

Bacillus cereus HIC 080115

Bacillus subtilis HIC 100165

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 $MnSO_4$ を含有する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

市販の米飯について、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 ~ 25% 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 28 日間（合計 35 日間）保存した。なお、7 日ごとに経目的にソイビーン・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. ビブリオ属菌検査用調査試料に添加する菌液の調製

Marine broth に 2%ゼラチンを加えて滅菌した後、対象菌 1 白金耳を接種した。これを 37°C で 24 時間培養したものを試験菌液とした。なお、ナイシンを用いる系では、2%ゼラチンを添加した Marine broth を滅菌した後、上澄みの一部にナイシンを 0.5 g/L となるように溶解し、これをろ過した。

6. ビブリオ属菌検査用調査試料における基材の検討

マッシュポテト基材は Marine broth を添加することにより作製し、これに対象菌液を添加した後、28 日間冷蔵保存した。ハンバーグ基材は、2 回のボイルおよび 121°C で 75 分間オートクレーブ処理した後、対象菌液にハンバーグを浸漬することにより作製し、これを 7 日間冷蔵保存した。まぐろ切り身は、表面をアルコール噴霧、次亜塩素酸ナトリウム処理あるいは無処理のいずれかを行った後、対象菌液に浸漬した。これを 7 日間冷蔵保存した。なお、生菌数測定は Marine agar を使い、37°C で 24 ~ 48 時間培養することにより行った。まぐろ基材における選択培地の反応性の検討では、菌液接種 7 日後に選択培地に接種し、形成された集落を観察した。なお、選択培地は、CHROMagar Vibrio、ビブリオ寒天培地、X-VP 寒天培地および TCBS 寒天培地を用いた。

7. 一般細菌数測定検査におけるストマッカー袋の影響

一般細菌数測定用調査試料（平成 24 年度配布試料）を混合することにより均質化した後、10 g を秤量し、これを 6 種類のストマッカー袋に入れた後、生理食塩液 90 mL を添加し、1 分間のストマッカー処理を行ったものを試料溶液とした。必要に応じて 10 倍段階希釈を行い、標準寒天培地を用い

て n=2 で生菌数測定を行った。なお、培養は 35.5°C で 24 時間後および 48 時間後とした。

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

外部精度管理調査を行ううえで、特に定量検査を行うためには、基材に接種した対象菌の長期間の安定性と輸送時の温度変化に伴う菌数変動が小さいこと求められる。これまでの検討結果から、米飯基材を用いることによりセレウス菌に関する定性検査ならびに定量検査のいずれも対応することが可能となったが、定量検査を行う場合に、陰性対象菌において温度負荷をかけた際に、菌数変動が大きくなることが明らかとなった。そのため本年度は、*B. subtilis* を陰性対象菌として選択し、これを米飯基材に接種したときの、食塩濃度について検討した。自家調製した芽胞液を作製する際の食塩濃度を 15%、20% および 25% として、これを米飯基材に添加することにより調査試料を作製した。調査試料を 7 日間の冷蔵保存後に、引き続き冷蔵保存あるいは 22.5°C、32.5°C にて保存したときの生菌数の変動について確認した。その結果、食塩濃度が 15% のときには 22.5°C 以上の保存温度において、約 3 オーダーの増菌が認められたが、食塩濃度を 20% 以上とすることにより、接種した陰性対象菌は接種濃度とほぼ同等の菌数で接種後 35 日目まで推移した (図 1)。同様に市販の芽胞液を同濃度の食塩存在下で米飯試料中の菌数変動を観察したところ、食塩濃度が 20% 以上のときに温度負荷に伴う増菌は 99 日目まで認められなかった。ま

た、陽性対象菌を含めた安定性について確認した。すなわち、陽性対象菌では食塩濃度を 15%、陰性対象菌では食塩濃度を 20% としたとき、菌液添加後、22.5°C または 32.5°C で 42 日間保存したときの菌数変動を確認した。その結果、いずれの温度条件下においても陽性対象菌、陰性対象菌ともに安定した菌数の推移を認めた (図 2)。

2. 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

こうや豆腐基材を用いた場合、乾物であるがゆえに、*Bacillus* 属といったグラム陽性菌の混入の可能性が考えられる。そこで、基材中にナイシンを添加することによりグラム陽性菌の発育を阻害することが可能であるかについて検討した。すなわち、ナイシンを含む 2%ゼラチン加 Marine broth を用いて試験菌液を調製し、これをこうや豆腐に添加することにより調査試料を作製した。これを室温で 24 時間放置した後、引き続き冷蔵保存したときの菌数測定を経日的に行った。グラム陽性菌としては *B. subtilis* および *S. aureus* を用いた。同様にビブリオ属菌に対する影響の有無についても検討した。その結果、いずれのグラム陽性菌に対してもナイシンの明らかな効果は認められなかった (図 3)。同様にビブリオ属菌に対しても影響は認められなかった。

3. ビブリオ属菌検査用調査試料に用いる基材の検討

これまでの検討においてこうや豆腐を用いることによりビブリオ属菌検査を安定して実施できる可能性を示唆したが、他の基材についても検討した。すなわち、黄色ブドウ球菌検査等においてこれまでに実績のあるマッシュポテト基材、大腸菌群検査等

においてこれまでに実績のあるハンバーグ
基材ならびに水産物であるまぐろ切り身
を用いて、基材としての採用の可否につ
いて検討した。なお、マッシュポテト基
材についてはビブリオ属菌の性質を考
慮し、Marine brothを用いて作製した。これら
の基材に対照菌を接種し、経日的に生
残菌数について観察したところ、い
ずれの基材も7日以内に1オーダー以
上の菌数減少が認められた(表1、図4)。また、まぐろ切り
身では菌液接種後の表面の観察も行
ったが、経日的に著しい変化が認め
られた。さらにアルコール等で前処
理したまぐろ切り身に接種した対象
微生物について選択培地を用いた反
応性について確認したところ、残存
微生物による偽陽性が認められ、陽
性対象菌であっても選択培地によっ
ては陰性と判定されるものもあった
(図5)。

