

図4 大根漬け部位別ソルビン酸濃度の安定性(作製0日および60日後)

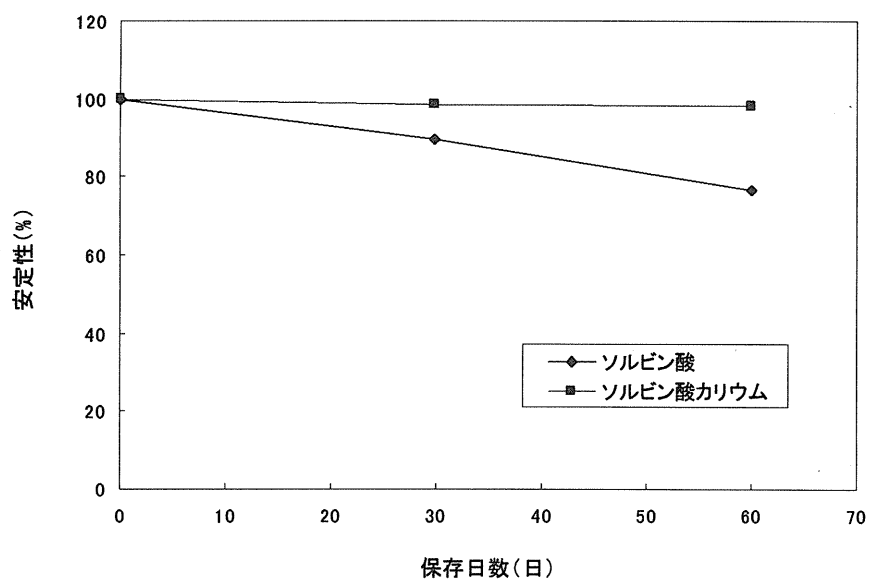


図5 ソルビン酸およびソルビン酸カリウム添加によるガムシロップ中のソルビン酸濃度の安定性

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の作製と
信頼性確保に関する研究(その2)

—セレウス菌検査用調査試料およびビブリオ属菌検査用調査試料の
新規開発に関する基礎的検討—

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	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 室長
研究協力者	山田 健一	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	山本奈々美	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	梶原三智香	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	梅津 麻実	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨

これまでの研究結果から米飯を基材とした場合にセレウス菌検査用調査試料として使用しうる可能性を示唆したが、添加菌の安定性をより確保することを目的として菌液添加した基材を7日間冷蔵保存した後に、各種温度で保存した際の添加菌数の変動について検討した。その結果、*B. cereus*ではいずれの温度帯においても比較的安定的に菌数が保存35日目まで推移したのに対して、陰性対照菌では32.5℃で保存することにより菌数の著しい増加が認められた。また、*B. subtilis*では22.5℃での保存によっても菌数の増加が認められた。

一方、ビブリオ属菌についてはこうや豆腐中に接種した対象菌は冷蔵保存により著しい菌数の減少を認めたことから、本年度は冷凍保存時の添加菌の安定性について確認することとした。併せて、グラム陽性菌の発育を阻害するためナイシンを添加し、この影響についても確認した。その結果、凍結保存14日目までは接種菌数と同等の回収が得られたが、その後次第に減少し、保存36日目には2オーダー程度の減少が認められた。さらに、ナイシン添加試験では液体培地中に添加する前に解凍操作の有無による検出菌数の変化を確認したが、大きな差異は認められなかった。

以上のことから、セレウス菌検査用調査試料は外部精度管理調査においても菌数測定用基材としても有用である可能性が高いものと考えられた。また、ビブリオ属菌においても冷凍保存することによりこれまでに開発した基材を用いて定性検査としての外部精度管理調査の実施は可能であるものと考えられた。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査(衛生指標菌および食中毒病因微生物検査)試料の作製にあたり、とりわけ考慮しなければならない事項として、「実食材を基材とした調査試料の開発」と「試験菌(標準菌株)の選択」ならびに試験に用いる培地の組み合わせでの反応性が挙げられる。これまでに外部精度管理調査試料の定性検査用試料として、大腸菌群、E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌の4種について提供してきた。しかしながら、食品検査における微生物検査はこれら以外にも多数存在することから、実際の微生物検査を見据えた調査項目の選定が必要である。また、外部精度管理調査では参加機関からの意見として、実際の食材に近いものを提供してほしいとのことであるため、単に検査対象菌種の安定性を保証し、寒天培地等を用いて検査対象菌のみを提供することはできない。そのため、採用する食品基材中においても接種菌の安定性を保証する必要がある。セレウス菌は、土壌、塵埃、汚水等に存在しており、食品の腐敗菌として広く知られていることに加え、耐熱性芽胞を形成するため、加熱処理することによっても完全に死滅させることが困難であることから、品質管理上大きな問題となりうる。さらに、本菌による食中毒は感染型と毒素型の両者が認められている。一方、ビブリオ属菌は、水中に多く生息しているが、耐塩性を有しているために海水中にも存在することから、魚介類の生食による食中毒の原因としても挙げられる。

外部精度管理調査用試料は、その試料を用いて共同試験を実施することから、試料中の均一性と安定性が保証されなければならない。また、特に微生物検査の場合には通常採

用される検査方法に基づいた定性検査を実施したときに、その選択培地上で明らかに陽性、陰性が調査試料の配布から1ヶ月間に亘って判定できることが求められる。さらに、定量検査が指定されている検査項目については菌数の変動やばらつきを考慮した調査試料を提供する必要がある。

そこで、本年度はセレウス菌検査およびビブリオ属菌検査を対象とした調査試料作製を目標として、基材を用いた接種菌の安定性に関する検討を行うこととした。

B. 研究方法

1. 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所に保存してある以下の菌株を用いた。

セレウス菌検査用

Bacillus cereus HIC 080115

Bacillus cereus HIC 080117

Bacillus cereus HIC 100172

Bacillus subtilis HIC 100165

Bacillus megaterium HIC 080136

ビブリオ属菌検査用

Vibrio parahaemolyticus HIC 090153

Vibrio fluvialis HIC 090156

なお、試験菌株は5継代以内のものを使用した。

枯草菌 6633 (E-MN11)は栄研化学より購入した。

2. セレウス菌検査用菌株の芽胞液作製

上記のセレウス菌検査用菌株をMnSO₄を含む普通寒天培地に接種し、32.5°Cで7日間培養した。培養終了後、生理食塩液に懸濁させ、芽胞液を得た。なお、調製した芽胞液について芽胞染色を行い、芽胞形成を確認した。

また、芽胞液は使用まで冷蔵保存した。

3. セレウス菌検査用基材の作製

市販の白米について、121°Cで60分間のオートクレーブ滅菌を行った後、これに15% NaCl溶液に懸濁した各種芽胞液を添加し、完全に水分が吸収され米飯状となったことを確認し、これをセレウス菌検査用基材(米飯)とした。

