

る傾向が認められた。また、メーカーの異なる TCBS 寒天培地および酵素基質培地(3種)を用いて 100 日間保存したこうや豆腐基材について菌数測定を行ったところ、酵素基質培地では Marine agar で測定した菌数と比較してわずかに低い菌数が検出されたが、TCBS 寒天培地ではメーカーにより検出される菌数に大きな相違が得られた。

以上のことから、セレウス菌検査用調査試料では 15%滅菌食塩液を添加することにより添加菌である陽性対照菌および陰性対照菌のいずれも安定した濃度で長期間に亘り 22.5℃で保存できることが明らかとなり、温度変化に非常に強い基材が作製されたものと考えられた。ビブリオ属菌検査用調査試料ではこうや豆腐を用いることにより食材として調査試料を提供できる可能性が示唆された。しかしながら、各検査機関において採用されているであろう保存条件である冷蔵保存では著しい菌数減少が認められたことから、提供方法等についても今

後さらに検討を加える必要があるものと考えられた。

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

表1 *B. cereus* HIC080115添加した米飯基材における定性培地での反応

	定性培地				参考
	NGKG	MYP	PEMBA	コンパクトドライ	SCD寒天培地
10%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.2×10 ⁴)
	(1.6×10 ⁴)	(1.8×10 ⁴)	(1.8×10 ⁴)	(1.0×10 ⁴)	
28日目	+	+	+	+	(1.5×10 ⁴)
	(1.6×10 ⁴)	(1.4×10 ⁴)	(1.8×10 ⁴)	(1.1×10 ⁴)	
12.5%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.1×10 ⁴)
	(1.5×10 ⁴)	(1.1×10 ⁴)	(1.9×10 ⁴)	(7.6×10 ³)	
28日目	+	+	+	+	(1.2×10 ⁴)
	(1.7×10 ⁴)	(1.7×10 ⁴)	(1.3×10 ⁴)	(9.2×10 ³)	
15%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.4×10 ⁴)
	(1.8×10 ⁴)	(1.6×10 ⁴)	(2.0×10 ⁴)	(8.0×10 ³)	
28日目	+	+	+	+	(2.4×10 ⁴)
	(2.2×10 ⁴)	(2.3×10 ⁴)	(2.5×10 ⁴)	(8.1×10 ³)	

※ +: 典型集落を認める。 -: 典型集落でない集落を認めるか、生育が認められない。
測定値を()内に示す(cfu/g)。

表2 *B. cereus* HIC080117添加した米飯基材における定性培地での反応

	定性培地				参考
	NGKG	MYP	PEMBA	コンパクトドライ	SCD寒天培地
10%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.7×10 ⁴)
	(2.1×10 ⁴)	(1.5×10 ⁴)	(1.5×10 ⁴)	(1.2×10 ⁴)	
28日目	+	+	+	+	(1.5×10 ⁴)
	(2.0×10 ⁴)	(1.5×10 ⁴)	(1.6×10 ⁴)	(1.2×10 ⁴)	
12.5%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.6×10 ⁴)
	(2.3×10 ⁴)	(1.5×10 ⁴)	(2.0×10 ⁴)	(1.2×10 ⁴)	
28日目	+	+	+	+	(1.4×10 ⁴)
	(1.7×10 ⁴)	(1.4×10 ⁴)	(1.4×10 ⁴)	(1.3×10 ⁴)	
15%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.5×10 ⁴)
	(2.7×10 ⁴)	(1.6×10 ⁴)	(2.6×10 ⁴)	(1.1×10 ⁴)	
28日目	+	+	+	+	(2.1×10 ⁴)
	(1.9×10 ⁴)	(1.8×10 ⁴)	(2.1×10 ⁴)	(1.2×10 ⁴)	

※ +: 典型集落を認める。 -: 典型集落でない集落を認めるか、生育が認められない。
測定値を()内に示す(cfu/g)。

表3 *B. cereus* HIC 090147添加した米飯基材における定性培地での反応

	定性培地				参考
	NGKG	MYP	PEMBA	コンパクトドライ	SCD寒天培地
10%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(7.4×10 ³)
	(1.3×10 ⁴)	(8.1×10 ³)	(1.2×10 ⁴)	(6.5×10 ³)	
28日目	+	+	+	+	(1.0×10 ⁴)
	(1.4×10 ⁴)	(9.6×10 ³)	(9.5×10 ³)	(6.1×10 ³)	
12.5%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(8.2×10 ³)
	(1.1×10 ⁴)	(1.2×10 ⁴)	(1.1×10 ⁴)	(5.4×10 ³)	
28日目	+	+	+	+	(9.1×10 ³)
	(1.1×10 ⁴)	(1.0×10 ⁴)	(8.6×10 ³)	(7.1×10 ³)	
15%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(9.8×10 ³)
	(1.4×10 ⁴)	(1.3×10 ⁴)	(1.5×10 ⁴)	(4.5×10 ³)	
28日目	+	+	+	+	(1.4×10 ⁴)
	(1.3×10 ⁴)	(1.5×10 ⁴)	(2.0×10 ⁴)	(7.7×10 ³)	

