

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料作製と
信頼性確保に関する研究(その 3)

—食品中のアレルギー関連物質検査の外部精度管理に関する調査試料の作製検討—

主任研究者 遠藤 明 (財)食品薬品安全センター 理事長

分担研究者 大島 赴夫 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 食品衛生事業部長

協力研究者 笠間 菊子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

井上 雪乃 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨

アレルギー物質を含む特定原材料(卵、乳、小麦、そば、落花生)については平成 13 年 4 月に食品への表示が義務化されたのに伴い、厚生労働省からの通知に従って検査が行われている。特定原材料検査の精度の適正化および向上のためには外部精度管理の実施が不可欠でそのための配布用試料が必要となった。昨年度までに特定原材料のうち卵、牛乳試料の調製について検討したが、本年度は残る小麦、そば、落花生特定原材料試料の調製について検討した。

小麦は標準品規格に従った銘柄の小麦粒の入手が不可能で、一次標準粉末の調製ができなかった。このため、市販の小麦粉を用いることとし、抽出液を作製して小麦タンパク質を 2 種の ELISA キットで測定した結果、測定値には約 2 倍の差が認められた。小麦粉抽出液添加試料および小麦粉添加試料の測定でも約 2 倍の差が認められたが、 -20°C での保存安定性ではいずれの試料からも良好な結果が得られた。そば、落花生については、標準品規格に従って一次標準粉末および高濃度標準品を調製し、これらを添加した試料を調製して回収率および安定性について検討した。いずれも高濃度標準液を添加した試料については回収率、 -20°C での保存安定性とも良好な結果が得られたが、一次標準粉末を添加した試料においては、回収率に問題が認められ、検討の継続が必要と考えられた。

A. 研究の目的

アレルギー体質を持つ人の健康危害の発生を防止するため平成 13 年 4 月にアレルギー物質を含む原材料 24 品目について食品への表示が義務化された。そのうち 5 品目については特定原材料(卵、乳、小麦、そば、落花生)

と指定され、検査法が通知されたため、食品衛生法施行規則に基づき検査の精度の適正化および向上のため外部精度管理の実施を検討する必要性が生じた。

特定原材料の検査法は平成 14 年 11 月 6 日厚生労働省医薬局食品保健部長より通知

(食発第 1106001 号)された後、平成 17 年 10 月(食安発第 1011002 号)、平成 18 年 3 月(食安発第 0324001 号)および平成 18 年 6 月(食安発第 0622003 号)にその一部が改正され現在に至っている。このうち、平成 18 年 3 月には標準品規格が追加され、平成 18 年 6 月にはそれまで指定されていた測定キットが全て通知からはずれ、代わって検査方法を評価するためのガイドラインのみが記載されるようになった。しかし、それ以前に通知に記載されていたキットは前述の検査方法の評価が完了していなくても移行措置として平成 21 年 6 月 30 日まで使用が認められている。また、現在検査方法の評価が完了しているキットは平成 18 年 3 月の通知(食安発第 0324001 号)に含まれており、これ以外に新たに評価が完了したキットはない。このため、本年度も昨年度と同様に、平成 18 年 3 月の通知(食安発第 0324001 号)に基づく測定法に従って特定原材料タンパク質を測定し、調製試料の評価を行った。

一昨年は卵を含む試料、昨年は牛乳を含む試料の調製に主眼を置いて検討を行い、いずれも ELISA 法による定量、ウェスタンブロット法による確認試験の双方に対応可能な試料が試作レベルではあるが調製できた。本年度は特定原材料のうち残る小麦、そば、落花生について精度管理試料の調製を試みた。

B. 研究方法

1. 特定原材料タンパク質の定量

特定原材料タンパク質の定量は ELISA 法により実施した。すなわち小麦タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 小麦 測定キット(㈱森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver.Ⅱ小麦(日本ハム㈱)、そばタンパク質の測定にはモリナガ FASPEK そば 測定キット(㈱森永

生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver.Ⅱそば(日本ハム㈱)、落花生タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 落花生 測定キット(㈱森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver.Ⅱ落花生(日本ハム㈱)を使用し、平成 18 年 3 月の通知法に従って操作した。次いで 450nm/630nm の吸光度をマイクロプレートリーダー(BIO- KINETICS READER EL 312e、Bio-Tek Instruments, Inc.)により測定し、4-パラメーターにより作成した検量線から試料中の特定原材料タンパク質の濃度を求めた。

2. 総タンパク質の定量

小麦粉、そば粉、落花生粉を平成 18 年 6 月(食安発第 0622003 号)の標準品規格に従って抽出した抽出液のタンパク質濃度は 2-D Quant Kit(GE ヘルスケアバイオサイエンス㈱)を用いて定量した。また、小麦粉、そば粉、落花生粉のタンパク質含量をケルテックオート 1035 型(tecator)を用い、ケルダール法により測定した。なお窒素係数は小麦粉 5.83、そば粉 6.31、落花生粉 5.46 を使用した。

3. SDS-PAGE

標準品規格に従って抽出した抽出液の電気泳動はゲルに SDS- PAGE mini(テフコ㈱)を使用し、電気泳動槽 STC-808(テフコ㈱)により行った。

4. 抽出および混合

小麦粉、そば粉、落花生粉の標準品規格による抽出および特定原材料添加食材からのタンパク質の抽出には、振とう機: RECIPRO SHAKER NR- I および Double Shaker R-30 mini(以上 TAITEC)および遠心機:himac CF 16RX(日立工機㈱)を使用した。また、特定原材料の食材への添加、混合にはフードプロセッサー:MK-K58(松下電器産業㈱)を使用した。

5. 小麦、そばおよび落花生試料

小麦試料にはオリエンタル酵母株式会社より譲渡を受けた小麦一次標準粉末の他、神奈川県内の食品店で購入した各種小麦粉および別途入手した小麦を使用した。そば試料は標準品規格に規定されているそばを製粉会社から購入し、通知に従って混合後、標準品規格に準じて粉碎したものを使用した。また、落花生試料についても標準品規格に指定された千葉県産の落花生を農家より購入し、標準品規格に従って調製した一次標準粉末を使用した。

