

平成 29 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）

食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究

### 研究分担報告書

既存技能試験試料の改善及び新規技能試験プログラムの導入に関する研究（2）

アレルギー物質技能試験プログラムのパイロットスタディ

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
	若栗 忍	（一財）食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員
	久保田 佳子	（一財）食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員

#### 研究要旨

近年、アレルギー疾患の罹患者が増えており、アレルギー物質を含む特定原材料については食品への表示義務が設けられている。検査法は通知されており、ELISA 法による定量試験がまず行われるが、定量試験においてはその検査精度が保たれていることが必須である。そのためには外部精度管理が必要であり、適切な試料の作製およびデータの解析は重要課題である。

そこで卵タンパク質を含有した試料を用いて ELISA 法による外部精度管理調査研究を実施した。そして 43 機関から定量検査の結果を得、解析を行った。外部精度管理調査試料には 2 種類の基材（ベビーフードおよびかぼちゃペースト）に卵タンパク質を 8  $\mu\text{g/g}$  添加し、用いた。各機関、消費者庁から提示されている 3 キット中任意の 2 種類で測定を行うこととした。測定結果は試料ごと、また、測定キットごとにまとめ、ロバスト方式により統計値を算出した後、z-スコアを算出した。測定結果から得られた含有量を指標とした管理図についてもあわせて解析を行った。

その結果、各キット及び試料ごとの解析結果において z-スコアの絶対値が 2~3 及び 3 以上となる機関が数機関認められた。また、回収率を指標とした  $\bar{X}$  管理図では管理限界線の範囲を超える機関は認められなかったが、R 管理図で管理限界線を超える機関が各解析結果ごとに 1~2 機関認められた。

また、卵以外の特定原材料を用いた新規の外部精度管理調査用試料を作製する目的で、小麦タンパク質およびそばタンパク質による検討を行った。

## A. 研究の目的

近年、アレルギー疾患の罹患者が増えているが、中でも食物アレルギーは国民生活と密接に結びついている。アレルギー物質を含む食品に関する表示制度は平成 13 年から開始されている。表示義務にかかわる物質を選定するに当たり、発症数、重篤度などを鑑みて特定原材料として小麦、そば、卵、乳及び落花生の 5 物質、特定原材料に準ずるものとしてはエビ、カニを含む 19 物質が指定されたが、現在ではえび、かには特定原材料と分類され計 7 種類が表示義務を持つアレルギー物質となっている。また、特定原材料に準ずるものは 3 種追加され現在 20 種となっている。

特定原材料物質については検査法が通知されており、それに従っての検査が求められている。また、平成 29 年 3 月以降はアレルギーを含む食品に関わる試験検査については精度管理の一般ガイドラインに準拠した適切な業務管理を実施することが求められている。

検査方法は「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(平成 22 年 9 月 10 日消食表第 286 号、平成 26 年 3 月 26 日消食表第 36 号一部改正)及び消費者庁食品表示企画課事務連絡「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、平成 26 年 3 月 26 日一部改正)に記載されているように ELISA 法を用いた定量検査を行い、判断樹にしたがった確認試験として、ウエスタンブロットングまたは PCR 法による定性検査を行うというものである。

外部精度管理は第一段階の ELISA 法が各機関で同程度の精度を確保できているかを

確認するために重要である。我々はこれまでに外部精度管理調査用として卵を添加した試料を配布し、データの解析を行ってきた。本年度も引き続き、外部精度管理調査の事業化に向けて ELISA 法の外部精度管理調査試料の安定供給をめざし、卵を添加した試料の配布、データの解析を行った。

また、卵以外のアレルゲンをを用いた試料作製についての検討も行った。

## B. 研究方法

### 1. 基材

基材としてはかぼちゃペースト(ミクロペースト®(野菜ペースト)、新進)、ベビーフード(ハッピーレシピ 白身魚と野菜の雑炊、キューピー)、冷凍カスタードクリーム(以下カスタードクリーム、ADEKA AA)、井村屋謹製こしあん(以下こしあん、井村屋)を用いた。かぼちゃペーストとベビーフードについては ELISA 法を用いて卵、小麦、そばのいずれも検出されないことを確認した。カスタードクリーム、こしあんでは ELISA 法を用いてそばが検出されないことを確認した。ELISA 法に使用したキットについては「4. ELISA キット」参照。

### 2. 各種添加溶液の調製

#### 1) 添加用卵タンパク質の調製

鶏卵加工品として市販されている乾燥全卵粉末、乾燥全卵 No.1(キューピータマゴ)を注射用水(光製薬)で希釈し、添加用卵タンパク質調製液とした。

#### 2) 添加用小麦タンパク質の調製

日清 全粒粉お菓子・料理用(以下料理用小麦)またはパン用(以下パン用小麦)(日清フーズ)を 1g/50-mL チューブに分取し、0.6% SDS 及び 0.1 M 亜硫酸ナトリウムを含

有する 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6) を 20 mL/チューブ添加後、室温で 1 晩振盪した。懸濁液は遠心 (10,000 × g、30 min) し、上清を 0.8 μm のフィルターでろ過し、添加用小麥タンパク質調製液とした。

### 3) 添加用そばタンパク質の調製

そば粉 (中国産、マルサンパントリー) を 1 g/50-mL チューブに分取し、0.6% SDS, 0.1 M 亜硫酸ナトリウムおよび 0.5 M NaCl を含有する 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) (以下 NaCl 含有緩衝液) または 0.6% SDS, 0.1 M 亜硫酸ナトリウムを含有する 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) (以下 NaCl 不含有緩衝液) を 20 mL/チューブ添加後、室温で 1 晩振盪した。懸濁液は遠心 (10,000 × g、30 min) 後、上清を 0.8 μm のフィルターでろ過し、添加用そばタンパク質調製液 (NaCl 含有または不含) とした。

### 4) タンパク質量の測定

各物質からの調製液は、2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス) により、タンパク質量を測定した。得られたタンパク質量を元に調製液濃度又は添加量を調整した。添加重量はタンパク質量相当とした。

## 3. 試料調製

### 1) 外部精度管理調査試料の調製

外部精度管理調査で配布の卵タンパク質添加試料をかぼちゃペーストおよびベビーフードを基材として作製した。

各基材に添加用卵タンパク質調製液をそれぞれ 8 μg/g となるように加え、ロボ・クープブリクサー5 プラス (エフ・エム・アイ) で均質化することで試料を作製した (約 2 kg)。それぞれの試料はいずれも約 10 g ずつ分注し、-20 で凍結保存した。ベビー

フード試料を試料 1、かぼちゃペースト試料を試料 2 とした。均質性および安定性はこれらの試料を用いて確認を行った。

### 2) 試料検討用サンプルの調製 (小麦)

小麦粉抽出液を用いた試料検討用サンプルの調製を以下のように行った。

#### (1) 初期検討用試料の調製

基材としてかぼちゃペーストとベビーフードを用いた。

基材を 1 g/50-mL チューブに分取し、400 μg/mL に調整した小麦タンパク質調製液を 25 μL (10 μg) 添加後、ブレンダーを用いて十分に混合した。

必要に応じて、-20 で凍結保存した。

#### (2) スモールスケールでの調製

スモールスケールのサンプル調製には基材としてかぼちゃペーストとベビーフードを用いた。

各基材に添加用卵タンパク質調製液をそれぞれ 8 μg/g となるように加え、フードプロセッサー (MK-K58、National) で均質化し、試料とした。

それぞれの試料はいずれも約 10 g ずつ分注し、-20 で凍結保存した。

### 3) 試料検討用サンプルの調製 (そば)

コントロールとして精製水にそば粉から調製した添加用調製液を加えたものを使用した。

基材としてこしあん、カスタードクリーム、かぼちゃペースト及びベビーフードを用いた。こしあんには 10% の精製水を加え、十分に混和したものを使用した。

基材を 1 g/50-mL チューブに分取し、400 μg/mL に調整したそばタンパク質調製液 (NaCl 含有または不含) を 25 μL (10 μg) 添加後、ブレンダーを用いて十分に混合し

た。

必要に応じて、-20℃で凍結保存した。

#### 4. ELISA キット

特定原材料である、卵タンパク質、小麦タンパク質及びそばタンパク質の検出は、「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26年3月26日消費者庁食品表示企画課通知)に従い、以下のELISAキットを使用した。

##### 1)卵タンパク質検出

- FASTKIT エライザ Ver. III 卵(日本ハム)  
(以下、日本ハムキット)
- モリナガ FASPEK エライザ II 卵(卵白アルブミン)(森永生化学研究所)(以下、モリナガキット)
- アレルゲンアイ ELISA® II 卵(オボアルブミン)(プリマハム)(以下、プリマハムキット)

##### 2)小麦タンパク質検出

- FASTKIT エライザ Ver. III 小麦(日本ハム)(以下、日本ハム(小麦)キット)
- モリナガ FASPEK エライザ II 小麦(グリアジン)(森永生化学研究所)(以下、モリナガ(小麦)キット)
- アレルゲンアイ ELISA® II 小麦(プリマハム)(以下、プリマハム(小麦)キット)

##### 3)そばタンパク質検出

- FASTKIT エライザ Ver. III そば(日本ハム)(以下、日本ハム(そば)キット)
- モリナガ FASPEK エライザ II そば(森永生化学研究所)(以下、モリナガ(そば)キット)
- アレルゲンアイ ELISA® II そば(プリマハム)(以下、プリマハム(そば)キット)

#### 5.外部精度管理調査試料の均質性および安定性

外部精度管理調査使用は作製後、均質性および安定性の確認を行った。

均質性の確認は、試料の作製後、各基材につき、10容器からn=1でサンプリングして、ELISA法による卵タンパク質濃度の測定を行った。平均値、標準偏差、変動係数を算出した後、測定値の平均から算出した添加量に対する各キットで測定された卵タンパク質の含有量(以下含有量)および含有率を求め、均質であるかどうかを判断した。

また、安定性は、作製後に行った均質性試験の結果を0ヶ月、100%として作製後1ヶ月、2.5ヶ月及び5ヶ月の3回試料を測定し、0ヶ月における濃度に対する割合として安定性を算出した。0ヶ月(含均質性試験)以外では、各基材につき、4容器からn=1でサンプリングして、ELISA法による卵タンパク質濃度の測定を行った。

測定には均質性、安定性ともモリナガキット、日本ハムキットおよびプリマハムキットの3種類のELISA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。