※ +: 典型集落を認める。 -: 典型集落でない集落を認めるか、生育が認められない。
測定値を()内に示す(cfu/g)。

表4 *B. cereus* HIC 100172添加した米飯基材における定性培地での反応

	定性培地				参考
	NGKG	MYP	PEMBA	コンパクトドライ	SCD寒天培地
10%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.4×10 ⁴)
	(1.8×10 ⁴)	(1.2×10 ⁴)	(1.5×10 ⁴)	(8.1×10 ³)	
28日目	+	+	+	+	(1.4×10 ⁴)
	(1.8×10 ⁴)	(1.4×10 ⁴)	(1.6×10 ⁴)	(1.3×10 ⁴)	
12.5%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.0×10 ⁴)
	(1.8×10 ⁴)	(1.3×10 ⁴)	(1.7×10 ⁴)	(1.1×10 ⁴)	
28日目	+	+	+	+	(8.3×10 ³)
	(1.8×10 ⁴)	(1.3×10 ⁴)	(1.8×10 ⁴)	(1.2×10 ⁴)	
15%調製溶液					
0日目	+	+	+	+	(1.7×10 ⁴)
	(1.8×10 ⁴)	(1.9×10 ⁴)	(1.9×10 ⁴)	(7.7×10 ³)	
28日目	+	+	+	+	(2.0×10 ⁴)
	(2.3×10 ⁴)	(1.7×10 ⁴)	(2.1×10 ⁴)	(9.2×10 ³)	

※ +: 典型集落を認める。 -: 典型集落でない集落を認めるか、生育が認められない。
測定値を()内に示す(cfu/g)。

表5 *B. subtilis* HIC080138添加した米飯基材における定性培地での反応

	定性培地				参考
	NGKG	MYP	PEMBA	コンパクトドライ	SCD寒天培地
10%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- (1.8×10^4)	- (5.0×10^2)	- ($<10^2$)	(2.5×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- (1.9×10^8)	- (3.2×10^7)	- ($<10^2$)	(3.1×10^8)
12.5%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- (1.5×10^4)	- (5.0×10^2)	- ($<10^2$)	(2.1×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- (1.4×10^4)	- (1.5×10^4)	- ($<10^2$)	(1.0×10^7)
15%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- (5.7×10^4)	- (7.0×10^2)	- ($<10^2$)	(3.6×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- (4.5×10^4)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(1.4×10^6)

※ +: 典型集落を認める。 -: 典型集落でない集落を認めるか、生育が認められない。
測定値を()内に示す(cfu/g)。

表6 *B. subtilis* HIC100165添加した米飯基材における定性培地での反応

	定性培地				参考
	NGKG	MYP	PEMBA	コンパクトドライ	SCD寒天培地
10%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- (7.6×10^3)	- (3.0×10^2)	- ($<10^2$)	(1.7×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- (1.4×10^8)	- (7.4×10^7)	- ($<10^2$)	(2.0×10^8)
12.5%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- (6.6×10^3)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(2.0×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- (9.1×10^5)	- (3.0×10^4)	- ($<10^2$)	(4.9×10^7)
15%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- (5.6×10^3)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(1.6×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- (6.6×10^3)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(1.8×10^4)

※ +: 典型集落を認める。 -: 典型集落でない集落を認めるか、生育が認められない。
測定値を()内に示す(cfu/g)。

表7 *B. megaterium* HIC080136添加した米飯試料における定性培地での反応

	定性培地				参考
	NGKG	MYP	PEMBA	コンパクトドライ	SCD寒天培地
10%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(1.4×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(1.9×10^5)
12.5%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(1.4×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(6.2×10^6)
15%調製溶液					
0日目	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(1.4×10^4)
28日目	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	- ($<10^2$)	(6.5×10^4)

