

短報

食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討- I

酵素免疫測定法 (ELISA) による定量

渡邊裕子¹, 児玉千絵², 関戸晴子¹, 濟田清隆³
宮沢啓貴³, 渡部健二郎³, 田中幸生², 山田利治¹

Study of managing accuracy methods for detection of
foods containing allergic substances - I
Quantitation by ELISA

Hiroko WATANABE, Chie KODAMA
Haruko SEKIDO, Kiyotaka SAITA
Hiroataka MIYAZAWA, Kenjiro WATABE
Yukio TANAKA and Toshiharu YAMADA

緒言

平成14年11月に通知された「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食発第1106001号)に基づき神奈川県内では川崎市, 横浜市と県衛生研究所の3機関で行政検査を行っている。当検査は加工食品中のアレルギータンパク質をELISA法で定量することをスクリーニング検査としている。また, スクリーニング検査の陰性・陽性の判断基準を $10\mu\text{g/g}$ と設定し, 定量値が $8\sim 12\mu\text{g/g}$ となった場合に再測定を行ない, 値の平均値を採用することが定められている。食品中のアレルギータンパク質は, 加工による変性状態が多様で不均一となり, 食品からの抽出効率が大きく変化することが知られている。また, ELISA法は抗原抗体の結合反応を用いた測定法であることから, 食品試料中の夾雑物の影響を受けやすく, 判断基準である $10\mu\text{g/g}$ を基準とした数値の再現性及び信頼性の確保が検査法の課題として挙げられる。

そこで, 平成14年度に通知されたELISAを用いた定量法の信頼性を確保することを目的に3機関共同で日常検査において簡易に行うことができる精度管理の方法について検討を行った。本報告では3機関の室間誤差を明らかにし, その要因について試料の調製, 食品からの抽出

方法, ELISA法におけるスパイクチェック等の検討を行った。アレルギー原因物質の表示義務として検査法が設定されている5品目(卵, 乳, 小麦, 落花生, そば)のうち, 卵タンパク質を測定することにより評価した。

方法

1. 試料の調製

試料として卵黄蒸しケーキを調製し, 用いた。ケーキは卵黄 300g, 小麦粉300g, バター180g, 砂糖200g, ベーキングパウダー10gを混合し, 35gずつカップに小分けしたものを11分, 13分, 15分蒸して調製した(卵黄の割合30.3%)。各材料は同一ロットを使用し, 卵黄を除く材料の卵タンパク量が検出限界以下であることを確認した。

2. 試薬および機器

卵タンパク量の測定には, 株森永生科学研究所製モリナガ卵白アルブミン(OVA)キット(以下OVAキット)および日本ハム(株)製FASTKITTM卵エライザキット(以下卵キット)を用いた。その他の試薬は, すべて試薬特級を用いた。水は超純水を用いた。

サンプルの均一化には, フードカッター ナショナル製 MK-K58を用いた。抽出操作には, キネマティカポリトロン製ホモジナイザーPT3100, あるいはボルテックスミキサー製VORTEX社製VORTEXGENE2, 高速冷却遠心機トミー製GRX-220を用いた。ELISA法には, マイクロプレートウオッシャー バイオラッド(株)製モデル1575及びマイクロプレートリーダー バイオラッド(株)製モデル680を用いた。pHの測定には東亜電波工業社製HM-30Gを用いた。

3. 卵タンパク質の測定

試験溶液の調製は検査方法に従い¹⁾, 均質化されたサンプルを50mLのポリプロピレンチューブに約2g取り, キット付属の抽出用緩衝液を38mL加えた後, 氷冷しながらホモジナイザーで10,000rpm, 60秒ホモジナイズし, pH6~8に調整する。さらに10,000rpm, 60秒ホモジナイズを2回繰り返した後, $3000\times g$, 4°C で20分遠心分離し, 上清を採取した。ボルテックスミキサーによる抽出では90秒攪拌した後, 遠心し上清を採取した。卵タンパクの定量として用いたELISA法は既報^{1)~5)}に従って行った。定量限界については, 日本薬局方の基準を準用し, $> \mu \pm 10\sigma$ (μ ; ブランク溶液の吸光値の平均値, σ ; ブランク溶液吸光値の標準偏差)とした。3機関をA,B,Cとして結果を示した。

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2 川崎市衛生研究所
3 横浜市衛生研究所

結果及び考察

試料の調製

試料調製は調製方法が簡易な食品として卵黄蒸ケーキを選定した。試料調製のための卵タンパク質の標準品が入手できないことから、市販の卵から卵黄を分離したものを卵標準品として加え調製した。この場合、卵タンパク質量が未知である卵黄を用いるため、添加回収率を求めることはできない。ゆえに分析法における真度を評価することはできない。しかし、日常の検査において同一試料を保存しその継続的な定量によって室内、室間精度の維持ができることから、本試料を用いた室内、室間精度の評価を行った。

