

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 - 可溶化剤を用いた 抽出法による定量・定性

渡邊裕子¹, 赤星千絵², 濟田清隆³,
橋口成喜², 関戸晴子¹, 渡部健二郎³, 田中幸生²

Study of managing accuracy methods for detection
of foods containing allergic substances -
Quantification and Qualitation by using
extraction buffer containing a surfactant

Hiroko WATANABE, Chie AKABOSHI, Kiyotaka SAITA,
Shigeki HASHIGUCHI, Haruko SEKIDO,
Kenjiro WATABE and Kouki TANAKA

緒言

平成 14 年より施行された食品表示制度におけるアレルギー物質検査¹⁾の信頼性を確保するため、神奈川県内の行政検査機関である川崎市、横浜市、神奈川県の 3 機関が共同で精度管理について検討を行い、その結果を既報²⁾において報告した。既報では、県内 3 機関の 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、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実サンプルの真度の把握などの課題が明らかとなった。

一方、検査法においては食品加工によるタンパク質の変性により、使用した原材料の抽出効率が低下する状況を受けて、平成 17 年に ELISA 抽出液に変性剤等を用いた検査法^{3,4)}への改訂が行われた。しかし、改訂後の検査法においても、その精度管理においては従

来法と同様の課題が残こされたままとなった。ゆえに、改訂される検査法の特定原材料検知法開発者⁵⁾(日本ハム(株),(株)森永生科学研究所)が行う試験室間バリデーションに共同参画し、各機関における定量・定性室間バリデーションを把握し、検査の信頼性の確認を行った。

方法

1. 試料の調製

試料は、特定原材料検知法開発者が作製した加工食品を用いた。加工食品には各特定原材料の一次標準粉末をタンパク質濃度として 10 μg/g 添加している。定性では特定原材料タンパク質を含まない陰性サンプルについても分析を行った。

2. 試薬および機器

ELISA 法による定量には、(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 落花生測定キット、そば測定キット、日本ハム(株)製 FASTKIT エライザ Ver. 卵キット、同牛乳キット、同小麦キット、同落花生キット、同そばキットを用いた。

ウエスタンブロット法による定性には、(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 卵ウエスタンブロットキット(オボアルブミン(以下 OVA)およびオボムコイド(以下 OVM))、同牛乳ウエスタンブロットキット(カゼイン(以下 CN)および β -ラクトグロブリン(以下 β -LAG))、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。

抽出操作には、振とう機 TAITEC SR-2 s 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(主波長 450 nm, 副波長 630 nm)を用いた。ウエスタンブロット法には、電気泳動装置 テフコ製セイフティーセルミニ、パワーサプライ インビトロジェン製 MP250、転写装置 バイオラッド(株)製トランスブロット SD セルおよびアトー製 AE6110 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. 特定原材料の定量

試験溶液の調製はキットのプロトコールに従い、均質化されたサンプル 1g にキット付属の抽出用緩衝液を 19ml 加えた後、攪拌し、pH6 ~ 8 に調整する。その後、15 時間振とう抽出を行い、3000 × g、室温で 20 分間遠心分離し、上清を採取した。ELISA 法は既報⁶⁾⁻¹⁰⁾およびキット付属のプロトコールに従い行っ

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

た．検量線はマイクロプレートマネージャ 5.2 PC データ解析ソフトウエアを用いて、4 係数 logistic 解析により作成した．試験は 2 回繰り返しで行った．

4. 特定原材料の定性

試験溶液の調製は ELISA 法と同様に行い、ウエスタンブロット法は既報⁶⁾と同様に行った．結果の判定には卵および乳の標準品 10, 1, 0.5 μ g/g のバンドを確認し、サンプルのバンドの有無を判定した．試験は 2 回繰り返しで行った．

5. データ解析

県内 3 機関のデータ解析はバリデーション参加機関

全体のデータと比較するため、データ数は満たないが全体のデータ解析と同様に AOAC の室間共同試験ガイドライン¹¹⁾ および JIS Z8402-2 の手順に従い、添加回収率の平均値 (%), 併行精度 (%) および室間精度 (%) を求めた．さらに 3 機関の変動係数 (%) を求めた．

なお、比較データとして用いた機関全体のデータは特定原材料検出法開発者が解析したデータを参照した．データ解析は AOAC の室間共同試験ガイドラインおよび JIS Z8402-2 の手順に従い、外れ値を除外するために Cochran 検定および Grubbs 検定 (両者とも有意水準 2.5%) を行っている．