#### 6. 外部精度管理調査の実施

外部精度管理調査には43機関が参加した。これらの機関には平成29年9月4日に調査試料と実施要領を宅配便(冷凍)にて送付した。

測定には、各機関、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(モリナガキット、日本ハムキット、プリマハムキット)のうち、

任意の 2 種類を使用した。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 ウェル併行とした。また、報告書の回収期限は平成 29 年 10 月 6 日とした。

## 7. 外部精度管理調査結果の解析

参加機関から提出された測定値は、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」との記載より、試料別、測定キット別に集計した。

これらのデータについては統計解析システム JMP (SAS Institute Japan) を用い、Xbar-R 管理図を代用した解析を実施した。この際、Xbar 管理図の管理限界線の値は(中央値 ± 中央値の 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」との記載があることから、キットの測定誤差の範囲についてもこれ以下で設定した。また、測定値から算出した各キットで測定された卵タンパク質の含有率については、用いるキットにより検出される抗原のプロファイルが異なることから、各試料およびキットごとに算出したロバスト平均値を付与値として解析を行った。

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：システムサポート、大隅昇〕により行い、得られたロバスト平均値およびロバスト標準偏

差を用いて z-スコアを算出した。さらに、アンケート結果をとりまとめ、検討を加えた。今回の外部精度管理調査研究でモリナガキットを使用した機関は 43 機関、日本ハムキットを使用した機関は 42 機関、プリマハムキットを使用した機関は 1 機関であった。プリマハムキットは使用機関数が少なかったことからキットごとの統計解析は行わなかった。

(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とした。

外部精度管理調査試料については、検査終了後の調査試料の保管期間および廃棄は、各機関の SOP に従って実施することとした。

## C. D. 結果および考察

### 1. 外部精度管理調査試料の均質性

均質性試験の結果を表 1 に示した。3 種のキットで測定し、得られた含有量は、添加卵タンパク質量 8 μg/g に対し、試料 1 で 6.6~6.9 μg/g、試料 2 で 5.9~6.5 μg/g となり、いずれのキットでも試料 1 に比べ試料 2 で低い値を示した(図 1、表 1)。

また、表 1 に示した含有率および変動係数では、試料 1 は 3 キットとも含有率が 80% 台、変動係数が 0.023~0.033、試料 2 は含有率が 74.3~81.3%、変動係数が 0.026~0.043 とキット間、試料間ともに大きな差は認められなかった。したがって、試料 1、2 ともに均質であり、3 キットのどれを使用しても評価可能であると判断した。

### 2. 外部精度管理調査試料の安定性

安定性は、作製直後に行った均質性試験

の結果を 100%として作製後 1 ヶ月、2.5 ヶ月及び 5 ヶ月の 3 回を行った（図 2）。その結果、試料 1 および試料 2 の安定性は約 90%～115%の範囲内であった。

したがって、今回作製した外部精度管理試料は、調査期間中安定であったと判断した。なお、同じ調製法により昨年度作製した調査試料では 1.5 年の安定性が得られている。

### 3. 外部精度管理調査結果（回収データの集計結果）

参加機関の測定値を試料別かつ測定キット別に集計し、結果を表 2 に示した。また、データ分布を図 3 に示した。モリナガキットは 43 機関が、日本ハムキットは 42 機関が、プリマハムキットは 1 機関が使用した。プリマハムキットは 1 機関のみの使用であったことからキットごとの統計解析は行わなかった。モリナガキット（43 機関）と日本ハムキット（42 機関）のデータを比較すると、測定値の平均は試料 1 ではモリナガキットが  $7.352 \pm 0.510 \mu\text{g/g}$ 、日本ハムキットが  $6.800 \pm 0.483 \mu\text{g/g}$ 、試料 2 ではモリナガキットが  $6.753 \pm 0.514 \mu\text{g/g}$ 、日本ハムキットが  $5.970 \pm 0.450 \mu\text{g/g}$  と両試料ともモリナガキットで高い数値を示したが、測定値の分布形および変動係数では、キット間の相違はほとんど認められなかった。試料間ではモリナガキット、日本ハムキットの両方で試料 1 より試料 2 が低い平均値を示した。また、1 機関のみ行ったプリマハムキットにおいても試料 1 より試料 2 が低い傾向は同じであった。

## 5. キット別集計結果

### 1) モリナガキット

#### (1) 試料 1 の解析結果

モリナガキットを用いて測定した 43 機関の試料 1 における統計量を表 3 に示した。また、回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 4 に、z-スコアおよび順位を図 5 に、Xbar-R 管理図を図 6 に示した。

全 43 機関のロバスト平均値  $\pm$  ロバスト標準偏差は  $7.352 \pm 0.510 \mu\text{g/g}$  であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 3 以上の機関が 1 機関あった。なお、z-スコアの絶対値が 2 以上、3 未満の機関はなかった。

Xbar 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、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。

#### (2) 試料 2 の解析結果

モリナガキットを用いて測定した 43 機関の試料 2 における統計量を表 3 に示した。また、回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 4 に、z-スコアおよび順位を図 5 に、Xbar-R 管理図を図 6 に示した。

全 43 機関のロバスト平均値  $\pm$  ロバスト標準偏差は  $6.753 \pm 0.514 \mu\text{g/g}$  であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 2 機関であったが、絶対値が 3 以上の機関はなかった。

Xbar 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、R 管理図で上部管理限界線を超えた機関が 2 機関あった。

### 2) 日本ハムキット

#### (1) 試料 1 の解析結果

日本ハムキットを用いて測定した 42 機関の試料 1 における統計量を表 4 に示した。

また、回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 7 に、z-スコアおよび順位を図 8 に、Xbar-R 管理図を図 9 に示した。

全 42 機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は  $6.800 \pm 0.483 \mu\text{g/g}$  であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 3 以上の機関は 2 機関あった。なお、z-スコアの絶対値が 2 以上、3 未満の機関はなかった。

Xbar 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、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。

## (2) 試料 2 の解析結果

日本ハムキットを用いて測定した 42 機関の試料 2 における統計量を表 4 に示した。また、回収した報告値のヒストグラムおよび正規確率プロットを図 7 に、z-スコアおよび順位を図 8 に、Xbar-R 管理図を図 9 に示した。

全 42 機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は  $5.970 \pm 0.450 \mu\text{g/g}$  であった。これに基づき z-スコアを算出したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関は 2 機関で、うち、絶対値が 3 以上の機関は 1 機関であった。

Xbar 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、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。

## 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機関は 1 機関であったため、統計解析は実施しなかった。

## 4) キットのロットと測定値について

今回の外部精度管理調査研究において、モリナガキットでは 9 ロット、日本ハムキ

ットでは 4 ロットが測定に用いられたことから、ロットと測定値の関連について図 10 および図 11 に示した。どちらのキットにおいても若干の測定値の変動はあるものの、試料 1、試料 2 とともに明確なロット間差は認められなかった。プリマハムキットのデータは 1 機関からのみであったが、測定値の比較のために、図 12 に結果を示した。

## 5) 検量線について

今回の外部精度管理調査研究において、モリナガキットと日本ハムキットでは複数ロットが使用されていたことから、検量線の反応性についての比較を行った。図 13 にモリナガキットを用いた試験の全検量線を、図 14 に日本ハムキットを用いた試験の全検量線を示した。モリナガキットおよび日本ハムキットの全機関の検量線を比較するとモリナガキットの検量線の方がやや広がっていた。日本ハムキットでは異なる反応性を示す検量線が 2 機関ほど認められた。

また、プリマハムキットについては、1 機関のみの試験であったことから、当所で均質性試験および安定性試験時に得られた 3 試験分の検量線とともに図 15 に示した。参加機関と均質性・安定性試験で用いたロットとは異なっていたが、ほぼ同じ反応性を示した。

次に、表 5 および表 6 に本調査研究で使用されたモリナガキットおよび日本ハムキットのロットおよび使用期限と使用機関数、図 16 および図 17 にモリナガキットおよび日本ハムキットにおける、ロットごとの検量線のグラフを示した。使用されたキットはすべて使用期限内に用いられた。また、どちらのキットにおいても全体の平均と比較して明らかにロットごとに異なっている

ような反応は示しておらず、それぞれのキットは試験に供した複数のロットにおいて安定した検量線が得られた。

また、実験時の室温が低め（25 未満）および高め（25 以上）の場合の検量線をモリナガキットおよび日本ハムキットについて、図 18 に示した。両キットとも検量線は実験時の室温の高低によらず、ほぼ同じ反応を示しており、今回の調査においては室温（20～28 程度）の違いによる検量線の反応性に大きな差は認められなかった。

## 6) 測定値の相関性

### (1) 同一キットにおける試料間の測定値の相関性

モリナガキットおよび日本ハムキットについて、各機関ごとの試料 1 と試料 2 の測定値の相関を図 19 に示した。その結果、モリナガキットでは相関係数が 0.821、日本ハムキットでは 0.886 といずれも強い相関が認められた。また、モリナガキットでの 1 機関を除くとすべての機関で試料 1 の測定値が試料 2 の測定値を上回っており、機関間の再現性は良好であった。

### (2) 同一試料におけるキット間の測定値の相関性

各試料におけるキット間の相関を図 20 に示した。その結果、試料 1 では相関係数が 0.315、試料 2 では 0.417 であった。試料 1 では日本ハムキットでの測定値がモリナガキットの測定値を上回っていたのは 6 機関、試料 2 では 3 機関あったが、残りの機関はすべて試料 1 および試料 2 でモリナガキットの測定値は日本ハムキットより高い値を示した。

## 6. 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 および表 8 に示した。ピペット操作に関して、抽出溶液等の希釈操作はすべての機関が手動で行っていたが、プレートの洗浄方法については、手動が 19 機関、自動が 24 機関とほぼ半数ずつであった。また、検量線の近似曲線は 40 機関で 4 係数 logistic 曲線 (PL) が、3 機関で 5PL が採用されていた。検量線の相関はほとんどの機関で  $R^2$  が 0.99 以上となり、手技に問題がないと考えられた。試料溶液の添加は 10 分以内で行った機関が半数以上であったが、30 分を越えると回答した機関もあり、添加に要する操作の過程をどこから考えるかについて明確な質問としていなかったための回答と思われた。

## 7. 検査実績のまとめ

参考として参加機関における検査実績（平成 28 年度）を表 9 および表 10 に示した。

卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類の特定原材料 6 種中、すべての種類で検査実績があるのは 15 機関で参加した約 1/3 となった。試験数は卵、乳、小麦でそれぞれ実施件数が 1000 件を超え、そば、落花生、甲殻類の実施総数は上記 3 種の 1/2～1/4 程度であった。

