

報 文

特定原材料えび・かにのPCR確認検査法の適用性

(平成25年7月23日受理)

田口大夢^{1,*} 永富靖章² 菊池 亮² 平尾宜司¹

Applicability of PCR Methods for Detection of Shrimp and Crab in Processed Food

Hiromu TAGUCHI^{1,*}, Yasuaki NAGATOMI², Ryo KIKUCHI² and Takashi HIRAO¹¹ House Foods Group Inc.: 1-4 Takanodai, Yotsukaido-shi, Chiba 284-0033, Japan;² Fasmac Co., Ltd.: 5-1-3 Midorigaoka, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0041, Japan;

* Corresponding author

According to Japanese food allergen labeling regulations, an ELISA screening test is used for detection of crustacean proteins in food and a shrimp/crab-PCR confirmation test is used to confirm a positive ELISA screening test and to exclude false positives. Forty-six kinds of processed foods labeled as containing shrimp/crab were subjected to ELISA screening test and PCR confirmation test and the usefulness of the shrimp/crab-PCR was evaluated. Twenty-seven of the 46 samples contained total crustacean protein levels of 10 ppm or more in the ELISA screening test. All of the samples were positive in the shrimp/crab-PCR confirmation test. The results of the confirmation test were consistent with the declaration in the list of ingredients and with the results of the ELISA screening test. The shrimp/crab-PCR confirmation test was demonstrated to be applicable to various kinds of foods, including powder, extract, seasoning paste, prepared frozen food, snack food, re-tort food and canned food.

(Received 23 July, 2013)

Key words: 食物アレルギー food allergy; えび shrimp; かに crab; PCR法 PCR

緒 言

えびとかには、平成20年6月3日にアレルギー物質を含む食品として、表示推奨品目から表示義務品目に追加され、2年間の猶予期間を経た平成22年6月4日から本格的に加工食品への表示が義務化されている^{1),2)}。加工食品中のえびとかにを検査する方法は、甲殻類全般を検出するスクリーニング検査用のELISA法と、えびとかにそれぞれに特有のDNA配列を検出する確認検査用のPCR法があり、平成22年9月に食品衛生法に基づく表示の所管が消費者庁に変更されるに伴い通知された「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日付け消費表第286号）」（以下、「通知」）^{*1}に示されている。また、「通知」には、PCR試験に供するDNAの抽出法に関して、CTAB法、シリカゲル膜タイプキット法およびイオン交換

樹脂タイプキット法が示されており、各検査対象検体に適した方法にてDNAの抽出を行うことが記載されている。

えびとかにの加工食品への表示義務化に伴い検査法が通知されて以降、地方衛生研究所をはじめとする各機関において、えびやかにを原料とはしない製品（主に採取法や捕食によるえび、かにのコンタミネーションリスクがある魚肉練り製品や魚介類乾製品）の実態調査がなされてきた³⁾。今回、われわれは、えびやかにを原料とする製品・原料（えび、かに表示あり）を広く収集し、それら試料の原材料表示、ELISA値、PCR試験結果を比較・考察することによって、えび／かにPCR確認検査法の適用性を評価した。なお、えび／かにPCR法の検出感度、偽陰性や偽陽性などの特性に関しては、Taguchiら⁴⁾およびSakaiら⁵⁾が調べており、試験上の留意点に関しては、田口・永富⁶⁾が整理している。

実験方法

1. 試 料

えびやかにを含む旨の表示がなされている原料および加工食品46試料（1. えび混合パウダーⅠ, 2. えび混合パウダーⅡ, 3. えび混合パウダーⅢ, 4. えびオイルⅠ, 5. えびオイルⅡ, 6. えびエキスⅠ, 7. えびエキスⅡ, 8. えびみ

* 連絡先 h-taguchi@housefoods.co.jp

¹ ハウス食品グループ本社株式会社 中央研究所: 〒284-0033 千葉県四街道市鷹の台1-4² 株式会社ファスマック 遺伝子検査事業部: 〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘5-1-3^{*1} 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」平成14年11月6日食発第1106001号（2002）。最終改正消費者庁次長通知平成22年9月10日消費表第286号（2010）。

Table 1. Samples used in this study

No.	Sample	Description	Declaration ^a	
			Shrimp	Crab
1	Shrimp powder mix I	Dry powder	+	—
2	Shrimp powder mix II	Dry powder	+	—
3	Shrimp powder mix III	Dry powder	+	—
4	Shrimp-flavored oil I	Oil	+	—
5	Shrimp-flavored oil II	Oil	+	—
6	Shrimp extract paste I	Thick paste	+	—
7	Shrimp extract paste II	Thick paste	+	—
8	Salted shrimp paste	Seasoning paste	+	—
9	XO sauce	Seasoning paste	+	—
10	Shrimp with chili sauce	Prepared frozen food	+	—
11	Shrimp pilaf	Prepared frozen food	+	—
12	Shrimp shumai; steamed dumpling with shrimp	Prepared frozen food	+	—
13	Satsuma-age; fried fish cake	Prepared frozen food	+	—
14	Chukadon sauce; chopsuey over rice	Prepared frozen food	+	—
15	Champon sauce; a dish of noodles with stir-fried pork, seafood and vegetables in soup	Prepared frozen food	+	—
16	Shrimp gratin	Prepared frozen food	+	—
17	Shiokara; salted and fermented shrimp	Fermented food	+	—
18	Seafood paella seasoning mix	Dry powder	+	—
19	Seafood paella mix	Dry food mix	+	—
20	Dried shrimp	Dry food	+	—
21	Seasoned laver	Dry food	+	—
22	Wheat flour based fried snacks	Snack food	+	—
23	Potato flour based fried chips	Snack food	+	—
24	Rice flour based fried crackers	Snack food	+	—
25	Seasoning mix for braised seaweed, shrimps and squid	Retort food	+	—
26	Chili sauce	Retort food	+	—
27	White stew roux	Roux	+	—
28	Mochi; rice cake	Rice cake	+	—
29	Crab extract paste	Thick paste	—	+
30	Croquette with crab meat	Prepared frozen food	—	+
31	Shiokara; salted and fermented crab	Fermented food	—	+
32	Dried crab	Dry food	—	+
33	Zousui seasoning mix for rice soup with crab meat	Dry food mix	—	+
34	Corn starch and rice flour based fried snacks	Snack food	—	+
35	Miso soup with crab meat	Freeze-dried food	—	+
36	Zousui; rice soup with crab meat	Retort food	—	+
37	Sauce for crab omelet	Retort food	—	+
38	Curry flavored sauce for stir-fried crab and egg	Retort food	—	+
39	Canned crabmeat	Canned food	—	+
40	Kani miso; crab viscera	Canned food	—	+
41	Kamaboko; boiled fish paste	Fish paste product	—	+
42	Fish sausage	Sausage-like fish paste product	—	+
43	Chitosan dietary supplement	Tablet	—	+
44	Spaghetti with cream sauce	Prepared frozen food	+	+
45	Chinese cabbage kimchi; Korean pickle	Fermented food	+	+
46	Glucosamine dietary supplement	Tablet	+	+

^a Labeling indication of shrimp and crab components: +, declaration of shrimp or crab; —, without declaration.

