

図5 精米(古米)に添加した各種農薬の冷凍及び冷蔵における回収率測定結果
(測定時点につき、各n=3)

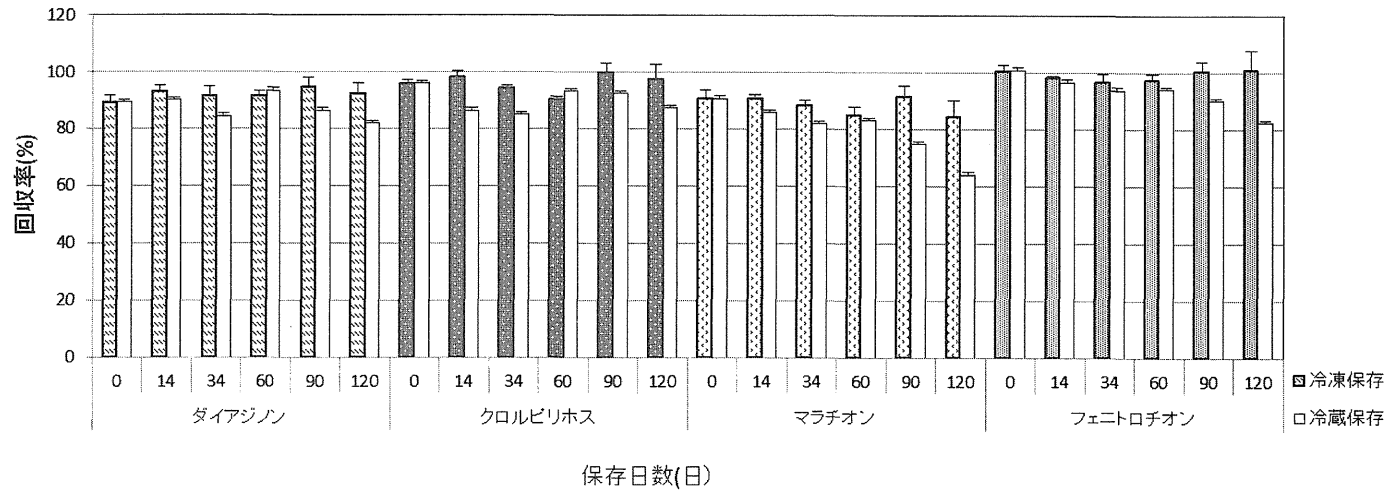


図6 玄米(古米)に添加した各種農薬の冷凍及び冷蔵における回収率測定結果
(測定時点につき、各n=3)

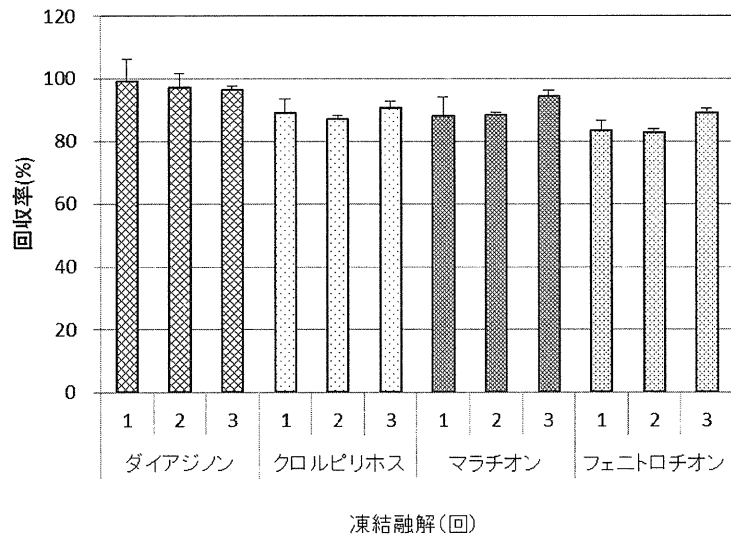


図7 水分5%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の凍結融解における回収率測定結果 (各時点 n=5)

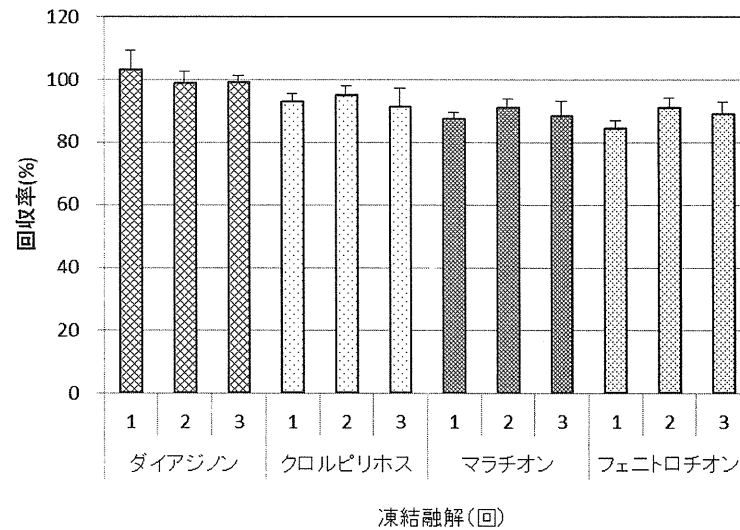


図8 水分10%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の凍結融解における回収率測定結果 (各時点 n=5)

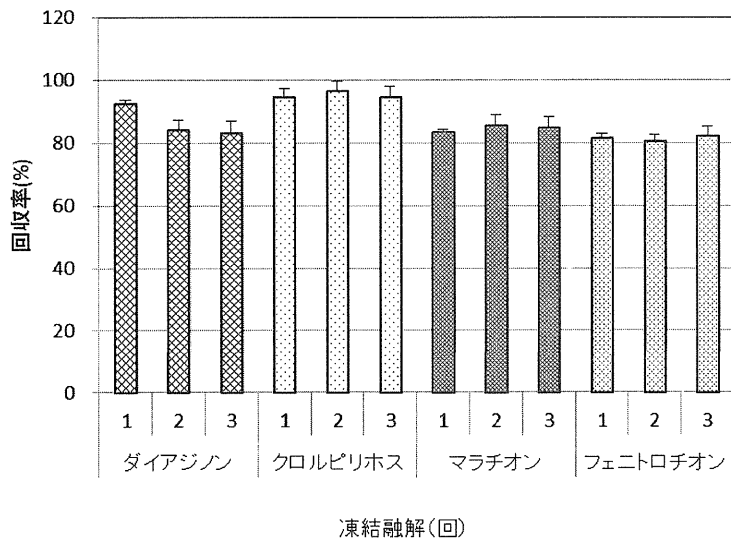


図9 油分2%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の凍結融解における回収率測定結果 (各時点 n=5)