## 8. 小麦及びそばタンパク質を用いた試料の検討

### 1) 小麦を用いた試料の検討

パン用及び料理用小麦から調製した小麦タンパク質調製液をベビーフードとかぼちゃペーストの 2 種の基材に添加し、初期検討を行った。測定は 3 種のキットを用い ELISA 法により行った。その結果（図 21）料理用は約 10～12  $\mu\text{g/g}$ 、パン用は約 13～

15  $\mu\text{g/g}$  となり、パン用では料理用よりも高い含有量を示した。どちらの小麦粉を用いても 2 基材において 3 キットの測定値は各基材ごとに近い値を示していたので、測定値が添加量に近い料理用の小麦を用いてさらに検討を行った。

次に、外部精度管理調査用の試料作製を目指してスモールスケールでの試料作製を行った。作製したサンプルについては 3 種のキットを用い ELISA 法による測定をおこなった。その結果 (図 22)、ベビーフードでは約 9~10  $\mu\text{g/g}$ 、かぼちゃペーストでは約 10~12  $\mu\text{g/g}$  となり、2 基材とも、初期検討で得られた測定値とほぼ変わらない値を示した。

以上の結果から、料理用の全粒粉小麦から抽出した小麦タンパク質をベビーフード及びかぼちゃペーストに添加した試料は再現性良く、外部精度管理調査試料として調製が可能であることが示唆された。今後は均一性、安定性及び、スケールアップを行っての調製について検討が要される。

## 2) そばを用いた試料の検討

「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 26 年 3 月 26 日消費者庁食品表示企画課通知) の「(別添 4) 標準品規格」に記載の「そば標準品原液調製方法」で使用されている抽出用緩衝液 (NaCl 含有) を作製したところ、析出が認められ緩衝液が濁ったため、温めて、溶解した。このため、NaCl 不含の抽出用緩衝液も作製し、2 種の緩衝液でそば粉の抽出を行った。その結果、遠心後の上清は NaCl 含有緩衝液では澄んでいたが、NaCl 不含緩衝液では濁っていた。これらの抽出液のタン

パク質量を測定したところ (図 23)、NaCl 含有調製液では 4.7  $\text{mg/mL}$  (4 回平均)、NaCl 不含調製液では 5.6  $\text{mg/mL}$  (7 回平均) となり、NaCl 不含調製液のタンパク質量が高値を示した。

調製液の濃度を調整後、こしあん、カスタードクリーム、ベビーフードおよびかぼちゃペーストに添加し、初期検討用サンプルを作製した。これらについて 3 種のキットを用い ELISA 法により測定を行った。

その結果を表 11 および図 24 に示す。NaCl 含有調製液では 4 基材とも日本ハム(そば)キットではモリナガ(そば)キット、プリマハム(そば)キットよりも高い値を示し、こしあんでは 2 倍程度の差が認められた。しかしながら、モリナガキット、プリマハムキットでは 4 基材において約 9~9.5  $\mu\text{g/g}$  および約 8~9  $\mu\text{g/g}$  と安定した数値を示し、添加したそばタンパク質量 (10  $\mu\text{g/g}$ ) から考えると妥当な数値であると考えられた。日本ハムキットでは約 12~18  $\mu\text{g/g}$  と基材によって異なり、最低値はベビーフードで 11.9  $\mu\text{g/g}$ 、最高値はこしあんで 18.1  $\mu\text{g/g}$  となった。

NaCl 不含調製液では 3 キットの測定数値はこしあんで約 13~16  $\mu\text{g/g}$ 、カスタードクリームで約 11~14  $\mu\text{g/g}$ 、ベビーフードで約 11.5~14  $\mu\text{g/g}$ 、かぼちゃペーストで約 13~16  $\mu\text{g/g}$  となり、NaCl 含有調製液と比較すると 3 キット間の差は少なかった。

モリナガキットとプリマハムキットにおいて NaCl 不含調製液では NaCl 含有調製液よりも測定値は高くなったが、日本ハムキットではこしあんでは NaCl 含有調製液よりやや低い値を示したが、他の 3 基材では NaCl 含有調製液とほぼ等しい値を示した。

「そば標準品原液調製方法」に記載の NaCl 含有抽出液ではそば粉からの抽出液が透き通っており、抽出物が外見上は十分に溶解していたが、キット間、基材間で測定値に差が認められた。

以上の事から、そば粉から直接タンパク質を抽出する際の条件により、ELISA 法での検出に影響する可能性が示唆された。

外部精度管理調査試料とする場合、3 種のキット間での検出力が同程度のものが望まれる。したがって、外部精度管理調査試料としてはさらなる検討が必要と考えられた。

#### E . 結論

昨年度に続いて、卵タンパク質を添加したかぼちゃペーストおよびベビーフードを用いた外部精度管理調査を 43 機関を対象に実施した。

ロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて z-スコアを算出したところ、各キット及び試料ごとの解析結果において z-スコアの絶対値が 2~3 及び 3 以上となる機関が数機関認められた。

また、回収率を指標とした Xbar 管理図では管理限界線の範囲を超える機関は認められなかったが、R 管理図で管理限界線を超える機関が各解析結果ごとに 1~2 機関認められた。

さらにいずれの機関においても検量線の相関が高かったことから今回の調査研究に参加した機関では安定した検査技術を持っていると考えられた。

新規の外部精度管理調査用試料の検討では、小麦タンパク質抽出液を添加した基材において外部精度管理調査用試料作製の可

能性が考えられた。一方、そばタンパク質抽出液を添加した基材ではそば粉からの抽出法の違いによりキットによって測定値に差が認められ、新規調査用試料としてはさらなる検討が必要と考えられた。

#### 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

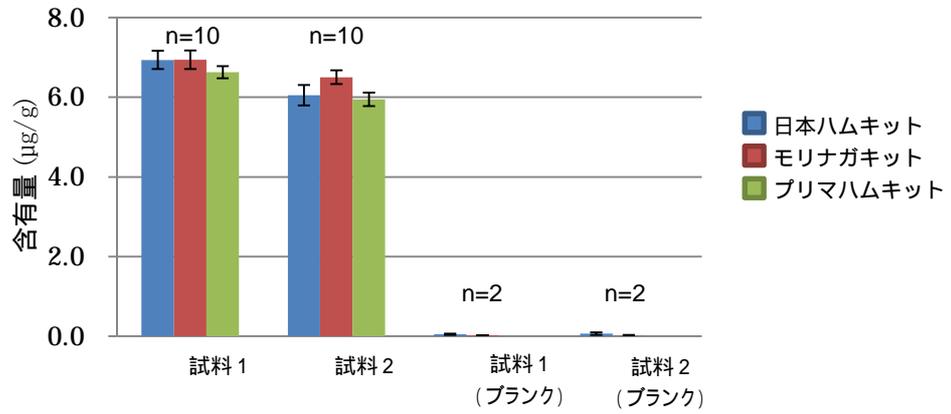


図 1 外部精度管理調査研究試料の均質性試験結果

表 1 外部精度管理調査研究試料の均質性試験における各キットでの含有率と変動係数

キットメーカー	試料 1			試料 2		
	含有量 (µg/g)	含有率 (%)	変動係数	含有量 (µg/g)	含有率 (%)	変動係数
モリナガ	6.9	86.8	0.033	6.5	81.3	0.026
日本ハム	6.9	86.7	0.033	6.1	75.6	0.043
プリマハム	6.6	82.9	0.023	5.9	74.3	0.028

