

を解凍後、腹部第1節と第2節の間を切断し、殻を除去した後、腹部中心にある腸を除去したエビ尾肉をフードプロセッサーにて均一化した。均一化されたエビ尾肉は凍結乾燥後、ミルサーを用いて細砕し、一次標準粉末とした。一次標準粉末のタンパク質量をアマシヤムバイオサイエンス社製 2-D Quant kit で定量したところ、0.684 g/gであった。タンパク質濃度および加工による試料の重量変化を考慮して、一次標準粉末添加量を決定した。

試料の均一性評価: 試料の均一性が試験室間バリデーションに適用可能かどうかの評価を行った。評価手順を以下に示す。

1. 均一化し小分けした試料から6個を採り、それぞれから1gを2回採取した。
2. 採取した試料を抽出手順に従って抽出した。
3. 各抽出液につき、2ウェル併行で甲殻類測定試薬「ニッスイ」を用いて定量した。
4. 2ウェルから得られた結果の平均値を用い、2×6の分散分析を行い、試料内の分散および試料間の分散を求めた。

試験室: 以下の10機関により試験室間バリデーションを実施した。

1. 株式会社日清製粉グループ本社 R&D・品質管理本部QEセンター
2. 株式会社ファスマック遺伝子検査事業部
3. 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科中毒化学研究室
4. 財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター微生物試験課
5. 株式会社ニッポンジーン研究試薬部開発課製品開発グループ
6. 昭和産業株式会社総合研究所分析センター
7. 財団法人食品環境検査協会東京事業所
8. 財団法人日本食品分析センター千歳研究所生物科学課
9. ロート製薬株式会社製品開発部技術研究グループ
10. 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社品質保証部検査課

バリデーション手順: 参加機関にバリデーション手順に関する文書、試料5種類、キット2種類、各キットの測定マニュアルを送付した。

参加機関は試料毎に2回の抽出・測定を行った。測定は3ウェルを用い、同一プレート上で8濃度(ブランクを含む)の検量線の測定も行った。得られた結果(吸光度)を国立医薬品食品衛生

研究所食品部に返送した。

国立医薬品食品衛生研究所では、参加機関から送付された吸光度データに基づいて検量線(4係数ロジスティック曲線)を作成し、この検量線を使って各試料中の抗原の濃度を計算した。検量線の作成は simplex 法により行った。3ウェルの定量値の平均値を用い、1回目と2回目の抽出による結果を併行試験として扱った。AOAC INTERNATIONAL の手順に従い、外れ値を除外するために Cochran 検定および Grubbs の検定(両者とも有意水準 2.5%)を行った後、平均値、併行再現性および室間再現性を求めた。また、JIS Z8402-5 の方法による頑健な統計量に基づいた平均値、併行再現性および室間再現性も計算した。

4) 貝類のアレルゲン

試料: 巻貝4種(古腹足目ミミガイ科のクロアワビ、サザエ科のサザエ、新腹足目エゾバイ科のエゾボラおよびエゾバイ)、二枚貝7種(フネガイ目フネガイ科のアカガイ、カキ目イタボガキ科のマガキ、マルスダレガイ目ザルガイ科のトリガイ、バカガイ科のウバガイおよびミルクイ、マテガイ科のマテガイ、マルスダレガイ科のアサリ)の合計11種貝類を用いた。クロアワビは貝殻筋、マガキは閉殻筋、ミルクイは水管、アサリは可食部、その他は足筋を実験に用いた。

加熱抽出液の調製: 各試料に4倍量の0.15 M KCl-0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)を加えてホモジナイズした。ホモジネイトを加熱(100℃、10分間)後、冷却遠心分離(18,000xg、4℃、20分間)により得られた上清を加熱抽出液とした。

精製トロポミオシンおよびトロポミオシン抗体: 精製トロポミオシンはサザエの足筋、スルメイカの外套膜、アメリカンロブスターの腹部筋肉から調製した。タラバガニのトロポミオシンに対するポリクローナル抗体(抗血清)は東京海洋大学資源利用科学研究室の潮 秀樹助教授より提供していただいた。

SDS-PAGE: SDS-PAGE には泳動装置として PhastSystem (Amersham Biosciences) を、ゲルとして PhastGel Gradient 8-25 (Amersham Biosciences) を使用した。泳動に先立ち、各加熱抽出液およびサザエの精製トロポミオシンを5% ジチオスレイトール-2.5% SDS 溶液に溶解し、沸騰水浴中で10分間加熱変性した。泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Precision plus protein standards (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

イムノブロットイング: SDS-PAGE で泳動させたタンパク質は PhastSystem の取扱説明書に従いニ

トロセルロース膜に転写した。転写後の膜は一次抗体として患者血清(1:500)あるいはポリクローナル抗体(1:30,000)と37℃、1時間反応させた。次いで二次抗体として、一次抗体に血清を用いた場合にはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgE抗体(1:10,000)と、ポリクローナル抗体を用いた場合にはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(1:20,000)と37℃、1時間反応させた。検出にはECL plus western blotting detection system(Amersham Biosciences)を用いた。阻害イムノブロッティングの場合は、サザエ、スルメイカまたはアメリカンロブスターの精製トロポミオシン溶液(10 µg/mL)と患者血清(1:250)を等量ずつ混合し、37℃、1時間ブレインキュベートしたものを一次抗体として用い、その他の操作は上述のイムノブロッティングと同様に行った。

cDNA クローニング:17年度の研究において、クロアワビ、サザエ、アカガイおよびアサリのトロポミオシンについては全アミノ酸配列を、マガキ、トリガイおよびウバガイのトロポミオシンについては部分アミノ酸配列をcDNAクローニング法により明らかにした。18年度はまず、マガキ、トリガイおよびウバガイの3種については前年度から継続してPCR増幅産物の塩基配列を解析し、全アミノ酸配列の解明に努めた。次に、エゾボラ、エゾバイ、ミルクイおよびマテガイの筋肉からTRIzol試薬を用いてtotal RNAを抽出した。total RNAから合成した1st strand cDNAをテンプレートとし、既知の貝類トロポミオシンをコードするcDNAの保存性の高い塩基配列領域に基づいて設計した特異プライマーを用いて3'RACEを行った。3'RACEにより明らかになった部分塩基配列をもとに5'RACEを行い、残りの塩基配列を決定した。

5)魚卵のアレルゲン

実験 a:イクラに含まれる・コンポーネント(・)とリポビテリン(Lv)に対するポリクローナル抗体(それぞれa-・とa-Lv:ウサギ)を調製し、これらと7魚種(サケ科3種、スケトウダラ、カペリン、カレイ、ニシン)の卵黄タンパク質との反応性をウエスタンブロットと競争ELISAで検討した。

実験 b:17人のイクラアレルギー患者血清について、8魚種の卵黄タンパク質に対する特異IgEの反応性を調べた。

C. 研究結果

1)甲殻類検知キット(甲殻類測定試薬「ニッスイ」)の性能

標準曲線および検出限界:標準液濃度として

0.78-50 ng/mLの範囲で良好な反応性を確認した。検出限界は0.78 ng/mL以下であった。

再現性:甲殻類総タンパク質濃度として標準溶液を用いて再現性を確認した。その結果、同時再現性はCV値が10%以下、日差再現性もCV値が10%以下であり、良好な精度を確認した。

交差反応性:精製トロポミオシンに対する反応性は、甲殻類はタンパク質濃度として1 ppm溶液、軟体動物はタンパク質濃度として1,000 ppm溶液を用いて、甲殻類検知キットで測定した。また、食品サンプル(84検体)を用いた試験では、所定の方法により試料溶液を調製し測定した。その結果、開発した検知キットは、3種類のえび類(ブラックタイガー、クルマエビ、アメリカンロブスター)、かに類(ズワイガニ)、やどかり類(タラバガニ)、おきあみ類(ナンキョクオキアミ)の精製トロポミオシンに反応することを確認した。一方、いか類(スルメイカ)、たこ類(マダコ)、貝類(クロアワビ、エゾバイ、アサリ、ホタテガイ、マガキ)などの軟体動物では0.1%未満の交差率であった。また、食品サンプル(84検体)を用いた試験では、甲殻類に分類されるえび類、かに類、やどかり類、しゃこ類、おきあみ類、ふじつぼ類の19検体は測定上限(甲殻類総タンパク質濃度として20 ppm)を超える反応であった。一方、甲殻類以外の検体はすべて1 ppm未満であった(表2)。

加熱の影響:加熱の影響を調べるために、標準溶液(10 ppm)を、1)60℃、30分、2)100℃、30分、3)121℃、10分にそれぞれ供し、甲殻類検知キットで測定した。その結果、未処理の標準液に対する回収率を100%とした場合、60℃、30分で処理した標準液に対する回収率は93.3%、100℃、30分で93.9%、121℃、10分で80.0%であった。

2)甲殻類検知キット(甲殻類キット「マルハ」)の性能

各種甲殻類、軟体動物との反応性の検討:各種甲殻類、軟体動物の反応曲線を図1に示す。本測定法は、程度に差はあるものの甲殻類全般に反応性を示し、特に十脚目で強い反応性を認めた。一方、軟体動物には反応性を示さなかったことから、本測定法は甲殻類に特異性の高い系であることが確認された。

モデル加工食品を用いた本測定法の評価:試験室間バリデーションに先立ち、5種類のモデル加工食品を用いて本測定法の回収率と再現性を自社にて予備的に評価した。その結果、魚肉ソーセージの回収率は108%、FD卵スープは112%、鶏肉団子は107%、クリームコロッケは111%、トマトソースは115%と、いずれのモデル加工食品に

においても良好な回収率が認められた。また、魚肉ソーセージの併行再現性は2.0%、室内再現性は6.6%、FD卵スープでは併行再現性が2.7%、室内再現性が2.9%、鶏肉団子では併行再現性が3.7%、室内再現性が4.5%、クリームコロッケでは併行再現性が4.6%、室内再現性が7.6%、トマトソースでは併行再現性が2.7%、室内再現性が7.9%と、いずれも併行再現性は5%未満、室内再現性は10%未満と、良好な再現性が認められた(表3)。また、各モデル加工食品における希釈直線性を評価した結果、いずれの食品においても良好な希釈直線性(回帰係数 $r^2=0.995\sim0.999$)が認められ(図2)、本測定法では食品マトリックスの影響を受けずに正確な測定が可能であることが示唆された。

