

食品衛生検査指針中にはビブリオ属菌の TCBS 寒天培地を用いた定量検査が記載されていることから、上記 2 菌種を用いた Marine broth 中での菌数変動を検討した。すなわち、試験菌を $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL で Marine broth に接種した後、冷蔵または 22.5°C で 28 日間保存し、接種後 3、7、14、21 および 28 日目に菌数測定を実施した。その結果、*V. parahaemolyticus* では冷蔵保存の 28 日目において、*V. fluvialis* では冷蔵保存の 14 日目以降において接種菌が死滅する傾向が認められた(図 5、6)。一方、 22.5°C で保存したものは 3 日目において $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL まで菌数が上昇した後、その菌数を保存 28 日目まで維持する傾向が認められた。さらに、 22.5°C での保存時において、選択培地である TCBS 寒天培地を用いたときの菌数が Marine agar における算出菌数と同等であるのかについて確認した。その結果、Marine agar で測定した場合には 28 日目まで安定的に接種菌を回収することができたが、選択培地である TCBS 寒天培地の 5 種全てで Marine agar と比較すると 1 オーダー以上低い菌数が得られた(図 7、8)。

D. 考察

外部精度管理調査にセレウス菌およびビブリオ属菌検査に関する調査試料を導入することを目標とし、予備検討を行った。昨年度のセレウス菌検査用試料の作製において、米を用いた基材を開発することができなかつたため、これまでに実績のあるマッシュポテトを用いてセレウス菌の安定性を確保することができた。しかし、外部精度管理試料は通常の検査品と類似の形状が参加機関からも求められていることから、マッシュポテト以外の基材、特に白米等を用いた基材の開発が望まれた。そこで、本

年度は市販の白米を用いて基材としての有効性の確認、ならびにセレウス菌を接種したときの均一性および安定性を確認することを目的とした。なお、セレウス菌検査では定性検査のみならず定量検査も実施するため、菌数変動についても外部精度管理試料として耐えうるか確認した。その結果、市販白米をオートクレーブ処理した後、吸水させることにより作製した米飯が基材として有用であり、接種したセレウス菌も冷蔵保存することにより、比較的安定的に 28 日間まで回収できることが明らかとなった。また、基材調製時に 15%NaCl 溶液を用いることにより、保存温度の変化にも強い試料を作製することができた。外部精度管理調査試料は 1 ヶ所で作製されてから各検査機関に配布されて検査が実施されるが、少なくとも 2~3 日程度の輸送期間が見込まれることを考慮すると、温度変化に強い検体は輸送時における環境変化により菌数の変動が少ないことを示しており、このことは安定的な調査結果を得るためにも重要であると考えられる。一方、定性検査を指標とした場合、陽性対照菌として使用した 2 菌種はいずれの選択培地においても陽性集落を認めたものの、陰性対照菌として使用した *B. subtilis* は使用する選択培地により全く集落形成を認めないことがあった。外部精度管理調査を行ううえで添加菌をどのように設定するかは非常に難しい問題である。しかし、セレウス菌検査における陰性対照菌は少なくとも MYP 培地および PEMBA 培地において非典型集落を認めることから、菌数としては少なくとも確保できていると言える。そのため、NGKG 培地において集落が形成されなくとも、標準寒天培地等を用いた菌数測定や塗抹培養を行うことにより実際に試料中に対象菌が存在していることは確認できることから、現状としては採用

することが可能であると考えられた。

また今回新たにビブリオ属菌検査用調査試料の開発を目的としたビブリオ属菌の長期保存法の検討を行った。ビブリオ属菌は不安定であるため長期間の冷凍以外の方法での保管が難しい。そこで標準菌株の培養に用いられる Marine agar および Marine broth を用いて冷蔵および 22.5°Cでの保存の可否について検討したところ、138 日間までビブリオ属菌の生存が確認された。このことから、将来的な基材への接種を踏まえて Marine broth 中に 10^3 cfu/mL 程度の菌数を接種した際の冷蔵および 22.5°Cでの保存について確認した。その結果、冷蔵保存では 28 日目にはほとんど死滅してしまい、安定的に接種菌を回収できなかった。これに対して、22.5°Cで保存した場合には、3 日目に 10^8 cfu/mL 程度まで上昇し、その後安定した菌数が回収された。以上のことから、現状においてビブリオ属菌を長期間に亘って冷蔵保存することは難しいものと考えられた。そのため、以後の検討は 22.5°Cでの安定性について確認することとした。さらに Marine agar と TCBS 寒天培地を用いて菌数測定を実施した際の相違について比較した。その結果、Marine agar で菌数測定を実施した場合には、経時的に安定した菌数が回収されたが、TCBS 寒天培地を用いた菌数測定を実施したところ、Marine agar で計測された菌数と比較して1オーダー以上の相違が認められた。このことは、食品衛生検査指針に記載されているTCBS 寒天培地を用いた定量検査を実施した場合に、検査結果に大きな相違を生じる可能性を示唆している。また、TCBS 寒天培地の製造メーカーによっても回収率は大きく異なっていた。しかし、これらの原因を明らかにするには至らなかった。さらに、TCBS 寒天培地を使

用した場合には使用する菌種により菌数は大きく変動したことを考慮すると、現状ではビブリオ属菌検査用試料を開発できても定量検査を実施することは難しいものと判断された。

E. 結論

外部精度管理調査試料として新規項目を導入することを目的として、セレウス菌検査を対象とした調査試料の作製を行うための予備検討を実施した。

B. cereus HIC080117、*B. cereus* HIC090147 および *B. subtilis* HIC080138 を用いて市販の白米を用いて作製した米飯試料に添加した後の均一性と安定性について検討した。その結果、冷蔵保存することによって 28 日目までの安定性を確保することができた。また、n=5 で同様に安定性確認を行ったが、測定日ごとにばらつきが大きく変化することはなかった。さらに、各測定日において定性検査を実施したところ、陽性対照菌である *B. cereus* では使用した全ての選択培地上で典型集落の形成を認めたが、陰性対照菌である *B. subtilis* では NGKG 寒天培地において集落形成が認められなかった。さらに、28 日間の冷蔵保存後に 22.5°Cで 24 時間保存することにより、15%NaCl 溶液で調製した白飯基材は、セレウス菌の菌数変動がほとんどなかった。以上のことから、市販の白飯を基材として採用したセレウス菌検査用試料は今後の外部精度管理調査を実施するうえで有用な基材であるものと考えられた。

