

Fig. 6

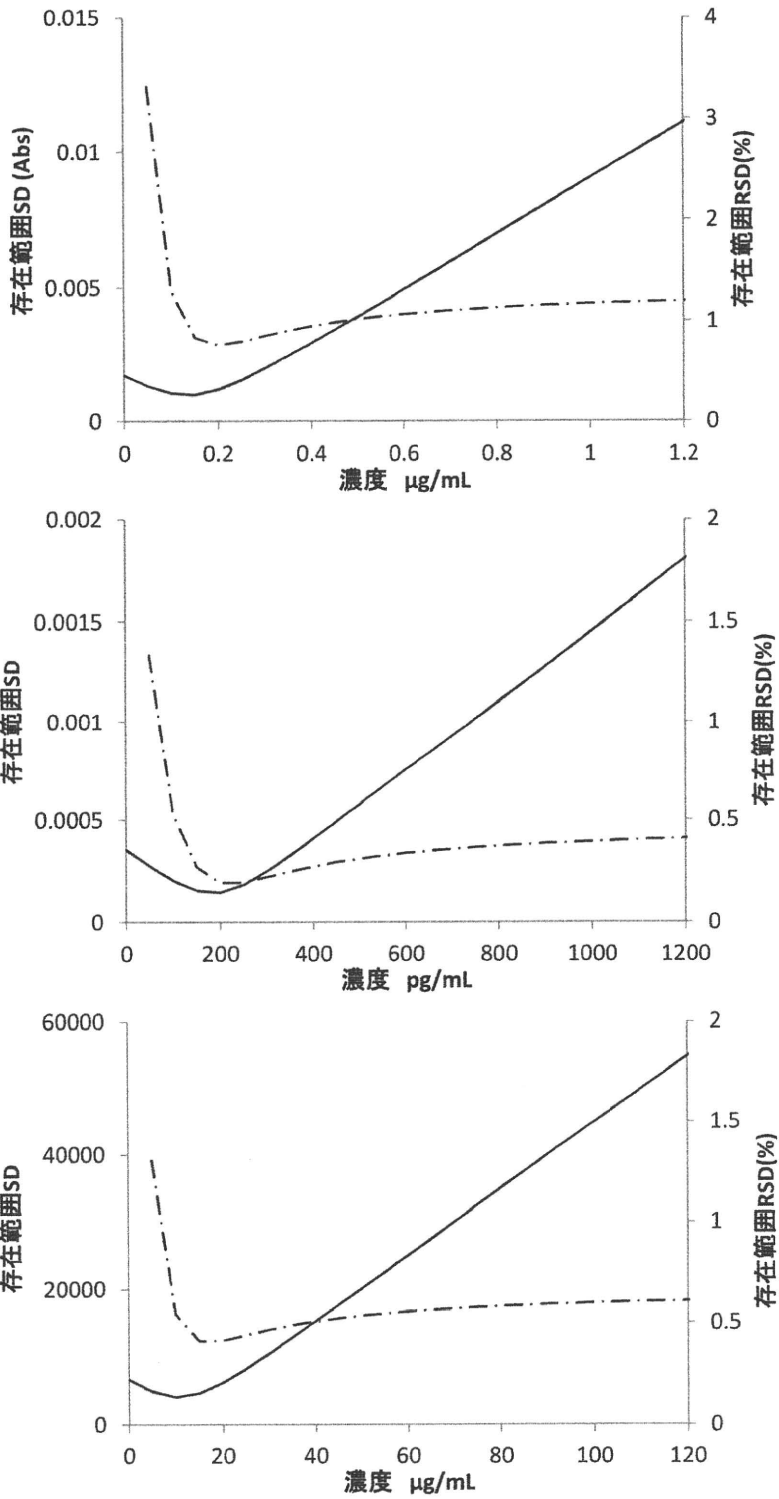


Fig. 7

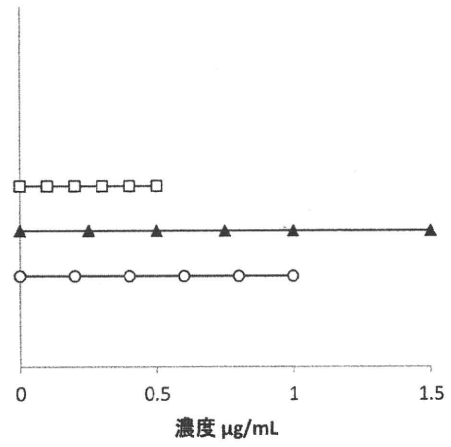
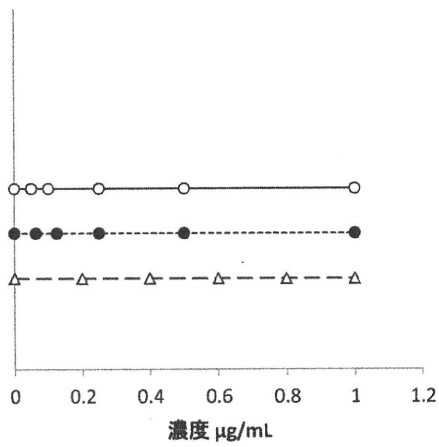
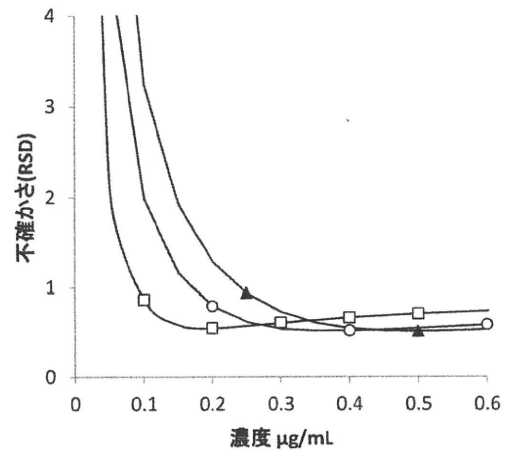
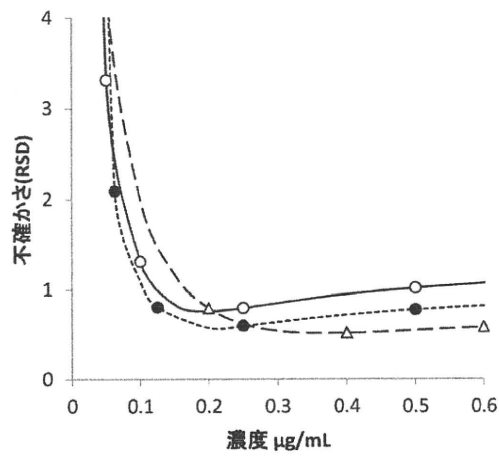
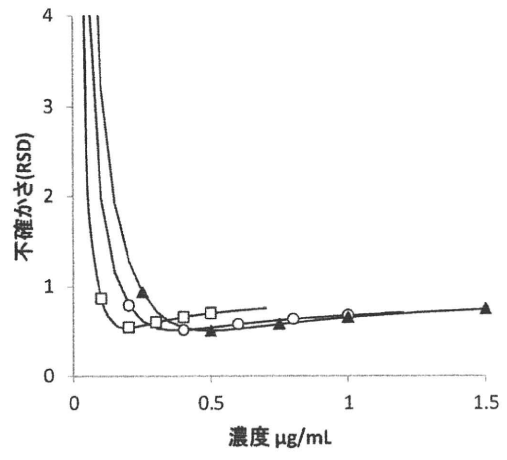
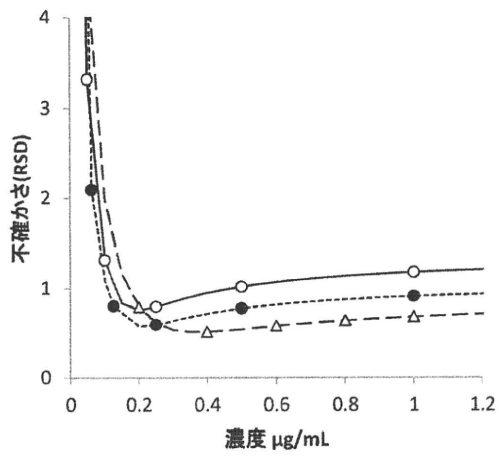


