

表4 セレウス菌検査用調査試料 米飯基材の生菌数の経時的変化  
(セレウス選択寒天培地)

保存期間	冷蔵保存		32.5℃保存	
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
接種直後	3.4×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>	3.4×10 <sup>4</sup>	1.0×10 <sup>5</sup>
4週間	4.1×10 <sup>4</sup>	6.6×10 <sup>4</sup>	3.6×10 <sup>4</sup>	7.3×10 <sup>4</sup>
8週間	4.4×10 <sup>4</sup>	7.8×10 <sup>4</sup>	2.9×10 <sup>4</sup>	7.0×10 <sup>4</sup>

単位：CFU/ g

表5 微生物担体の検討 微生物担体1個あたりの生菌数

保存期間	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sal. enterica</i>
調製直後	63.5	88.0	106.5
1日間	121.8	105.1	104.5
2日間	58.1	97.6	78.3
5日間	74.4	62.2	44.7
6日間	83.0	54.9	44.0
7日間	20.8	130.2	39.4

微生物担体10個の平均値 (CFU / 個) 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）

—アレルギー関連物質検査のための適正調査試料の作製検討—

主任研究者 渡辺 卓穂 (一財)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 生化学部第三室長  
協力研究者 鈴木 達也 (一財)食品薬品安全センター 秦野研究所 室長  
協力研究者 梅津 麻実 (一財)食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員  
協力研究者 佐藤 夏岐 (一財)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不可欠であるため、配布用調査試料の作製が必要となっている。本年度は落花生試料の作製について検討するとともに、小規模での配布量を想定した試料調製を試みた。まず、基材添加用落花生タンパク質の調製に用いる落花生の選定を行った。3種類の ELISA キット（N キット、M キット、P キット）を用いて落花生タンパク質の回収率を比較した結果、回収率が最も高かった中国産落花生を採用した。次に、この落花生タンパク質溶液を2種類の基材に添加した試料を作製し、3種類の ELISA キットにより回収率および保存安定性を確認した。その結果、P キットについては保存期間が長くなるにつれて回収率が低下する傾向が認められたが、N キットおよびM キットでは2ヶ月間安定であることが確認された。また、各試料の測定値を比較したところ、基材間差、キット間差が大きかったことから、落花生 ELISA キットの測定は食品夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。そこで、20種類の食品を用いて各食品抽出液および各食品からの落花生タンパク質の添加回収試験を行い、落花生 ELISA キットの測定段階および抽出段階における食品夾雑物の影響を調べた。その結果、M キットは、測定段階および抽出段階のいずれでも食品夾雑物の影響を受けにくかったが、N キットは抽出段階で、P キットは測定段階で食品夾雑物の影響を受けやすいことが明らかとなった。さらに、落花生タンパク質の回収率が極端に低かった食品のうち、ココアパウダーに含まれるプロアントシアニジンに着目し、プロアントシアニジンを多く含む食品について検討をおこなった結果、M キット、P キットでは落花生タンパク質の測定阻害に

プロアントシアニジンが関与している可能性が示唆された。

## 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）が発出されている。また最近、特定原材料の定量検査法であるELISA法に用いる抽出液および標準品に含まれる変性剤（2-メルカプトエタノール）が毒物であることから亜硫酸ナトリウムに変更された（消食発第36号、平成26年3月26日）。これに伴い、ELISAキットについても2-メルカプトエタノールを用いない改良型ELISAキットが販売され、公定法として使用されているが、様々な食品に対する反応性についての知見は少ない。

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品目について試料の試作を完了している。

本年度は落花生の外部精度管理用調査試料の作製を目的として、落花生タンパク質添加試料の作製について検討するとともに、小規模での配布量を想定した試料調製を行い、試料の保存安定性を確認した。

また、落花生の外部精度管理用調査試料に用いる適正な基材を探索することを目的として、落花生ELISAキットの様々な食品に対する反応性について確認し、測定を阻害する食品成分についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試料

#### 1.1. 落花生

落花生は国産生落花生（千葉半立種）、中国産生落花生およびアメリカ産生落花生、その他にレトルトパウチ食品であるゆで落花生（千葉半立種）をそれぞれ購入して使用した。

#### 1.2. 食品

食品は原材料の欄に落花生を使用した旨の表示が無い、こしあん、チョコレートクリーム、白がゆ、かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、ブロッコリーペースト、豆腐、高野豆腐、カスタードクリーム、いちごジャム、ビスケット、鶏がらスープの素、いりごま、米粉、小麦粉、ハンバーグ、あさり缶詰、魚肉ソーセージ、鯖缶詰、オリーブオイル、ココアパウダー、ミルクココア、チョコレート、チョコクッキー、シナモン、ミックスベリーを購入して使用した。

## 2. タンパク質抽出

落花生からのタンパク質抽出は通知法標準品規格に記載の方法に従って実施した。落花生はミルサーIFM-700G（岩谷産業(株)）で粉砕したものを使用した。抽出には振とう機：RECIPRO SHAKER NR- I および Double Shaker R-30 mini（以上TAITEC）、遠心機：himac CF 16RX（日立工機(株)）を使用した。

## 3. 総タンパク質の定量

落花生から抽出したタンパク質の濃度は 2-D Quant Kit（GE ヘルスケアバイオサイエンス(株)）を用いて定量した。

## 4. 特定原材料（落花生）タンパク質の定量

特定原材料（落花生）タンパク質の定量は ELISA 法により実施した。すなわち日本ハム社製の FASTKIT™ エライザ Ver. III 落花生キット（N キット）、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ II 落花生キット（M キット）およびプリマハム社製のアレルゲンアイ®ELISA II 落花生キット（P キット）を使用した。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。