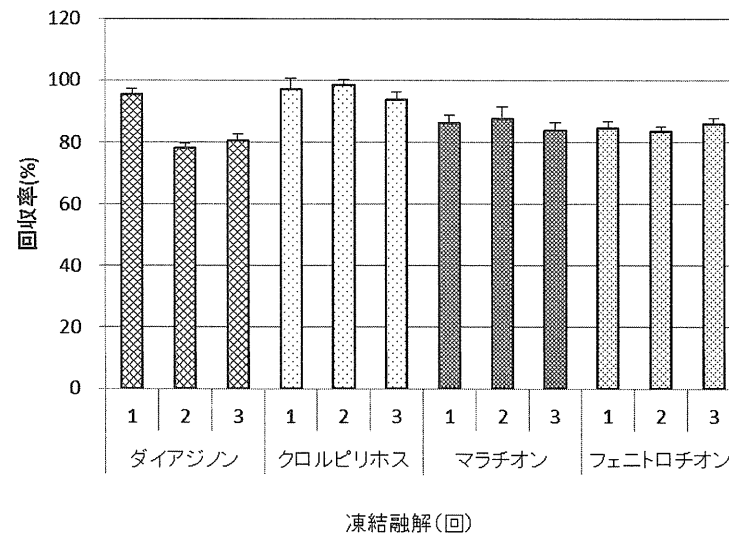


図10 油分5%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の凍結融解における回収率測定結果 (各時点 n=5)

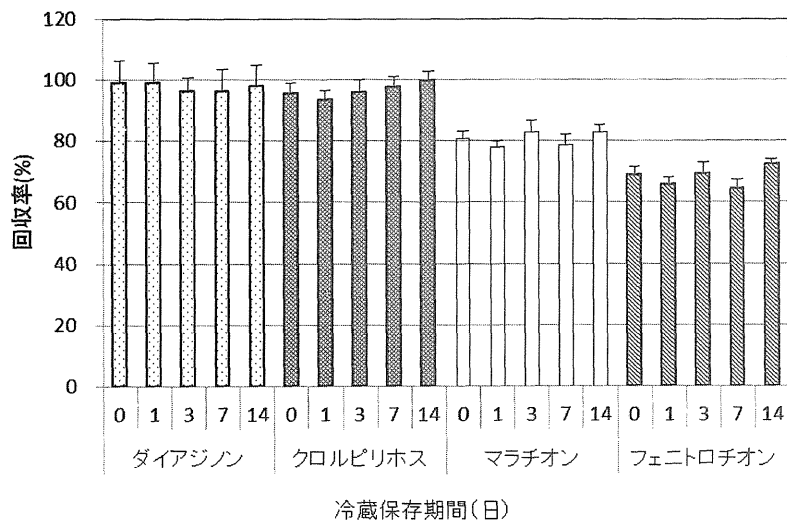


図11 水分5%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の冷蔵保存における回収率測定結果(各時点 n=5)

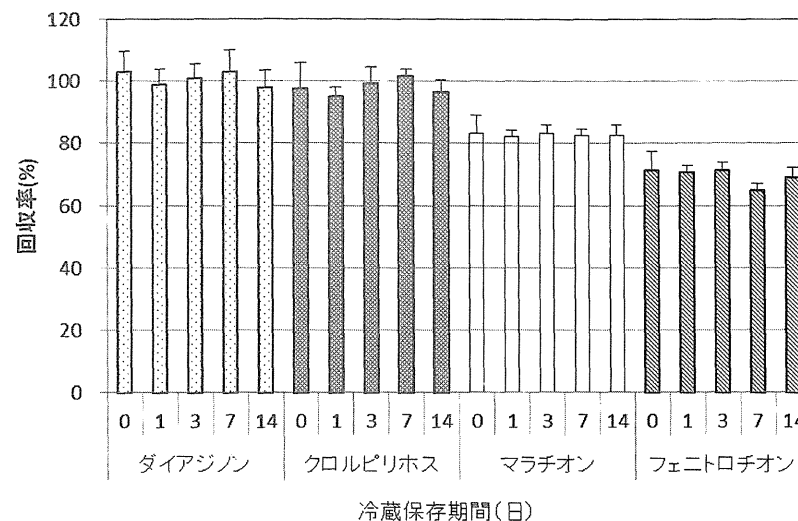


図12 水分10%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の冷蔵保存における回収率測定結果(各時点 n=5)

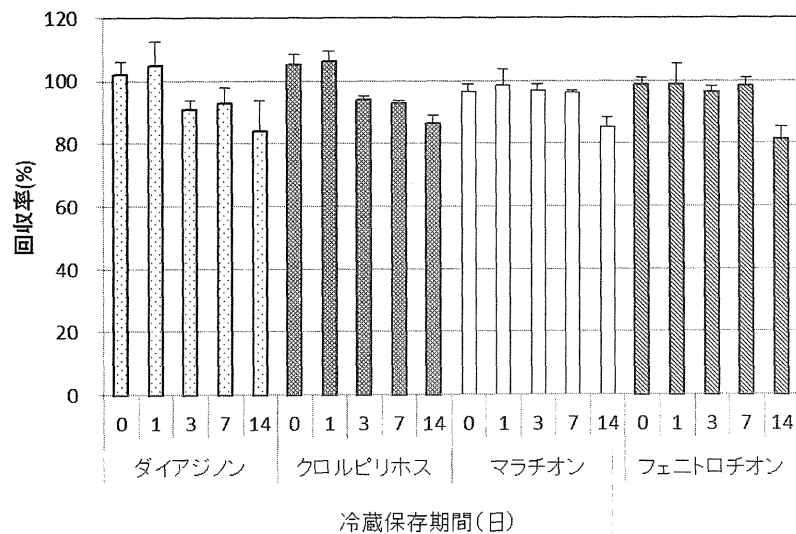


図13 油分2%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の冷蔵保存における回収率測定結果(各時点 n=5)

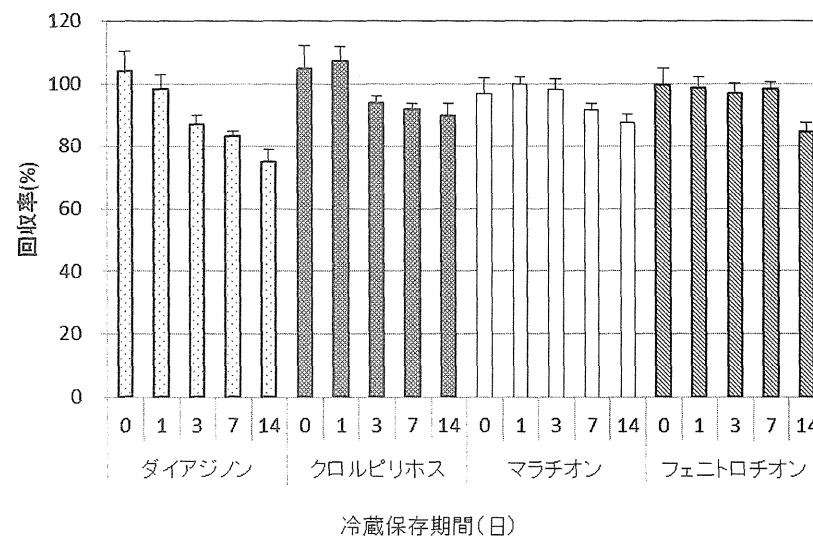


図14 油分5%添加枝豆ペーストに添加した各種農薬の冷蔵保存における回収率測定結果(各時点 n=5)