Fig. 8

Table 1 分析法の標準不確かさ(RSD%)と検量線の不確かさ(RSD%)

シアン濃度 μg/g	大豆	小豆	エンドウ	ソラマメ	ラッカセイ	検量線
5	3.1	6.0	2.4	4.1	3.6	0.93
10	3.3	5.1	2.4	1.7	3.9	1.1

鉛濃度 ng/g	米試料	魚試料	検量線
20	1.7	5.6	0.20

硝酸塩濃度 μg/g	豆試料	肉試料	検量線
1.25	2.8	3.3	0.44
5	1.7	2.0	0.60

分担研究報告書

生化学的試験法の不確かさの推定

分担研究者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長

研究要旨

分析結果の信頼性を表す定量的な指標である「不確かさ」の概念が、食品分析の分野にも急速に普及してきており、国際的には、規格への適合判定の際に考慮することも含め議論が進展している。

不確かさは個々の分析結果に付随する。また、不確かさの推定については、様々なデータセットや情報を利用した方法が提案されている。しかし、個々の分析結果に付随するその性質からすれば、不確かさを付与しようとする分析結果を得る試験室が、自ら得たデータセットを利用して推定した不確かさが、最も適切である。不確かさは分析法の原理や手技によらず推定可能であり、その範囲は、真値とする測定量の大きさ、分析法の性能、分析環境、分析者の技能等により変わりうる。さらに、各要因が不確かさに寄与する割合も、分析法や分析対象により様々であることが予想される。

本研究では、これまでも組換え DNA 技術応用食品を対象としたリアルタイム PCR 法を取り上げ、単一試験室内で計画した分析を実行することにより不確かさを推定するとともに、寄与する要因の検討を行った。本年度は、規格への適合判定に使用される生化学分析法のもう一つの例として、特定原材料(アレルギー誘発物質)の定量を目的とした ELISA 法を取り上げ、同様に不確かさの推定と寄与要因の検討を試みた。試料には、一定量の卵ならびに牛乳およびそれら由来のタンパク質を添加し、均質性を考慮して調製したモデル加工食品(畜肉ソーセージ)を用いた。調製した試料を規定した計画に従い単一試験室内で繰り返し分析し、得られた測定値に基づき、分析の全工程を通じて得られる測定値の不確かさを推定した。検討に当たっては、通知により示された性能を満たす 2 社の ELISA キット(キット A ならびにキット B)を用いた。また、測定値にばらつきを与える要因になると予測された抽出時間の影響を明らかにするための条件設定を計画に含めた。得られた測定値の解析の結果、1)卵由来のタンパク質を分析対象とする場合には、抽出時間の長さが測定値間の有意差を生じる要因になり得ること、2)吸光度および測定値のばらつきは、併行抽出間に比べ測定間の効果を含む抽出日間で大きいこと、3)吸光度および測定値のばらつき大きさがキット A と B の間で明確に異なること、4)検量線を適正に作成しないことが測定値にバイアスを生じる要因になることが明らかとなった。また、キットと分析対象タンパク質との全組み合わせを通じ、得られた測定値のばらつきは、室内精度(RSD%)として 5.5~19.8%と推定され、これを真値の存在範囲ととらえれば、標準不確かさとなる。

協力研究者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品部長

協力研究者 大森清美 神奈川県衛生研究所理化学部 主任研究員
協力研究者 荒川史博、森下直樹、森松文毅 日本ハム中央研究所

A. 研究目的

分析結果の信頼性を表す定量的な指標として測定値の不確かさを推定し、分析結果に付随させることが、食品分析の分野においても強く求められるようになってきている。また、WHO/FAO 合同国際食品規格計画 (Codex) 委員会・分析・サンプリング法部会においては、規格への適合判定の際にも、不確かさを考慮することについて議論がされている。このように、食品の分析により得られる測定値に不確かさを付随させ、その信頼性を保証することへの要求が国際的にも強まっている現在において、少なくともその推定方法について検討をし、ひいては寄与する要因やそれらの性質を明らかにすることは極めて重要である。