4. セレウス菌検査用試料における安定性の確認

セレウス菌検査用基材を7日間4°Cにて保存した後、さらに4°C、22.5°Cまたは32.5°Cで35日間保存した。なお、7日ごとに経時的にソイビーン・カゼイン・ダイジェスト(SCD)寒天培地を用いた生菌数測定を行った。生菌数測定は32.5°Cで24時間培養した後の形成集落数を計測することにより算出した。

5. ビブリオ属菌の基材中での安定性の確認

ビブリオ属菌を2%ゼラチン加 Marine brothで24時間前培養した後、2%ゼラチン加 Marine brothで 10^3 倍希釈したものを試験菌液とした。試験菌液 20 mL、基材および2%ゼラチン加 Marine brothを加え、合計重量が100 gとなるようにした。これを-20°Cにて保存し、経時的に Marine agarを用いて生菌数測定を行った。なお、保存期間は71日までとした。保存終了後、基材を取り出し Marine brothまたはアルカリペプトン水に懸濁することで10倍希釈溶液を作製した。なお、10倍希釈溶液の作製では冷凍保存した基材について1時間の室温放置による解凍、または解凍なしの2種の方法を採用した。生菌数測定は Marine agarを用いて行った。

6. ビブリオ属菌検査用調査試料に添加するナイシンのグラム陽性菌に対する効果の検討

S. aureus, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*

の重層寒天平板を作製した。これに力価試験用ステンレスカップを4か所に設置し、これに400 ppm および 3.125 ppm のナイシン溶液を250 μ L ずつ注入した。寒天培地を37°Cで24時間培養した後、寒天培地上の阻止円形成を確認した。

7. ビブリオ属菌検査用調査試料に添加するナイシンの滅菌方法の影響

400 ppm のナイシンを含む Marine broth を作製し、これをろ過滅菌した後、高圧蒸気滅菌した。これらの溶液に *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus* または *V. fluvialis* を 10^6 cfu/mL となるように添加し、これを37°Cで保存した。保存開始日、1日目、6日目にそれぞれ SCD 寒天培地または Marine agar を用いて生菌数測定を実施した。なお、試験対照としてナイシンを含まない Marine broth を用いた。

C. 研究結果

1. セレウス菌検査用基材作製における食塩濃度の影響

外部精度管理調査試料を作製するにあたり、とりわけ菌数測定も行う場合には、基材に接種した添加菌の長期間の安定性と温度変化に強いことが求められる。これまでの検討結果から、米飯基材を用いることにより、陽性対照菌において、各種選択定性培地にて明らかな典型集落形成を認め、かつ冷蔵保存において安定した菌数を得たことから、外部精度管理調査試料として使用できる可能性が示唆された。一方、陰性対照菌では一部の選択定性培地では集落形成を認めないものの、陽性対照菌と明らかな判別ができることから、上記結果を踏まえて少なくとも定性検査用の調査試料としては採用できるものと考えられた。そこで本

年度は、定量検査を踏まえた輸送時の温度変化の影響を考慮し、冷蔵保存後に各種温度で継続的に保存した際の米飯基材中の試験菌数変動を観察することとした。すなわち、セレウス菌検査に使用することを前提とした陽性対照菌または陰性対照菌を米飯基材に添加した後、冷蔵保存にて 7 日間、その後冷蔵、22.5°C または 32.5°C で 35 日間保存した際の菌数変動を確認した。その結果、陽性対照菌では *B. cereus* HIC 080115 および HIC 100172 ではいずれの保存条件下においても 35 日目まで安定した菌数が得られた(図 1)。これに対して、*B. cereus* HIC 080117 ではわずかに減少傾向が認められたが、*B. cereus* HIC 080117 ではいずれの保存温度においても大きな差異は認められなかった。一方、陰性対照菌では使用した *B. subtilis* HIC 100165、枯草菌 6633 (E-MN11)、*B. megaterium* HIC 080136 のいずれにおいても 32.5°C 保存で著しい菌数の増加が認められた(図 2)。さらに *B. subtilis* HIC 100165 では 22.5°C での保存によっても著しい菌数の増加が認められた。

2. ビブリオ属菌検査用調査試料の冷凍保存時の安定性

これまでの検討からビブリオ属菌検査用調査試料として Marine broth に接種した菌液を使用し、かつこうや豆腐を用いることにより 22.5°C での保存により長期間に亘り安定した菌数を確保することができた。しかしながら、22.5°C での保存後に冷蔵あるいは冷凍保存することにより、その接種菌数は著しく減少した。少なくとも定性検査を実施するうえでは十分に検出できる範囲ではあるが、より安定化をはかるため、凍結保存時の菌数変動について観察した。その結果、凍結後 14 日目では接種菌数とほぼ同等の菌数が残存していたが、さら

に保存期間を延長することにより、36 日目では 1~2 オーダーの減少が認められ、保存 71 日目にはほとんど検出されなかった(図 3)。また、凍結後の基材について、解凍せずに液体培地中に添加した場合と、1 時間の室温放置により解凍した場合とでの生残菌数の差異について観察したが、大きな差異は認められなかった。

3. ビブリオ属菌検査用調査試料に添加するナイシンのグラム陽性菌に対する効果

こうや豆腐が乾物であることを考慮すると基材中に *Bacillus* 属菌の混入の可能性も否定できない。そのため、グラム陽性菌に対して抗菌効果を示すナイシンの影響について確認した。すなわち、*S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli* の合計 4 菌種を用いて、日本薬局方に記載されている力価試験、円筒平板法と同様の手法で Marine broth に懸濁したナイシンの効果を確認した。その結果、400 ppm のナイシンが *S. aureus* および *B. subtilis* に対して抗菌効果を示したが、*P. aeruginosa* および *E. coli* では阻止円の形成が認められなかった(図 5、6)。

4. ビブリオ属菌検査用調査試料に添加するナイシンの滅菌方法の影響

上記の検討においてナイシンが Marine broth 共存下においてもグラム陽性菌に対して抗菌効果を示したことから、ナイシンのろ過滅菌または高圧蒸気滅菌処理後に基材中において同様の抗菌効果を示すかについて検討した。すなわち、Marine broth 中で最終濃度が 400 ppm となるように調製したナイシンをろ過滅菌または高圧蒸気滅菌した後に、*S. aureus*、*B. subtilis*、*P. aeruginosa*、*E. coli*、*V. parahaemolyticus* および *V. fluvialis* に対する影響を観察したところ、いずれの菌種に対して

