

また，現時点の通知法における分析は定量検査が「えび」、「かに」を甲殻類として定量し，確認検査は「えび」と「かに」を区別する PCR 法により定性を行っている。特に定性検査は「えび」、「かに」特異的 PCR を行った後，制限酵素を用いて PCR 産物を消化し確認する等，そばなどの他のアレルギー物質の PCR 検査法と比較して手順が増え，かに特異的 PCR 産物の電気泳動などは，吉光らが報告しているようにある程度の手技が必要とされる¹¹⁾。さらに，原材料に「あきあみ」「しゃこ」又は「大豆」等が混入している可能性がある場合は，さらにその他の PCR 法を用いて確認する必要がある，より短時間で簡便な試験法が望まれる。

文献

- 1) 消費者庁次長通知:アレルギー物質を含む食品の検査法について，平成 22 年 9 月 10 日，消費表第 286 号
- 2) 中村晋，飯倉洋治:最新食物アレルギー，第 1 版 永井書店，241-244(2002)
- 3) Ebisawa, M., Ikematsu, K., Imai, T., Tachimoto, Food allergy in Japan. J. World Allergy Org., 15, 214-217 (2003).
- 4) Nakamura, S., Iikura, Y., "Saishin Shokumotsu allergy," Nagai Shoten, 2002, p.241-244.
- 5) Imai, T., Iikura, Y., The national survey of immediate type of food allergy, arerugi, 52, 1006-1013 (2003)
- 6) Tomikawa, M., Suzuki, N., Urisu, A., Tsuburai, T., Ito, S., Shibata, R., Ito, K., Ebisawa, M., Characteristics of shrimp allergy from childhood to adulthood in Japan, arerugi, 55, 1536-1542 (2006)
- 7) 亀山浩:アレルギー物質を含む食品の検査法について，日本食品衛生学会第 100 回学術講演会

- 8) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡道弘, 阿部晃久, 清木興介, 織田浩志, 吉岡久史, 塩見一雄, 宇理須厚雄, 穂山浩, 手島玲子:食品原料に含まれる「えび」, 「かに」等の甲殻類タンパク質の実態調査, 日本食品衛生学雑誌, 15(1)12-17(2008)
- 9) 安達玲子, 酒井信夫, 中村厚, 穂山浩, 手島玲子:魚肉すり身を原材料とする加工食品に含まれる甲殻類実態調査, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年回講演集
- 10) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, アレルギー物質を含む食品の表示について, 平成16年12月24日, 食安発第1224002号
- 11) 吉光真人, 清田恭平, 阿久津和彦, 尾花裕孝:特定原材料「えび」「かに」検査 その2 -確認検査について-, 第 47 回全国衛生化学技術協議会年回講演集