理化学分析(化学分析)により得られる測定値の不確かさについては、これまでも精力的に研究が進められており、発行済みの Codex ガイドライン (CAC/GL59)等に従えば、実際の推定も可能である。これに対し、生化学分析法により得られる測定値の不確かさに関する研究は遅れており、2010 年に、Codex ガイドライン「GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA AND VALIDATION OF METHODS FOR DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SPECIFIC DNA SEQUENCES AND SPECIFIC

PROTEINS IN FOODS」(CAC/GL74)が発行され、本ガイドラインの 3.1.5 項では不確かさ推定の要求について言及されているものの、実際的な推定法方法は、学術的にも検討されていないのが現状である。

本研究課題では、これまでに生化学分析法の一例として組換え DNA 技術応用食品を対象としたリアルタイム PCR 法を取り上げ、検討を進めてきた。昨年度は、規定の計画に沿った繰り返し分析を単一試験室内で実施することにより得られた一連の測定値をデータセットとして用い、不確かさの推定方法について検討した。さらに不確かさに大きな影響を与える要因に、DNA の性質(あるいは DNA 抽出法の特性)の違いがあることを明らかにした。

本年度は、我が国の公定分析法として示されている特定原材料を対象とした ELISA 法を取り上げた。ELISA 法は、リアルタイム PCR 法と同様に、生化学分析法に区分される特定タンパク質の定量を目的とした分析法である。リアルタイム PCR 法の測定対象物質が特定の DNA であるのに対し、ELISA 法の測定対象物質は特定のタンパク質である。その検出は抗原抗体反応を原理としており、同じ生化学分析法であっても PCR 法とは異なる要因が不確かさに影響を与え

ることが予測された。そこで、総タンパク質の抽出時間や、異なる抗体によって構成されている 2 社のキットを使用する事を実験計画に含め、不確かさの推定方法ならびに不確かさに影響する要因を明らかにすることを目的に、検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料

均質性の確認された試料として、1)卵ならびに牛乳およびそれら由来のタンパク質を一定量添加し調製した畜肉ソーセージ、2)市販の認証値付き標準試料 (certified reference material: CRM)を用いた。畜肉ソーセージ試料は、豚肉を主原料として、油脂、粉乳、卵ならびに牛乳由来のタンパク質、pH 調整剤を添加し、均質性を高めることを目的に、製品製造の混合工程を 1.5 倍の時間に変更してモデル加工した。なお、本試料の均質性は、The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories*に記載された推奨される方法により統計学的に確認した。

* M.Thompson, S.L.R.Ellison and R.Wood, Pure Appl.Chem., 2006, Vol.78, No.1 145-196.

CRM には、Food allergen laboratory 社 (CRETE, Mpizaniou 5, 74100 RETHIMNO,GREECE)が製造販売している卵および牛乳を含む 2 種類の試料

を、(株)プラクティカルを通じて購入し用いた。試料に添付された証明書によれば、いずれの試料もパスタを基材としている。また、卵、牛乳それぞれの認証値は 5 $\mu\text{g/g}$ と 10 $\mu\text{g/g}$ とされている。ただし、後に結果に基づき考察するが、この認証値を付与した分析法が不明であるため、ELISA 法により得られる測定値と認証値に乖離が生じる可能性はあらかじめ予測されていた。

B-2. 試薬

一定濃度の標準タンパク質の多重測定に用いる標準品として、各キットに付属の検量線作成用の標準溶液を(株)日本ジーンから入手した。測定時には、試料重量濃度として 5 および 10 ppm 相当にすることを想定し、操作手順に含まれる希釈の倍率も考慮した上で、測定溶液中濃度として、6.25 および 12.5 ng/mL に調製した。

計測による吸光度のばらつきを明らかにするために実施した多重測定には、ELISA 法により測定することが規定されている波長 (450 nm) に吸収極大をもつ 4-アミノ-3-ニトロフェノールを用いた。4-アミノ-3-ニトロフェノールは、本研究で得られた実測値から、25、12.5、2.5 ng/mL の各濃度の標準タンパク質溶液を測定して得られる吸光度をそれぞれ 0.7~0.8、0.3~0.4、0.07~0.08 と想定し、それら吸光度を与える濃度として、40、20、4 mg/L に調製した。

B-3. ELISA 法

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 21 年 1 月 22 日付食安発第 0122001 号)によると、特定原材料等の表示制度を科学的に検証する目的において、同通知別紙 5「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」に示された性能評価基準を満たした分析法を用いる事とされている。また、本研究で検討した ELISA 法については、上記評価基準を満たした性能を有するキットとして、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(参考)」(平成 22 年 9 月 10 日付消食第 286 号)により、複数社によって製造販売されている製品が示されている。それぞれのキットには、性能を評価するために実施した室間共同試験の結果が添付されている。この結果をみると、共同試験に使用した試料種が異なっているため、一概に比較することが難しいが、同じ特定原材料を分析対象とするキットであっても、メーカーの違いによって測定値のばらつきの程度が異なることも考えられた。そこで、卵または牛乳のそれぞれを対象とするキットを異なるメーカー 2 社から購入し、用いる事とした(以下、製造販売者ごとにキット A、キット B とする)。なお、各キットは同一ロットの製品を入手して実験に用いた。

分析手順は各キットに付属の手順書に従った。検量には通知に記載された手順書にも指示されていた 4 係数ロジスティック曲線にフィッティングさせた回帰

曲線を用いた。

試料から調製する測定溶液は、検量点の濃度として ELISA 法に規定されている 8 点の内低濃度側の 3 点の範囲 (Std.3;3.125ng、Std.4 ; 6.25 ng/mL、Std.5;12.5 ng/mL)で内挿されるよう、予備試験結果に基づき希釈した。

B-4. 機器

振とう機 : Invitroshaker Shake-LR (タイテック社製)、冷却遠心機 : Avanti HP25 (Beckman 社製)、タッチミキサー : MT-51 (ヤマト社製)、マイクロプレートリーダー : Vmax Kinetic microplate reader (Molecular devices 社製)、マイクロプレートウォッシャー Model 1575 (Biorad 社製)。