も抗菌効果を示さなかった(図 7, 8)。

D. 考察

外部精度管理調査にセレウス菌と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て、基材作製ならびに基材中での安定化を検討するための基礎的検討を行った。これまでの検討から確立したセレウス菌検査用米飯基材が長期間に亘って安定的に添加菌を回収することができることが明らかとなった。さらに、本基材を用いることにより各種選択性培地において陽性対照菌が典型集落を形成することを明らかとした。これらの事実は、外部精度管理調査試料として定性検査のみならず定量検査を含めて採用することが可能であることを示唆するものである。そこで、本研究では対照菌を接種した基材に温度負荷をかけることによっても安定的な菌数が得られるかについて確認することとした。その結果、少なくとも陽性対照菌では冷蔵から 32.5°C までの広い温度範囲においても保存 35 日目まで安定的に菌数が回収できることが明らかとなった。外部精度管理調査試料では指定された輸送環境の維持や正しい温度での保存が求められるが、微生物検査を行う場合、特にこれらの点が厳密に管理される必要がある。しかし、配送業者においても配送時の温度管理を行っているとのことであるが、実際には冷蔵で送付したにも関わらず到着時の温度が 10°C を超えていた等の報告もある。このことを踏まえると、輸送や保存条件の逸脱にも耐えうるような基材を開発することが望まれる。今回のように 32.5°C においても長期間に亘って安定した菌数が確保できたことは定量検査における菌数測定結果のばらつきを小さくするうえでも有効であると考えられる。これに対して陰性対照菌では 32.5°C

では添加菌数の増加が認められた。セレウス菌では陽性菌の菌数測定を行うことから、定性検査において陰性と判定される場合には菌数測定が実施されることはない。そのため、菌数の増加が認められたとしても検査結果に対して影響を及ぼすことはないものと考えられるが、場合によっては偽陽性を疑うこともありうることから、なるべく陽性対照菌と同等の菌数確保が望ましい。少なくとも今回の検討では長期間に亘って温度負荷をかけた場合の菌数変動を観察したが、短時間であれば今回観察されたほどの菌数の増加は認められないと考えられることから、外部精度管理調査試料としては採用することは可能であると思われる。

一方、ビブリオ属菌検査では、これまでの検討から Marine broth に懸濁したビブリオ属陽性対照菌が室温において長期間に亘り安定的に回収できること、ならびにこうや豆腐を基材として採用したところ、菌液のみと同様に長期間の安定性が担保できることが明らかとなったが、冷蔵保存により著しい菌数減少が認められた。検査機関における検体の保存は一般的に冷蔵保存あるいは冷凍保存であることを考慮すると、この結果は調査試料を受領した検査機関において SOP には通常掲載されていない方法で保存する可能性を示唆している。外部精度管理調査は通常検査機関で実施している検体の保存方法に従って処理されることが望ましいことから、今回は冷凍保存における安定性について確認した。その結果、冷凍後 14 日目までは接種菌数と同等の菌数が得られたが、保存期間の延長に伴い菌数の減少が認められた。少なくとも今回の検討では凍結後 36 日目には 1~2 オーダー程度の菌数減少が認められたことから、本基材を定性検査として使用する場合には、実施が可能であるもの

と考えられた。しかしながら、送付前の調査試料作製期間を考慮すると、さらに長い時間の安定性が担保されることが望ましいことから、さらなる検討が必要であるものと考えられた。また、これまでの検討から室温では非常に安定であったが、この情報を調査試料の保存条件として記載することも可能ではあるが、誤って到着後に冷蔵あるいは冷凍保存される可能性も否定できないことから、これらの温度域での安定性が必要であると考えられる。

また、基材の採用候補として挙げているこうや豆腐は乾物であることから *Bacillus* 属といったグラム陽性菌が存在することが考えられる。そのため、検査対照菌以外の菌種について除去することを目的として、ナイシンのグラム陽性菌に対する効果を確認した。その結果、*S. aureus*、*B. subtilis* に対して抗菌効果を示したことから、ナイシンをこうや豆腐基材に添加することによりグラム陽性菌の発育を阻害できる可能性が示唆された。しかしながら、ナイシンをろ過滅菌あるいは高圧蒸気滅菌することによりナイシン無添加群と差異のない結果が得られたことから、高圧蒸気滅菌に伴う失活やメンブランフィルターへの吸着の可能性が考えられた。そのため、ナイシンの調製方法について今後検討する必要があるものと考えられた。

E. 結論

外部精度管理調査における新規項目を導入することを目的として、セレウス菌検査およびビブリオ属菌検査に関する調査試料の作製を試みた。

セレウス菌用調査試料では、これまでに確立した米飯試料を用いて温度負荷をかけた際の添加菌数の変動について観察した。その結果、陽性対照菌である *B. cereus* では 4°C から

32.5°C のいずれの温度範囲においても保存 35 日目まで安定的に菌数を得ることができた。これに対して、陰性対照菌では 32.5°C では添加菌が増加する傾向が認められたが、4°C の保存では菌数に大きな変動は認められなかった。

一方、ビブリオ属菌では冷凍保存時の安定性について検討したが、冷凍保存後 36 日目には 1~2 オーダーの菌数減少が認められた。この結果は本調査試料を定性検査用として使用することを前提とした場合には使用できる可能性が高いことを示唆している。しかし、保存期間の延長により菌数減少が認められていることを考慮すると、より一層の安定性を確保する必要があるものと考えられた。これまでの検討では冷蔵保存により著しい菌数減少が認められたことから、これと比較すると冷凍保存のほうが安定であるとも考えられるが、室温保存時の安定性を加味すると、まだ安定性を担保できたとはい切れない状況にある。さらにビブリオ属菌の検出を確実にするために、調査試料の作製の際に混入する可能性が考えられるグラム陽性菌を除去することを目的としてナイシンの効果について検討した。その結果、円筒平板を用いた抗菌試験では 400 ppm のナイシン存在下で *S. aureus* および *B. subtilis* において明らかな阻止円形成が認められた。しかし、ナイシンをろ過滅菌あるいは高圧蒸気滅菌した後に、グラム陽性菌を対象とした抗菌作用の確認では明らかな効果が認められなかった。これには高圧蒸気滅菌に伴う失活やメンブランフィルターへの吸着の可能性が考えられた。このことから、ナイシンを用いたグラム陽性菌の発育阻害を考慮するうえではその滅菌方法についても検討す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

