

甲殻類を原料とした市販健康食品における甲殻類タンパク質および機能性成分の測定

紀 雅美、村上太郎、工藤鮎子、昌山 敦、山野哲夫、清水 充

The Determination of Crustacean Protein and Functional Component
in Commercial Health Foods Derived from CrustaceanMasami KI, Taro MURAKAMI, Ayuko KUDO, Atsushi MASAYAMA,
Tetsuo YAMANO and Mitsuru SHIMIZU

Abstract

The determination of crustacean protein was performed with respect to 16 health foods containing chitosan or glucosamine using two kinds of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, Food Allergen Test EIA Crustacean “Nissui”(N kit) and crustacean kit “Maruha”(M kit). Crustacean protein was not detected in none of 16 samples (limit of detection, $<0.31\mu\text{g/g}$). To evaluate the effect of extracted materials from health foods on the assay, standard solution was added to each sample solution and then determined with ELISA kits. The effects of the matrix were within the range of -16 to +4% for N kit and -12 to +35% for M kit.

Functional component, chitosan and glucosamine, were determined in the sample health foods. The difference between the determination values and the labelling values was -28~+32% in chitosan and -15~+25% in glucosamine.

Key words: chitosan, crustacean, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), glucosamine, health foods

I 緒言

食物アレルギーによる健康被害予防の見地から、食品衛生法に基づき平成13年4月よりアレルギー物質を含む食品の表示が開始された[1]。当初、乳、卵、小麦、そば、落花生の5品目が特定原材料と指定され表示が義務化されたが、「えび」および「かに」は学童および成人において甲殻類が食物アレルギーの原因食品の第一位であるなどの理由により、表示義務対象に追加され、平成22年6月から完全施行されている[2]。

甲殻類を原材料とする機能性成分としてキトサンおよびグルコサミンがあり、これらを含む健康食品が数多く流通している。キトサンはコレステロール改善作用が報告されており[3]、特定保健用食品においても、コレステロールが高めの人を対象にしたキトサン含有のビスケットや粉末清涼飲料が許可・販売されている。グルコサミンは、軟骨などの結合組織の合成を高め、関節

痛の緩和作用や関節炎症状の進行防止などに効果があるといわれている[4]。これらの製品では原材料由来の甲殻類タンパク質が残存している可能性が懸念されるが、甲殻類由来のアレルゲン性に関する報告は限られている。そこで本研究では、甲殻類を原料としたキトサン含有健康食品またはグルコサミン含有健康食品において、甲殻類タンパク質の測定を行いアレルゲン性について調査した。また機能性成分であるキトサンおよびグルコサミンの定量も実施し、表示値と分析値の比較も行ったのであわせて報告する。

II 実験方法

1) 試料

本調査に用いた試料の一覧を表1に示す。平成17年に大阪市内で購入したキトサン含有健康食品8試料およびグルコサミン含有健康食品8試料である。錠剤の試料は乳鉢を用いて均一に粉砕した。カプセルの試

表1 調査に用いた健康食品

| 試験品 No. | 試験品 | 原材料における甲殻類に関する表示 | 機能性成分表示量(%)(キトサンまたはグルコサミン) |
|---------|--------------|------------------|----------------------------|
| C1 | キトサン含有健康食品 | カニ由来 | 75.6 |
| C2 | キトサン含有健康食品 | 原材料の一部にカニを含む | 50.0 |
| C3 | キトサン含有健康食品 | カニキトサン | — |
| C4 | キトサン含有健康食品 | カニキトサン | 65.0 |
| C5 | キトサン含有健康食品 | カニ甲羅由来のキトサン | 62.5 |
| C6 | キトサン含有健康食品 | エビ由来 | 25.0 |
| C7 | キトサン含有健康食品 | カニ由来 | 100.0 |
| C8 | キトサン含有健康食品 | ズワイ蟹の甲羅 | 62.5 |
| G1 | グルコサミン含有健康食品 | — | 40.0 |
| G2 | グルコサミン含有健康食品 | エビ由来 | 33.3 |
| G3 | グルコサミン含有健康食品 | エビ由来 | 52.2 |
| G4 | グルコサミン含有健康食品 | エビ・カニ由来 | — |
| G5 | グルコサミン含有健康食品 | 原材料の一部にカニを含む | 40.0 |
| G6 | グルコサミン含有健康食品 | 原材料の一部にカニを含む | 42.9 |
| G7 | グルコサミン含有健康食品 | エビ・カニ由来 | 56.3 |
| G8 | グルコサミン含有健康食品 | — | 76.3 |