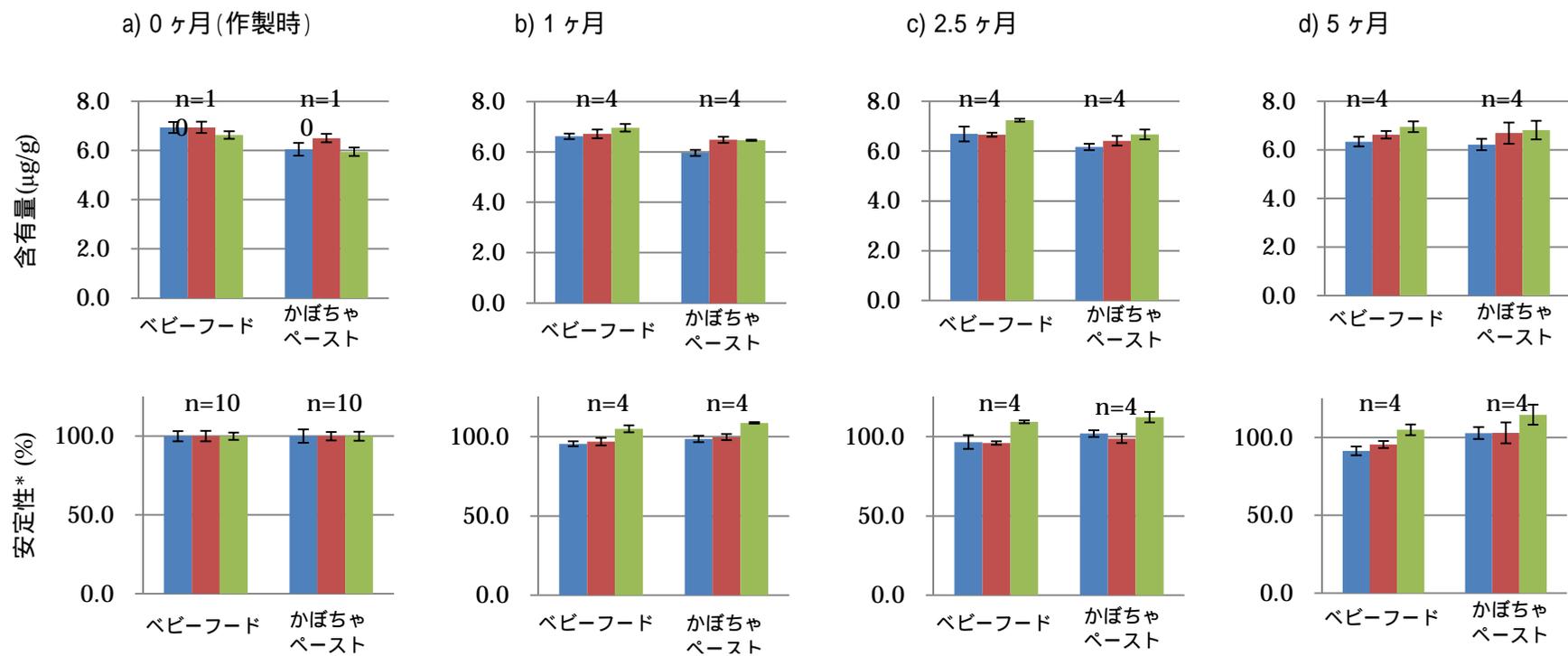


図2 調査試料中の含有率および安定性  
 \*安定性は0ヶ月の測定値を100%とする  
 上段は含有率、下段は安定性

- 日本ハムキット
- モリナガキット
- プリマハムキット

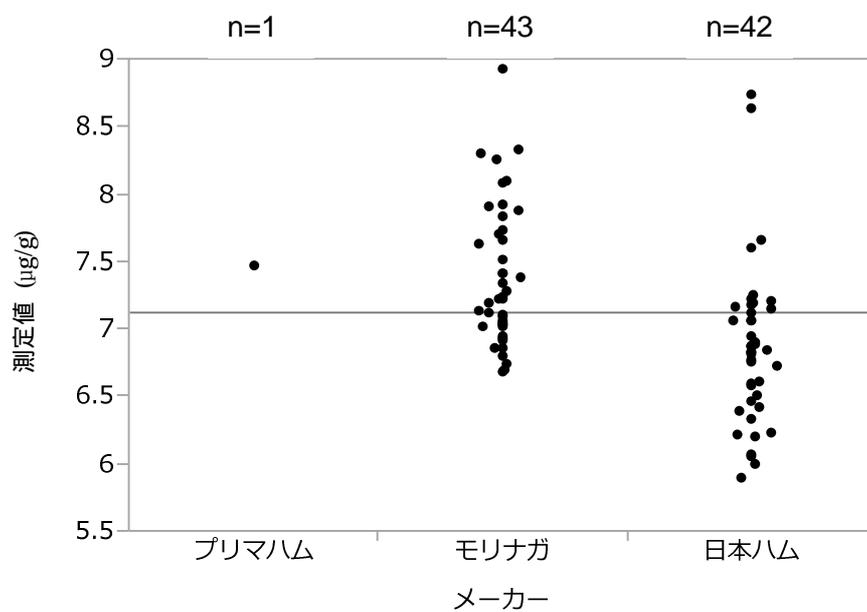
表 2 外部精度管理調査研究における報告結果の平均値および変動係数

	試料 1			試料 2		
	モリナガ	日本ハム	プリマハム**	モリナガ	日本ハム	プリマハム**
データ数	43	42	1	43	42	1
平均値* (μg/g)	7.352	6.800	(7.47)	6.753	5.970	(6.58)
標準偏差* (μg/g)	0.510	0.483		0.514	0.450	
変動係数*	0.0694	0.0710		0.0762	0.0753	

\*ロバスト方式

\*\* プリマハムキットは 1 機関のみの使用のため、数値は当該機関の提出データ

a) 試料 1



b) 試料 2

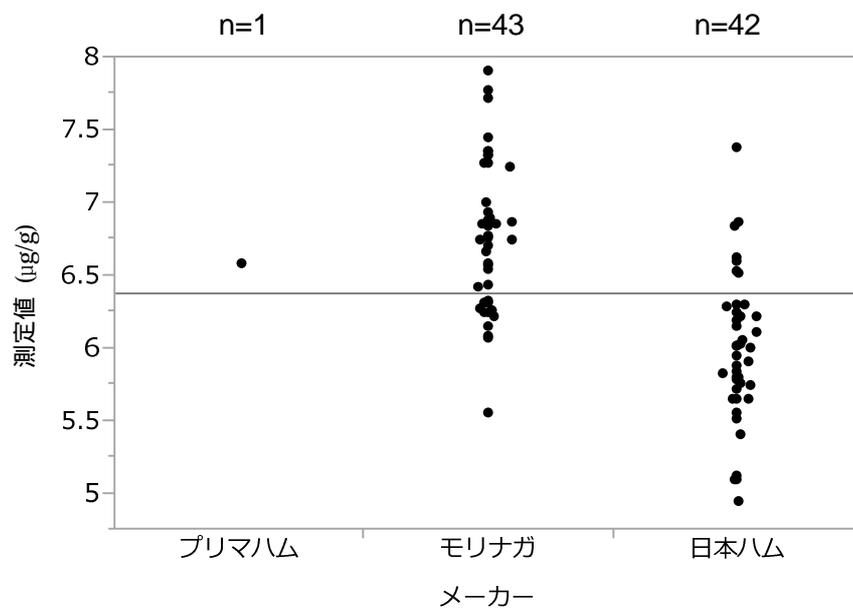
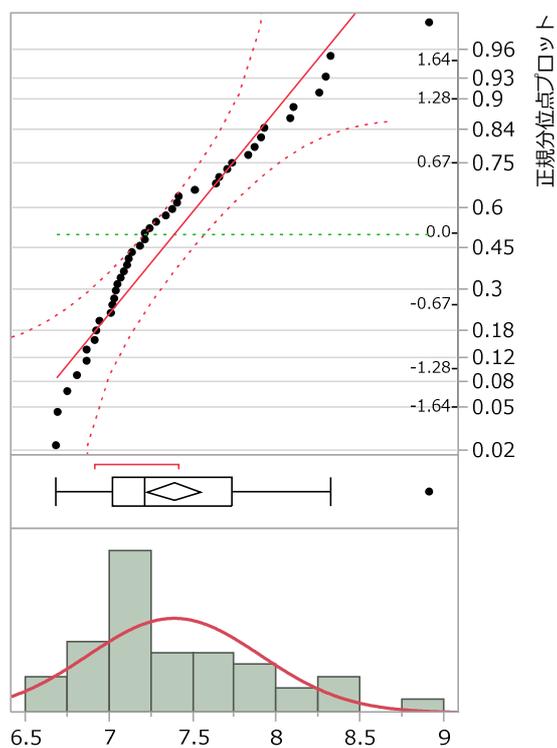


図 3 外部精度管理調査での各試料におけるキットごとのデータ分布

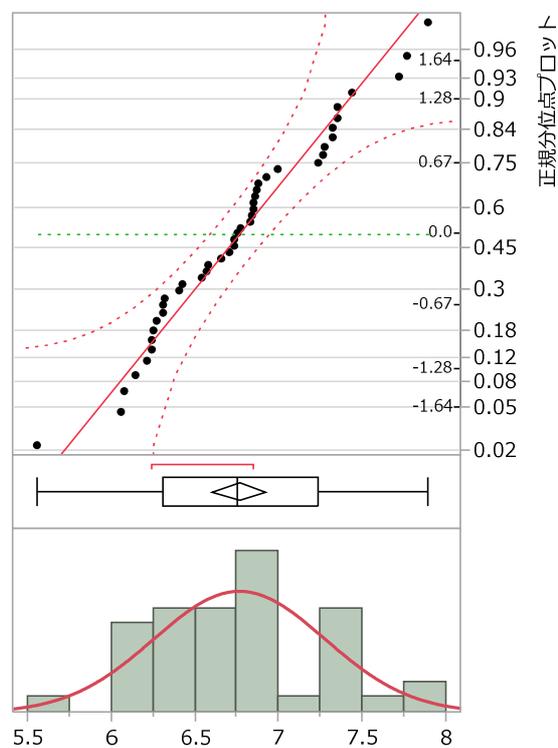
表3 モリナガキットによる測定結果の統計量一覧

試料名		試料 1	試料 2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
測定 の 統計量	データ数 (有効機能数)	43	43
	平均値	7.352	6.753
	分散	0.260	0.264
	標準偏差	0.510	0.514
	変動係数	0.06941	0.07616
	第 1 四分位数 (Q1)	7.020	6.305
	中央値 (メジアン)	7.215	6.755
	第 3 四分位数 (Q3)	7.735	7.235
	置換後の最大値	8.109	7.515
	置換後の最小値	6.680	5.990
	範囲	1.429	1.525
四分位範囲	0.715	0.930	
測定 の 差	R の平均	0.279	0.257
	上部管理限界	0.911	0.841

a) 試料 1



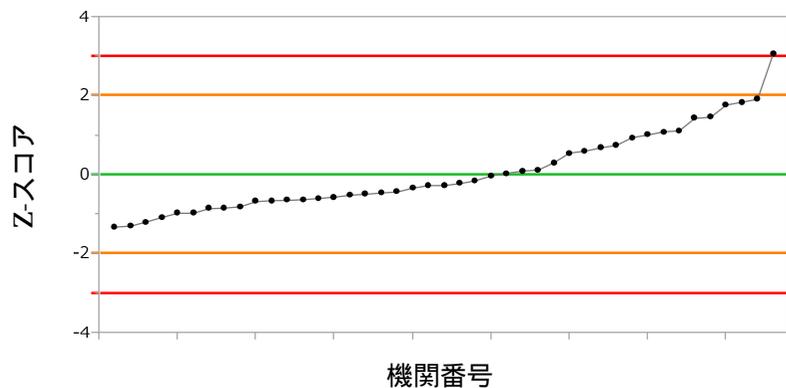
b) 試料 2



(機関数 43)

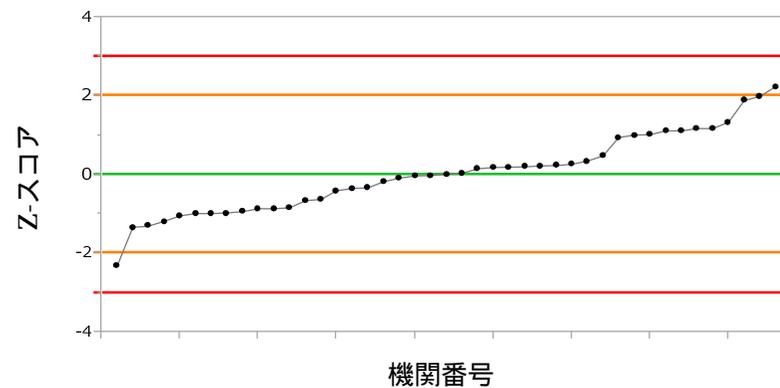
図 4 モリナガキットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット

a) 試料 1



z-スコア ≤ -2 の順位	z-スコア	2 ≤ z-スコア の順位	z-スコア
		1	3.072

b) 試料 2

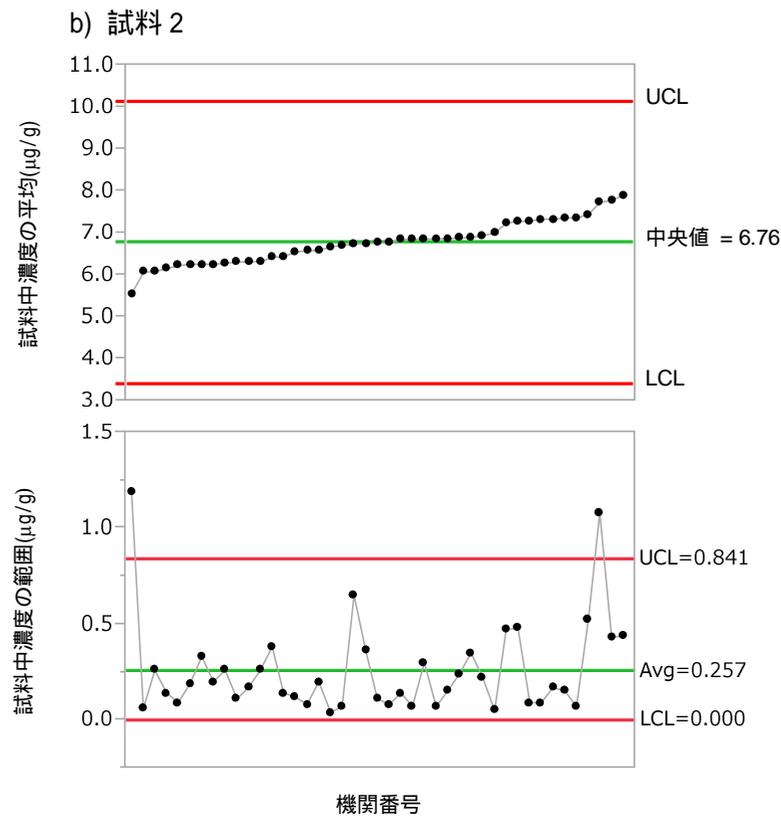
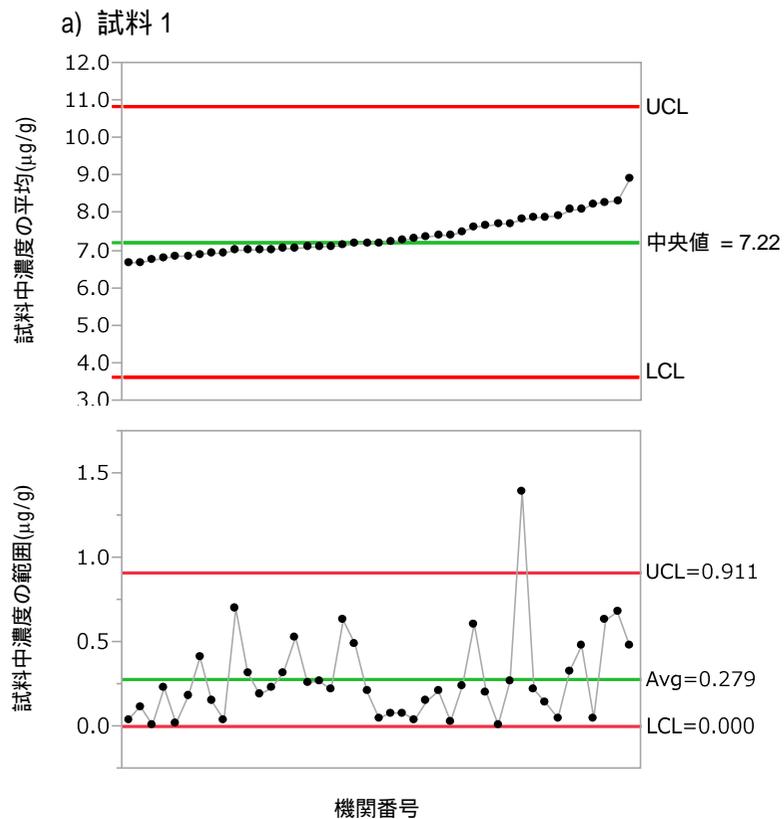


z-スコア ≤ -2 の順位	z-スコア	2 ≤ z-スコア の順位	z-スコア
1	-2.329	1	2.231

(機関数 43)

図 5 モリナガキットを用いた測定による z-スコアおよび順位

機関番号は左から試料 1: 29, 20, 41, 21, 18, 42, 8, 43, 37, 7, 15, 23, 17, 27, 30, 35, 36, 33, 2, 34, 3, 11, 32, 40, 12, 9, 31, 22, 38, 19, 24, 26, 28, 4, 10, 5, 25, 16, 1, 13, 6, 14, 39, 試料 2: 42, 41, 29, 18, 33, 20, 15, 8, 17, 11, 35, 21, 2, 43, 19, 23, 3, 32, 9, 30, 37, 40, 28, 31, 38, 7, 27, 34, 24, 4, 5, 22, 12, 10, 16, 6, 25, 13, 36, 26, 1, 39, 14



(機関数 43)

図 6 モリナガキットを用いた測定による Xbar-R 管理図

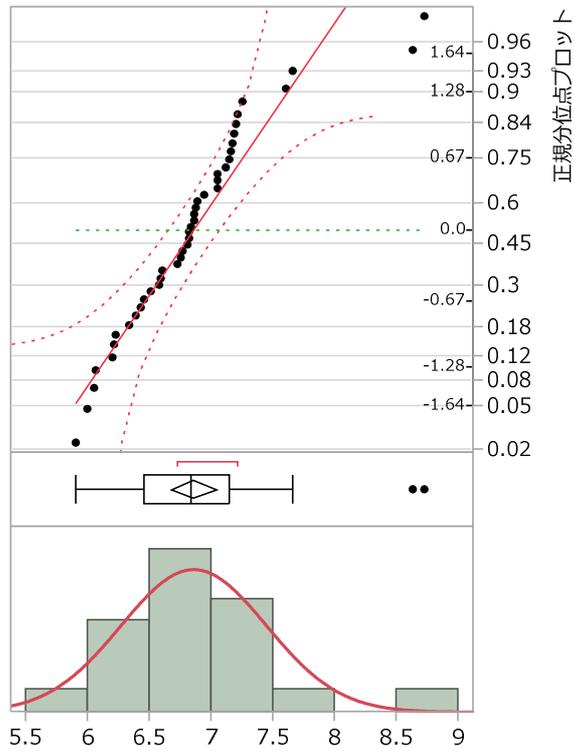
機関番号(左から) 試料 1:29, 20, 41, 21, 18, 42, 8, 43, 37, 7, 15, 23, 17, 27, 30, 35, 36, 33, 2, 34, 3, 11, 32, 40, 12, 9, 31, 22, 38, 19, 24, 26, 28, 4, 10, 5, 25, 16, 1, 13, 6, 14, 39; 試料 2:42, 41, 29, 18, 33, 20, 15, 8, 17, 11, 35, 21, 2, 43, 19, 23, 3, 32, 9, 30, 37, 40, 28, 31, 38, 7, 27, 34, 24, 4, 5, 22, 12, 10, 16, 6, 25, 13, 36, 26, 1, 39, 14

Xbar 管理図(上段)の上部管理限界線(UCL)および下部管理限界線(LCL)は中央値 $\pm$ 50%とした。R 管理図(下段)の UCL および LCL は R の平均値と JIS ハンドブックの係数 D4(=3.267)から算出した。

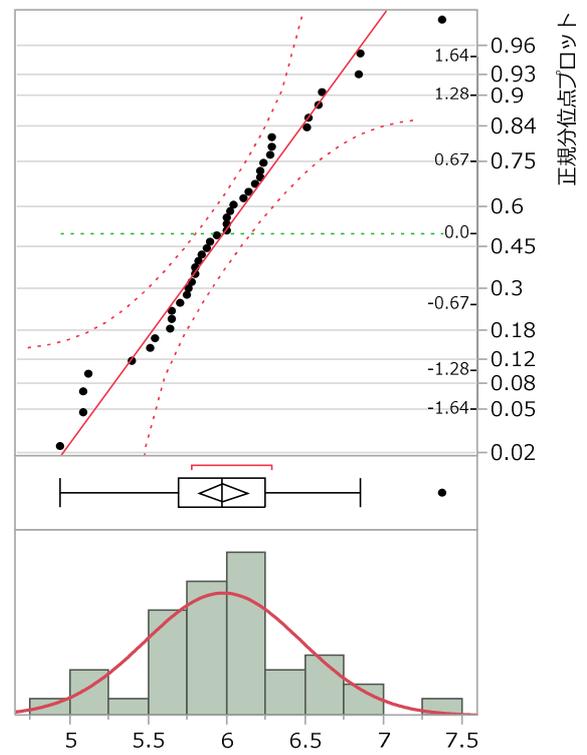
表 4 日本ハムキットによる測定結果の統計量一覧

試料名		試料 1	試料 2
統計量の種類		ロバスト方式	ロバスト方式
測定 の 統計量	データ数 (有効機能数)	42	42
	平均値	6.800	5.970
	分散	0.233	0.202
	標準偏差	0.483	0.450
	変動係数	0.07096	0.07534
	第 1 四分位数 (Q1)	6.451	5.691
	中央値 (メジアン)	6.833	5.970
	第 3 四分位数 (Q3)	7.150	6.250
	置換後の最大値	7.515	6.637
	置換後の最小値	6.084	5.303
	範囲	1.430	1.333
	四分位範囲	0.699	0.559
測定 の 差	R の平均	0.255	0.213
	上部管理限界	0.834	0.696

a) 試料 1



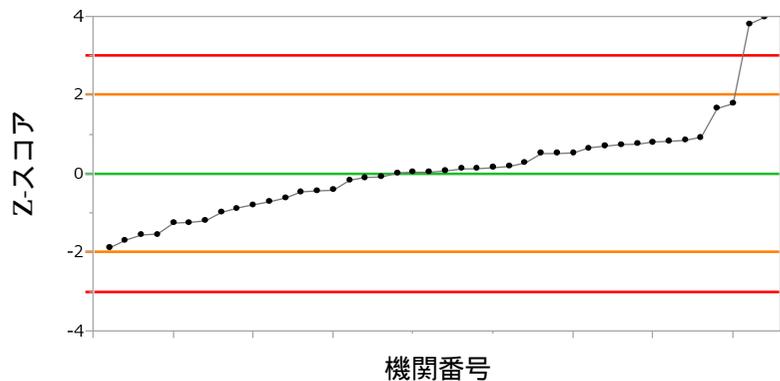
b) 試料 2



(機関数 42)