また、新規項目としてビブリオ属菌検査に対応する基材を開発するための予備検討を行った。一般にビブリオ属菌は不安定であり、長期保存することが難しい。そのため、Marine agar および Marine broth を用いたときの冷蔵およ

び 22.5℃保存下でのビブリオ属菌の生存の可否について検討した。その結果、138 日目まで生存が確認された。そのため、今後の基材への菌液接種の方法を考慮し、Marine broth 中のビブリオ属菌の菌数変動について検討したところ、 10^3 cfu/mL でビブリオ属菌を接種することにより冷蔵保存では長くとも 28 日目までにほぼ死滅することが明らかとなった。これにたいして、22.5℃で保存することにより、保存開始 3 日目に 10^8 cfu/mL 程度まで上昇し、その後安定化する傾向が認められた。また、通常の定性検査および定量検査で使用する TCBS 寒天培地を用いて菌数測定を行ったところ、Marine agar での測定結果と比較して少なくとも 1 オーダー以上の相違が認められた。この事実は、現状において基材開発を進めても、ビブリオ属菌検査を行う際には定量検査を実施することができない可能性が高いことを示唆している。さらに、この菌数測定結果は TCBS 寒天培地の製造メーカーによっても異なるものであった。しかし、ある程度の菌数が確

保されていれば定性検査については実施できる可能性を示すものであると考えられる。

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

表1 オートクレーブ処理後の白米中への溶液添加時の吸水時間

| 添加溶液 | 吸水時間 |
|-------------------------|------------------|
| 生理食塩液 | 30分程度 |
| 生理食塩液+MnSO ₄ | 30分程度 |
| 生理食塩液+グリセリン | 1時間後においても全ては吸水せず |
| 15%NaCl溶液 | 1時間程度 |

表2 米飯基材の7日間冷蔵保存後の性状

| 添加溶液 | 性状 |
|-------------------------|-------------------|
| 生理食塩液 | 通常の米飯よりも若干水分量が少ない |
| 生理食塩液+MnSO ₄ | 通常の米飯よりも若干水分量が少ない |
| 生理食塩液+グリセリン | 乾燥して固い部分あり |
| 15%NaCl溶液 | 通常の米飯に近い |

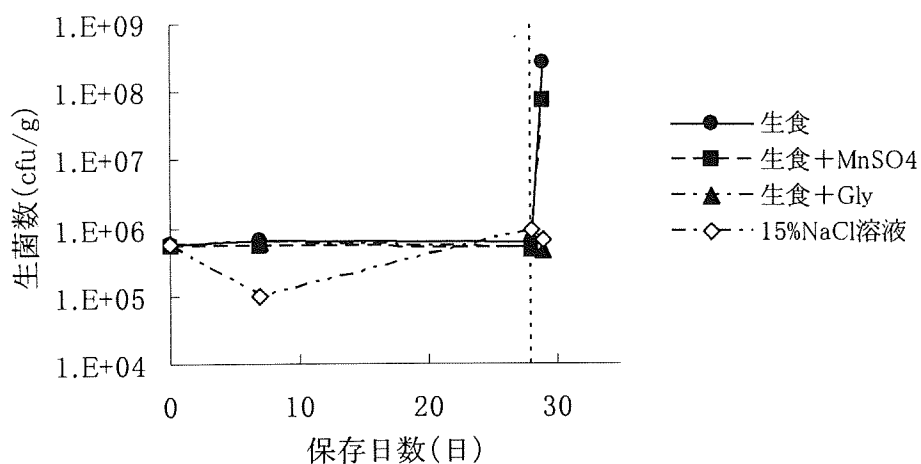


図1 米飯基材に接種した *B. cereus* の安定性確認試験

28日目までは冷蔵保存し、その後 22.5°C で 24 時間保存した。

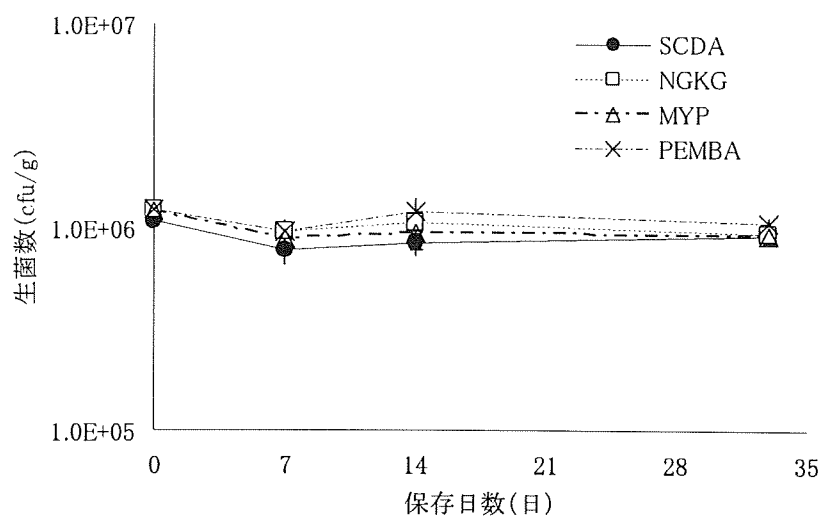


図2 米飯基材中における *B. cereus* HIC 080117 の均一性および安定性確認試験
 菌数測定には SCD 寒天培地、NGKG 培地、MYP 培地、PEMBA 培地を使用した。
 各測定日に試料 5 本を用いて n=2 でそれぞれ測定した。