そ、9. XO 醬、10. えびのチリソースあえ、11. えびピラフ、12. えびシウマイ、13. さつまあげ、14. 中華丼の素、15. ちゃんぽんの素、16. グラタン、17. えびの塩辛、18. パエリアの素、19. パエリア、20. 乾燥えび、21. 味付け海苔、22. スナック、23. ポテトスナック、24. せんべい、25. 旨煮の素、26. チリソース、27. シチュールウ、28. 餅、29. かにエキス、30. かにコロッケ、31. かに漬け、32. かに乾燥品、33. 雑炊の素、34. コーンスナック、35. 味噌

汁、36. 雑炊、37. かに玉、38. カレー炒めの素、39. かにフレーク、40. かにみそ、41. かにかまぼこ、42. 魚肉ソーセージ、43. キトサン、44. スパゲッティ、45. 白菜キムチ、46. グルコサミン）を分析試料とした（Table 1）。

2. スクリーニング検査

「通知」の「別添3: 判断樹について」では、スクリーニング検査は検査特性の異なる2種の検査を組み合わせて実施することとなっている。そこで、食品試料からのタンパ

ク質の抽出、測定および甲殻類総タンパク質濃度の算出は、「通知」の「参考：アレルギー物質を含む食品の検査方法について」に記載の2種類のELISAキットにより行った。キットは、日水製薬社製のFAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」およびマルハニチロ食品社製の甲殻類キット「マルハ」を用いた。なお、「通知」では、ELISA試験の結果、甲殻類総タンパク質濃度が8~12 µg/gの範囲内にある場合、再測定し、平均値を採用することとなっているが、本試験では再測定は行わなかった。

3. 確認検査

3.1 DNA抽出

食品試料からのDNA抽出は、「通知」に記載の2種類のDNA抽出精製法（シリカゲル膜タイプキット法およびイオン交換樹脂タイプキット法）に従って実施した。シリカゲル膜タイプキットはQIAGEN DNeasy Plant Mini、イオン交換樹脂タイプキットはQIAGEN Genomic-tip 20/Gを用いた。抽出したDNA溶液は、230 nm、260 nmおよび280 nmの吸光度（ A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} ）を測定し、DNA濃度を A_{260} から算出するとともに、精製度の指標となる A_{260}/A_{280} 比（基準：1.2~2.5）と A_{260}/A_{230} 比（基準：2.0以上）を算出した。

3.2 植物、動物、えび、かにDNA検出用定性PCR

食品試料から抽出したDNAの品質確認およびえび、かにDNAの検出は、「通知」に記載の各種定性PCR法に従って実施した。植物DNA検出用プライマー対、えび検出用プライマー対、かに検出用プライマー対はファスマック社製を、動物DNA検出用プライマー対はオリエンタル酵母工業社製を用いた。陽性コントロールとして、植物、えび、かにDNA検出PCRでは甲殻類検出用陽性コントロールプラスミド（ファスマック社製）を、動物DNA検出PCRでは陽性コントロールテンプレート（オリエンタル酵母工業社製）

を用いた。PCR反応試薬（AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 10×PCR buffer II, MgCl₂, dNTPs）はライフテックノロジーズ社製、制限酵素Hae IIIはタカラバイオ社製を用いた。PCR増幅装置は、GeneAmp PCR System 9700およびVeritiサーマルサイクラー（ともにライフテックノロジーズ社製）を用いた。

4. あきあみDNA検出用定性PCR

えびPCR法で偽陰性となるあきあみ（えびの一種）DNAの検出は、Taguchiらの論文⁴⁾に記載のあきあみ定性PCR法に従って実施した。あきあみDNA検出プライマー対はファスマック社製を用いた。陽性コントロールは甲殻類検出用陽性コントロールプラスミド（ファスマック社製）を用いた。PCR反応試薬、PCR増幅装置はライフテックノロジーズ社製を用いた。

5. PCR阻害作用確認試験

「通知」に記載の植物、動物、えび、かにDNA検出定性PCRにおいて、抽出DNAに各種陽性コントロール（2.5 µL）を添加したものを鋳型DNAとして、全量25 µLの反応系でPCRを行った。

結果および考察

「通知」の「別添3：判断樹について」では、スクリーニング検査で食品採取重量1 g当たりの特定原材料由来の総タンパク量が10 µg（10 ppm）以上であった陽性試料についてのみ確認検査を実施することとなっている。しかし、アレルギーを誘発する総タンパク量に関しては、厚生労働省通知を基に新たに定められた「アレルギー物質を含む食品に関する表示について（平成25年9月20日付け消食表第257号）」の別添2「アレルギー物質を含む食品に関する表示Q&A」*2に記載のとおり、「数µgでは、アレルギーの誘発には個人差があり、ngレベルではほぼ誘発しないで

Table 2. Results of screening test and confirmation test

Declaration		Shrimp and/or crab								
Screening test	Crustacean ELISA	$X < 1$ ppm			$1 \text{ ppm} \leq X < 10 \text{ ppm}$			$10 \text{ ppm} \leq X$		
	judgement	neg			pos			pos		
Confirmation test	Plant/animal-PCR	—	+		—	+		—	+	
	Shrimp/crab-PCR	±	—	+	±	—	+	±	—	+
	Judgement	ind	neg	pos	ind	neg	pos	ind	neg	pos
Case		3	1	2	3	2	1	3	2	1

Abbreviations: pos, positive; neg, negative; ind, indeterminate.