平成 27 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
研究分担報告書

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 2）
—一般細菌数測定検査用調査試料の改良に関する検討—

研究代表者	渡辺 卓穂	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	部長
研究協力者	鈴木 達也	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	山田 健一	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	梶原三智香	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所	研究員

研究要旨

食品衛生外部精度管理調査、微生物学調査では、これまで検討してきた腸炎ビブリオ、セレウス菌及び微生物担体の 3 項目について実施した。

腸炎ビブリオ調査試料の検討では、低温輸送における接種菌への影響を検討した。作製した調査試料を実際にチルドゆうパックで輸送し、箱内温度の経時変化、輸送前後の接種菌の生菌数測定及び選択培地上の反応の確認を実施した結果、チルドゆうパック発送前の保管温度を 22.5℃にした場合に、チルドゆうパック到着時の生菌数の減少を回避できることが示唆された。

セレウス菌調査試料の検討では、接種菌の芽胞液について長期安定性を検討した。これにより陽性菌、陰性菌共に約 1 年間の安定性が認められた。また、芽胞液は、調製後半年程度経過した方が生菌数が安定し、接種菌数の精度を向上できる可能性が示唆された。

微生物担体の安定化技術の検討では、検体採取時に担体が潰れなかった場合の定性試験について、サルモネラ菌を用いて検討した。外部精度管理で使用するサルモネラ陽性、陰性の 2 菌種において、担体が潰れない状態で定性試験を実施したところ問題なく判定できることを確認した。

以上のことから、低温輸送が可能と判断された腸炎ビブリオ、及び芽胞液の長期安定性の確認ができたセレウス菌は運用可能なレベルに達したと考えられた。また、微生物担体については実用化に至るレベルではないが、基礎的なデータを収集することができた。

A. 研究目的

これまで定性試験の新規調査用試料として検討を進めている腸炎ビブリオ、セレウス菌及び微生物担体について実施した。

腸炎ビブリオ検査用調査試料は、腸炎ビブリオが低温域に弱いことから、調査試料の輸送及び保管条件によっては添加菌の死滅をまねき、最終的な検査結果の判定に大きな影響を及ぼす可能性が考えられる。そのため、低温域を中心に保管温度の変化に伴う生菌数の経時的変化を確認してきたが、実際に低温輸送した場合の影響はこれまで確認していなかった。このことから、最終確認として通常、食品衛生外部精度管理調査における輸送手段であるチルドゆうパックでの輸送の影響について確認した。

セレウス菌検査用調査試料は、これまでに米飯基材の室温での長期保存が可能であることを確認してきたが、接芽胞液は作製方法により発育型が一部混入する可能性も否定できないことから、採用する接種用芽胞液の最適な保存期間について検討することを目的とした。

一方、これまでに食品衛生外部精度管理調査において採用した調査試料は基材を対象微生物を直接添加することにより作製しているが、この方法を採用した場合、基材中での安定性の確保が重要となる。そのため、基材の影響が少ない状態で対象微生物を維持することができれば、基材を選ぶことなく調査試料として応用できる可能性がある。そのため、人工イクラを参考とした疑似食材（一種のカプセル化）を開発することとした。その結果、サルモネラにおいて菌数の安定化が認められたことから、2014年度の安定性確認試験で最も安定して

いたサルモネラを使用し、試料の採取時に担体が潰れなかった場合でも定性試験で陰性、陽性を正しく判定できるかを検討することを目的とした。

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。

腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討

Vibrio parahaemolyticus HIC 140279

Vibrio fluvialis HIC 140282

セレウス菌検査用調査試料の検討

Bacillus cereus HIC 140280

Bacillus subtilis HIC 140244

微生物担体の検討

Salmonella enterica HIC 140294

Proteus mirabilis HIC 140255

なお、試験菌株は5継代以内のものを使用した。

2. 腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討

試験操作は国立医薬品食品衛生研究所HPで公開されているNIHSJ-06-ST3（定性試験法）に従って実施した。基材は樹脂製容器に個別に収納したこうや豆腐（約16.5 g/1個）を121℃で40分間高圧蒸気滅菌したものを使用した。なお、陽性菌として*Vibrio parahaemolyticus*（Vp）、陰性菌として*Vibrio fluvialis*（Vf）を使用した。

Marine agar（Difco）に37℃で24時間培養した試験菌を添加剤含有Marine broth（Difco）に接種し、同様に培養した培養液を適宜希釈したものを試験菌液とした。試験菌液50 mLを滅菌済こうや豆腐に添加したものを調査試料とした。

調査試料は冷蔵または22.5℃で保存し、

接種当日（0 日後）、チルドゆうパック発送日（9 日後）、チルドゆうパック到着日（12 日後）に定性試験及び寒天平板混釈法による生菌数測定を実施した。定性試験では、TCBS 寒天培地（日水製薬、栄研化学、極東製薬、OXOID、MERCK）、X-VP 寒天培地「ニッスイ」（日水製薬）、CHROMagar Vibrio（関東化学）、ビブリオ寒天培地「ニッスイ」（日水製薬）、ES ビブリオ寒天培地（栄研化学）の 9 種の選択寒天培地を使用した。発送時には温度データロガーを同梱し、輸送時の箱内温度をそれぞれ記録した。

3. セレウス菌検査用調査試料の検討

米飯基材に接種する陽性菌（*Bacillus cereus*）及び陰性菌（*Bacillus subtilis*）について、芽胞液の安定性を確認した。

陽性菌は芽胞形成培地で培養した菌を生理食塩液で懸濁した芽胞懸濁液、陰性菌は市販の芽胞液、陽性菌と同様に作製した芽胞懸濁液、芽胞懸濁液の一部をヒートショック処理により芽胞のみにした芽胞懸濁液の 3 種を用意した。これらを冷蔵保存し、約 1 年間の長期安定性を確認した。

4. 微生物担体による安定化技術の検討

2014 年度の微生物担体の安定性確認試験において最も安定していたサルモネラについて、基材に混ぜた担体が潰れないまま定性試験を遂行しても影響がないかを確認した。確認には、食品衛生外部精度管理調査のサルモネラの項目で使用している陽性菌（*Salmonella enterica*）及び陰性菌（*Proteus mirabilis*）の 2 菌を使用した。