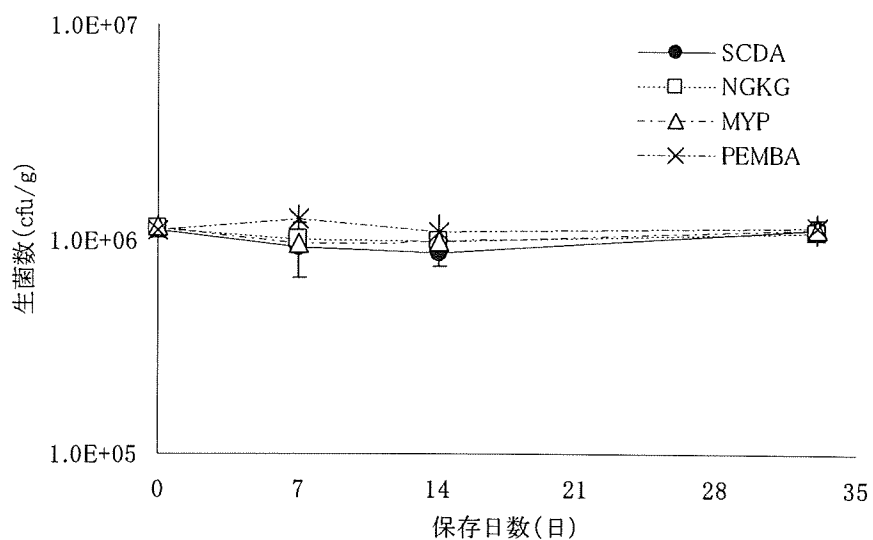


図3 米飯基材中における *B. cereus* HIC 090147 の均一性および安定性確認試験
 菌数測定には SCD 寒天培地、NGKG 培地、MYP 培地、PEMBA 培地を使用した。
 各測定日に試料 5 本を用いて n=2 でそれぞれ測定した。

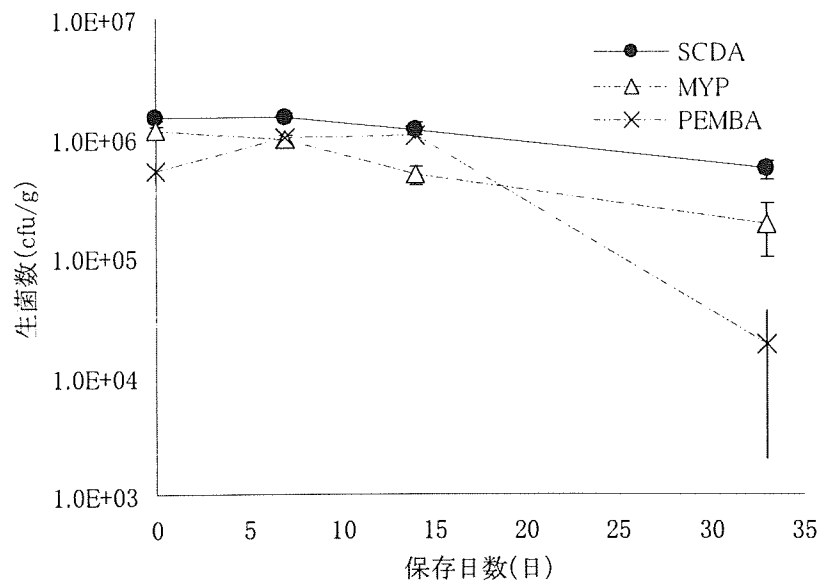


図4 米飯基材中における *B. subtilis* HIC 080138 の均一性および安定性確認試験
 NGKG 培地上に集落は形成されなかった。
 菌数測定には SCD 寒天培地、MYP 培地、PEMBA 培地を使用した。
 各測定日に試料 5 本を用いて n=2 でそれぞれ測定した。

表 3 米飯基材から回収したセレウス菌検査用供試菌の定性検査

| <i>B. cereus</i> HIC080117 | | | |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 保存日数 | 選択培地 | | |
| | NGKG | MYP | PEMBA |
| 0 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| 7 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| 14 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| 33 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| <i>B. cereus</i> HIC090147 | | | |
| 保存日数 | 選択培地 | | |
| | NGKG | MYP | PEMBA |
| 0 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| 7 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| 14 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| 33 | 5/5 | 5/5 | 5/5 |
| <i>B. subtilis</i> HIC080138 | | | |
| 保存日数 | 選択培地 | | |
| | NGKG | MYP | PEMBA |
| 0 | 0/5 ^{*1} | 0/5 ^{*2} | 0/5 ^{*2} |
| 7 | 0/5 ^{*1} | 0/5 ^{*2} | 0/5 ^{*2} |
| 14 | 0/5 ^{*1} | 0/5 ^{*2} | 0/5 ^{*2} |
| 33 | 0/5 ^{*1} | 0/5 ^{*2} | 0/5 ^{*2} |

表中の数値は 5 本中の陽性反応を示した試料数を示す。

※1: 集落形成を認めない、※2: 非典型集落を認める

表4 ビブリオ属菌検査に使用した供試菌の選択培地上での反応性

| | <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>V. vulnificus</i> | <i>V. haliotocoli</i> | <i>V. fluvialis</i> |
|-----------|----------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| 酵素基質培地 | | | | |
| ① | + / 青 | - | - | + / 白 |
| ② | + / 桃 | - | - | + / 桃 |
| ③ | + / 赤 | + / 赤 | - | + / 青 |
| TCBS 寒天培地 | | | | |
| ① | + / 緑 | + / 緑 | - | + / 黄 |
| ② | + / 緑 | + / 緑 | - | + / 黄 |
| ③ | + / 緑 | - | - | + / 黄 |
| ④ | + / 緑 | - | - | + / 黄 |
| ⑤ | + / 緑 | - | - | + / 黄 |