The combined results are categorized as follows:

Case 1: The positive and negative results of the confirmation test are in agreement with those of the corresponding screening test.

Case 2: The positive and negative results of the confirmation test are not in agreement with those of the corresponding screening test.

Case 3: The results of the confirmation test and the screening test cannot be compared because of an indeterminate confirmation test result.

*2 アレルギー物質を含む食品に関する表示Q&A:消費者庁,
<http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin12.pdf>

あろう」という専門家の意見がある。また、1~10 ppmの範囲で独自の基準を設定している食品製造・販売メーカーもある。そこで、今回は、スクリーニング検査で、ELISA値1 ppm以上であった試料を「陽性」、ELISA値1 ppm未満であった試料を「陰性」と判定した。PCRによる確認検査については、「通知」に記載のとおり、「植物／動物PCR：+（標的サイズのPCR増幅産物を検出）」の試料において、「えび／かにPCR：+」であった試料を「陽性」、「えび／かにPCR：-（標的サイズのPCR増幅産物を不検出）」であった試料を「陰性」と判定した。また、「植物／動物PCR：-」の試料は「検知不能」と判定した。判定結果は、「スクリーニング検査：陽性／陰性」と「確認検査：陽性／陰性／検知不能」の組み合わせで場合分けした（Table 2）。なお、今回は「えび／かに表示あり」の試料を対象としているため、えび、かに以外の甲殻類による偽陽性の可能性は考えなかった。

1. DNA抽出法の評価

DNeasy法（以下、D法）とGenomic-tip法（以下、G法）の2つのDNA抽出法について、DNA収量、精製度を比較した（Table 3）。 A_{260} から換算したDNA濃度に関しては、「20 ng/ μ L以上」であった試料数はD法30試料／G法36試料とG法の方が多く、また、全体的にG法で濃度が高い傾向にあった。なお、「31. かに漬」、「8. えびみそ」、「23. ポテトスナック」においては、どちらか一方の抽出法でのみDNAが得られ、試料によって適した抽出法が異なっていた。DNA精製度に関しては、タンパク質など不純物除去の指標である A_{260}/A_{280} 比が1.2~2.5の範囲内の基準を満たしたものは、D法44試料／G法40試料と大きな差はなかった。一方、糖、フェノールなどの低分子化合物の不純物除去の指標である A_{260}/A_{230} 比が2.0以上の基準を満たしたものは、D法1試料／G法23試料とG法の方が精製度が良かった。なお、抽出操作に関しては、「21. 味付け海苔」の様にG法ではG-tipが詰まり、溶出が難しいものがあつた。これまで報告されているように、海苔製品では抽出液の粘性が高くなるなど、操作性が低下するため、D法、G法ともに試料採取量1 g当たり15 mLの含水操作を加えるなど、試料重量や抽出スケールの工夫が必要と考えられた^{*3}。以上の結果から総合的に判断すると、抽出されたDNAの濃度と精製度の面から、食品試料からのDNA抽出法としては、はじめにG法を選択することが適当であると考えられた。

2. ELISA値とPCR試験結果の比較

ELISA値とPCR試験結果の詳細はTable 4Aに記載した。また、両検査の陽性／陰性判定の比較結果はTable 4Bにまとめた。

ELISA値10 ppm以上であった32試料のうちPCRにより検知可能であった試料の結果をみると、D法抽出DNA

では全23試料のうち21試料は「陽性」であったが、「44. スパゲッティ」、「45. 白菜キムチ」の2試料は表示とは異なり「かに：陰性」であった。一方、G法抽出DNAでは全27試料が「陽性」であり、陰性であるものはなかった。D法で「陰性」であった2試料のように、えび、かに両方を含有すると表示されている試料においては、えび、かにどちらか一方が微量に含有されている場合、甲殻類全般を検出するスクリーニング検査で「陽性」であっても、えび、かにを個別に検出する確認検査では微量に含有されている一方が不検出となり、「陰性」と判定される可能性がある。また、D法とG法で異なる結果が得られたように、微量に含有されている場合、DNA抽出時にDNAの損失等の影響を受けやすいことが予想されるため、測定サンプル数の追加、他のDNA抽出法の検討などの対応が望まれる。実際に「44. スパゲッティ」では、試料全体量の1%に満たない原料の一部にかにエキスを、また「45. 白菜キムチ」では、試料全体の1%に満たない量のキトサン（かにの外皮由来）が含まれている程度であった。なお、PCRにより検知不能であった試料は、D法抽出DNAでは9試料、G法抽出DNAでは、そこから4試料減り、計5試料であった。以上の結果から、確認検査においては、G法抽出DNAを用いたほうが、大きな見逃しなく原料や加工食品中のえび、かにを検出できると考えられた。

ELISA値1 ppm以上、10 ppm未満の5試料のうちPCRにより検知可能であった試料の結果をみると、D法抽出DNAでは「21. 味付け海苔」が「えび（あきあみ含む）：陽性」であったが、「42. 魚肉ソーセージ」が「かに：陰性」であった。G法抽出DNAでは、D法同様「42. 魚肉ソーセージ」が「かに：陰性」であった。D法抽出DNAで陽性であった「21. 味付け海苔」は、G法抽出DNAでは「検知不能」であり、試料によってはG法だけでなくD法によるDNA抽出を行う必要があつた。両抽出DNAで「かに：陰性」であった「42. 魚肉ソーセージ」では、原材料表示に「原料の一部にかにを含む」との記載があり、実際に試料全体量の1%に満たない原料の一部にかにエキスを含まれること、ELISA値が2.3 ppmおよび2.7 ppmと低値であったことから、元々かにが微量含まれる程度であると考えられた。また、このような製品では、主原料由来（「42. 魚肉ソーセージ」の場合は魚肉）のDNAが多量に抽出された場合、相対的に抽出DNA中のかにDNAの割合が低下することが予想され、PCRによる検出が難しくなる可能性も考えられる。

ELISA値1 ppm未満の9試料のうちPCRにより検知可能であった試料の結果をみると、D法抽出DNAでは、5試料のうち4試料で「陰性」、1試料で「陽性」であり、G法抽出DNAでは、6試料のうち3試料で「陰性」、3試料で「陽性」であった。なお、少なくともどちらか一方の抽出DNAにおいて、スクリーニング検査で「陰性」、確認検査で「陽性」と判定された試料は9試料中3試料（5. えびオイルII, 18. パエリアの素, 27. シチュールウ）であり、

^{*3} 橋本博之, 本郷 猛, 中西希代子, 宮本文夫, 石井俊靖, 安達玲子, 穂山 浩, 手島玲子. 特定原材料検査における海苔製品中のえび・かにDNA検出法の検討. 第17回日本食品化学学会総会・学術大会講演要旨集, p. 66 (2011).