料については、カプセルから内容物を取り出した後、乳鉢で均一にした。

2) 甲殻類タンパク質の検出

甲殻類タンパク質の検出は、平成22年9月10日消食表第286号消費者庁通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」[5]（以下、通知法と略す）に従い、日水製薬株式会社のFAテストEIA—甲殻類「ニッスイ」（以下、Nキットと略す）、株式会社マルハニチロ食品の甲殻類キット「マルハ」（以下、Mキットと略す）の2種類を用いた。両キットは、甲殻類の主要アレルゲンであるトロポミオシンを指標として甲殻類由来タンパク質濃度を測定するキットである[6-8]。

均一にした試料 1g を採取し、抽出用試薬を 19 mL 加え、室温で一晩振とうした。室温、6, 400 × g で 20 分間遠心し、得られた上清をろ過し抽出検体液とした。得られた抽出検体液は検体希釈液を用いて 20 倍希釈し、測定溶液とした。抗体固相化プレートの各ウェルに、0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 ng/mL の標準溶液および測定溶液を 100 μL ずつ 3 ウェルに添加し、キットの説明書に従い ELISA 操作を行った。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー (MTP300、コロナ電気株式会社製) を使用し、主波長 450 nm、副波長 620 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度より機器に付属のデータ処理ソフト MTP-SF5 によって 4-係数 logistic 解析により検量線を作成し、測定溶液中のタンパク質濃度 (ng/mL) を算出した。得られたタンパク質濃度に、抽出および測定溶液調製時の希釈

倍率 (20 × 20 = 400 倍) を乗じて試料中のタンパク質濃度 (μg/g) を求めた。あわせて測定溶液中のマトリックスが ELISA 反応に及ぼす影響を検証するために、測定溶液 350 μL にキットに含まれる 50 ng/mL の標準溶液 50 μL を添加 (最終濃度 6.25 ng/mL) して測定し、測定濃度の理論値に対する差をマトリックス効果 (%) として求めた (式 1)。

$$\text{マトリックス効果 (\%)} = \frac{C_s - C_p \times \frac{350}{400} - 6.25}{6.25} \times 100 \quad (\text{式1})$$

C_s: 標準溶液添加測定溶液中の甲殻類タンパク質濃度 (ng/mL)

C_p: 標準溶液未添加測定溶液中の甲殻類タンパク質濃度 (ng/mL)

6.25: 添加した甲殻類タンパク質濃度 (ng/mL)

なお検出限界は、キットの標準溶液の最低濃度 0.78 ng/mL に試料溶液を調製した際の希釈倍率を乗じた値である 0.31 μg/g とした。

3) キトサンの測定

キトサンの測定には前崎らの方法[9]を用いた。試料 0.5 g (W) を秤量し、リン酸バッファーに懸濁後アミラーゼ処理、プロテアーゼ処理、アミログルコシダーゼ処理を行い、エタノール添加により水溶性食物繊維を沈殿させた。残渣はろつぼろ過器に捕集し、一晩乾燥させた。乾燥した残渣は希硫酸中で加水分解を行い、残渣