+ : 増殖あり、- : 増殖なし
色はコロニーの色調を示す

表5 ビブリオ属菌の 22.5℃または冷蔵保存時の生存の可否

| 保存日数 | <i>V. parahaemolyticus</i> | | | | | | <i>V. fluvialis</i> | | | | | | |
|------|----------------------------|---|---|---|---|---|---------------------|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 29 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 138 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |

1: Marine agar に接種し冷蔵保存、2: Marine broth に接種し冷蔵保存、
3: Marine broth+0.3%Agar に接種し冷蔵保存、4: Marine agar に接種し 22.5℃保存、
5: Marine broth に接種し 22.5℃保存、6: Marine broth+0.3%Agar に接種し 22.5℃保存

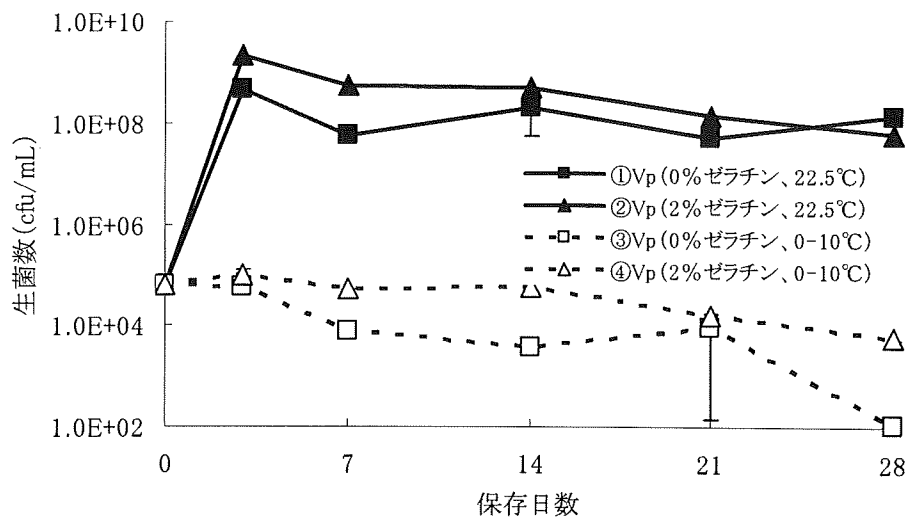


図5 *V. parahaemolyticus* の冷蔵および 22.5°C 保存時の安定性確認試験

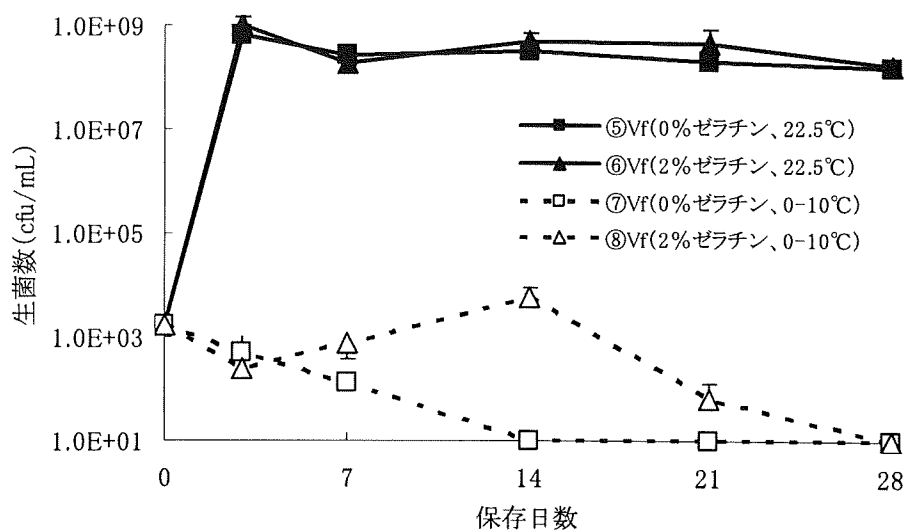


図6 *V. fluvialis* の冷蔵および 22.5°C 保存時の安定性確認試験

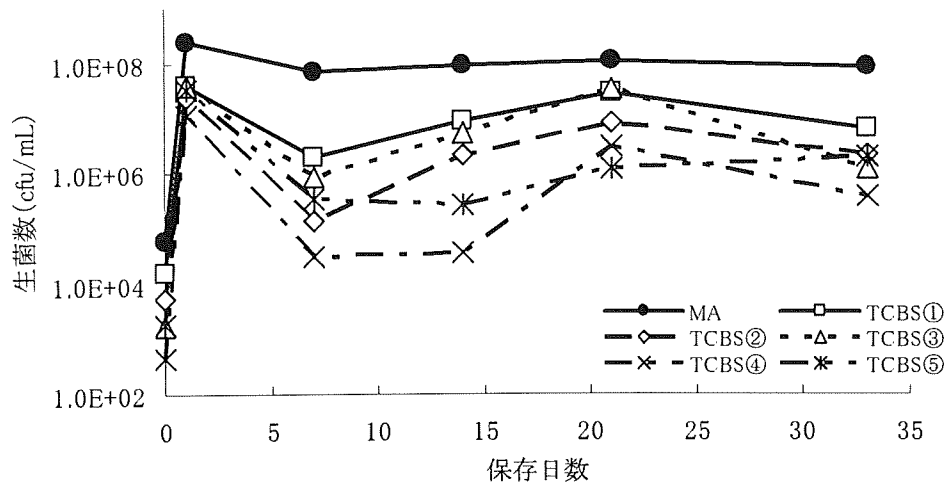


図7 *V. parahaemolyticus*の高濃度接種時の22.5°Cでの安定性確認試験
菌数測定は Marine agar または TCBS 寒天培地により行った。