※ +: 典型集落を認める。 -: 典型集落でない集落を認めるか、生育が認められない。
測定値を()内に示す(cfu/g)。

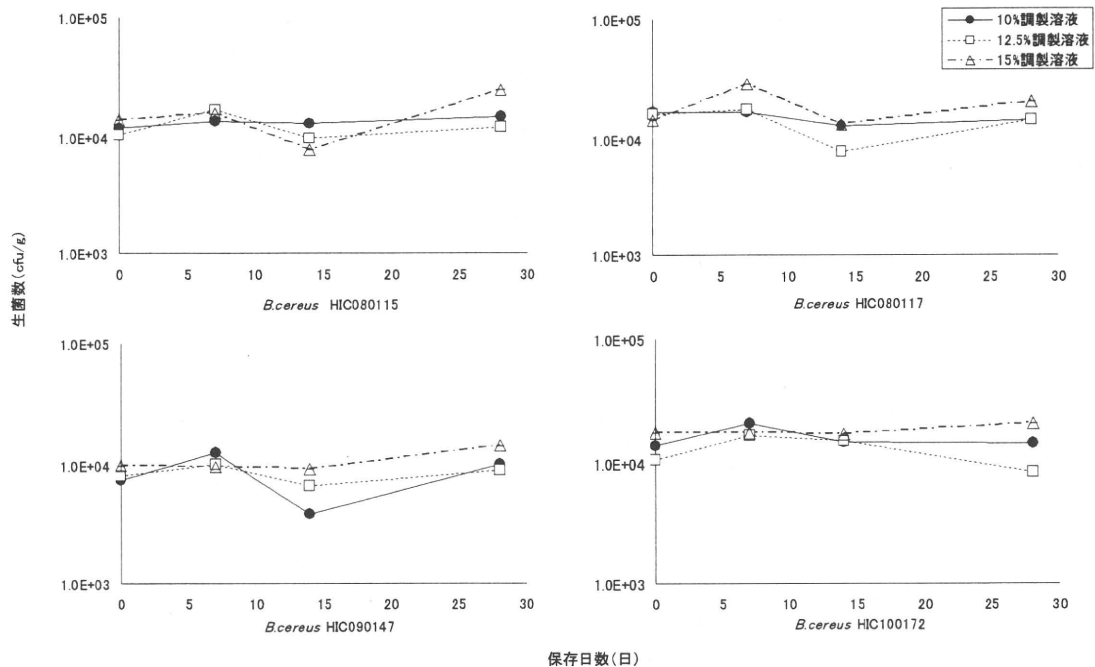


図1 *B. cereus* 添加した米飯基材における添加菌の安定性に及ぼす食塩濃度の影響

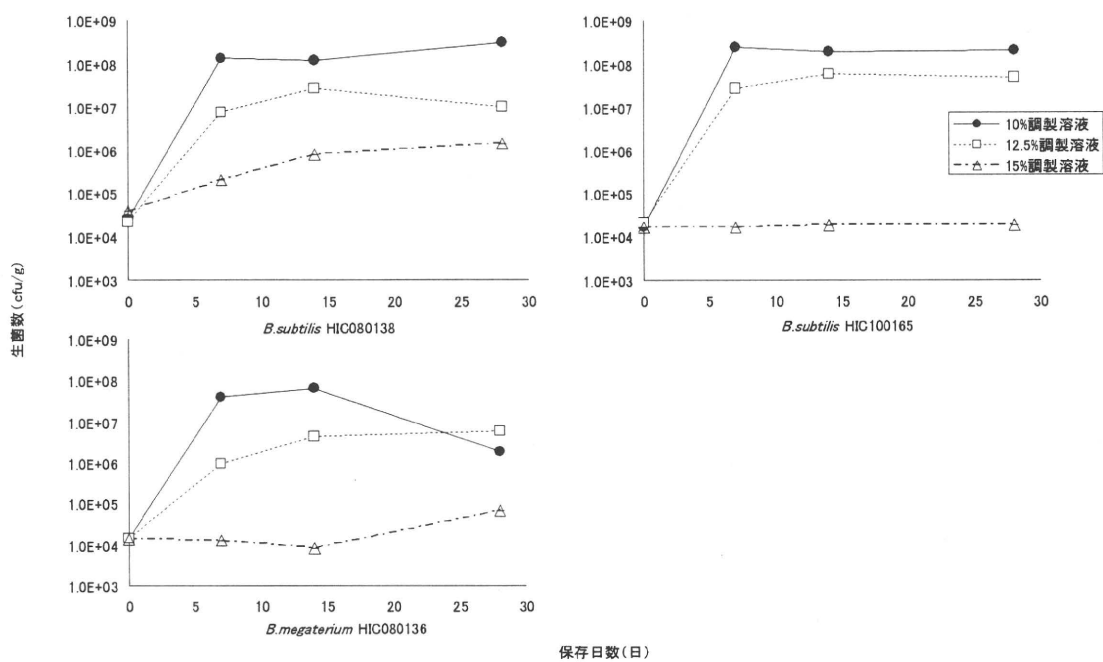


図2 *B. subtilis* または *B. megaterium* 添加した米飯基材における添加菌の安定性に及ぼす食塩濃度の影響

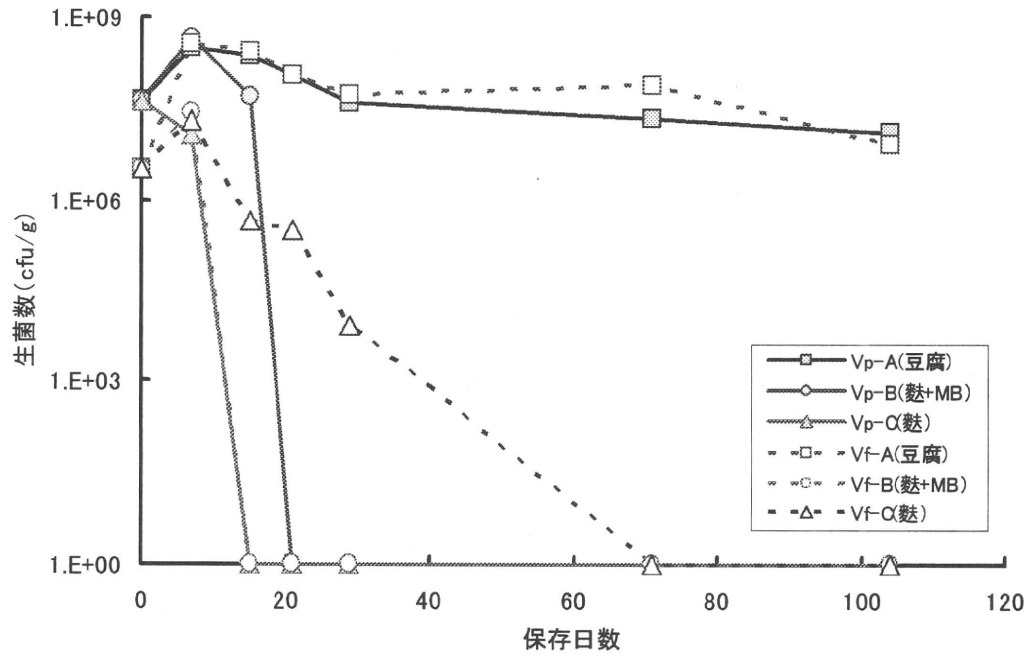


図3 こうや豆腐または麩に接種したビブリオ属菌の安定性

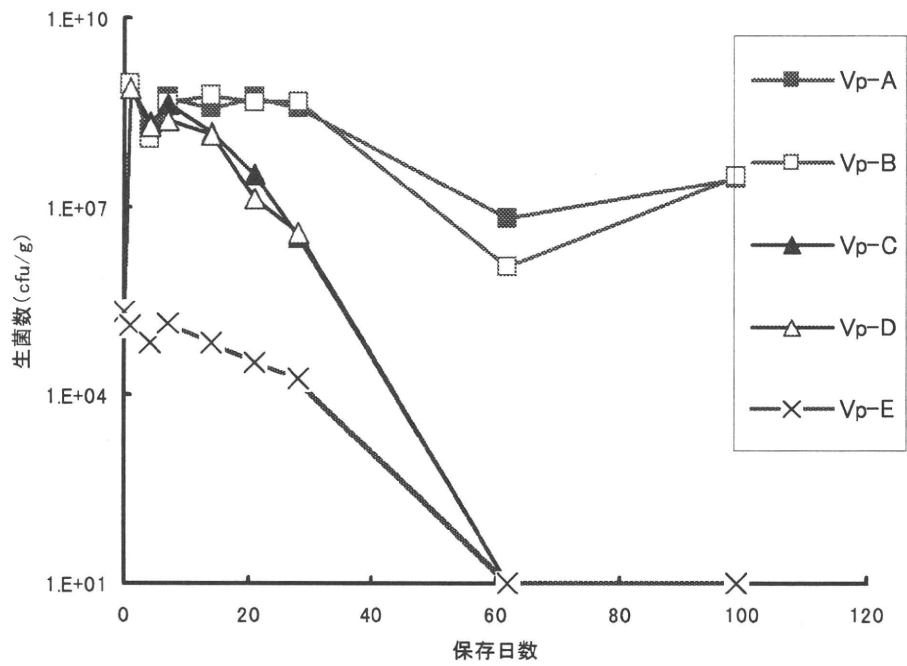


図4 *V. parahaemolyticus* 接種したこや豆腐試料または麩試料における接種菌の安定性
 における保存条件の影響

A、B：22.5℃にて保存

C、D：22.5℃にて3日間保存後、冷蔵保存

E：冷蔵保存

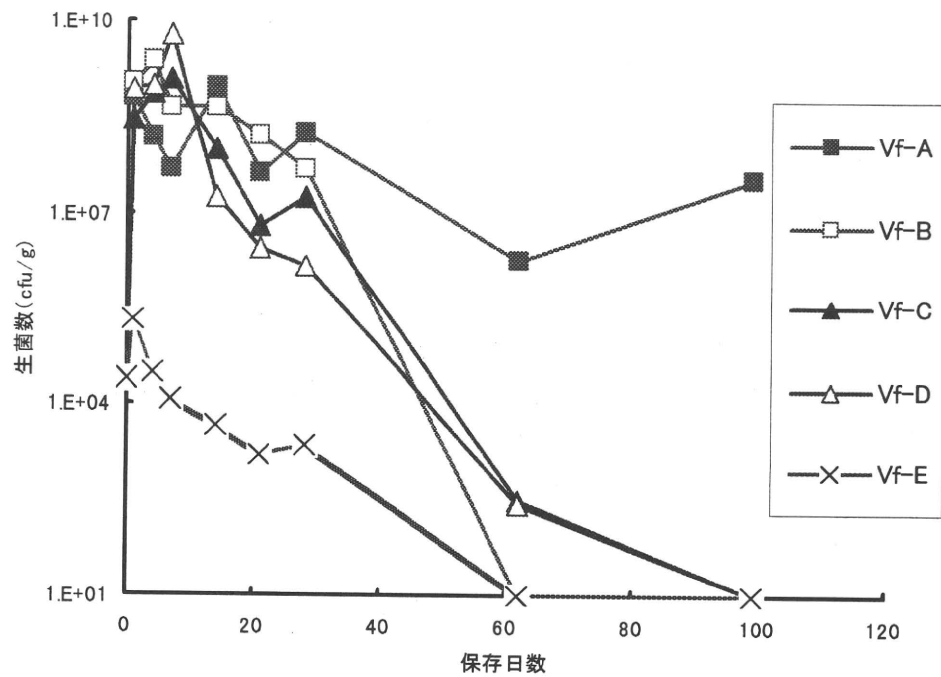


図 5 *V. fluvialis* 添加したこや豆腐試料における接種菌の安定性に及ぼす保存条件の影響

- A、B : 22.5℃にて保存
- C、D : 22.5℃にて3日間保存後、冷蔵保存
- E : 冷蔵保存

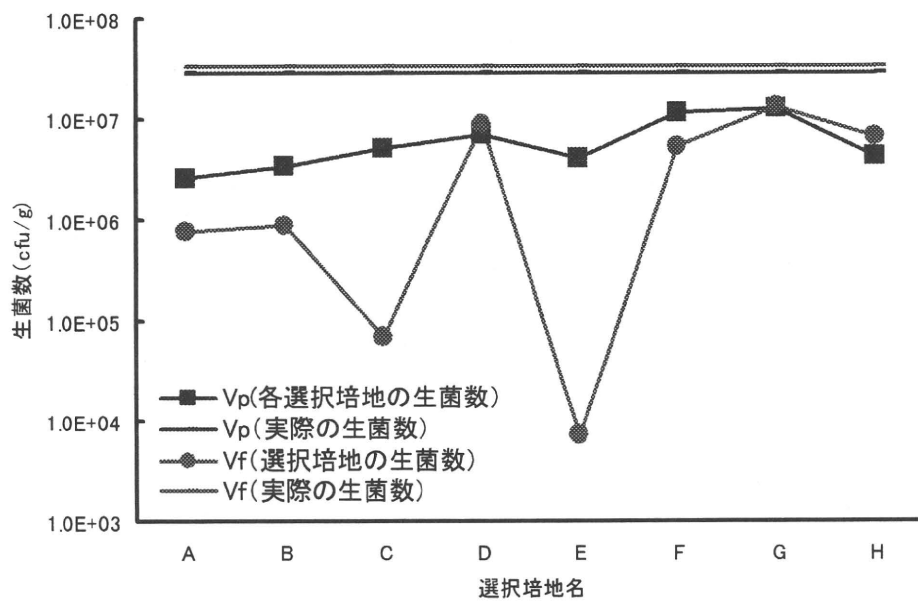


図6 各種選択培地を用いた際のこうや豆腐中の *V. parahaemolyticus* または *V. fluvialis* の菌数測定

- A : TCBS 寒天培地 (A 社)、B : TCBS 寒天培地 (B 社)、
- C : TCBS 寒天培地 (C 社)、D : TCBS 寒天培地 (D 社)、
- E : TCBS 寒天培地 (E 社)、F : 酵素基質培地 (F 社)、
- G : 酵素基質培地 (G 社)、H : 酵素基質培地 (H 社)