4. 一般細菌数測定検査におけるスト マッカー袋のメーカーごとの相違に 関する検討

平成24年度の外部精度管理調査の
一般細菌数測定検査において、例年
よりも大きな変動係数が認められ
たことに加え、低めの値を報告す
る検査機関が多かった。本年度に
配布した調査試料は例年と同様の
寒天状基材であり、寒天のロット
差に基づく濃度のわずかな調整は
あるものの、作製方法は変更して
いないが、当財団で実施した均一
性確認試験における変動係数も大
きかった。さらに、参加機関より
ストマッカー袋を変更して検査を
実施したところ、得られた結果が
異なった旨の報告を受けたことに
伴い、6種のストマッカー袋を使
用したときの調査試料中の一般細
菌数測定検査を実施した。フィル
ターの材質やメッシュサイズがメ
ーカーごとに異なるようであったが、

詳細の情報は得られなかった。これ
らのストマッカー袋を用いること
により、最も回収率が高いものと
比較して約40%の回収率に留ま
る製品もあった(表2)。

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定性培地
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、定量
検査を実施するうえでの菌数変動
の安定性をより高いものとし、輸
送温度帯が指定した範囲を超え
た場合にも安定した菌数が得ら
れることを目的として、これま
でにこれらの見解が得られていな
い陰性対象菌を用いて調査試料
の作製条件について検討した。自
家調製した芽胞液を基材に添加
する際の食塩濃度を15~25%と
し、温度負荷を与えた場合、食
塩濃度が20%以上のときに陰
性対象菌においても温度負荷によ
る接種菌の増殖は認められな
かった。これは市販の芽胞液を
用いたときも同様であった(図1)。このこと
から、陽性対象菌、陰性対象菌
のいずれも基材に添加する際の
食塩濃度を20%以上とすること
で、温度負荷に対しても極めて安
定な基材を作製できた

と考えられた。微生物検査において、検査対象となる微生物が保存条件等により増殖することもあれば死滅することもあるという性質上、安定した結果を得られるように定量検査を実施することは非常に難しい。これをセレウス菌検査用調査試料では芽胞を用いることで安定性を確保することができたが、外部精度管理調査試料は各検査機関に配布することにより検査が実施されるので、輸送の影響も加味しなければならない。そのため、今回冷蔵保存後の温度負荷によっても菌数変動のほとんどない調査試料を作製することができたことは、輸送時の温度逸脱があった場合においても検査実施に影響を与えないことを示すことから、非常に意義があると思われる。

ビブリオ属菌では、こうや豆腐を基材として確立したが、こうや豆腐は乾物であるがゆえに、*Bacillus* 属といったグラム陽性菌が存在している可能性が高い。そのため、基材を滅菌する際に、芽胞として残存する可能性も否定できないことから、グラム陽性菌に対して選択的に作用すると考えられるナイシンの効果を確認することは、作業効率、あるいは最終的にビブリオ属菌のみが基材中に存在している状況を作り出すために有効な手段であると考えられる。そこで、基材にビブリオ属菌あるいはグラム陽性菌を添加する際に、ナイシンを含有する Marine broth を添加したときの添加菌の挙動を確認したところ、ビブリオ属菌の増殖に対して影響を及ぼすことはなかった。しかし、使用したグラム陽性菌のいずれもナイシンを添加することによっても添加菌の減少は認められなかった(図 3)。このことから、こうや豆腐基材を用いる際に混入の

可能性があるグラム陽性菌をコントロールするという目的のためにはナイシンは不適切であると考えられた。また、ビブリオ属菌は魚介類に多く存在することが知られているが、魚介類は滅菌することができないことから、基材として採用するためには、いくつかのステップを経て決定する必要がある。そのため、これまでに外部精度管理調査試料として確立したマッシュポテトやハンバーグが基材として適応できるのか否かについて確認した。また、魚介類のひとつとしてまぐろ切り身を用いて、ビブリオ属菌検査用調査試料としての採用の可能性について検討した。しかしながら、いずれも対象菌を添加してから 1 週間以内に 1 オーダー以上の添加菌の減少が認められ(表 1、図 4)、かつまぐろ切り身においては基材の著しい変質も認められた。さらに、まぐろ切り身において選択培地による反応性を確認したところ、基材中にもともと存在していた微生物種が偽陽性を示すこと、ならびに陽性対象菌を接種したにも関わらず陰性と判定されることがあった(図 5)。このことは、基材中のビブリオ属菌以外の混入があった場合には、検査結果に対して影響を及ぼす可能性が高いことが考えられた。陽性対象菌を接種したにも関わらず陰性の可能性が示唆されたことは、他の微生物種との増菌率の相違により、添加した陽性対象菌の検出に影響を及ぼした可能性も考えられた。

このことから、今回使用した 3 種の基材はビブリオ属菌検査を実施するうえでは不適切であると考えられた。外部精度管理調査試料として採用するためには、少なくとも 1 か月以上、定性検査を行う上で必要な

菌数が基材中で残存していなければならない。そのため、今後も引き続いて対象菌の安定化を図るため、添加剤や基材との相性等について検討する必要があるものと考えられた。一般的にビブリオ属菌は冷蔵保存時の安定性が低いことから、冷凍など保存条件の異なる状況での検討も必要かもしれない。

また、一般細菌数測定検査では平成 24 年度の外部精度管理調査結果を踏まえて、ストマッカー袋のメーカーごとの検査結果について比較検討した。その結果、最も低い回収率が得られたストマッカー袋での菌数測定結果は、最も高かった回収率に対して約 40%の値を示した(表 2)。通常ストマッカー袋のフィルターは、検査対象物の表面に付着している微生物をストマッカー処理することにより希釈溶液中に懸濁させ、フィルターを通して菌濃度を平衡化し、これに検査対象物の残渣をフィルターの内側に移行させないことを目的として採用されている。外部精度管理調査における一般細菌数測定用調査試料は、溶解した寒天基材中に *B. subtilis* 芽胞液を添加した後に固化させることにより作製している。すなわち、ストマッカー処理後に残存した寒天粒子中に芽胞液の一部が取り込まれた状態となる可能性がある。そのため、残存した粒子が一部のストマッカー袋のフィルターを通過できなかったために、差が認められた可能性が考えられた。

