

## 第5回(総合評価)

あなたの職種は何ですか

	人数	%
製造業	27	56.3
流通(販売)業	9	18.8
行政	11	22.9
その他	1	2.1
合計	48	100.0

製造業、流通業の方の担当部署

	人数	%
営業	3	8.6
品質管理	19	54.3
消費者相談窓口	1	2.9
その他	12	34.3
合計	35	100.0

現在の担当の担当年数は何年ですか

	人数	%
1年未満	7	14.6
1～3年未満	17	35.4
3～5年未満	11	22.9
5～10年未満	8	16.7
10年以上	5	10.4
合計	48	100.0

第1回勉強会

	人数	%
不参加	28	59.6
参加	19	40.4
合計	47	100.0

第2回勉強会

	人数	%
不参加	23	48.9
参加	24	51.1
合計	47	100.0

第3回勉強会

	人数	%
不参加	12	25.5
参加	35	74.5
合計	47	100.0

第4回勉強会

	人数	%
不参加	15	31.9
参加	32	68.1
合計	47	100.0

第5回勉強会

	人数	%
不参加	1	2.1
参加	46	97.9
合計	47	100.0

問1 今日の勉強会の講義内容について

	人数	%
十分満足	3	7.7
まあまあ満足	31	79.5
少し不満	5	12.8
合計	39	100.0

問2 今日の勉強会の形式(宿題と講義)について

	人数	%
十分満足	4	9.5
まあまあ満足	33	78.6
少し不満	5	11.9
合計	42	100.0

問3 今日の勉強会の配布資料について

	人数	%
十分満足	1	2.4
まあまあ満足	21	51.2
少し不満	19	46.3
合計	41	100.0

問4 勉強会を5回にわたって開催することは適切と思いますか

	人数	%
思う	20	43.5
まあまあ思う	25	54.3
あまり思わない	1	2.2
合計	46	100.0

問5 勉強会の回数は適切と思いますか

	人数	%
多い	2	4.4
やや多い	5	11.1
ちょうどよい	30	66.7
やや少ない	7	15.6
少ない	1	2.2
合計	45	100.0

問6 あなたは食物アレルギーの症状について理解している自信がありますか

	人数	%
十分ある	5	10.4
まあまあある	24	50.0
あまりない	15	31.3
ほとんどない	4	8.3
合計	48	100.0

問7 あなたは食物アレルギーの診断について理解する自信がありますか

	人数	%
まあまあある	11	22.9
あまりない	27	56.3
ほとんどない	10	20.8
合計	48	100.0

問8 あなたは食物アレルギーの治療について理解する自信がありますか

	人数	%
十分ある	1	2.1
まあまあある	9	18.8
あまりない	23	47.9
ほとんどない	15	31.3
合計	48	100.0

問9 あなたはアレルギー物質を含む食品の通知内容について理解している自信がありますか

	人数	%
十分ある	3	6.3
まあまあある	34	70.8
あまりない	10	20.8
ほとんどない	1	2.1
合計	48	100.0

問10 あなたは各検査法の特徴について理解している自信がありますか

	人数	%
十分ある	6	12.5
まあまあある	19	39.6
あまりない	15	31.3
ほとんどない	8	16.7
合計	48	100.0

問11 あなたは判断樹について理解している自信がありますか

	人数	%
十分ある	5	11.1
まあまあある	23	51.1
あまりない	10	22.2
ほとんどない	7	15.6
合計	45	100.0

問12 あなたはアレルギー表示のルールについて理解している自信がありますか

	人数	%
十分ある	6	12.5
まあまあある	28	58.3
あまりない	13	27.1
ほとんどない	1	2.1
合計	48	100.0

問13 あなたはアレルギー表示を正確にできる自信がありますか

	人数	%
十分ある	5	10.4
まあまあある	21	43.8
あまりない	16	33.3
ほとんどない	6	12.5
合計	48	100.0

問14 あなたは消費者からのアレルギー表示に関する質問に的確に対応できる自信がありますか

	人数	%
十分ある	6	12.5
まあまあある	16	33.3
あまりない	22	45.8
ほとんどない	4	8.3
合計	48	100.0

問15 あなたは食物アレルギーに関する相談先が1年前までと比較して増えていますか

	人数	%
かなり増えた	2	4.4
まあまあ増えた	21	46.7
かわらない	21	46.7
少し減った	1	2.2
合計	45	100.0

問16 あなたは検知法に関する相談先が1年前までと比較して増えていますか

	人数	%
かなり増えた	1	2.3
まあまあ増えた	19	43.2
かわらない	23	52.3
少し減った	1	2.3
合計	44	100.0

問16 あなたは検知法に関する相談先が1年前までと比較して増えていますか

	人数	%
かなり増えた	1	2.3
まあまあ増えた	19	43.2
かわらない	23	52.3
少し減った	1	2.3
合計	44	100.0

問17 あなたはアレルギー表示に関する相談先が1年前までと比較して増えていますか

	人数	%
まあまあ増えた	24	54.5
かわらない	19	43.2
少し減った	1	2.3
合計	44	100.0

問18 あなたはこの勉強会以外に食物アレルギーに関する勉強会に参加した経験がありますか

	人数	%
たくさんある	1	2.1
まあまあある	15	31.3
あまりない	13	27.1
ほとんどない	19	39.6
合計	48	100.0

問19 あなたはこの勉強会以外に検知法に関する勉強会に参加した経験がありますか

	人数	%
たくさんある	2	4.3
まあまあある	6	12.8
あまりない	13	27.7
ほとんどない	26	55.3
合計	47	100.0

問20 あなたはこの勉強会以外にアレルギー表示に関する勉強会に参加した経験がありますか

	人数	%
たくさんある	2	4.3
まあまあある	9	19.1
あまりない	15	31.9
ほとんどない	21	44.7
合計	47	100.0

問21 あなたは現在食物アレルギーに関する資料が十分整備されていると思いますか

	人数	%
たくさんある	1	2.1
まあまあある	17	36.2
あまりない	24	51.1
ほとんどない	5	10.6
合計	47	100.0

問22 あなたは現在検知法に関する資料が十分整備されていると思いますか

	人数	%
たくさんある	1	2.3
まあまあある	7	15.9
あまりない	25	56.8
ほとんどない	11	25.0
合計	44	100.0

問23 あなたは現在アレルギー表示に関する資料が十分整備されていると思いますか

	人数	%
たくさんある	4	8.7
まあまあある	13	28.3
あまりない	27	58.7
ほとんどない	2	4.3
合計	46	100.0

問24 あなたは食物アレルギーとその表示制度について学習を継続する必要があると思いますか

	人数	%
かなり思う	29	60.4
まあまあ思う	18	37.5
あまり思わない	1	2.1
合計	48	100.0

問25 講義内容を職場(関連部署を含む)で共有すべきだと思いますか

	人数	%