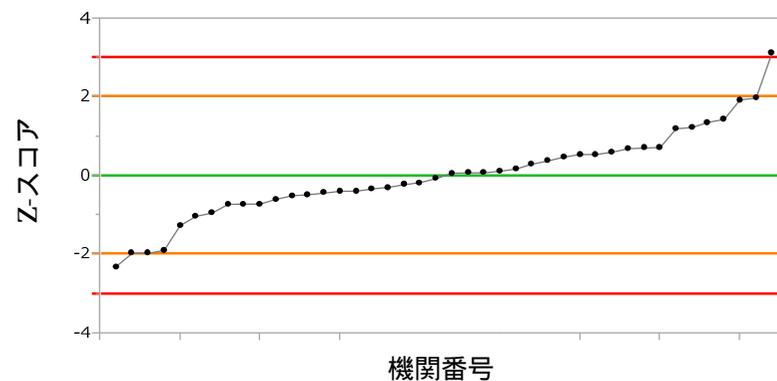
図7 日本ハムキットを用いた測定によるヒストグラムおよび正規確率プロット

a) 試料 1



z-スコア ≤ -2 の順位	z-スコア	2 ≤ z-スコア の順位	z-スコア
		1	4.021
		2	3.814

b) 試料 2



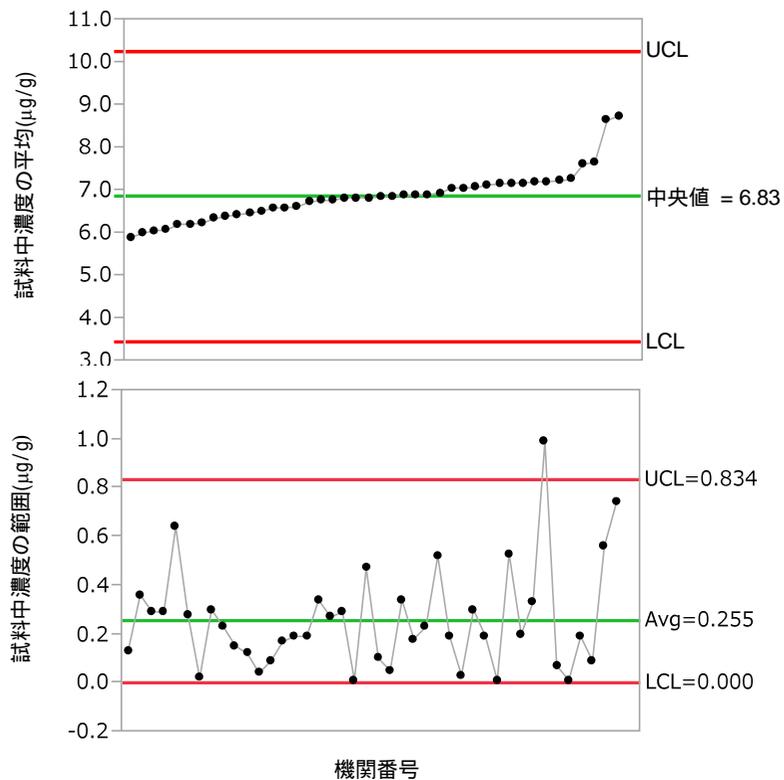
z-スコア ≤ -2 の順位	z-スコア	2 ≤ z-スコア の順位	z-スコア
1	-2.301	1	3.135

(機関数 42)

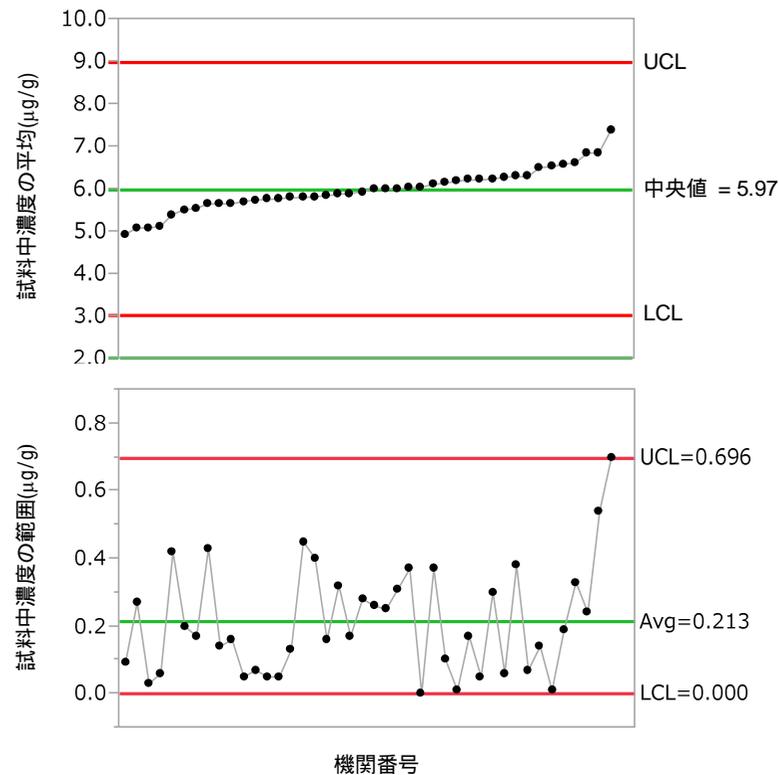
図 8 日本ハムキットを用いた測定による z-スコアおよび順位

機関番号は左から試料 1: 2, 8, 42, 33, 27, 1, 41, 3, 43, 5, 32, 36, 30, 9, 11, 20, 23, 18, 25, 7, 15, 31, 40, 12, 35, 13, 19, 21, 24, 29, 39, 17, 22, 6, 38, 4, 14, 28, 16, 26, 37, 10、試料 2: 1, 8, 42, 2, 5, 27, 3, 21, 43, 36, 18, 11, 41, 30, 23, 19, 33, 32, 20, 9, 17, 24, 7, 35, 15, 25, 6, 38, 40, 13, 22, 12, 31, 29, 39, 16, 4, 28, 14, 37, 26, 10

a) 試料 1



b) 試料 2



(機関数 42)

図 9 日本ハムキットを用いた測定による Xbar-R 管理図

機関番号は左から試料 1: 2, 8, 42, 33, 27, 1, 41, 3, 43, 5, 32, 36, 30, 9, 11, 20, 23, 18, 25, 7, 15, 31, 40, 12, 35, 13, 19, 21, 24, 29, 39, 17, 22, 6, 38, 4, 14, 28, 16, 26, 37, 10、試料 2: 1, 8, 42, 2, 5, 27, 3, 21, 43, 36, 18, 11, 41, 30, 23, 19, 33, 32, 20, 9, 17, 24, 7, 35, 15, 25, 6, 38, 40, 13, 22, 12, 31, 29, 39, 16, 4, 28, 14, 37, 26, 10

Xbar 管理図(上段)の上部管理限界線(UCL)および下部管理限界線(LCL)は中央値 $\pm$ 50%とした。R 管理図(下段)の UCL および LCL は R の平均値と JIS ハンドブックの係数  $D4(=3.267)$  から算出した。