表 1 FASTKIT エライザ Ver. 卵キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	92.1	85.1	4.4	4.3	12.4	9.4	11.2
おしるこ	104.0	96.0	3.1	3.4	10.4	9.2	9.4
オレンジジュース	91.7	83.7	4.7	3.6	6.9	9.0	6.5
肉団子	94.0	86.1	3.0	3.7	4.3	8.8	2.8
コーヒーゼリー	101.2	98.3	2.2	3.1	11.7	8.5	10.5
みそ汁	88.5	88.7	4.5	3.1	13.2	8.8	12.0

表 2 FASTKIT エライザ Ver. 牛乳キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	89.3	89.2	3.1	3.4	5.7	4.4	5.3
おしるこ	101.1	100.3	4.4	3.4	6.3	5.6	6.0
かまぼこ	75.2	74.4	3.2	3.7	3.3	4.0	3.2
オレンジジュース	82.4	80.8	3.4	3.2	7.1	8.3	6.5
コーヒーゼリー	95.8	96.7	5.1	4.1	7.2	4.5	4.2
みそ汁	69.0	73.6	7.1	4.0	8.7	9.9	8.4

表 3 FASTKIT エライザ Ver. 小麦キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	140.5	138.9	2.0	4.5	13.7	9.0	12.3
おしるこ	135.1	126.9	2.1	3.4	6.7	9.9	6.0
かまぼこ	127.0	124.4	2.0	4.2	12.0	5.3	10.8
肉団子	112.8	111.4	5.8	5.0	8.2	9.0	7.8
コーヒーゼリー	126.2	129.0	1.6	5.1	7.3	9.2	6.6
みそ汁	110.1	110.5	4.9	5.7	9.5	10.4	8.8

表 4 FASTKIT エライザ Ver. そばキットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	128.3	117.5	8.2	5.8	21.3	18.0	19.4
おしるこ	148.8	137.2	3.9	6.7	11.7	13.3	10.6
かまぼこ	128.6	123.0	2.4	3.5	9.6	10.0	8.7
肉団子	81.5	91.1	2.7	7.8	8.3	12.7	7.5
コーヒーゼリー	118.3	112.2	2.4	6.6	16.3	10.8	14.6
みそ汁	89.6	93.8	6.7	5.4	15.6	12.9	14.3

表5 FASTKIT エライザ Ver. 落花生キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
白がゆ	75.9	74.9	1.2	2.5	5.1	7.9	4.6
おしるこ	90.3	88.9	4.5	3.4	8.3	7.3	7.7
かまぼこ	94.4	100.5	2.2	2.5	3.1	12.9	1.8
肉団子	97.3	104.1	2.6	3.2	3.6	12.6	2.5
コーヒーゼリー	74.6	75.6	3.1	3.5	5.4	9.7	5.0
みそ汁	50.4	52.1	2.2	2.8	3.2	7.8	3.0

表6 モリナガ FASPEK 小麦測定キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
鶏肉団子	94.1	92.2	8.3	6.2	11.7	16.2	8.0
かまぼこ	88.1	115.0	12.6	10.9	17.9	12.9	12.2
オレンジジュース	113.2	111.7	8.8	5.4	15.8	11.7	14.7
プリン	106.6	129.6	8.6	6.4	16.2	10.6	15.0
寄せ鍋	113.9	128.3	8.0	6.7	19.8	12.0	18.1
トマトソース	102.9	122.4	6.7	7.0	13.4	10.2	12.4

表7 モリナガ FASPEK 落花生測定キットのバリデーション結果

試料	回収率 (%)		併行精度 (RSD%)		室間精度 (RSD%)		変動係数(CV%)
	3機関	全体	3機関	全体	3機関	全体	3機関
みそ汁	80.0	86.8	3.9	2.8	5.5	4.8	3.4
鶏肉団子	80.5	87.5	1.5	2.0	2.6	4.9	2.4
ゼリー	78.6	89.1	3.0	4.2	7.7	5.5	7.1
オレンジジュース	75.9	84.6	3.7	3.0	4.9	5.7	4.6
コーンスープ	94.4	104.7	2.8	2.4	2.9	5.7	2.9
トマトスープ	97.5	109.6	3.5	3.5	4.0	6.2	3.9

表8 モリナガ FASPEK ウェスタンブロットキットのバリデーション結果

試料	陽性率(8機関による2回繰り返し回数)							
	OVA		OVM		CN		β-LAG	
	添加卵濃度		添加卵濃度		添加牛乳濃度		添加牛乳濃度	
	(0 μg/g)	(10 μg/g)	(0 μg/g)	(10 μg/g)	(0 μg/g)	(10 μg/g)	(0 μg/g)	(10 μg/g)
ジュース	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
ゼリー	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
おしるこ	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
トマトソース	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16
コンソメスープ	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16	0/16	16/16