かなり思う	24	51.1
まあまあ思う	20	42.6
あまり思わない	3	6.4
合計	47	100.0

問26 今後も食物アレルギーとその表示に関する勉強会が開催されるべきだと思いますか

	人数	%
かなり思う	32	66.7
まあまあ思う	16	33.3
合計	48	100.0

問27 あなたは東京会場以外でこれまでの内容の勉強会が開催されるべきだと思いますか

	人数	%
かなり思う	16	34.0
まあまあ思う	26	55.3
あまり思わない	5	10.6
合計	47	100.0

問28 1 食物アレルギーの主な症状は、じんましんである

	人数	%
×	36	81.8
○	8	18.2
合計	44	100.0

2 食物アレルギーで死ぬことはない

	人数	%
×	45	100.0
合計	45	100.0

3 食物アレルギーの診断は、血液検査の結果で行う

	人数	%
×	30	71.4
○	12	28.6
合計	42	100.0

4 食物アレルギーは、一生治らない

	人数	%
×	42	95.5
○	2	4.5
合計	44	100.0

## 5 アトピーの人は、食物アレルギーである

	人数	%
×	40	93.0
○	3	7.0
合計	43	100.0

## 6 食物アレルギーは、子どもの時に発症する

	人数	%
×	42	93.3
○	3	6.7
合計	45	100.0

## 7 食物アレルギーは、母親から遺伝する

	人数	%
×	44	97.8
○	1	2.2
合計	45	100.0

## 8 食物アレルギーの原因となる物質は24品目に限られている

	人数	%
×	44	100.0
合計	44	100.0

## 9 全ての民族で、5大アレルゲンは同じである

	人数	%
×	43	100.0
合計	43	100.0

## 10 食生活の欧米化が原因で、食物アレルギー患者が増えている

	人数	%
×	20	47.6
○	22	52.4
合計	42	100.0

## 11 食品の検査では、常に二種類のELISAキットを使わねばならない

	人数	%
×	20	50.0
○	20	50.0
合計	40	100.0

## 12 検査対象となるのはアレルゲンである

	人数	%
×	35	85.4
○	6	14.6
合計	41	100.0

13 ELISA法で陽性とは食品採取重量1gあたりの特定原材料由来のタンパク質含量が1 $\mu$ g以上のものをいう

	人数	%
×	33	82.5
○	7	17.5
合計	40	100.0

## 14 ELISA法は、感度は高いが特異性に問題がある

	人数	%
×	8	22.2
○	28	77.8
合計	36	100.0

15 PCR法は、もっとも特異性が高い

	人数	%
×	12	37.5
○	20	62.5
合計	32	100.0

16 ELISA法は、不溶物の測定もできる

	人数	%
×	33	91.7
○	3	8.3
合計	36	100.0

17 卵、牛乳の確認検査には、PCR法を用いる

	人数	%
×	23	71.9
○	9	28.1
合計	32	100.0

18 判断樹では、まず、表示の有無で振り分けを行う

	人数	%
×	10	27.8
○	26	72.2
合計	36	100.0

19 製造記録を省略できるのは、表示があり、ELISA測定値陽性の場合である

	人数	%
×	18	51.4
○	17	48.6
合計	35	100.0

20 試料の調製場所と検査場所は、開放された空間で行う

	人数	%
×	35	97.2
○	1	2.8
合計	36	100.0

平成15年度厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

「健康保護を目的とした食に関するリスクコミュニケーションのすすめ方  
に関する研究」

分担研究課題 検知法の開発と精度管理

分担研究者 樺山浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部室長

研究要旨 昨年度確立した特定原材料5品目（卵、乳、小麦、そば、落花生）の2種類の各5食品毎にELISA検出法を抽出液統一化と抽出効率の向上を目的に改良した。統一した改良抽出方法は簡易で、改良前の抽出方法より抽出効率が向上した。2種のELISAで計10検出法も抽出法の改良に併せて改良した。改良した方法の0 µg/gおよび50 µg/gに擬似混入したモデル加工食品を用いた食品の10機関によるinter-laboratory validationを検討した。その結果、卵、牛乳およびそばに関しては、両ELISAキットとも概ね良好な回収率を示した。しかし小麦のキットに関しては、複合抗原認識ELISAキットでは高濃度測定の際に検量線の傾きが小さくなり、測定値の精度が低くなった。落花生に関しては、単一・精製抗原認識ELISAキットでは回収率が100%を超え、複合抗原を用いたELISAキットでは非常に低かった。

協力研究者：小川正（京都大学大学院農学研究科）田中和子（国立成育医療センター）松田りえ子、渡邊敬浩、長岡恵、佐藤雄嗣、坂田こずえ（国立医薬品食品衛生研究所）丸井英二、堀口逸子（順天堂大学医学部）

支援研究者：渡邊裕子（神奈川県衛生研究所）、高畑能久、森松文毅（日本ハム（株）中央研究所）、佐藤秀隆、三嶋隆（（財）日本食品分析センター多摩研究所）尾畑嵩英（森永製菓株式会社研究所）本庄勉、村岡嗣朗（（株）森永生科学研究所）、布藤聡、中村健人（（株）ファスマック）飯塚太由、水口岳人（（財）食品環境検査協会）山川宏人（（株）日清製粉グループ）、小笠原健、荒川史博（三栄源エフ・エフ・アイ株式会社）古井聡（（株）ニッポンジーン）、小池哲央、赤木第子（ロート製薬株式会社）加藤久、西原理久香（昭和産業（株））

A.研究目的

厚生科学研究補助金食品安全確保研究事業「健康保護を目的とした食に関するリスクコミュニケーションのすすめ方」に関する

研究」における研究の一環として行うものであり、アレルギー表示の監視のための特定原材料（省令5品目に限る）の検出法の開発、評価、整備を行うことを目的とする。

B.研究方法

1) 公定法ELISA法の改良

抽出液および試料液調製

試料1gをプラスチック製遠心管に量り取る。

検体抽出液19 mLを加える。その後、よく振り混ぜて混合し、固形分を均等に分散させる。振とう機に遠心管を横にして置き、一夜（12時間以上）振とう（90～110rpm、1往復が1回転とし、1分間に90から110往復）しながら抽出する。抽出液のpHを確認し、必要であれば、中性（pH 6.0-8.0）となるように調整する。（pHの調整はpH試験紙で良いが、なるべく測定レンジの狭いものを用いる。3000 x gの条件で20分間遠心し、遠心後に得られる上清を別の容器にとる。（なるべく一定量の水層を分取する。沈査が得られない場合はろ過する。可能であれば油層は除くこと。遠心はさらに高速でも問題はない。）温度は室温程度とする。

改良単一・精製抗原認識ELISA（Mキット）操作法



試料 1 g をプラスチック製遠心管などに取り、検体抽出液 19 mL (「4. 検体抽出液」参照) を加えよく振り混ぜて混合し、固形分を均等に分散させる。遠心管を横にして振とう機で一晩 (12 時間以上) 振とうしながら抽出する。抽出液の pH を確認し、必要であれば中性付近 (pH 6.0~8.0) になるよう調整する。