中のキトサンをグルコサミンまで分解した。加水分解液はグルコサミン濃度が 10~200 µg/mL となるように希釈し、試験溶液とした。グルコサミンはグルコサミン塩酸塩を標準としてインドール塩酸法[10]にて比色定量し、キトサン含量はグルコサミンポリマーとして試料溶液中のグルコサミン量 G(µg/mL) から式 2 を用いて算出した。

$$\begin{aligned} & \text{キトサン含量(g/100g)} \\ &= \frac{G \times (179.17 - 18) \div 179.17 \times 500}{W \times 1000} \times 100 \end{aligned} \quad (\text{式 2})$$

4) グルコサミンの測定

グルコサミンの測定には Blix 法を用いた[11]。均一にした試料 1g を蒸留水に溶解して 100mL に定容した。グルコサミン標準液は、試薬のグルコサミン塩酸塩を用

いてグルコサミン濃度で 10~100 µg/mL になるように調製した。試料溶液、グルコサミン標準液それぞれ 0.5mL にアセチルアセトン試薬を加え 90°C で 1 時間加熱した。冷却後、96% エタノールおよび Eirlich 試薬を加えて混合し、1 時間室温に放置後、比色定量した。

III 結果と考察

1) 甲殻類タンパク質の検出における検量線の評価

N キットおよび M キットで甲殻類タンパク質を検出するにあたり、両キットの検量線の評価を行った(図 1)。すなわち、標準溶液 (0~50 ng/mL) を各濃度につき 3 ウェル併行で 6 日間繰り返し測定を行い、標準溶液各濃度における 3 ウェルの吸光度平均値、3 ウェル間の吸光度の相対標準偏差(RSD)、検量線から得られる標準溶液各濃度の甲殻類タンパク質濃度 RSD を算出し