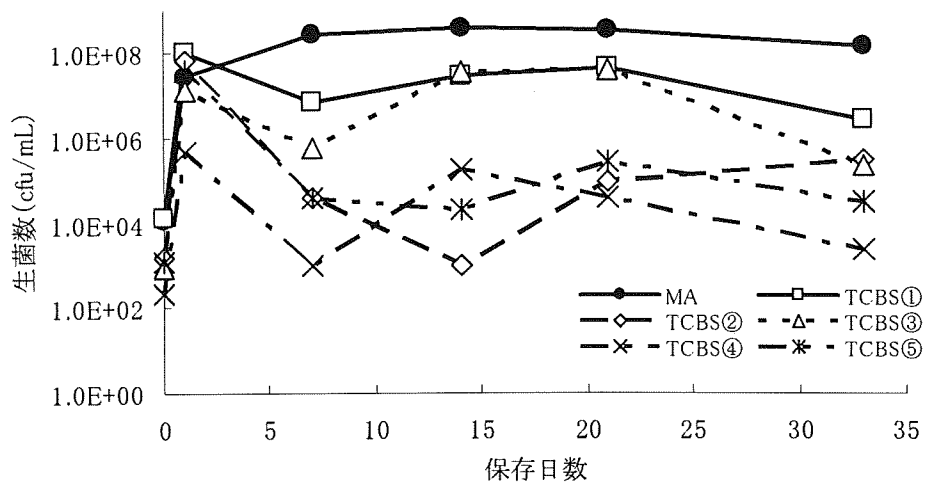


図8 *V. fluvialis*の高濃度接種時の22.5°Cでの安定性確認試験
菌数測定は Marine agar または TCBS 寒天培地により行った。

平成 21 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 小島 幸一 (財)食品薬品安全センター 所長
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 副所長
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
 小熊 恭代 (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、えび、かに）については食品への表示が義務付けられており、検査法が厚生労働省から通知されている。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必要と考えられ、実施に向けて調査試料の作製が課題となっている。本年度は昨年度に外部精度管理を想定した規模での試料調製を検討済みの卵添加試料を用いて外部精度管理の模擬試験を実施し、試料の調製から報告書のとりまとめに至る手順について確認するとともに、協力参加機関の測定結果を解析した。すなわち、調製した試料の均一性および試験期間内の安定性の確認、プロトコルの作成、協力参加機関への試料の配布、報告書の回収および Xbar-R 管理図の作成を行い、いずれも実行可能であることを確認した。測定結果の解析からは、測定操作に習熟した機関でも操作を誤った可能性があることや、使用機器により定量値が変動することが明らかになり、外部精度管理が特定原材料検査の精度の向上に寄与できる可能性が改めて示された。

配布量を想定して作製した牛乳試料では、一元配置による分散分析により均一性が確認できたほか、16 週間保存後の試料について実施した安定性試験の結果も良好であった。しかし、ウェスタンブロットによる確認試験では一部の試料で結果の判定を誤る可能性のあるデータが得られ、検討の継続が必要となった。

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

への表示が推奨された。そのうち卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目は特定原材料と指定され、食品への表示が義務付けられた。さらに平成 20 年 6 月には 2 年の猶予期

間を持って、えび、かにが追加された。これらの特定原材料はいずれも検査法が通知されているため、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を実施することが望ましいと考えられる。

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)、平成18年6月(食安発第0622003号)、平成21年1月(食安発第0122001号)および平成21年7月(食安発第0724第1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、平成18年6月には検査方法を評価するためのガイドラインが新たに記載された。その後の改正では、えび・かにの標準品規格が加わったほか、バリデーション済みの検査キットが順次追加されている。

昨年までにえび・かにを除く特定原材料5種について精度管理試料の調製を検討し、落花生については問題が残っているものの、卵、牛乳、小麦、そばについてはELISA法による定量およびウエスタンブロット法またはPCR法による確認試験の双方に対応可能な試料が試作できている。さらに卵については実際の配布を想定したスケールに調製量を拡大し、均一性および安定性を確認した。

この結果を踏まえ、本年度は卵試料を用いて外部精度管理調査の模擬試験(以下共同試験とする)を行うこととした。さらに来年度の配布を想定して、牛乳添加試料の調製量を拡大し、調製試料について均一性

および安定性の確認を行った。

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。すなわち卵タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 卵測定キット(株)森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 卵(日本ハム(株))、牛乳タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 牛乳測定キット(株)森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳(日本ハム(株))を使用し、各々のキットの取り扱い説明書に従って操作した。なお、吸光度測定にはマイクロプレートリーダー(EL 808IV、Bio-Tek Instruments, Inc.)を使用し、内蔵の検量線ソフトウェアのうち4パラメーター解析を使用して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. ウエスタンブロットによる確認試験

電気泳動はゲルにQ-PAGE mini(テフコ(株))、泳動用緩衝液にTris-BESバッファー、電気泳動槽にSTC-808(テフコ(株))を使用して行った。ブロッティングは転写膜にHybond-P(GEヘルスケアバイオサイエンス(株))を使用し、トランスブロットSDセル(BIO-RAD)を用いて実施した。免疫染色には牛乳ウエスタンブロットキット(カゼイン)、牛乳ウエスタンブロットキット(β -ラクトグロブリン)(以上(株)森永生科学研究所)、VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit、Alkaline Phosphatase Substrate kit IV(以上VECTOR)を使用し、ウエスタンブロットキットの取り扱い説明書に従って操作した。

3. 添加に使用した特定原材料

卵は神奈川県内の食品店で購入した全卵を水で希釈して使用した。牛乳はスキムミルク粉末（生化学用、和光純薬）を水に溶解し、 $0.8\mu\text{m}$ のフィルターでろ過したものを使用した。全卵およびスキムミルクのタンパク質含量は2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス^(株))を使用し、キットの取り扱い説明書に従って測定した。