3,000×g 以上で 20 分間遠心分離し、上清を分取する。上清をろ紙でろ過する。ろ液を検体希釈液 I を用い 20 倍に希釈し、検体とする。更に検体を希釈して測定する場合は、検体希釈液 II を用い希釈する。抗体固相化モジュールを付属のモジュール用フレームにセットする。各ウェルに標準溶液 (0, 0.78 ~ 50ng/mL) または検体を 100 μL ずつ添加する。付属のモジュール用フタをして常温で正確に 1 時間静置して反応させる。ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300 μL ずつの洗浄液で 6 回洗浄する。酵素標識抗体溶液を各ウェルに 100 μL ずつ分注する。フタをして常温で正確に 30 分間静置して反応させる。ウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 300 μL ずつの洗浄液で 6 回洗浄する。酵素基質液を各ウェルに 100 μL ずつ分注する。フタをして常温遮光下で正確に 10 分間静置して反応させる。反応停止液を各ウェルに 100 μL ずつ分注し酵素反応を停止させる。プレートリーダーで各ウェルの吸光度を測定する。標準溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体中のタンパク質濃度を求める

#### 改良複合抗原認識ELISAキット(Nキット)操作法

標準溶液及び試料抽出液を希釈した測定溶液を調製する。抗体固相化プレートをアルミパウ

チに入れたままで室温に戻しておく。調整した標準溶液及び測定溶液を、各ウェルに 100 μL ずつ分注する。攪拌後室温 (20~25℃) にて 60 分間反応させる。プレートを各ウェルあたり 250 μL の洗浄液にて 5 回洗浄する。100 倍希釈したビオチン結合抗体を 100 μL ずつ各ウェルに分注する。攪拌後室温 (20~25℃) にて 60 分間反応させる。プレートを各ウェルあたり 250 μL の洗浄液にて 5 回洗浄する。100 倍希釈した酵素アビジン結合物を 100 μL ずつ各ウェルに分注する。攪拌後室温 (20~25℃) にて 30 分間反応させる。プレートを各ウェルあたり 250 μL の洗浄液にて 5 回洗浄する。発色剤を 100 μL ずつ各ウェルに分注する。攪拌後、静置し室温 (20~25℃) にて 20 分間酵素反応させる。反応停止液を 100 μL ずつ各ウェルに分注する。攪拌後、プレートリーダーで主波長 450 nm、副波長 600~650nm の吸光度を測定する。

#### 2) 試験室間バリデーションによるELISAキット評価

作成した ELISA キットについて、10 カ所の機関による試験室間バリデーションを実施し、バリデーション方法

##### 2.1) 試料

試料として、ソーセージ、牛肉レトルトパウチ、トマトソース、ビスケット、オレンジジュース、ジャムを作成した。各試料には、複数の抗原を添加した。添加濃度は 2 レベルとし、Dose A は 10 mg/kg、Dose B は 50 mg/kg とした。各試料の原材料および添加した抗原を Table 1 にしめす。

Table 1

試料	原材料	添加抗原
ソーセージ	豚もも肉、植物油、食塩、砂糖、水	卵、牛乳、小麦、そば、落花生
牛肉レトルトパウチ	牛かた肉、食塩、寒天水、砂糖	卵、牛乳、小麦、そば、落花生

トマトソース	トマトピューレ, 砂糖, ウスターソース, アップルビネガー, 食塩, でんぷん, 水	小麦, そば, 落花生
ビスケット	小麦粉, ショートニング, 砂糖, 食塩, 重炭酸, 脱脂粉乳, 水	卵, 牛乳, そば
オレンジジュース	オレンジ濃縮果汁, 砂糖, クエン酸, アスコルビン酸	卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生
ジャム	イチゴ, 糖類, ペクチン, クエン酸	卵, 牛乳, 小麦, 落花生

## 試料の均一性評価

### 2.2) 2社における抽出方法の差の評価

ジャム試料（抗原添加量 10 mg/kg 及び 50 mg/kg）を両社で2回ずつ抽出し、卵白アルブミンキット及び小麦キット（Mキット）により測定した。測定結果をt検定(paired)により評価した。

### 2.3) 試料の均一性評価

試料の均一性が試験室間バリデーションに適用可能かどうかの評価を行った。評価手順を以下に示す。なお、ソーセージ（卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生）、牛肉レトルトパウチ（卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生）、トマトソース（小麦, そば, 落花生）は各抗原をNキットを用いて測定し評価した。ビスケット（卵, 牛乳（カゼイン,  $\beta$ -LG）, そば）、オレンジジュース（卵, 牛乳（カゼイン,  $\beta$ -LG）, 小麦, そば, 落花生）、ジャム（卵, 牛乳（カゼイン,  $\beta$ -LG）, 小麦, 落花生）については各抗原をMキットを用いて測定し評価した。

### 2.4) 均一性評価プロトコル

1. 均一化した試料から 3 g × 6 を採取する。
2. 採取した 3 g から、それぞれ 1 g × 2 を採取し、抽出を行う。
3. 各抽出液につき、2 well 併行で定量を実施する。

### 2.5) 解析

2 ウェルから得られた結果の平均値を用い、2 × 6 の分散分析を行った。（抽出間と試料間の分散の解析）さらに、各ウェルからの結果を用い、2 × 1 2 の分散分析を行った。（ELISA 測定間と抽出間の分散の解析）

## 2.6) 試験室間バリデーション方法

### 参加機関

以下の 10 機関により試験室間バリデーションを実施した。

神奈川県衛生研究所 理化学部、三栄源エフ・エフ・アイ（株）品質保証部検査課、(財)食品環境検査協会 業務部、(株)日清製粉グループ本社 R&D・品質管理本部 QEセンター、(株)ニッポンジー 研究試薬部 (財)日本食品分析センター 千歳研究所 安全性試験部、(株)ファスマック、ロート製薬 (株)製品開発部、昭和産業 (株)総合研究所 分析センター、(財)日本冷凍食品検査協会

### 2.7) 手順

参加機関に以下の文書、試料（6種類 × 2 dose）、キットを送付した。試料からの抽出、各キットの操作方法についての文書を資料として示した。

参加機関は各試料毎に2回の抽出・測定を行い、さらにそれぞれの抽出液を5倍希釈した溶液についても測定を行った。従って、各試料から4種類の測定値が得られる。測定は3ウェルを用い、同一プレート上で8濃度（ブランクを含む）の検量線の測定も行った。得られた結果（吸光度）を、国立医薬品食品衛生研究所食品部に返送した。プレートの割付を Figure 1 に示す。

全ての抗原について、同一の抽出液を用いて測定を行った。

国立医薬品食品衛生研究所では、参加機関から送付された吸光度データに基づいて、検量線（4係数ロジスティック曲線）を作成し、この

検量線を使って各試料中の抗原の濃度を計算した。検量線の作成は simplex 法により行った。3 ウェルの定量値の平均値を用い、1 回目と 2 回目の抽出による結果を併行試験として扱った。AOAC INTERNATIONAL 及び JIS Z8402-2 の手順に従い、外れ値を除外するため