各種原材料との交差反応性の検討: 今回検証を行った各種原材料で交差反応性を示すものは認められなかった。

市販加工食品を用いた本測定法の評価: 今回検証を行った市販加工食品の中で、原材料名に甲殻類の表示のある品目に関してはいずれも甲殻類タンパク質が検出された(61-143,000 ppm)。また、これら品目を対象に希釈試験を実施した結果、いずれの食品も良好な希釈直線性($r^2=0.991-1.000$)を示し、本測定法は市販食品においても食品マトリックスの影響を受けることなく、正確に甲殻類タンパク質を測定可能であることが示唆された。また、今回検証を行った範囲では、甲殻類の表示のない品目では甲殻類タンパク質は検出されなかった(<1.0 ppm)。

3) 甲殻類検知キットのバリデーション

試料の均一性評価結果: 各試料の抗原濃度の均一性評価結果を、表4に示す。この結果、5試料すべてについて、試料間の分散は試料内の分散に比較して有意に大きくなかった。さらに、試料内と試料間を含めた全体の変動は6%以下であった。この結果により、これらの試料は試験室間バリデーションのための試料として使用可能と考えられた。

試験室間バリデーション結果: 5種類の試料について、添加量に対する回収率、併行精度(RSD_r)、室間精度(RSD_p)を評価した。それぞれのキットのバリデーション結果を表5および6に示す。

甲殻類キット「マルハ」による回収率は、クリームコロッケで82%、その他の試料では90%以上であり、極めて良好な真度であった。2回抽出間の併行精度はいずれの試料においても $RSD10\%$ 以下であった。室間精度は併行精度よりもかなり大きく、15-25%の範囲であった。

甲殻類測定試薬「ニッスイ」の回収率は90%以

下であり、すべての試料において甲殻類キット「マルハ」の回収率よりも低い結果となった。しかし併行精度 RSD は3-6%と良好で、室間精度もすべての試料で10%以下であり、高い精度が得られた。

4) 貝類のアレルゲン

11種類貝類の加熱抽出液をサザエから精製したトロポミオシンとともに $SDS-PAGE$ に供したところ、すべての抽出液において精製トロポミオシンに対応する約37 kDaの位置にバンドが認められた(図3A)。患者血清を用いたイムブロッティングではすべての加熱抽出液において37 kDa付近に陽性バンドが認められたが、コントロール血清との反応は見られなかった(図3B)。また、患者血清が反応するこのバンドには抗タラバガニトロポミオシンポリクローナル抗体はすべて反応した。さらに、阻害イムブロッティングでは、サザエ、スルメイカおよびアメリカンロブスターの精製トロポミオシンを阻害剤とした場合、すべての貝類トロポミオシンのバンドが完全に消失した(データ示さず)。

マガキ、トリガイおよびウバガイの3種については17年度から継続してPCR増幅産物の塩基配列を解析し、トロポミオシンの全アミノ酸配列を明らかにした。本年度に新たに取り上げたエゾボラ、エゾバイ、ミルクイおよびマテガイの4種のうち、3'RACEで増幅産物が得られなかったエゾバイを除く3種については、cDNAクローニング法によりトロポミオシンの全アミノ酸配列を決定した。こうして17-18年度の研究において10種貝類のトロポミオシンの全アミノ酸配列を明らかにすることができ、既報と合わせて分類上多岐にわたる食用貝類のトロポミオシンの配列特性を論じるには十分であると判断された。

これまでに解明された貝類トロポミオシンのアミノ酸配列を、頭足類の代表としてスルメイカ、甲殻類の代表としてブラウンシュリンプのトロポミオシンのアミノ酸配列と並べて図4に示した。また、軟体動物と甲殻類のトロポミオシンのアミノ酸配列の相同性を表7にまとめた。配列相同性は甲殻類間あるいは頭足類間では90%以上と非常に高いが、貝類間では同じ目(カキ目の場合は同じ科)では約90%と高いものの、目(または科)を越えると70-80%と低くなり、目(または科)レベルで1つのグループを形成していると考えられる。さらに各グループのトロポミオシンのアミノ酸配列は、頭足類とは約75%、甲殻類とは約60%の相同性であり、明らかに区別された。

5) 魚卵のアレルゲン

実験 a: すべての魚卵にLvに相当するタンパク質

性を確認するとともに、a-と反応するタンパク質(・-like)が存在した。一方、スケトウダラとホッケのLvは、a-Lvと反応しなかった。この結果を踏まえて競争ELISA(阻害剤として各種魚卵の卵黄タンパク質画分を用い、a-とイクラ・の反応性を調べた)を行ったところ、サケ科魚類>スケトウダラ(タラコ)>カペリン>カレイ>ニシンの順に阻害性が高かった。

実験 b: イクラアレルギー患者血清中には・-likeと反応する特異IgEが存在していたが、サケ科の魚卵タンパク質と特に強く反応した。一方、その他の魚卵では特異IgEと反応したタンパク質が必ずしもa-とは反応しないケースがみられた。

D. 考察

1) 甲殻類検知キット(甲殻類測定試薬「ニッスイ」)の性能

酵素免疫測定法(ELISA法)を測定原理とし、甲殻類トロポミオシンを測定対象タンパク質とする甲殻類検知キットを開発した。本キットのブラクタイガー筋肉より抽出した標準液に対する反応性は、0.78-50 ng/mLの範囲で良好であり、また同時再現性、日差再現性とも良好な結果であった。

本法で測定対象タンパク質としたトロポミオシンは、甲殻類間におけるアミノ酸配列の相同性は88.3-100%と非常に高いことが知られている。本キットは、精製トロポミオシンに対する反応性において甲殻類間で高い交差率を示したこと、一方、軟体動物、貝類には反応しないことから、本キットで使用した抗体は甲殻類以外の動物種とは相同性が低く、甲殻類間で相同性の高いアミノ酸配列を認識していることが示唆された。この点は、144種類の食品サンプルを用いた試験においても裏づけされた。

また本キットでは、加熱・加圧変性トロポミオシンにも反応するモノクローナル抗体を選択したことにより、缶詰やレトルト食品の殺菌処理を想定した条件でも十分に検出が可能であった。

2) 甲殻類検知キット(甲殻類キット「マルハ」)の性能

本測定法の性能を評価した結果、以下のことが判明した。

- ・ 甲殻類全般に反応し、特に十脚目に属する甲殻類に対して特異性が高かった。一方、甲殻類以外の原材料に対して交差反応性は認められなかった。
- ・ 5種類のモデル加工食品において良好な回収率と希釈直線性が認められた。
- ・ 市販加工食品において甲殻類の表示のある

食品では甲殻類タンパク質が検出され、良好な希釈直線性が認められた。一方、表示のない市販加工食品では甲殻類タンパク質は検出されなかった。

以上のことから、本測定法は様々なマトリックスが存在する加工食品においてもその影響を受けることなく甲殻類タンパク質を特異的かつ正確に測定できるものと考えられた。

3) 甲殻類検知キットのバリデーション

本研究において開発した2種類の甲殻類検知キット(甲殻類キット「マルハ」および甲殻類測定試薬「ニッスイ」)の分析性能を、10機関による試験室間バリデーションにより評価した。5種類の試料を分析した結果、甲殻類キット「マルハ」はすべての試料で80%以上の良好な回収率を示した。甲殻類測定試薬「ニッスイ」の回収率は若干低い結果であったが、室間精度はすべての試料で10%以下と良好であった。甲殻類キット「マルハ」の室間精度は15%以上でやや大きかった。

特定原材料定量試験方法については、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)において、試験室間バリデーションを実施し、回収率50-150%、室間精度25%以下であったキットを使うことが示されている。今回評価した甲殻類キット「マルハ」および甲殻類測定試薬「ニッスイ」は、いずれもこの基準に適合しており、食品中の甲殻類検知に使用可能であった。

4) 貝類のアレルゲン

甲殻類、頭足類の主要アレルゲンはトロポミオシンであることが証明されているが、本研究により貝類の主要アレルゲンも共通してトロポミオシンであることが確認された。また、阻害イムノブロットの結果から、トロポミオシンは貝類間だけでなく、貝類と頭足類、貝類と甲殻類の間でも抗原交差性を示すことも判明した。しかしながら、トロポミオシンのアミノ酸配列相同性の点から、貝類は甲殻類、頭足類とは区別され、しかも貝類間でも目(または科)レベルでグループを形成していると判断された。したがって抗原交差性を分子レベルでさらに詳細に理解するためには、貝類の場合には目(または科)レベルのグループごとに検討していく必要があると考えられる。

本研究で開発した甲殻類検知キットに利用した抗トロポミオシンモノクローナル抗体の認識部位は不明であるが、検知キットは甲殻類特異的であったので、抗体は甲殻類トロポミオシンに特有の配列を認識すると考えられる。特定原材料に準ずるとされている軟体動物のイカ、アワビの場合、トロポミオシンのアミノ酸配列相同性はそれ

ぞれ頭足類間、古腹足目間では高いが他の軟体動物や甲殻類とはそれほど高くないことがわかったので、イカ類トロポミオシンに特有の配列あるいはアワビ類トロポミオシンに特有の配列を認識するモノクローナル抗体の取得は可能であると思われる。19年度にはこうしたモノクローナル抗体を作製し、イカ類ならびにアワビ類に特異的な検知法を開発する予定である。

5) 魚卵のアレルゲン

実験 a)の結果より、サケ科魚卵、スケトウダラ(タラコ)、カペリン(輸入シシヤモ)については、a- \cdot と \cdot の組み合わせでの検知法開発が可能と推定できる。また、a-LvとLvを組み合わせれば、スケトウダラ(タラコ)との区別も可能かもしれない。なお a- \cdot と \cdot 様タンパク質間の反応性が低い魚種については、検知の必要性を考慮して対応すべきである。

実験 b)の結果より、 \cdot -like における IgE 結合領域が魚種間では異なる可能性がある(たとえばイクラにはタラコには含まれない特有の IgE 結合部位が存在する)。今後はこれらの知見を踏まえつつ \cdot を魚卵検知対象タンパクとし、a- \cdot (ポリクローナル抗体)を用いた分析法の検討に入る。