生理食塩液に試験菌を懸濁して 1×10^5 CFU/mL の菌液を作製した。この菌液を 0.5% アルギン酸ナトリウム加生理食塩液

で 20 倍希釈したものを担体内包用溶液とした。担体内包用溶液を約 0.05g（250 CFU/0.05 g 相当）ずつ 5% 塩化カルシウム溶液に滴下し、数秒反応させて生成した担体を生理食塩液に回収した。

回収した担体を 10 mL の緩衝ペプトン水に 1 粒ずつ添加した。緩衝ペプトン水は 37°C で 24 時間培養した。培養後、培養液をテトラチオネート培地、ラパポート培地にそれぞれ 1 mL、ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地に 0.1 mL 添加した。培養液を添加した 3 種の選択液体培地を 42.5°C で 24 時間培養した。培養後の選択液体培地からそれぞれ ES サルモネラ II 寒天培地、DHL 寒天培地、MLCB 寒天培地、XLD 寒天培地、プリリアントグリーン寒天培地、CHROMagar サルモネラの 6 種の選択カンテン培地に 1 白菌耳画線後、37°C で 24 時間培養した。

培養後の選択寒天培地を観察し、発育の有無及び陽性、陰性の判定を実施した。

なお、担体の試験と並行して、 1×10^5 CFU/mL の菌液を生理食塩液で 20 倍希釈し、0.05 mL を緩衝ペプトン水に添加して同様に試験を実施したものを各試験菌の対照とした。

C. D. 研究結果及び考察

1. 腸炎ビブリオ検査用調査試料の検討

生菌数測定は接種当日、発送当日、チルドゆうパック到着後の 3 回実施した。接種当日は各菌 2 個ずつ、発送当日は保管温度 2 条件について各菌 2 個ずつ、チルドゆうパック到着後は発送した保管温度 2 条件について 5 セットずつの検査用調査試料を使用した。

定性試験は生菌数試験の残余を使用し、接種直後及びチルドゆうパック到着後の 2 回について実施した。

輸送中の箱内温度を記録したデータロガーは、チルドゆうパック到着後に速やかに回収した。

生菌数測定結果より、チルドゆうパックで輸送会社の冷蔵倉庫に保管されている間の生菌数の変化は小さいこと、及びチルドゆうパック発送前の保管温度条件がチルドゆうパック発送後の生菌数に大きく影響することが示唆された(図 1、表 1)。

生菌数の経時的変化について、発送前の保管条件が冷蔵の場合、Vp で約 10^{-1} 倍、Vf で約 10^{-3} 倍に接種菌数から減少した。一方 22.5℃ 保管では、Vp で約 10^2 倍、Vf で約 10 倍に増殖した。なお並行して実施した定性試験では、いずれの保管条件においても選択培地上の集落は陽性菌、陰性菌共に正常な反応を示した(表 2)。

また、輸送時の温度変化を記録した結果を図 2 に示した。図 2 は梱包して発送した各温度条件 5 セットの箱内温度平均値の経時的変化を示したものである。梱包直後は梱包時の室温だが、梱包後 2 時間以内に 10℃ 以下に低下し、配送会社の倉庫に保管されて 1℃ 前後に安定した後、配送のため倉庫から出されて 3℃ 前後まで上昇した(今回の輸送試験は同一管内での輸送であったことから、県内の配送センターに集積されないため、輸送時間が非常に短くなった)。75 時間後の開封時に温度の急激な上昇が認められたが、梱包開始から開封までの間に大きな温度上昇は認められず、安定した低温保管であったことが示された。

定性試験の外部精度管理において、輸送

中の生菌数の減少は判定結果に大きく影響する。今回の結果より、発送前の保管温度を 22.5℃ にすることで、輸送中の低温保管による生菌数の減少を回避できると考えられた。

2. セレウス菌検査用調査試料の検討

米飯基材に接種する陽性菌 (*Bacillus cereus*) 及び陰性菌 (*Bacillus subtilis*) について、芽胞液の安定性を確認した。

全体的に大きな生菌数の変動は認められなかったが、長期保存で生菌数がより安定する傾向が認められた(図 3)。特にヒートショック処理を実施していない芽胞液は、芽胞以外の菌の除去効果があると考えられた。今回の結果から、基材に接種する試験菌は、陽性菌、陰性菌共に 24 週(約半年)以上の冷蔵保管後の芽胞懸濁液を使用することで、調査用試料の生菌数の精度を高められる可能性が示唆された。

3. 微生物担体による安定化技術の検討

各試験菌の担体は 10 個ずつ試験に供した。担体の選択寒天培地の発育の有無及び定性試験の判定結果は表 3、表 4 のとおりであった。陽性菌は対照試験及び全ての担体で陽性の判定を得られた。一方、陰性菌は一部の寒天培地上で弱い発育が確認されたが、対照及び全ての担体で陰性の判定を得られた。

以上のことより、液体培地による増菌の工程が入る試験法では担体が潰れない場合も結果に影響はないことが示唆された。

E. 結論

腸炎ビブリオ用調査試料の検討では、チルドゆうパックでの輸送が可能であることを示すことができた。また、セレウス菌用

調査試料の検討では、接種菌の安定性を確認できたことより、接種菌の生菌数の精度を向上できる可能性を示した。微生物担体による安定化技術の検討では、定性試験において、担体が潰れない状態で操作を進めた場合にも、結果に影響がないことが示された。

以上のことより、腸炎ビブリオ、セレウス菌の調査用試料は実際の運用可能なレベルに達したと考えられた。また、微生物担体による安定化技術の検討においては、基礎的なデータを収集できた。