## 5. SDS-PAGE

SDS-PAGE はゲルに SDS-PAGE mini（テフコ）を使用し、電気泳動槽 STC-808（テフコ）により行った。泳動後のゲルはコロイド CBB 染色キット（テフコ）で染色した。分子量マーカーには SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard（invitrogen）を使用した。

## 6. 試料の作製

中国産落花生よりタンパク質抽出を行い、落花生タンパク質溶液を調製した。次に、こしあんおよびチョコレートクリーム

に落花生タンパク質溶液をそれぞれ 10.7  $\mu\text{g/g}$ 、10.8  $\mu\text{g/g}$  となるよう添加し、フードプロセッサー：MK-K58（松下電器産業(株)）で均質になるまで混合した後、遠沈管に分注して試料を作製した。作製した試料はいずれも $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

（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. 特定原材料（落花生）調査試料の作製検討

#### 1. 1. 添加用落花生タンパク質の調製に用いる落花生の選定

基材に添加する落花生タンパク質の調製を行うにあたり、通知法の落花生標準品規格では千葉県産バージニア種落花生を使用することとしているが、品種名や加熱の有無等は不明である。そこで、基材の添加に適した落花生を選定するために、生落花生 3 種類〔国産生落花生（千葉半立種）、中国産生落花生およびアメリカ産生落花生〕およびゆで落花生 1 種類〔国産ゆで落花生（千葉半立種）〕からそれぞれタンパク質を抽出し、各落花生タンパク質抽出液中の総タンパク質濃度を比較した（表 1）。その結果、生落花生 3 種のタンパク質濃度は落花生標準品規格に記載のタンパク質濃度をいずれも満たしていた。一方、国産ゆで落花生のタンパク質濃度は落花生標準品規格を上回っており、国産生落花生の約 2 倍のタンパク質が抽出された。

次に、各落花生タンパク質抽出液をそれぞれ 10  $\mu\text{g/mL}$  となるよう希釈後、3 種類

の ELISA キットで測定し、落花生タンパク質の回収率を比較した（表 2）。その結果、生落花生 3 種の回収率は各キット内でそれぞれ同程度であったが、キット間で比較すると、P キット、N キット、M キットの順に高かった。また、国産ゆで落花生の回収率は N キットでは 75.4% であり、同キットの国産生落花生の回収率と同程度であったが、M キットおよび P キットではそれぞれ 22.5% および 51.1% と低く、同キットの国産生落花生の回収率の約 2 分の 1 であった。生落花生よりもゆで落花生で回収率が低かった原因として、加熱処理による落花生タンパク質の変性が考えられた。そこで、ゆで落花生中のタンパク質が変性しているかを確認するために、各落花生タンパク質抽出液について SDS-PAGE を行い、泳動像を比較した（図 1）。その結果、国産ゆで落花生は生落花生 3 種に比べて全体的にバンドが不明瞭であり、高分子側のバンドに消失または減少がみられた。このことから、国産ゆで落花生のタンパク質は加熱処理により変性していることが確認された。また、加熱処理した食品中の落花生タンパク質を M キットまたは P キットで測定した場合、測定値が実際の値よりも低くなる可能性が考えられた。

以上のことから、添加用落花生タンパク質溶液には国産ゆで落花生を除く生落花生 3 種のうち、ELISA 測定値の比較的高かった中国産生落花生を使用することとした。

## 1. 2. 落花生添加試料の作製検討

1. 1. において選定した中国産生落花生から抽出した落花生タンパク質溶液をこしあんおよびチョコレートクリームにそれぞれ添加し、落花生タンパク質添加試料を作

製した。この落花生タンパク質添加試料について、調製直後、冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の回収率を調べ、安定性を評価した。なお、回収率は 3 種類の ELISA キットの測定値から算出したタンパク質量を添加タンパク質量で除することで求めた（表 3）。また、安定性は冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の測定値から算出したタンパク質量を保存前（調製直後）の測定値から算出したタンパク質量で除することで求めた。

その結果、調製直後の回収率は、こしあん試料およびチョコレートクリーム試料でそれぞれ P キットが 170.3%、133.6%、N キットが 104.4%、64.0%、M キットが 73.5%、73.7% と、P キット、N キット、M キットの順に高く、落花生タンパク質溶液の結果と同様にキット間差が大きかった。さらに、N キットおよび P キットでは試料間差も大きく、こしあん試料はチョコレートクリーム試料に比べて回収率が高かった。

冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後の安定性は、P キットでは保存期間が長くなるにつれて回収率が低くなる傾向がみられたが、N キットおよび M キットでは両試料の安定性がいずれも 100% 程度と良好であった。

以上のことから、3 種類のうち 2 種類の ELISA キットでは 2 ヶ月間安定であることが確認されたことから、これらの試料が外部精度管理用調査試料として適用できる可能性はあるが、長期安定性を確保するための更なる検討が必要であることが示唆された。

## 2. 落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす食品についての検討

## 2.1. 落花生 ELISA キットの食品夾雑物の影響

1.2. において、こしあん試料とチョコレートクリーム試料の落花生 ELISA キットの測定値はキット間差に加え、基材間差も大きかった。このことから、落花生 ELISA キットの測定は食品夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。また、現在使用している変性剤に亜硫酸ナトリウムを用いた改良型 ELISA キットは、発売されてからの期間が浅く、様々な食品に対する反応性についての知見が少ない。そこで、落花生の外部精度管理用調査試料に用いる適正な基材を探索することを目的として、落花生 ELISA キットにおける食品夾雑物の影響について検討した。