E. 結論

1) 甲殻類 ELISA 検知キットの開発と性能評価: ELISA 法に基づく2種類の甲殻類検知キット(甲殻類測定試薬「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」)を開発した。両キットとも甲殻類特異的で、外部機関によるバリデーションにおいても回収率、室間精度は良好であったので、加工食品における甲殻類の検知法として使用可能であると考えられた。

2) 貝類のアレルゲン: 貝類の主要アレルゲンはトロポミオシンで、甲殻類および頭足類トロポミオシンと抗原交差性を示すことを確認した。また、貝類トロポミオシンは、アミノ酸配列から目(または科)レベルのグループに分けられることを示した。

3) 魚卵のアレルゲン: すべての魚卵に a- \cdot と反応するタンパク質(\cdot -like)が存在したが、その抗原性の強さは魚種によって異なっていた。一方、サケ科魚類の \cdot -like はすべてのイクラアレルギー患者血清と反応したが、他の魚種では反応性に個人差が見られた。魚卵検知法の対象タンパク質の第一候補として \cdot の利用が妥当である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Motoyama, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Cephalopod tropomyosins: identification as major allergens and molecular cloning. Food Chem. Toxicol. 44, 1997-2002 (2006)
- 2) 山口詢子、猪又直子、広門未知子、嶋倉邦嘉、塩見一雄、池澤善郎: シーフードによる職業性の接触蕁麻疹と口腔アレルギー症候群の1例. アレルギー 56, 49-53 (2007)
- 3) Y. Lu, T. Ohshima, H. Ushio, Y. Hamada and K. Shiomi: Immunological characteristics of monoclonal antibodies against shellfish major allergen tropomyosin. Food Chem. 100, 1093-1099 (2007)
- 4) Y. Kobayashi, S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima and K. Shiomi: Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. Parasitol. Res. (in press)
- 5) K. Motoyama, Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima and K. Shiomi: Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans. J. Agric. Food Chem. (in press)
- 6) Y. Suma, S. Ishizaki, Y. Nagashima, Y. Lu, H. Ushio and K. Shiomi: Comparative analysis of barnacle tropomyosin: divergence from decapod tropomyosins and role as a potential allergen. Comp. Biochem. Physiol. Part B (in press)
- 7) K. Motoyama, Y. Hamada, Y. Nagashima and K. Shiomi: Allergenicity and allergens of amphipods, crustaceans belonging to the order Amphipoda, mixing in nori (dried laver). Food Addit. Contam. (in press)
- 8) 柴原裕亮、岡道弘、富永桂、猪井俊敬、梅田衛、畝尾規子、阿部晃久、大橋英治、潮秀樹、塩見一雄: サンドイッチ ELISA 法を用いた食品中の甲殻類アレルゲンの検出. 食科工(投稿中)

2. 学会発表

- 1) 江本愛、石崎松一郎、長島裕二、嶋倉邦嘉、塩見一雄: 貝類トロポミオシンのアレルゲン性評価および一次構造解析. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)
- 2) 小林征洋、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: アニサキス新規アレルゲンの同定および組換えアレルゲンのIgE結合能. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)

- 3) 小林征洋、池田 薫、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: アニサキス主要アレルゲンAni s 1のIgE結合エピトープ解析. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)
- 4) 中村 央、濱田友貴、橘 勝康、塩見一雄: パルブアルブミンに着目した軟骨および硬骨魚類のアレルゲン性. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)
- 5) 板垣康治、伊藤正也、望月 篤、塩見一雄: 水産食品の低アレルゲン化に関する検討. 第1報 酵素処理によるアレルゲンの分解. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)
- 6) 板垣康治、伊藤正也、望月 篤、塩見一雄: 水産食品の低アレルゲン化に関する検討. 第1報 物理化学的方法によるアレルゲンの除去. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)
- 7) 小池修一郎、清水 裕、中村 厚、渡辺一彦、原 彰彦、佐伯宏樹: 魚卵アレルギーにおけるイクラと他魚種卵との免疫学的交差性. 平成18年度日本水産学会大会(2006年4月、高知)
- 8) 穂山浩、吉岡靖雄、松田りえ子、佐伯宏樹 2、宇理須厚雄、米谷民雄: 食物アレルゲン(ペーナッツ、魚卵). 平成18年度日本アレルギー学会シンポジウム
- 9) 柴原裕亮、岡 道弘、梅田 衛、畝尾規子、阿部晃久、大橋英治、潮 秀樹、塩見一雄: ELISA法を用いた甲殻類検出試薬の開発. 日本食品衛生学会第92回学術講演会(2006年10月、愛知)
- 10) 清木興介、織田浩司、酒井信夫、穂山 浩、米谷民雄: 加工食品中の甲殻類たんぱく質検出法の開発について. 日本食品衛生学会第92回学術講演会(2006年10月、愛知)
- 11) 小林征洋、嶋倉邦嘉、石崎松一郎、長島裕二、塩見一雄: アニサキス新規アレルゲンSXP/RAL-2 protein様タンパク質の精製およびcDNAクローニング. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会(2006年11月、横浜)
- 12) 戸村聡子、石崎松一郎、嶋倉邦嘉、長島裕二、塩見一雄: マサバパルブアルブミンのIgE反応性に対するCa²⁺結合部位の重要性. 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会(2006年11月、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称: 食品中タンパク質の高感度検出

表1 バリデーションに用いたモデル加工食品

試料	原材料	調製方法	エビ一次標準粉末濃度 (ppm)
魚肉ソーセージ	魚すり身、豚脂、砂糖、食塩	原材料を十分に練り合わせた後、121℃、4分でレトルト処理	10.0
FD 卵スープ	卵、澱粉、乳糖、砂糖、食塩	原材料を加熱溶解後、約 20 時間凍結乾燥処理	11.9
トマトソース	ホールトマト缶、たまねぎ、オリーブオイル、にんにく、ローリエ、砂糖、食塩、胡椒	原材料を炒め、トマトを加え煮つめた後、121℃、1分でレトルト処理	10.0
クリームコロッケ	牛乳、バター、小麦粉、澱粉、食塩、砂糖、胡椒、パン粉	ホワイトソースを作成した後、凍結保存(-20℃)	10.0
鶏肉団子	鶏ささみ、ラード、片栗粉、砂糖	原材料を練り合わせた後、凍結保存(-20℃)	10.0

表2 交差試験に供した食品と甲殻類測定試薬「ニッスイ」による測定値

種類	測定 (ppm)
えび類 (8 検体) ブラックタイガー、クルマエビ、バナメイエビ、ボタンエビ、ホッコクアカエビ、サクラエビ、イセエビ、アメリカンロブスター	>20
かに類、やどかり類 (7 検体) ズワイガニ、ケガニ、ガザミ、チュウゴクモクズガニ、アサヒガニ、タラバガニ、ハナサキガニ	>20
しゃこ類、おきあみ類、ふじつぼ類 (4 検体) シャコ、ナンキョクオキアミ、カメノテ、ミネフジツボ	>20
いか類、たこ類 (10 検体) マダコ、イイダコ、ミズダコ、ヤナギダコ、スルメイカ、ホタルイカ、スマイカ、ヤリイカ、アオリイカ、モンゴウイカ	<1
貝類 (16 検体) ホタテガイ、アサリ、ヤマトシジミ、ムラサキイガイ、シナハマグリ、ウバガイ、ナミガイ、バカガイ、アカガイ、トリガイ、マガキ、クロアワビ、アカアワビ、サザエ、バイ、エゾバイ	<1
魚類 (20 検体) ギンザケ、ベニザケ、ニジマス、サーモントラウト、サクラマス、マサバ、マアジ、メロ、サワラ、キンメダイ、シルバー、メルルーサ、メバチマグロ、カツオ、ホッケ、マダラ、イワシ、サンマ、カラフトシシャモ、アブラツノサメ	<1
水産食品 (5 検体) ナマコ、マボヤ、イクラ、タラコ、シシヤモ卵	<1
生鮮肉類 (5 検体) 鶏肉、合鴨肉、牛肉、豚肉、羊肉	<1
海藻類 (9 検体) ワカメ、コンブ、アカトサカ、アオトサカ、シロトサカ、ヒジキ、モズク、エゴノリ、ヒトエグサ	<1

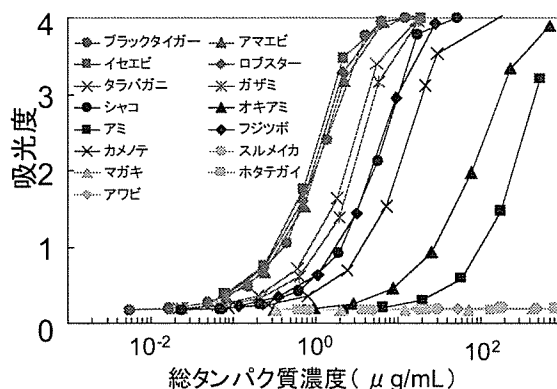


図1 各種甲殻類および軟体動物との反応性(甲殻類キット「マルハ」)

表3 モデル加工食品を用いた甲殻類キット「マルハ」の評価(回収率、再現性)

	魚肉ソーセージ (10.0 ppm)	FD 卵スープ (11.9 ppm)	クリームコロッケ (10.0 ppm)	トマトソース (10.0 ppm)	鶏肉団子 (10.0 ppm)
回収率(%)	108	112	111	115	107
併行再現性 (n=5, % CV)	2.0	2.7	4.6	2.7	3.7
室内再現性 (n=5, % CV)	6.6	2.9	7.6	7.9	4.5

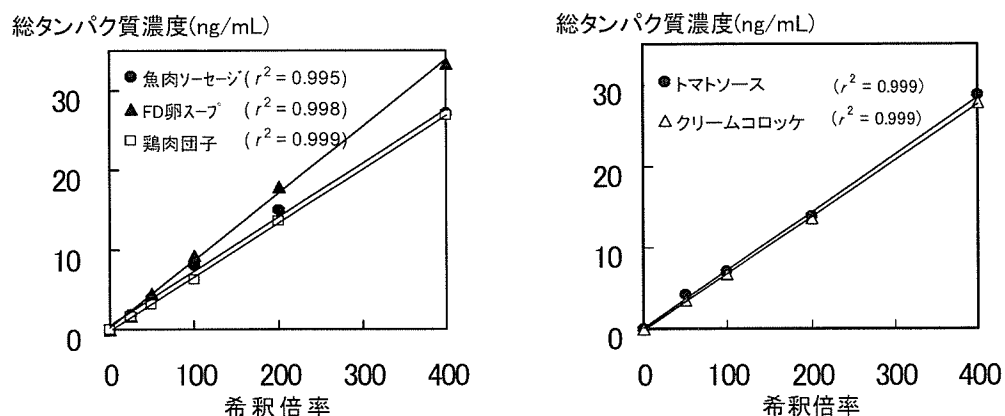


図2 モデル加工食品の希釈直線性(甲殻類キット「マルハ」)