なお、小麦粒およびそばの粉碎には超遠心粉碎機 ZM200 (楸レッチェ) を使用した。

6. 添加用基材

添加基材には原材料の欄に添加予定の特定原材料を使用した旨の表示が無い食材を神奈川県内の食品店で購入し、使用した。

7. 精度管理試料の調製

7.1 高濃度標準液添加による試料調製

5. の特定原材料を厚生労働省の通知(食安発第 0622003 号)の標準品規格に従って抽出して調製した自家製高濃度標準液またはオリエンタル酵母(株)より購入した高濃度標準液を、6. の添加基材に加えて作製した。すなわち添加用基材をフードプロセッサーで均一化した後、その 1g を 50mL 容の遠沈管に量り取り、高濃度標準液を一定量添加して作製した。

7.2 原材料添加による試料調製

6. の添加用基材に 5. の特定原材料を直接加え、フードプロセッサーで均一化して作製した。

倫理面への配慮

添加試料が食材であるため、誤って口に入ることが無いよう、試料の残余や廃棄物は速やかに焼却処分に付した。

C. D. 結果および考察

1. 小麦試料作製の検討

1.1 高濃度標準液の食材への添加回収試験

小麦を使用した旨の表示のない食材(肉団子、カボチャペースト、離乳食 1、離乳食 2、離乳食 3、みそ)に高濃度標準液(小麦用)(オリエンタル酵母(株))を添加した試料について、小麦タンパク質をモリナガ FASPEK 小麦 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で測定し、添加したタンパク質量に対する回収率を求めた(表 1)。その結果いずれも食材のみでは小麦タンパク質は検出されなかった。添加食材における小麦タンパク質の回収率は食材間ではあまり差がなかったが、キット間の回収率には大きな差があり、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットでは 98.4~106.9%であったのに対し、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦では 53.6~62.1%だった。また、同時に測定した高濃度標準液の回収率にも両キットで同様の差が認められた。高濃度標準液は、両キットの検量線作成用の標準溶液の原液であるため、本来、両キットとも 100%に近い回収率となるはずであることを考えると FASTKIT エライザ Ver. II 小麦の回収率に問題があると考えられた。この原因としては、オリエンタル酵母(株)より高濃度標準液を購入した際、保存中に生じた沈澱をソニケーターにより溶解して使用するよう助言を受けこれに従ったが、操作が不十分だった可能性が考えられた。

1.2 小麦抽出液作製の検討

厚生労働省の通知法、標準品規格には指定された 14 銘柄の小麦粒を混合後粉碎して小麦一次標準粉末を調製し、これを抽出して小麦標準品原液を調製する旨が記載されている。しかし、通知に記載されたほとんどの銘柄

について小麦粒の入手は不可能で、独自に小麦一次標準粉末を調製することはできなかった。高濃度標準液(小麦用)(オリエンタル酵母(株))に代わる試料添加用の小麦抽出液を調製するため、入手可能だった13種の小麦粉のそれぞれについて標準品規格に基づいた抽出を行い、抽出液の標準品規格への適合性その他を検討した。また、比較のためオリエンタル酵母(株)より譲渡を受けた小麦一次標準粉末についても、同様に抽出を行った。得られた抽出液のタンパク質濃度を2-D Quant Kitで測定し、標準品規格と比較した結果、検討した小麦粉13種のうち6種のタンパク質濃度が標準品規格(4.0~6.0mg/mL)を外れた。この原因としては、小麦の銘柄によるタンパク質含量の違いの外に小麦粉の粒子の大きさ(市販の小麦粉は小麦一次標準粉末に比べて小さい)も関係するのではないかと考え、小麦粒(農林61号)を粒子径を変えて粉碎した。データは示していないが、抽出液のタンパク質濃度は粒子が小さいほうが高い傾向がみられ、市販小麦粉の抽出液のタンパク質濃度は単純には標準品規格と比較できないことが分かった。

市販小麦粉と小麦一次標準粉末の抽出液について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動像を比較した結果、皮の部分を除いて製粉した通常小麦粉の泳動像は全粒粉である小麦一次標準粉末とは特に低分子領域で異なっていた。一方、全粒粉では、石臼挽きハルユタカ全粒粉、石臼挽(春よ恋100%)全粒粉の泳動像が小麦一次標準粉末と比較的類似していた(図1)。

次にこれら抽出液をモリナガ FASPEK 小麦測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で測定し、2-D Quant Kit によるタンパク質の測定値と比較した(表2)。FASTKIT エライ

ザ Ver. II 小麦の 2-D Quant Kit に対する回収率は 57.9~124.5%と幅が大きかったが、100%に近いものもあった。一方、モリナガ FASPEK 小麦測定キットでは回収率が全般に高く、123.9~195.8%と全て100%を超え、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦の測定値の1.5~2倍であった。

抽出液のタンパク質濃度の測定値がモリナガ FASPEK 小麦測定キットと2-D Quant Kit および FASTKIT エライザ Ver. II 小麦の間で大きく異なったことから、抽出に用いた各小麦粉のタンパク質含量を知るためにケルダール法による分析を実施した。ケルダール法による分析結果と2-D Quant Kit によるタンパク質濃度を比較して抽出率を求めた結果、抽出率はおおむね90%以上で、小麦粉のタンパク質は標準品規格の抽出法によりほぼ抽出されていることおよび2-D Quant Kit および FASTKIT エライザ Ver. II 小麦の測定値が抽出液の小麦タンパク質の濃度を反映していることが分かった。モリナガ FASPEK 小麦測定キットで小麦タンパク質の回収率が高くなった理由としては、今回使用した小麦粉のタンパク質の組成が小麦一次標準粉末と異なっていた可能性が考えられた。すなわちモリナガ FASPEK 小麦測定キットはグリアジンと反応する抗体のみを使用しているため、総タンパク質に占めるグリアジンの割合が多い場合、小麦タンパク質量が、実際より高く測定されるからである。家庭用小麦粉は主に小麦粒の中心部を使用し¹⁾、外皮およびそれに近い部分は使用しないため、小麦粒全体を粉碎した小麦一次標準粉末とはグリアジン含量が大きく違っている可能性が考えられた。しかし、モリナガ FASPEK 小麦測定キットは小麦一次標準粉末抽出液においても2-D Quant Kit のタンパク質濃度に対して家

