

原 著

酵素活性によるタバコシバンムシ成虫の死亡時期の推定

今井 利宏・原田 晴康

日本たばこ産業株式会社葉たばこ研究所

〒323-0808 栃木県小山市大字出井 1900

Estimation of Death Time of Cigarette Beetle by Enzyme Assay

Toshihiro IMAI and Haruyasu HARADA

Leaf Tobacco Research Center, Japan Tobacco Inc.,

Idei 1900, Oyama, Tochigi, 323-0808 Japan

摘要. タバコシバンムシ成虫の死骸からその死亡時期を特定するために、虫体に含まれる酵素活性の指標性を検討した。まず、市販の酵素測定キット（アピザイム）を用いて 19 種の酵素の活性を調べ、強い活性を示した 3 種（C4 エステラーゼ・ α -グルコシダーゼ・酸性フォスファターゼ）を選抜した。続いて、それら 3 種の酵素にカタラーゼを併せた 4 種の酵素活性の個体変動を調べ、ばらつきの少なかったカタラーゼ・C4 エステラーゼ・酸性フォスファターゼを指標酵素として選定した。これら 3 種の酵素の死後減衰を調べた結果、減衰速度は保存温度および酵素によって異なることが判明し、それぞれの半減期は、カタラーゼで 2~3 日（30℃）・1 週間（20℃）・2~3 週間（10℃）、C4 エステラーゼで 2~3 週間（20・30℃）・4 週間以上（10℃）、酸性フォスファターゼは 9 カ月以上であった。以上の結果から、製造工程に加熱滅菌工程を有さないたばこ製品においても、死骸に残存する酵素活性の定量によって、異物昆虫の死亡時期推定が可能であることが明らかになった。

キーワード: 異物昆虫, タバコシバンムシ, 酵素活性, 死後減衰, カタラーゼ, C4 エステラーゼ, 酸性フォスファターゼ

Abstract. We examined the residual activity of enzymes in the dead bodies of adult cigarette beetles to establish an index for determining elapsed time from death to examination. We determined the half-lives of catalase and two other enzymes selected through APIZYM testing: 2 to 3 days at 30℃, 1 week at 20℃, and 2 to 3 weeks at 10℃ for catalase; 2 to 3 weeks at 20 to 30℃, and 4 weeks $\leq$ at 10℃ for C4 esterase; and 9 months $\leq$ at 10 to 30℃ for acid phosphatase. The data suggest that we can use the residual enzyme activity to estimate the time when cigarette beetles contaminated a tobacco product by referring to the date of its manufacture.

Key words: insect contamination, cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*, residual enzyme activity, catalase, C4 esterase, acid phosphatase

はじめに

食品などへの混入異物事例の中で昆虫類の占める割合は高く、消費者の食の安全性に対する関心

の高まりの中で、クレーム件数は近年顕著に増加している（宮沢・他, 2003）。昆虫類の混入は、製造工程から流通、消費者の手元での開封後の消費過程に至るあらゆる時点で発生するため、回収された虫体からその混入時期を特定することは、製造者責任の有無を判断する材料となるばかりでな

2005 年 4 月 4 日受付 (Received 4 April 2005)

2005 年 8 月 12 日受理 (Accepted 12 August 2005)

く、再発防止の観点からも食品産業における重要な課題となっている。昆虫の死後経過時間や加熱履歴を推定する手法として、虫体に残存するカタラーゼあるいはコリンエステラーゼといった酵素活性を指標とする方法や(沼本・他, 1978; 中桐・他, 1995; Nakagiri *et al.*, 1996; 光楽, 2000), 筋肉の構成タンパク質であるミオシンの熱変性を指標とする方法(石橋・他, 2002), RNAの残存量を指標する方法(小田・岡田, 2002)が提案されている。これらの手法のうち、特に簡便性に優れるカタラーゼ法は、パッキング後に加熱滅菌処理される飲料やレトルト食品などにおいて、混入時期を開封の前か後かに特定するうえで高い有効性が認められ、一般に広く利用されている。一方、パッキング後の加熱工程がない紙巻たばこなどに混入する異物昆虫に対しては、本手法の有効性はこれまでほとんど検証されていない。虫体のカタラーゼ活性は、多くの昆虫において、乾燥条件下では死後6カ月以上維持されることが示されているため(辻, 2003), 水分含量が低く、製造後半年以内程度で消費されることが多い紙巻たばこの商品特性を考慮すると、慣用的に行われている気泡の発生量の目視に基づく簡便な測定手法では、有効な死後経過時間の指標とならない可能性が高い。そこで、本研究においては、たばこの主要な異物昆虫となっているタバコシバンムシを対象として、市販の酵素活性測定用キットを用いて指標酵素をスクリーニングし、選抜した酵素の死後経過時間の指標性を検証した。