Table 3. Yield and quality of genomic DNA extracted from samples

No.	Sample	Declaration	DNA extraction							
			DNeasy				Genomic-tip			
			Lot	DNA conc. (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Lot	DNA conc. (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
10 ppm $\leq$ X										
3	Shrimp powder mix III	Shrimp	A	296.00	1.84	1.41	A	3485.30	1.85	2.30
			B	419.56	1.86	1.65	B	2523.90	1.90	2.44
6	Shrimp extract paste I	Shrimp	A	13.84	1.62	0.79	A	28.06	1.48	0.55
			B	13.91	1.56	0.82	B	20.24	1.62	0.74
7	Shrimp extract paste II	Shrimp	A	17.90	1.47	0.59	A	6.67	1.29	−1.13
			B	20.12	1.50	0.57	B	12.95	1.34	5.79
9	XO sauce	Shrimp	A	107.14	1.40	0.58	A	69.87	1.88	2.17
			B	154.87	1.39	0.58	B	60.51	1.88	2.08
10	Shrimp with chili sauce	Shrimp	A	33.71	1.90	0.93	A	175.14	1.87	2.66
			B	33.43	1.79	0.90	B	345.81	1.88	2.38
11	Shrimp pilaf	Shrimp	A	35.06	1.55	0.65	A	101.25	1.42	0.80
			B	53.72	1.57	0.64	B	85.32	1.59	1.34
12	Shrimp shumai; steamed dumpling with shrimp	Shrimp	A	65.12	1.81	1.42	A	373.34	1.81	2.31
			B	63.29	1.84	1.63	B	518.37	1.82	2.29
13	Satsuma-age; fried fish cake	Shrimp	A	49.40	1.64	0.86	A	267.50	1.94	2.18
			B	45.36	1.61	0.85	B	280.31	1.94	2.19
14	Chukadon sauce; chopsuey over rice	Shrimp	A	36.19	1.78	1.14	A	350.96	1.84	2.31
			B	35.37	1.69	1.09	B	364.46	1.81	2.15
15	Champon sauce; a dish of noodles with stir-fried pork, seafood and vegetables in soup	Shrimp	A	43.25	1.75	2.06	A	415.50	1.79	2.15
			B	57.00	1.70	1.48	B	323.30	1.79	2.20
16	Shrimp gratin	Shrimp	A	13.27	1.80	1.94	A	367.16	1.77	2.15
			B	13.62	1.87	1.91	B	304.30	1.76	2.10
17	Shiokara; salted and fermented shrimp	Shrimp	A	76.28	1.61	1.09	A	688.62	1.78	2.09
			B	92.41	1.58	0.86	B	368.49	1.83	2.13
19	Seafood paella mix	Shrimp	A	164.86	1.81	1.21	A	95.39	1.58	1.64
			B	143.71	1.79	1.17	B	190.27	1.31	1.35
20	Dried shrimp	Shrimp	A	58.38	1.52	0.56	A	162.84	1.91	1.67
			B	31.08	1.63	1.25	B	1063.29	1.67	1.85
22	Wheat flour based fried snacks	Shrimp	A	27.87	1.68	0.97	A	737.39	1.84	1.99
			B	22.13	1.69	0.99	B	728.14	1.73	1.87
23	Potato flour based fried chips	Shrimp	A	−0.39	1.54	0.12	A	6.14	2.22	−1.35
			B	0.57	−0.84	0.77	B	6.89	1.71	−1.73
24	Rice flour based fried crackers	Shrimp	A	65.28	1.74	0.74	A	591.56	1.69	1.10
			B	55.62	1.78	0.73	B	542.07	1.68	1.04
25	Seasoning mix for braised seaweed, shrimps and squid	Shrimp* ¹	A	22.51	1.85	0.55	A	28.11	1.87	2.19
			B	25.53	1.72	0.53	B	32.98	1.88	2.13
28	Mochi; rice cake	Shrimp, Shrimp* ¹	A	33.00	1.58	0.69	A	123.10	1.51	0.92
			B	24.96	1.56	0.71	B	107.87	1.56	0.99
30	Croquette with crab meat	Crab	A	28.07	1.79	1.30	A	378.27	1.79	2.18
			B	29.63	1.73	1.35	B	377.61	1.78	2.16
31	Shiokara; salted and fermented crab	Crab	A	5.43	0.90	0.24	A	−0.81	−5.01	−2.37
			B	3.23	1.02	0.27	B	1.15	0.69	0.19
32	Dried crab	Crab	A	416.60	2.06	1.97	A	760.33	1.88	2.18
			B	438.24	2.19	2.07	B	521.60	1.92	2.24
33	Zousui seasoning mix for rice soup with crab meat	Crab	A	139.42	1.51	0.46	A	323.72	1.70	1.35
			B	93.86	1.51	0.43	B	282.98	1.67	1.16
34	Corn starch and rice flour based fried snacks	Crab	A	8.14	1.87	0.78	A	86.84	1.86	3.20
			B	6.91	2.36	1.20	B	77.27	1.88	3.67
35	Miso suop with crab meat	Crab	A	48.51	1.42	0.52	A	128.96	1.91	1.64
			B	60.94	1.57	0.50	B	32.90	1.89	1.55