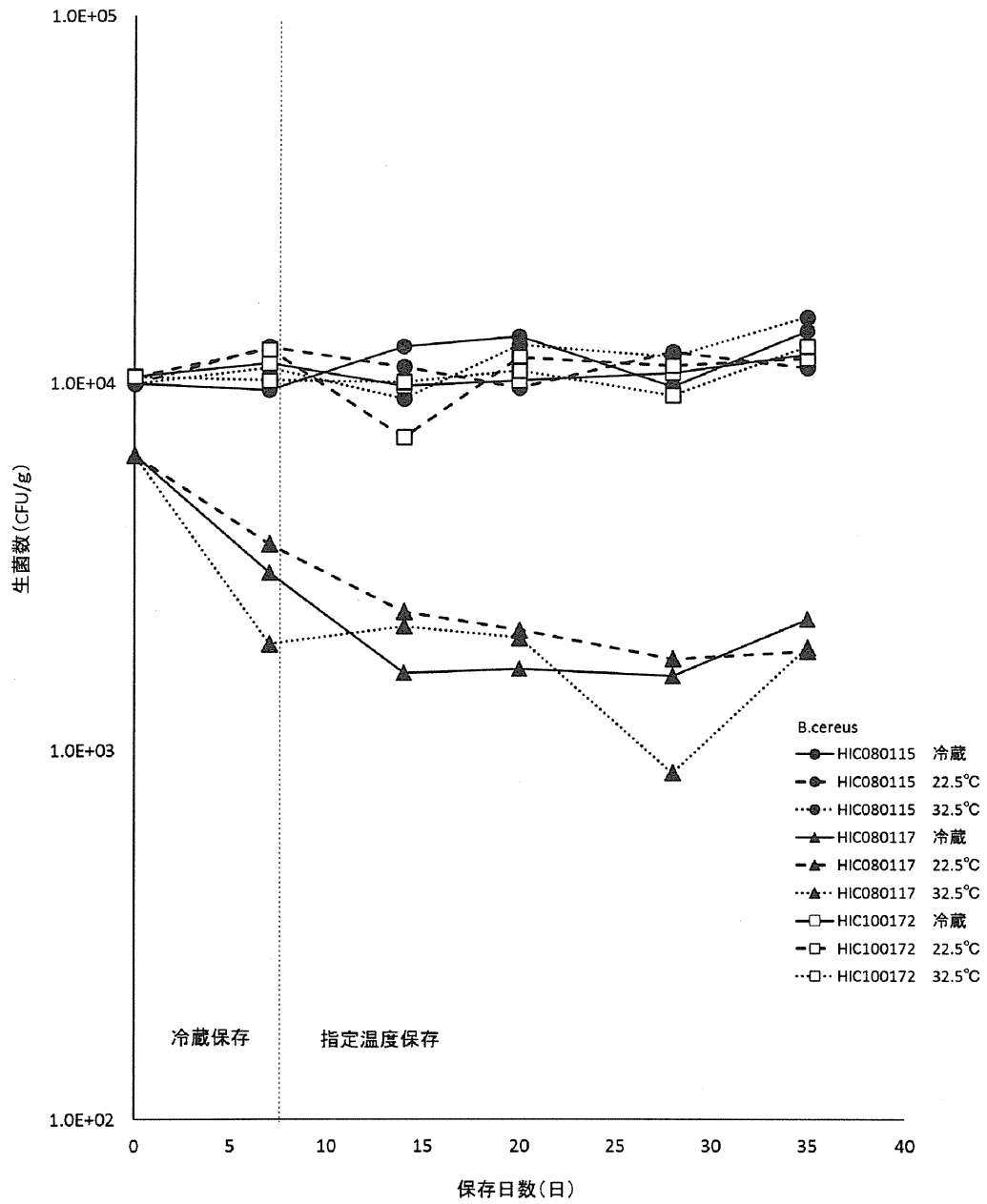


図1 セレウス菌検査用調査試料の各種保存温度における安定性の確認(陽性対照菌)
7日間冷蔵保存した後、指定温度にて保存した。

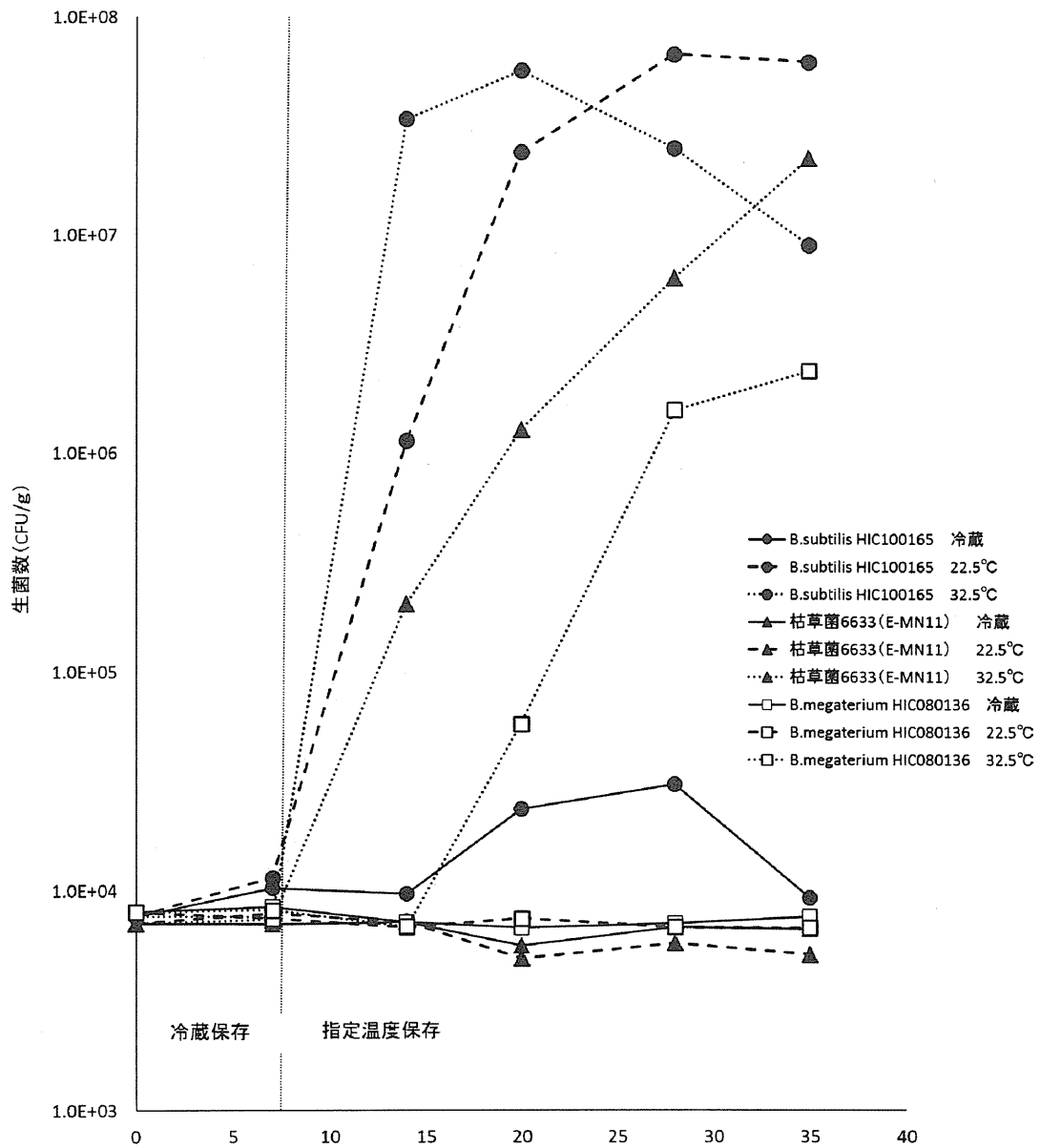


図2 セレウス菌検査用調査試料の各種保存温度における安定性の確認(陰性対照菌)
7日間冷蔵保存した後、指定温度にて保存した。

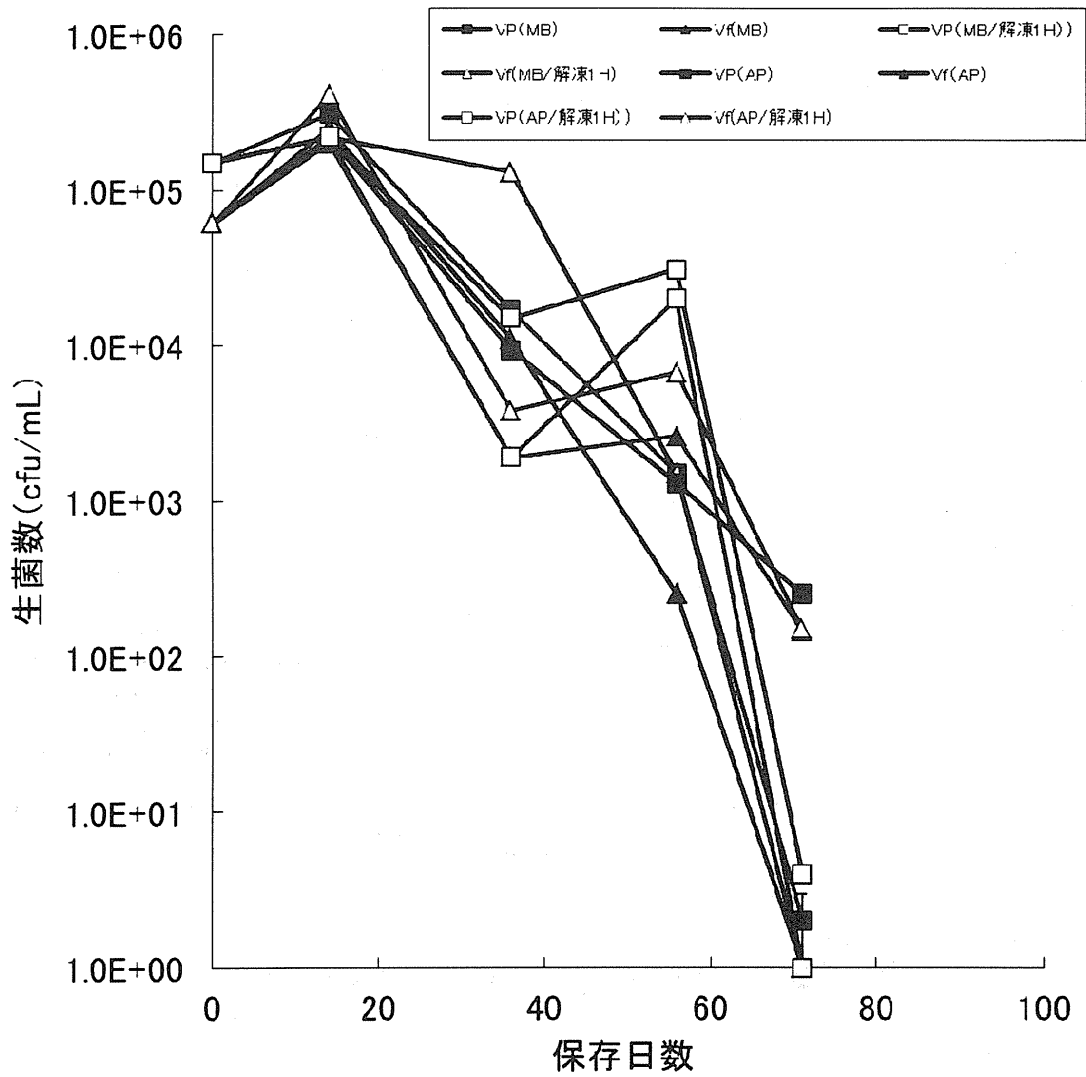


図3 ビブリオ属菌検査用調査試料の冷凍保存時の安定性確認

VP: *V. parahaemolyticus*, Vf: *V. fluvialis*

MB: Marine broth、AP: アルカリペプトン水

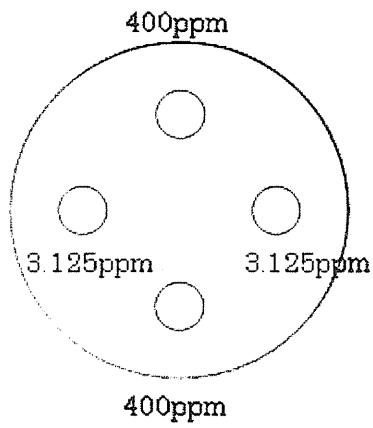


図4 ナイシンの抗菌効果の確認における
円筒平板法での接種濃度

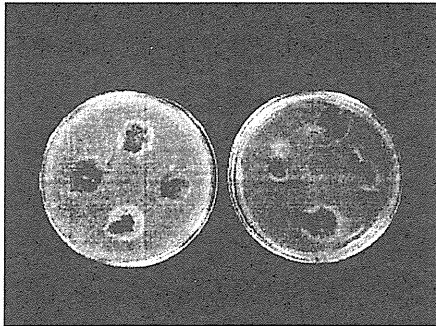


図5 ナイシンの阻止円形成を指標
とした抗菌効果
(右) *B. subtilis*
(左) *S. aureus*

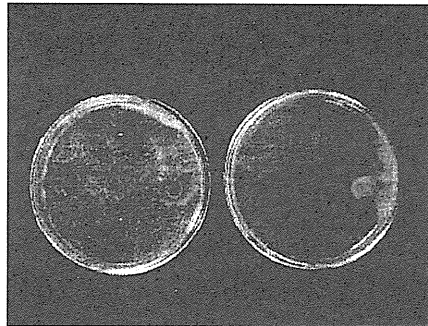


図6 ナイシンの阻止円形成を指標
とした抗菌効果
(右) *E. coli*
(左) *P. aeruginosa*

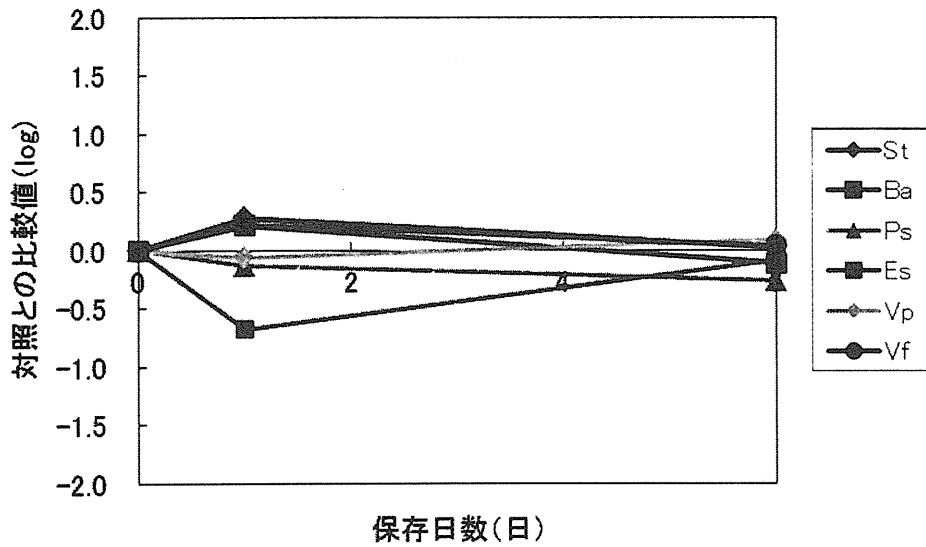


図7 ろ過滅菌したナイシンの各種供試菌に対する抗菌効果

St: *S. aureus*, Ba: *B. subtilis*, Ps: *P. aeruginosa*, Es: *E. coli*

Vp: *V. parahaemolyticus*, Vf: *V. fluvialis*

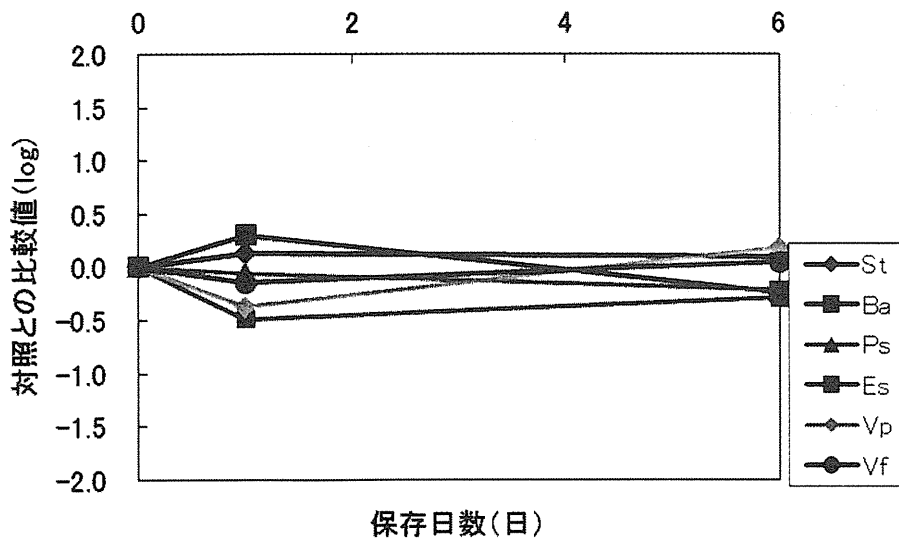


図8 高圧蒸気滅菌したナイシンの各種供試菌に対する抗菌効果

St: *S. aureus*, Ba: *B. subtilis*, Ps: *P. aeruginosa*, Es: *E. coli*

Vp: *V. parahaemolyticus*, Vf: *V. fluvialis*

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の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	秦野研究所	所長
分担研究者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所	室長
協力研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部	部長