表4 バリデーション用試料均一性評価結果

	魚肉ソーセージ	FD 卵スープ	トマトソース	クリームコロッケ	鶏肉団子
平均 (ng/mL)	16.19	21.13	22.56	21.25	17.67
併行 (RSD%)	3.93	2.42	4.40	4.29	3.53
試料間 (RSD%)	2.18	0.00	2.23	0.36	4.19
Total (RSD%)	4.49	2.42	4.93	4.30	5.48
F	1.62	0.91	1.52	1.01	3.83
F critical	4.39	4.39	4.39	4.39	4.39

表5 甲殻類キット「マルハ」バリデーション結果

分散分析結果	機関数	添加量 (mg/kg)	平均 (mg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
試料						
魚肉ソーセージ	10	10.0	10.28	102.8	4.9	20.5
FD 卵スープ	8	11.9	11.14	93.6	2.6	16.1
トマトソース	10	10.0	9.58	95.8	9.3	17.6
クリームコロッケ	10	10.0	8.21	82.1	9.9	18.8
鶏肉団子	10	10.0	10.00	100.0	6.1	19.2

ロバスト解析結果	機関数	添加量 (mg/kg)	平均 (mg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
試料						
魚肉ソーセージ	10	10.0	10.28	102.8	5.1	23.2
FD 卵スープ	10	11.9	11.70	98.4	4.1	19.4

トマトソース	10	10.0	9.58	95.8	9.6	19.7
クリームコロッケ	10	10.0	8.21	82.1	8.2	20.6
鶏肉団子	10	10.0	10.00	100.0	6.6	21.6

表 6 甲殻類測定試薬「ニッスイ」バリデーション結果

分散分析結果 試料	機関数	添加量 (mg/kg)	平均 (mg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
魚肉ソーセージ	8	10.0	6.48	64.8	4.0	4.0
FD 卵スープ	9	11.9	8.76	73.6	3.0	8.6
トマトソース	10	10.0	8.60	86.0	4.7	6.8
クリームコロッケ	10	10.0	7.76	77.6	4.6	5.9
鶏肉団子	10	10.0	7.23	72.3	5.1	8.4

ロバスト解析結果 試料	機関数	添加量 (mg/kg)	平均 (mg/kg)	回収率 (%)	併行精度 (RSD%)	室間精度 (RSD%)
魚肉ソーセージ	10	10.0	6.35	63.5	4.0	6.1
FD 卵スープ	10	11.9	8.76	73.6	3.8	9.4
トマトソース	10	10.0	8.57	85.7	4.6	5.5
クリームコロッケ	10	10.0	7.77	77.7	4.8	6.2
鶏肉団子	10	10.0	7.22	72.2	5.3	8.9

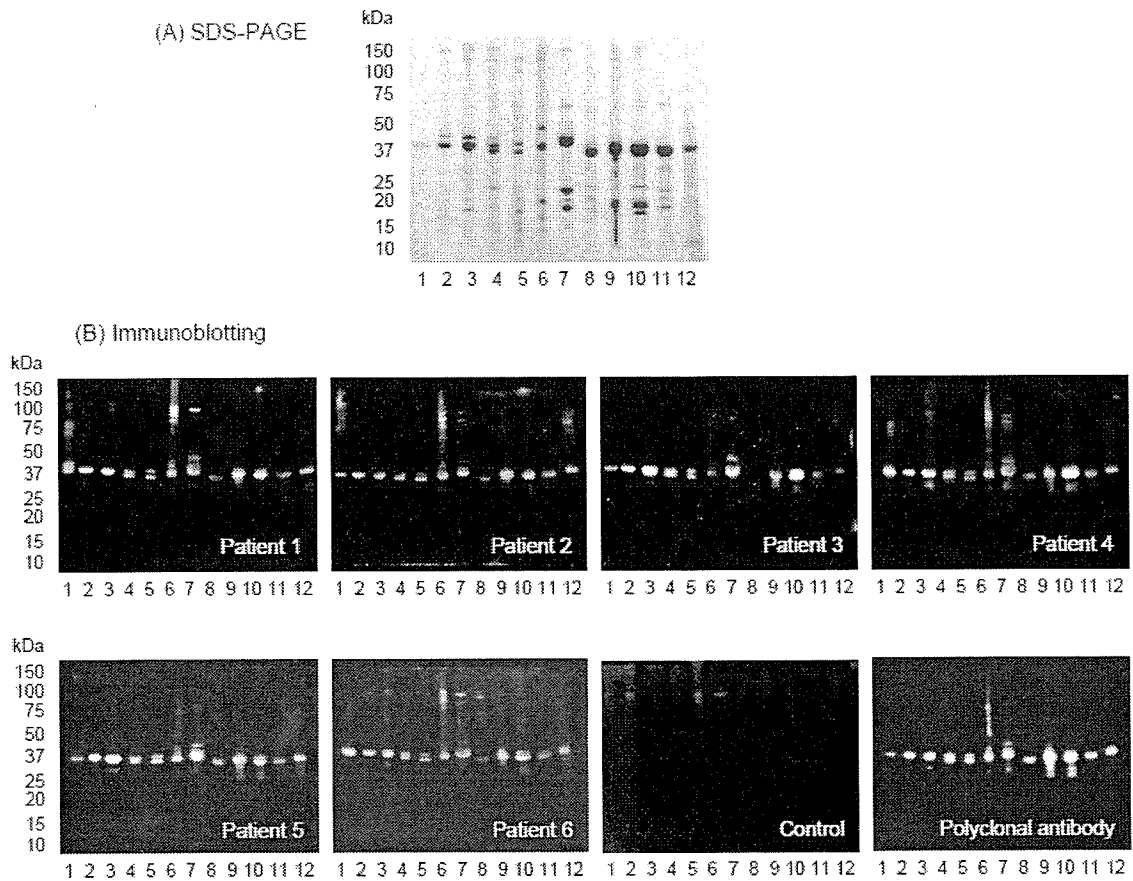


図3 貝類加熱抽出液のSDS-PAGE (A) およびイムノブロッティング (B)
 1: サザエ精製トロポミオシン、2: クロアワビ、3: サザエ、4: エゾボラ、5: エゾバイ、6: アカガイ、7: マガキ、8: トリガイ、9: ウバガイ、10: ミルクイ、11: マテガイ、12: アサリ

クワアビ	MDA I K K K M L A M K M E K E N A V D R A E Q N E Q K L R D T E E Q K A K I E E D L N N L Q K K C A N L E N D F D N V N E Q L Q E A M A K L E T S E K R V T E
ミミガイ	MDA I K K K M L A M K M E K E N A V D R A E Q N E Q K L R D T E E Q K A K I E E D L N N L Q K K C A N L E N D F D N V N E Q L Q E A M A K L E T S E K R V T E
フクトコブシ	MDA I K K K M L A M K M E K E N A V D R A E Q N E Q K L R D T E E Q K A K I E E D L N N L Q K K C A N L E N D F D N V N E Q L Q E A M A K L E T S E K R V A I E
アカネアワビ	MDA I K K K M L A M K M E K E N A V D R A E Q N E Q K L R D T E E Q K A K I E E D L N N L Q K K C A N L E N D F D N V N E Q L Q E A M A K L E T S E K R V T E
サザエ	MDA I K K K M L A M K M E K E N A L D R A E Q L E Q K L R E T E E A K A K I E E D Y N S L Q K K S I Q T E N D L D N T Q T Q L Q D V Q A K Y T T A E K O I A E
エゾボラ	MDL I K K K M L S M K M D K E N A L D R A D V M E Q K F R D A E D Q K S K L E E D L N L L Q K K Y S Q L E N E F D R V N E G L L D A N A K L E T S E K R V N E
ヨーロッパバイガイ	MDA I K K K M V A M K M E K K N A L D R A E Q L E Q K L R E T E E A K A K I E E D Y N S L Q K K S I Q T E N D L D N T Q T Q L Q D V Q A K Y T T A E K O I A E
ムラサキガイ	MDA I K K K M V A M K M E K K N A L D R A E Q L E Q K L R E T E E A K A K I E E D Y N S L Q K K S I Q T E N D L D N T Q T Q L Q D V Q A K Y T T A E K O I A E
ミドリイガイ	MDA I K K K M V A M K M E K K N A L D R A E Q L E Q K L R E T E E A K A K I E E D Y N S L Q K K S I Q T E N D L D N T Q T Q L Q D V Q A K Y T T A E K O I A E
アカガイ	MDS I K K K M I A M K M E K E N A L D R S E Q L E Q K L R D T E E Q K A K V E E E L G A Y Q K K F S I L E N D F D T V N T K W E D A S V K L E E A E K L T E
マガキ	MDS I K K K M I A M K M E K E N A Q D R A E Q L E Q Q L R D T E E Q K A K I E E D L T S L Q K K H S N L E N E F D T V N E K Y Q E C Q T K L E E A E K T A S I E
アカザラガイ	MDA I K K K M Q A M K V D R E N A Q D L A E Q M E Q K L K D T E T A K A K L E E E F N D L Q K K L T T T E N N F D V A N E Q L Q E A N T K L E N S D K O I T O
ヒオウギガイ	MDA I K K K M Q A M K V D R E N A Q D L A E Q M E Q K L K D T E T A K A K L E E E F N D L Q K K L T T T E N N F D V A N E Q L Q E A N T K L E N S E K O I T O
ホタテガイ	MDA I K K K M Q A M K V D R E N A Q D L A E Q M E Q K L K D T E T A K A K L E E E F N D L Q K K L T T T E N N F D V A N E Q L Q E A N T K L E N S E K O I T O
トリガイ	M E A I K K K M Q S M K N E K E N A I D K A E Q L E I K L K D T E D S K A K I E E D L T S L Q K K Y T N L E N E F D T V N E K H A D S V A K L E A E K R L T E
ウバガイ	MDS I K K K M Q A M K I E K E N A L D K A E Q L D Q K L K D T E D S K A K I E E D L S S L Q K K Y T N L E N E F D V N E K Y N E G V N K L E A I S A E K R V T E
ミルウイ	MDS I K K K M Q A M K I E K E N A L D K A E Q L D Q K L K D T E D S K A K I E E D L S S L Q K K Y T N L E N E F D V N E K Y N E G V N K L E A I S A E K R V T E
マテガイ	MDS I K K K M Q A M K L E K E N A L D K A E Q L E Q K L K E T E D S K A R A E E D L S S L Q K K F T N L E N E F D K V N E Q Y Q E G V N K L E A I S A E K R V T E
アサリ	MDA I K K K M L A M K M E K E V A T D K A E Q L E Q S L R D L E A A N K T I E E D L S T L Q K K Y S N L E N D F D N A K E N L T V A N T N L E A I S A E K R V N E
スルメイカ	MDA I K K K M L A M K M E K E V A T D K A E Q L E Q S L R D L E A A N K T I E E D L S T L Q K K Y S N L E N D F D N A K E N L T V A N T N L E A I S A E K R V N E
ブラウنشユリノブ	MDA I K K K M Q A M K L E K D N A M D R A D T L E Q Q N E A N N R A E K S E E V H N L Q K R M Q O L E N D L D V O E S L K A N I Q L V E K D K A L S N