に Cochran 検定及び Grubbs の検定（両者とも有意水準 2.5%）を行った後、平均値、併行再現性及び室間再現性を求めた。また、JIS Z8402-5 の方法による頑健な統計量に基づいた平均値、併行再現性及び室間再現性も計算した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	標準溶液 0 ng/mL			抽出1回目 食品①			抽出1回目5倍希釈 食品④		抽出2回目5倍希釈 食品②			
B	標準溶液 0.78125ng/mL			抽出1回目 食品②			抽出1回目5倍希釈 食品⑤		抽出2回目5倍希釈 食品③			
C	標準溶液 1.5625ng/mL			抽出1回目 食品③			抽出2回目 食品①		抽出2回目5倍希釈 食品④			
D	標準溶液 3.125ng/mL			抽出1回目 食品④			抽出2回目 食品②		抽出2回目5倍希釈 食品⑤			
E	標準溶液 6.25ng/mL			抽出1回目 食品⑤			抽出2回目 食品③					
F	標準溶液 12.5ng/mL			抽出1回目5倍希釈 食品①			抽出2回目 食品④					
G	標準溶液 25ng/mL			抽出1回目5倍希釈 食品②			抽出2回目 食品⑤					
H	標準溶液 50ng/mL			抽出1回目5倍希釈 食品③			抽出2回目5倍希釈 食品①					

Figure 1 プレート上の割付

## B. 結果

### 1) 検出法の改良.

抽出法は加工過程によって起こる他の共雑タンパクとの結合による妨害と不溶化等の問題を解決するために新たに抽出法を考案した。さらに両社の抽出法を統一化しそれに伴い公定法 ELISA キットも改良を加えた。

### 2) 試験室間バリデーションによる改良 ELISA キット評価

#### 2.1) 試料の均一性評価結果

##### 2社における抽出方法の差の検定結果

卵白アルブミンキット及び小麦キットにより評価した結果を Table 2 に示す。50 mg/kg 添加試料については、抽出液をさらに 5 倍希釈して測定した。

Table 2 抽出方法の差の評価結果

#### 卵白アルブミンキット結果

	N	M
10mg/kg -1	5.53 mg/kg	5.78 mg/kg
10mg/kg-2	5.63	5.77
50mg/kg-1	5.67	6.03
50mg/kg-2	6.19	5.84

#### 小麦キット結果

	N	M
10mg/kg -1	1.38 mg/kg	1.65 mg/kg
10mg/kg-2	1.59	1.60
50mg/kg-1	1.47	1.54
50mg/kg-2	1.64	1.57

卵白アルブミンキット及び小麦キットによる結果を、対応のある t-検定により比較したところ、いずれも有意差なしであり、両社の抽出方法間の差がなかった。

#### 2.2) 試料の均一性評価

各試料の抗原別の均一性評価結果を、Table 3~8 に示す。この結果、6 試料間の分散が、2 回の併行分析（抽出を含む）間の分散よりも有意に高かったのは、ソーセージ（50 mg/kg, 小麦）、ソーセージ（10 mg/kg, そば）、ソーセージ（50 mg/kg, そば）、トマトソース（50 mg/kg, そば）の 4 つの組み合わせ（試料×抗原）であった。しかし、これらの試料についても、試料間の抗原濃度の RSD% は 5% 以下であり、実際の試験室間の結果の RSD が 10% 以上と予想されることから、試験室間バリデーションのための試料として使用可能と考えられた。

#### 2.3) 試験室間バリデーション結果

抗原毎に 5 種類試料について、添加量に対する回収率、併行精度 (RSD<sub>r</sub>)、室間精度 (RSD<sub>R</sub>) を評価した。Dose B の抽出溶液の濃度は 125 ng/mL であり、検量線の範囲外であるため評価できないが、5 倍希釈したものは、Dose A と同じ濃度となるはずである。従って、Dose A と Dose B 5 倍希釈の結果が大きく異なる場合には、食品マトリックスの影響が考えられる。Dose A の 5 倍希釈では、抗原の濃度がかなり

低くなるので、精度が低下することが予想されるが、キットの検出能力の指標として評価した。試料食品と抗原の組み合わせによっては、欠測値あるいは大きく離れた結果が多く外れ値の検定が困難な場合があったため、JIS Z8402-5の方法による頑健な統計量に基づいた平均値、併行再現性及び室間再現性も計算した。

#### 2.4)卵

卵抗原についての2つのキットにおける、回収率、 $RSD_r$ 及び $RSD_R$ をTable 9に示す。

全ての試料で、Mキットの結果がNキットと比較して2倍以上高い回収率を与えた。食品別では、オレンジジュースの回収率が最も高く、ビスケットの回収率は最も低かった。Dose A 5倍希釈も全試験室で定量可能であった。

Dose A 及びDose B 5倍希釈の $RSD_r$ はほとんどが15%以下であったが、オレンジジュースのDose Bの5倍希釈の結果のみ、非常に高い値となった。3カ所の試験室が、2回の抽出で非常に異なる値を報告したため、 $RSD_r$ の計算値が大きくなったためである。頑健な統計量から計算した $RSD_r$ はこの影響が除かれており、4.3%となった。

$RSD_R$ については、全体としてNキットの方が大きく、ばらつきが大きい結果となった。 $RSD_r$ が大きかったオレンジジュースのDose Bの5倍希釈データは、 $RSD_R$ も大きく、2回の抽出でばらつきの大きかった試験室以外でも平均値の変動は大きく、頑健な統計量を用いた計算法でも40%以上であった。

#### 2.5)牛乳

牛乳抗原についての2つのキットにおける、回収率、 $RSD_r$ 及び $RSD_R$ をTable 10に示す。

回収率については、2つのキット及び計算方法による差は見られなかった。食品別では、牛肉レトルトパウチとビスケットの回収率が低く、30%以下であった。Dose A 5倍希釈は全試験室で定量可能であった。

$RSD_r$ はほとんどが15%以下で、卵の場合と同程度の性能を示した。 $RSD_R$ については、卵に見られたようなキット間のばらつきの差はなかった。

#### 2.6)小麦

小麦抗原についての2つのキットにおける、回収率、 $RSD_r$ 及び $RSD_R$ をTable 11に示す。

Mキットにおける小麦抗原の回収率は、ソーセージ、牛乳レトルトパウチ、トマトソース、オレンジジュースについては70%以上であったが、ジャムでは20%以下となった。一方、Nキットでは、トマトソースとオレンジジュース(Dose A 及びDose B 5倍希釈)で200%以上となった。これらの試料のDose Aを5倍希釈した場合には、回収率が90%程度となり、濃度によって回収率が変化した。ジャム試料の回収率は非常に低く、10%以下であった。

Mキットの $RSD_r$ は、卵・牛乳と同じく概ね20%以下であった。Nキットでは、トマトソース、オレンジジュース、ジャムの通常の統計量から計算した $RSD_r$ がで大きな値となった。しかし、頑健な統計量から計算するとオレンジジュース、ジャムはMキットと同程度となったが、トマトソースは6試験室が大きなばらつきを示したために、54.3%の $RSD_r$ となった。