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た陰性対象菌について温度負荷をかけた際の添加菌数の変動を観察した。その結果、基材作製溶液中の食塩濃度を 20%以上とすることにより、22.5℃あるいは 32.5℃で保存した場合においても安定した菌数を認めた。このことから、食塩濃度を 20%とすることにより、陽性対象菌および陰性対象菌の両者において温度変化に強い安定な調査試料を作製することができたものと判断した。

一方、ビブリオ属菌ではこうや豆腐以外の基材についても検討するべく、外部精度管理調査において既実績のあるマッシュポテト、ハンバーグおよび魚介製品としてまぐろ切り身を用いて検討したが、いずれの基材も添加菌を安定して回収することができなかったことから、これらの基材については調査試料の候補として採用することは現状では難しいものと判断した。ビブリオ属菌は一般的に冷蔵保存においても安定性を確保することが難しいことから、冷凍保存といった別の温度帯での保存を含めて検討する必要があるものと考えられた。また、こうや豆腐基材のより確実な作製を行うために、グラム陽性菌の増殖抑制を目的としてナイシンの効果について検討したが、ビブリオ属菌に対して影響を与えなかったものの、グラム陽性菌に対しても顕著な効果は認められず、ナイシンを添加することの意義を見出すには至らなかった。

さらに、平成 24 年度の一般細菌数測定検査に関する外部精度管理調査において、例年と比較すると大きな変動係数が得られたことに伴い、その原因について検討したと

ころ、ストマッカー袋のメーカーにより大きな差異が生じることが明らかとなった。通常、微生物検査は検査試料の表面に付着した微生物をストマッカー処理によって溶液中に懸濁させることにより行われる。そのため、ストマッカー袋のフィルターは微生物を通過させるが、検査試料の残渣は通過させないという前提がある。今回の一般細菌数測定試料は、寒天状基材中に芽胞液を封入することにより作製していることから、残存粒子中に芽胞が取り込まれた状態となり、フィルターを通過できなかったために生菌数としての差異が認められたものと考えられた。すなわち、今回のストマッカー袋のメーカー間の生菌数の相違は、調査試料の物理化学的性状に基づく可能性が示唆された。今後、ストマッカー袋のメーカー間の詳細なデータについて把握するため、様々な基材中に微生物を添加することによっても同様の差異が認められるのかについて検討する必要があるものと考えられた。これにより、一般細菌数測定検査におけるより一層の検査精度の向