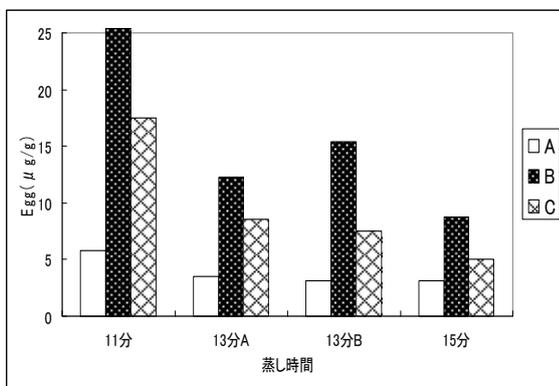


図1 各機関で調製した卵黄蒸ケーキの蒸し時間の検討：卵キット(n=2)

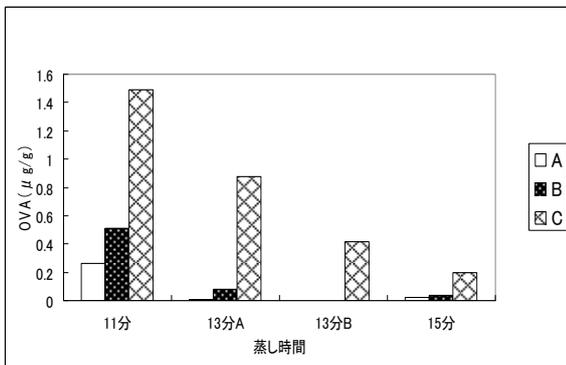


図2 各機関で調製した卵黄蒸ケーキの蒸し時間の検討：卵白アルブミンキット(n=2)

各機関でそれぞれに卵黄蒸ケーキを調製し、蒸し時間による卵タンパク質の変化について検討を行った。卵タンパク質の定量結果を図1（卵キット）と2（OVAキット）に示した。卵キットでは13分と15分の蒸し時間で3~15 μg/gの定量値となることから、基準値の10 μg/g付近でELISA法の検量線の範囲内であることから、13分の蒸し時間が妥当と考えられた。一方、OVAキットでは11分から15分の蒸し時間で1.5 μg/g以下となり、精度管理に適切な値が得られなかった。ゆえに精度管理検討用

サンプルとして、13分の蒸し時間で調製した卵黄蒸ケーキを用い、卵キットの測定値を採用した。

次に共通試料として共同で調製した卵黄蒸しケーキを用いて、3機関の定量値を比較した。共通試料は、試料1と2の2回試料調製を行い、2回抽出による平均値を図3に示した。2回の試料調製では、試料1で2機関が20 μg/g以上の検量線外の値となった。加工を伴う試料調製の再現性を一定に保ち、検量線内に3機関の定量値を安定させることは難しかった。また、試料2の結果をみると3機関の定量値の傾向と図1に示した各機関で調製したサンプルの定量値の傾向とが一致していた。つまり、定量値がB>C>Aの順となった。この傾向はサンプル調製に因らないことから、3機関の室間誤差の要因を明らかにするために抽出方法およびELISA法の見直しを行った。

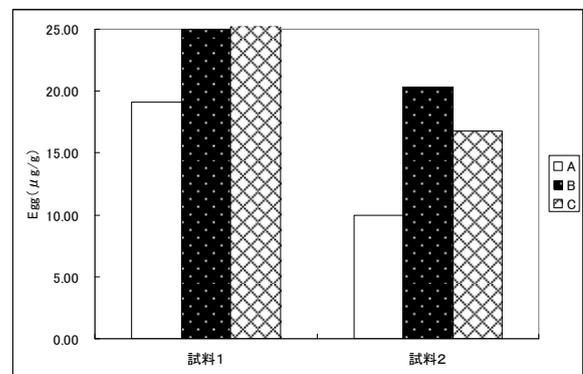


図3 共通試料における3機関の定量値の比較：卵キット (n=2)

食品からの抽出方法

今回検討した3機関では、2機関が内径の異なるホモジナイザーで抽出を行い（A:12mm, C:20mm）、1機関がボルテックスミキサーでの抽出を行っていた(B)。

そこで、これらの抽出条件による定量値の比較を行った（表1）。ホモジナイザーによる抽出では内径12mmと20mmで同じ結果が得られた。また、12mm径では回転数を10,000rpmと20,000rpmで比較したが同等の結果が得られた。さらに、ホモジナイザーとボルテックスミキサーによる抽出においてもほぼ同様の結果が得られ

表1 抽出方法の違いによる比較(n=5)

検討項目	抽出条件	平均値(μg/g)	CV値(%)
ホモジナイザー抽出条件による検討 ¹⁾	内径12mm/10,000rpm	4.0	4.9
	内径12mm/20,000rpm	3.9	2.2
	内径20mm/10,000rpm	4.0	2.8
ホモジナイザーとボルテックスミキサーとの比較 ¹⁾	ホモジナイザー(内径20mm/10,000rpm)	7.1	6.7
	ボルテックスミキサー	6.5	5.2