Table 3. Continued

No.	Sample	Declaration	DNA extraction							
			DNeasy				Genomic-tip			
			Lot	DNA conc. (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Lot	DNA conc. (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
36	Zousui; rice soup with crab meat	Crab	A	74.48	1.70	1.07	A	151.45	1.91	2.10
			B	80.47	1.73	1.09	B	185.12	1.94	2.23
37	Sauce for crab omelet	Crab	A	14.13	2.02	0.87	A	94.29	1.72	2.82
			B	14.38	2.00	0.91	B	93.54	1.72	2.77
39	Canned crabmeat	Crab	A	38.26	1.99	5.01	A	737.13	1.75	2.25
			B	44.66	2.01	4.52	B	1334.78	1.84	2.15
40	Kani miso; crab viscera	Crab	A	85.81	1.72	0.91	A	100.79	1.85	2.12
			B	69.02	1.80	0.95	B	52.09	1.84	2.16
41	Kamaboko; boiled fish paste	Crab	A	11.05	1.29	1.82	A	488.89	1.81	2.33
			B	11.72	1.50	1.86	B	446.80	1.81	2.34
44	Spaghetti with cream sauce	Shrimp, Crab ^{*1}	A	14.24	1.88	2.05	A	463.22	1.88	2.21
			B	14.81	1.82	1.80	B	307.92	1.89	2.17
45	Chinese cabbage kimchi; Korean pickle	Shrimp ^{*1} , Crab ^{*1}	A	17.07	1.53	1.19	A	106.58	1.96	2.24
			B	21.82	1.54	1.03	B	112.24	2.00	2.29
1 ppm≤X<10 ppm										
1	Shrimp powder mix I	Shrimp	A	28.28	1.61	0.62	A	7.54	1.58	0.41
			B	35.01	1.57	0.66	B	9.60	1.42	0.39
2	Shrimp powder mix II	Shrimp	A	33.33	1.58	0.59	A	51.71	1.90	1.32
			B	58.30	1.48	0.57	B	78.11	1.88	1.01
21	Seasoned laver	Shrimp ^{*1}	A	336.24	2.15	1.97	A	113.51	1.87	1.48
			B	364.19	2.10	1.97	B	62.21	1.88	1.83
38	Curry flavored sauce for stir-fried crab and egg	Crab	A	23.72	1.82	0.39	A	12.39	1.22	0.51
			B	18.52	1.85	0.37	B	12.92	1.42	0.36
42	Fish sausage	Crab ^{*1}	A	13.03	1.90	1.92	A	229.44	1.90	1.91
			B	13.31	2.02	2.50	B	107.22	1.86	2.17
X<1 ppm										
4	Shrimp-flavored oil I	Shrimp	A	−3.36	1.54	0.35	A	−0.09	−0.08	0.01
			B	−3.31	1.90	0.45	B	−4.30	1.65	0.33
5	Shrimp-flavored oil II	Shrimp	A	−3.18	1.26	0.34	A	−4.72	7.68	0.43
			B	−1.64	1.50	0.20	B	−3.94	6.13	0.35
8	Salted shrimp paste	Shrimp	A	62.37	1.49	1.01	A	0.29	0.06	0.01
			B	18.45	1.43	0.65	B	−0.54	−0.11	−0.02
18	Seafood paella seasoning mix	Shrimp	A	76.22	1.76	0.92	A	1548.52	1.89	2.25
			B	73.59	1.80	0.97	B	1441.43	1.89	2.24
26	Chili sauce	Shrimp ^{*1}	A	16.16	1.65	0.53	A	2.51	0.38	−2.21
			B	9.73	2.06	0.44	B	19.07	0.96	0.86
27	White stew roux	Shrimp ^{*1}	A	101.43	1.73	1.50	A	1265.27	1.80	2.04
			B	55.62	1.77	1.44	B	1229.08	1.80	2.06
29	Crab extract paste	Crab	A	71.44	1.51	0.60	A	31.96	1.66	2.12
			B	58.59	1.53	0.58	B	41.73	1.67	1.79
43	Chitosan dietary supplement	Crab ^{*2}	A	66.96	1.52	0.37	A	132.57	1.74	2.75
			B	113.93	1.52	0.45	B	123.13	1.71	2.78
46	Glucosamine dietary supplement	Shrimp ^{*2} , Crab ^{*2}	A	−3.01	3.48	0.40	A	−6.76	587.35	0.55
			B	−3.35	2.24	0.36	B	−6.65	−30.95	0.46

^{*1} Some ingredients contain shrimp/crab.

^{*2} Sample also contains ingredients of shrimp/crab origin.

すべてで、えびエキス原料を使用していた。エキス原料の製造方法の詳細は不明であるが、製造条件によっては、タンパクとDNAで変性・分解程度が異なることが予想され

る。エキス原料については、モデル品を作製するなどして、タンパクやDNAの挙動を検証する必要がある。

ELISA 値の大小にかかわらず、「植物／動物 PCR: -」

Table 4A. Results of screening test and confirmation test for detection of shrimp and crab in samples

No.	Sample	Declaration	ELISA ^a						PCR ^b															
			M kit			N kit			Judgement				DNeasy				Genomic-tip							
			ppm	%CV		ppm	%CV		Lot	P	A	S	AP-S	C	Judgement	Lot	P	A	S	AP-S	C	Judgement		
			10 ppm ≤X																					
3	Shrimp powder mix III	Shrimp	>20	—		>20	—		A		+	+	+		A		+	+	+		pos		pos	
6	Shrimp extract paste I	Shrimp	17.3	1.5		>20	—		A	—	—	—	—		B	—	—	—	—	—		ind		ind
7	Shrimp extract paste II	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	—	+	—		B	+	+	+	—	—		pos		pos
9	XO sauce	Shrimp	4.5	2.6		11.8	2.4		A	—	—	+	+		B	—	—	+	+	+		ind		ind
10	Shrimp with chili sauce	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
11	Shrimp pilaf	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		B	+	+	+	+	+		pos		pos
12	Shrimp shumai; steamed dumpling with shrimp	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
13	Satsuma-age; fried fish cake	Shrimp	>20	—		>20	—		A	—	—	—	—		A	+	+	—	—	—		ind		pos
14	Chukadon sauce; chopsuey over rice	Shrimp	>20	—		>20	—		B	+	+	+	—		B	+	+	+	+	+		pos		pos
15	Champon sauce; a dish of noodles with stir-fried pork, seafood and vegetables in soup	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
16	Shrimp gratin	Shrimp	>20	—		>20	—		B	+	+	+	—		B	+	+	+	+	+		pos		pos
17	Shiokara; salted and fermented shrimp	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	—	—		pos		pos
19	Seafood paella mix	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
20	Dried shrimp	Shrimp	>20	—		>20	—		B	—	—	—	—		A	—	—	—	—	—		ind		ind
22	Wheat flour based fried snacks	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
23	Potato flour based fried chips	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
24	Rice flour based fried crackers	Shrimp	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
25	Seasoning mix for braised seaweed, shrimps and squid	Shrimp ^{*1}	14.9	7.4		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
28	Mochi; rice cake	Shrimp, Shrimp ^{*1}	>20	—		>20	—		B	+	+	+	—		B	+	+	+	+	+		pos		pos
30	Croquette with crab meat	Crab	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
31	Shiokara; salted and fermented crab	Crab	10.5	2.0		5.8	1.0		A	—	—	—	—		A	—	—	+	+	+		pos		pos
32	Dried crab	Crab	>20	—		>20	—		A	—	—	—	—		A	—	—	+	+	+		pos		pos
33	Zousui seasoning mix for rice soup with crab meat	Crab	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		A	+	+	+	+	+		pos		pos
34	Corn starch and rice flour based fried snacks	Crab	>20	—		>20	—		A	+	+	+	—		B	+	+	+	+	+		pos		pos