Mキットの $RSD_R$ は、ジャム試料で特に大きく、50%以上となった。これは、ジャム試料からの回収率が小さいことが原因と考えられる。Nキットの $RSD_R$ は、トマトソース、オレンジジュース、ジャムにおいて、Mキットよりも大きい結果となった。

Figure 2に示すように、2つのキットの検量線の形状は非常に異なっている。Mキットの検量線はおおよそ直線的に増加しており、50 ng/mLでも吸光度は2.0以下であるが、Nキットの検量線は10 ng/mL付近までの傾きが大きく、10 ng/mLの吸光度が2.0を超えてから傾きが減少している。また、曲がり方が急激なために、4係数ロジスティック曲線の当てはめもうまくいっていない。どの試験室においても同様の傾向が現れた。このため、高濃度範囲では、わずかな吸光度の差も、大きな分析値の差として現れるため、Nキットのばらつきが大きくなったと考えられる。

#### 2.7)そば

そば抗原についての2つのキットにおける、

回収率,  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  を Table 12 に示す。

Mキットにおける小麦抗原の回収率は、すべての試料で概ね 70%以上であり、良好な結果が得られた。Nキットの回収率は、試料によって変動が見られ、ビスケット試料では 50%程度でやや低く、オレンジジュースでは 150%程度でやや高めの回収率となった。Dose A 5 倍希釈は全試験室で定量可能であった。

$RSD_r$  は両キット共に、概ね 15%以下となった。Mキットの  $RSD_R$  は、20%以下であった。頑健な統計量から計算した  $RSD_R$  が、通常の統計量から計算した値よりも若干高くなる傾向が見られた。一方、Nキットの  $RSD_R$  は 20%以上であり、Mキットに比較して精度が劣っていた。

## 2.8) 落花生

落花生抗原についての2つのキットにおける、回収率,  $RSD_r$  及び  $RSD_R$  を Table 13 に示す。

落花生抗原の回収率は、全ての試料で、MキットがNキットの3倍以上となり、2キットの分析値の差が最も大きい結果となった。Mキットの回収率は、ジャムを除いて約 150%であり、Nキットは 40%以下と、いずれも不満足な結果であった。Dose A 5 倍希釈は全試験室で定量可能であった。

いずれのキットの  $RSD_r$  も、ジャムを除いて 15%以下であった。 $RSD_R$  は、2キット間に差は見られず、他のキットと同程度の値となった。D 考察

### 1) 公定法 ELISA 法の改良

加工食品からの抽出効率をあげるために、抽出溶液をあらたに開発された方法は、加工食品における卵と牛乳の表示と必要とされるレベルで、検知が可能であることが示唆された。また6機関によるバリデーションの結果、良好な再現性が得られたことから、標準法として適していることが明かとなった。

### 2) バリデーション

擬似混入したモデル加工食品を用いた食品の 10 機関による inter-laboratory

validation を検討した。その結果、卵、牛乳およびそばに関しては、両 ELISA キットとも概ね良好な回収率を示した。しかし小麦のキットに関しては、複合抗原を用いた ELISA キットでは高濃度測定の際に検量線の傾きが小さくなり、測定値の精度が低くなった。落花生に関しては、単一・精製抗原を用いた ELISA キットでは回収率が 100%を超え、複合抗原を用いた ELISA キットでは非常に低かった。

## E. 結論

昨年度確立した特定原材料5品目（卵、乳、小麦、そば、落花生）の2種類の各5食品毎に ELISA 検出法を抽出液統一化と抽出効率の向上を目的に改良した。統一した改良抽出方法は簡易で、改良前の抽出方法より抽出効率が向上した。2種の ELISA で計 10 検出法も抽出法の改良に併せて改良した。改良した方法の 0  $\mu\text{g/g}$  および 50  $\mu\text{g/g}$  に擬似混入したモデル加工食品を用いた食品の 10 機関による inter-laboratory validation を検討した。その結果、卵、牛乳およびそばに関しては、両 ELISA キットとも概ね良好な回収率を示した。しかし小麦のキットに関しては、複合抗原を用いた ELISA キットでは高濃度測定の際に検量線の傾きが小さくなり、測定値の精度が低くなった。落花生に関しては、単一・精製抗原を用いた ELISA キットでは回収率が 100%を超え、複合抗原を用いた ELISA キットでは非常に低かった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hiroshi AKIYAMA, Kazuto ISUZUGAWA, Naoki HARIKAI, Hiroko WATANABE, Ken IJIMA, Hirohito YAMAKAWA, Yamato MIZUGUCHI, Reiji YOSHIKAWA, Miho YAMAMOTO, Hidetaka SATO, Masatoshi WATAI, Fumihito ARAKAWA, Takeshi OGASAWARA, Rikuka NISHIHARA, Hisashi KATO, Atsushi YAMAUCHI, Yoshihisa TAKAHATA, Fumiki MORIMATSU, Shinichi

MAMEGOSHI, Shiroo MURAOKA, Tsutomu HONJOH, Takahiro WATANABE, Chiseko WAKUI, Tomoaki IMAMURA, Masatake TOYODA, Tamio MAITANI, Inter-laboratory Evaluation Studies of Notified ELISA Methods for Allergic Substances (Egg) J. Food Hyg. Soc. Japan, 44,120-124 (2004)

2) Hiroshi AKIYAMA, Kazuto ISUZUGAWA, Naoki HARIKAI, Hiroko WATANABE, Ken IJIMA, Hirohito YAMAKAWA, Yamato MIZUGUCHI, Reiji YOSHIKAWA, Miho YAMAMOTO, Hidetaka SATO, Masatoshi WATAI, Fumihito ARAWAKA, Takeshi OGASAWARA, Rikuka NISHIHARA, Hisashi KATO, Atsushi YAMAUCHI, Yoshihisa TAKAHATA, Fumiki MORIMATSU, Shinichi MAMEGOSHI, Shiroo MURAOKA, Tsutomu HONJOH, Takahiro WATANABE, Chiseko WAKUI, Tomoaki IMAMURA, Masatake TOYODA, Rieko MATSUDA, Tamio MAITANI Inter-laboratory Evaluation Studies of Notified ELISA Methods for Allergic Substances (Milk) J. Food Hyg. Soc. Japan, in press.