材料と方法

1. 供試昆虫

エビオス(乾燥ビール酵母)を10%添加したトウモロコシ粉を飼料として本研究所で継代飼育中のタバコシバンムシ *Lasioderma serricorne* (F.) 飼育系統を用いた。1 mmメッシュの篩で飼料中から篩い分けした蛹窩を流水中で除去して得た蛹を雌雄に分け、27°C, 60%RH条件下で羽化させて成虫を得た。同条件下で自然死した死後1日以内の雌成虫死骸をマイルドセブンスーパーライトのパッケージ中に入れ、10, 20, 30°C条件下で保存し、酵素活性の死後減衰測定用のサンプル

とした。

2. 試薬類

アルカリフォスファターゼ・C4エステラーゼ・C8エステラーゼ/リパーゼ・C14リパーゼ・ロイシンアリルアミダーゼ・バリンアリルアミダーゼ・シスチンアリルアミダーゼ・トリプシン・キモトリプシン・酸性フォスファターゼ・ナフトール-AS-BI-ホスホハイドロラーゼ・ α -ガラクトシダーゼ・ β -ガラクトシダーゼ・ β -グルクロニダーゼ・ α -グルコシダーゼ・ β -グルコシダーゼ・*N*-アセチル- β -グルコサミニダーゼ・ α -マンノシダーゼ・ α -フコシダーゼの半定量的分析には、アピザイムキット(日本ビオメリュー)を用いた。酸性フォスファターゼ・C4エステラーゼ・ α -グルコシダーゼの基質として、SIGMA 104 Phosphatase substrate (*p*-ニトロフェニルフォスフェート)・*p*-ニトロフェニルブチレート・*p*-ニトロフェニル α -D-グルコピラノシド(シグマアルドリッチジャパン)をそれぞれ用いた。カタラーゼの基質として、日本薬局方オキシドール(三共, 3 w/v% H_2O_2)を用いた。

3. 器具および装置

死後減衰測定用サンプルの保存(10, 20, 30°C)および酵素反応用(30°C)の恒温器として、温度勾配恒温器TG-200-ADCT(日本医化器械製作所)を用いた。

試料の磨砕には、ヒスコトロンNS-310E(マイクロテックニチオン)を使用した。

定量分析の際の酵素反応は、BD Falcon 353261 紫外-可視光透過性96穴マイクロプレート(日本ベクトン・ディッキンソン)中で行い、TECAN Spectra Fluor マイクロプレートリーダー(テクカンジャパン)を用いて405 nmもしくは240 nmの吸収を測定し、基質から遊離した*p*-ニトロフェノール濃度もしくは過酸化水素濃度を求めた。

4. サンプルの調製

アピザイム試験には、下記の手順で調製した粗酵素液を供した。まず、羽化後14日齢の雌成虫5

個体を蒸留水 2 mL で磨砕した後、5°C 条件下で 10,000 回転 10 分間遠心分離した。上清を ADVANTEC DISMIC 13CP020AN 酢酸セルロースフィルター（アドバンテック東洋）でろ過し、粗酵素液とした。酸性フォスファターゼ・C4 エステラーゼ・ α -グルコシダーゼ・カタラーゼの定量分析には、成虫 1 個体を 0.15 M 塩化ナトリウム水溶液 1 mL で同様に調製した粗酵素液を供した。粗酵素液を 70°C、30 分間加熱処理して失活させたものをリファレンスとした。

5. アピザイム試験

アピザイム試験は、反応温度を 30°C に設定したことを除いて付録のマニュアルどおりに実施した。酵素活性はキット付属の比色スケールを用いて、0（活性なし）、<1（活性弱）、1（活性中）、2<（活性強）の 4 段階に半定量した。

6. 酵素活性の定量分析

酸性フォスファターゼ・C4 エステラーゼ・ α -グルコシダーゼの活性は、酵素反応により基質から遊離した *p*-ニトロフェノールを 405 nm の吸収により測定し、検量線から求めたモル数で示した。すなわち、マイクロプレートのウェルに粗酵素液 50 μ L（0.05 個体当量）、50 mM pH 緩衝液 25 μ L（酸性フォスファターゼ：クエン酸緩衝液 pH 4.5、C4 エステラーゼ：リン酸緩衝液 pH 7.0、 α -グルコシダーゼ：リン酸緩衝液 pH 5.0）と 15 mM 基質溶液（*p*-ニトロフェニルブチレートについては少量のイソプロパノールに溶解後加水した）25 μ L を注入し、30°C で 0.5 時間反応させた後、50 mM リン酸水素二カリウム溶液 200 μ L を加え、速やかに 405 nm の吸収を測定した。