Table 4A. Continued

No.	Sample	Declaration	ELISA ^a				PCR ^b															
			M kit		N kit		Judgement			DNeasy						Genomic-tip						
			ppm	%CV	ppm	%CV		Lot	P	A	S	AP-S	C	Judgement	Lot	P	A	S	AP-S	C	Judgement	
35	Miso Soup with crab meat	Crab	>20	—	>20	—		A	—	—	—	—	pos		A	—	—	—	—	—	+	ind
36	Zousui; rice soup with crab meat	Crab	>20	—	>20	—		A	—	—	—	—	pos		A	+	—	—	—	—	+	pos
37	Sauce for crab omelet	Crab	>20	—	>20	—		A	+	+	—	+	pos		A	+	+	—	+	+	+	pos
39	Canned crabmeat	Crab	>20	—	>20	—		A	+	+	—	+	pos		A	+	+	—	+	+	+	pos
40	Kani miso; crab viscera	Crab	>20	—	>20	—		A	—	—	—	—	pos		A	—	—	—	—	—	+	ind
41	Kamaboko; boiled fish paste	Crab	>20	—	>20	—		A	+	+	—	+	pos		A	+	+	—	+	+	+	pos
44	Spaghetti with cream sauce	Shrimp, Crab ^{*1}	>20	—	>20	—		A	+	+	—	+	pos	Shrimp:pos Crab:neg	B	+	+	—	+	+	+	Shrimp:pos Crab:pos
45	Chinese cabbage kimchi; korean pickle	Shrimp ^{*1} , Crab ^{*1}	>20	—	>20	—		A	+	+	—	+	pos	Shrimp:pos Crab:neg	B	+	+	—	+	+	+	Shrimp:pos Crab:pos
1 ppm≤X<10 ppm																						
1	Shrimp powder mix I	Shrimp	3.6	2.7	1.1	10.4		A	—	—	—	—	neg		A	—	—	—	—	—	—	ind
2	Shrimp powder mix II	Shrimp	7.5	1.1	4.8	1.6		A	—	—	—	—	neg		A	—	—	—	—	+	—	ind
21	Seasoned laver	Shrimp ^{*1}	1.5	8.2	2.9	7.1		A	+	—	+	+	neg		A	—	—	—	—	—	—	ind
38	Curry flavored sauce for stir-fried crab and egg	Crab	3.1	2.0	8.3	3.8		A	—	—	—	—	neg		A	—	—	—	—	—	—	ind
42	Fish sausage	Crab ^{*1}	2.3	3.0	2.7	5.6		A	+	+	—	—	neg		A	+	+	—	—	—	—	neg
X<1 ppm																						
4	Shrimp-flavored oil I	Shrimp	<1.0	—	<1.0	—		A	—	—	+	—	neg		A	—	—	—	—	—	—	ind
5	Shrimp-flavored oil II	Shrimp	<1.0	—	<1.0	—		A	+	+	+	+	neg		A	+	+	+	+	+	+	pos
8	Salted shrimp paste	Shrimp	<1.0	—	<1.0	—		A	—	—	—	—	neg		A	—	—	—	—	—	—	ind
18	Seafood paella seasoning mix	Shrimp	<1.0	—	<1.0	—		A	—	—	—	—	neg		A	+	+	—	—	—	—	pos
26	Chili sauce	Shrimp ^{*1}	<1.0	—	<1.0	—		A	+	—	—	—	neg		A	+	+	—	—	—	—	neg
27	White stew roux	Shrimp ^{*1}	<1.0	—	<1.0	—		A	—	—	—	—	neg		A	+	+	—	—	—	—	pos
29	Crab extract paste	Crab	<1.0	—	<1.0	—		A	—	+	—	—	neg		A	—	—	—	—	—	—	ind
43	Chitosan dietary supplement	Crab ^{*2}	<1.0	—	<1.0	—		A	—	—	—	—	neg		A	+	+	—	—	—	—	neg
46	Glucosamine dietary supplement	Shrimp ^{*2} , Crab ^{*2}	<1.0	—	<1.0	—		A	+	+	—	—	neg	Shrimp:neg Crab:neg	B	—	—	—	—	—	—	Shrimp:neg Crab:neg

^a M kit and N kit represent Crustacean Kit "Maruha" (Maruha Nichiro foods, Inc.) and Food Allergen Test EJA Crustacean "Nissui" (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), respectively.^b Primers for PCR: A, animal; P, plant; S, shrimp; AP-S, akiami paste shrimp; C, crab.^{*1} Some ingredients contain shrimp/crab.^{*2} Sample also contains ingredients of shrimp/crab origin.