4. 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または野菜ペースト（^(株)新進）を使用した。

5. 精度管理試料の調製

4. の添加用基材に3. の特定原材料を直接加え、BLIXER-5Plus（^(株)エフ・エム・アイ）で均質化して作製、またはあらかじめ1gずつ秤取した食材に3. の特定原材料を一定量ずつ分注のいずれかの方法で作製した。作製した試料は -20°C で保存した。

また、各試料について10容器から $n=2$ でサンプリングして測定した特定原材料タンパク質含量を用いて一元配置による分散分析を実施し、均一性を検討した。

6. 共同試験の実施

平成21年6月1日に5. で作製した試料のうち卵を測定対象とした試料8種類を試験方法および報告書様式に関する文書と共にクール宅急便（冷凍）で、さらにモリナガ FASPEK 卵 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 各1キットをクール宅急便（冷蔵）で、共同試験協力参加機関に送付した。なお、測定期間は6月30日までの1ヶ月間、報告書の回収期限は7月10日とした。

参加機関から回収した報告書は、測定値

について統計解析システム JUSE-QCAS（^(株)日本科学技術研修所）により Xbar-R 管理図を作成して解析したほか、アンケート結果についてもとりまとめ、検討を加えた。

なお、今回の共同試験への協力参加機関は、神奈川県衛生研究所、千葉県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、広島県保健環境センター、川崎市衛生研究所、横浜市衛生研究所、財団法人日本食品分析センター、財団法人食品環境検査協会、財団法人日本冷凍食品検査協会、株式会社ファスマックの計10機関である。

（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. 共同試験試料の均一性および安定性

共同試験試料について配布前に、添加した卵の回収率の確認を兼ねて均一性試験を実施した。その結果、卵を添加した試料（試料2、試料3、試料5、試料6、試料7）についてはいずれも一元配置による分散分析で均一と判定された（表1）。また、回収率も通知（食安発第食安発第0724第1号）の定量検査法の評価基準に示された回収率50%~150%の範囲内であった。さらに共同試験の測定期間終了後に安定性試験を実施したが、配布前に測定した均一性試験の測定値の87.3~111.8%の範囲であった（表2）。

なお、ブランク試料（試料1、試料4、試料8）の測定では、モリナガ FASPEK 卵 測定キットはいずれの試料でも卵タンパク質は検出されなかった。FASTKIT エライ

ザ Ver. II 卵 では試料 1 および試料 4 ではキットの検出下限 ($0.313 \mu\text{g/g}$) 以下であったが、試料 8 (クッキー) では $0.66 \mu\text{g/g}$ と検出下限を上回る卵タンパク質が検出された。このクッキーには製造工場での卵を使用している旨の表示があり、製造過程で卵の混入があったものと考えられた。

3. 試料送付

協力参加機関への共同試験試料およびキットの送付に関しては、試料の取り違えや配送に関するトラブルの報告はなかった。また、発送の翌日に全協力参加機関に到着したことをインターネット上で確認した。

4. 共同試験結果

ブランク試料 (試料 1、試料 4、試料 8) の測定結果をまとめて表 3 に示した。試料 8 の FASTKIT エライザ Ver. II 卵による測定では卵タンパク質を検出した機関が多かったが、検出限界以下の測定値として値を報告しない機関もあったため、統計値の算出は行わなかった。卵を添加した試料 (試料 2、試料 3、試料 5、試料 6、試料 7) の報告値の集計結果および Xbar-R 管理図を表 4~8 および図 1~5 にモリナガ FASPEK 卵 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 のそれぞれに分けて示した。試料 2、試料 3 および試料 6 では Xbar 管理図において Xbar が上部管理線 (UCL) および下部管理線 (LCL) の範囲外および z スコアの絶対値が 2 以上となった機関はなかった。一方、試料 5 および試料 7 では FASTKIT エライザ Ver. II 卵 による測定でそれぞれ 1 機関 (同一機関) の Xbar が下部管理線 (LCL) の範囲外および z スコアの絶対値が 2 以上となった。当該機関について、報告書を詳細に検討したところ、

FASTKIT エライザ Ver. II 卵 による測定では標準溶液も含め吸光度が他機関に比べて高いことがわかった。一方、同機関のモリナガ FASPEK 卵 測定キットによる測定では、測定値および吸光度とも問題が認められなかった。両キットの測定に用いた抽出液は同じものなので抽出操作には問題がないものと考えられ、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 による測定の際に抽出液の希釈、キット試薬の希釈、発色時間のいずれかにおいて操作ミスがあったのではないかと推察された。

なお全機関の全試料で、R 管理図において上部管理線 (UCL) を超えた測定値はなく、併行精度は良好であった。

後述するが、共同試験協力参加機関はいずれも特定原材料検査の経験が豊富な機関であった。それにもかかわらず、操作ミスが疑われる事例があったほか、今回の試験を通して計算ソフトウェアの設定ミスに気付いた機関もあり、外部精度管理の実施が特定原材料検査の精度の向上に役立つ可能性が改めて示された。

5. 計算ソフトウェアの測定値に対する影響

当所では過去にマイクロプレートリーダーの機種を変更した際、計算ソフトウェアにより検量線からの読み取り値が変わる現象を確認した。このため、各機関から報告された吸光度の生データを当所で使用しているソフトウェア DeltaSoft JV version 1.80 を用いて再計算し、結果を報告値と並べて表 9 に示した。その結果、計算ソフトウェアによっては報告値と再計算結果に差が認められ、解析に使用するソフトウェアにより定量値が変わることがわかった。表 10 に各機関が使用したマイクロプレート

リーダーおよび計算ソフトウェアを示したが、特定のソフトウェアで再計算値との乖離が特に大きいこともわかった。

6. 共同試験アンケートのまとめ

表 11 に示したように、今回共同試験に協力いただいた 10 機関の特定原材料検査業務の経験年数はいずれも 4 年以上であった。また、ELISA 法による年間の検査件数の総計は、卵、乳が約 1000 件、その他の特定原材料はその半分程度であった。確認試験の実施件数は、ELISA 法の件数と比例しているもののその約 20 分の 1 程度で、全く実施していない機関も 3 機関あった。