OVA:卵白アルブミン, OVM:オボムコイド, CN:カゼイン, β-LAG:β-ラクトグロブリン

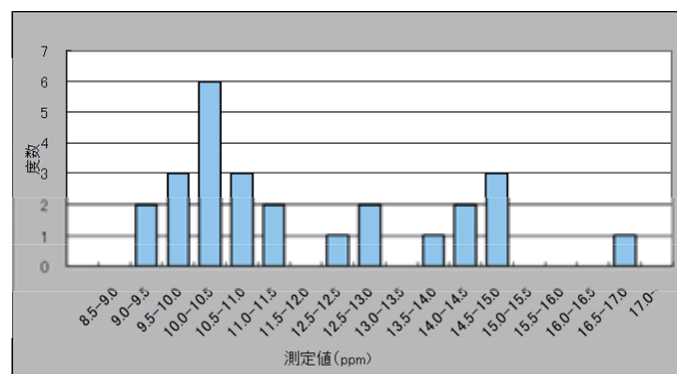
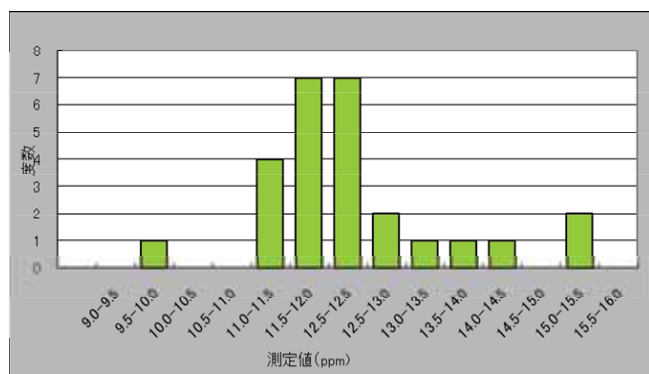


図1 FASTKIT エライザ Ver. そばキットのバリデーション結果 (かまぼこ) 度数分布

図2 FASTKIT エライザ Ver. そばキットのバリデーション結果 (白がゆ) 度数分布

結果及び考察

1. ELISA 法による定量

平成 17 年に行われた検査法の一部改正において、「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」が参考として示された⁵⁾。定量法の試験室間バリデーションは試験室数 8 以上、試料数 5 以上としている。また、試料はタンパク質濃度レベルの一つに 10 μ g/g を含んだ特定原材料を添加し、加熱等の製造方法で作製したモデル加工品としている。本バリデーションはその基準を満たすべく行われた。

定量結果は県 3 機関の結果とバリデーションに参加した全体の機関の結果（日本ハムキットでは 13 機関、モリナガキットは 10 あるいは 12 機関）を比較し、表 1～7 に示した。ELISA 法の性能として、ガイドラインでは添加回収率は 50% 以上 150% 以下であること、併行精度は吸光度 1 付近の同一試験溶液の繰り返し測定では、5% を大きく超えるような場合には措置が必要とされ、室間精度は 25% 以下であることが提言されている⁵⁾。

FASTKIT エライザ Ver.（表 1～5）では 3 機関におけるデータ解析の結果、添加回収率、併行精度、室間精度ともにすべて基準を満たした。また、3 機関の変動係数においても、試験結果の採用の基準である 20% 以下を満たし¹⁾、データの信頼性が確保されていることが確認された。

13 機関全体のデータでは、乳キットの白がゆ、おしろこ、コーヒーゼリーで 1 機関、かまぼこで 2 機関のデータが棄却され、小麦キットではかまぼこで 2 機関、落花生キットではおしろこで 1 機関のデータが棄却された。その結果、添加回収率、併行精度、室間精度ともに特定原材料 5 品目の ELISA キットの全体の結果はバリデーションの基準を満たした。

5 種類のキット間の性能を併行精度および室間精度の平均値で比較すると、卵の併行精度は 3.5%、室間精度 9.0%、牛乳 3.6%、6.1%、小麦 4.7%、8.8%、そば 6.0%、13.0%、落花生 3.0%、9.7% となり、牛乳が最もよく、そばが最もばらつきが大きかった。特に室間精度はそばが牛乳の 2 倍の値を示した。一方、精度管理に用いる食品サンプルの選定も重要であることを既報²⁾で課題として挙げた。試料によるデータのばらつきを示す例として、そばキットのかまぼこ白がゆの結果を度数分布（図 1, 2）で示した。かまぼこは 26 データのうち 18 データと全体の 69% が 11～12.5ppm にほぼ正規分布しているが、白がゆでは 10～10.5ppm を中心とした分布と 12.0ppm 以上に散漫な分布がみられる。このように食品試料によってデー