庭用小麦粉と同様に高い回収率を示していることから、これ以外の可能性も含めさらに検討が必要と考えられた。

1.3 ハルユタカ抽出液添加試料の添加回収および安定性試験

1.2 の小麦抽出液のうち、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像が小麦一次標準粉末の電気泳動像と類似していた石臼挽きハルユタカ全粒粉の抽出液を通知の高濃度標準液の調製法に準じて 20 倍希釈し、ハルユタカ高濃度標準液とし、添加回収試験を実施した。添加食材はオリエンタル酵母製高濃度標準液による添加回収試験でも使用した肉団子とした。肉団子 1g を試験容器にとり、ハルユタカ高濃度標準液をタンパク質量として $4.65 \cdot \text{g}$ (2-D Quant Kit の測定値から計算) 加えて添加試料を調製し、 -20°C で保存した。添加試料の小麦タンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK 小麦測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた(表 3)。保存前の回収率はモリナガ FASPEK 小麦測定キットで 154.4%、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で 75.3%と 1.1、1.2 の結果と同様に ELISA キット間で 2 倍の差が認められた。保存後の測定値を保存前の測定値で除して求めた回収率は、いずれのキットのいずれの時点でも 100%以上で、添加試料の -20°C における安定性が、12 週後まで確認された。(図 2)

なお、各時点における両キットの測定値の RSD(n=3)は、全て 6%以内だったこと、添加試料と同時に測定したハルユタカ高濃度標準液(-80°C 保存)の測定時点間の変動係数がいずれも 5%以下であったこと(表 13)から、本試験の同時再現性およびアッセイ間再現性に問題はなかったものと考えられた。

1.4 食材への原材料添加による添加回収および安定性試験

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像が小麦一次標準粉末の電気泳動像と類似していた石臼挽きハルユタカ全粒粉を 1%CMC に懸濁したものを肉団子またはみそに混合して添加試料を作製した。小麦タンパク質の添加量は $5 \cdot \text{g/g}$ (標準品規格による抽出液の 2-D Quant Kit による測定値から推定)とした。添加タンパク質量を基準にして求めた保存前の回収率はみそ、肉団子でそれぞれモリナガ FASPEK 小麦測定キットが 197.4%、170.6%、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で 96.4%、50.6%とハルユタカ抽出液添加試料の測定結果と同様に、両キット間で 2 倍以上の差が認められた(表 4)。添加試料を -20°C で保存して 1、4、12 週後に測定し、これを保存前の測定値で除して求めた回収率はいずれも 100%以上で、添加試料の -20°C における安定性が 12 週後まで確認された(図 3)。

また、添加試料について均一性試験は実施していないが、モリナガ FASPEK 小麦測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦ともに各時点における測定値の RSD(n=3)は、1 時点を除き全て 10%以内だったことから、ある程度均一性が確認できたものと考えられた。

2. そば試料作製の検討

2.1 高濃度標準液の食材への添加回収試験

そばを使用した旨の表示のない食材(クッキー1、クッキー2、せんべい、インスタントラーメン、おかゆ)に高濃度標準液(そば用)(オリエンタル酵母(株))を添加した試料について、そばタンパク質をモリナガ FASPEK そば測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、添加したタンパク質量に対する回収率を求めた(表 5)。せんべいを除く添加食材の回収率

はモリナガ FASPEK そば 測定キットでは 78.0~89.3%、FASTKIT エライザ Ver. II そばでは 93.8~114.3%と良好であった。また、せんべいを除き、いずれの食材でも食材のみではそばタンパク質は検出されなかった。せんべいは食材のみでもモリナガ FASPEK そば 測定キットで 1.7・g/g の測定値が得られたほか、添加食材の回収率は両キットともに他の食材に比べて高値を示した。

2.2 そば抽出液作製の検討

標準品規格に基づき、茨城産および中国産のそばを 1:1 で混合後、超遠心粉碎機 ZM200 で 1mm のスクリーンを用いて粉碎した。これを標準品規格に従って抽出したそば標準品原液についてタンパク質濃度を 2-D Quant Kit で測定した結果、3.3mg/mL で標準品規格 (2.8~4.2mg/mL) に適合した。また、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像も標準品規格に適合していることを確認した(図 4)。次にそば標準品原液を標準品規格に従って 20 倍希釈して自家製そば高濃度標準液とした後、そばタンパク質の濃度をモリナガ FASPEK そば 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、2-D Quant Kit による測定値と比較して回収率を求めると共に、高濃度標準液(そば用)(オリエンタル酵母株)の測定結果とも比較した(表 6)。その結果、自家製そば高濃度標準液のモリナガ FASPEK そば 測定キットによる回収率は 81.1%、FASTKIT エライザ Ver. II そばでは 118.4%と良好で、高濃度標準液(そば用)(オリエンタル酵母株)の回収率とも類似していた。

2.3 自家製そば高濃度標準液添加試料の添加回収および安定性試験

2.1 で検討した食材のうち、クッキー2、またはインスタントラーメン 1g を試験容器にとり、こ

れに 2.2 で調製した自家製そば高濃度標準液をタンパク質量として 6.58・g(2-D Quant Kit の測定値から計算)加えて添加試料を調製し、-20℃で保存した。添加試料のそばタンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK そば 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた(表 7)。モリナガ FASPEK そば 測定キットでは回収率が全期間を通して、クッキー2、インスタントラーメン共に 77.2~90.6%の範囲でほぼ一定であった。一方、FASTKIT エライザ Ver. II そばでは回収率が 105.8~151.2%と変動が大きかった。両キットの測定値の同時再現性は、RSD(n=3)が全て 5.1%以内、保存前および 1、4、12 週で添加試料と同時に測定した自家製そば高濃度標準液(-80℃保存)の測定値を指標とした変動係数もモリナガ FASPEK そば 測定キットでは 2.8%と良好であった(表 13)。一方、FASTKIT エライザ Ver. II そばの自家製そば高濃度標準液測定値の RSD は 13.2%と大きく、アッセイ間の測定精度に問題が認められた。しかし日本ハムが実施した特定原材料測定キットのバリデーション試験²⁾の併行精度および室間精度は今回の実験の再現性と同程度であることから、アッセイ間再現性の問題はキットに由来するものと考えられた。したがって、少なくともモリナガ FASPEK そば 測定キットにおいて良好な結果得られていることから、自家製そば高濃度標準液添加試料の-20℃における安定性は確認できたと考える。