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

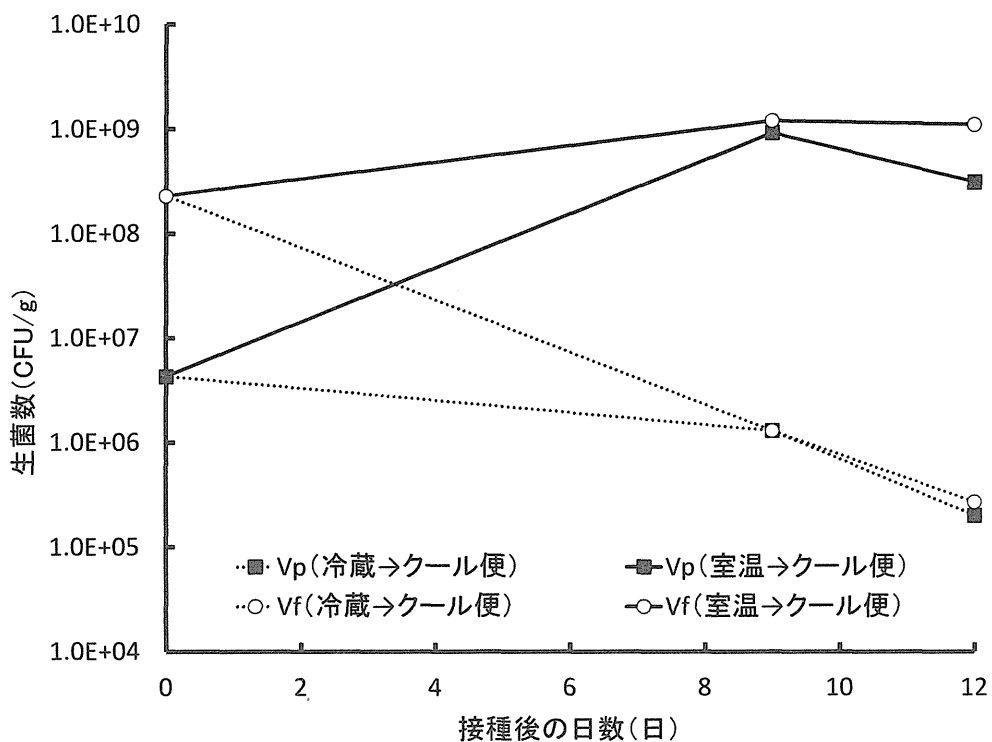


図1 腸炎ビブリオ：チルドゆうパック利用時の発送前保管条件の生菌数への影響

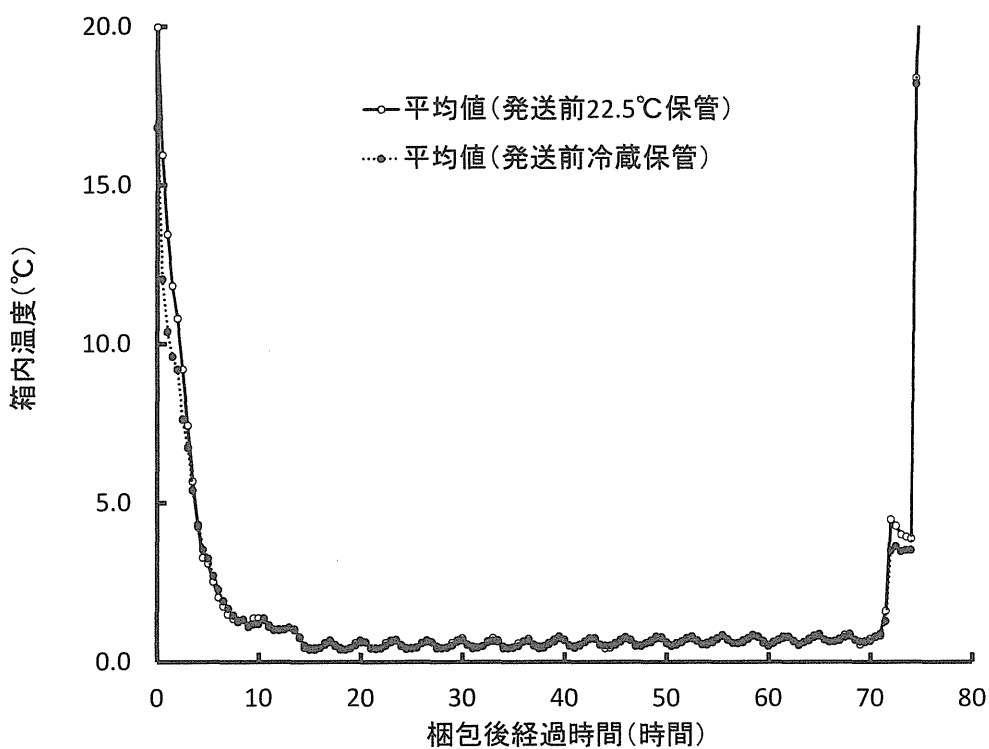


図2 腸炎ビブリオ：チルドゆうパック利用時の箱内温度の経時的変化

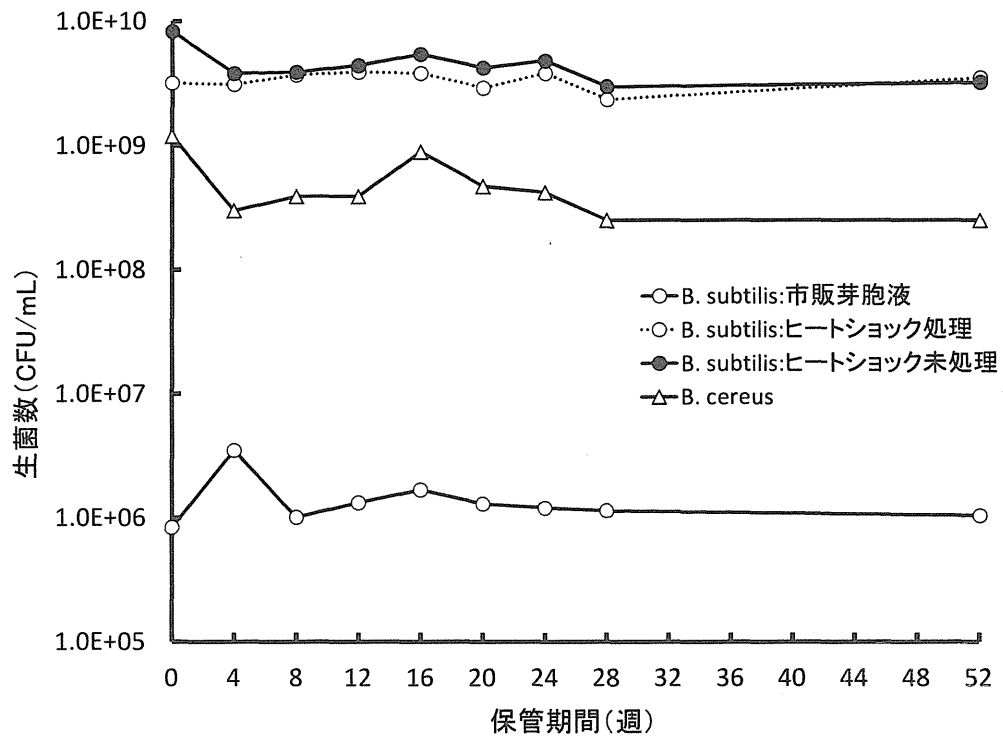


図3 セレウス菌：芽胞液の冷蔵保管における生菌数の経時的変化

表1 腸炎ビブリオ：チルドゆうパック利用時の発送前保管条件の生菌数への影響

接種後経過時間 (日)	チルドゆうパック発送前の保管条件			
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		<i>Vibrio fluvialis</i>	
	冷蔵	22.5℃	冷蔵	22.5℃
0	4.3×10^6	4.3×10^6	2.3×10^8	2.3×10^8
9	1.3×10^6	9.2×10^8	1.3×10^6	1.2×10^9
12	2.0×10^5	3.1×10^8	2.7×10^5	1.1×10^9