3) Hiroshi AKIYAMA, Kazuto ISUZUGAWA, Naoki HARIKAI, Hiroko WATANABE, Ken IJIMA, Hirohito YAMAKAWA, Yamato MIZUGUCHI, Reiji YOSHIKAWA, Miho YAMAMOTO, Hidetaka SATO, Masatoshi WATAI, Fumihito ARAWAKA, Takeshi OGASAWARA, Rikuka NISHIHARA, Hisashi KATO, Atsushi YAMAUCHI, Yoshihisa TAKAHATA, Fumiki MORIMATSU, Shinichi MAMEGOSHI, Shiroo MURAOKA, Tsutomu HONJOH, Takahiro WATANABE, Kozue SAKATA, Tomoaki IMAMURA, Masatake TOYODA, Rieko MATSUDA, Tamio MAITANI Inter-laboratory Evaluation Studies for Development of Notified ELISA Methods for Allergic Substances (Wheat) J. Food Hyg. Soc. Japan, in press

4) 穂山浩 食品中のアレルギー誘発物質の検出法について食肉の科学,44(2),167-173(2003) 5) 穂山浩、松田りえ子、米谷民雄 食物アレルギーの主要抗原と検知法,小児科臨床, 7.43-49(2004)

2. 学会発表 1) 穂山浩 食物アレルギーの抗原解析およびその低減化に関する研究

第4回食物アレルギー研究会(2004.1)

2) 荒川史博、小笠原健、小関良宏、高畑能久、森松文毅、穂山浩、米谷民雄 食品中の特定原材料の分析について(1) 日本食品化学会第9回学術大会(2003.6) 3)

Table 3 ソーセージ試料の均一性評価結果

抗原	添加濃度 (mg/kg)	総平均 (mg/kg)	真度 (%)	分散分析 2x6 試料・抽出			分散分析 2x12 試料・ELISA						
				試料間 RSD%	抽出間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)	試料間 RSD%	ELISA間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)
卵	10	4.30	43.0	5.7	4.8	3.87	0.09	5.19	7.3	3.6	8.99	0.00	3.02
	50	20.23	40.5	-	3.3	0.97	0.50	5.19	3.1	2.0	6.04	0.00	2.85
牛乳	10	6.24	62.4	2.5	3.3	2.15	0.21	5.19	3.0	1.2	14.24	0.00	2.85
	50	27.83	55.7	2.4	4.1	1.66	0.29	5.19	3.5	2.6	4.83	0.01	2.85
小麦	10	9.23	92.3	-	6.5	0.85	0.56	4.39	5.3	4.9	3.32	0.03	2.72
	50	45.02	90.0	4.5	3.4	4.41	0.05	4.39	5.1	3.0	6.58	0.00	2.72
そば	10	7.08	70.8	4.5	2.5	7.21	0.02	4.39	4.6	2.5	8.16	0.00	2.72
	50	27.05	54.1	3.2	2.3	4.71	0.04	4.39	2.8	3.7	2.20	0.10	2.72
落花生	10	6.65	66.5	2.2	6.5	1.22	0.40	4.39	5.9	4.9	3.90	0.01	2.72
	50	40.70	81.4	-	7.9	0.64	0.68	4.39	2.3	9.8	1.11	0.43	2.72
落花生2	10	4.59	45.9	2.6	2.3	3.61	0.07	4.39	3.2	1.8	7.23	0.00	2.72
	50	23.27	46.5	2.6	2.5	3.08	0.10	4.39	3.4	1.5	10.54	0.00	2.72

Table 4 牛肉レトルトパウチ試料の均一性評価結果

抗原	添加濃度 (mg/kg)	総平均 (mg/kg)	真度 (%)	分散分析 2x6 試料・抽出			分散分析 2x12 試料・ELISA						
				試料間 RSD%	抽出間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)	試料間 RSD%	ELISA間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)
卵	10	4.51	45.1	-	4.0	0.39	0.84	4.39	2.9	2.3	4.20	0.01	2.72
	50	21.96	43.9	-	3.9	0.57	0.72	4.39	3.0	2.5	3.90	0.01	2.72
牛乳	10	4.07	40.7	0.9	4.3	1.09	0.45	4.39	3.7	3.2	3.75	0.02	2.72
	50	13.73	27.5	2.3	4.5	1.50	0.31	4.39	3.6	5.0	2.04	0.12	2.72
小麦	10	9.21	92.1	-	9.1	0.81	0.58	4.39	6.5	8.1	2.27	0.09	2.72
	50	46.31	92.6	-	5.0	0.54	0.74	4.39	2.9	4.8	1.71	0.19	2.72
そば	10	10.09	100.9	-	6.5	0.78	0.60	4.39	3.2	7.5	1.36	0.30	2.72
	50	38.85	77.7	-	3.3	0.17	0.96	4.39	-	4.7	0.63	0.77	2.72
落花生	10	4.37	43.7	-	9.5	0.10	0.99	4.39	4.1	8.6	1.45	0.26	2.72
	50	26.73	53.5	-	12.4	0.69	0.65	4.39	9.5	9.1	3.17	0.03	2.72
落花生2	10	3.94	39.4	1.4	2.6	1.61	0.29	4.39	2.6	2.0	4.47	0.01	2.72
	50	18.58	37.2	3.4	3.2	3.22	0.09	4.39	4.4	2.0	10.48	0.00	2.72

Table 5 トマトソース試料の均一性評価結果

抗原	添加濃度 (mg/kg)	総平均 (mg/kg)	真度 (%)	分散分析 2x6 試料・抽出				分散分析 2x12 試料・ELISA					
				試料間 RSD%	抽出間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)	試料間 RSD%	ELISA間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)
小麦	10	10.52	105.2	-	20.0	0.43	0.81	4.39	17.1	3.1	61.78	0.00	2.72
	50	50.66	101.3	-	21.9	0.53	0.75	4.39	19.4	2.6	116.36	0.00	2.72
そば	10	8.15	81.5	2.8	2.4	3.88	0.06	4.39	3.0	2.8	3.32	0.03	2.72
	50	39.35	78.7	3.1	1.8	6.57	0.02	4.39	2.8	2.8	3.01	0.04	2.72
落花生	10	10.90	109.0	5.3	5.3	2.98	0.11	4.39	5.2	7.3	2.01	0.12	2.72
	50	53.82	107.6	2.2	10.6	1.08	0.45	4.39	10.0	5.7	7.21	0.00	2.72
落花生2	10	1.77	17.7	1.3	2.2	1.64	0.28	4.39	1.9	2.3	2.32	0.08	2.72
	50	10.31	20.6	3.0	4.3	1.94	0.22	4.39	5.1	1.5	23.99	0.00	2.72

Table 6 ビスケット試料の均一性評価結果

抗原	添加濃度 (mg/kg)	総平均 (mg/kg)	真度 (%)	分散分析 2x6 試料・抽出				分散分析 2x12 試料・ELISA					
				試料間 RSD%	抽出間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)	試料間 RSD%	ELISA間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)
卵	10	3.97	39.7	-	4.2	0.02	0.69	4.39	1.4	5.2	1.14	0.41	2.72
	50	16.83	33.7	-	4.2	0.65	0.67	4.39	3.3	2.9	3.57	0.02	2.72
カゼイン	10	2.16	21.6	-	3.9	0.64	0.68	4.39	2.8	3.1	2.65	0.05	2.72
	50	11.34	22.7	-	4.4	0.48	0.78	4.39	3.4	2.6	4.24	0.01	2.72
βLG	10	3.07	30.7	-	2.6	0.97	0.50	4.39	-	4.0	0.82	0.62	2.72
	50	9.33	18.7	-	5.6	0.53	0.75	4.39	3.9	4.4	2.53	0.06	2.72
そば	10	8.22	82.2	3.3	9.7	1.23	0.40	4.39	10.0	2.9	23.91	0.00	2.72
	50	37.08	74.2	2.2	4.5	1.46	0.33	4.39	4.8	1.6	19.18	0.00	2.72