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 秦野研究所 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 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
 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。本年度は外部精度管理調査に向けた試料調製を検討済みの乳添加試料を用いて、昨年度に引き続き外部精度管理の模擬試験を実施し、試料の調製、調製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付、報告書の回収等が支障なく実施できることを確認した。また、昨年度判明した解析ソフトウェアにより定量値が異なる原因を解明し、これを受けて本年度の協力参加機関の測定結果のうち乳試料の解析に適さないソフトウェアを使用していた機関のデータを再計算し、これ以外の報告データとあわせて統計解析した。解析結果と報告書を詳細に検討した結果、一部の機関でマイクロプレートの洗浄操作に偏りがあった可能性が示された。

模擬試験の際実施した検査実績に関するアンケートで、卵、乳に次いで検査件数が多かったえび・かに 試料の調製を検討した。甲殻類タンパク質は市販の食品素材から調製できることを確認後、配布量を想定して試料を作製した。当該試料中の甲殻類タンパク質をELISA法で測定し、均一性、安定性について確認した。

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、えび、かに が特定原材

料に追加され、平成22年6月からは食品への表示も義務付けられた。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てきた。その後、食品衛生法に基づく表示の所管が消費者庁に移管されたことに伴い、平成22年9月10日消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(消食表第286号)が発出され現在に至っている。また、同じく平成22年9月10日、アレルギー物質を含む食品の検査に用いるキット等に関して参考情報を記載した「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(参考)」(消費者庁食品表示課事務連絡)が発出され、卵、乳、小麦、そば、落花生について新たにバリデーション済みの検査キットが追加された。

えび・かにを除く特定原材料5種については昨年までに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、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た。また卵については実際に外部精度管理調査の模擬試験(以下共同試験とする)を行ったほか、乳添加試料については配布を想定して調製量を拡大し、均一性および

安定性の確認を行った。本年度は、乳試料を用いて昨年度に引き続き共同試験を実施し、試料の妥当性および協力機関の測定結果を検討した。また、新たにえび・かに添加試料の調製を検討した。さらに、平成21年度総括・分担報告書で報告したELISA法の解析ソフトウェア間で定量値が異なって計算される現象について検討を行い、原因を解明した。

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以下のELISAキットを用いて実施した。すなわち乳タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 牛乳測定キット(㈱森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳(日本ハム㈱)、えび・かにタンパク質の測定にはFAテストEIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬㈱)、甲殻類キット「マルハ」(㈱マルハニチロ食品)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、吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダーEL 808IU、および計算ソフトウェアDeltaSoft JV Ver.1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.)を使用した。