検討には 20 種類の食品（こしあん、白がゆ、かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、ブロッコリーペースト、豆腐、高野豆腐、カスタードクリーム、いちごジャム、ビスケット、鶏がらスープの素、いりごま、米粉、小麦粉、ハンバーグ、あさり缶詰、魚肉ソーセージ、鯖缶詰、オリーブオイル、ココアパウダー）を使用し、以下に示す 2 種類の方法で試験を行った。

(1) 食品抽出液からの落花生タンパク質の添加回収試験：ELISA キットの測定段階における食品夾雑物の影響を評価するために、20 種類の食品から N キット付属の抽出液を用いてそれぞれ抽出を行い、得られた食品抽出液に各キット付属の落花生標準品を 12.5 ng/mL となるよう添加して ELISA 測定を行い、添加量に対する回収率を求めた(図 2)。

(2) 食品からの落花生タンパク質の添加回収試験：ELISA キットの抽出段階における

食品夾雑物の影響を評価するために、抽出を行う前の 20 種類の食品に落花生タンパク質溶液を 5.0  $\mu\text{g/g}$  となるよう添加後、N キット付属の抽出液を用いて抽出および測定を行い、併行して行った落花生タンパク質溶液の測定値に対する回収率を求めた(図 2)。

また、(1) の回収率を横軸、(2) の回収率を縦軸にプロットしたものを図 3 に示した。

まず、(1) の回収率(図 3、横軸)についてキット毎に比較した結果、M キットではすべての食品で回収率が 80~120% の範囲内、N キットではほとんどの食品で回収率が 90~130% の範囲内にあり、いずれも良好であった。一方、P キットではほとんどの食品で回収率が 110~190% 程度と範囲が広く、200% を超える食品もあった。また、N キットにおいて、回収率が 150% を超えた食品 3 種(ココアパウダー、いりごま、小麦粉)については、食品抽出液落花生標準品を添加しないブランク試料でも ELISA 測定値が 1  $\mu\text{g/g}$  以上であったことから、疑陽性反応あるいは原材料に落花生が含まれていた可能性が考えられた(データは示さず)。

次に、(2) の回収率(図 3、縦軸)についてキット毎に比較した結果、M キットでは回収率が全体的に低かったが、ほとんどの食品で 60~110% 程度と比較的良好であった。一方、N キットおよび P キットではほとんどの食品で回収率がそれぞれ 90~150%、100~160% 程度と広範囲であった。また、N キットおよび M キットではハンバーグ、P キットではココアパウダーで回収率が 50% 以下であった。これらの食品については、原材料中に測定阻害物質が含まれ

ている可能性が考えられた。かぼちゃペースト、とうもろこしペースト、鶏がらスープの素、オリーブオイルの4食品はすべてのELISAキットで回収率が80~120%であったことから、外部精度管理用調査試料に用いる基材として利用できる可能性が考えられた。

さらに、図3のプロット範囲の形状から各キットにおける食品夾雑物の影響について比較した結果、Mキットでは、プロット範囲が小さく、ELISA法の測定段階および抽出段階のいずれでも食品夾雑物の影響を受けにくいと考えられた。Nキットでは、プロット範囲が縦に長く、ELISA法の測定段階よりも抽出段階で食品夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。Pキットではプロット範囲が右上がりであり、(1)で回収率の低い(または高い)食品は(2)でも同様の傾向があることから、PキットはELISA法の抽出段階よりも測定段階で食品夾雑物の影響を受けやすいと考えられた。

## 2.2. プロアントシアニジンを含む食品による測定阻害

落花生の主要なアレルゲンであるAra h1はプロアントシアニジンと結合して複合体を形成することが知られており<sup>1)</sup>、PキットはAra h1に対するモノクローナル抗体を用いて測定するため、ポリクローナル抗体を用いて測定する他キットに比べプロアントシアニジンの影響を受けやすいと推測された。また、2.1.(2)においてPキットの回収率がプロアントシアニジンを含むココアパウダーでのみ極端に低かったことから、プロアントシアニジンが測定を阻害している可能性が考えられた。そこで、プロアントシアニジンを含む食品6種(ココアパウ

ダー、ミルクココア、チョコレート、シナモン、ミックスベリー)について落花生タンパク質の添加回収試験を2.1.(2)と同様の方法で行い、回収率を比較した(表4)。なお、プロアントシアニジンを含む食品は「米国農務省(USDA)データベース(Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods)」(<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/PA/PA.pdf>)を参考に選択した。その結果、Nキットでは回収率が低い食品はなかったが、MキットおよびPキットではプロアントシアニジンを特に多く含むシナモンで回収率がそれぞれ15.9%、3.6%と極めて低かった。このことから、Pキットに加え、プロアントシアニジンを特に多く含む食品ではMキットでも、プロアントシアニジンにより測定が阻害される可能性が考えられた。

## 2.3. ゼラチン添加抽出液による回収率の向上

プロアントシアニジンによる測定阻害は小麦グリアジン測定用のELISAキットにおいても確認されており、プロアントシアニジンと結合性のあるゼラチンを抽出液に添加することで回収率が向上するとの報告がある<sup>2)</sup>。落花生ELISAキットにおいても測定阻害にプロアントシアニジンが関与している場合、ゼラチンを抽出液に添加することで、プロアントシアニジンがゼラチンに吸着され、回収率が向上すると考えられた。そこで、2.2.で回収率が極端に低かったココアパウダーおよびシナモンについて、プロアントシアニジンと結合性のある魚ゼラチン(FG)およびウシゼラチン(BG)を添加した抽出液を用いて落花生タンパク質の添加回収試験を2.1.(2)と同様の方法で行

い、回収率が向上するか確認した（表 5）。その結果、測定阻害がみられた M キットのシナモン、P キットのココアパウダーおよびシナモンでは無添加区よりもゼラチン添加区で回収率が高かった。このことから、ゼラチン添加による回収率の向上が落花生 ELISA キットにおいても確認された。