タのばらつきに違いがあることがわかる。白がゆの場合、3 機関の室間精度および変動係数をみると、データの採用の基準である室間精度 25%、変動係数 20% に近い値を示している。ゆえに、ばらつきの大きい場合はデータ数が少ないとその室間のばらつきが試料によるものか、キットの性能に起因するものか、あるいは検査技能によるものか判断できないため、できるだけ多くのデータを取る必要があると考えられた。ゆえに、日常の精度管理では安定した効率の良い方法が必要とされることから、試料によるばらつきについても考慮する必要があると考えられた。

モリナガ FASPEK キットの結果を表 6, 7 に示した。3 機関の結果は、回収率、併行精度、室間精度のいずれも基準を満たし、FASTKIT エライザ Ver. キットと同様にデータの信頼性が確保されていることを確認した。

全体の結果では、落花生キットの鶏肉団子とオレンジジュースで 1 機関のデータが棄却され、その結果モリナガキットにおいても同様にガイドラインの基準を満たした。キットの性能では小麦キットと落花生キットの室間精度の平均がそれぞれ 12.3% と 5.5% と大きく異なり、さらに小麦の寄せ鍋では 3 機関の室間精度、変動係数がそれぞれ 19.8%、18.1% と精度管理の基準に近い値を示したことから、モリナガキットにおいても同様に食品とキットの組み合わせによるばらつきの違いを把握することが精度管理において重要と考えられた。

2. ウエスタンプロット法による定性

定性法のガイドラインでは⁵⁾、試験室数 6 以上、試料数 5 以上としている。試料の条件は定量と同様とし、同一の試料・濃度のサンプルを各試験室ごとに 2 サンプル以上について判定率を評価するとしている。判定基準は陽性率が 90% 以上、ブランク試料の陰性率も 90% 以上とし、95% 以上が望ましいとされている。

卵・乳の定性におけるウエスタンプロットキットのバリデーションの結果を表 8 に示した。ELISA 法において陽性の判定基準である 10 μ g/g 添加された 5 食品の判定結果は、3 機関および 10 機関いずれも OVA, OM, CN, β -LAG の陽性率 100%、陰性率 100% となり、判定基準を満たす良好な結果となった。アレルギー物質検査では定性検査法として、現在 PCR 法とウエスタンプロット法が示されている。ガイドライン⁵⁾ではこれらの定性法に対し、特定原材料検知法開発者の試験室において、少なくとも 20 種類以上の性質・加工程度の異なるマトリクスの中での

誤判定率を確認し、誤判定率が50%以上となると推定される濃度を判定限界として示すことが望ましいとされている。今後、これらのデータを蓄積し、判定限界の基準を明確に定義することが必要と考えられた。

まとめ

以上、特定原材料検知法開発者によるバリデーション結果から、ELISA法による定量およびウエスタンブロット法による定性法について、神奈川県内の3機関の検査精度が確保されていることを確認することができた。しかし、多様な市販食品に対する日常の検査においては製品間のデータのばらつきや定性での判定限界など課題も多く、今後もデータを蓄積して検査精度の向上に努めていきたい。

(平成22年8月20日受理)

文献

- 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日付け食発第1106001号
- 2) 渡邊裕子, 児玉千絵, 関戸晴子, 濟田清隆, 宮沢啓貴, 渡部健二郎, 田中幸生, 山田利治：食品中のアレルギー物質検査における精度管理の検討 - 酵素免疫測定法 (ELISA) による定量, 神奈川県衛生研究所研究報告, 37, 53-55 (2007)。
- 3) 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17年10月11日付け食発第1011002号
- 4) Watanabe, Y., Aburatani, K., Mizumura, T., Sakai, M., Muraoka, S., Mamegosi, S., Honjoh, T., Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. *J. Immunol. Methods*, 300, 115-123 (2005)。
- 5) 厚生労働省医薬局食品安全部長通知：アレルギー物質を含む食品の検査方法について、平成18年6月22日付け食発第0622003号
- 6) 穠山浩：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)。
- 7) 穠山浩, 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)。
- 8) 穠山浩, 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)。
- 9) 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, J275277 (2002)。
- 10) 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)。
- 11) AOAC Int., : Appendix D : Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis, Official Methods of Analysis of AOAC Int. 18 ed. 2005.