2. 添加に使用した特定原材料

乳たんぱく質にはスキムミルクを使用し、これを水に溶解し、0.8 μ mのフィルターでろ過したものを食材に添加した。えび・かにタンパク質は甲殻類を含む市販の食品素材から調製した抽出液を使用した。スキムミルクおよび甲殻類を含む食品素材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㈱)を使用して測定した。

3. 添加用基材

添加用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

たは野菜ペーストを使用した。

4. 精度管理試料の調製

精度管理試料は、添加用基材に特定原材料を加え、BLIXER-5Plus (株)エフ・エム・アイ) またはグラインドミックス GM300 (株)レッチェ) で均質化して作製した。作製した試料は遠沈管に分注し、4℃または-20℃で保存した。

5. 試料の均一性および安定性の検討

試料分注後、10 容器から n=2 でサンプリングして ELISA キットにより特定原材料タンパク質を測定し、一元配置による分散分析を実施して均一性を検討した。安定性は乳試料では共同試験終了後に、えび・かに 試料では9週間後に試料を再度測定し、均一性試験の結果と比較して検討した。

6. 共同試験の実施

平成 21 年 6 月 15 日、乳を測定対象とした試料 8 種類およびモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 各 1 キットを試験方法および報告書様式に関する文書と共に宅配便(冷蔵および冷凍)で共同試験参加機関に送付した。なお、測定期間は 7 月 16 日までの 1 ヶ月間、報告書の回収期限は 7 月 30 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 管理図を作成して統計解析した。この際、Xbar 管理図の上下管理限界線は 平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差 とした。また、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参加機関は、東京都健康安全研究センター、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 11 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

乳を測定対象とした共同試験試料について配付前に、添加量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、添加試料(試料 1、試料 3、試料 5、試料 7、試料 8)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(消食表第 286 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を検討した結果、測定値は配布前に実施した均一性試験の 89.0~109.9%の範囲であった(表 2)。

なお、ブランク試料(試料 2、試料 4、試料 6)の測定値は、いずれもキットの検出下限(0.31 $\mu\text{g/g}$)以下であった。

2. 試料送付

参加機関への試料およびキットの送付に関しては、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、全参加機関に発送の翌日に到着したことをインターネット上で確認した。

3. 共同試験結果

共同試験結果の統計解析に先立って参加機関が使用した ELISA 計算ソフトウェアを確認した(表 3)。その結果、昨年度問題が指摘されたソフトウェアを使用していた 3 機関は引き続

き同一のソフトウェア(マイクロプレートマネージャーVer.5)を使用していることが判明した。後述するが、当該ソフトウェアによる Logistic 4PL 解析はモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳の濃度計算には適していないので、これら3機関の試験結果は報告を受けた吸光度を使用してマイクロプレートマネージャーVer.5 の Logistic 5PL 解析(Rodbard)により再計算を行った。再計算結果は報告データとともに表 4 に示したが、以下の統計解析には再計算データを使用した。なおこれ以外の機関が使用した ELISA 計算ソフトウェアには問題がなかったため、統計解析には報告データをそのまま使用した。

ブランク試料(試料 2、試料 4、試料 6)の測定結果をまとめて表 5 に、乳添加試料(試料 1、試料 3、試料 5、試料 7、試料 8)の報告値の集計結果および Xbar-R 管理図を表 6~10 および図 1~5 にモリナガ FASPEK 牛乳 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 のそれぞれに分けて示した。モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットによる添加試料の測定では試料 3、試料 8 を除き Xbar 管理図において Xbar が上部管理限界線(UCL)および下部管理限界線(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が、R管理図では、UCL を超えた機関が各試料につき各々1機関ずつ認められた。一方、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 による測定では全添加試料で機関番号 3 における測定値が Xbar 管理図の LCL を下回りz-スコアが-2 以下となった。機関番号 3 においては FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 による測定の際、何らかの異常があったことが予想されたため、機関番号 3 を除いて再度統計解析を行った。再解析の結果はz-スコアのみ表に示したが、全機関で絶対値は

2未満であった。またR管理図では再解析を含めて、UCL を超えた機関はなかった。

モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料 3 において Xbar が UCL を超えz-スコアが2以上となった機関番号 1 では、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料 1、試料 5 の R 管理図でも UCL を超えた。機関番号 1 からは、測定中にマイクロプレートウォッシャーが故障し、途中から手で洗浄を行ったとの報告があり、洗浄の偏りにより測定値の異常、再現性の低下が起こったものと考えられた。機関番号 3 では FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳の全試料の Xbar が LCL を下回り、z-スコアが-2 以下となった。また、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットでも Xbar が LCL を下回り、z-スコアが-2 以下だった試料 8 を含め全試料で報告値が参加機関の中で最も低かった。機関番号 3 は、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットのいずれの測定値も低いこと、両キットとも使用した試料抽出液は共通であることから、試料の抽出操作に何らかの問題があった可能性が考えられた。また、報告書を詳細に検討した結果、ブランク試料の測定においてウェル間の再現性不良が認められたため、マイクロプレートの洗浄不良があった可能性も考えられた。機関番号 11 は、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料 3 と試料 7 の R 管理図で UCL を超えた。機関番号 11 ではブランク試料のみでなく添加試料でもウェル間で再現性不良が認められた。このため、マイクロプレートの洗浄の偏りに加え、使用したピペットの分注精度に問題があった可能性も考えられた。機関番号 2 は、モリナガ FASPEK 牛乳 測定キットの試料 8 の R 管理図で UCL を超えた。機関番号 2 の報告書を詳細に検討したが R が UCL を超えた測定で測定