単位：CFU/ g

表2 腸炎ビブリオ：チルドゆうパック利用時の発送前保管条件の選択培地反応性への影響

接種後経過時間 (日)	選択カンテン培地の種類									
	TCBS 寒天培地					酵素基質培地				
	A	B	C	D	E	①	②	③	④	
①冷蔵保管後、チルドゆうパック発送 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)										
0	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
12	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
②22.5℃保管後、チルドゆうパック発送 (<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)										
0	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
12	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
③冷蔵保管後、チルドゆうパック発送 (<i>Vibrio fluvialis</i>)										
0	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
12	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
④22.5℃保管後、チルドゆうパック発送 (<i>Vibrio fluvialis</i>)										
0	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
12	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

- ・表中の記号は[発育の有無 / 陰性 (-)、陽性 (+) の判定]を示す
- ・調査試料は0日(接種当日)に2個、12日(チルドゆうパック到着後)に5個使用した。
- ・TCBS 寒天培地は日水製薬 (A)、栄研化学 (B)、極東製薬 (C)、OXOID (D)、MERCK (E) の5種を使用した。
- ・酵素基質培地は X-VP 寒天培地 (①)、CHROMagar Vibrio (②)、ビブリオ寒天培地 (③)、ES ビブリオ寒天培地 (④) の4種を使用した。

表3 微生物担体：選択培地への影響 (*Salmonella enterica*)

培地	検体番号										対照	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
①テトラチオネート液体培地												
CROM	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ESSal	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BG	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
DHL	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
XLD	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
MLCB	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
②ラバポート液体培地												
CROM	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ESSal	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BG	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
DHL	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
XLD	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
MLCB	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
③ラバポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地												
CROM	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ESSal	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
BG	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
DHL	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
XLD	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
MLCB	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

表中の記号は[発育の有無 / 陰性 (-)、陽性 (+) の判定]を示す

表4 微生物担体：選択培地への影響 (*Proteus mirabilis*)

培地	検体番号										対照	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
①テトラチオネート液体培地												
CROM	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
ESSa1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
BG	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
DHL	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-
XLD	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
MLCB	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
②ラバポート液体培地												
CROM	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
ESSa1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
BG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
DHL	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
XLD	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-
MLCB	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
③ラバポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地												
CROM	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
ESSa1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
BG	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
DHL	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
XLD	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-
MLCB	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

表中の記号は[発育の有無 / 陰性 (-)、陽性 (+) の判定]を示す

平成 27 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

研究分担報告書

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—

研究代表者 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

研究協力者 安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部第三室長

鈴木 達也 （一財）食品薬品安全センター 秦野研究所 室長

梅津 麻実 （一財）食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員

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。また、平成 26 年 3 月に通知法が一部改正され、ELISA 測定に用いる抽出液および標準品に含まれる還元剤が 2-メルカプトエタノール（2ME）から亜硫酸ナトリウムに変更された。これに伴い、ELISA キットにおいても新しい ELISA キットが販売され、公定法として使用されている。本年度は通知法改正後の新 ELISA キットに適用可能な外部精度管理調査試料の作製を目的として、小麦およびそばのタンパク質溶液について、新 ELISA キットにおける反応性を確認するとともに、実際の配布量を想定したラージスケールでの試料調製を試み、均一性および保存安定性を確認した。

小麦全粒粉から 2 種類の抽出液を用いて調製した小麦タンパク質溶液を 3 種類の新 ELISA キットによりそれぞれ測定した結果、すべての ELISA キットおよび抽出液で良好な反応性を示した。中国北方産そば粉から 2 種類の抽出液を用いて調製したそばタンパク質溶液を 3 種類の新 ELISA キットによりそれぞれ測定した結果、通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液では、ELISA キット間の差が大きかったが、通知法改正後の抽出液ではすべての ELISA キットで良好な反応性を示した。次に、新 ELISA キットにおいて良好な反応性が確認された小麦およびそばタンパク質溶液を用いて、外部精度管理調査の実施を想定したスケール（約 2 kg スケール）で試料を作製し、均一性および安定性について確認した結果、小麦添加試料（ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料）およびそば添加試料（こしあん試料）のいずれにおいても、均一性および冷凍保存 2 ヶ月までの安定性が確認された。よって、特定原材料である小麦およびそばの外部精度管理調査実施に向けた、

新 ELISA キットに適用可能な均一かつ安定した試料を大量に作製することができた。

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還元剤である 2-メルカプトエタノール（2ME）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 キットについても抽出液および標準品に 2ME を含まない新しい ELISA キットが販売され、公定法として使用されている。

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受けて、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、さらに卵については外部精度管理の本格的実施に向けて、より大きな規模での模擬試験を実施済みである。しかし、これら試料は、通知法改正前の ELISA キットを用いて検討、開発したものであり、通知法改正後の ELISA キットにおける反応性は不明である。

そこで、本年度は通知法改正後の ELISA キットに適用可能な外部精度管理調査試料の作製を目的として、通知法改正前に開発した小麦およびそばの基材添加用タンパク質溶液について、通知法改正後の ELISA キットを用いて測定を行い、反応性を確認した。

さらに、小麦およびそばについて、実際の配布量を想定したラージスケールでの試料調製を試み、均一性および保存安定性を確認した。

また、平成 25 年度の検討で、そば試料を日本ハム社製の ELISA キットで測定すると、保存期間が長くなるにつれて検量線作成用のそば標準品の吸光度が低下し、そば試料の定量値が見かけ上高くなるという問題があった。そこで、通知法改正後の ELISA キットにおいても同様の傾向がみられるかを確認した。

なお、本研究では通知法改正前の ELISA キットを旧 ELISA キット、通知法改正後の ELISA キットを新 ELISA キットとした。

B. 研究方法

1. 特定原材料および基材

1.1. 特定原材料

小麦は、神奈川県内の食品店で購入した小麦全粒粉を使用した。そばは、中国北方産そば粉を使用した。

1.2. 基材

小麦タンパク質添加用基材には、原材料の欄に小麦を使用した旨の表示が無い、ベビーフードおよびかぼちゃペーストを購入して使用した。そばタンパク質添加用基材には、原材料の欄にそばを使用した旨の表示が無いこしあんを購入して使用した。

2. 添加用タンパク質の抽出

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。

2.1. 小麦

小麦全粒粉からの添加用タンパク質の抽出は通知法標準品規格に記載の方法に従って抽出した。抽出液は、通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液〔0.5%SDS を含有する 0.1M Tris-HCl (pH8.6)〕および通知法改正後の抽出液〔0.6%SDS 及び 0.1M 亜硫酸ナトリウムを含有する 0.1M Tris-HCl (pH8.6)〕の 2 種類を使用した。

2.2. そば

そば粉からの添加用タンパク質の抽出は通知法標準品規格に記載の方法に従って行った。抽出液は、通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液〔0.5%SDS、0.5M NaCl を含有する 20mM Tris-HCl (pH7.5)〕および通知法改正後の抽出液〔0.6%SDS 及び 0.1M 亜硫酸ナトリウムを含有する 20mM