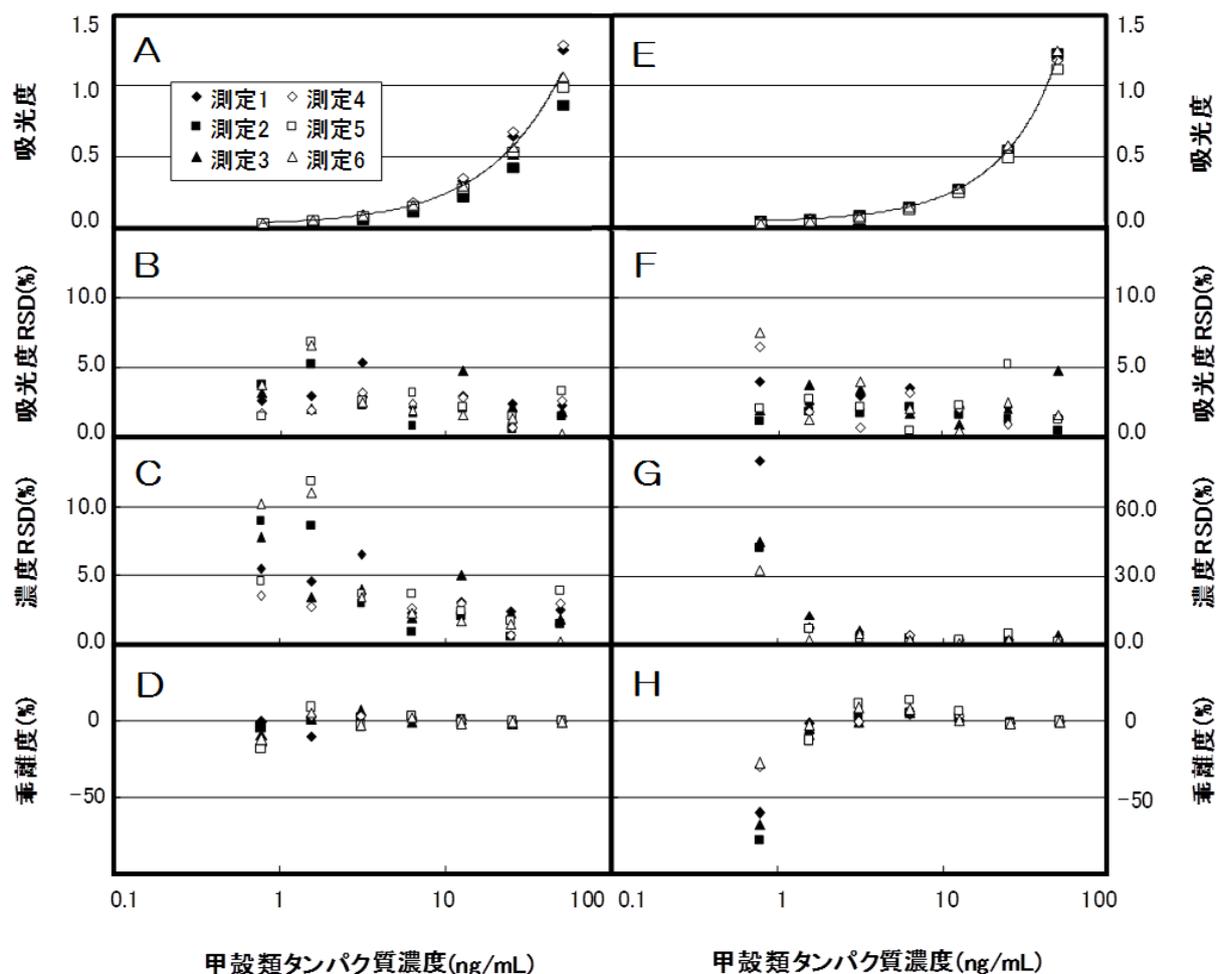


図 1 N キット(A~D) および M キット(E~H)における検量線の評価

- 6 枚のプレートで標準溶液(0.78~50ng/mL)をそれぞれ 3 ウェルずつ、日を変えて 6 回測定した。
- A, E; 3 ウェルの吸光度の平均値をプロットした。また、3 ウェル×6 回の吸光度の平均値を用いて検量線を作成した。
- B, F; 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差(RSD)(%)
- C, G; 検量線より得られた各標準溶液 3 ウェルの甲殻類タンパク質濃度の RSD(%)
- D, H; 検量線より得られた各標準溶液 3 ウェルの甲殻類タンパク質濃度の平均値と理論値との乖離度(%)

ロットした。さらに得られた標準溶液の甲殻類タンパク質濃度と理論値との乖離度(%)を式3にて算出した。

$$\text{乖離度(}\%) = \frac{\text{濃度(理論値)} - \text{濃度(測定値平均)}}{\text{濃度(理論値)}} \times 100 \quad (\text{式} 3)$$

両キットともに検量線はシグモイド曲線であるため、低濃度(0.78~1.56 ng/mL)において吸光度RSDは低いが濃度RSDは高くなる傾向がみられた。その傾向はMキットにおいて顕著であった。しかし、両キットともに3.13 ng/mL以上において濃度RSDは10%未満に収まった。乖離度は、両キットともに低濃度では理論値より低い傾向があり、特にMキットの0.78 ng/mLでは計算値が理論値を大きく下回った(-78%)。しかし濃度が大きくなるにつれて乖離は小さくなり、両キットともに3.13 ng/mL以上では理論値の±10%未満に収束した(図1 D, H)。以上のことから、両キットともに低濃度ではばらつきがみられるが、3.13 ng/mL以上の範囲であれば高い精度で測定できることが分かった。また、本検査の確認事項として、通知法では3ウェル間の吸光度のCV値(RSD)が20%未満であること、通知法に添付されている参考資料「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」では吸光度1付近のRSDが5%程度までとされている。この2つの条件については、満たされていた。