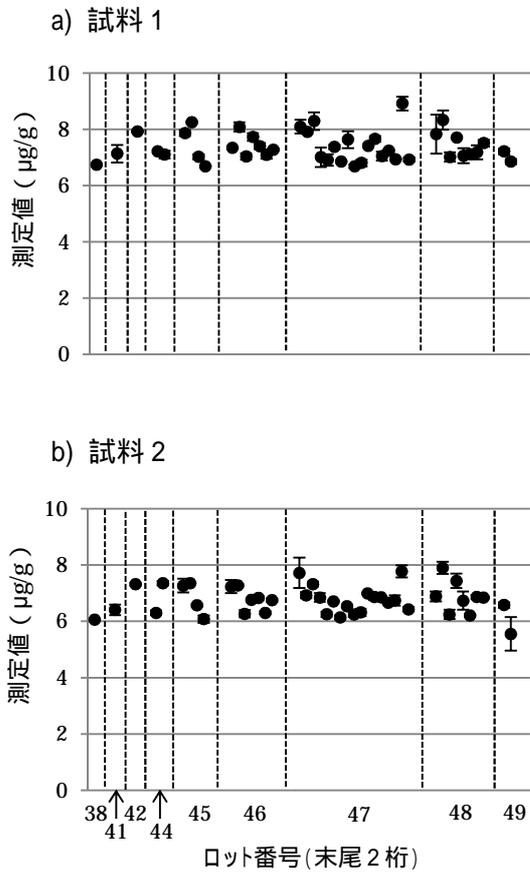


図 10 モリナガキットを用いた測定値のロット間比較

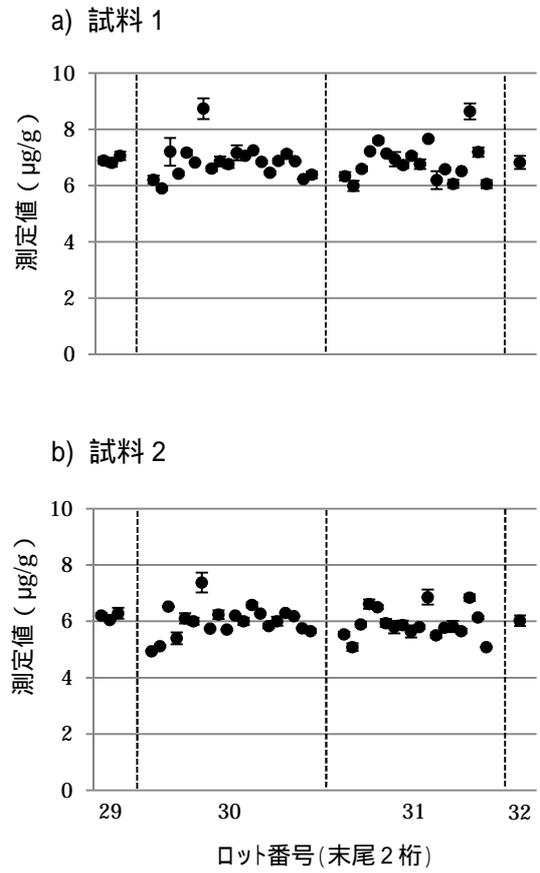


図 11 日本ハムキットを用いた測定値のロット間比較

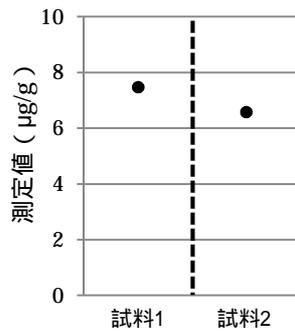


図 12 プリマハムキット(ロット:1707OAS)を用いた測定値

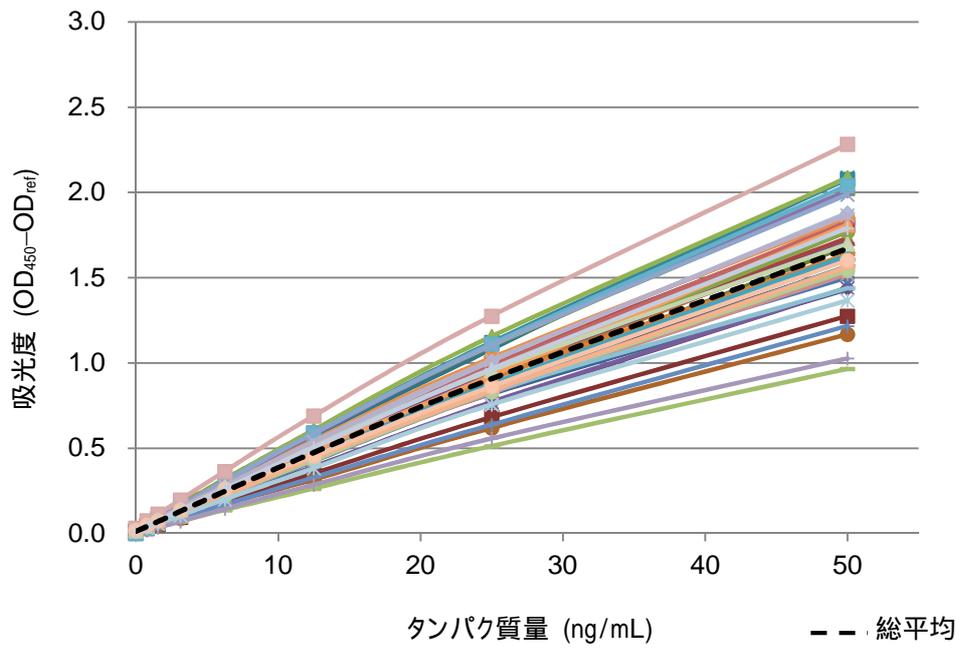


図 13 モリナガキットを用いた測定における検量線(43 機関)

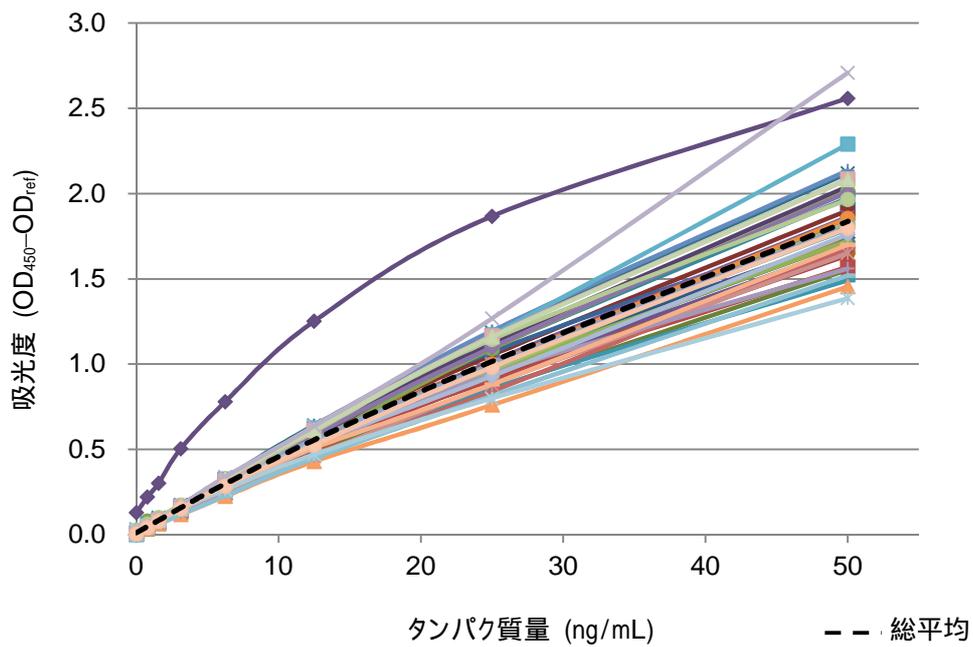


図 14 日本ハムキットを用いた測定における検量線(42 機関)

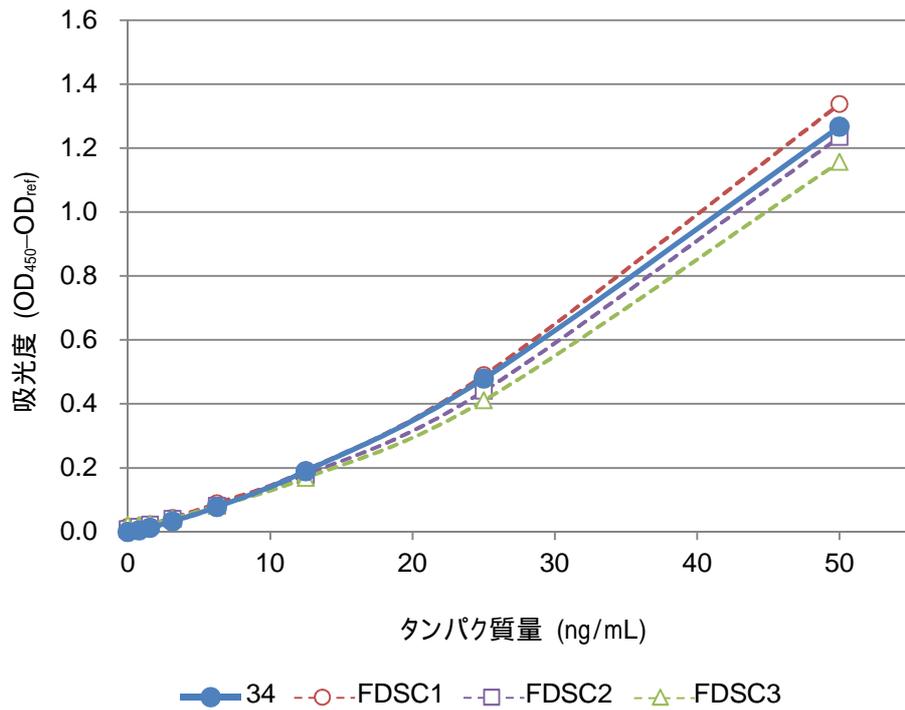


図 15 プリマハムキットを用いた測定における検量線(1 機関:使用ロット 1707OAS [使用期限 2018.5] および均質性、安定性試験時:使用ロット 1703OAS の検量線)

表 5 外部精度管理調査研究で使用されたモリナガキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
16OCSFOA038	2017.10.13	1
17JASFOA041	2018.1.9	1
17FESFOA042	2018.2.2	1
17APSFOA044	2018.4.17	2
17MYSFOA045	2018.5.8	4
17MYSFOA046	2018.5.29	7
17JUSFOA047	2018.6.8	17
17JUSFOA048	2018.6.15	8
17JLSFOA049	2018.7.3	2