2.4 食材への原材料添加による添加回収および安定性試験

そば粉(自家製そば一次標準粉末をさらに粉碎したもの)をあずきあんまたは CMC 溶液に加えてそば粉添加試料を作製し、-20℃で

保存した。そば粉の添加量は使用したそば粉を標準品規格により抽出した抽出液の 2-D Quant Kit による測定値から推定し、そばタンパク質として 5 および 8・g/g とした。そば粉添加あんおよび CMC 懸濁液のそばタンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK そば 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II そばで測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた(表 8)。その結果、モリナガ FASPEK そば 測定キットの回収率は CMC 懸濁液が 106.0~115.6%、あんが 114.9~130.6%と全期間を通してほぼ一定で、標準品規格の抽出液からの予測値とも大きく違わなかった。一方 FASTKIT エライザ Ver. II そばでは CMC 懸濁液、あんともに回収率が標準品規格の抽出液からの予測値を大幅に上回ったほか、保存により増加する傾向も認められた。

そば粉添加試料測定の結果、標準品規格による抽出液のタンパク質濃度から推定したそば粉のタンパク質含量に疑問が生じたため添加に使用したそば粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した。その結果、そば粉からの標準品規格によるタンパク質の抽出率は 64.4%に留まることが分かった。従って今回作製したそば粉添加試料のそばタンパク質の含量が予定した含量よりも高かったことが、FASTKIT エライザ Ver. II そばの回収率が大きくなった原因のひとつと考えられた。今後、ケルダール法により測定したタンパク質含量を指標にして、添加回収試験を実施したいと考えている。

3. 落花生試料作製の検討

3.1 高濃度標準液の食材への添加回収試験

落花生を使用した旨の表示のない食材(クッキー1、クッキー2、せんべい、インスタントラ

ーメン、おかゆ)に高濃度標準液(落花生用)(オリエンタル酵母㈱)を添加した試料について落花生タンパク質を、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、添加したタンパク質量に対する回収率を求めた(表 9)。その結果、添加食材の落花生タンパク質の回収率はせんべいを除き、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは 75.8~89.9%であったが、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生ではおかゆを除き、100%以上となり、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットに比べて高い回収率を示した。同時に測定した高濃度標準液の回収率はモリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは 80.5%、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生では 85.2%と差がなかったので両キットで認められた回収率の差は添加食材のマトリックスの影響によるものと考えられた。なお、いずれの食材でも食材のみでは落花生タンパク質は検出されなかった。

3.2 落花生抽出液作製の検討

標準品規格に従って、千葉産の落花生から落花生一次標準粉末を作製した。この落花生粉を標準品規格に従って抽出した落花生標準品原液についてタンパク質量を 2-D Quant Kit で測定した結果、3.7mg/mL で、標準品規格(3.6~5.3mg/mL)に適合した。また、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像も標準品規格に適合していることを確認した(図 5)。次に落花生標準品原液を標準品規格に従って 20 倍希釈して自家製落花生高濃度標準液とした後、落花生タンパク質の濃度をモリナガ FASPEK 落花生 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、2-D Quant Kit による測定値と比較して回収率を求めると共に、高濃度標準液(落花生用)(オリエンタル酵母㈱)の測

定結果とも比較した(表 10)。その結果自家製落花生高濃度標準液のモリナガ FASPEK 落花生 測定キットによる回収率は 105.3%、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生では 72.6%で、同時に測定した高濃度標準液(落花生用)の回収率とは若干異なっていた。

3.3 自家製落花生高濃度標準液添加試料の添加回収および安定性試験

3.1 で検討した食材のうち、クッキー2 を 1g ずつ試験容器にとり、これに 3.2 で調製した自家製落花生高濃度標準液をタンパク質量として $3.74 \cdot \text{g}$ (2-D Quant Kit の測定値から計算) 加えて添加試料を調製し、 -20°C で保存した。添加試料の落花生タンパク質を保存前および 1、4、12 週後にモリナガ FASPEK 落花生 測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた(表 11)。モリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは回収率が全期間を通して 110%前後とほぼ一定であった。一方、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生では 92.0~115.5%と変動が大きかった。両キットの同時再現性は RSD(n=3)が全て 5.1%以内、保存前および 1、4、12 週で添加試料と同時に測定した自家製落花生高濃度標準液(-80°C 保存)の測定値を指標とした変動係数も、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは 4.3%と良好であった(表 13)。一方、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生の自家製落花生高濃度標準液測定値の RSD は 11.0%と大きく、アッセイ間の測定精度に問題が認められた。しかし、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットにおいて良好な結果得られていることから、自家製落花生高濃度標準液添加試料の -20°C における安定性は確認できたと考える。

3.4 食材への原材料添加による添加回収およ

び安定性試験

落花生粉をあずきあんまたは CMC 溶液に加えて落花生粉添加試料を作製し、 -20°C で保存した。落花生粉の添加量は落花生粉の標準品規格による抽出液の 2-D Quant Kit による測定値から推定し、落花生タンパク質として 5 および $8 \cdot \text{g/g}$ となる量とした。落花生粉添加あんおよび CMC 懸濁液の落花生タンパク質をモリナガ FASPEK 落花生 測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた(表 12)。その結果、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットの回収率は CMC 懸濁液が 88.8~103.0%、あんが 101.0~114.2%と全期間を通してほぼ一定で、標準品規格の抽出液からの予測値とも大きく違わなかった。一方 FASTKIT エライザ Ver. II 落花生では CMC 懸濁液の回収率が 67.6~83.4%と 100%以下だったのに対し、あんでは 122.4~170.6%と 100%を上回った。