上に貢献できるものと思われる。さらには、回収菌数のばらつきが少ない調査試料を作製するため、基材の構成成分について改良する必要性が示唆された。

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

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

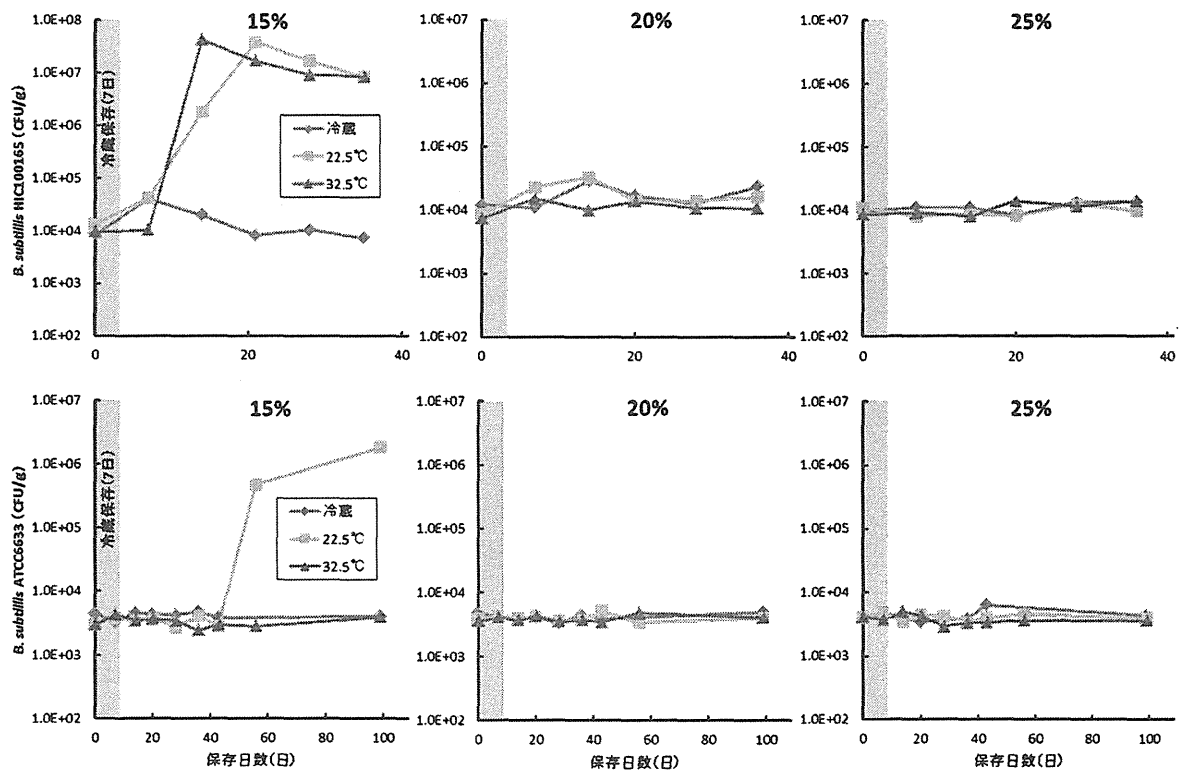


図1 セレウス菌検査陰性対象菌の菌数変動に及ぼす食塩濃度の影響
% : 食塩濃度

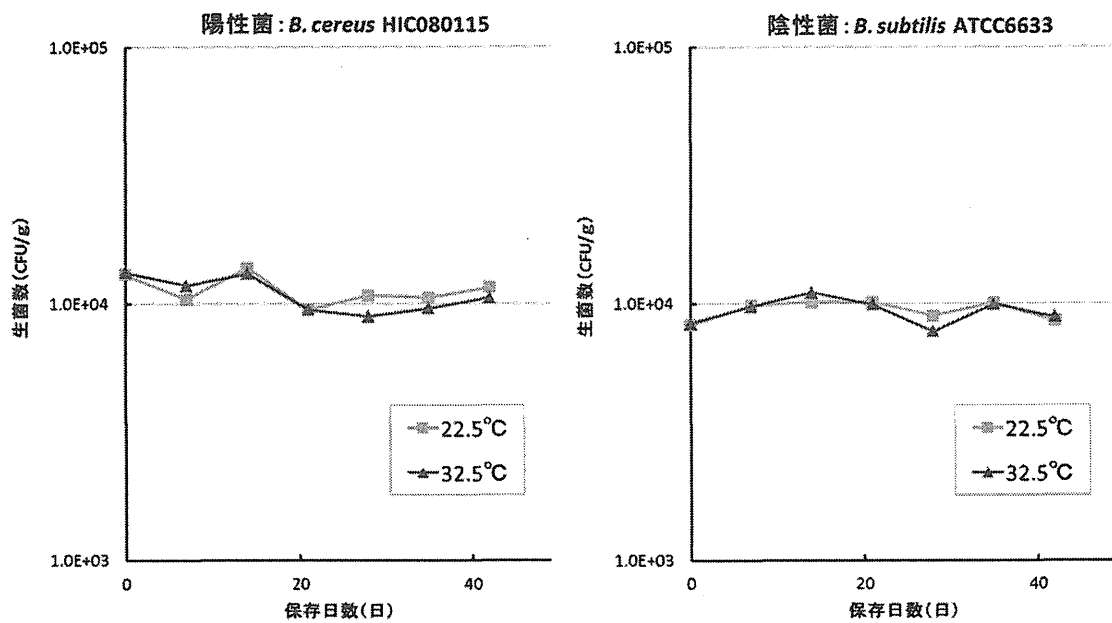


図2 米飯基材における対象菌の温度負荷時の菌数変動

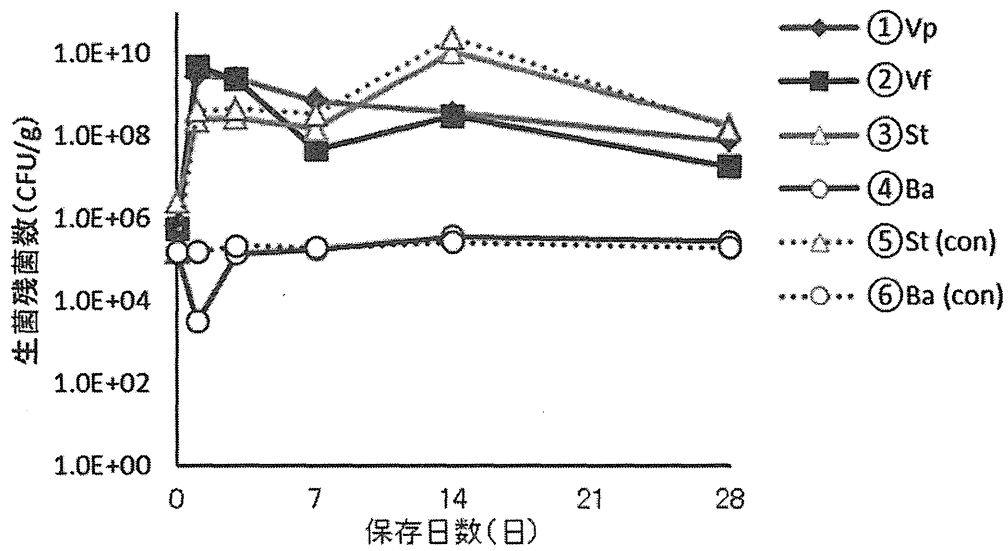


図3 ビブリオ属菌検査におけるこうや豆腐基材を用いたときのナイシンの影響

Vp: *V. parahaemolyticus*

Vf: *V. fluvialis*

St: *S. aureus*

Ba: *B. subtilis*

表1 マッシュポテト基材におけるビブリオ属菌の安定性

	初発菌数	Day 3	Day 7	Day 14	Day 28
MP+Vp	6.7×10^5	<100	<10	<10	<10
MP+Vf	5.4×10^5	<10	6.9×10^2	<10	<10
MP(MB)+Vp	6.7×10^5	1.5×10^2	8.2×10^2	<10	<10
MP(MB)+Vf	5.4×10^5	1.6×10^4	5.9×10^2	<10	<10

表中の数値は基材 1 g あたりの生残菌数を示す (CFU/g)

MP: マッシュポテト

MB: Marine broth

Vp: *V. parahaemolyticus*

Vf: *V. fluvialis*

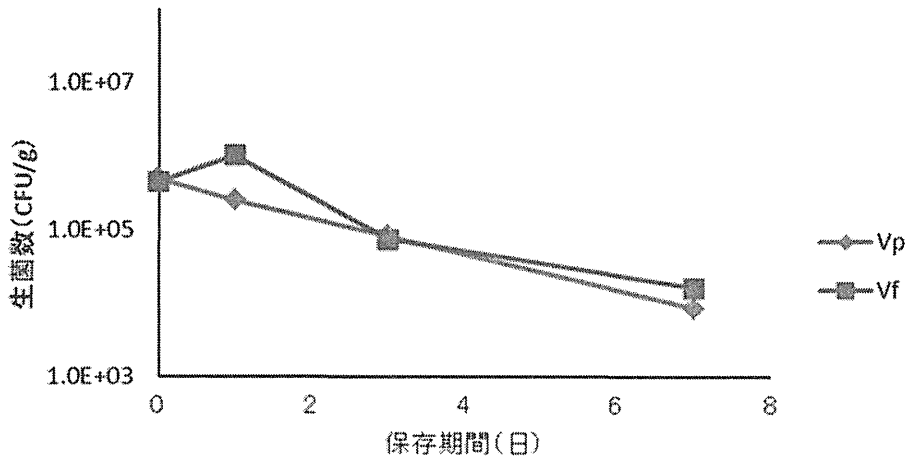


図4 ハンバーグ基材におけるビブリオ属菌の安定性

Vp: *V. parahaemolyticus*

Vf: *V. fluvialis*

選択培地の反応性

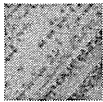
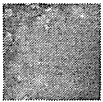
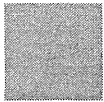
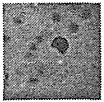
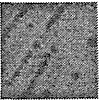
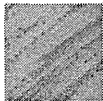
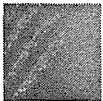
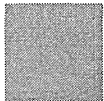
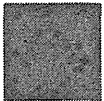
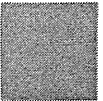
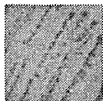
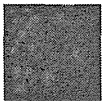
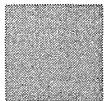