なお、M キットのココアパウダーと両キットの落花生タンパク質溶液においてゼラチンの添加による回収率の減少がみられたが、これはゼラチンの成分が ELISA の抗原抗体反応を阻害した、あるいはゼラチン添加抽出液に粘性があるため、落花生タンパク質の抽出効率が低下したことが原因であると考えられた。

以上のことから、シナモンやココアパウダーを含む食品を基材として採用する場合、落花生タンパク質の回収量が実際の含有量よりも低くなることが予想されるが、基材へのゼラチン添加により改善できる可能性が考えられた。また、より難易度の高い外部精度管理用調査試料を作製する場合にはこれらプロアントシアニジンを含む食品が利用できると思われる。

## E. 結論

落花生の外部精度管理用調査試料の作製を目的として、4 種類の落花生よりタンパク質を抽出し、3 キットの ELISA 測定値から最も回収率の高かった中国産落花生を選定した。また、M キットおよび P キットではゆで落花生の測定値が生落花生の測定値よりも低く、これら ELISA キットは加熱変性タンパク質を認識できない可能性が考えられた。さらに、こしあんおよびチョコレートクリームを基材とした落花生タンパ

ク質添加試料については、N キット、M キットで測定した場合は 2 ヶ月間の安定性が確認されたが、P キットで測定した場合は保存期間が長くなるにつれ、回収率が低下する傾向が認められたことから、長期安定性を確保するための更なる検討が必要であることが示唆された。

落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす食品についての検討では、M キットは、ELISA 法の測定段階および抽出段階のいずれでも食品夾雑物の影響を受けにくかったが、N キットは抽出段階で、P キットは測定段階で食品夾雑物の影響を受けやすいことが明らかとなった。また、かぼちゃペースト、トウモロコシペースト、鶏がらスープの素、オリーブオイルの 4 食品はすべての ELISA キットで落花生タンパク質の回収率が 80~120% であったことから、外部精度管理用調査試料に用いる基材として利用できる可能性が考えられた。また、プロアントシアニジンを多く含む食品では M キットおよび P キットで測定阻害がみられたが、抽出液にゼラチンを添加することで、回収率が向上することが確認された。

## 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

1) 梅津麻実、佐藤夏岐、鈴木達也、渡辺卓穂：特定原材料の外部精度管理用調査試料の作製検討～落花生 ELISA キットの測定に影響を及ぼす原材料についての検討～：第



108回 日本食品衛生学会学術講演会, 金沢,  
2014.

2) 安達玲子、酒井信夫、有馬優美、山本智之、佐久間恵、最上(西巻)知子：新規抽出液を用いて調製した特定原材料定量検査法標準品に関する検討：第108回 日本食品衛生学会学術講演会, 金沢, 2014.

#### 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

#### 引用文献

1) Van Boxtel EL, Van den Broek LA, Koppelman SJ, Vincken JP, Gruppen H, J *Agric Food Chem.* (21) 8772-8, 2007

2) 村上太郎、工藤鮎子、紀雅美、昌山敦、山野哲夫、第108回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 56, 2014

表1 落花生タンパク質抽出液の総タンパク質濃度

試料名	落花生標準品規格 <sup>a</sup> (mg/mL)	タンパク質濃度 <sup>b</sup> (mg/mL)
国産生落花生(千葉半立種)		4.2
国産ゆで落花生(千葉半立種)	3.2~4.8	8.1
中国産生落花生		4.5
アメリカ産生落花生		4.8

a 消費者庁通知「アレルギー物質を含む食品の検査法について」(平成26年3月26日消食表第36号)より引用

b 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)により測定

表2 落花生タンパク質抽出液のELISAキットにおける回収率

試料名	タンパク質 <sup>a</sup> 濃度 (µg/mL)	Nキット		Mキット		Pキット	
		測定値 (µg/mL)	回収率 <sup>b</sup> (%)	測定値 (µg/mL)	回収率 <sup>b</sup> (%)	測定値 (µg/mL)	回収率 <sup>b</sup> (%)
国産生落花生(千葉半立種)	10	7.46	74.6	5.37	53.7	9.30	93.0
国産ゆで落花生(千葉半立種)	10	7.54	75.4	2.25	22.5	5.11	51.1
中国産生落花生	10	8.45	84.5	6.34	63.4	10.77	107.7
アメリカ産生落花生	10	7.19	71.9	5.14	51.4	9.70	97.0

Nキット…FASTKIT<sup>TM</sup>エライザVer.Ⅲ落花生キット(日本ハム)

Mキット…FASPEKエライザⅡ落花生キット(森永生科学研究所)

Pキット…アレルギー<sup>®</sup>ELISAⅡ落花生キット(プリマハム)