2) 健康食品における甲殻類タンパク質の検出

健康食品16試料について、甲殻類タンパク質の測定を行った。その結果、全ての試料において両キット共に甲殻類タンパク質は検出されなかった(表2)。キトサン含有健康食品においては8検体全てにおいて、グルコサミン含有健康食品については8検体中6検体において甲殻類を原材料としていた。キトサンは甲殻類の殻から炭酸カルシウム、タンパク質、色素などを除いて精製したキチン質を高濃度のアルカリ溶液中で加熱して脱アセチル化し、それをさらに精製したものであり[12-13]、グルコサミンはキチン質を加水分解したものである[13]。精製や加工により、甲殻類由来のタンパク質は残存していないと考えられた。酒井らは、昆虫類を原材料とする健康食品ではNキットおよびMキットで甲殻類様タンパク質が検出されるが、キトサンおよびグルコサミン含む健康食品において甲殻類タンパク質は検出されなかったと報告していることから[14]、同様の結果が得られた。消費者庁「アレルギー物質を含む食品に関するQ&A」[15]において、食品食物アレルギーを引き起こすアレルギー物質の含有量は数μg/gレベルであるされていることから、調査に使用した16検体についてはアレルギーを誘発しない可能性が考えられた。

ELISAキットを用いた測定では、試料からの抽出液を精製することなく測定に用いている。そこで測定溶液中におけるマトリックスの影響を検証するために、測定

表2 市販健康食品における甲殻類タンパク質含有量およびマトリックス効果

| 試験品 No. | Nキット | | Mキット | |
|---------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | 甲殻類タンパク質 (μg/g) | マトリックス効果 (%) | 甲殻類タンパク質 (μg/g) | マトリックス効果 (%) |
| C1 | ND | 4 | ND | 1 |
| C2 | ND | 3 | ND | 28 |
| C3 | ND | -4 | ND | 27 |
| C4 | ND | -4 | ND | -9 |
| C5 | ND | -10 | ND | -12 |
| C6 | ND | -9 | ND | 18 |
| C7 | ND | -4 | ND | -10 |
| C8 | ND | 1 | ND | -4 |
| G1 | ND | -6 | ND | 28 |
| G2 | ND | -6 | ND | 25 |
| G3 | ND | -8 | ND | 33 |
| G4 | ND | -8 | ND | 35 |
| G5 | ND | -12 | ND | 30 |
| G6 | ND | -14 | ND | 33 |
| G7 | ND | -16 | ND | 35 |
| G8 | ND | -16 | ND | 33 |

ND; 検出限界(0.31 μg/g)未満

溶液にキットに含まれる標準溶液を 6.25 ng/ μ L になるように添加してマトリックス効果を検証した(表 2)。理論値との差は N キットにおいてキトサン含有健康食品では -10~+4%、グルコサミン含有健康食品では -16~-6%、M キットにおいてキトサン含有健康食品では -12~+28%、グルコサミン含有健康食品では +25~+35%であった。N キットを用いた加工食品抽出液への甲殻類標準溶液添加試験において回収率は 88.2~104.5%であったと報告されていることから[6]、今回用いた 16 試料におけるマトリックス効果は良好で、試料マトリックスの影響を受けずに測定されていると考えられた。そしてこの結果より、健康食品における甲殻類タンパク質の測定結果が ND であったことが裏付けられた。

3) 健康食品における機能性成分の検出

キトサン含有健康食品についてはキトサンを、グルコサミン含有健康食品についてはグルコサミンを、それぞれ 3 点併行で測定を行い重量%(w/w)の平均値および標準偏差(SD)を求めた。

キトサンの測定値(平均 \pm SD)を図 2 に示す。キトサン含量の表示がなかった C3 を除いて、測定値は表示値に近い値を示した。表示値に対する分析値の割合を(表示値-測定値) \div 表示値 \times 100(%)で算出すると、-28~+32%(平均-5%)となった。C1 は表示値よりも分析値が高い結果となったが、これは表示値がカプセルを含む重量あたりのキトサン含量であるのに対し、分析にはカプセルを除いた内容物のみを用いたことによる。