以上の事実から、特定原材料検査に関する外部精度管理を計画する場合は、まず ELISA 法による測定を対象とする試験から始めることがよいと考えられた。

7. 牛乳試料作製の検討

牛乳試料は過去に調製量 200g 程度の試作レベルで添加試料を作製し、回収率、安定性等の検討を実施した。しかし、精度管理の実施を想定した場合、配布量および参加機関数にもよるが、さらに多くの試料が必要となる。このため今回は混合用のミキサーとして BLIXER・5Plus を使用して約 2kg のスケールで試料を調製した。添加基材としてはカボチャペーストおよびハンバーグを用い、それぞれにスキムミルクを水で溶解したものを加えて均一になるように混合し、試料を作製した。調製した試料は 10 個に分割し、それぞれから $n=2$ でサンプリングして抽出し、牛乳タンパク質をモニタガ FASPEK 牛乳 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 で測定した。両キットの測定結果についてそれぞれ、一元配置による分散分析を行った結果、カ

ボチャペースト、ハンバーグのいずれも均一と判定された (表 12)。またこの試料を -20°C で 16 週間保存後の測定結果を保存前の測定値と比較した結果を表 13 に示したが、良好な安定性を示した。さらに、保存後の安定性試験の ELISA 抽出液を用いてウエスタンブロットによる確認試験を実施した。図 6 にはカゼイン抗体による検出結果を、図 7 には β -ラクトグロブリン抗体による検出結果を示した。いずれの抗体でも添加試料についてはカゼインまたは β -ラクトグロブリンのバンドが全例で検出できた。しかし、ハンバーグ試料では基材のみでもカゼインと混同しやすい位置にはっきりしたバンドが認められたため、確認試験用の試料についてはさらに検討が必要であると考えられた。以上の結果から、ELISA 法については牛乳においても外部精度管理実施に向けて、均一かつ確認試験にも対応した試料を大量に作製することができたものと考えられた。

E. 結論

1. 共同試験

卵添加試料を用いて外部精度管理調査の模擬試験を実施し、試料の調製から報告値の解析に至る手順について確認した。すなわち、調製した試料の均一性および試験期間内の安定性の確認、プロトコルの作成、試料の配布、報告書の回収および \bar{X} -R 管理図の作成についていずれも実行可能であることを確認した。

協力参加機関の測定値を解析した結果、測定操作に習熟した機関でも操作を誤った可能性があることや、使用する計算ソフトウェアにより定量値が違ってくるのが明

らかになり、外部精度管理が特定原材料検査の精度の向上に寄与できる可能性が示された。

2. 牛乳試料作製の検討

混合用のミキサーとして BLIXER・5Plus を使用し、約 2kg のスケールで牛乳添加試料を調製した。調製試料の ELISA 法による測定値を一元配置による分散分析により解析した結果、いずれの試料も均一と判定された。これらの試料は -20℃で 16 週間保存後の ELISA 法の測定においても安定性を示したが、ウェスタンブロットによる確認試験の試料としては問題が残る試料もあった。

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

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 穠山 浩先生に深謝致します。

表1 共同試験試料の均一性試験結果

| 基材 および 添加量* | モリナガ FASPEK 卵 測定キット | | | | FASTKIT エライザ Ver. II 卵 | | | | | |
|---|-----------------------------------|------------|------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------|------------|-----------------------------------|----|
| | 測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$) | RSD (%) | 回収率 (%) | 二元配置による分散分析 分散比 (<3.02) | 判定 | 測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$) | RSD (%) | 回収率 (%) | 二元配置による分散分析 分散比 (<3.02) | 判定 |
| | | | | | | | | | | |
| 試料1 ハンバーグ 0 $\mu\text{g/g}$ | 0.00 | — | — | — | — | $<0.313^{**}$ | — | — | — | — |
| 試料2 ハンバーグ 14.6 $\mu\text{g/g}$ | 9.66 | 5.0 | 66.1 | 0.35 | 均一 | 9.82 | 3.6 | 67.1 | 0.95 | 均一 |
| 試料3 ハンバーグ 7.4 $\mu\text{g/g}$ | 4.95 | 5.9 | 67.1 | 0.87 | 均一 | 5.34 | 4.8 | 72.3 | 0.89 | 均一 |
| 試料4 カボチャペースト 0 $\mu\text{g/g}$ | 0.00 | — | — | — | — | <0.313 | — | — | — | — |
| 試料5 カボチャペースト 13.4 $\mu\text{g/g}$ | 10.38 | 5.8 | 77.3 | 0.93 | 均一 | 11.16 | 4.4 | 83.1 | 1.26 | 均一 |
| 試料6 カボチャペースト 6.7 $\mu\text{g/g}$ | 4.88 | 8.1 | 72.7 | 0.38 | 均一 | 5.46 | 5.4 | 81.2 | 0.93 | 均一 |
| 試料7 クッキー 10.0 $\mu\text{g/g}$ | 9.26 | 5.2 | 89.6 | 0.39 | 均一 | 8.99 | 4.5 | 89.9 | 0.21 | 均一 |
| 試料8 クッキー 0 $\mu\text{g/g}$ | 0.00 | — | — | — | — | 0.66 | 4.8 | — | — | — |