B-5. 実験計画

卵および牛乳を分析対象とするキット A およびキット B を用い、ソーセージ試料ならびに CRM を 1 日あたり 2 併行で 10 日間分析した。総タンパク質の抽出時間は、各キットに付属の手順書に 12 時間以上と記載されていたことを踏まえ 15 時間を基本とした。ソーセージ試料については、これに加え、抽出時間を 25 時間あるいは 5 時間とする試験区を設定した。

測定溶液中濃度として、6.25 および 12.5 ng/mL の標準タンパク質を含む溶液の多重測定には、牛乳を分析対象とするキット A およびキット B を用いた。ELISA 法に含まれる分析手順の内、抽出を除く手順を実行した。それぞれの濃

度の標準タンパク質を含む溶液をキット付属のマイクロプレートの24ウェルを使用し同時に測定することを1日の計画とし、これを3日間実施した。

4-アミノ-3-ニトロフェノール溶液の多重測定は、40、20、4 mg/Lの濃度ごとに以下の計画に従い実施した。ELISAに使用可能なことがメーカーによって保証されている96ウェルのマイクロプレートの全てのウェルを使用し、1日あたり6併行の繰り返し分析を2日間実施した。また、測定した各濃度の溶液は、1日ごとに必要量を一括して調製し、その後8連のマイクロピペッターにより1ウェルあたり200 µLを分注した。

B-6. 検量線の作成

ELISA法には、0～50 ng/mLの濃度範囲で8段階の濃度で希釈した各標準タンパク質溶液から得られた吸光度(検量線データ)に基づき、4係数ロジスティック曲線にフィッティングさせた回帰曲線を用いて検量することが規定されている。4係数ロジスティック曲線を作成するには吸光度を曲線にフィッティングさせるためのアルゴリズムが不可欠であるが、これについては通知や手順書中に言及が無い。吸光度を測定するための装置に付属しているソフトウェアに依存しているのが現状と考えられる。本研究でも、装置に付属するソフトウェアにより作成される4係数ロジスティック曲線に回帰させた曲線に基づき検量することを基本とした。なお、適正にフィッティングされているかについては、同じ検量線データをExcel上に構

築したsimplex法をアルゴリズムとする非線形最小二乗法によってフィッティングし作成した回帰曲線との比較により検証した。

後述する戻し値のバイアスが10%を超え、また最高濃度の標準タンパク質(50 ng/mL)から得られた吸光度が2を超えている場合には、フィッティング不能と判断し、50ng/mL濃度の標準タンパク質溶液から得られた吸光度を除外し、全検量点数を7点としたうえで、改めて4係数ロジスティック曲線への回帰分析を行った。改めて作成した回帰曲線を評価し、戻し値のバイアスが10%を下回ることを確認した後に、検量に使用した。なお、再解析が必要であった検量線データは、下記実験計画に従いB社キットによって5日目から7日目までに得られた4組の検量線データである。

また、使用する検量線データを制限して作成した一次回帰曲線を検量に使用する事の適正についても検討した。

B-7. 統計解析

B--1. ピペッティング精度の推定

ELISA法により分析を行う場合、マイクロピペッターによりはかりとられる各種溶液量のばらつきは、不確かさに寄与する基本的な要因になり得る。そこで、ピペッティング操作の精度を明らかにすることを目的に、1、5、10 mL容量の水を対応する容量のマイクロピペッターではかりとりその重量を測定した。実験は、1日10併行で20日間行い、得られたデータを一

元配置の分散分析により解析した。算出された分散に基づき、併行精度、日間およびそれらを総じた室内精度を標準偏差(SD)ならびに相対標準偏差(RSD%)として推定した。

B-7-2. 検量線作成用標準タンパク質溶液から得られた吸光度データ(検量線データ)の解析

実験計画に示したとおり、単一試験室での2併行分析を10日間にわたり実施した。この分析に伴い、牛乳ならびに卵のそれぞれについて、各社キットを用いて10本分の検量線データを得た。これら検量線データを対象に、各標準タンパク質の濃度ごとにデータをまとめ、一元配置の分散分析を行うことで得られた分散に基づき、併行(ウェル間)、日間、およびそれらを総じた吸光度のばらつきを推定した。

B-7-3. 試料から得られた牛乳および卵濃度の解析

ELISA法により得られた牛乳および卵の試料重量あたりの濃度は、試料とキットまた、抽出時間の組み合わせごとに得られたn=20のデータを対象に、一元配置の分散分析により解析した。算出された分散に基づき、併行分析間、日間およびそれらを総じたばらつきをSDならびに相対標準偏差RSD%として推定した。また、上記のデータセットを用いて、抽出時間が測定値に与える影響を知る目的から、student's t検定による平均値の差の検定を行った。

C.D. 研究結果および考察

C.D.-1. ピペッティング精度の推定結果

1、5、10 mLの水を一日あたり10併行ではかりとり、その重量を測定する実験を20日間実施して得られたデータを対象に、一元配置の分散分析を行った。算出された分散に基づき推定された併行、日間および室内での測定値のばらつきを、標準偏差(SD)ならびに相対標準偏差(RSD%)として表1に示す。併行条件下ならびに日間で測定値のばらつきはほぼ等しく、それらを足しあわせた室内での測定値のばらつきは、全てのはかりとり容量を通じて1%未満と推定された。室内での測定値は、マイクロピペッターの仕様書に記載され保証された誤差範囲の間でばらついており、技能による無視できない影響はないものと考えられた。

C.D.-2. 吸光度測定精度の推定結果～一定濃度の化学物質から得られる吸光度のばらつき～

40、20、4 mg/Lの濃度の4-アミノ-3-ニトロフェノール溶液を調製し、溶液の濃度別に、マイクロプレートの全ウェルに相当する96ウェルを使用する測定を1日あたり6回繰り返し、この計画を2日間実施した。得られた結果を1回の測定ごと(n=96)、また1日の測定ごと(n=576)に解析し、平均値、SD、RSD%を算出した。結果を表2に示す。プレートへの分注に使用したマイクロピペッターの種類および容量が異なるが、1日内の吸光度のばらつきは表1に示したピペッティングによるはかりとり容量のば