Tris-HCl (pH7.5)〕の 2 種類を使用した。

3. 総タンパク質の定量

小麦粉およびそば粉から抽出した添加用タンパク質溶液の濃度は 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. 特定原材料タンパク質の定量

特定原材料タンパク質の定量は ELISA 法により実施した。すなわち、小麦タンパク質の定量には日本ハム社製の FASTKIT™ エライザ Ver. III小麦キット、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ II小麦 (グリアジン) キットおよびプリマハム社製のアレルゲンアイ®ELISA II小麦キットの 3 種類を使用した。また、そばタンパク質の定量には日本ハム社製の FASTKIT™ エライザ Ver. IIIそばキット、森永生科学研究所製の FASPEK エライザ IIそばキットおよびプリマハム社製のアレルゲンアイ®ELISA IIそばキットの 3 種類を使用した。

なお、日本ハム社製 ELISA キットを N キット、森永生科学研究所製 ELISA キットを M キット、プリマハム社製 ELISA キットを P キットとした。

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。

5. 試料の作製および保存

基材の均質化および混合には、ロボ・クープ BRIXER-5-Plus (株)エフ・エム・アイ、以下ブリクサーとする) を使用した。また、作製した試料はいずれも 25 mL チューブに

10 g ずつ分取し、使用時まで-20℃で冷凍保存した。

5. 1. 小麦タンパク質添加試料の作製

小麦タンパク質添加試料は、基材にベビーフードおよびかぼちゃペーストを使用し、小麦タンパク質溶液を添加して作製した。すなわち、ブレンダーで均質化した各基材約 2.5 kg に B. 2. 1 で抽出した小麦タンパク質溶液をそれぞれ添加し、ブレンダーで均一になるまで攪拌（20 秒、5 回）したものを試料とした。小麦タンパク質の添加量はベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料でそれぞれ 9.98 µg/g および 9.80 µg/g とした。

5. 2. そばタンパク質添加試料の作製

そばタンパク質添加試料は、基材としてこしあん（水 10% 添加）を使用し、そばタンパク質溶液を添加して作製した。すなわち、あらかじめこしあんに水を 10% 添加して均質化した基材約 2.5 kg に B. 2. 2 で抽出したそばタンパク質溶液を添加し、ブレンダーで均一になるまで攪拌（20 秒、5 回）したものを試料とした。そばタンパク質の添加量は 9.97 µg/g とした。

（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（小麦）調査試料の作製検討

1. 1. 小麦タンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性

通知法改正前に開発した基材添加用の小麦タンパク質溶液について、新 ELISA キッ

トを用いて測定し、反応性を確認した。

小麦タンパク質溶液は、通知法改正前の旧 ELISA キットを用いた検討で良好な結果が得られている小麦全粒粉および通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液（old-2ME 抽出液）を用いて調製した。また、通知法改正後の抽出液（new 抽出液）を用いたものについても同様に調製した。各小麦タンパク質溶液は、総タンパク質濃度を測定後、10 µg/mL 程度に希釈し、3 種類の新 ELISA キットにより測定した。

各小麦タンパク質溶液の総タンパク質濃度測定結果を表 1 に示した。old-2ME 抽出液および new 抽出液により抽出した小麦タンパク質溶液中の総タンパク質濃度はそれぞれ 4.3 mg/mL および 4.4 mg/mL と同程度であり、いずれも標準品規格に記載のタンパク質濃度範囲（4.0~6.0 mg/mL）内であった（表 1）。

各小麦タンパク質溶液の新 ELISA キットにおける測定値および回収率を表 2 に示した。

各小麦タンパク質溶液の回収率は、old-2ME 抽出液で 100.2~130.7%、new 抽出液で 99.0~122.2% と良好であった（表 2）。また、両小麦タンパク質溶液ともに M キット、N キット、P キットの順に回収率が高かったが、M キットと P キットの回収率の差はいずれも約 30% であり、キット間差は小さかった（表 2）。old-2ME 抽出液と new 抽出液を比較すると、すべての ELISA キットでほぼ同等の反応性を示し、抽出液の違いによる影響はみられなかった（表 2）。

以上のことから、小麦タンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性は old-2ME 抽出液および new 抽出液の両方で良好であ

った。また、通知法改正前に開発した材料および抽出液が新 ELISA キットにおいても適用可能であることが確認できた。

1.2. ラージスケールでの試料作製

C. D. 1. 1. において、新 ELISA キットに適用可能であることが確認された小麦タンパク質溶液を用いて、外部精度管理調査の実施を想定したスケール（約 2 kgスケール）での試料作製を試みた。なお、小麦タンパク質溶液の抽出には old-2ME 抽出液を用いた。添加用基材にはベビーフードおよびかぼちゃペーストを用い、それぞれに小麦タンパク質溶液を加えて混合し、試料を作製した。

均一性試験として、分注後に冷凍保存した試料から 10 容器を無作為に選び、1 容器につき $n=2$ でサンプリングを行い、3 種類の新 ELISA キットで測定を行った。各キットの測定結果について一元配置による分散分析を行い、試料の均一性を確認した。その結果、ベビーフード試料、かぼちゃペースト試料は F 値がいずれも有意水準 5% 点 (3. 020) 未満であり、均一性が認められた (表 3 および表 4)。

次に、安定性試験として、これら試料について冷凍保存 1 ヶ月後および冷凍保存 2 ヶ月後に同様にしてサンプリングおよび ELISA 測定を行い、冷凍保存 0 ヶ月（均一性試験）結果と合わせて添加回収率および安定性を評価した。なお、回収率は 3 種類の新 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によって求めた。また、安定性は冷凍保存 1 ヶ月および冷凍保存 2 ヶ月の測定値から算出したタンパク質量を冷凍保存 0 ヶ月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、冷凍保存 0 ヶ月の回収率は、両試料において M キットでは 160% 程度と高めであったが、N キット、P キットではいずれも 100% 程度と良好であった (表 5)。また、M キットと N キット、P キットの回収率の差は約 60% であり、キット間差は小麦タンパク質溶液のキット間差に比べて大きかった (表 2 および表 5)。これは、食品マトリックスによる影響若しくは M キットのロット間差による可能性が考えられた。ベビーフード試料とかぼちゃペースト試料の回収率はすべての ELISA キットでほぼ同等であり、試料間差は小さかった (表 5)。

さらに、冷凍保存 1 ヶ月および冷凍保存 2 ヶ月の安定性は、すべての試料および ELISA キットで 85~110% の範囲内にあったことから、これら試料は少なくとも 2 ヶ月間は安定であることが確認できた (表 5)。

以上のことから、小麦タンパク質添加試料（ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料）については外部精度管理調査実施に向けて、均一かつ安定した試料を大量に作製することができたものと考えられた。