落花生粉添加試料測定の結果、そば粉と同様に標準品規格による抽出液のタンパク質濃度から推定した落花生粉のタンパク質含量に疑問が生じたため、添加に使用した落花生粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した。その結果、落花生粉からの標準品規格によるタンパク質の抽出率は 41.2%に留まることが分かった。従って落花生粉のタンパク質の含量の予測が正しくなかったことにより、落花生粉添加あんでは回収率が大きくなった可能性が考えられた。今後、落花生についてもケルダール法により測定したタンパク質含量を指標にした、添加回収試験を実施したいと考えている。

E. 結論

1. 小麦試料作製の検討

厚生労働省の通知法、標準品規格に従った小麦粒が入手できなかつたため、小麦一次標準粉末の代替品を検索することとし、入手可能な小麦粉について標準品規格による抽出液の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、2-D Quant Kit、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 小麦によるタンパク質濃度の測定、ケルダール法による小麦粉のタンパク質含量の測定を実施し、標準品規格と比較した。その結果、試験した小麦粉は抽出液のタンパク質濃度が規格に適合しないものが約半数あつたほか、いずれもモリナガ FASPEK 小麦 測定キットの測定値が小麦粉のタンパク質含量よりも高く測定されるなど、小麦一次標準粉末の代替品として適当なものは見つからなかつた。その中で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像が小麦一次標準粉末の電気泳動像と類似していた石臼挽きハルユタカ全粒粉を用いて以下の検討を行なつた。ハルユタカ高濃度標準液または石臼挽きハルユタカ全粒粉を食材に添加したものを-20℃で保存し、回収率および保存安定性を検討した。その結果、添加試料は回収率では ELISA キット間で 2 倍の差が認められたが、同時再現性、アッセイ間再現性とも良好で、-20℃、12 週間の安定性が確認できた。

2. そば試料作製の検討

標準品規格に従って自家製一次標準粉末および自家製高濃度標準液を調製し、標準品規格に適合していることを確認した。自家製高濃度標準液を添加した試料を作製し-20℃で保存したのについてそばタンパク質を測定した結果、モリナガ FASPEK そば 測定キットでは添加回収率が良好で保存安定性も 12 週間で確認でき、使用可能な高濃度標準液添加

試料が調製できたと考えられた。一方、自家製一次標準粉末を添加した食材においては回収率が添加量を大幅に上回つた。そば粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した結果、標準品規格の抽出液から予測したそば粉のタンパク質含量が実際と異なっていることが分かつた。今後ケルダール法のタンパク質含量を指標にして添加回収試験を実施する予定である。

3. 落花生試料作製の検討

標準品規格に従って自家製一次標準粉末および自家製高濃度標準液を調製し、標準品規格に適合していることを確認した。自家製高濃度標準液を添加した食材を作製し-20℃で保存したのについて落花生タンパク質を測定した結果、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは添加回収率は良好で保存安定性も 12 週間で確認でき、使用可能な高濃度標準液添加試料が調製できたと考えられた。一方、自家製一次標準粉末を添加した食材においては回収率が添加量を上回つた。落花生粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した結果、標準品規格の抽出液から予測した落花生粉のタンパク質含量が実際と異なっていることが分かつた。今後ケルダール法のタンパク質含量を指標にして添加回収試験を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

引用文献

- 1) (財)製粉振興会ホームページ:
<http://www.seifun.or.jp>

- 2) 日本ハム中央研究所ホームページ:
<http://www.rdc.nipponham.co.jp>

謝辞

本研究に対しご助言頂いた国立医薬品食品衛生研究所、代謝生化学部第2室長穂山浩先生、また、小麦一次標準粉末をご提供下さったオリエンタル酵母株式会社に深謝致します。

図1 各種小麦粉抽出液の電気泳動像

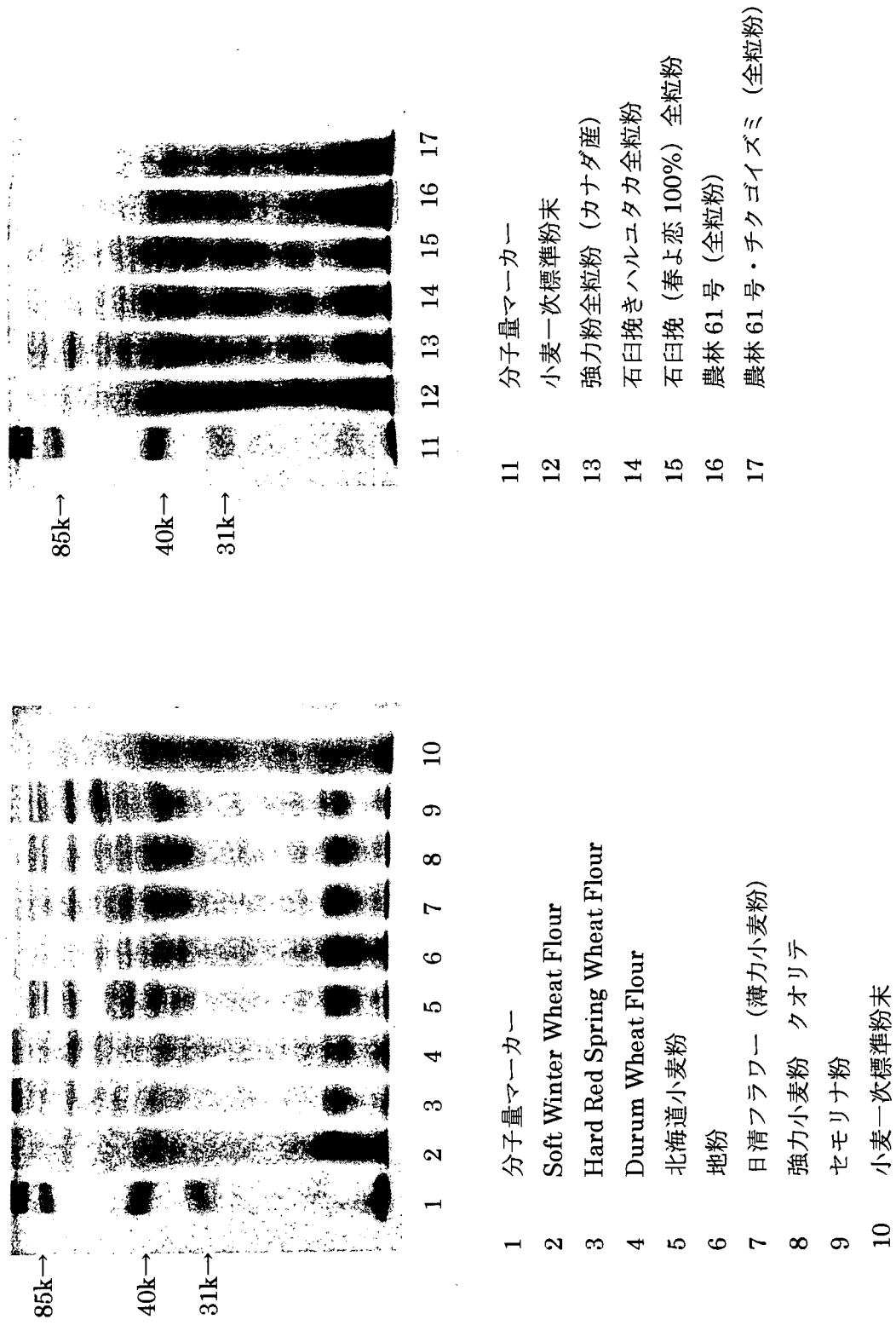
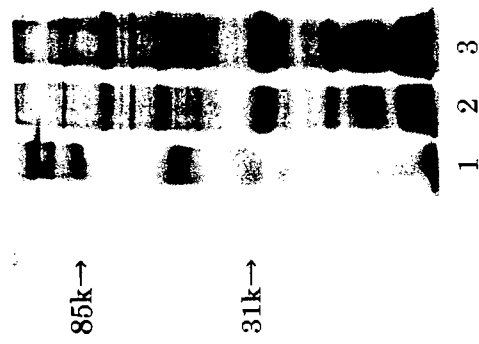
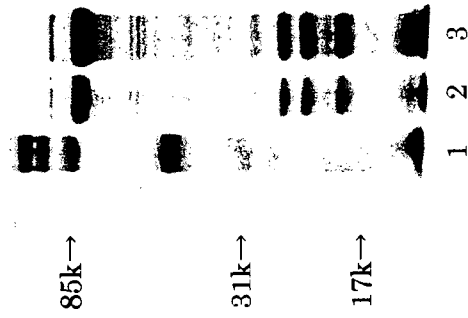