値が高い傾向がある以外は特に問題点は認められなかった。以上の結果、外部精度管理調査により、特定原材料検査の測定操作のみでなく、機器や器具の性能、管理状況も推定できることが分かった。

共同試験参加機関の添加試料測定における室間精度 (RSD_R) はモリナガ FASPEK 牛乳測定キットでは 5.35~12.81%、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳で 15.06~18.89% (機関番号 3 を除くと 9.22~13.58) でいずれも測定キットのバリデーション基準 25% 以下を満たしていた。今回、この基準に従ってバリデートされたキットで基準内の測定値が得られたことから、共同試験試料は外部精度管理試料として適切であったことが示されたと考えられた。

4. 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 11 機関の特定原材料検査業務の経験年数はいずれも 5 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、乳が最も多く 965 件、卵が 740 件、小麦およびえび・かに が約 570 件、そばが 385 件、落花生が 224 件で参加機関が 1 機関増えたにもかかわらず、えび・かに を除き前年度と比べて減少した。確認試験の実施件数も昨年度に比べ減少したものが多かったが、えび・かに については約 4 倍に増加した。しかし、確認試験の実施数は少なく、ELISA 法の総計の 5% 以下だった。

以上の結果から、早急に えび・かに を含む外部精度管理試料調製の検討を進める必要があると考えられた。

5. ELISA 計算ソフトウェアの 4PL 検量線の回帰法について

昨年度の本研究報告で ELISA の吸光度データからの濃度計算結果が使用する計算ソフ

トウェアにより異なり、DeltaSoft JV Ver.1.80 の計算値を対照として参加機関が使用した各計算ソフトウェアを比較した場合、マイクロプレートマネージャー Ver.5 の乖離が特に大きいことを報告した。昨年度の卵試料の測定データを用い、マイクロプレートマネージャー Ver.5 の 4PL 解析について詳細に検討したところ、図 6 および表 12 に示したように吸光度と濃度のプロットから検量線がずれていることが明らかになった。一方、これ以外の計算ソフトウェアでは DeltaSoft JV Ver.1.80 も含め、吸光度と濃度のプロットと検量線は一致していた。以上から、マイクロプレートマネージャー Ver.5 の 4PL 解析には何らかの問題があることが予想されたため、この結果をメーカーに報告し、原因の究明を依頼した。

その結果、マイクロプレートマネージャー Ver.5 の 4PL 解析は、図 7 のような典型的なシグモイド曲線を想定した回帰法を使用しており、図 6 のようにシグモイド曲線の左半分のデータしかないモリナガ FASPEK 卵 測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 卵 の解析には適していないこと、マイクロプレートマネージャー Ver.5 に搭載されている 5PL 解析 (Rodbard, Cook-Wilkenson) の回帰方法は図 6 の形状のデータにも対応していることが明らかになった。図 6 のデータをマイクロプレートマネージャー Ver.5 の 5PL により再解析した結果を図 8 に示したが、吸光度と濃度のプロットと検量線が一致しており、濃度の計算に使用できることが判明した。

以上の結果を踏まえ、本年度の共同試験に使用したモリナガ FASPEK 牛乳 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳 の検量線の吸光度と濃度のプロットを検討した結果、卵キットと同じく、図 6 の左半分のデータのみ

であり、マイクロプレートマネージャーVer.5 の 4PL 解析は濃度計算に適さないと判断された。このため共同試験結果のうちマイクロプレートマネージャーVer.5 の 4PL 解析を使用した機関の濃度は、マイクロプレートマネージャーVer.5 の 5PL 解析により再計算することとし、再計算データを統計解析に使用した。

6. えび・かに 試料作製の検討

えび・かに 試料調製にあたり、食材に添加する甲殻類タンパク質の調製法を検討した。通知では、甲殻類高濃度標準液の調製には、生のウシエビから調製した甲殻類一次標準粉末を使用することとなっているが、調製法が複雑である。このため市販の食品素材を利用することとし、これらから甲殻類タンパク質が抽出可能かについて検討した。その結果、表 13 に示したように甲殻類③を除き、2-D Quant kit の測定値に対する回収率は低いものの検討した 3 種全てから FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」によって甲殻類タンパク質が検出された。この抽出液をそれぞれ 6 種類の食材に添加して甲殻類タンパク質を測定し、添加液に対する回収率を求めた結果、回収率は 82~120%といずれも良好だった(表 14)。次にこのうち甲殻類①、甲殻類③および食材 4、食材 6 を用いて精度管理の実施を想定して 2kg の試料を調製した。なお試料の混合には BLIXER- 5Plus またはグラインドミックス GM300 を使用した。調製した試料は 10 個に分割し、各々から n=2 でサンプリングして抽出し、甲殻類タンパク質を FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」および甲殻類キット「マルハ」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、食材 4、食材 6 のいずれも均一と判定された(表 15)。また、この試料を-20℃で 9 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 16 に示したが、良好な安定性を示した。以上の結果から、えび・かに について ELISA 法による外部精度管理に使用可能な試料を作製することができたと考えられた。