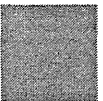
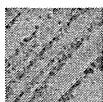


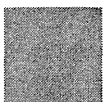


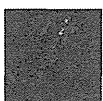


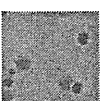



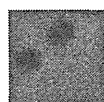

	CHROMagar Vibrio	ビブリオ 寒天培地	X-VP 寒天培地	TCBS 寒天培地 (国内)	TCBS 寒天培地 (海外)
無処理	 陽性、陰性集落 混合	 陰性集落	 陰性集落	 陽性、陰性集落 混合	 陽性、陰性集落 混合
アルコール噴霧	 陰性集落	 陰性集落	 発育集落なし	 陽性、陰性集落 混合	 陰性集落
次亜塩素酸ナトリウム浸漬	 陰性集落	 陽性集落	 発育集落なし	 陽性集落	 発育集落なし
<i>V. parahaemolyticus</i> 添加	 陽性、陰性集落 混合	 陰性集落	 陽性、陰性集落 混合	 陰性集落	 陽性集落
<i>V. fluvialis</i> 添加	 陽性、陰性集落 混合	 陰性集落	 陰性集落	 陰性集落	 陰性集落
<i>V. parahaemolyticus</i> 陽性	 陰性集落	 陽性集落	 陽性集落	 陽性集落	 陽性集落

図5 ビブリオ属菌検査におけるまぐろ切り身への接種後の選択培地の反応性

表 2 寒天状基材の各種ストマッカー用袋での一般細菌数検査結果の相違

メーカー	商品名	24 時間後	48 時間後
GSI クレオス	ストマフィルターNEO	1.2×10^5	1.2×10^5
アテクト	フィルター付きストマッカー用袋	8.6×10^4	8.6×10^4
サニーフーズ	サニスペックテストバッグソフト	8.7×10^4	8.7×10^4
サンセイ医療機器	滅菌フィルターバッグ	4.8×10^4	4.8×10^4
サンセイ医療機器	滅菌フィルターバッグ NB	7.5×10^4	7.5×10^4
ダイワ包材	細菌検査用 BAG F タイプ	7.2×10^4	7.3×10^4

表中の数値は調査試料 1 g あたりの生菌数を示す

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用適正試料の作製検討と

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	渡辺 卓穂	(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	安達 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部第三室長	
協力研究者	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	笠間 菊子	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員
協力研究者	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、検査法が消費者庁から通知されている。特定原材料検査の検査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るため、その実施に向けて検討を行っている。本年度は特定原材料検査に関する外部精度管理に対する検査機関の需要の調査および実施可能な規模の確認のため、ELISA 法による卵タンパク質の測定を対象とした外部精度管理調査を試験的に実施した。外部精度管理試料として 3 種類の基材に卵タンパク質を添加して濃度の異なる 3 試料を調製し、それぞれの均一性を確認後、参加機関に配付した。参加機関は各衛生研究所を中心に 73 機関を対象に実施した事前調査において参加を希望した 42 機関で、参加機関での測定には消費者庁から提示されているキットから 1 種類以上を用いるよう依頼した。測定結果は試料ごと、測定キットごとにまとめ、従来方式およびロバスト方式により統計値を算出し、zスコアを算出した。また、検査手法についてもまとめたほか、zスコアの絶対値が 2 以上の報告については原因について検討した。

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、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）が発出された。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事に伴い、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）および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）」（平成 22 年 9 月 10 日）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、落花生を除く 6 品目について ELISA 法による定量試験に対応可能な試料の試作を完了している。このうち、卵、乳、甲殻類（えび、かに）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を小規模で実施し、精度管理試料の妥当性、報告値の妥当性、検査手法の問題点等について検討を加えてきた。本年度は外部精度管理の本格的実施に向けて、実施可能な規模の確認のため、卵添加試料を用いた外部精度管理の模擬試験を参加機関の範囲を拡大して計画、実施したので報告する。

B. 研究方法

1. 試験試料の調製

あらかじめ卵を含まないことを確認した基材に薄めた卵液を加え、ミキサーで均質

化して濃度の異なる 3 種類の試料を作製した。それぞれの試料はいずれも遠沈管約 100 本に分注し、 -20°C で凍結保存した。なお、卵液の基材への添加量は、2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)による卵タンパク質の測定値に基づいて決定した。

2. 試料の均一性および安定性の検討

調製試料のそれぞれについて 10 容器から $n=2$ でサンプリングして実施した ELISA 法による卵タンパク質の測定値を一元配置による分散分析により解析し、均一性を確認した。また、試料発送前と試験期間終了後に試料を測定し、安定性を検討した。

なお、均一性および安定性はモリナガ FASPEK 卵測定キット（森永生科学研究所）、FASTKIT エライザ Ver. II 卵（日本ハム）およびアレルギーアイ ELISA 卵（プリマハム）のそれぞれの ELISA キット測定について検討した。また、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。

3. 外部調査精度管理調査の実施

過去に実施した共同試験の協力機関および各都道府県、政令指定都市の衛生研究所 73 機関を対象として、試験への参加を募った結果、42 機関が参加の意向を示した。平成 24 年 9 月 4 日、これら 42 機関に 3 種類の試料と報告書書式を宅配便（冷凍）にて送付した。なお測定には、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）」に記載されている卵測定用キット 3 種（モリナガ FASPEK 卵測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 卵、アレルギーアイ ELISA 卵）のうち、任意の

1 種類以上を使用し、測定法は測定キットのプロトコール通り、サンプリング数は 1 試料につき 2 抽出、ELISA 測定は 1 抽出につき 3 ウェル併行で実施とした。また、測定期間は 10 月 5 日までの約 1 ヶ月間、報告書の回収期限は 10 月 12 日とした。