2. 特定原材料 (そば) 調査試料の作製検討

2.1. そばタンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性

通知法改正前に開発した基材添加用のそばタンパク質溶液について、新 ELISA キットを用いて測定し、反応性を確認した。

そばタンパク質溶液は、通知法改正前の旧 ELISA キットを用いた検討で良好な結果が得られている中国北方産そば粉および通知法改正前の抽出液から 2ME を除いた抽出液 (old-2ME 抽出液) を用いて調製した。

また、通知法改正後の抽出液 (new 抽出液) を用いたものについても同様に調製した。各そばタンパク質溶液は、総タンパク質濃度を測定後、10 µg/mL となるよう希釈し、3 種類の new ELISA キットにより測定した。

各そばタンパク質溶液の総タンパク質濃度測定結果を表 6 に示した。old-2ME 抽出液および new 抽出液により抽出したそばタンパク質溶液中の総タンパク質濃度はそれぞれ 3.0 mg/mL および 5.7 mg/mL であり、new 抽出液は old-2ME 抽出液と比較して約 2 倍高かった (表 6)。また、new 抽出液により抽出したそばタンパク質溶液は標準品規格に記載のタンパク質濃度範囲 (2.7~4.0 mg/mL) を上回った (表 6)。

各そばタンパク質溶液の new ELISA キットにおける測定値および回収率を表 7 に示した。old-2ME 抽出液における回収率は、N キットで 133.7%、M キットで 132.0%、P キットで 198.5% であり、P キットで測定した場合の回収率が他の 2 キットに比べて高く、キット間差が大きかった (表 7)。一方、new 抽出液における回収率はそれぞれ 111.2%、137.9%、106.1% とキット間差が old-2ME 抽出液よりも小さく、約 30% であった (表 7)。old-2ME 抽出液を用いた場合にキット間差が大きくなった原因として、old-2ME 抽出液は還元剤を含まないことから、抽出できるそばタンパク質の種類に偏りが生じ、P キットの抗体が認識するタンパクが多く抽出された可能性が考えられた。一方、new 抽出液は還元剤として亜硫酸ナトリウムを含むため、3 種類の ELISA キットがそれぞれ認識するそばタンパク質をバランスよく抽出できたと考えられた。

以上のことから、そばタンパク質溶液の

new ELISA キットにおける反応性は old-2ME 抽出液 よりも new 抽出液で良好であり、旧 ELISA キットにおいて開発した材料である中国北方産そば粉は new ELISA キットにおいても適用可能であることが確認できた。

2.2. ラージスケールでの試料作製

C. D. 2. 1. において、new ELISA キットに適用可能であることを確認した中国北方産そば粉および new 抽出液を用いて調製したそばタンパク質溶液を用いて、外部精度管理調査の実施を想定したスケール (約 2 kg スケール) での試料作製を試みた。添加用基材にはこしあんを用い、そばタンパク質溶液を加えて混合し、試料を作製した。均一性試験および安定性試験は C. D. 1. 2. と同様に行った。

均一性試験の結果、こしあん試料の F 値は有意水準 5% 点 (3.020) 未満であり、均一性が認められた (表 8)。安定性試験の結果、冷凍保存 0 ヶ月の回収率は、N キットでは 152.6% と高かったが、M キットでは 136.0%、P キットでは 96.7% と良好であった (表 8)。また、N キットと P キットの回収率の差は約 60% であり、キット間差はそばタンパク質溶液のキット間差に比べて大きかった (表 7 および表 8)。これは、食品マトリックスによる影響若しくは N キットのロット間差による可能性が考えられた。さらに、冷凍保存 1 ヶ月および冷凍保存 2 ヶ月の安定性は、すべてのキットで 90~110% の範囲内にあったことから、こしあん試料は少なくとも 2 ヶ月間は安定であることが確認できた (表 9)。

以上のことから、そばタンパク質添加試料 (こしあん試料) についても外部精度管理調査実施に向けて、均一かつ安定した試

料を大量に作製することができたものと考えられた。

2.3. 日本ハムキット検量線吸光度の比較

平成 25 年度の検討において、そば試料（ビスケット試料、こしあん試料、カスタードクリーム試料およびチョコレートクリーム試料）を日本ハム社製の旧 ELISA キットで測定すると、保存期間が長くなるにつれて検量線作成用のそば標準品の吸光度が低下し、そば試料の定量値が見かけ上増加するという問題があった。そこで、新 ELISA キットにおいても同様の傾向がみられるかを確認するために、新旧 ELISA キットの検量線作成用のそば標準品 2 濃度（25 および 50ng/mL）の吸光度およびこしあん試料の吸光度の経時変化を比較した。なお、旧 ELISA キットのデータは、平成 25 年度に報告済みのこしあん試料の冷凍保存 0、1、2 ヶ月の測定データ、新 ELISA キットのデータは C. D. 2. 2. の冷凍保存 0、1、2 ヶ月の測定データを使用した。

その結果、旧 ELISA キットではそば標準品の吸光度は保存 1 ヶ月で著しく減少していたが、こしあん試料の吸光度は保存期間の経過に伴って緩やかに減少しており、そば標準品の吸光度とこしあん試料の吸光度に乖離がみられた（図 1、上）。一方で、新 ELISA キットでは、そば標準品の吸光度とこしあん試料の吸光度に乖離はみられず、いずれも保存期間の経過に伴って緩やかに減少していた（図 1、下）。このことから、日本ハム社製新 ELISA キットでは、旧 ELISA キットでみられたようなそば標準品の吸光度の低下はみられず、そば試料を安定して測定できることが確認できた。

E. 結論

通知法改正後の新 ELISA キットに適用可能な外部精度管理調査試料の作製を目的として、小麦およびそばタンパク質溶液の新 ELISA キットにおける反応性を確認した結果、小麦タンパク質溶液の反応性は良好であり、そばタンパク質溶液の反応性は通知法改正後の抽出液において良好であった。

新 ELISA キットにおいて良好な反応性が確認された小麦およびそばタンパク質溶液を用いて、外部精度管理調査の実施を想定したスケール（約 2 kgスケール）で試料を作製し、均一性および安定性について確認した結果、小麦添加試料（ベビーフード試料およびかぼちゃペースト試料）およびそば添加試料（こしあん試料）のいずれにおいても、均一性および冷凍保存 2 ヶ月までの安定性が確認できた。

また、そば試料について日本ハム社製の新旧 ELISA キットの検量線作成用のそば標準品の吸光度およびこしあん試料の吸光度の経時変化を比較したところ、新 ELISA キットでは、旧 ELISA キットでみられたようなそば標準品の吸光度の低下はみられず、そば試料を安定して測定できることが確認できた。

以上のことから、特定原材料である小麦およびそばの外部精度管理調査実施に向けた、新 ELISA キットに適用可能な均一かつ安定した試料を大量に作製することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表