らつきにはほぼ等しい。また 2 日間の吸光度のばらつきに顕著な変化はない。4-アミノ-3-ニトロフェノール濃度と吸光度のばらつきに関しては、0.1 を下回る吸光度を与える低濃度(4 mg/mL)でのばらつきが RSD% としてほぼ 1% となり、より高濃度の溶液から得られた吸光度のばらつきに比べて大きい。顕著ではないが、一定以下に低濃度の溶液から得られる吸光度のばらつきは、大きくなることが予測される。なお、ピペッティングによるはかりとり量のばらつきと、吸光度のばらつきはほぼ同程度の大きさではあるが相関はない。つまり、吸光度のばらつきの要因はピペッティングの精度ではなく、それぞれは互いに独立したばらつきの要因となる。

C.D.-3. 標準タンパク質溶液から得られる吸光度のばらつき

ELISA 法は、免疫系における基本的な反応である、特定の抗原と抗体間で生じる認識と結合を基本原理とする。本分析法では、この抗体の抗原に対する特異的な親和性を利用し、測定溶液中に含まれる特定のタンパク質を検出できるように分離する。代表的な検出の方法は、抗体に結合させた(あるいは中間物質を介して結合させる)酵素により、特定の基質を分解あるいは変換し、それに伴い生じる信号を理化学機器によって計測するものである。抗原量とそれに結合する抗体量また、抗原と抗体により形成された複合体から生じる信号の量に相関があることから、定量性を有する。

本研究で使用したキットは、いずれも上記原理を基本とし、基質の変換により生じる 450 nm の吸光を吸光光度計により測定する。構成の細部が異なることも理由の一つと考えられるが、抗原と抗体の量および酵素反応により生じる信号強度の相関が異なるため、キットごとまた分析ごとに決められた手順に従い回帰曲線を作成し検量を行う。上記の原理的な理由のため、同一量の特定タンパク質の測定であっても、キット間で得られた信号(吸光度)の大きさを比較することは無意味である。しかし、単一キットにより同一量の特定タンパク質を測定して得られる吸光度のばらつきを知ることは、測定値(ここでは特定タンパク質濃度)の不確かさに寄与する要因とその大きさを把握するために重要である。そこで、検量線作成用として各キットにも付属している標準タンパク質溶液を別途入手し、2 社が販売する牛乳を対象としたキットを用いて測定し、得られた吸光度を解析した。実験は、試料重量濃度として 10ppm または 5ppm 相当(希釈倍率を 800 倍と仮定し、標準溶液濃度としては 12.5ng/mL または 6.25ng/mL)となるよう調製した標準タンパク質溶液を対象とし、それぞれの濃度について 1 日あたり 24 ウェルの併行測定を 3 日間実施した。

結果は、測定日、キット、濃度を区別したデータ(n=24)として解析し、表 3 に示した。予測したとおり、同一濃度のタンパク質溶液であっても、用いるキットにより得

られる吸光度の大きさが異なり、本結果では、キット B により得られる吸光度が常に低値を示した。また吸光度のばらつきは、RSD%としてキット A で 2.3~3.3%、キット B で 3.1~8.0%であった。同一濃度のタンパク質の測定結果に限定すれば、キット B でのばらつきは、キット A でのばらつきに比べ約 2 倍大きかった。

C.D.-4. 検量による測定値への影響

ELISA 法では、測定対象となる特定のタンパク質濃度が未知の試料からこれを抽出し、既知濃度の標準タンパク質を測定して得られる吸光度に基づき作成した回帰曲線により検量し、測定値を求める。そのため、データを適正に回帰分析して得られた曲線を検量に用いなければ、正しい測定値は得られない。不適正な回帰曲線を検量に用いる事は系統誤差や、分析ごとに測定値がばらつく原因になる。そこで、検量に用いる適正な回帰曲線の作成について検討を行った。

C.D.-4.(1) 4 係数ロジスティック曲線への回帰の適正

通知にも示されているとおり、特定原材料を対象とする ELISA 法においては、指示される濃度範囲の標準タンパク質溶液(0~50 ng/mL)の 8 点(Std.0~Std.7)を測定して得られた吸光度を 4 係数ロジスティック曲線にフィッティングさせることで作成した回帰曲線を用いて検量を行う。これは、ELISA 法によって得られる吸光度と濃度との相関を直線近似可能な範囲が狭く、一般的な理化学試験の検

量に用いられるような一次回帰直線の作成が難しいとの判断であろうと推測する。しかし、4 係数ロジスティック曲線にフィッティングさせるためのアルゴリズムに規定はなく、その内容次第で異なる回帰曲線が作成されることになる。そこで、本研究で使用したマイクロプレートリーダーに付属するソフトウェアにより作成される回帰曲線の検量線としての適正について検証した。

4 係数ロジスティック曲線は、 $Y=((a-d)/(1+X/c)^b)+d$ で表現される。図 1 に示したとおり、本式中、 $X=0$ の場合に $Y=a$ 、 $X=c$ の場合に $Y=(a+d)/2$ 、 $X=\infty$ の場合に $Y=d$ となる。 b は曲線の形を整えるための係数である。サンドイッチ ELISA と呼ばれる技術では、マイクロプレートに結合している 1 次抗体に測定対象となる特定タンパク質が抗原として結合し、この 1 次抗体-特定タンパク質の複合体に、2 次抗体を結合させる。さらに、2 次抗体に結合させた酵素の活性により測定可能な信号を得るべく基質となる物質の分解、変換を行う。このような機序を経て得られる信号の強度(吸光度や蛍光強度)と特定タンパク質の濃度は、ゴンベルツ曲線として知られる s 字上の曲線(シグモイド曲線と言われることもある)によりその関係が表されるのが一般である。このような相関にある信号強度と濃度とを検量に用いるために 4 係数ロジスティック曲線にフィッティングさせた回帰曲線が用いられる。フィッティングの手法には非

線形最小二乗法を用いる事が一般的であり、シンプレックス法はその代表的なアルゴリズムである。

特定原材料を対象とした ELISA 法の多数の実施者から得た情報をまとめると、回答者のほぼ全員が、使用するマイクロプレートリーダーに付属のソフトウェアを用い、特段の考慮なく検量線を作成しているとのことであった。一方で、マイクロプレートリーダーの販売者には複数があり、それぞれの機器に付属するソフトウェアに関する情報は少ない。さらに、各メーカーのソフトウェアに採用されている回帰分析の手法あるいはそれに含まれるアルゴリズムの違いによることが強く示唆される、分析実施者間での測定値の乖離についても知見を得ている。