4. 統計処理

参加機関から回収した報告値は消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」の別紙 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」の 4.「特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」に「免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なることが予想される」とあることから、試料別、測定キット別に集計した。次にこのデータを統計解析システム JUSE-QCAS（㈱日本科学技術研修所）を用い、 \bar{X} -R 管理図を代用した解析を実施した（以下従来方式とする）。なお、 \bar{X} 管理図の上下管理限界線は（メジアン±メジアン×50%）とした。これは、前述したガイドラインの 4. の提言にタンパク質の回収率が「50%以上、150%以下であること」と記載されており、キットの測定誤差の範囲はこれ以下と考えられること、および以下に示すロバスト方式による統計でメジアンの 50%以下、150%以上のデータを除外するメジアンクリーニング操作が必要であることによる。

ロバスト方式の統計は、Huber の proposal 2 の推定方式による統計をエクセル・マクロによるプログラム（作成：村石明彦、システムサポート：大隅昇）により実行し、得られた平均値、標準偏差を用いて z -スコアを計算した。さらに、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、今回の外部精度管理調査でモリナガ FASPEK 卵測定キットを使用した機関は 39 機関、FASTKIT エライザ Ver. II 卵を使用した機関は 31 機関、アレルゲンアイ ELISA 卵を使用した機関は 4 機関であった。

（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

試験試料の卵タンパク質をモリナガ FASPEK 卵測定キット（モリナガキット）、FASTKIT エライザ Ver. II 卵（日本ハムキット）、アレルゲンアイ ELISA 卵（プリマハムキット）の各キットを用いて測定し、均一性を検討した。その結果、試料 1、試料 2、試料 3 のいずれも、3 種類のキットによる測定結果のそれぞれについて、一元配置による分散分析で均一と判定された（表 1）。しかし測定値は同一試料でもキットごとに差があった。特に日本ハムキットは試料 1 では卵タンパク質添加量に対する回収率が 80%台と低かったのに対し、試料 2 では回収率が 100%以上となり、試料 1 と試料 2 では添加量と測定値の関係が逆転する結果が得られた。

一方、各試料の測定期間終了後の測定値の、配付前の測定値に対する割合（安定性）は 94.5~113.0%の範囲であった（表 2）。安定性は同じ試料においても測定したキットにより変化の方向が異なっており、変動幅は測定誤差の範囲内と考えられた。

2. 精度管理調査結果

参加機関の測定値を試料別かつ測定キット別に集計し集計結果を表 3 に、測定値の分布をまとめて図 1 に示した。モリナガキットによる測定値は一部の機関を除き、いずれの試料でも報告値の分布範囲が狭く、機関間差が小さかった。

一方、日本ハムキットによる報告値はモリナガキットに比べ広範囲に分布しており、特に試料 1 で機関間の報告値のバラツキが大きく、相対標準偏差はモリナガキットの 2 倍の 20%以上に達した。これは日本ハムキットの測定操作ステップが他のキットに比べ多いことに起因するのではないかと考えられた。また参加機関の総平均値は均一性試験の結果と同様、添加量の低い試料 2 の測定値が試料 1 の測定値を上回った。

プリマハムキットは使用した機関が少なかったため、報告値のバラツキが他の 2 キットと比べて差があるかについては明らかではなかった。

3. キット別集計結果

1) モリナガキット

(1) 試料 1 の測定結果

モリナガキットを用いて測定した 39 機関の試料 1 の報告値をまとめて表 4(左側)に示した。

従来方式によるヒストグラムおよび正規確率プロットを図 2 に、Xbar-R 管理図を図 3 に示した。Xbar 管理図で上部管理限界線および下部管理限界線の外側となったデータはなかったが、R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が 1 機関あった。

全 39 機関の総平均値±標準偏差は $9.919 \pm 0.904 \mu\text{g/g}$ であった。また、総平均値から大きく離れたデータがあったため、2

σ 処理を 2 回行った。その結果除外された 4 機関を除く 35 機関の総平均値±標準偏差は $9.874 \pm 0.433 \mu\text{g/g}$ となった。

次にロバスト方式による統計を実施した。メジアンクリーニングに該当する報告値はなかったため、全 39 機関のデータからロバスト平均値±ロバスト標準偏差を求め、 $9.874 \pm 0.553 \mu\text{g/g}$ の値を得た。

以上 3 種類の平均値および標準偏差を用いて z-スコアを計算し、図 4 に示した。従来方式で全 39 機関の統計値から算出した z-スコアでは、絶対値が 2 以上の機関は 3 機関、そのうち 3 以上は 1 機関であったが、2 σ 処理 2 回実施後では絶対値が 2 以上の機関が 4 機関、そのいずれも絶対値は 3 以上となった。また、ロバスト方式統計値では絶対値が 2 以上の機関は 4 機関、そのうち 3 以上の機関は 3 機関であった。

(2) 試料 2 の測定結果

モリナガキットを用いて測定した 39 機関の試料 2 の報告値をまとめて表 4(中央)に示した。

従来方式によるヒストグラムおよび正規確率プロットを図 5 に、Xbar-R 管理図を図 6 に示した。Xbar 管理図では 1 機関が上部管理限界線の外側となったほか、R 管理図でも 1 機関が上部管理限界線を超えた。全 39 機関のデータの総平均値±標準偏差は 8.918 ± 0.935 であったが、総平均値から大きく離れたデータがあったため、2 σ 処理を行った。その結果除外された 2 機関を除く 37 機関の総平均値±標準偏差は $8.859 \pm 0.454 \mu\text{g/g}$ となった。

次にロバスト方式による統計を実施した。メジアンクリーニングに該当する報告値があったため、全 39 機関のデータを使用した

場合と、メジアンクリーニング後の 38 機関のデータを使用した場合のそれぞれについて統計処理を実施した。得られたロバスト平均値±ロバスト標準偏差は全 39 機関では $8.853 \pm 0.521 \mu\text{g/g}$ 、メジアンクリーニング後では $8.831 \pm 0.503 \mu\text{g/g}$ であった。

以上 4 種類の平均値および標準偏差を用いて z-スコアを計算し、図 7 に示した。従来方式による全 39 機関の統計値から算出した z-スコアでは、絶対値が 2 以上の機関は 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関であったが、 2σ 処理実施後の統計値では絶対値が 2 以上の機関は 3 機関、そのうち 3 以上が 2 機関となった。また、ロバスト方式統計値では、メジアンクリーニング実施のいかんにかかわらず、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 3 機関、そのうち 3 以上は 2 機関であった。