クワアビ	MEQEVSGTTRK I T L L E E D L E R N E E R L Q T A T E R L E E A S K A A D E S E R G R K V L E S R S L A D D E R I D Q L E A Q L K E A K Y I A E D A I E R
サザエ	MEQEVSGTTRK I T L L E E D L E R N E E R L Q T A T E R L E E A S K A A D E S E R G R K V L E S R S L A D D E R I D Q L E A Q L K E A K Y I A E D A I E R
ミミガイ	MEQEVSGTTRK I T L L E E D L E R N E E R L Q T A T E R L E E A S K A A D E S E R G R K V L E S R S L A D D E R I D Q L E A Q L K E A K Y I A E D A I E R
フクトコブシ	MEQEVSGTTRK I T L L E E D L E R N E E R L Q T A T E R L E E A S K A A D E S E R G A R V L E S R S L A D D E R I D Q L E A Q L K E A K Y I A E D A I E R
アカネアワビ	MEQEVSGTTRK I T L L E E D L E R N E E R L Q T A T E R L E E A S K A A D E S E R G A R V L E S R S L A D D E R I D Q L E A Q L K E A K Y I A E D A I E R
エゾボラ	MEQE I S G L N R R I Q L L E E D L E R S E E R L Q T A T E K L E E A T K A A D E S E R A R K V L E S K N O T A E E S A D S L E A Q L K E S K Y I A E D A I E R
ヨーロッパバイガイ	HEQE I O S L T R K I S M L E E D I M K S E E R Y T T A A S K L E E A S K A A D E S E R N R K V L E N L N C G N D E R I D Q L E Q L T E A K W I A E E A D K
ムラサキガイ	HEQE I O S L T R K I S M L E E D I M K S E E R Y T T A A S K L E E A S K A A D E S E R N R K V L E N L N C G N D E R I D Q L E Q L T E A K W I A E E A D K
ミドリイガイ	HEQE I O S L T R K I S M L E E D I M K A E E R F T T A S G K L E E A S K A A D E S E R N R K V L E N L N S G N D E R I D Q L E Q L T E A K W I A E E A D K
アカガイ	SEQE I A S L T R K I T L L E E D I A K N E E K L M S A T O K L E E A S H A A D E S E R G R K V L E S R S F A D D E R I D A L E A Q L K E A K Y I A E D A D R
マガキ	A E Q E I O S L N R R I Q L L E E D M E R S E E R L Q T A T E K L E E A S K A A D E S E R N R K V L E N L N N A S E E R T D V L E K Q L T E A K L I A E E A D K
アカザラガイ	L E S D V G A L Q R R L Q L L E E D F E R S E E K L N S T T E K L E E A S K A A D E S E R N R K V L E G R S N T A E E R I D V L E K Q L T E A K N V A T D A D Q
ヒオウギガイ	L E S D V G A L Q R R L Q L L E E D F E R S E E K L N S T T E K L E E A S K A A D E S E R N R K V L E G R S N S Y E E R I D E L E Q L E T A K N V A T D A D H
ホタテガイ	L E S G V G A L Q R R L Q L L E E D F E R S E E K L T T E K L E E A S K A A D E S E R G R K V L E S R S L A D D E R I D A L E A Q L K E A K Y I A E D A D R
トリガイ	T E D E I K G Y T R R I Q L L E D D L E R T O T K L D E A T G K L E E A T K S A D E S E R G R K V L E S R S L A D D R I D G L E K Q V K D A K Y V A E E S D R
ウバガイ	C E D E I K G Y T R R I Q L L E D D L E R T O V K L E A L K L E E A T K T A D E S E R G R K V L E S R S I A D D R I D G L E K Q V K D A K Y V A E E A D R
ミルウイ	C E D E I K G Y T R R I Q L L E D D L E R T O V K L E A T L K L E A T K T A D E S E R G R K V L E S R S I A D D R I D Q L E A Q L K E A K Y I A E D A I E R
マテガイ	C E D E I K G F T R R I Q L L E D D L E R T O A L K L E A T K T A D E S E R G R K V L E S R S I A D D R I D Q L E A Q L K E A K Y I A E D A I E R
アサリ	A E D E I K G Y T R R I Q L L E D D L E R T O V K L D E A T S K L E A T K T A D E S E R G R K V L E S R S I A D D R I D A L E K Q V K D A K Y V A E E A D R
スルメイカ	A E G E I O G L N R R I Q L L E E D L E R S E E R L T S A Q S K L E A S K A A D E S E R G R K V L E N R S O G D E E R I D L L E K Q L E A K W I A E D A D R
ブラウنشユリノブ	A E S E V A L N R R I Q L L E E D L E R S E E R L N T A T K L E A S Q A A D E S E R M R K V L E N R S L S D E E R M D A L E N Q L K A R F L A E E A D R

クワアビ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K I L E L E E L K V V G N N M K S L E I S E Q E A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A T
サザエ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K I L E L E E L K V V G N N M K S L E I S E Q E A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A T
ミミガイ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K I L E L E E L K V V G N N T K S L E I S E Q E A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A T
フクトコブシ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K I L E L E E L K V V G N N M K S L E I S E Q E A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A T
アカネアワビ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K I L E L E E L K V V G N N M K S L E I S E Q E A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A T
エゾボラ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K V L E L D E Q L H V V G N N I K T L S I Q N D Q A S Q S W D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A Q
ヨーロッパバイガイ	KYEEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K V I D L E E Q L T V V G A N I K T L Q V Q N D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T N R L K D A E N R A T
ムラサキガイ	KYEEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K V I D L E E Q L T V V G A N I K T L Q V Q N D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T N R L K D A E N R A T
ミドリイガイ	KYEEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K V I D L E E Q L T V V G A N I K T L Q V Q N D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T N R L K D A E N R A T
アカガイ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K I L E L E E L T V V G A N I K T L Q V Q N D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T A N L K D A E N R A T
マガキ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K V Y L E E E Q L S V V A N N I K T L Q V Q N D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A T
アカザラガイ	KFDEAARKLA I TEVDL ERA ETRLEAAEA K V H E L E E L T V V G A N I K T L Q V Q N D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L S N R L K D A E T R A T
ヒオウギガイ	KFDEAARKLA I TEVDL ERA ETRLEAAEA K V L E L E E L T V V G A N I K T L Q V Q N D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T K S L K D A E N R A T
ホタテガイ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA ETRLEAAEA K V L E L E E L K V V G N N M K S L E I S E Q E A S Q R E D S Y E E T I R D L T K N L K D A E N R A T
トリガイ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA ETRLEAAEA K I V E L T E E L S V V G N N L K G L Q N A V D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A S
ウバガイ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA ETRLEAAEA K I T E L S E E L S V V A N N C K A L Q N A V D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A A
ミルウイ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA ETRLEAAEA K I T E L S E E L S V V A N N C K A L E I S V D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A S
マテガイ	KYDEAARKLA I TEVDL ERA ETRLEAAEA K I T E L S E E L Q V V G N N S K A L G N A V D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A A
アサリ	KYDEAARKLA I TEVDL ERSETRLEAAEA K I T E L S E E L A V V G N N C K A L Q N A V D Q A S Q R E D S Y E E T I R D L T Q R L K D A E N R A A
スルメイカ	KFDEAARKLA I TEVDL ERA EARLEAAEA K I V E L E E L K V V G N N M K S L E I S E Q E A S Q R E D S Y E E T I R D L T H R L K E A E N R A A
ブラウنشユリノブ	KYDEVAARKLA I M V E A D L E R A E E R A E T G E S K I V E L E E L R V V G N N L K S I E V I S E F K A N Q R E E A Y K E Q I K T L T N K L K A E A R A E

クワアビ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
サザエ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
ミミガイ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
フクトコブシ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
アカネアワビ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
エゾボラ	EAERTVTKLQKEVDRL EDELLA EKERY KN I SDEL DQTF AELAGY
ヨーロッパバイガイ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLTEKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
ムラサキガイ	EAERTVSKLRKEVDRL EDELLTEKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
ミドリイガイ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLTEKEKY KA I SDEL DQTF AELAGY
アカガイ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKERY KA I SDEL DQTF AELAGY
マガキ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKERY KA I SDEL DQTF AELAGY
アカザラガイ	EAERQ L T K L Q K E V D R L E D E L L A E K E R Y K A I S D E L D Q T F A E I A G Y
ヒオウギガイ	EAERQ V V K L Q K E V D R L E D E L L A E K E R Y K A I S D E L D Q T F A E I A G Y
ホタテガイ	EAERQ V V K L Q K E V D R L E D E L L A E K E R Y K O I S D E L D Q T F A E I A G Y
トリガイ	EAERV I K L Q K E V D R L E D E L L Q E K E K Y K O I S D E L D Q T F A E L A G M
ウバガイ	EAERV V N K L Q K E V D R L E D E L L A E K E K Y K T I S D E L D Q T F A E L A G M
ミルウイ	EAERV V N K L Q K E V D R L E D E L L A E K E K Y K O I S D E L D Q T F A E L A G M
マテガイ	EAERV V N K L Q K E V D R L E D E L L A E K E K Y K O I S D E L D Q T F A E L A G M
アサリ	EAERV V N K L Q K E V D R L E D E L L A E K E K Y K A I S D E L D Q T F A E L A G M
スルメイカ	EAERTVSKLQKEVDRL EDELLA EKERY KS I SDEL DQTF AELAGY
ブラウنشユリノブ	FAERSVQKLQKEVDRL EDELLVNEKEKY KS I TDEL DQTFSELSGY