本研究で用いたプレートリーダーにも 4 係数ロジスティック曲線に回帰するためのデータ解析ソフトが付属しているが、上記の状況を考慮すれば、その適正を検証せずに使用する事ができない。そこで実験計画に示した各種試料の 2 併行分析を 10 日間実施することにより得られた 10 本分の検量線データを対象に、シンプレックス法をアルゴリズムとする非線形最小二乗法を用いて、付属ソフトウェアを用いた解析とは別途、4 係数ロジスティック曲線にフィッティングさせ回帰曲線を作成し比較した。なお、この解析は、excel 上にアルゴリズムを含むフィッティング法をマクロとして構築し実行した。初期値は、サンドイッチ ELISA により得られる

一般的な吸光度と、フィッティングの内容を考慮し、 $a=0.001$ 、 $b=1$ 、 $c=100$ 、 $d=5$ とした。

牛乳を対象とした ELISA 法について、キットごとに典型的な 1 例の解析結果を図 2 に示す。付属ソフトウェアにより作成した回帰曲線を実線、同データを再解析して作成した回帰曲線を破線として示したが、2 社のキットともに個々に解析した 2 つの曲線がほぼ重なり、同時に示した実測の吸光度も本回帰曲線上にある(図中○で示した)。これらの結果から、付属ソフトウェアにより得られる回帰曲線はシンプレックス法をアルゴリズムとする非線形最小二乗法を用いたのと同様にフィッティングされていることが示唆された。また、この回帰曲線を検量に使用することが適正であると判断した。

図 2 に示した回帰曲線をキット A と B との間で比較すると、キット A の曲線がほぼ直線であるのに対し、キット B の曲線は高濃度範囲での湾曲の程度が大きい。また高濃度の標準タンパク質溶液(50 および 25 ng/mL)から得られた実測の吸光度も回帰曲線上から若干ずれて位置している。ELISA 法により得られる検量線データを 4 係数ロジスティック曲線にフィッティングして作成した回帰曲線を検量に用いる事が手順ではあるが、得られる吸光度によっては、フィッティングさせることに限界がある。限界を超えた検量線データを使用して作成した回帰曲線を用いて検量することは、正しい行為であると

は言えない。このフィッティングの限界あるいは検量に用いるのに適正な回帰曲線であるかは、先に言及したように、回帰曲線上に実測値がプロットされるかを指標に視覚的に確認することができる。また、回帰曲線の作成に使用したデータを、作成した回帰曲線によって模擬的に検量し、規定した量との乖離の程度を評価することで、検量線としての適正を定量的に確認することもできる。図 2 から示唆されるように、ELISA 法により測定することが規定されている標準タンパク質の濃度範囲には、吸光度と濃度との相関を一次回帰曲線によって近似可能と思われる範囲が含まれている。この濃度範囲から得られたデータから作成される一次回帰曲線の検量線としての適正について、次に解析した。

C.D.-4.(2) 1 次回帰曲線による検量の可能性

前述の通り、特定原材料を対象とした ELISA 法では、検量線を作成するために測定する標準タンパク質の濃度範囲が設定されており、この範囲には、得られる吸光度と濃度との相関を一次回帰曲線によって近似可能な範囲が含まれている。ELISA による測定の一般として、特段の必要が無ければ、一次回帰可能な濃度範囲で検量線を作成し、この範囲の吸光度を与えるように測定溶液中の特定タンパク質濃度を希釈して測定することを正しいとする考え方がある。先に言及したフィッティングの限界にも関係

するが、4 係数ロジスティック曲線にフィッティングさせた回帰曲線を検量線として使用するためには、吸光度データを適正にフィッティングさせることが前提としてある。この前提を満たしていることの証明や確認をすることの煩雑さを避けるためには妥当な考え方であろう。

そこで、本研究で得た検量線データからも、検量に使用可能な適正な一次回帰曲線が作成できるかについて、検討を行った。検討には、実験計画に示した各種試料の 2 併行分析を 10 日間実施することにより得られた 10 本分の検量線データを使用した。データはキットごとに解析した。1 本の検量線を作成するために使用可能なデータとしては、0、0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50 ng/mL(Std.1~Std.7)の濃度の標準タンパク質溶液を測定し得られた吸光度があるが、このうち、Std.6 および 7 また、Std.1 を解析するデータから除外し作成した一次回帰曲線についてもその適正を検討した。適正であるか否かは、作成した一次回帰曲線を用い、作成に使用した吸光度の実測値を模擬的に検量して得た値を戻し値とし、戻し値と規定した濃度との差を百分率として表した値(バイアス%)の絶対値により判断した。正負問わず最大となったバイアスの絶対値が、15 以下の場合に適正と判断した。結果を表 4 に示す。

まず牛乳と卵の結果を比較すると、両社のキットともに、牛乳でのバイアスがより

大きいことが分かる。キット間で比較すると、牛乳と卵ともにキット B のバイアスが大きい。全検量点中最低あるいはそれに次いで低い濃度の標準タンパク質を含む Std.1 と 2 については、バイアスの中央値と最大または最小値との乖離の程度がより高濃度の検量点に比べて大きい。

表中では、バイアスの絶対値が 15% 以下の場合を太字で示した。牛乳を対象とするキット A については、Std.0~7 の全てのデータを回帰分析に用いても Std.3~Std.7(3.12~50 ng/mL)の範囲でバイアスが 15%以下であった。Std.1 と 7 を解析から除外した場合にも、Std.3~Std.6(3.12~25 ng/mL)の範囲ではバイアスが 15%以下であった。一方で、キット B については、Std.1 と 7 とを除いた場合に Std.4 と 5(6.25 ng/mL および 12.5 ng/mL)の範囲でのみ 15%以下となった。卵を対象とするキット A については、Std.0~7 の全てのデータを回帰分析に用いても Std.2~Std.7(1.56~50 ng/mL)の範囲でバイアスが 15%以下であった。Std. 7 を解析から除外することで、Std.1~Std.6(1.56~25 ng/mL)の範囲のバイアスが 15%以下となった。一方で、キット B については、Std.0~7 の全てのデータを回帰分析に用いた場合に Std.3~Std.7(3.12~25 ng/mL)の範囲でバイアスが 15%以下、Std. 1 と 7 を解析から除外しても、バイアスが 15%以下となる範囲は変わらなかった。