	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。本年度は昨年度試料調製を検討したエビ添加試料およびカニ添加試料を用いて、ELISA 法による甲殻類タンパク質(エビ・カニタンパク質)測定を対象とした外部精度管理の模擬試験を実施した。調製試料はそれぞれについて均一性および試験期間内の安定性を確認した。通知の ELISA キットは甲殻類タンパク質においてもマイクロプレートマネージャー Ver.5 の Logistic 4PL 解析では回帰曲線がプロットと一致しなかったため、当該プログラムを使用した機関の報告値は Logistic 5PL 解析により再計算した値を以後の解析に用いた。協力機関からの報告値の室間再現性は昨年度の乳と比べ同程度であったが、検量線用標準液測定のウェル間の再現性が悪い測定がいくつか認められた。

模擬試験試料が確認試験にも使用できるか検討した。エビ、カニ DNA を抽出した結果、DNA 収量は基材によって大きく異なった。このため PCR では同量のエビ添加液を加えた試料でも DNA 収量の少ない試料ではエビ DNA が検出された一方、DNA 収量の多い試料では検出されなかった。カニ添加液を加えた試料はいずれもカニ DNA が検出された。また、ハンペン(魚)はブランク試料でもエビ DNA が検出され、基材自体がエビ DNA を含んでいた。

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、落花生と平成 20 年に追加されたえび、

かにの 7 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ている。これら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、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)、平成 22 年 9 月 10 日、消費者庁食品表示課事務連絡「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(参考)」が発出され現在に至っている。

我々は昨年度までに特定原材料 7 品目すべてについて精度管理試料の調製を検討し、落花生を除いて ELISA 法による定量試験に対応可能な試料が作製できたことを報告した。さらにこれらの試料のうち卵、乳についてはウエスタンブロット法、小麦、そばについては PCR 法による確認試験法によって検出可能であることも報告した。また、卵、乳については検査機関の協力をうけて、実際に ELISA 法による測定を対象とした外部精度管理の模擬試験(以下共同試験とする)を行い、精度管理試料の妥当性および報告された結果について検討を加えてきた。本年度は、エビ、カニ添加試料を用いて共同試験を実施したほか、共同試験試料について通知の PCR 法による確認試験

試料としても適用可能か検討した。

B. 研究方法

1. 特定原材料タンパク質の定量