(3) 試料 3 の測定結果

モリナガキットを用いて測定した 39 機関の試料 3 の報告値をまとめて表 4 に示した。従来方式によるヒストグラムおよび正規確率プロットを図 8 に、Xbar-R 管理図を図 9 に示した。Xbar 管理図では 1 機関が上部管理限界線の外側となった。全 39 機関の総平均値±標準偏差は $5.924 \pm 0.684 \mu\text{g/g}$ であったが、総平均値から大きく離れたデータがあったため、 2σ 処理を行った。その結果除外された 2 機関を除く 37 機関の総平均値±標準偏差は $5.871 \pm 0.350 \mu\text{g/g}$ となった。

次にロバスト方式による統計を実施した。メジアンクリーニングに該当する報告値があったため、全 39 機関のデータを使用した場合と、メジアンクリーニング後の 38 機関のデータを使用した場合のそれぞれについ

て統計解析を実施した。得られたロバスト平均値±ロバスト標準偏差は全 39 機関では $5.873 \pm 0.413 \mu\text{g/g}$ 、メジアンクリーニング後では $5.857 \pm 0.402 \mu\text{g/g}$ であった。

以上 4 種類の平均値および標準偏差を用いて z-スコアを計算し、図 10 に示した。従来方式による全 39 機関の統計値から算出した z-スコアでは、絶対値が 2 以上の機関は 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関であったが、 2σ 処理実施後では絶対値が 2 以上の機関が 2 機関でいずれも絶対値は 3 以上となった。また、ロバスト方式統計値では、メジアンクリーニング実施のいかんにかかわらず、絶対値が 2 以上の機関は 2 機関でいずれも絶対値は 3 以上であった。

(4) ELISA 測定における吸光度の相対標準偏差

モリナガキットの ELISA 測定の併行精度を、併行実施した 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差を指標として検討した。検量線用標準液の測定における相対標準偏差を、濃い方から 5 濃度についてまとめ、図 11 に示した。機関番号 28 は 5 濃度中 4 濃度で相対標準偏差が 15% を超え、併行精度が著しく不良だった。また、機関番号 17、18、29 では 5 濃度中 3 濃度以上で相対標準偏差が 5% を超え、機関番号 9、17、21、27 においては、10% を超える測定が認められるなど、併行精度に問題がある機関が散見された。

試料測定における併行精度は、併行実施した 3 ウェル相対標準偏差の試料ごとの平均値を用いて検討した (図 12)。その結果、機関番号 17 は 3 試料とも、機関番号 29、30、38 では 3 試料中 2 試料で相対標準偏差が 5% を超え、併行精度に問題がある可能性が示唆された。

(5) z-スコアの絶対値が 2 以上となったデータ

モリナガキットを用いた精度管理試料の測定において、いずれかの統計で少なくとも 1 試料の z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関は、5 機関あった。このうち機関番号 6 および機関番号 28 は全試料で z-スコアの絶対値が 2 以上となった。

機関番号 28 は、検量線 7 濃度のうち 5 濃度で相対標準偏差が 15% 以上と ELISA の併行精度が悪く、検量線が正しく設定できていない可能性が考えられ、これが定量値に影響したものと考えられた (図 11)。機関番号 6 の併行精度は良好で、検量線の吸光度も他の機関と同程度であった。また、当該機関は日本ハムキットによる測定にも参加しているが、日本ハムキットのデータは良好であるため、モリナガキット測定の際、試料の希釈を誤った可能性が高いと考えられた。機関番号 34 は、試料 1 で z-スコアが 2 以上で、さらに R 管理図でも管理限界を超えていた。しかし、ELISA 測定の併行精度は良好であったため、試料のサンプリングに問題があった可能性が考えられた。試料 2 で z-スコアが 2 以上となった機関番号 18 については検量線の併行精度に若干問題が認められたため、これが測定値に影響した可能性が考えられた。しかし、試料 1 で z-スコアが -2 以下となった機関番号 16 についてはその原因は明らかではなかった。

このほか、機関番号 11 は試料 2 の R が管理限界を超えた。当該機関は日本ハムキットによる試料 2 の測定でも R が管理限界を超えており、試料 2 のサンプリングに問題があったものと考えられた。

2) 日本ハムキット

(1) 試料 1 の測定結果

日本ハムキットを用いて測定した 31 機関の試料 1 の報告値をまとめて表 5 に示した。

従来方式によるヒストグラムおよび正規確率プロットを図 13 に、Xbar-R 管理図を図 14 に示した。Xbar 管理図で上部管理限界線および下部管理限界線の外側となったデータおよび、R 管理図で上部管理限界線を超えたデータはなかった。全 31 機関の総平均値±標準偏差は $8.127 \pm 1.733 \mu\text{g/g}$ であった。また、総平均値から大幅に離れたデータはなかったため、 2σ 処理は実施しなかった。

次にロバスト方式による統計を実施した。メジアンクリーニングに該当するデータはなかったため、全 31 機関のデータからロバスト平均値±ロバスト標準偏差を求め、 $8.190 \pm 1.718 \mu\text{g/g}$ の値を得た。

以上 2 種類の平均値および標準偏差を用い z-スコアを計算し、図 15 に示した。その結果、従来方式の統計およびロバスト方式統計から算出した z-スコアのいずれにおいても、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 1 機関で、3 以上となる機関はなかった。

(2) 試料 2 の測定結果

日本ハムキットを用いて測定した 31 機関の試料 2 の報告値をまとめて表 5 に示した。従来方式によるヒストグラムおよび正規確率プロットを図 16 に、Xbar-R 管理図を図 17 に示した。Xbar 管理図で上部管理限界線および下部管理限界線の外側となったデータはなかったが、R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が 1 機関あった。全 31 機関の総平均値±標準偏差は $9.506 \pm 1.065 \mu\text{g/g}$ であった。また、総平均値か

ら大きく離れたデータが認められたため、 2σ 処理を実施した結果、除外された 2 機関を除く 29 機関の総平均値±標準偏差は $9.488\pm 0.833 \mu\text{g/g}$ となった。

次にロバスト方式による統計を実施した。メジアンクリーニングに該当するデータはなかったため、全 31 機関のデータからロバスト平均値±ロバスト標準偏差を求め、 $9.494\pm 0.996 \mu\text{g/g}$ の値を得た。