a 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値を参考に希釈した濃度

b (測定値)/(タンパク質濃度)×100

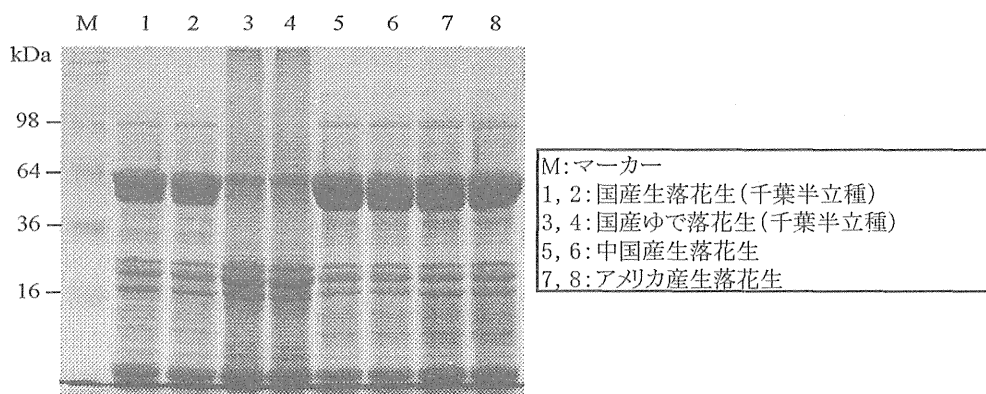


図1 落花生タンパク質抽出液のSDS-PAGE

表3 落花生タンパク質添加試料における添加回収率および安定性

ELISA キット	試料名	落花生 <sup>a</sup> タンパク質 添加量 (μg/g)	保存前(調製直後)(n=6)			-20℃ 1ヶ月保存後(n=3)			安定性 <sup>c</sup> (%)	-20℃ 2ヶ月保存後(n=3)			安定性 <sup>c</sup> (%)
			測定値 (μg/g)	回収率 <sup>b</sup> (%)	RSD (%)	測定値 (μg/g)	回収率 <sup>b</sup> (%)	RSD (%)		測定値 (μg/g)	回収率 <sup>b</sup> (%)	RSD (%)	
Nキット	こしあん	10.7	11.19	104.4	2.2	11.26	105.1	2.9	100.6	11.24	104.8	2.2	100.4
	チョコレートクリーム	10.8	6.88	64.0	1.1	7.37	68.5	1.9	107.0	7.20	67.0	0.5	104.6
Mキット	こしあん	10.7	7.87	73.5	1.4	7.73	72.1	1.5	98.1	7.68	71.6	1.7	97.5
	チョコレートクリーム	10.8	7.93	73.7	0.9	7.52	69.9	0.8	94.8	7.76	72.1	2.3	97.9
Pキット	こしあん	10.7	18.25	170.3	4.6	17.17	160.2	5.4	94.1	16.38	152.8	6.7	89.7
	チョコレートクリーム	10.8	14.37	133.6	5.5	11.67	108.4	3.3	81.2	11.04	102.6	4.7	76.8

Nキット…FASTKIT<sup>TM</sup>エライザVer.Ⅲ落花生キット(日本ハム)

Mキット…FASPEKエライザⅡ落花生キット(森永生科学研究所)

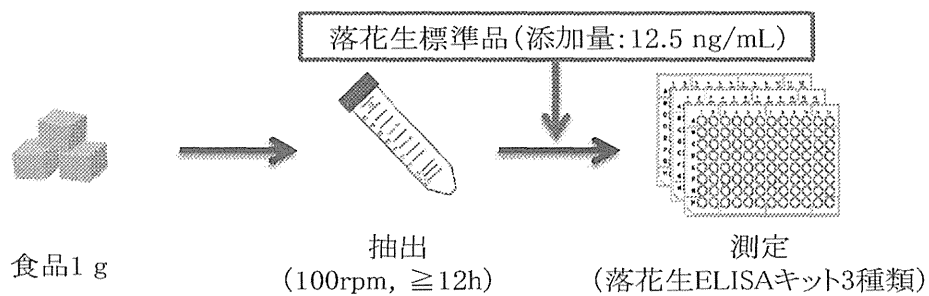
Pキット…アレルゲンアイ<sup>®</sup>ELISAⅡ落花生キット(プリマハム)