ELISA 法による甲殻類タンパク質(エビ・カニタンパク質)の定量には FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬(株))、甲殻類キット「マルハ」(株マルハニチロ食品)を使用し、各々のキットの取扱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. 特定原材料タンパク質の調製

特定原材料タンパクはカニまたはエビを含む市販の食品素材それぞれから調製し、カニ添加液およびエビ添加液とした。カニ添加液、エビ添加液の総タンパク質濃度は 2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス)を使用して測定した。

3. 添加用基材

添加用基材には市販のホワイトソース、ハンペンおよびブロッコリーペーストを使用した。

4. 共同試験試料の調製

共同試験試料は、添加用基材に 2. の添加液を加え、BLIXER-5Plus (株エフ・エム・アイ)またはグランドミックス GM300 (株レッチェ)で均質化して作製した。なお、試料 1、試料 5 にはカニ添加液を、試料 2、試料 6、試料 8 にはエビ添加液を表 1 に示した濃度で添加した。また、作製した試料は遠沈管に分注し、 -20°C 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 法により甲殻類タンパク質を測定し、一元配置による分散分析を実施し、均一

性を確認した。試料の安定性は共同試験終了後に -20°C で保存した試料を測定し、均一性試験の結果と比較した。

6. 共同試験の実施

平成23年6月14日、甲殻類を測定対象とした試料8種類およびFAテストEIA—甲殻類「ニッスイ」、甲殻類キット「マルハ」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22日までの約1ヶ月間、報告書の回収期限は7月29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)を用い Xbar-R 管理図による解析を行った。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、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、大阪府立公衆衛生研究所、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。

7. PCR 法による確認試験

DNA 抽出はイオン交換樹脂タイプのキット(Genomic-Tip 20/G, QIAGEN)を用い、遠心機に himac CF 16RX(日立工機株)、恒温槽に DryThermoUnit DTU-2B(TAITEC)、吸光度測定に Gene Quant pro(GEヘルスケアバイオサイエンス)を使用して実施した。PCR 増幅は植物検出用(CP03-5', CP03-3')、エビ検出用(ShH12-05', ShH13-03')、カニ検出用