Table 7 オレンジジュース試料の均一性評価結果

抗原	添加濃度 (mg/kg)	総平均 (mg/kg)	真度 (%)	分散分析 2x6 試料・抽出				分散分析 2x12 試料・ELISA					
				試料間 RSD%	抽出間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)	試料間 RSD%	ELISA間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)
抗原 卵	10	8.78	87.8	-	9.0	0.02	1.00	4.39	6.6	2.9	3.57	0.02	2.72
	50	38.42	76.8	1.3	4.8	1.15	0.43	4.39	4.4	3.3	4.42	0.01	2.72
カゼイン	10	7.63	76.3	-	9.4	0.13	0.98	4.39	7.2	1.9	30.02	0.00	2.72
	50	30.93	61.9	-	15.6	0.09	0.99	4.39	11.8	2.4	50.26	0.00	2.72
βLG	10	8.51	85.1	-	5.3	0.29	0.91	4.39	4.1	2.1	8.20	0.00	2.72
	50	37.79	75.6	-	6.9	0.22	0.94	4.39	5.2	2.4	10.53	0.00	2.72
小麦	10	9.46	94.6	-	11.9	0.17	0.96	4.39	9.2	2.7	24.62	0.00	2.72
	50	67.12	134.2	-	6.2	0.76	0.61	4.39	5.6	2.4	12.12	0.00	2.72
そば	10	11.29	112.9	-	9.0	0.53	0.75	4.39	7.7	3.0	14.39	0.00	2.72
	50	54.52	109.0	-	4.8	0.27	0.91	4.39	3.7	1.7	10.75	0.00	2.72
落花生	10	17.22	172.2	1.8	3.7	1.45	0.33	4.39	3.2	3.7	2.45	0.07	2.72
	50	84.22	168.4	-	4.2	0.37	0.85	4.39	3.2	2.1	5.56	0.00	2.72

Table 8 ジャム試料の均一性評価結果

抗原	添加濃度 (mg/kg)	総平均 (mg/kg)	真度 (%)	分散分析 2x6 試料・抽出				分散分析 2x12 試料・ELISA					
				試料間 RSD%	抽出間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)	試料間 RSD%	ELISA間 RSD%	分散比	P	境界F値 (0.95)
抗原 卵	10	6.44	64.4	-	4.5	0.54	0.74	4.39	3.3	3.2	3.08	0.03	2.72
	50	27.11	54.2	-	3.8	0.60	0.71	4.39	-	5.3	0.84	0.61	2.72
カゼイン	10	6.14	61.4	-	2.3	0.94	0.52	4.39	1.5	2.5	1.68	0.19	2.72
	50	25.34	50.7	1.1	3.8	1.18	0.42	4.39	3.2	3.2	2.99	0.04	2.72
βLG	10	6.24	62.4	-	4.1	0.78	0.60	4.39	1.6	5.0	1.22	0.37	2.72
	50	25.19	50.4	-	5.3	0.65	0.67	4.39	4.0	3.8	3.30	0.03	2.72
小麦	10	1.74	17.4	-	7.5	0.50	0.77	4.39	6.2	3.1	9.35	0.00	2.72
	50	9.18	18.4	2.6	2.9	2.54	0.14	4.39	1.4	4.4	1.20	0.38	2.72
落花生	10	7.16	71.6	-	3.4	0.17	0.96	4.39	1.6	3.0	1.57	0.22	2.72
	50	34.23	68.5	4.0	7.8	1.52	0.31	4.39	8.5	2.4	25.88	0.00	2.72

Table 9 卵抗原測定結果

通常の統計量から計算した回収率

試料食品	添加量 ng/mL	Mキット			Nキット			
		試験室数	ng/mL	%	試験室数	ng/mL	%	
ソーセージ	Dose A	25	10	12.07	48.3	10	6.81	27.2
	Dose A 5倍希釈	5	10	3.19	63.9	9	1.61	32.2
	Dose B	125	9	51.84	41.5	10	33.96	27.2
	Dose B 5倍希釈	25	8	15.80	63.2	10	7.65	30.6
牛肉	Dose A	25	10	15.77	63.1	10	9.48	37.9
	Dose A 5倍希釈	5	10	3.67	73.3	10	1.97	39.4
	Dose B	125	10	58.48	46.8	10	45.05	36.0
	Dose B 5倍希釈	25	10	15.81	63.2	10	9.40	37.6
ビスケット	Dose A	25	10	8.95	35.8	10	2.99	11.9
	Dose A 5倍希釈	5	10	1.76	35.2	9	0.62	12.4
	Dose B	125	9	34.75	27.8	10	14.43	11.5
	Dose B 5倍希釈	25	9	8.16	32.7	9	2.88	11.5
オレンジ ジュース	Dose A	25	10	17.66	70.7	10	12.41	49.6
	Dose A 5倍希釈	5	10	3.78	75.6	10	2.35	47.0
	Dose B	125	10	66.95	53.6	10	62.93	50.3
	Dose B 5倍希釈	25	10	17.08	68.3	10	14.86	59.4
ジャム	Dose A	25	10	14.41	57.6	10	6.29	25.2
	Dose A 5倍希釈	5	10	3.00	60.1	9	1.26	25.3
	Dose B	125	10	56.87	45.5	10	35.17	28.1
	Dose B 5倍希釈	25	10	14.51	58.1	10	7.14	28.5

頑健な統計量から計算した回収率

試料食品	添加量 ng/mL	Mキット		Nキット		
		ng/mL	%	ng/mL	%	
ソーセージ	Dose A	25	12.3	49.1	6.7	27.0
	Dose A 5倍希釈	5	3.2	63.9	1.6	32.2
	Dose B	125	50.9	40.7	33.4	26.7
	Dose B 5倍希釈	25	15.1	60.3	7.5	30.1
牛肉	Dose A	25	15.8	63.1	9.5	37.8
	Dose A 5倍希釈	5	3.7	73.2	2.0	39.4
	Dose B	125	58.5	46.8	44.4	35.5
	Dose B 5倍希釈	25	15.9	63.8	9.2	36.8
ビスケット	Dose A	25	8.9	35.8	3.0	11.9
	Dose A 5倍希釈	5	1.8	35.7	0.7	13.3
	Dose B	125	34.8	27.8	14.4	11.5
	Dose B 5倍希釈	25	7.9	31.7	2.8	11.4
オレンジ ジュース	Dose A	25	17.7	70.9	12.4	49.6
	Dose A 5倍希釈	5	3.8	75.6	2.4	47.7
	Dose B	125	66.9	53.6	61.2	49.0
	Dose B 5倍希釈	25	17.0	68.1	14.6	58.6
ジャム	Dose A	25	14.5	57.8	6.3	25.2
	Dose A 5倍希釈	5	3.1	61.4	1.3	26.9
	Dose B	125	56.2	45.0	35.2	28.1
	Dose B 5倍希釈	25	14.5	58.0	7.1	28.5