図4 各種貝類、スルメイカおよびブラウنشユリノブのトロポミオシンのアミノ酸配列
 コンセンサスと考えられるアミノ酸残基に影をつけて示す。ブラウنشユリノブトロポミオシンで報告されている
 IgE 結合エピトープ領域は□で囲って示す。

表 7 軟体動物・甲殻類トロポミオシンのアミノ酸配列相同性(%)

	腹足綱		二枚貝綱					頭足綱	甲殻綱
	古腹足目	新腹足目	フネガイ目	イガイ目	カキ目:イ タヤガイ科	カキ目:イ タボガキ科	マルオスダ レガイ目		
	クロアワ ビ、ミミガ イ、フクト コブン、ア カネ、アワ ビ、サザ エ	エゾボラ	アカガイ	ヨーロッパ イガイ、ム ラサキイ ガイ、ミド リイガイ	アカザラガ イ、ヒオウ キガイ、ホ タテガイ	マガキ	トリガイ、ウ バガイ、ミ ルクイ、マ テガイ、ア サリ	コウイカ、 アオリイ カ、スルメ イカ、アカ イカ、マダ コ	アメリカ ンロブス ター、プ ラックタイ ガー
腹足綱 古腹足目	94.0-99.6	75.4-77.8	77.5-80.3	71.5-75.4	68.3-81.0	76.0-78.5	72.5-76.8	77.8-82.7	59.9-63.4
腹足綱 新腹足目		100	72.2	69.0-70.1	68.7-71.1	77.1	68.7-70.8	73.2-74.3	58.8-60.2
二枚貝綱 フネガイ目			100	75.4-75.7	70.4-73.2	79.2	72.9-73.9	71.8-73.2	58.5-59.5
二枚貝綱 イガイ目				94.0-99.6	67.6-70.1	78.9-79.2	64.8-67.3	69.4-71.5	56.0-57.7
二枚貝綱 イタヤガイ科					84.4-91.9	72.2-73.9	66.2-71.5	69.7-74.6	57.0-60.0
二枚貝綱 イタボガキ科						100	72.5-74.3	75.0-76.0	60.9-62.0
二枚貝綱 マルオスダレ ガイ目							85.6-94.4	70.1-73.6	55.6-58.8
頭足綱								91.2-99.6	61.3-63.7
甲殻綱									91.5-98.2

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）

食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究

豆類検知法の開発

分担研究者 穂山浩（国立医薬品食品衛生研究所食品部）

研究協力者

塩見一雄	（東京海洋大学海洋食品科学科）	松本貴之	（日本ハム株式会社）
森下直樹	（日本ハム株式会社）	森山達哉	（近畿大学農学部）
柴田治樹	（株式会社森永生科学研究所）	土井啓利	（株式会社森永生科学研究所）
山川宏人	（株式会社日清製粉グループ本社）	田口大夢	（ハウス食品株式会社）
平尾宜司	（ハウス食品株式会社）	織田浩司	（マルハ株式会社中央研究所）
清木興介	（マルハ株式会社中央研究所）	鈴木友紀子	（株式会社アルバック）
中村幹彦	（株式会社アルバック）	酒井信夫	（国立医薬品食品衛生研究所）
松田りえ子	（国立医薬品食品衛生研究所）	米谷民雄	（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨:ダイズ ELISA 法の開発の検討に関しては、標準品に対する感度は 0.78 ng/mL であり、検量線の形状も良好であった。食品原材料への交差反応も認められず、原材料に大豆と表記されている市販食品は、醤油を除いてすべて測定可能であった。前年度に良好な回収率が得られなかった肉類モデル加工食品についても、高い回収率を示し、作製した 6 種類のモデル加工食品に対して 67~102%の回収率を示した。クルミ ELISA 法の開発の検討に関しては、特定原材料 5 品目を含めた種々の食品原材料として、穀類・芋類・澱粉、豆類・種実類・魚介類・肉類・卵類・乳製品類・野菜類・きのこ類・果実類・コーヒー・ココア・茶類・海藻類・香辛料類・調味料類・増粘多糖類と約 160 品目の交差反応性を調べたが、昨年度報告したピーカンナッツ以外反応性を示す物はなかった。白粥・鶏肉団子・パン・スポンジケーキ・オレンジジュース・ビスケットと 6 種の食品でクルミタンパクが 10 ppm 含まれるモデル加工食品を作製し、回収率を検討したところ、110%~136%と良好な回収率が得られた。抽出条件が回収率にどの様に影響を及ぼすかの検討を行ったところ、抽出時間、抽出温度、抽出後の放置時間は測定値に大きな影響を及ぼさないことが判った。ダイズ PCR 法の検討においては、Gym81/82 を用いた PCR 法により、加工度の高いレトルト食品や大豆を発酵した醤油や味噌、大豆レシチンからも大豆が検知された。油揚げと風味調味料 A については、PCR 反応に適した DNA が得られず大豆の検知はできなかった。一方市販の ELISA キットでは、多くの加熱加工食品、調味料、食品素材において大豆は検出限界以下であった。モデル加工食品については、イチゴジャムを除く 6 種類の食品から、PCR 法によって大豆を検知することができた。クルミ PCR 検知法に関しては、クルミ PCR 法の検討においては、遺伝子配列の明らかな、matK 遺伝子に着目し、クルミ科ナッツの特異的検出のための PCR 用プライマーを設計した。さらに、精製 DNA を使用して、この PCR の検出限界を確認し、クルミ、ピーカンナッツとも 0.1 pg(10 ppm 相当)まで検出できた。クルミ DNA から増幅させた増幅産物とピーカンナッツから増幅させた増幅産物とを用いて制限酵素による切断を行った。その結果、クルミおよびピーカンナッツには制限酵素 BafI の切断部位があるが、制限酵素部 AccI の切断部位はクルミにはあるが、ピーカンナッツでは消失していることが明らかとなり、これらの制限酵素を用いることで、クルミとピーカンナッツの簡便な分別方法を確立した。エビ PCR 検知法に関しては、試験したエビ 12 種全てにおいて、2.5 pg の DNA から標的とした約 200bp の PCR 産物が得られた。また、クルマエビ蛋白質 10 ppm(w/w)相当のエビ標準粉末を含有する 5 種類すべての擬似混入試料からも、標的 PCR 産物が得られた。一方、試験したカニ 9 種と他の甲殻類 3 種のうち、上海ガニ、ダンジネスクラブ、ワタリガニの 3 種からも、エビと同様に標的 PCR 産物が得られた。得られた PCR 産物を、エビに特徴的な配列を認識して切断する制限酵素で消化した結果、ダンジネスクラブとワタリガニ由来の PCR 産物は切断されず、上海ガニ由来の PCR 産物だけが、エビ由来産物と同様に切断された。

A. 研究目的

食品中に含まれる特定原材料に準ずるアレルギー物質について、アレルギー表示の適正化の観点から、ELISA 法、その他特定の蛋白質や核酸成分について定性、定量的に検証できる科学的検知法を開発する。本研究では、ダイズ及びクルミの ELISA 法の開発の検討と、ダイズ、クルミ及びエビの遺伝子増幅法(PCR 法)についての確立を行った。またアレルギーの新規簡易法の検討についても実施した。

B. 研究方法

ダイズ ELISA 検知法の開発の検討

前年度に構築したサンドイッチ ELISA の系をベースとして抽出液の改良を行った。新抽出液を用いた系で検量線、各種食品原材料への交差反応性、市販の加工食品に対する反応性を検討した。一定量の大豆粉末を含むモデル加工食品を 6 種類作製し、回収率を検討した。

クルミ ELISA 検知法開発の検討

クルミの 2S アルブミンを抗原としたポリクローナル抗体を用い、ELISA の系を確立した。その系を用いて、特定原材料 5 品目を含めた種々の食品原材料を抽出し、交差反応性を検討した。次に、クルミの入っていない食品に、クルミタンパクが 10 ppm となるように添加してモデル加工食品を作製し、回収率の検討を行った。また、抽出条件が回収率にどの様に影響を及ぼすかの検討も合わせて行った。

ダイズ PCR 検知法の開発の検討

昨年度開発したダイズ特異的検知プライマー；Gym81/82 を用いて、ダイズ由来原料を含む食品素材、調味料および加工食品からの PCR 法による大豆の検知実験を行い、市販の ELISA キット(Veratox Quantitative Soy Flour Allergen Testkit, Neogen, USA)による測定値と比較した。また、一定量の大豆粉末を添加したモデル加工食品について PCR 法による大豆の検知を行い、この方法の実用性を確認した。

クルミ PCR 検知法の開発の検討

既知の植物遺伝子の塩基配列を解析して、PCR 増幅予測ソフトウェア(Amplify 1.0)で特異性を予測した上で、クルミ検知用プライマーを設計した。設計したプライマーは植物(キウイ、クルミ、リンゴ、ヤマモ、

バナナ、ダイズおよび他のナッツ類(ピーカン、ブラジルナッツ、マカダミア、ピーナッツ、アーモンド、カシュー、ピスタチオ、ヘーゼルナッツ)から精製した DNA を用いて特異性・検出感度を調べた。また、本プライマーの標的遺伝子の未知であったピーカンナッツの標的遺伝子をクローニングし、その塩基配列を基に分別方法を確立した。実用性は、一定量のくるみ粉末を添加したモデル加工食品について PCR 法によるくるみの検知を行い、この方法の実用性を確認した。