グルコサミンの測定結果(平均 \pm SD)を図 3 に示す。グルコサミン含量の表示がなかった G4 を除いて、測定値はキトサンと同様に表示値に近い値を示した。表示値に対して分析値は -15~+25%(平均-2%)となった。

なおグルコサミンの測定については、試料 G3 を用いてばらつき試験およびグルコサミン塩酸塩の添加回収試験(添加濃度はグルコサミンとして 200mg)をそれぞれ 5 点併行で実施した。ばらつき試験では測定値の RSD は 1.1%、回収率は 94.9~102.7%(平均 99.7%)と良好な精度と回収率であった。

一般の食品に表示されている栄養成分は、健康増進法の栄養表示基準により表示対象の成分や表示方法などが定められている[15]。また成分の含有量には許容範囲が定められており、これは決められた分析方法に基づく分析値の誤差に起因している。例えばタンパク質については、分析方法は窒素定量換算法(いわゆるケルダ-ル法)で表示値の許容範囲は -20%~+20%、ビタミン B1 については、分析方法は高速液体クロマトグラフ法またはチオクリム法で表示値の許容範囲は -20%~+80%というように、栄養成分によって許容範囲は異なる。本研究において調査の対象としたキトサンおよびグルコサミン含有健康食品は一般の食品と同じ分類であり、キトサンおよびグルコサミンの含有量について表示義務は無く、分析方法も定められていない(公益法人日本健康・栄養食品協会の自主規格はある)。今回用いた分析方法は任意の分析方法であるが、表示値に対してキトサンでは -28~+32%、グルコサミンは -15~+25%と、表示値のおよそ -30~+30%となり、今回調査を行った限りにおいては機能性成分の表示値は妥当な範囲にあると思われた。今後、本分析方法を用いてキトサンやグルコサミン含有健康食品の表示値を検証することも可能であるが、機能性を高めるために分子の修飾や低分子化なども想定されることから、分析方法の特性と機能性成分の形態について注意を払う必要がある。