*: 2-D Quant Kit による測定値

** : FASTKIT エライザ Ver. II 卵 の検出下限

表2 共同試験試料の安定性試験結果

| 基材 および 添加量* | モリナガ FASPEK 卵 測定キット | | | | FASTKIT エライザ Ver. II 卵 | | | |
|---|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------|
| | 配布前(A) | | 終了後(B) | | 配布前(A) | | 終了後(B) | |
| | 測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$) | RSD (%) | 測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$) | RSD (%) | 測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$) | RSD (%) | 測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$) | RSD (%) |
| 試料1 ハンバーグ 0 $\mu\text{g/g}$ | 0.00 | — | 0.00 | — | <0.313** | — | <0.313 | — |
| 試料2 ハンバーグ 14.6 $\mu\text{g/g}$ | 9.66 | 5.0 | 10.60 | 6.3 | 9.82 | 3.6 | 10.98 | 0.8 |
| 試料3 ハンバーグ 7.4 $\mu\text{g/g}$ | 4.95 | 5.9 | 5.29 | 4.0 | 5.34 | 4.8 | 5.54 | 4.3 |
| 試料4 カボチャペースト 0 $\mu\text{g/g}$ | 0.00 | — | 0.00 | — | <0.313 | — | <0.313 | — |
| 試料5 カボチャペースト 13.4 $\mu\text{g/g}$ | 10.38 | 5.8 | 10.41 | 4.1 | 11.16 | 4.4 | 11.42 | 2.1 |
| 試料6 カボチャペースト 6.7 $\mu\text{g/g}$ | 4.88 | 8.1 | 5.26 | 5.4 | 5.46 | 5.4 | 5.30 | 3.3 |
| 試料7 クッキー 10.0 $\mu\text{g/g}$ | 9.26 | 5.2 | 8.08 | 2.1 | 8.99 | 4.5 | 9.33 | 2.3 |
| 試料8 クッキー 0 $\mu\text{g/g}$ | 0.00 | — | 0.00 | — | 0.66 | 4.8 | 0.54 | 3.2 |

*: 2-D Quant Kit による測定値

** : FASTKIT エライザ Ver. II 卵 の検出下限

表3 共同試験測定結果(試料1、試料4、試料8)

モリナガ FASPEK 卵 測定キット

| 機関番号 | 繰り返し数 | 試料1 | | 試料4 | | 試料8 | |
|------|-------|------|------|------|------|------|------|
| | | Xbar | S.D. | Xbar | S.D. | Xbar | S.D. |
| 1 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 2 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 4 | 3 | 0.03 | 0.06 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 5 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 6 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.50 | 0.30 | 0.52 | 0.81 |
| 7 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 8 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 9 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 10 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

FASTKIT エライザ Ver. II 卵

| 機関番号 | 繰り返し数 | 試料1 | | 試料4 | | 試料8 | |
|------|-------|------|------|------|------|------|------|
| | | Xbar | S.D. | Xbar | S.D. | Xbar | S.D. |
| 1 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.18 | 0.01 |
| 2 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.28 | 0.08 |
| 3 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 4 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.14 | 0.02 |
| 5 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.38 | 0.10 |
| 6 | 3 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.28 | 0.06 |
| 7 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.05 |
| 8 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.13 | 0.08 |
| 9 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.27 | 0.02 |
| 10 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

表4 共同試験測定結果(試料2)

モリナガ FASPEK 卵 測定キット

| 機関番号 | 繰り返し数 | Xbar | S.D. | RSD(%) | R | Z |
|------|-------|-------|------|--------|------|-------|
| 8 | 3 | 8.51 | 0.39 | 4.58 | 0.74 | -1.86 |
| 1 | 3 | 9.13 | 0.10 | 1.10 | 0.18 | -1.08 |
| 9 | 3 | 9.39 | 0.17 | 1.81 | 0.33 | -0.75 |
| 6 | 3 | 9.90 | 0.31 | 3.13 | 0.61 | -0.10 |
| 3 | 3 | 10.03 | 0.36 | 3.59 | 0.63 | 0.06 |
| 4 | 3 | 10.14 | 0.27 | 2.66 | 0.52 | 0.20 |
| 10 | 3 | 10.22 | 0.11 | 1.08 | 0.20 | 0.30 |
| 7 | 3 | 10.64 | 0.43 | 4.04 | 0.85 | 0.84 |
| 5 | 3 | 10.77 | 0.13 | 1.21 | 0.25 | 1.00 |
| 2 | 3 | 11.08 | 0.27 | 2.44 | 0.50 | 1.39 |

| | データ数 | 平均値 (CL) | 標準偏差 | RSD(%) | 上部管理 限界(UCL) | 下部管理 限界(LCL) |
|------|------|-------------|------|--------|-----------------|-----------------|
| Xbar | 10 | 9.98 | 0.79 | 7.92 | 11.56 | 8.40 |
| R | 10 | 0.48 | 0.23 | — | 1.24 | — |

FASTKIT エライザ Ver. II 卵

| 機関番号 | 繰り返し数 | Xbar | S.D. | RSD(%) | R | Z |
|------|-------|-------|------|--------|------|-------|
| 8 | 3 | 8.80 | 0.25 | 2.84 | 0.45 | -1.37 |
| 3 | 3 | 8.97 | 0.27 | 3.01 | 0.49 | -1.21 |
| 9 | 3 | 9.05 | 0.53 | 5.86 | 1.06 | -1.14 |
| 10 | 3 | 9.73 | 0.18 | 1.85 | 0.33 | -0.50 |
| 5 | 3 | 10.39 | 0.06 | 0.58 | 0.11 | 0.11 |
| 1 | 3 | 10.68 | 0.22 | 2.06 | 0.43 | 0.38 |
| 6 | 3 | 10.90 | 0.17 | 1.56 | 0.31 | 0.59 |
| 7 | 3 | 10.99 | 0.13 | 1.18 | 0.25 | 0.67 |
| 2 | 3 | 11.37 | 0.18 | 1.58 | 0.35 | 1.03 |
| 4 | 3 | 11.81 | 0.40 | 3.39 | 0.79 | 1.44 |

| | データ数 | 平均値 (CL) | 標準偏差 | RSD(%) | 上部管理 限界(UCL) | 下部管理 限界(LCL) |
|------|------|-------------|------|--------|-----------------|-----------------|
| Xbar | 10 | 10.27 | 1.07 | 10.42 | 12.41 | 8.13 |
| R | 10 | 0.46 | 0.28 | — | 1.18 | — |