エビ PCR 検知法の開発の検討

平成 17 年度より開発を進めてきたエビの PCR 検知用プライマーの感度と特異性について、エビとカニなどの種類を増やして検討するとともに、擬似混入試料中のエビ DNA を検知可能か検討した。エビは、アカエビ、アマエビ、アメリカザリガニ、イセエビ、ウチワエビ、オマールエビ、キューバロブスター、クルマエビ、サクラエビ、シマエビ、スキャンピー、テナガエビの 12 種類、カニは、アサヒガニ、アブラガニ、ケガニ、上海ガニ、ズワイガニ、タラバガニ、ダンジネスクラブ、花咲ガニ、ワタリガニ(ガザミ)の 9 種類、他の甲殻類としては、アミ、オキアミ、シャコの 3 種類を試験した。また、擬似混入試料には、クルマエビ蛋白質 10 ppm(w/w)相当のエビ標準粉末を含有する鶏団子、クリームコロッケ、魚肉ソーセージ、トマトソース、フリーズドライ卵スープの 5 種類を用いた。これらから QIAGEN Genomic-tip 20/G により DNA を抽出し、エビ検知用プライマーを用いて PCR を行なった。PCR 反応液組成は、1 x PCR 緩衝液、0.20 mM dNTP、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.3 μ M 5' 及び 3' プライマー、及び 0.625 units TaqDNA ポリメラーゼを含む液に、20 ng/ μ L に調製した DNA 試料液 2.5 μ L(エビ DNA は 2.5 pg, 5 pg、他のカニや擬似混入試料 DNA は 50 ng)を加え、全量を 25 μ L とした。PCR 反応条件は、95°C に 10 分間保ち反応を開始させた後、95°C 1 分間、56°C 1 分間、72°C 1 分間を 1 サイクルとして 45 サイクルの PCR 増幅を行ない、終了反応として 72°C で 7 分間保った。

C. 研究結果

ダイズ ELISA 検知法の開発の検討

標準品に対する感度は 0.78 ng/mL であり、検量

線の形状も良好であった(図 1)。食品原材料への交差反応も認められず、原材料に大豆と表記されている市販食品は、醤油を除いてすべて測定可能であった(表 1)。前年度に良好な回収率が得られなかった肉類モデル加工食品についても、高い回収率を示し、作製した 6 種類のモデル加工食品に対して 67～102%の回収率を示した(表 2)。

クルミ ELISA 検知法開発の検討

特定原材料 5 品目を含めた種々の食品原材料として、穀類・芋類・澱粉、豆類・種実類・魚介類・肉類・卵類・乳製品類・野菜類・きのこ類・果実類・コーヒー・ココア・茶類・海藻類・香辛料類・調味料類・増粘多糖類と約 160 品目の交差反応性を調べたが、昨年度報告したピーカンナッツ以外反応性を示す物はなかった。

白粥・鶏肉団子・パン・スポンジケーキ・オレンジジュース・ビスケットと 6 種の食品でクルミタンパクが 10 ppm 含まれるモデル加工食品を作製し、回収率を検討したところ、110～136%と良好な回収率が得られた(表 1)。

抽出条件が回収率にどの様に影響を及ぼすかの検討を行ったところ、抽出時間(図 1)、抽出温度(図 2)、抽出後の放置時間(図 3)は測定値に大きな影響を及ぼさないことが判った。

ダイズ PCR 検知法の開発の検討

Gym81/82 を用いた PCR 法により、加工度の高いレトルト食品や大豆を発酵した醤油や味噌、大豆レシチンからも大豆が検知された。油揚げと風味調味料 A については、PCR 反応に適した DNA が得られず大豆の検知はできなかった。一方市販の ELISA キットでは、多くの加熱加工食品、調味料、食品素材において大豆は検出限界以下であった(表 1)。

モデル加工食品については、イチゴジャムを除く 6 種類の食品から、PCR 法によって大豆を検知することができた(表 2)。

クルミ PCR 検知法の開発の検討

遺伝子配列の明らかな、matK 遺伝子に着目し、クルミ科ナッツの特異的検出のための PCR 用プライマーをデザインした(表 1)。このプライマーセットの特異性を確認した結果を図 1 に示す。このプライマーセットを使用した PCR で、クルミ科ナッツを特異的に検出できることが証明できた(図 1A, B)。さらに、精製

DNA を使用して、この PCR の検出限界を確認し、クルミ、ピーカンナッツとも 0.1 pg (10 ppm 相当)まで検出できた(図 1C)。しかし、現在の日本商品標準分類では、ピーカンナッツはクルミには分類されておらず、ピーカンナッツとクルミの分別検出方法が必要である。PCR の標的遺伝子とした matK 遺伝子の塩基配列はクルミでは多くの食用品種で公知化されているが、食用ピーカンナッツである「illinoiase」では遺伝子配列が未知である。そこで、matK を標的として、クルミとピーカンナッツの分別ができるかどうかを確認するため、クルミプライマーで増幅される領域を含むピーカンナッツの matK の遺伝子配列を確認した(図 2A)。その結果、クルミとピーカンナッツでは増幅される遺伝子領域では 1 箇所の違いがあることが判明した。この置換によってピーカンナッツ遺伝子ではクルミ遺伝子配列に存在する制限酵素 Acc1 の認識部位が消失していることが判明した。クルミとピーカンナッツの PCR で増幅される遺伝子領域には制限酵素 Baf1 の認識部位が共通して存在しており、Acc1 と Baf1 を利用することで、クルミとピーカンナッツの分別検出ができることが予想された。表 2 にクルミおよびピーカンナッツの PCR 増幅産物の制限酵素での切断サイズを示した。我々はこのことを検証するため、クルミ DNA から増幅させた増幅産物とピーカンナッツから増幅させた増幅産物とを用いて制限酵素による切断を行った(図 2B)。その結果、クルミおよびピーカンナッツには制限酵素 Baf1 の切断部位があるが、制限酵素部 Acc1 の切断部位はクルミにはあるが、ピーカンナッツでは消失していることが明らかとなり、これらの制限酵素を用いることで、クルミとピーカンナッツの簡便な分別方法を確認した。また、モデル加工食品については、検討した 6 種類全ての食品で、PCR 法によってくるみを検知することができた(図 3)。

エビ PCR 検知法の開発の検討

試験したエビ 12 種全てにおいて、2.5 pg の DNA から標的とした約 200 bp の PCR 産物が得られた。また、クルマエビ蛋白質 10 ppm(w/w)相当のエビ標準粉末を含有する 5 種類すべての擬似混入試料からも、標的 PCR 産物が得られた(以上図 1)。一方、試験したカニ 9 種と他の甲殻類 3 種のうち、上海ガニ、ダンジネスクラブ、ワタリガニの 3 種からも、エビと同様

に標的 PCR 産物が得られた。得られた PCR 産物を、エビに特徴的な配列を認識して切断する制限酵素で消化した結果、ダンジネスクラブとワタリガニ由来の PCR 産物は切断されず、上海ガニ由来の PCR 産物だけが、エビ由来産物と同様に切断された(図 2)。

D. 考察

ダイズ ELISA 検知法の開発の検討

抽出液を改良することで、以前と同等の感度、特異性を有しながら、肉類モデル加工食品への反応性を向上することができた。

クルミ ELISA 検知法開発の検討

160 品目におよぶ食品原材料と交差反応性を示さないことから、本測定法はクルミ特異的に測定可能であることが示唆された。今後、標準品に用いている物と同一の処理を施したクルミ(脱脂処理したクルミ)を添加したモデル加工食品を作製し検証を行っていく必要がある。

ダイズ PCR 検知法の開発の検討

供試した市販およびモデル加工食品には焙煎、焼成およびレトルトなど加工度の高い食品も含まれており、本研究で開発された方法が幅広い食品のダイズ検知法として適用可能であることが示唆された。また、本研究で開発された PCR 法は市販の ELISA キットより高い感度で大豆を検出することが可能であった。

クルミ PCR 検知法の開発の検討

我々は、matK 遺伝子を標的にした PCR で食用のクルミ科ナッツの検出方法の開発に成功した。さらに、ピーカンナッツ matK 遺伝子を同定し、その遺伝子配列中の制限酵素部位を利用することで、クルミとピーカンナッツの分別法を確立した。供試したモデル加工食品には焙煎、焼成およびレトルトなど加工度の高い食品も含まれており、本研究で開発された方法が幅広い食品のクルミ検知法として適用可能であることが示唆された。

エビ PCR 検知法の開発の検討

クルマエビ蛋白質 10 ppm(w/w)相当のエビ標準粉末を含有する 5 種類の疑似混入試料を検知できたことから、同法がエビの確定試験法に必要な感度を有することを確認できた。特異性については、試験した 12 種類のエビすべてを検知できて、アミ、オキアミ、シヤコや大多数のカニは検知しないかったが、上海

ガニ、ダンジネスクラブ、ワタリガニだけは偽陽性検出してしまふことが確認された。このうち上海ガニだけは、制限酵素処理によっても、エビとは区別できずに偽陽性となることが確認された。高級カニとして珍重される上海ガニが加工食品に混入するリスクは比較的小さいと考えられるため、同法は、確定試験に必要なエビ特異性を有するものと考えている。以上、平成 19 年度に予定している同検知法のバリデーション準備を整えることができたため、今後は、エビ PCR 検知法のバリデーションを行なうとともに、カニだけを検知する PCR 法、またはエビとカニを一括して検知する PCR 法の開発を進める。

E. 結論

ダイズ ELISA 法の開発の検討に関しては、新抽出法を用いることで、以前より高感度に食品中の大豆が検出可能となった。

クルミ特異的な測定系が構築できた。プレのモデル加工食品での検討では通知(食安発 第 0622003 号)の規格(50~150%)におさまり良好であった。

ダイズ PCR 法の開発の検討に関しては、この方法が幅広い食品に適用できることを確認した。今後、疑似混入試料の分析を数機関で行い、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。

クルミ PCR 法の開発の検討に関しては、この方法が幅広い食品に適用できることを確認した。今後、疑似混入試料の分析を数機関で行い、同検知法のバリデーションを行なう必要がある。

平成 17 年度より開発を進めてきたエビの PCR 検知法について、感度と特異性の検証を行ない、平成 19 年度に予定している同検知法のバリデーション準備を整えた。今後は、エビ PCR 検知法のバリデーションを行なうとともに、カニだけを検知する PCR 法、またはエビとカニを一括して検知する PCR 法の開発を進める。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Takahiro Watanabe, Hiroshi Akiyama, Soheila Maleki, Hirohito Yamakawa, Ken Iijima, Fuminori Yamazaki, Takashi Matsumoto, Satoshi Futo, Fumihiro Arakawa, Masatoshi Watai, and Tamio