図4 そば標準品原液の電気泳動像



- 1 分子量マーカー
- 2 そば標準品原液
- 3 そば標準品原液

図5 落花生標準品原液の電気泳動像



- 1 分子量マーカー
- 2 落花生標準品原液
- 3 落花生標準品原液

表1 高濃度標準液(小麦用)(オリエンタル酵母㈱)添加食材の小麦タンパク質の測定

食材 ^a	モリナガFASPEK				FASTKITエライザ Ver. II小麦					
	タンパク質		小麦測定キット		測定値		回収率		RSD	
	添加量 ^b ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	回収率 (%)	RSD (%)			
食材なし(高濃度標準品のみ)	7.59	8.40	110.7		5.34	70.4				
肉団子	0	0.00	-		0.00	-				
	7.59	8.11	106.9	0.82	4.12	54.3	2.72			
カボチャ	0	0.00	-		0.00	-				
ペースト	7.59	7.90	104.1	2.86	4.49	59.2	4.75			
離乳食 1	0	0.00	-		0.00	-				
	7.59	7.77	102.4	1.59	4.65	61.3	4.32			
離乳食 2	0	0.00	-		0.00	-				
	7.59	7.47	98.4	1.08	4.25	56.0	3.01			
離乳食 3	0	0.00	-		0.00	-				
	7.59	7.64	100.7	0.15	4.71	62.1	2.62			
みそ	0	0.00	-		0.00	-				
	7.59	7.63	100.5	7.98	4.07	53.6	3.73			

添加量 7.59 は 2測定の平均、添加量 0 は 1測定のみ実施

a 食材はそれぞれ 1g を分取

b 高濃度標準液(小麦用)(オリエンタル酵母㈱)の表示量から計算

表2 各種小麦粉のタンパク質含量および抽出液のタンパク質濃度

小麦粉の種類	標準品規格により抽出した抽出液 ^a					FASTKITエライザVer. II小麦					
	測定試料		2-D Quantnt Kit		モリナガFASPEK小麦測定キット		タンパク質濃度		タンパク質濃度		回収率 ^d
	ケルダール法	タンパク質含量	タンパク質濃度	粉末のタンパク質含量に換算(B)	抽出率 ^b	タンパク質濃度	回収率 ^c	(D)	(E)	(%)	
(A)	(%)	(C)	(%)	(%)	(μg/mL)	(%)	(%)	(μg/mL)	(μg/mL)	(%)	
Soft Winter Wheat Flour	9.04	9.04	4.19	8.38	92.7	6.30	150.4	6.30	3.60	85.9	
Hard Red Spring Wheat Flour	14.02	14.02	6.56	13.12	93.6	11.79	179.7	11.79	5.51	84.0	
Durum Wheat Flour	14.11	14.11	6.60	13.20	93.6	8.74	132.4	8.74	4.07	61.7	
北海道小麦粉	9.97	9.97	4.79	9.58	96.1	8.18	170.8	8.18	5.41	112.9	
地粉	9.39	9.39	4.48	8.96	95.4	8.27	184.6	8.27	5.16	115.2	
日清フラー(薄力小麦粉)	9.86	9.86	4.37	8.75	88.7	8.27	189.2	8.27	5.44	124.5	
強力小麦粉 クオリテ	12.33	12.33	5.65	11.31	91.7	11.06	195.8	11.06	6.33	112.0	
セモリナ粉	13.79	13.79	6.44	12.89	93.5	7.98	123.9	7.98	3.73	57.9	
強力粉 全粒粉(カナダ産)	11.93	11.93	5.90	11.80	98.9	10.51	178.1	10.51	6.04	102.4	
石臼挽きハルユタカ全粒粉	13.43	13.43	6.21	12.43	92.6	11.50	185.2	11.50	6.18	99.5	
石臼挽(香よ恋100%)全粒粉	13.26	13.26	5.77	11.55	87.1	9.93	172.1	9.93	5.89	102.1	
農林61号(全粒粉)	7.91	7.91	3.11	6.22	78.6	4.17	134.1	4.17	2.69	86.5	
農林61号・チクゴイズミ(全粒粉)	9.46	9.46	3.93	7.85	83.0	5.28	134.4	5.28	3.59	91.3	
小麦一次標準粉末	n.d. ^g	n.d. ^g	4.99	9.98	-	8.94	179.2	8.94	4.28	85.8	
高濃度標準液(小麦用)	n.d.	n.d.	5.06 ^f	-	-	5.78	114.0	5.78	2.94	58.1	