通常の統計量から計算した精度

試料食品	添加量	ng/mL	Mキット			Nキット		
			試験室数	RSDr%	RSDR%	試験室数	RSDr%	RSDR%
ソーセージ	Dose A	25	10	9.8	20.7	10	5.7	22.6
	Dose A 5倍希釈	5	10	14.6	22.5	10	7.3	19.7
	Dose B	125	9	3.8	8.3	10	6.3	23.0
	Dose B 5倍希釈	25	8	7.4	8.0	10	10.4	26.5
牛肉	Dose A	25	10	4.6	11.1	10	7.3	19.9
	Dose A 5倍希釈	5	10	9.9	21.5	10	9.7	22.1
	Dose B	125	10	4.5	7.4	10	5.9	27.9
	Dose B 5倍希釈	25	10	10.7	16.5	10	9.1	23.3
ビスケット	Dose A	25	10	7.9	12.1	10	6.2	17.7
	Dose A 5倍希釈	5	10	10.8	25.6	9	12.3	31.1
	Dose B	125	9	3.2	6.4	10	5.9	25.6
	Dose B 5倍希釈	25	9	7.7	14.6	9	9.7	21.2
オレンジ ジュース	Dose A	25	10	5.3	9.6	10	4.8	19.8
	Dose A 5倍希釈	5	10	8.5	19.7	10	11.1	21.2
	Dose B	125	10	3.6	9.3	10	4.7	26.7
	Dose B 5倍希釈	25	10	6.3	16.0	10	52.9	55.7
ジャム	Dose A	25	10	6.3	10.8	10	5.1	16.5
	Dose A 5倍希釈	5	10	12.8	21.6	9	9.7	23.1
	Dose B	125	10	4.4	7.4	10	3.5	19.5
	Dose B 5倍希釈	25	10	7.2	13.7	10	4.5	19.4

頑健な統計量から計算した精度

試料食品	添加量	ng/mL	Mキット		Nキット	
			RSDr	RSDR	RSDr	RSDR
ソーセージ	Dose A	25	7.5	17.4	6.4	23.5
	Dose A 5倍希釈	5	14.3	21.5	6.4	22.0
	Dose B	125	2.1	10.1	7.1	22.4
	Dose B 5倍希釈	25	8.3	14.3	11.6	26.6
牛肉	Dose A	25	5.0	12.6	8.0	22.1
	Dose A 5倍希釈	5	10.8	23.9	10.0	24.9
	Dose B	125	5.0	8.4	6.6	28.7
	Dose B 5倍希釈	25	11.6	16.5	10.2	21.5
ビスケット	Dose A	25	6.7	13.1	6.8	19.4
	Dose A 5倍希釈	5	11.7	21.6	11.3	35.8
	Dose B	125	4.1	7.0	6.5	29.1
	Dose B 5倍希釈	25	10.1	20.0	12.4	20.5
オレンジ ジュース	Dose A	25	4.7	9.7	4.8	22.4
	Dose A 5倍希釈	5	8.0	22.1	11.4	20.1
	Dose B	125	4.0	10.5	3.9	24.1
	Dose B 5倍希釈	25	6.8	17.5	31.0	49.3
ジャム	Dose A	25	6.9	11.3	5.4	18.7
	Dose A 5倍希釈	5	13.8	20.9	11.5	19.0
	Dose B	125	4.2	6.4	3.1	22.0
	Dose B 5倍希釈	25	5.3	14.7	3.7	21.8

Table 10 牛乳抗原結果

通常の統計量から計算した回収率

試料食品	添加量 ng/mL	Mキット				Nキット		
		試験室数	ng/mL	%	試験室数	ng/mL	%	
ソーセージ	Dose A	25	10	14.27	57.1	8	14.29	57.2
	Dose A 5倍希釈	5	10	3.34	66.8	9	2.52	50.4
	Dose B	125	10	60.51	48.4	10	42.53	34.0
	Dose B 5倍希釈	25	10	17.08	68.3	10	12.80	51.2
牛肉	Dose A	25	10	6.44	25.7	10	7.15	28.6
	Dose A 5倍希釈	5	9	1.42	28.4	9	1.20	24.0
	Dose B	125	10	28.11	22.5	10	23.02	18.4
	Dose B 5倍希釈	25	10	6.70	26.8	9	5.24	21.0
ビスケット	Dose A	25	10	5.05	20.2	10	5.45	21.8
	Dose A 5倍希釈	5	10	1.05	20.9	9	0.70	14.0
	Dose B	125	10	27.00	21.6	9	29.99	24.0
	Dose B 5倍希釈	25	9	5.93	23.7	10	6.90	27.6
オレンジ ジュース	Dose A	25	10	18.93	75.7	10	18.63	74.5
	Dose A 5倍希釈	5	10	3.83	76.6	10	3.80	76.0
	Dose B	125	10	63.76	51.0	10	57.37	45.9
	Dose B 5倍希釈	25	9	17.52	70.1	10	18.46	73.8
ジャム	Dose A	25	10	19.03	76.1	10	18.37	73.5
	Dose A 5倍希釈	5	10	3.69	73.8	9	3.81	76.1
	Dose B	125	10	69.07	55.3	9	62.04	49.6
	Dose B 5倍希釈	25	10	17.85	71.4	10	19.53	78.1

頑健な統計量から計算した回収率

試料食品	添加量 ng/mL	Mキット			Nキット	
		ng/mL	%	ng/mL	%	
ソーセージ	Dose A	25	14.4	57.5	13.5	53.8
	Dose A 5倍希釈	5	3.3	66.7	2.6	52.3
	Dose B	125	60.8	48.7	42.5	34.0
	Dose B 5倍希釈	25	17.1	68.3	12.8	51.0
牛肉	Dose A	25	6.4	25.6	7.2	28.8
	Dose A 5倍希釈	5	1.5	30.5	1.3	25.1
	Dose B	125	28.4	22.7	23.2	18.6
	Dose B 5倍希釈	25	6.7	26.8	5.6	22.5
ビスケット	Dose A	25	5.1	20.2	5.4	21.8
	Dose A 5倍希釈	5	1.1	21.6	0.7	15.0
	Dose B	125	26.9	21.6	29.4	23.5
	Dose B 5倍希釈	25	5.8	23.1	6.8	27.3
オレンジ ジュース	Dose A	25	18.9	75.7	18.6	74.3
	Dose A 5倍希釈	5	3.9	77.2	3.8	76.0
	Dose B	125	64.8	51.9	57.4	45.9
	Dose B 5倍希釈	25	17.8	71.1	18.4	73.5
ジャム	Dose A	25	19.0	76.1	18.4	73.5
	Dose A 5倍希釈	5	3.8	75.9	4.0	79.4
	Dose B	125	69.3	55.5	60.2	48.2
	Dose B 5倍希釈	25	17.8	71.1	19.5	78.1