a 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値から計算

b (測定値)/(落花生タンパク質添加量)×100

c (保存後の測定値)/(保存前の測定値)×100

(1) 20種類の食品抽出液からの落花生タンパク質の添加回収試験



(2) 20種類の食品からの落花生タンパク質の添加回収試験

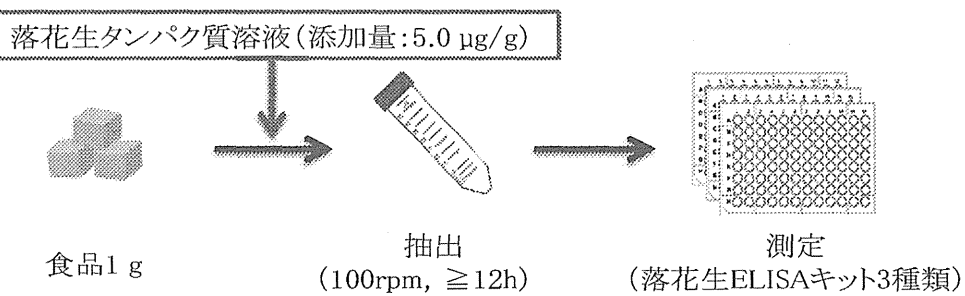


図2 落花生ELISAキットの食品夾雑物の影響についての検討方法

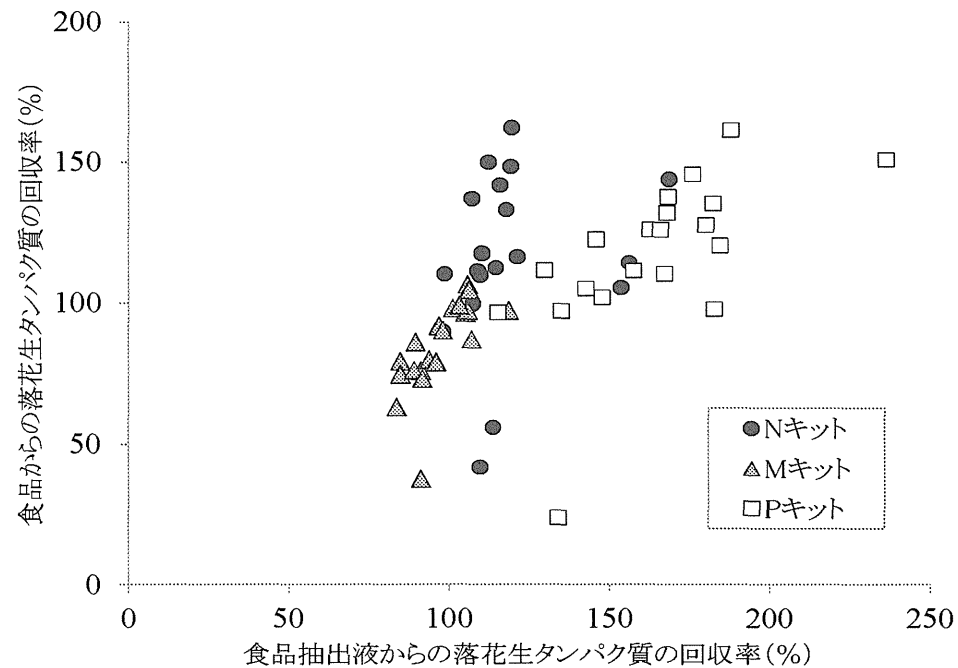


図3 落花生ELISAキットの食品夾雑物の影響

Nキット…FASTKIT™エライザVer.Ⅲ落花生キット(日本ハム)

Mキット…FASPEKエライザⅡ落花生キット(森永生科学研究所)

Pキット…アレルギーアイ®ELISAⅡ落花生キット(プリマハム)

横軸:食品抽出液からの落花生タンパク質の回収率(%)

(食品抽出液に落花生標準品を添加して測定したときのELISAキットの定量値)/(落花生標準品の添加量)×100

縦軸:食品からの落花生タンパク質の回収率(%)

(食品に落花生タンパク質溶液を添加して抽出・測定したときのELISAキットの定量値)/(落花生タンパク質溶液のELISAキットの定量値)×100

表4 プロアントシアニジンを含む食品における落花生タンパク質の添加回収試験

試料名	落花生 <sup>a</sup> タンパク質 添加量 (µg/g)	Nキット		Mキット		Pキット	
		測定値 (µg/g)	回収率 <sup>b</sup> (%)	測定値 (µg/g)	回収率 <sup>b</sup> (%)	測定値 (µg/g)	回収率 <sup>b</sup> (%)
ココアパウダー		4.27	119.2	4.04	113.7	1.54	21.5
ミルクココア		2.79	77.8	3.72	105.0	6.80	95.0
チョコレート		3.01	84.0	3.52	99.3	6.53	91.1
チョコクッキー	5.0	4.11	114.8	3.12	87.9	8.05	112.3
シナモン		2.77	77.2	0.56	15.9	0.26	3.6
ミックスベリー		2.49	69.5	3.58	100.9	7.23	101.0
落花生タンパク質		3.58	100.0	3.55	100.0	7.16	100.0

Nキット…FASTKIT<sup>TM</sup>エライザVer.Ⅲ落花生キット(日本ハム)

Mキット…FASPEKエライザⅡ落花生キット(森永生科学研究所)

Pキット…アレルギーアイ<sup>®</sup>ELISAⅡ落花生キット(プリマハム)

a 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値から計算

b (測定値)/(落花生タンパク質の測定値)×100

表5 ゼラチン添加抽出液を用いた落花生タンパク質の添加回収試験

試料名	抽出液	落花生 タンパク質 添加量 <sup>a</sup> (µg/mL)	Mキット				Pキット			
			測定値 (µg/mL)	回収率 <sup>b</sup> (添加量) (%)	無添加 抽出液 との差 <sup>c</sup>	回収率 <sup>d</sup> (コントロール) (%)	測定値 (µg/mL)	回収率 <sup>b</sup> (添加量) (%)	無添加 抽出液 との差 <sup>c</sup>	回収率 <sup>d</sup> (コントロール) (%)
ココアパウダー	無添加		4.61	92.2	—	114.0	2.48	49.6	—	29.6
	FG	5.0	3.18	63.7	-28.5	113.1	5.82	116.3	+66.7	124.1
	BG		3.52	70.4	-21.8	117.0	6.10	122.1	+72.5	134.4
シナモン	無添加		0.72	14.3	—	17.7	0.44	8.8	—	5.3
	FG	5.0	2.27	45.5	+31.1	80.7	1.43	28.6	+19.7	30.5
	BG		2.46	49.2	+34.8	81.6	1.70	34.0	+25.1	37.4
落花生タンパク質抽出液	無添加		4.04	80.9	—	100.0	8.38	167.7	—	100.0
	FG	5.0	2.81	56.3	-24.6	100.0	4.69	93.8	-73.9	100.0
	BG		3.01	60.2	-20.7	100.0	4.54	90.8	-76.8	100.0

FG…10%魚ゼラチン添加抽出液

BG…2.5%ウシゼラチン添加抽出液

Mキット…FASPEKエライザⅡ落花生キット(森永生科学研究所)

Pキット…アレルゲンアイ®ELISAⅡ落花生キット(プリマハム)

a 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値から計算

b (測定値)/(落花生タンパク質添加量)×100

c [無添加抽出液の回収率(添加量)]-[FGあるいはBG添加抽出液の回収率(添加量)]

d (測定値)/(各落花生タンパク質抽出液の測定値)×100



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 4)

—組換え DNA 技術応用食品検査のための適正調査試料の作製検討—

主任研究者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	部長
協力研究者	近藤 一成	国立医薬品食品衛生研究所	生化学部第二室長	
協力研究者	鈴木 達也	(一財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	室長
協力研究者	梅津 麻実	(一財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員
協力研究者	佐藤 夏岐	(一財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員