a 試料 1.0g に 0.5% SDS、2% Mercaptoethanol を含む 0.1M Tris-HCl(pH8.6) 20mL を加え 1晩振盪して抽出

b (B)/(A) × 100

c (D)/(C) × 100

d (E)/(C) × 100

e not determined

f オリエンタル酵母㈱での測定値

表3 ハルユタカ高濃度標準液の添加回収試験

	保存期間 (測定時点) (week)	コムギタンパク質 モリナガFASPEK小麦測定キット				FASTKITエライザVer. II 小麦		
		添加量 ^b ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	回収率 (%)	RSD (%)
ハルユタカ 高濃度標準液	保存前	4.65	7.18	154.4	2.1	3.50	75.3	4.5
	1	4.65	7.91	170.1	2.4	3.97	85.4	5.9
添加	4	4.65	8.07	173.5	4.7	3.91	84.1	4.1
肉団子 ^a	12	4.65	7.70	165.6	4.1	3.90	83.9	4.4

- a 肉団子 1g にハルユタカ抽出液を添加後、 -20°C で保存、1時点につき3検体測定
 b 2-D Quant Kit による測定値から計算

図2 ハルユタカ高濃度標準液添加食材の -20°C における安定性

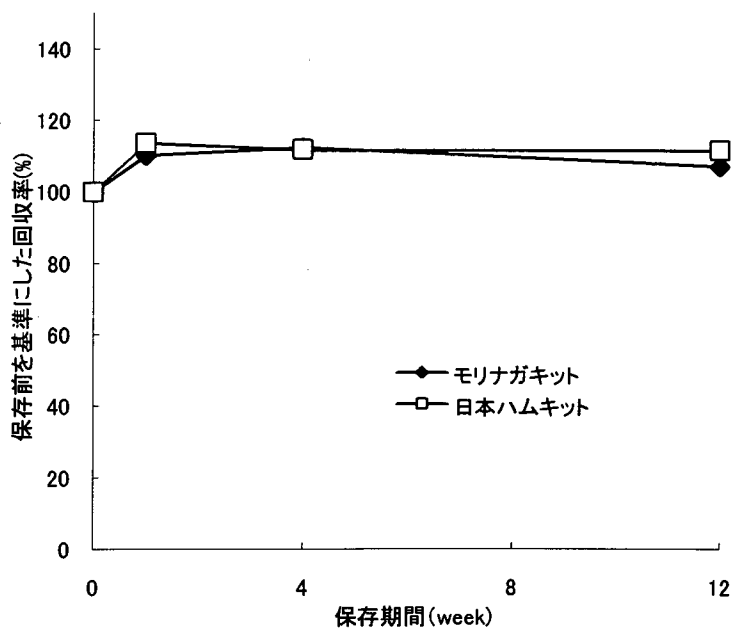


表4 石臼挽きハルユタカ全粒粉添加試料の添加回収および安定性試験

測定キット	試料	タンパク質 添加量 ^a (μg/tube)	保存前			-20℃ 1週間保存後			-20℃ 4週間保存後			-20℃ 12週間保存後		
			測定値 (μg/tube)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/tube)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/tube)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/tube)	回収率 ^b (%)	RSD (%)
モリナガFASPE 小麦測定キット	CMC	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	懸濁液	5	7.94	158.8	2.9	8.92	178.4	8.0	8.40	188.0	6.1	8.07	161.4	9.5
モリナガFASPE 小麦測定キット	みそ	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	みそ	5	9.87	197.4	3.1	10.30	206.0	12.3	10.15	203.0	3.6	10.09	201.8	6.9
モリナガFASPE 小麦測定キット	肉団子	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	肉団子	5	8.53	170.6	3.8	9.29	185.8	2.0	9.31	186.2	0.4	8.77	175.4	1.8
FASTKITエラー ザVer. II 小麦	CMC	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	懸濁液	5	4.32	86.5	4.1	5.12	102.3	7.9	4.36	87.2	11.8	4.23	84.6	10.3
FASTKITエラー ザVer. II 小麦	みそ	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	みそ	5	4.82	96.4	1.8	5.48	109.6	16.1	5.37	107.4	9.4	4.91	98.2	2.9
FASTKITエラー ザVer. II 小麦	肉団子	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	肉団子	8	4.04	50.6	6.1	4.37	54.7	2.0	4.56	57.0	8.9	4.48	56.0	3.2