上記の結果には、まず、同じ濃度の標準タンパク質溶液を併行測定して得られた 3 ウェル間での吸光度のばらつきが反映されているものとする。表 5 に本解析に使用した全ての吸光度データについて、標準タンパク質の濃度ごとに一元配置の分散分析を行い、併行(ウェル間)、日間またそれらを統合したばらつきを推定した結果を示した。表 4 と表 5 を比較すると、吸光度のばらつきと検量可能と判断される濃度範囲とがよく一致していることが確認できる。一般に、同濃度の標準タンパク質を併行測定して得られる吸光度のばらつきは、一次回帰曲線の信頼区間を広げる要因となるため、可能な限り小さいことが望ましい。また、併行測定される吸光度のばらつきとは別に、4 係数ロジスティック曲線へのフィッティングの限界として言及したことが、一次曲線への回帰にも同様に当てはまる。繰り返し試行のアルゴリズムを用いていることから分かるが、4 係数ロジスティック曲線への回帰は探索型である。一方、一次曲線への回帰も最小二乗法によるが、その解は一意に定まる。4 係数ロジスティック曲線へのフィッティングの限界と同様に、誤った解を与える吸光度データは一次曲線への回帰に使用すべきではない。

4 係数ロジスティック曲線に回帰させた曲線に対して同様の解析を行った場合にも、戻し値の規格値に対するバイアスが 15%程度の大きさで観察されることが

ある。そのような検量線データから回帰曲線を作成する場合には、目視により回帰曲線と実測値との乖離の程度が大きい検量点であることを確認し、50 ng/mLの標準タンパク質から得られた吸光度データを除外して再解析を行った。表4の結果からは、回帰に使用するのが適切な吸光度を与える濃度範囲をキット別に確認し、適切な濃度の標準タンパク質溶液を、必要な点数分調製し、これを設計とすれば、一次回帰曲線によっても適正に検量できる可能性が強く示唆される。キット間で検量線の設計が異なることも予測されるが、同じ設計である必然性もない。また検量の濃度範囲についても、定量を意図する濃度が明らかなため、測定液の希釈に不都合を生じない程度の幅を持った範囲であればよいと考える事もできるだろう。

C.D.-5 測定値の不確かさの推定

C.D.-5-(1) 吸光度の検量と測定値の特性

これまでに、測定値の不確かさに寄与する要因となることが予測された、ピペティング精度、吸光度の測定、ELISA法における抗原抗体反応の結果得られる物質の吸光度、また検量に使用する回帰曲線の適正について検討を進めてきた。その結果、適正な検量を前提とすれば、ELISA法における抗原抗体反応の結果得られる吸光度のばらつきが、測定値の不確かさの支配的要因となることが明らかとなった。次に、各試料を規定し

た実験計画に従い分析して得られた測定値(試料重量あたりの特定タンパク質量)に基づき、測定値の不確かさを推定することとした。なお、一次回帰曲線による検量の可能性を示唆したが、キット付属の分析手順および通知等に示されていることから、検量には4係数ロジスティック曲線にフィッティングさせた回帰曲線を用いた。測定値は、3ウェル併行により得られたそれぞれの吸光度を検量し、得られた値の平均値とした。試料(畜肉ソーセージあるいはCRM)、畜肉ソーセージを試料とした場合の抽出時間、1日に併行分析した分析ポジションを区別し、各試験区の全測定値の平均値、SDおよびRSD%を求め表6に示した。参考として、表7には、同一の吸光度データをStd.2~Std6(1.56~25 ng/mL)の範囲で作成した一次回帰曲線により検量して得られた測定値を表6と同じ表形式により示した。表6と7とに示した結果の比較により、標準偏差を考慮すれば、検量に使用する回帰曲線の種類が異なっても、各試料から選られる測定値の平均値に差があるとは言えないことが強く示唆される。また、試験区ごとにRSD%を比較すると分かりやすいが、一時回帰曲線を検量に使用した場合のほうが、測定値のばらつきは小さい。

表6に示した結果を概観すると、同一試料を同一条件で分析して得られる測定値であっても、使用するキットによって異なることが推測される。これは主に、キ

ットに採用されている抗体の特性を反映した結果であって、事前に予測されていた。本研究で使用した CRM には、牛乳について 10 µg/g、卵について 5µg/g の濃度が認証値として付与されていた。この認証値と表 6 に示したキット A および B から得られた測定値の乖離も、抗体の特性を反映した結果と考えられる。抗原そのものが異なる可能性や、標準タンパク質を添加していた場合には、その純度が異なっていることも可能性として考えられる。表 8 には student's-t 検定により平均値の差を検定した結果を示した。表 8-1 には畜肉ソーセージを試料とした同試験区について、表 8-2 には CRM について、キット A と B 間での検定結果を示している。予測のとおり、危険率は異なるものの、2 つのキットを用いて得られる測定値の平均値の差は有意であった。特定タンパク質に含まれる抗原の抗体への反応性は、熱による変性や物理的な破壊によって変化しうる。そのため、分析法の重要な性能パラメータである真度を評価する上で仮定する真値が、添加量等の意図した値から、加工の過程を経ることにより変化している可能性は否定できない。このような現実を踏まえて厚生労働省が示した「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」においても、満たすべき真度の目標値が 50~150%と、その他一般的な理化学試験に比べ、広い範囲に設定されている。これらの背景を踏まえれば、両キットにより得られる測

定値の平均値に有意差が認められても、ガイドラインに示された性能をそれぞれが満たしていれば、制度に伴う検査を目的とした使用に関して許容されるものであり、特段問題にすべきではない。