カタラーゼの活性は、反応前後の過酸化水素濃度を 240 nm の吸収により測定し、分解モル数で示した。すなわち、粗酵素液 50 μ L（0.05 個体当量）を 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）で調製した 20 mM 過酸化水素溶液 250 μ L に加え、直後に反応前の 240 nm の吸収を測定した。さらに 30°C で 0.5 時間反応させた後、発生した酸素気泡を 200 rpm、2 分間の遠心分離によって除去し、速やかに反応後の 240 nm の吸収を測定した。

粗酵素液自体が 240 nm の吸収を有するため、反応液全体の吸収の反応前後差を過酸化水素の検量線に当てはめて分解量とみなした。

結果と考察

1. 指標酵素の検討

アピザイム試験により半定量的に分析したタバコシバンムシ雌成虫抽出物の 19 種の酵素活性レベルは以下のとおりであった。>2（強）：C4 エステラーゼ・酸性フォスファターゼ・ナフトール-AS-BI-ホスホハイドロラーゼ・ α -グルコシダーゼ、1（中）：C8 エステラーゼ/リパーゼ・ロイシンアリルアミダーゼ・ β -ガラクトシダーゼ・ β -グルクロニダーゼ・*N*-アセチル- β -グルコサミニダーゼ、<1（弱）：アルカリフォスファターゼ・ α -マンノシダーゼ、0（なし）：C14 リパーゼ・バリニアリルアミダーゼ・シスチンアリルアミダーゼ・トリプシン・キモトリプシン・ α -ガラクトシダーゼ・ β -グルコシダーゼ・ α -フコシダーゼ。アピザイムキットは微生物の同定用に開発されたものであるため (Gruner *et al.*, 1992)、培養細胞を除くと昆虫での利用例はこれまでほとんど報告されていないものの (Mitsunashi, 1990)、虫体の酵素活性の測定にも有用であることが明らかになった。アピザイム試験により強い活性を示した酵素のうち、基質を試薬として入手することが容易な C4 エステラーゼ・酸性フォスファターゼ・ α -グルコシダーゼについて指標酵素としての適性をさらに検討した。

死後経過時間の指標となる酵素の条件として、個体間の活性のばらつきが少ないことが挙げられるため (光楽, 2000)、アピザイム試験により選抜した C4 エステラーゼ・酸性フォスファターゼ・ α -グルコシダーゼとカタラーゼについて、雌雄別および日齢別に各 8 個体ずつ活性を調べ、個体変動を明らかにした (表 1)。その結果、 α -グルコシダーゼの活性は個体変動が大きく、死後減衰の指標として使えないことが明らかになった。残り 3 種の酵素は、同性・同一日齢の個体間のばらつきが α -グルコシダーゼと比較して小さく、指標としての要件を満たしたが、酸性フォスファターゼは雌の活性が有意に高く、指標として用いる場

表 1 タバコシバンムシ成虫の週齢と 4 種の酵素活性 (平均値±標準偏差, $N=8$)

羽化後 週	カタラーゼ ^{1), 4)}		C4 エステラーゼ ^{2), 4)}		酸性フォスファターゼ ^{2), 3)}		α -グルコシダーゼ ^{2), 4)}	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1	1.8±0.4	1.5±0.2	24.3±2.1	23.2±4.7	3.7±0.4a	8.1±1.5b	18.6±8.9	19.2±9.6
2	1.5±0.1	1.7±0.2	19.3±3.0	19.8±4.7	3.8±0.5a	8.3±2.4b	8.0±5.8	9.8±6.3
4	1.3±0.2	1.7±0.1	18.8±5.1	19.3±4.8	4.7±0.8a	10.6±2.3b	4.4±2.6	14.4±7.4

¹⁾ 過酸化水素分解量 $\mu\text{mol}/0.05$ 個体当量 (30°C, 30 min).

²⁾ *p*-ニトロフェノール誘導体分解量 $\text{nmol}/0.05$ 個体当量 (30°C, 30 min).

³⁾ Tukey 法により, アルファベット同文字を付した平均値間に有意差は存在しない ($\alpha=0.05$).