研究要旨

組換え DNA 技術応用食品の定性試験による外部精度管理調査の結果をより詳細に検討することを目的として、安全性未審査の遺伝子組換えコメ CpTI 系統の検知のためのリアルタイム PCR で得られる Ct 値を用いて統計解析を試みた。なお、本年度は遺伝子組換えでない米加工品粉碎物にコメ陽性コントロールプラスミドを添加して調製したコメ粉碎物試料についても解析した。まず、参加機関における Ct 値のデータについて正規確率プロットおよび  $z$ -スコア管理図を作成した結果、DNA 溶液試料において、CpTI 検出用試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示しており、Ct 値の解析により外部精度管理参加機関の測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。次にコメ粉碎物試料において、DNA 抽出に GMquicker2 を用いる試料では Ct 値をそのまま用いて正規確率プロットを作成したところ、形状が正規分布とは多少異なっていた。そこで、コメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差を用いることにより DNA 濃度の機関間差の補正を試みた。その結果、正規確率プロットの形状はより正規分布に近くなったことから、Ct 値の差を用いることにより DNA 濃度の誤差を補正できる可能性が示唆された。一方、DNA 抽出に Genomic-tip 100/G を用いる試料では Ct 値をそのまま用いた場合のほうが Ct 値の差を用いた場合よりも正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく正規分布に近かった。しかし、Ct 値の差を用いた場合、 $z$ -スコアが 2 以上となった機関が、DNA 溶液試料で  $z$ -スコアが 2 以上となった機関の場合と一致したことから、試料 4 においても DNA 濃度の誤差が補正された可能性が考えられた。よって、コメ粉碎物試料についても Ct 値を用いた解析により、測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。

## A. 研究の目的

組換え DNA 技術応用食品の検査は、各都道府県の衛生研究所および登録検査機関等で広く実施されている。我々はこれらの検査機関における組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性の確認および向上を目的として、外部精度管理調査を実施してきた。平成 25 年度は安全性未審査の遺伝子組換えコメの検査法が改正（食安発 0703 第 3 号、平成 25 年 7 月 3 日、以下、通知法とする）されたことを受け、安全性未審査の遺伝子組換えコメ CpTI 系統（以下、CpTI コメとする）を対象として外部精度管理調査を行った。また、平成 25 年度は外部精度管理調査試料を作製するにあたり、原料となる遺伝子組換え米を入手することができなかつたため、米加工品粉碎物に遺伝子組換えコメ陽性コントロールプラスミドを添加し、これを DNA 抽出操作確認用のコメ粉碎物試料として配布した。

CpTI コメの検査法は定性試験ではあるが測定にリアルタイム PCR を使用しており、増幅が認められた測定においては Th. line を設定することにより Ct 値（増幅曲線が Th. line と交わるサイクル数）を求めることができる。Ct 値は初期鋳型量に比例するが、外部精度管理では共通試料を用いるため、Th. line を同じ値に設定すれば、Ct 値は一定になると考えられる。

本研究では平成 24 年度に引き続き、遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査において収集した Ct 値に対して、定量試験の外部精度管理で用いる統計手法を適用し、定性試験による外部精度管理結果をより詳細に解析できないか検討した。なお、本年度は

コメ粉碎物試料についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

外部精度管理調査試料の調製には、国立医薬品食品衛生研究所より供与された遺伝子組換えコメ陽性コントロールプラスミド（以下、陽性プラスミドとする）および ColE1/TE、また、神奈川県内で購入した国産米粉 2 種（米粉①および米粉②）およびタイ産ライスヌードル 1 種を使用した。なお、タイ産ライスヌードルは孔径 1.0 mm のスクリーンを装着した超遠心粉碎機 ZM200（レッチェ）で粉碎したもの（ライスヌードル粉碎物）を使用した。

### 2. nonGM コメ DNA 溶液の調製

米粉①から Genomic-tip100/G (QIAGEN) を使用し通知法のプロトコールに従って DNA 溶液を抽出し、水で 10 ng/μL に調整したものを nonGM コメ DNA 溶液とした。なお、遠心分離には多用途小形遠心機 CF16RX（日立工機）、恒温槽には DryThermoUnit DTU-2B（TAITEC）、吸光度測定には Gene Quant pro（GE ヘルスケアバイオサイエンス）を使用した。

### 3. 外部精度管理調査試料の調製

DNA 溶液試料は、陽性プラスミドを nonGM コメ DNA 溶液で希釈し、試料 C（高濃度陽性試料；100 コピー/ウェル）、試料 A（中濃度陽性試料；40 コピー/ウェル）および試料 B（低濃度陽性試料；20 コピー/ウェル）を調製した。また、nonGM コメ DNA 溶液を試料 D（陰性試料）とした。

コメ粉碎物試料は米粉②を 15 mL 容の遠沈管に 500 mg ずつ分注し、このうち半分

ColE1/TE で希釈した陽性プラスミド溶液 (3000 copies/ $\mu$ L) を 10  $\mu$ L ずつ添加し、試料 1 (GM quicker2 抽出用 陽性試料) とした。残り半分には陽性プラスミド溶液を添加せず、試料 2 (GM quicker2 抽出用 陰性試料) とした。また、ライスヌードル粉砕物を 50 mL 容の遠沈管に 2.0 g ずつ分注し、同様に陽性プラスミド溶液 (6000 copies/ $\mu$ L) を 10  $\mu$ L ずつ添加し、試料 4 (Genomic-tip100/G 抽出用 陽性試料) とした。残り半分にはプラスミド溶液を添加せず、試料 3 (Genomic-tip 100/G 抽出用 陰性試料) とした。