- Maitani, A Specific Qualitative Detection Method for Peanut (*Arachis hypogaea*) in Foods using Polymerase Chain Reaction, *J Food Biochemistry*, **30**, 215-233 (2006).
2. Hiroshi Akiyama, Kozue Sakata, Yasuo Yoshiooka, Yoshifumi Murata, Yoshihiro Ishihara, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, and Tamio Maitani. Profile Analysis and Allergenicity of wheat protein hydrolysates, *International Archives of Allergy Immunology*, **140**, 36-42 (2006).
 3. 森下直樹、松本貴之、高畑能久、森松文毅、上條茂徳、秋山恵利、有川奈津実、飯田知美、多勢加奈子、浜路麻衣、平岡里海、白柳利江子、豊田正武 “調理加工モデル食品を用いたアレルギー検査用イムノクロマトキットの評価” 食品衛生学雑誌, **47**, 66-75 (2006).
 4. Kazumi Kitta, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Tetsuya Moriyama, Tadashi Ogawa, and Shinichi Kawamoto. Detection of low molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem.*, **351**, 290-297 (2006).
 5. Hirohito Yamakawa, Hiroshi Akiyama, Yumi Endo, Kiyoko Miyatake, Kozue Sakata, Shinobu Sakai, Tatsuya Moriyama, Atsuo Urisu, and Tamio Maitani. A Specific Detection of Soybean Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 269-272 (2007)
 6. 穂山浩、佐伯宏樹、渡辺一彦、宇理須厚雄、食物アレルギー(ピーナッツ、魚卵)、臨床免疫・アレルギー科, 食物アレルギー, **46**, 588-595 (2006)
 7. Takeo Yano, Yumiko Sakai, Kohji Uchida, Yoshiki Nakao, Kimie Ishihata, Shigeru Nakano, Toshihiro Yamada, Shinobu Sakai, Atsuo Urisu, Hiroshi Akiyama, and Tamio Maitani. Detection of Walnuts Residues in Processed Foods Using Polymerase Chain Reaction (submitted)
- 学会発表
1. 第 50 回日本農芸化学会「モノクローナル抗体を用いたグリアジン検出ウエスタンブロットキットの開発」森下直樹、宮澤いづみ、奥村朋之、松本貴之、高畑能久、森松文毅(2006. 3)
 2. 第 92 回日本食品衛生学会「食品中のクルミタンパク質検出法の開発について」土井啓利、柴田治樹、酒井信夫、穂山浩、米谷民雄 (2006. 10)
 3. 日本食品化学学会第 12 回学術大会「PCR 法を用いた食品中の大豆の検知法について」山川宏人、江寄英剛、宮武聖子、渡邊敬浩、穂山浩、松田りえ子、米谷民雄 (2006. 6)
- H. 知的財産権の登録
1. 特願2006-258130 (発明の名称 食品中の大豆検出キット)
 2. 特願2007-4069号 (発明の名称 エビ検出用プライマーセット)、特願 2006-4982 号、2006-146878 号の国内優先権に基づく出願
 3. 特願 2007-22175 (発明の名称 クルミとピーカンナッツの分別検出方法)

ダイズ ELISA 検知法の開発の検討

図 1. ダイズ検知 ELISA キット 検量線

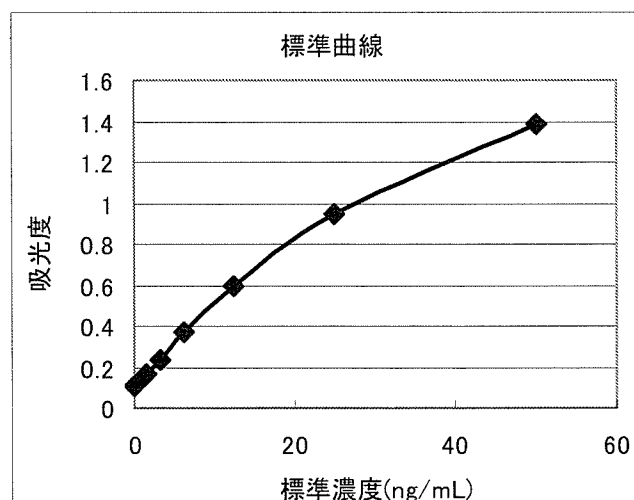


表 1

市販食品検体	原材料表示	測定値(ppm)
豆腐	大豆	>20
油揚げ	大豆	>20
豆乳	大豆	>20
ゆば	大豆	>20
味噌	大豆	>20
醤油	大豆	検量線範囲以下
肉団子	大豆たん白	>20
ロースハム	大豆たん白	>20

表 2

モデル加工食品	測定値 (ppm)	回収率
白がゆ	9.8	98%
おしるこ	10.2	102%
トマトソース	7.9	79%
イチゴジャム	8.7	87%
肉団子	7.3	73%
野菜スープ	6.7	67%

クルミ ELISA 検知法開発の検討

表 1 モデル加工食品の回収率の検討

モデル加工食品	回収率(%)
白粥	136.0
鶏肉団子	129.9
食パン	118.2
スポンジケーキ	110.3
ビスケット	111.2
オレンジジュース	129.4

図 1 抽出時間の回収率への影響

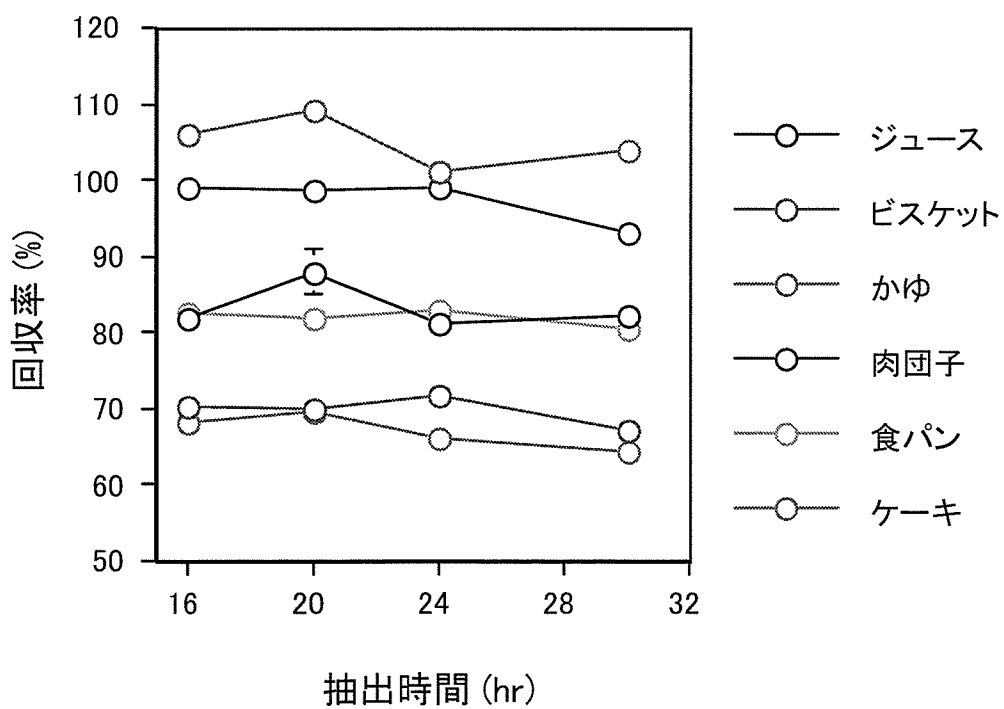


図2 抽出温度の回収率への影響(16時間抽出 25°Cの回収率を100として表示)

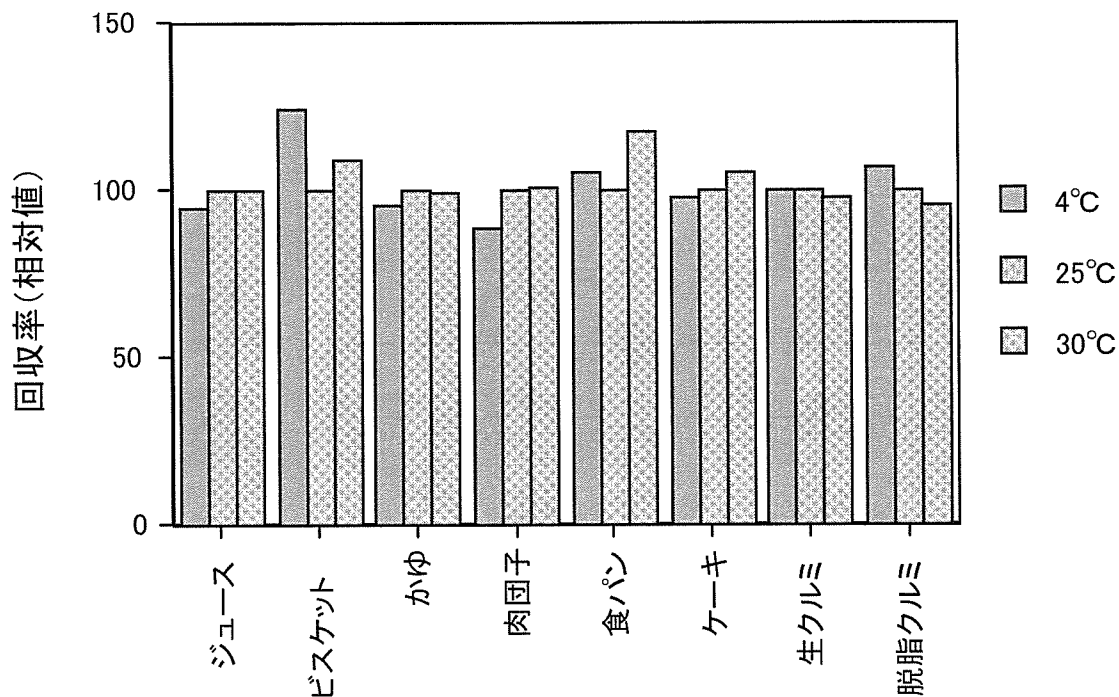


図3 抽出後静置時間の回収率への影響(25°C16時間抽出)