以上 3 種類の平均値および標準偏差を用い z-スコアを計算し、図 18 に示した。その結果、従来方式による 31 機関の統計値から算出した z-スコアでは、絶対値が 2 以上の機関は 2 機関で 3 以上の機関はなかったが、 2σ 処理実施後では絶対値が 2 以上の機関が 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関となった。また、ロバスト方式統計値では絶対値が 2 以上の機関は 2 機関で 3 以上となる機関はなかった。

(3) 試料 3 の測定結果

日本ハムキットを用いて測定した 31 機関の試料 3 の報告値をまとめて表 5 に示した。

従来方式によるヒストグラムおよび正規確率プロットを図 19 に、Xbar-R 管理図を図 20 に示した。Xbar 管理図で上部管理限界線および下部管理限界線の外側となったデータはなかったが、R 管理図で上部管理限界線を越えた機関が 1 機関あった。全 31 機関の総平均値±標準偏差は $5.728\pm 0.465 \mu\text{g/g}$ であったが、総平均値から大きく離れたデータが認められたため、 2σ 処理を実施した。その結果、除外された 1 機関を除く 30 機関の総平均値±標準偏差は $5.677\pm 0.375 \mu\text{g/g}$ となった。

次にロバスト方式による統計を実施した。

メジアンクリーニングに該当する報告値はなかったため、全 31 機関のデータからロバスト平均値±ロバスト標準偏差を求め、 $5.694\pm 0.411 \mu\text{g/g}$ の値を得た。

以上 3 種類の平均値および標準偏差を用い z-スコアを計算し、図 21 に示した。従来方式による 31 機関の統計値から算出した z-スコアでは、絶対値が 2 以上の機関は 1 機関で 3 以上の機関はなかったが、 2σ 処理実施後では絶対値が 2 以上の機関が 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関となった。ロバスト方式統計値による z-スコアでは絶対値が 2 以上の機関は 2 機関、そのうち 3 以上は 1 機関であった。

(4) ELISA 測定における吸光度の相対標準偏差

日本ハムキットの ELISA 測定の併行精度を、併行実施した 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差を指標として検討した。検量線用標準液の測定における相対標準偏差を、濃い方から 5 濃度についてまとめ、図 22 に示した。機関番号 2、6、9、27、30 では 5 濃度中 3 濃度で相対標準偏差が 5% を超え、併行精度に問題がある可能性が示唆された。

試料測定における併行精度は、併行実施した 3 ウェルの相対標準偏差の試料ごとの平均値を用いて検討した (図 23)。その結果、機関番号 14 は 3 試料中 2 試料で相対標準偏差が 5% を超え (うち 1 試料は 10% 以上)、併行精度に問題がある可能性が示された。

(5) z-スコアの絶対値が 2 以上となったデータ

日本ハムキットを用いた精度管理試料の測定において、いずれかの統計で少なくとも 1 試料の z-スコアの絶対値が 2 以上とな

った機関は、3 機関であった。このうち機関番号 14 は試料 1 および試料 2 で z-スコアが-2 以下となった。当該機関はモリナガキットによる測定にも参加しているが、モリナガキットの測定結果に比べ、試料 1 と試料 2 の測定の相対標準偏差が大きく (図 23)、併行精度が結果に影響した可能性が考えられた。機関番号 19 は試料 2 および試料 3 で z-スコアが 2 以上となったほか、試料 3 では R 管理図でも管理限界を超えた。また、試料 2 の 2 併行の測定値の差 R は管理限界を超えてはいないものの比較的大きかった。一方 ELISA 測定の併行精度はそれ程悪くないため、試料のサンプリングに問題があった可能性が考えられた。機関番号 9 は、試料 3 で z-スコアが 2 以上となった。当該機関は検量線の併行精度に若干問題が認められたため、これが測定値に影響した可能性が考えられた。

3) プリマハムキット

プリマハムキットを用いて測定した 4 機関の試料 1、試料 2 および試料 3 の報告値をまとめて表 6 に示した。4 機関の総平均値±標準偏差は試料 1 では $9.840 \pm 1.377 \mu\text{g/g}$ 、試料 2 では $7.974 \pm 1.251 \mu\text{g/g}$ 、試料 3 では $5.031 \pm 0.521 \mu\text{g/g}$ であった。プリマハムキットのデータについてはデータ数が少ないため、これ以上の統計解析は実施しなかった。

4) 測定値の相関性

(1) 同一キット内の試料間の相関性

試料 1 と試料 2、試料 2 と試料 3、試料 3 と試料 1 の各機関における測定値のモリナガキット内および日本ハムキット内における相関性を検討した。なお、解析データはモリナガキットにおいては 3 試料とも 2 σ

処理の対象となった 2 機関を除く 37 機関、日本ハムキットにおいては全 31 機関の測定値とした。

結果を図 24 および図 25 に示した。同一キット内の試料間の測定値は、同じ検量線から算出されるため相関性が高いと予想されたが、両キットとも試料 2 と試料 3 の間を除いて相関性はそれほど高くなく、試料 1 と試料 2、試料 3 と試料 1 では中位の相関に留まった。さらに試料 3 と試料 1 は濃度差が最も大きいことから他の組み合わせに比べて相関性が高くなる可能性が高いが、両キットとも組み合わせの中で最も低い相関となった。

以上の結果、使用するウェルの位置、基材など検量線以外の要素も測定結果に影響している可能性が示唆された。

(2) 同一試料のキット間の相関性

モリナガキット、日本ハムキットの両キットを用いて測定した 28 機関のうち、モリナガキットで 2 σ 処理の対象となった 1 機関を除く 27 機関について試料ごとに相関性を検討した。

結果を図 26 に示したが、いずれも中位～低位の相関に留まり、試料 3 を除き、同一キット内の試料間の相関に比べて相関係数が低く、ELISA 測定値に対する検量線の影響が大きいことが推察された。また、低いながらも相関性が認められることから、共通操作である、抽出、ピペット操作、プレートの洗浄操作、プレートリーダーの位置調整などの参加機関に特有な測定誤差の影響が否定できないことも示唆された。

4. 検査手法のまとめ

各参加機関が使用した検査手法をまとめて表 7 に示した。