(CrH16-05', CrH11-03') (以上いずれもファスマック)、動物検出用(AN1-5', AN2-5', AN-3')(北海道システムサイエンス)の各プライマー、PCR 酵素に AmpliTaq Gold(Life Technologies)を使用し、GeneAmp PCR System 9700(Life Technologies)により通知に従って実施した。PCR 増幅液は ultraPUREAgarose-1000(Life Technologies)、 $50 \times$ TAE(遺伝子工学研究用、ニッポンジーン)により作製したアガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid-2x(ADVANCE)を使用して電気泳動し、増幅物の有無を確認した。なお、アガロースゲルのエチジウムブロミド染色は前染色により実施し、サイズマーカーには 20bp DNA Ladder または 100bp DNA Ladder(以上 TAKARA)、画像解析にはプリントグラフ(ATTO)を使用した。

(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. 共同試験試料の均一性および安定性

甲殻類タンパク質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2、試料5、試料6、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)。回収率はカニ添加液を加えた試料1と試料5の甲殻類キット「マルハ」による測定で50%を下回ったが、このほかの測定では通知(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。なお、今回使用したカニを含む食品素材は平成22年度

報告書、表 13 の①と同一物で、平成 22 年度の報告でも、抽出液の総タンパク質に対する甲殻類キット「マルハ」の測定値の回収率は 41.2%と低かったが、カニを含む適当な食品素材が見つからなかったため試料調製に使用した。一方、共同試験の測定期間終了後に実施した安定性試験の測定値はカニ添加液を加えた試料の甲殻類キット「マルハ」による測定値も含め、均一性試験の 88.0～112.5%の範囲と良好であった(表 2)。

ブランク試料については、試料 3(ホワイトソース)、試料 7(ブロッコリー)の測定値は、いずれもキットの検出下限(0.31 µg/g)以下であったが、試料 4(ハンペン)の測定値はいずれの測定においても 0.31 µg/g 前後で、使用したハンペンは甲殻類タンパク質をわずかに含むことが示された。

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、全参加機関について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、平成 21 年度に問題を指摘したソフトウェア(マイクロプレートマネージャー Ver.5)を使用している機関が 3 機関あることが判明した。これら 3 機関の ELISA の吸光度についてマイクロプレートマネージャー Ver.5 の Logistic 4PL 解析と Logistic 5PL 解析(Rodbard)を実施し、解析結果を比較した(表 4)。その結果、甲殻類の測定においても卵、乳と同様、Logistic 4PL 解析では回帰曲線が吸光度のプロットからはずれていたほか、計算

結果も最大 10%程度差があることが明らかになった。このためこれら 3 機関については Logistic 5PL による解析の結果を以下の解析に使用することとした(表 4)。これ以外の機関については提出データをそのまま使用した。なお、平成 23 年 10 月 23 日、消費者庁食品表示課から、マイクロプレートマネージャー Ver.5 を特定原材料検査に使用する場合は Logistic 5PL 解析を使用する旨の業務連絡が発出されている。

ブランク試料(試料 3、試料 4、試料 7)の測定結果をまとめて表 5 に、エビまたはカニ添加試料(試料 1、試料 2、試料 5、試料 6、試料 8)の定量値の集計結果を表 6～10 に、Xbar-R 管理図を図 1～5 に、FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」、甲殻類キット「マルハ」のそれぞれに分けて示した。

添加試料の FA テスト EIA-甲殻類「ニッスイ」による測定では試料 8 を除き Xbar 管理図において Xbar が管理限界線(UCL または 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。なお Xbar が管理限界線の範囲外となった機関番号 1 について報告書を確認したが問題となる点は見つからなかった。これに対して R 管理図では、上部管理限界線(UCL)を超えた機関が試料 1、試料 2、試料 5、試料 8 でそれぞれ 1 機関ずつ認められた。試料 1 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 2 は同じ抽出液を用いたと思われる甲殻類キット「マルハ」による測定では再現性に問題がないため、抽出液の希釈に問題があったと考えられた。試料 2 と試料 8 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 4 は試料 8 では並行測定の 3 ウェル間の再現性不良が原因と考えられたが、試料 2 では同一抽出の 3 ウェル間の再現性に問題はなく、原因は不明であった。また、試料

5 で R 管理図の UCL を超えた機関番号 10 も並行測定 の 3 ウェル間の再現性不良が原因と考 えられた。

一方、甲殻類キット「マルハ」による測定では z-スコア、Xbar 管理図、R 管理図ともに管理限界線の範囲外となった測定値はなかった。なお、機関番号 4 は甲殻類キット「マルハ」による測定を全試料について失敗したため、データ数は 10 となっている。

共同試験参加機関のそれぞれの試料測定における平均値の室間相対標準偏差は FA テスト EIA-甲殻類「ニスイ」で 8.10~16.47%、甲殻類キット「マルハ」では 6.88~15.65%と平成 22 年度とほぼ同等であった。しかし、両キットとも検量線用標準液の測定において並行測定 の 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差が著しく大きい結果がいくつかの機関から報告された。これらの機関はいずれも特定原材料検査の経験が長く、また検量線用標準液の測定には抽出操作は関係しないこと、共同試験試料の測定ウェルでの吸光度の相対標準偏差は良好であったことから、測定操作ではなく測定キットのウェルに差を生ずる原因があった可能性も考 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 4 年以上であった。また、ELISA 法による平成 22 年度の検査件数の総計は、卵が最も多く 951 件、乳が 812 件、小麦が 649 件、えび・かにが 597 件、そばが 265 件、落花生が 246 件で、平成 21 年度と同程度であった。確認試験の実施数は平成 22 年度も少なく、ELISA 法の総検査数の 5%以下であった。

5. 確認試験の検討

5.1 共同試験試料の DNA 抽出結果

試料 1~8 の共同試験試料のそれぞれから、通知に記載の抽出法のうちイオン交換樹脂タイプのキット (Genomic-Tip 20/G) を使用してそれぞれ 3 並行で DNA を抽出した (表 12)。DNA 収量は用いた基材によって大きく異なり、ハンペン基材はホワイトソース基材に比べて約 8 倍、ブロッコリー基材はホワイトソース基材に比べて約 30 倍多かったが、260 nm/280nm の吸光度比は 1.61~1.95 で、いずれの DNA 原料液も通知の基準 (1.2~2.5) を満たしていた。

基材により DNA 収量の差が大きかったため、以前 PCR による確認試験を実施した平成 20 年度と DNA 収量を比較した。平成 20 年度に使用した基材ではハンバーグの DNA 収量が約 100 µg とブロッコリーと同程度であったほか、あずきあんの DNA 収量はホワイトソースと同程度に少なく、今回認められた DNA 収量の差は特別ではないことが明らかになった。