石臼挽きハルユタカ全粒粉添加試料は3測定の平均、添加量0は1測定

a 標準品規格による抽出液の2-D Quant Kit による測定値からの推定値

b 測定値/タンパク質添加量 × 100

図3 石臼挽きハルユタカ添加試料の安定性

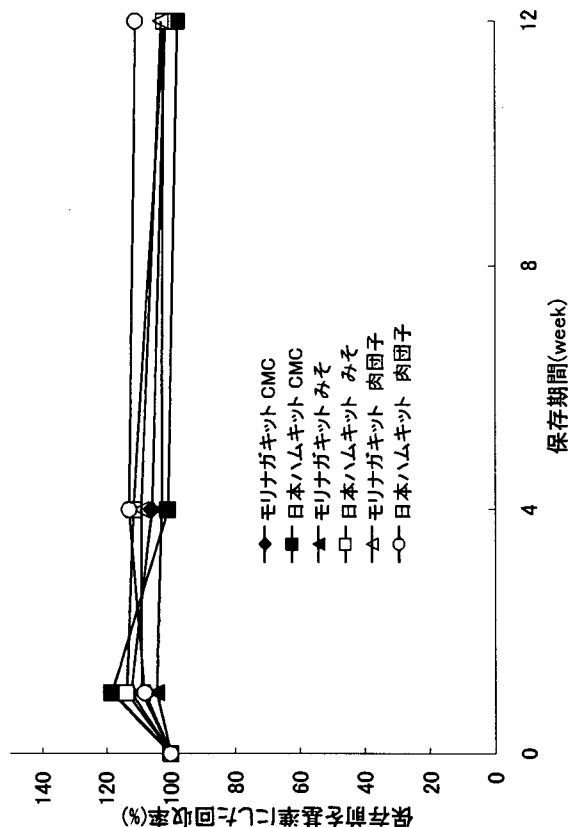


表5 高濃度標準液(そば用)(オリエンタル酵母株)添加食材のそばタンパク質の測定

食材 ^a	そばタンパク質 モリナガFASPEKそば測定キット				FASTKITエライザVer. II そば		
	添加量 ^b ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	回収率 (%)	RSD (%)
食材なし (高濃度標準液のみ)	0	0.00	-	-	0.00	-	-
	6.92	5.42	78.3	0.3	6.73	97.3	1.5
クッキー1	0	0.00	-	-	0.00	-	-
	6.92	5.83	84.2	1.5	7.60	109.8	4.2
クッキー2	0	0.00	-	-	0.00	-	-
	6.92	6.18	89.3	0.9	7.91	114.3	2.7
せんべい	0	1.72	-	-	0.00	-	-
	6.92	7.89	114.0	0.5	9.86	142.5	2.4
ラーメン	0	0.00	-	-	0.00	-	-
	6.92	5.73	82.8	1.6	6.49	93.8	1.3
おかゆ	0	5.42	-	-	0.00	-	-
	6.92	5.40	78.0	2.3	6.88	99.4	0.5

添加量 6.92は 2測定の平均、添加量 0 は 1測定

a 食材はそれぞれ 1g を分取

b 高濃度標準液(そば用)(オリエンタル酵母株)の表示量から計算

表6 そば高濃度標準液のタンパク質濃度

測定法	2-D Quant Kit		モリナガFASPEKそば測定キット		FASTKITエライザVer. II そば	
	測定値(A) ($\mu\text{g/mL}$)		測定値(B) ($\mu\text{g/mL}$)	回収率 ^b (%)	測定値(C) ($\mu\text{g/mL}$)	回収率 ^c (%)
高濃度標準液(そば用) (オリエンタル酵母)	173 ^d		136	78.3	168	97.3
自家製そば高濃度標準液 ^a	165 ^e		135	81.1	195	118.4

a 自家製そば一次標準粉末 1g に 0.5% SDS、2% Mercaptoethanol および 0.5M 塩化ナトリウムを含む 20mM Tris-HCl (pH7.5) 20mL を加え、一晩振とうして抽出後、通知に従って 20 倍希釈して調製

b $B/A \times 100$

c $C/A \times 100$

d 表示値(オリエンタル酵母株での測定値)

e 2-D Quant Kit によるそば標準品原液の測定値から計算

表7 自家製そば高濃度標準液の添加回収および安定性試験

測定キット	タンパク質			保存前			-20°C1週間保存後			-20°C4週間保存後			-20°C12週間保存後				
	添加食材 ^a (μg/tube)	添加量 ^b (μg/tube)	測定値 (μg/tube)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 (μg/tube)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 (μg/tube)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 (μg/tube)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 (μg/tube)	回収率 (%)	RSD (%)
モリナガFASPEK そば測定キット	クッキー2	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
	ラーメン	6.58	5.96	90.6	2.0	5.73	87.1	1.4	5.86	89.1	2.1	5.46	83.0	2.4	5.46	83.0	2.4
FASTKITエライザ Ver. II そば	クッキー2	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
	ラーメン	6.58	6.96	105.8	5.1	8.29	126.0	1.1	7.82	118.8	2.7	9.10	138.3	0.8	9.10	138.3	0.8

添加量 6.58は3測定の平均、添加量 0 は 1測定

a 食材はそれぞれ1gを分取

b 2-D Quant Kitによるそば標準品原液の測定値から計算

表8 自家製そば一次標準粉末添加試料の添加回収および安定性試験

測定キット	試料	タンパク質			保存前			-20°C 1週間保存後 ^a			-20°C 4週間保存後 ^b			-20°C 12週間保存後 ^c			
		添加量 ^a ($\mu\text{g/g}$)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	RSD (%)
モリナガ FASPEKそば測 定キット	CMC	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	懸濁液	5	5.55	111.0	7.2	5.40	108.0	1.6	5.40	108.0	2.3	5.44	108.8	2.1	5.44	108.8	2.1
		8	9.25	115.6	4.4	8.81	110.1	1.4	8.48	106.0	1.6	9.18	114.8	0.4	9.18	114.8	0.4
FASTKITエライ ザVer. II そば	CMC	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	懸濁液	5	6.37	127.4	9.7	6.71	134.1	0.3	7.17	143.4	6.9	8.46	169.1	6.3	8.46	169.1	6.3
		8	13.23	165.4	2.9	11.50	143.8	4.1	14.61	182.6	3.7	over	over	-	over	over	-
FASTKITエライ ザVer. II そば	CMC	0	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-	0.00	-	-
	懸濁液	5	8.12	162.4	1.7	10.66	213.1	12.9	10.27	205.5	13.7	11.74	234.9	10.7	11.74	234.9	10.7
		8	17.91	223.9	4.4	16.30	203.8	3.5	over	over	-	over	over	-	over	over	-

CMC懸濁液：タンパク質添加量 5および8 $\mu\text{g/g}$ は2測定、添加量0は1測定

あん：タンパク質添加量 5および8 $\mu\text{g/g}$ は3測定、添加量0は1測定

over：検量線の範囲外

a そば標準品原液の 2-D Quant Kit による測定値から推定

b タンパク質添加量 5 $\mu\text{g/g}$ は保存3週間後

c タンパク質添加量 5 $\mu\text{g/g}$ は保存11週間後