Table 4B. Summarized results of screening test and confirmation test for detection of shrimp and crab in samples

Screening test	Confirmation test	DNA		
		DNeasy		Genomic-tip
	pos	21		27
	neg	2		0
		44. Spaghetti with cream sauce/crab	45. Chinese cabbage kimchi/crab	
10 ppm ≤ X		9		5
		6. Shrimp extract paste I	35. Miso soup with crab meat	6. Shrimp extract paste I
		9. XO sauce	36. Zousui	9. XO sauce
	ind	13. Satsuma-age	40. Kani miso	20. Dried shrimp
		20. Dried shrimp	32. Dried crab	35. Miso soup with crab meat
		31. Shiokara		40. Kani miso
	pos	1		0
	neg	1		1
		42. Fish sausage		42. Fish sausage
1 ppm ≤ X < 10 ppm		3		4
	ind	1. Shrimp powder mix I	38. Curry flavored sauce	1. Shrimp powder mix I
		2. Shrimp powder mix II		2. Shrimp powder mix II
				21. Seasoned laver
	pos	1		3
	neg	4		3
X < 1 ppm		4		3
	ind	8. Salted shrimp paste	27. White stew roux	4. Shrimp-flavored oil I
		18. Seafood paella seasoning mix	43. Chitosan dietary supplement	8. Salted shrimp paste
				29. Crab extract paste

によって、「確認検査：検知不能」と判定された試料が、D法抽出DNAで16試料、G法抽出DNAで12試料あった。いずれの抽出DNAでも「植物／動物PCR：－」であった9試料については、確認検査を実施可能とするための改善が必要と考えられた。そこで、「植物／動物PCR：－」の原因として考えられるPCR阻害作用の確認を行った。

3. PCR阻害作用の影響

D法、G法両抽出DNAにおいて「検知不能」であった9試料、「かに：陰性」であった「42. 魚肉ソーセージ」、D法抽出DNAにおいてのみ「かに：陰性」であった2試料「44. スパゲッティ」、「45. 白菜キムチ」の合計12試料について、抽出DNAに陽性コントロールプラスミドを添加したPCRを実施し、標的サイズの増幅産物の検出の有無によってPCR阻害の程度を確認した。なお、検知不能であった9試料と「42. 魚肉ソーセージ」については、精製度が高いと予想されるG法抽出DNAを用いた。

Table 5に示すように、12試料のうち、「6. えびエキスI」、「1. えび混合パウダーI」、「2. えび混合パウダーII」、「38. カレー炒めの素」、「8. えびみそ」の5試料では、「植物、動物、えび、かにPCR：－」であり、PCR阻害の程

度が大きいと考えられた。このうち原料として利用される「6. えびエキスI」、「1. えび混合パウダーI」、「2. えび混合パウダーII」は、製品への使用量が少なく、製品レベルでは阻害作用は低減されることが考えられるが、「38. カレー炒めの素」、「8. えびみそ」は、ELISA値が低いものの、最終製品であり、DNA抽出・精製方法の改良による阻害作用の低減が望まれる。また、「9. XO醬」、「20. 乾燥えび」、「35. 味噌汁」の3試料では、「植物、えび、かにPCR：＋」であったものの、「動物PCR：－」であり、PCR阻害作用を有すると判断した。ただし、これら3試料では元々「えび／かにPCR：＋」であったことから、他のPCRと比較して動物PCRが阻害を受けやすいことが予想された。一般にPCR阻害を引き起こす食品中の物質としては、タンパク質、ポリフェノール類、多糖類等が知られている。今回PCR阻害作用が確認された試料において、 A_{260}/A_{280} 比は基準（1.2～2.5）範囲内に収まっていたことから、阻害の原因がタンパクである可能性は低いと判断した。また、試料の多くがえびとかにを主原料（エキス、パウダー、調味料）とすることから、果物や穀物に多く含有されるポリフェノールである可能性も低いと判断した。一

Table 5. PCR inhibition analysis using DNA samples spiked with positive control plasmid

No.	Sample	Declaration	DNA extraction method ^a	PCR												PCR inhibition	
				Extracted DNA						Extracted DNA + positive control							
				Lot	P	A	S	AP-S	C	Judgment	P	A	S	C	Judgment		
10 ppm≤X																	
6	Shrimp extract paste I	Shrimp	G	A	—	—	—	—		ind	—	—	—		ind	Presence	
				B	—	—	—	—			—	—	—				
9	XO sauce	Shrimp	G	A	—	—	+	+		ind	+	—	+		pos	Presence	
				B	—	—	+	+			+	—	+				
20	Dried shrimp	Shrimp	G	A	—	—	+	—		ind	+	—	+		pos	Presence	
				B	—	—	—	—			+	—	—				
35	Miso soup with crab meat	Crab	G	A	—	—			+	ind	+	—		+	pos	Presence	
				B	—	—			+		+	—		+			
40	Kani miso	Crab	G	A	—	—			+	ind	+	+		+	pos	Absence	
				B	—	—			+		+	+		+			
44	Spaghetti with cream sauce	Shrimp, Crab ^{*1}	D	A	+		+	+	—	Shrimp:pos	+		+	+	pos	Absence	
				B	+		+	+	—	Crab:neg	+		+	+			
45	Chinese cabbage kimchi	Shrimp ^{*1} , Crab ^{*1}	D	A	+		—	+	—	Shrimp:pos	+		+	+	pos	Absence	
				B	+		+	+	—	Crab:neg	+		+	+			
1 ppm≤X<10 ppm																	
1	Shrimp powder mix I	Shrimp	G	A	—	—	—	—		ind	—	—	—		ind	Presence	
				B	—	—	—	—			—	—	—				
2	Shrimp powder mix II	Shrimp	G	A	—	—	—	+		ind	—	—	—		ind	Presence	
				B	—	—	—	—			—	—	—				
38	Curry flavored sauce	Crab	G	A	—	—			—	ind	—	—		—	ind	Presence	
				B	—	—			—		—	—		—			
42	Fish sausage	Crab ^{*1}	G	A		+			—	neg		+		+	pos	Absence	
				B		+			—			+		+			
X<1 ppm																	
8	Salted shrimp paste	Shrimp	G	A	—	—	—	—		ind	—	—	—		ind	Presence	
				B	—	—	—	—			+	—	—				

^a DNA extraction method: D, DNeasy; G, Genomic-tip.

^{*1} Some ingredients contain shrimp/crab.