E. 結論

1. 共同試験

乳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。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、報告書の回収に関しては昨年度と同様に支障なく実施できた。Xbar-R 管理図の作成に際しては、問題が見つかった ELISA 解析プログラムを使用した機関のデータは、同ソフトウェアの Logistic 5PL 解析により再計算したデータを使用して行った。

共同試験の結果を統計解析した結果、機関番号 3 は FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳の全添加試料で Xbar が管理限界外となった。機関番号 3 および R が管理限界外となった機関では、ウェル間の吸光度の再現性が悪い測定が認められ、マイクロプレートの洗浄操作に問題があった可能性が考えられた。

2. えび・かに試料作製の検討

市販の食品素材を用いて精度管理試料に添加するえび・かに タンパク質の抽出を検討した結果、外部精度管理調査試料の調製に使用可能な抽出液が得られた。これらを使用して、約 2kg のスケールでえび・かにに添加試料を調製し、均一性を確認した結果、いずれの試料も均一と判定された。これらの試料は-20℃で 9 週間保存後も安定であった。

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

笠間菊子、小熊恭代、鈴木達也、穠山浩、大島赴夫、小島幸一:特定原材料検査に関する外部精度管理の実施に向けた検討, 第100回日本食品衛生学会 学術講演会, 熊本, 2010

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

マイクロプレートマネージャーVer.5 の Logistic 4PL 解析回帰法の検証にご協力頂いた、バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)に深謝致します。

表1 共同試験試料の均一性試験結果

タンパク質 添加量 ^{a)}	モリナガ FASPEK 牛乳 測定キット				FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳				
	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	回収率 (%)	一元配置による分散分析 分散比 判定 (<3.02)	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	回収率 (%)	一元配置による分散分析 分散比 判定 (<3.02)	
	試料1	10.6 $\mu\text{g/g}$	5.1	86.5	0.61	9.26	5.2	87.4	0.25
試料2	0 $\mu\text{g/g}$	b)	—	—	b)	—	—	—	—
試料3	10.1 $\mu\text{g/g}$	6.1	108.9	0.51	10.45	7.6	104.0	0.36	均一
試料4	0 $\mu\text{g/g}$	b)	—	—	b)	—	—	—	—
試料5	7.0 $\mu\text{g/g}$	7.21	4.8	102.4	0.58	5.1	100.7	0.36	均一
試料6	0 $\mu\text{g/g}$	b)	—	—	b)	—	—	—	—
試料7	4.7 $\mu\text{g/g}$	6.17	5.5	131.0	0.51	5.4	143.7	0.50	均一
試料8	9.4 $\mu\text{g/g}$	12.13	6.4	129.2	0.47	3.6	137.4	1.31	均一

a): 2-D Quant Kit による測定値
b): キットの測定下限 (0.31) 以下

表2 共同試験試料の安定性試験結果

乳 タンパク質 添加量 ^{a)}	モリナガ FASPEK 牛乳 測定キット				FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳						
	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 (%)			
				安定性 (B/A \times 100) (%)				安定性 (B/A \times 100) (%)			
試料1	10.6 $\mu\text{g/g}$	9.17	5.1	8.73	2.3	95.3	9.26	5.2	8.68	4.0	93.8
試料2	0 $\mu\text{g/g}$	b)	—	b)	—	—	b)	—	b)	—	—
試料3	10.1 $\mu\text{g/g}$	10.94	6.1	9.82	2.1	89.8	10.45	7.6	9.30	2.2	89.0
試料4	0 $\mu\text{g/g}$	b)	—	b)	—	—	b)	—	b)	—	—
試料5	7.0 $\mu\text{g/g}$	7.21	4.8	6.43	2.7	89.3	7.09	5.1	6.51	3.3	91.9
試料6	0 $\mu\text{g/g}$	b)	—	b)	—	—	b)	—	b)	—	—
試料7	4.7 $\mu\text{g/g}$	6.17	5.5	5.59	2.0	90.6	6.77	5.4	6.77	5.0	100.1
試料8	9.4 $\mu\text{g/g}$	12.13	6.4	12.50	3.9	103.0	12.91	3.6	14.18	4.8	109.9

a): 2-D Quant Kit による測定値
b): キットの測定下限 (0.31) 以下

表3 参加機関が使用したマイクロプレートリーダーおよびソフトウェア

機関 番号	マイクロプレートリーダー	計算ソフトウェア	
	型式	ソフトウェア名	バージョン
1	MFA-RR01	特定原材料測定プログラム	2
2	MTP-450	KF500	3.0.167
3	VERSA max	SOFT max pro	4.x
4	μ Quant	KC4	不明
5	Foodmark	特定原材料測定プログラム	2.1
6	550	マイクロプレートマネージャー	5.2
7	550	マイクロプレートマネージャー	5.2
8	SUNRISE CLASSIC	LS plate maneger	2001
9	680	マイクロプレートマネージャー	5.2
10	マルチスキャンJX	Acent Software	2.6
11	POWERSCAN HT	KC4	3.1