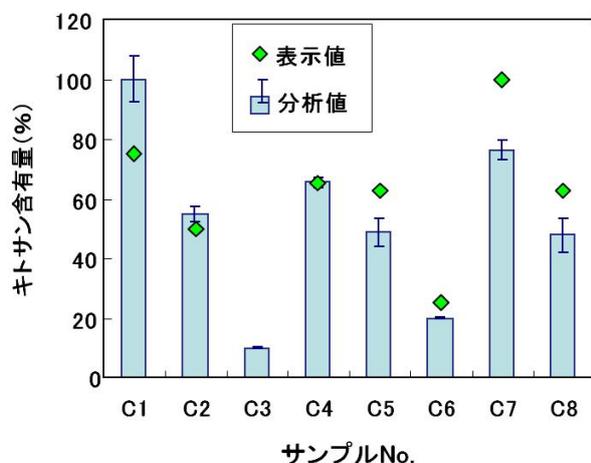


図 2 キトサン含有健康食品におけるキトサン測定値および表示値の比較

キトサン含有健康食品 8 試料について、1 試料につき 3 点併行で測定し、重量%(w/w)で算出した。

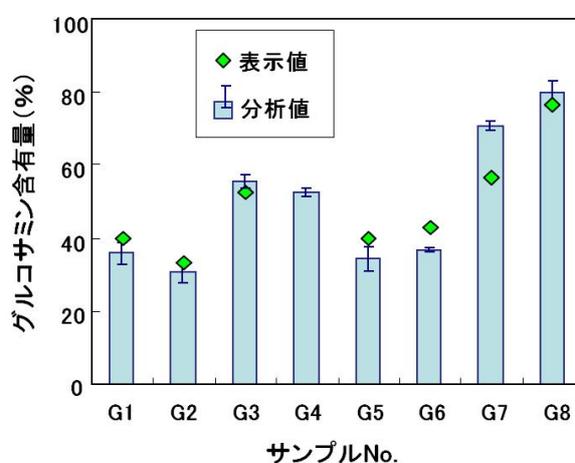


図 3 グルコサミン含有健康食品におけるグルコサミン測定値および表示値の比較

グルコサミン含有健康食品 8 試料について、1 試料につき 3 点併行で測定し、重量%(w/w)で算出した。

IV 結論

甲殻類アレルゲンを指標に甲殻類タンパク質を検出する市販 ELISA キットを用いて、甲殻類を原料とする健康食品について甲殻類タンパク質を測定した。その結果、いずれの試料からも甲殻類タンパク質は検出されなかった。

また機能性成分のキトサンおよびグルコサミン測定では、表示値に対する測定値の割合がおよそ-30～+30%であった。測定に用いたのは任意の方法ではあったが、表示値と測定値に大きな差はみられず、今後、キトサンまたはグルコサミンの表示値の検証に用いることが可能であると思われた。

(本研究は平成 22 年度当研究所重点研究「食の安全性確保のための天然有害物質の系統的解析手法に関する研究」として実施した。)

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課長および監視安全課長通知, アレルギー物質を含む食品に関する表示について. 平成 13 年 3 月 21 日食企発第 2 号および食監発第 46 号(2001).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長および厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知. 「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」の一部改正について. 平成 20 年 6 月 3 日食安基発第 0603001 号および食安監発第 0603001 号(2008).
- 3) 中永征太郎, 佐藤孜郎, 吉良尚平, 前崎祐二, 三田典子, 水落一雄, 他. キトサン摂取による人血清コレステロール値の改善. キチン・キトサン研究 1995; 1(3): 175-182.
- 4) 坂本廣司, 勝呂 栞. グルコサミンの機能と応用. 臨床栄養 2004; 104(1): 65-70.
- 5) 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” 平成 22 年 9 月 10 日消費表第 286 号(2010).
- 6) Shibahara Y, Oka M, Tominaga K, Ii T, Umeda M, Uneo N et al. Determination of crustacean allergen in food products by sandwich ELISA. J. Jpn. Sci. Food Sci. Technol. 2007; 54(6): 280-286.
- 7) Sakai S, Matsuda R, Adachi R, Akiyama H, Maitani T, Ohno Y et al. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. J. AOAC Int. 2008 ; 91(1): 123-129.
- 8) Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Sakai S, Uris A, Akiyama H et al. A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. J. Agric. Food. Chem. 2007; 55: 9345-9350.
- 9) 前崎祐二, 山崎晶子, 水落一雄, 辻 啓介. 酵素-重量法によるキチンおよびキトサンの定量性の検討. 日本農芸化学会誌 1993; 67(4): 677-684.
- 10) 福井作蔵. 還元糖の定量法(生物化学実験法1). 東京:学会出版センター:1969. 99-101頁.
- 11) Blix G. The Determination of hexosamines according to Elson and Morgan. Acta. Chem. Scand. 1948; 2: 467-473.
- 12) キチン、キトサン研究会編, キチン、キトサン実験マニュアル. 東京:技報堂出版;1994. p1-17.
- 13) 甲陽ケミカル株式会社, 技術資料, http://www.koyochemical.jp/?page_id=349, (2012/7/20)
- 14) 酒井信夫, 安達玲子, 中村 厚, 柴原裕亮, 上坂良彦, 清水興介, 他. いわゆる健康食品に含まれる甲殻類様タンパク質量の実態調査. 日本食品化学学会 2009; 16(3): 118-122.
- 15) 消費者庁, 食品表示, アレルギー表示について, <http://www.caa.go.jp/foods/index8.html>, (2012/7/20).
- 16) 栄養表示基準, 平成15年4月24日厚生労働省告示第 176 号(2003), 最終改正平成 21 年 12 月 16 日 消費者庁告示第9号(2009).