5.2 共同試験試料のエビ、カニ DNA の検出

共同試験試料の DNA 抽出液は試料 1~3 においてはそのまま、試料 4~8 では 20 ng/µL に調整後 PCR に供し、それぞれエビ検出用試験、カニ検出用試験、さらに DNA 抽出確認用として植物検出用試験および動物検出用試験を実施した。

5.2.1 ホワイトソースを基材とした試料

ホワイトソースを基材とした試料 1~3 の結果を図 6 に示した。DNA 抽出確認用の植物検出用試験では全 DNA 試料で予定長の増幅物が確認された。エビ検出用試験ではエビ添加液を加えた試料 2 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認されたが、これ以外では予定長の増幅物は認められなかった。カニ検出用試験では

カニ添加液を加えた試料 1 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認されたが、これ以外では予定長の増幅物は認められなかった。以上、試料 1~3 は、添加液の種類に応じて予測通りエビ、カニ DNA を区別して検出できたことから、確認試験にも使用できる試料であることが示された。なお、動物検出用試験は基材のみの試料 3 では予定長の増幅物の有無は明確ではなかった。一方、添加液を加えた試料 1 と試料 2 ではいずれも予定長の増幅物が確認でき、動物 DNA は添加液に由来したものと考えられた。

5.2.2 ハンペンを基材とした試料

ハンペンを基材とした試料 4、5 の結果を図 7 に示した。DNA 抽出確認用の植物検出用試験および動物検出用試験は共に全 DNA 試料で予定長の増幅物が確認された。カニ検出用試験ではカニ添加液を加えた試料 4 で 3 抽出とも予定長の増幅物が確認された一方、試料 5 では予定長の増幅物は認められずカニについては想定通りの結果であった。しかし、エビ検出用試験では試料 4、試料 5 共にエビ添加液を加えていないにもかかわらず、試料 4 の抽出 2 を除く全抽出でエビ DNA の増幅物が確認された。結果の 1. で述べたとおり、ハンペン基材のブランク試料である試料 4 の ELISA キットによる測定値はいずれも 0.31 $\mu\text{g/g}$ 前後であったことから、甲殻類タンパク質を含むことが示唆されており、検出されたエビ DNA は基材に由来するものと考えられた。以上の結果から、ハンペン基材は PCR での検知に十分なエビ DNA をあらかじめ含んでいるため、確認試験試料としては使用できないことが示された。

5.2.3 ブロッコリーを基材とした試料

ブロッコリーを基材とした試料 6~8 の結果を図 8 に示した。DNA 抽出確認用の植物検出用

試験では全試料の全抽出で予定長の増幅物が確認され、カニ検出用試験では増幅物が認められず想定通りの結果だった。しかし、エビ検出用試験では、ブランク試料の試料 7 も含め非特異的増幅が認められた一方、エビ添加液を加えた試料 6、試料 8 で予定長の増幅物は検出できなかった。また、動物検出用試験でも予定長の増幅物の有無は明確ではなかった。以上、エビ添加液を加えた試料 6、試料 8 において想定とは異なりエビ DNA が検出できなかったことから、これらの試料は確認試験試料としては使用できないことが明らかになった。

なお、データは示していないが、試料 6 および試料 8 の DNA 抽出液(原液)および 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ に調整した DNA 試料液についてもエビ検出用試験を実施した。しかし、これらの試料液による PCR では非特異的増幅の割合は増加したが、予定長の増幅物は確認できなかった。

5.3 エビ確認試験の検討

エビタンパク質を表示義務の下限である約 10 $\mu\text{g/g}$ 加えて調製した試料 2 と試料 6 のうちホワイトソースを基材とした試料 2 ではエビ DNA が検出されたが、ブロッコリーを基材とした試料 6 では検出できなかった。ブロッコリー基材はホワイトソース基材に比べて DNA 含量が約 30 倍多いため、PCR 反応液に加える DNA のうち添加液に由来する DNA が相対的に少なくなることで、エビ DNA 不検出の一因であると考えられた。しかし、先に述べた通りブロッコリー基材の DNA 含量は特別ではないため、確認試験試料はブロッコリーのように DNA 含量が高い基材においてもエビタンパク質が 10 $\mu\text{g/g}$ を超える場合はエビ DNA を検出できることが求められる。また今回の不検出には基材

以外に使用したエビ添加液の DNA 含量および質も関係していると考えられるため、共同試験試料とは別の原料から新たにエビ添加液を作製し、試料 6 と同じ濃度のエビタンパク質をブロッコリーに加えた試料を作製してエビ検出試験の感度を検討することとした。結果は示さないが、当該試料では予定長の増幅物が検出でき、新たに調製したエビ抽出液は共同試験試料調製に使用したエビ添加液に比べエビ DNA を多く含んでいることが分かった。従って、共同試験試料調製に使用したエビ添加液は DNA 含量が少ないかまたは変性しているものと考えられ、確認試験試料の作製には適当ではないことが明らかになった。以上の結果、エビ添加液の調製法を改めて検討する必要が生じた。

E. 結論

1. 共同試験

エビ添加試料およびカニ添加試料を用いて外部精度管理調査の模擬試験をおこなった。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支障なく実施できることを確認した。また、ELISA 解析ソフトウェアのマイクロプレートマネージャー Ver.5 の Logistic 4PL 解析は甲殻類キットの解析においても検量線の回帰が不十分なことが明らかになった。

共同試験の統計解析では、 \bar{X} が管理限界外となったのは 1 測定のみであった。しかし、検量線用標準液、試料液の測定は、両キット共に、ウェル間の吸光度の再現性が悪い測定が認められ、測定操作だけでなく、測定操作ではなく測定キットのウェルに差を生ずる原因があった可能性も考えられた。

2. 共同試験試料の確認試験の検討

共同試験試料について PCR 法による確認試験を実施した。ホワイトソースを基材とした試料では添加液の種類に応じてエビ、カニ DNA が想定通り検出され、確認試験試料としても使用可能と考えられた。ハンペンを基材とした試料ではカニを添加した試料でカニ DNA が想定どおり検出された。しかしブランク試料から基材に由来するエビ DNA が検出され、確認試験試料としては適当でないことが判明した。ブロッコリーを基材とした試料ではエビ添加液を甲殻類タンパク質として 10 $\mu\text{g/g}$ 加えた試料でもエビ DNA は検出できなかった。一方、別の原料から作製したエビ添加液を加えたブロッコリー試料ではエビ DNA が検出できた。この結果、今回共同試験試料の調製に用いたエビ添加液は含まれるエビ DNA の含量または質に問題があることが判明した。今後、確認試験試料に添加するエビ添加液の調製を再検討する必要が生じた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai Y., Kotoura S., Yano T., Kurihara T., Uchida K., Miyake K., Akiyama H., and Tanabe S., Quantification of Pork, Chicken and Beef using a Novel Reference Molecule Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 75, 1639–1643 (2011).
- 2) Akiyama H., Imai T., Ebisawa M., Japan Food Allergen Labeling Regulation - History and Evaluation, Advances in Food & Nutrition Research, 62, 139–171 (2011).