#### 4. 外部精度管理調査の実施

外部精度管理調査参加機関には DNA 溶液試料 4 試料 (試料 A、試料 B、試料 C および試料 D) 各 1 本、コメ粉砕物試料 4 試料 (試料 1、試料 2、試料 3 および試料 4) 各 2 本を、実施要領および報告書書式とともに送付した。参加機関での検査は通知法に従うこととした。ただし、コメ粉砕物試料から DNA を抽出する際、試料 1 および試料 2 は GM quicker2 を、試料 3 および試料 4 は Genomic-tip 100/G を用いてそれぞれ 2 併行で実施することとし、試料の秤量を行わずに試料の入った遠沈管に直接抽出緩衝液を添加し、以降の操作を実施するよう依頼した。

すなわち参加機関は、通知法に従ってコメ粉砕物試料から抽出した DNA と、DNA 溶液試料のそれぞれについてコメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験のリアルタイム PCR 測定を実施した。次に各測定について Amplification plot を確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Th. Line を

0.2 に設定して得られた Ct 値が 48 未満か否かにより、陰性試料または陽性試料の判定を行った。

#### 5. 外部精度管理調査結果の統計解析

参加機関の測定結果は試料ごとにまとめ、正答率を算出した。

また、参加機関の Ct 値は、試料 A、試料 B および試料 C については CpTI 検出用試験、試料 1 および試料 4 についてはコメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験について、それぞれ正規確率プロットおよび  $z$ -スコア管理図を作成し、リアルタイム PCR 法による定性試験の結果の評価法について検討した。さらに試料 1 および試料 4 についてはコメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差についても同様に検討した。

#### C. D. 結果および考察

##### 1. 外部精度管理調査結果

外部精度管理調査結果の概要を表 1 に示した。平成 25 年度の参加機関は 31 機関であったが、コメ粉砕物試料において試料 1 および試料 2 のみ実施した機関が 1 機関 (機関番号 28)、試料 3 および試料 4 のみ実施した機関が 1 機関 (機関番号 15) あった。

CpTI コメの検出に関しては全機関が陽性試料および陰性試料を正しく判定し、正答率はすべて 100%であった。

定性試験では検出下限付近のコピー数を含有試料の測定結果において、検出の有無は確率の問題となるため、正しく判定するためには繰り返しの数を多く設定する必要がある。しかし、通知法では繰り返しの数が指定されており、外部精度管理調査では試料の濃度を検出下限付近に設定すると陰

性だった場合、結果の解釈が難しくなると考えられた。このため、平成 25 年度の外部精度管理調査試料は検出下限付近の濃度設定を避け、低濃度試料でも検出下限の 8 倍の濃度とした。このため、陽性試料に関しては難易度が低くなり、結果として正答率は全試料とも 100%となった。従って、判定結果のみから参加機関の検出感度を確認することは困難であった。

## 2. 外部精度管理調査結果の解析

### 2.1. DNA 溶液試料の解析

CpTI コメの検査法は定性試験ではあるが、測定にリアルタイム PCR を使用しており、増幅が認められた測定については、Ct 値が得られる。そこで、参加機関から収集した Ct 値を用いて、定量試験の外部精度管理で用いる統計手法を適用し、定性試験による外部精度管理結果をより詳細に解析できないか検討した。

DNA 溶液試料は DNA 抽出および濃度調整の操作が含まれないため PCR 反応液に含まれる鋳型の量には機関間差が少なく、Ct 値はほぼ一定になると予想される。このため、試料 A、試料 B および試料 C については Ct 値をそのまま解析した。

試料 A、試料 B および試料 C の CpTI 検出用試験で得られた Ct 値の正規確率プロットおよび  $z$ -スコア管理図を図 1、図 3 および図 5 にそれぞれ示した。正規確率プロットを確認したところ、機関番号 13 の報告値がすべての試料で平均値から大きく離れていた。このため、2 シグマ処理 ( $z$ -スコアの絶対値が 2 以上のデータを除く操作) を実施したところ、1 機関 (機関番号 13) が除外され、正規確率プロットはいずれの試

料においてもひずみ、とがりが小さくなり、正規分布に近い形状となった (図 2、図 4、図 6)。2 シグマ処理で除外された機関番号 13 はすべての CpTI 検出用試験で Ct 値が他機関より 4 サイクル程度大きいため、プライマー・プローブの濃度調製に問題があった可能性が示唆された。

2 シグマ処理後の  $z$ -スコア管理図において、 $z$ -スコアの絶対値が 2 以上となった機関は試料 A では機関番号 11、機関番号 29、試料 B では機関番号 11、機関番号 15、機関番号 29、試料 C では機関番号 11、機関番号 29 であった (図 2、図 4、図 6)。試料 A、試料 B および試料 C のいずれでも  $z$ -スコアが 2 以上であった機関番号 11 および機関番号 29 について、リアルタイム PCR 測定時の増幅曲線を確認したところ、ベースラインの継続的増加が認められた。ベースラインの増加分は増幅による蛍光増加分から差し引かれるため、増幅曲線は緩やかになり、Ct 値が大きくなったと考えられた。また、試料 B において  $z$ -スコアが -2 以下であった機関番号 15 については、反応がプラトーに達した時の蛍光強度が他の機関に比べて大きいことから、PCR 反応液の調製あるいは装置の設定が Ct 値に影響した可能性が考えられた。

以上のことから、DNA 溶液試料において Ct 値を用いた解析を行うことで参加機関の測定精度より詳しく推定できる可能性が示唆された。

### 2.2. コメ粉砕物試料の解析

通知法において、リアルタイム PCR に供する DNA 溶液は、DNA 抽出液の濃度を測定後 10 ng/ $\mu$ L に調整したものをを用いることとして