方、多糖類としては、甲殻類の外皮を構成するキチンが考えられる。それらは抽出時にDNAと挙動を共にすると予想されるため、抽出DNA中の存在量も多く、阻害原因の1つと考えられる。残りの4試料「40. かにみそ」、「42. 魚肉ソーセージ」、「44. スパゲッティ」、「45. 白菜キムチ」では、抽出DNAを添加しない陽性コントロールのみのPCRの結果と比較して、同程度の増幅強度を有する標的サイズのPCR増幅産物が検出されたことから、PCR阻害の程度は問題ないレベルと考えられた。この中で唯一検知不能と判定されていた「40. かにみそ」の抽出DNAは、濃度・精製度とも良好な結果であり、「かにPCR: +」であったが、抽出DNAは数百塩基対 (base pair: bp) 以下まで分解されていることが電気泳動で確認された (data not shown)。今回測定した「かにみそ」は缶詰であり、加熱調味後、レトルト殺菌などの加工がなされているため、標的DNAの断片化が進んでいると推測され、かにPCRよりも増幅産物長が長く、感度が低い植物 (124 bp) / 動物 (370~470 bp) では検出されにくくなったと考えられた。なお、今回、D法、G法どちらの抽出DNAにおいても、「確認検査: 検知不能」であった試料が数多く存在したことから、今後もDNAの抽出・精製方法の検討は必要と考える。

4. 動物PCRによるDNAの品質確認

D法、G法いずれの抽出DNAにおいても「確認検査: 検知不能」と判定された9試料のうち、「えび／かにPCR: +」であった5試料について、増幅産物長を80bp程度に短くして、DNA分解、PCR阻害作用に対する頑健性を高めた動物PCR (以下、HF動物PCR)⁷⁾を実施した。Table 6に示すように、4試料で「HF動物PCR: +」であり、これら試料には動物DNAは存在するものの、通知動物PCRでは、PCR阻害の程度、DNAの分解程度、DNA含有程度などの要因によって検出できるレベルにはない可能性が示唆された。多くの加工食品は小麦などの植物原料を使用しているため、はじめに植物PCRを実施すると考えられるが、動物原料を主体とする加工食品については、その加工程度 (DNA分解に影響) やPCR阻害作用の有無によって、通知動物PCRでは不検出の結果が得られ、最終的に検知不能と判定される場合が考えられる。これら加工食品に関しては、動物PCRと併せて、えび／かにPCRを

実施すれば、動物PCRで検知不能であった場合でも、えび、かにの含有に関する情報は得られると考えられる。なお、今回使用したHF動物PCRの感度は通知動物PCRと比較して高く、加工度の高い食品を分析した際、「HF動物PCR: +」、「えび／かにPCR: -」の結果が得られ、偽陰性判定のリスクがあるため、使用場面としては、「通知動物PCR: -」、「えび／かにPCR: +」であった場合に確認用として用いるなど、注意が必要である。

ま と め

えびやかにを含む旨の表示がなされている原料および加工食品46試料について、スクリーニング検査および確認検査を実施し、えび／かにPCR確認検査法の適用性を評価した。DNA抽出精製方法の選択に関しては、G法で濃度と精製度ともに全般的に良好な数値が得られ、さらにELISA値10 ppm以上の試料において、G法で「陽性」であった2試料がD法では「陰性」であったことから、検査の見逃しを少なくするためには、はじめにG法を選択することが適当と考えられた。

確認検査の適用性は、表示、ELISA値とPCR試験結果を照合することによって評価した。「ELISA値10 ppm以上」であった32試料について、少なくともD法、G法どちらか一方の抽出DNAでPCRにより検知可能と判定された27試料では、すべての試料が「えび／かにPCR: +」であった。スクリーニング検査と確認検査で共に陽性の結果が得られたことから、「ELISA値10 ppm以上」であれば、パウダー原料、エキス原料、調味料、冷凍食品、菓子、レトルト食品、缶詰等、食品形態が異なる試料においても、確認検査により検出可能であると判断した。また、「ELISA値1 ppm以上、10 ppm未満」であった5試料のうち、PCRにより検知可能と判定された2試料については、1試料でスクリーニング検査と確認検査で共に陽性の結果が得られた一方、1試料では、「確認検査: かに陰性」であった。適用性が得られなかった試料は1試料「42. 魚肉ソーセージ」のみと少なく、検出が困難な食品共通の形態、加工条件などは確認できなかった。

なお、「ELISA値1 ppm以上」の37試料のうち、D法、G法いずれの抽出DNAでも「確認検査: 検知不能」であった試料は8試料あり、そのうち7試料においてPCR阻

Table 6. Analysis for the presence of animal using the HF animal-PCR

No.	Sample	Declaration	DNA extraction method	PCR					HF-PCR		
				Lot	A	S	AP-S	C	Judgment	A	Judgment
10 ppm≤X											
9	XO sauce	Shrimp	G	A	—	+	+		ind	+	pos
20	Dried shrimp	Shrimp	G	A	—	+	—		ind	+	pos
35	Miso soup with crab meat	Crab	G	A	—			+	ind	+	pos
40	Kani miso	Crab	G	A	—			+	ind	+	pos
1 ppm≤X<10 ppm											
2	Shrimp powder mix II	Shrimp	G	A	—	—	+		ind	—	ind

害作用が確認されたことから、DNAの抽出・精製方法の検討は今後も必要と考える。

文 献

- 1) Akiyama, H., Imai, T., Ebisawa, M. Japan Food Allergen Labeling Regulation—History and evaluation. *Adv. Food Nutr. Res.*, **62**, 139–171 (2011).
- 2) 安達玲子, 酒井信夫, 穂山 浩, 手島玲子. アレルギー物質を含む食品の表示と検査法—えび, かにの表示義務化—. *食衛誌*, **50**, J225–J230 (2009).
- 3) 酒井信夫, 安達玲子, 柴原裕亮, 岡 道弘, 阿部晃久, 清水興介, 織田浩司, 吉岡久史, 塩見一雄, 宇理須厚雄, 穂山 浩, 手島玲子. 食品原材料中に含まれる「えび」, 「かに」等の甲殻類タンパク質の実態調査. *日本食品化学誌*, **15**, 12–17 (2008).
- 4) Taguchi, H., Watanabe, S., Temmei, Y., Hirao, T., Akiyama, H., Sakai, S., Adachi, R., Sakata, K., Urisu, A., Teshima, R. Differential detection of shrimp and crab for food labeling using polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3510–3519 (2011).
- 5) Sakai, S., Adachi, R., Akiyama, H., Teshima, R. Validation of quantitative and qualitative methods for detecting allergenic ingredients in processed foods in Japan. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 5675–5680 (2013).
- 6) 田口大夢, 永富靖章. 特定原材料「えび」・「かに」のPCR確認試験法. *食衛誌*, **52**, J349–J354 (2011).
- 7) Watanabe, S., Hirao, T. Japan Kokai Tokkyo Koho, P2012–175928 (Feb. 25, 2011).