⁴⁾ 分散分析により, 雌雄間および週齢間に有意な差は存在しない.

表 2 タバコシバンムシ雌成虫の 2 種酵素活性の死後経時減衰¹⁾

酵 素 名	保存 温度	死 後 経 過 週 数				
		0	1	2	3	4
カタラーゼ	10°C	1±0.31	0.95±0.22	0.65±0.18	0.43±0.13	0.33±0.16
	20°C	1±0.20	0.42±0.07	0.25±0.15	0.05±0.04	0.08±0.10
	30°C	1±0.09	0.04±0.04	0.07±0.04	0.07±0.05	0.09±0.06
C4 エステラーゼ	10°C	1±0.39	0.81±0.14	0.85±0.44	0.73±0.20	0.68±0.09
	20°C	1±0.41	0.58±0.22	0.57±0.13	0.42±0.09	0.40±0.11
	30°C	1±0.45	0.61±0.17	0.68±0.20	0.45±0.19	0.44±0.06

¹⁾ 羽化後 4~6 週齢の生存虫の活性を 1 としたときの比活性, 平均値±標準偏差, $N=8$.

表 3 タバコシバンムシ雌成虫のカタラーゼの死後経時減衰¹⁾

酵 素 名	保存 温度	死 後 経 過 日 数					
		0	1	2	3	5	7
カタラーゼ	30°C	1±0.16	0.57±0.11	0.51±0.10	0.36±0.11	0.36±0.14	0.12±0.04

¹⁾ 羽化後 4~6 週齢の生存虫の活性を 1 としたときの比活性, 平均値±標準偏差, $N=8$.

合, 雌雄判別の必要があることが示唆された.

2. 3 種の酵素活性の死後減衰

10~30°C で保存した雌成虫死骸の C4 エステラーゼ・酸性フォスファターゼ・カタラーゼの 1~12 カ月間の経時的変化を調べた結果 (カタラーゼは 20°C 以上では 9 カ月ではほぼ失活したため, 以後の調査を打ち切った), 活性の減衰速度は酵素によって異なり, カタラーゼ>C4 エステラーゼ>酸性フォスファターゼの順に失活しやすいことが判明した (図 1). カタラーゼおよび C4 エステラーゼの活性は, いずれの温度条件下でも 1 カ月以内に急速に低下し, その後は低いレベルで維持された. 酸性フォスファターゼの活性の低

下は極めて緩慢で, 死後 12 カ月経過しても 50% 程度の活性が保持された. カタラーゼおよび C4 エステラーゼについて 4 週までの活性の経時的変化をさらに調べたところ, それぞれの酵素活性の半減期は, カタラーゼで 2~3 日 (30°C)・1 週間 (20°C)・2~3 週間 (10°C), C4 エステラーゼで 2~3 週間 (20・30°C)・4 週間<(10°C)であった (表 2, 3). パッキング後に加熱滅菌される食品類では, 加熱時に虫体内の酵素が失活するため, 酵素活性の定性による異物昆虫の混入時期の特定が可能なことが知られているが, 本試験の結果から, パッキング後の加熱工程がないたばこ製品においても, 虫体のカタラーゼおよび C4 エステラーゼ活性の定量によって死後数週間以内であ