¹⁾同一試料を用いて1機関で測定した

たことから、抽出方法の違いによる影響ではないことが示された。

ELISA法における標準品のスパイクチェック

本検討では、3機関がそれぞれの施設で測定した場合に、同一標準品を用いたスパイクチェックを行った。結果を表2に示した。OVAキットと卵キットそれぞれに8,16 μ g/gと5,10 μ g/gの各2濃度でチェックを行った。いずれもほぼ同等な結果が得られ、3機関のELISA法の真度が確保されていることを確認した。

表2 3機関によるELISA標準品スパイクの比較 (μ g/g)

キット	標準品濃度	測定機関		
		A	B	C
OVA	8	8.7	8.1	7.7
	16	15.8	16.0	13.6
卵	5	4.1	4.5	4.0
	10	10.1	10.8	10.9

抽出緩衝液の調製方法の違いによる比較

次に、抽出用緩衝液の調製方法の違いによる卵キットの定量値の比較を行った(表3)。通知法では抽出用緩衝液を試料に添加後、中性付近(pH6.0~8.0)となるようにpHを調整することが明記されている。タンパク質の抽出効率には、抽出用緩衝液のpHも大きく関与することから、各機関で調製した抽出用緩衝液と共通に調製した抽出用緩衝液を用いて抽出を行い、その時のpHを比較した。

表3 抽出緩衝液の調製の比較(n=2)

抽出緩衝液	測定項目	測定機関		
		A	B	C
共通	pH	7.06	7.11	7.05
	卵(μ g/g)	20<	18.8	18.3
各機関で調製	pH	7.14	7.11	7.85
	卵(μ g/g)	18.6	17.5	20<

共通に調製した抽出用緩衝液のpHを各機関で測定した結果はpH7.05~7.11 (B>A>C) となり、定量値はA>B>Cの順となった。また、各機関で調製した抽出用緩衝液はpH7.11~7.85 (C>A>B) となり、定量値はC>A>Bであった。抽出用緩衝液のpH値はいずれもpH6.0~8.0の範囲内であることから、通知法に準じると中性に調整する必要はない。また、3機関が調製した抽出用緩衝液のpHと定量値の関係は一定の傾向を示さなかった。このことから、抽出効率の変動によると考えられる定量値の変動は他の要因によると考えられ、さらに検討

が必要であった。

以上、我々は精度管理方法の検討として、試料の調製を行い、抽出方法およびELISA法の手順を確認し、3機関の室間誤差を明らかとし、その要因について検討を行った。その結果、ELISA法における手法や技量が同等であることを確認し、室内精度が確保されていることを示すことができたが、室間誤差の要因を明らかとすることはできなかった。一方、アレルギー物質の検査においては標準品が公開されていないことや食品によりその抽出効率が大きく異なるなど、精度管理を行うにあたり安定した試料の確保や真度の把握が大きな課題であり、本検討においてもそれらの2点をコントロールすることは難しかった。

精度確保の取り組みとして、佐藤⁶⁾はELISA法における検査結果の評価と課題について挙げ、独自に作製している内部標準試料の調製方法について紹介している。また、戸谷⁷⁾は日常の検査での注意点を挙げ、精度維持のための取り組みを紹介している。各機関での取り組みは、通知法にはない検査の原理と限界を理解した上で検査にあたるのが、精度の評価とその確保に不可欠であることを示すものである。さらに、平成17年および平成18年度に検査法の改正が行われ、検査側が検査法を評価し採用するという選択が可能となった。しかし、各機関でこれらの検討を行うにはコスト面での負担が大きいことから、今後も継続的に共同研究をすすめ、検査の信頼性の確保に務めていきたい。

(平成19年7月20日受理)

文 献

- 1) 穂山浩：アレルギー物質を含む食品の検査方法について、食衛誌, **44**, J168-J177(2003).
- 2) 穂山浩, 豊田正武：食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要, 食品衛生研究, **52**, 65-73(2002).
- 3) 穂山浩, 五十鈴川和人, 張替直輝, 渡邊裕子, 飯島賢, 山川宏人他：特定原材料(卵)測定の厚生労働省通知ELISA法の複数機関による評価研究, 食衛誌, **44**, 213-219(2003).
- 4) 高畑能久:ELISAによる特定原材料の検出について(1), 食衛誌, **44**, J275-277(2002).
- 5) 豆越真一：ELISAによる特定原材料の検出について(2), 食衛誌, **43**, J277-J279(2002).
- 6) 佐藤秀隆：アレルギー物質検出に関する課題について, 食衛誌 **46**, J249-J251(2005).
- 7) 戸谷和男：特定原材料の定量検査で気にかけていること 食衛誌 **47**, J352-J353(2006).