一方、抽出時間が測定値に影響していれば、同一キットを用いて得られる測定値のばらつきの要因になり得る。表 8-3 には、畜肉ソーセージを試料としてそれぞれのキットで得られた測定値の差を、抽出時間間で検定した結果を示した。牛乳を対象とする両キットについては、抽出時間を 25 時間として得られた測定値と、15 時間として得られた測定値の差には有意差が認められなかった。つまり、今回試料として用いた畜肉ソーセージのような食品であっても、15 時間以上抽出すれば、抽出時間が測定値に有意な差を生じる要因にはならないことが示唆された。一方で、卵を対象とした場合には、キット B で得られた測定値についてかろうじて p 値が 0.05 を上回っているものの、抽出時間を 25 時間とした場合に得られた測定値と 15 時間とした場合に得られた測定値に有意な差が認められる。25 時間と 15 時間、また 15 時間と 5 時間の間で測定値の差を検定した結果は、p 値が 0.01 を大きく下回っている。キット付属の手順書には、抽出時間は 12 時間以上と記載されている。抽出の過程では、個体状の試料を分散し、複雑な食品マトリクスからタンパク質を抽出液に溶出する。さらに、抗原と抗体の物理的接触を

可能とするために、タンパク質を変性させる。多様な食品を用いた検討結果から上記抗原抗体反応が進行するために必要な条件を満たすための抽出時間として12時間が設定され、その条件下で分析法の妥当性も確認されたものと推測する。12時間以上と書かれていることから、これは抽出に必要な最小時間の目安と考えるべきである。さらには、表 8-3の結果から示唆されるとおり、12時間では抽出効率が最大に達しない食品が存在する可能性もあることから、一定の抽出時間を規定することが、同一試料から得られる測定値のばらつきを大きくしないために有効と考える。さらに、異なる2つの試験室で得られた測定値として仮定すれば、同一試料を分析して得られた測定値に有意差が認められた場合の要因として、抽出時間の確認は不可欠であると言える。

C.D.-5-(2) 測定値の不確かさの推定

試験区ごとにキット A ならびに B を使い、1日2併行分析を10日間実施して測定値を得た。これらキットと試験区の組み合わせごとの測定値をデータセットとして分散分析を行い、算出された分散に基づき、併行、日間またそれらを総じた測定値のばらつきを推定し、SD ならびに RSD% として表 9 に示した。ここで、総じたばらつきとは、測定値に含まれるばらつきの要因を併行条件と日間条件とに分解して分散を算出し、それらを合成した分散に基づき推定された値であり、単

一試験室内での測定値のばらつきに相当する。

牛乳を含む CRM での結果を除き、測定値のばらつきは、併行条件に比べ日間で大きい。結果を概観すると、全ての試験区について、キット B により得られた測定値のばらつきがキット A で得られたばらつきに比べて大きい。また、牛乳の測定結果と卵の測定結果を比較すると、両キットともに卵について得られた測定値のばらつきが必ず大きい。測定値のキット間比較の結果は、表 3 に示した規定濃度の標準タンパク質を測定した吸光度のばらつきの比較からも示唆されたとおりの結果である。牛乳に比べ卵の測定値のばらつきが大きい結果については、抽出時間が測定値に有意な差を生じる要因になる可能性を示唆した表 8-3 に示した結果によっても補足される。本研究において抽出時間は厳密に管理した。測定値のばらつきのより直接の原因については厳密に考えていけば、それは時間ではなく、その時間内に起こっている特定タンパク質の抽出と変性の効率である。これらの効率は、分析対象となる食品によって変わりうるものと考えられる。本研究で用いた畜肉ソーセージにおける効率が低いあるいは不安定であったのであり、その他の食品についても同じ事が言える訳ではない。

分析手順書に指示されている抽出時間に近い15時間を抽出時間とした試験区から得られたばらつきを、分析を行っ

た試験室での測定値の標準不確かさ(RSD%)とすれば、牛乳についてキット A を用いた場合には 5.5%、キット B を用いた場合には 10.8%と推定される。また、同様に卵についてキット A を用いた場合には 15.3%、キット B を用いた場合には 19.8%と推定される。用いるキットが異なる大きさと測定値の不確かさに寄与することは明らかである。しかし、寄与の大きさは、対象とする特定タンパク質とその濃度、さらには食品の種類によっても変わる可能性が高いと考えられる。

E. 結論

生化学分析法の代表的な例として、特定原材料(牛乳および卵)を対象とした ELISA 法を取り上げ、単一試験室内で規定した計画に従い分析を行った。その結果得られた測定値に基づき推定された測定値の不確かさは、分析に使用するキットにより異なり、牛乳の測定値については 5.5%あるいは 10.8%、卵については 15.3%あるいは 19.8%であった。本分析法により得られる信号である吸光度を適正に検量するために使用可能な回帰曲線についても検討し、一次曲線の使用可能性を示した。

分析手順に含まれるピペッティング精度、吸光度の測定精度に関する検討結果も踏まえれば、本分析法を用いて得られる測定値に付随する不確かさへの寄与が最も大きく支配的となる要因は、キットの主要な要素である、抗原抗体反応であることが強く示唆された。

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

渡邊敬浩、白政優子、松田りえ子；第 99 回 日本食品衛生学会学術講演会(2010年5月13~15日；東京都)

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

	Repeatability			Between day			Reproducibility (within laboratory)		
	Ave.	SD	RSD%	SD	RSD%	SD	RSD%	SD	RSD%
1	1.0	0.003	0.3	0.003	0.3	0.004	0.4		
Volume 5	5.0	0.019	0.4	0.027	0.5	0.033	0.7		
10	10.0	0.040	0.4	0.074	0.7	0.084	0.8		

表1 ピペッティング精度の推定結果

	40 mg/L						20 mg/L						4 mg/L														
	1	2	3	4	5	6	total	1	2	3	4	5	6	total	1	2	3	4	5	6	total	1	2	3	4	5	6
repeat	0.83	0.83	0.84	0.83	0.83	0.83	0.83	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
Ave.	0.83	0.83	0.84	0.83	0.83	0.83	0.83	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
1st SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1st RSD%	0.4	0.6	0.6	0.4	0.6	0.7	0.6	0.4	0.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
Ave	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
2nd SD	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2nd RSD%	0.5	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7	1.0	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

SDは0.01未満の場合に0.00として表記

表2 化学物質を用いた測定による吸光度のばらつきの評価