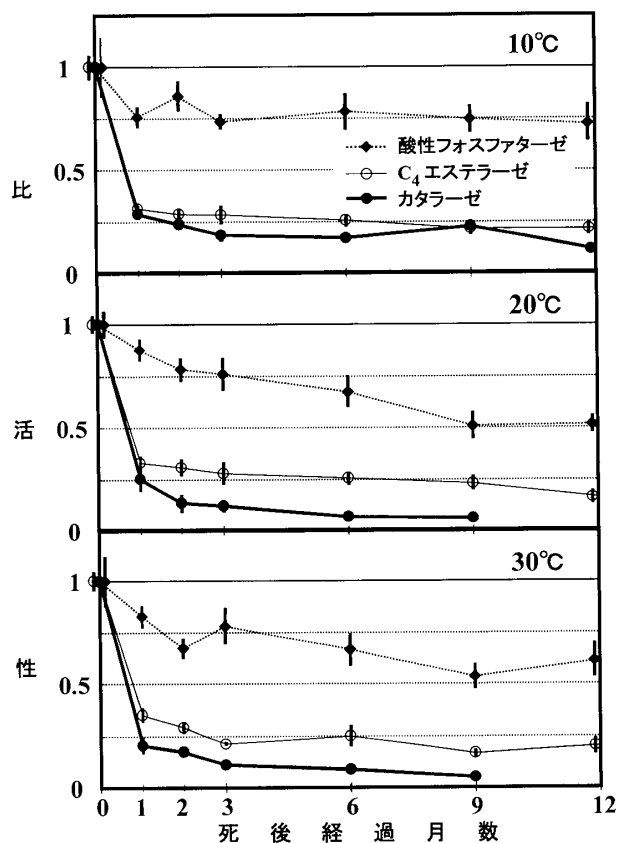


図1 タバコシバンムシ雌成虫の3種酵素活性の死後経時減衰
羽化後4～6週齢の生存虫の活性を1としたときの比活性。縦棒は標準誤差を示す(N=8)。

るのか、あるいはそれ以上の期間が経過しているのか、時期を絞り込むことが可能なことが明らかになった。本手法は、気泡発生量の目視に基づく従来のカタラーゼ活性測定法と比較すると簡便性に欠けるものの、死後経過時間をより短期間に絞り込むことが可能なため、消費までの期間が短い紙巻たばこにおいては、より実用度が高いものと考えられる。

本試験では、雌成虫を供試したが、カタラーゼおよびC₄エステラーゼ活性については性差がなく、また酵素の安定性に供試虫の性は無関係と考えられるため、本手法では雌雄に関係なく死亡時期を推定できるものと考えられる。ただし、供試個体の体サイズにばらつきがある場合、個体当量の活性でなく、抽出物のタンパク質濃度あたりの活性で評価する必要があるものと考えられる。

タバコシバンムシは一般家屋内で普通に発生している虫であるため(川上・中野, 1996, 1997),

家庭内において開封後の乾麺などの食品やたばこ製品に侵入する機会も多いものと考えられる。パッキング後に加熱処理されない紙巻たばこでは、製造段階で混入した虫がパッキング後まで生き残ることがありえるが、発見された虫の死亡推定時期と、製造日および開封日、製品が置かれていた温度条件やパッケージ内に残された糞や成虫脱出口などの生活痕等の情報を総合することによって、クレーム虫が開封後に侵入した可能性を判断することが可能になった。

引用文献

- Gruner, E., von Graevenitz, A. & Altwegg, M., 1992. The API ZYM system: A tabulated review from 1977 to date. *J. Microbiol. Methods* **16**: 101～118.
- 石橋美幸・堀 妃佐子・諏訪芳秀・佐脇徹也・増田正裕・岩田修二・峯 孝則, 2002. 昆虫の被加熱履歴鑑定技術の開発. *日本食品化学学会誌* **9**: 30～34.
- 川上裕司・中野敬一, 1996. 一般住宅の屋内とその近隣屋外におけるタバコシバンムシの生息調査(第1報). *家屋害虫* **18**: 1～8.
- 川上裕司・中野敬一, 1997. 一般住宅の屋内とその近隣屋外におけるタバコシバンムシの生息調査(第2報). *家屋害虫* **19**: 4～10.
- Mitsuhashi, J., 1990. Comparison of Zymograms of some insect cell lines by means of API ZYM system. *Appl. Entomol. Zool.* **25**: 535～537.
- 光楽昭雄, 2000. 酵素化学的手法による昆虫混入時期の推定. 最新の異物混入防止技術—食品・薬品の混入異物対策(増補改訂版)(緒方一喜・光楽昭雄編), pp. 260～264. フジ・テクノシステム, 東京.
- 宮沢 宏・荒井賢一・竹内裕子・上原久美子, 2003. 食品等への異物混入の現状—平成14年の検査結果の分析—. *家屋害虫* **25**: 7～12.
- Nakagiri, H., Ishida, I., Yoshimura, N., Sakuma, S. & Kowaka, M., 1996. Analytical methods to determine whether insects detected in draught beer entered during packaging or in the marked. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**: 67～70.
- 中桐裕幸・佐久間修三・小若雅弘, 1995. 生ビール中の昆虫の混入時期の判定方法. *食衛誌* **36**: 413～416.
- 沼本敬直・望月敬夫・鈴木敏孝・溝口善則・大沢貞夫, 1978. 不良食品(昆虫, 毛髪等)の原因追求に対するカタラーゼ試験の応用について. *食品衛生研究* **28**: 50～53.
- 小田祐一・岡田和也, 2002. RNAによる昆虫混入推定技術の開発. *日清研第12回研究発表会講演集*: 60～64.
- 辻 英明, 2003. 昆虫死体のカタラーゼ簡易検査法基礎データの追加—飛来侵入昆虫その他における反応—. *家屋害虫* **25**: 83～90.