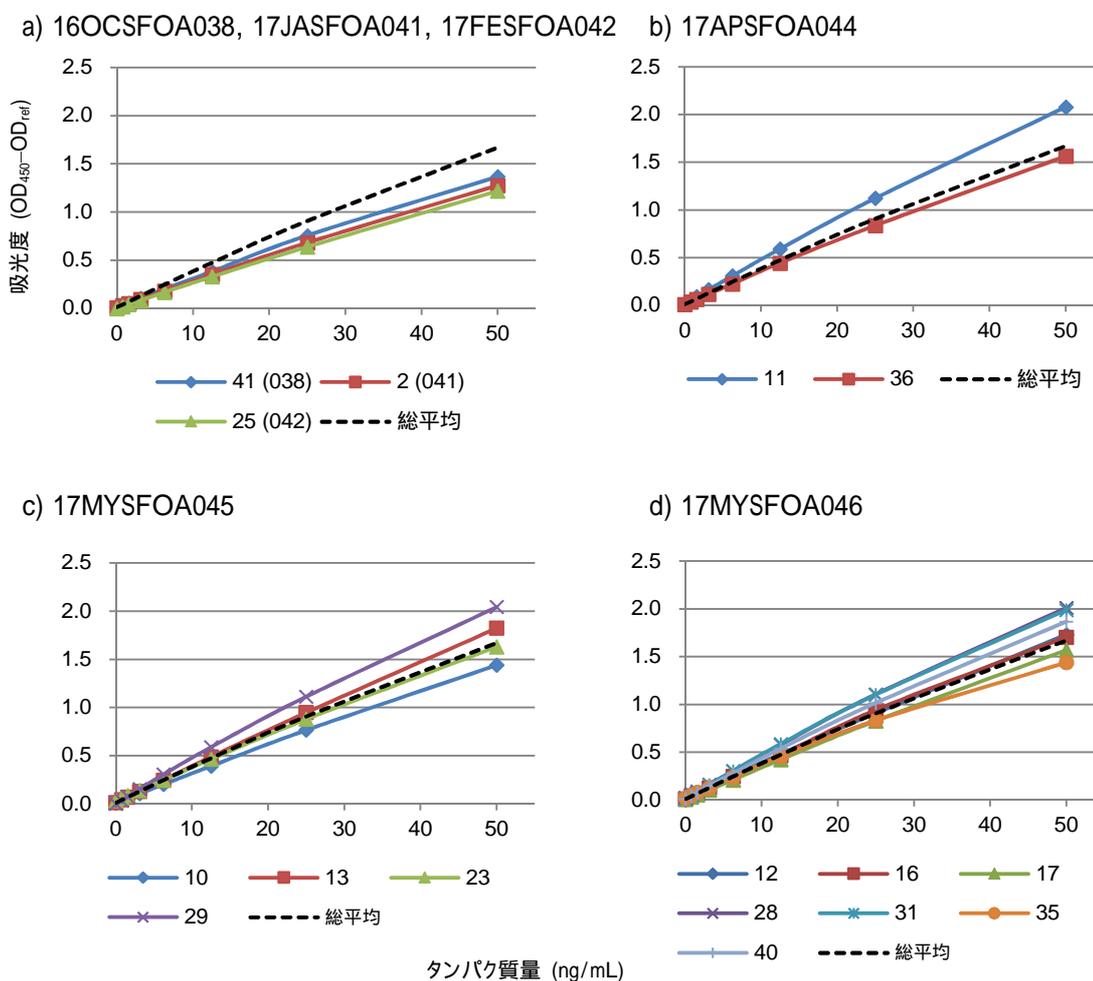


図 16-1 モリナガキットを用いた測定におけるロット別検量線

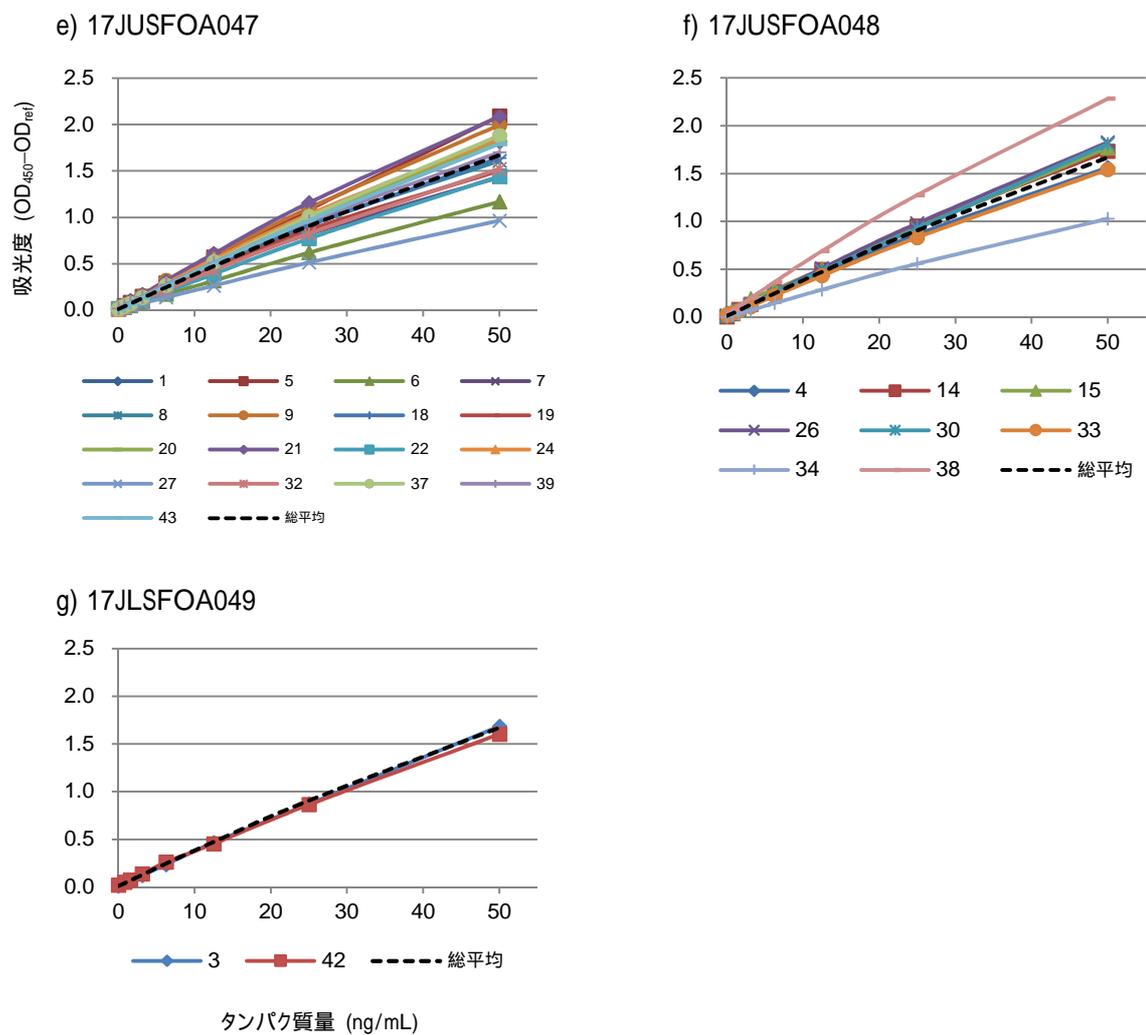


図 16-2 モリナガキットを用いた測定におけるロット別検量線

表 6 外部精度管理調査研究で使用された日本ハムキットのロットおよび使用機関数

ロット	使用期限	使用機関数
FKEE1729	2017.9	3
FKEE1730	2017.10	20
FKEE1731	2017.11	18
FKEE1732	2018.1	1

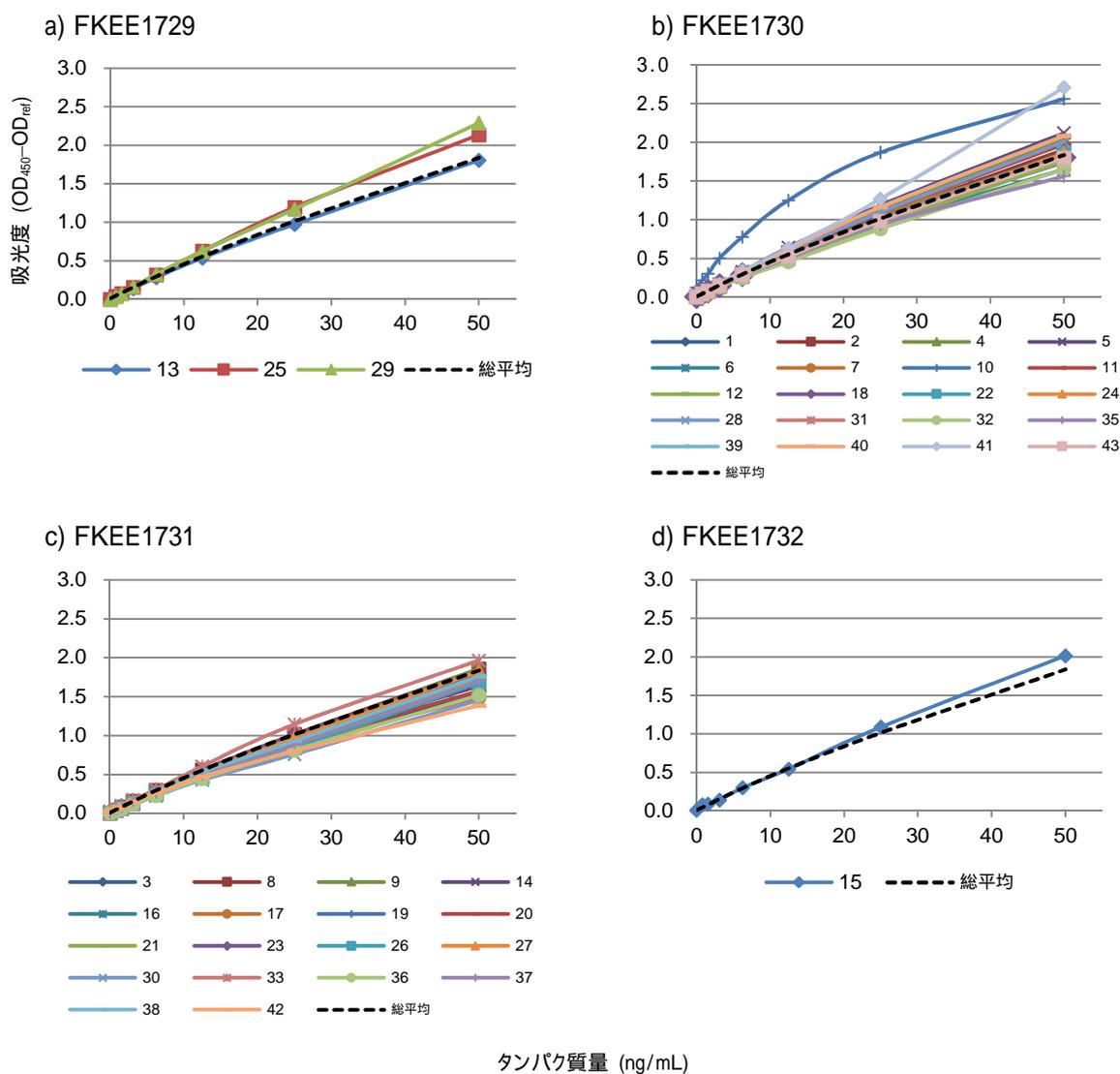
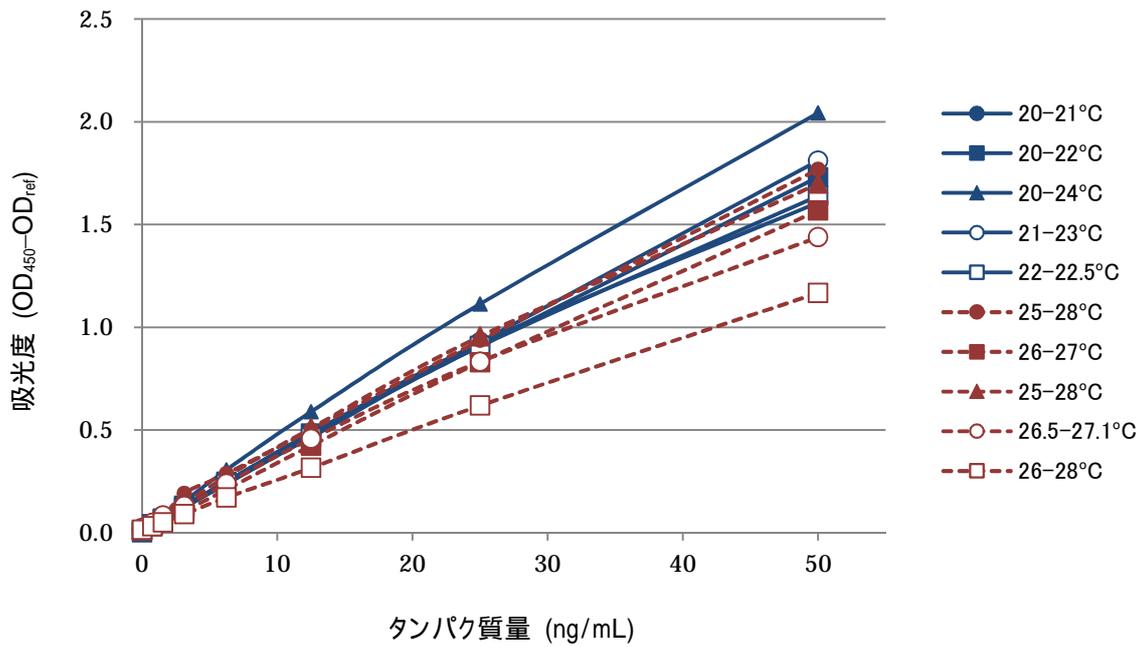


図 17 日本ハムキットを用いた測定におけるロット別検量線

a) モリナガキット



b) 日本ハムキット

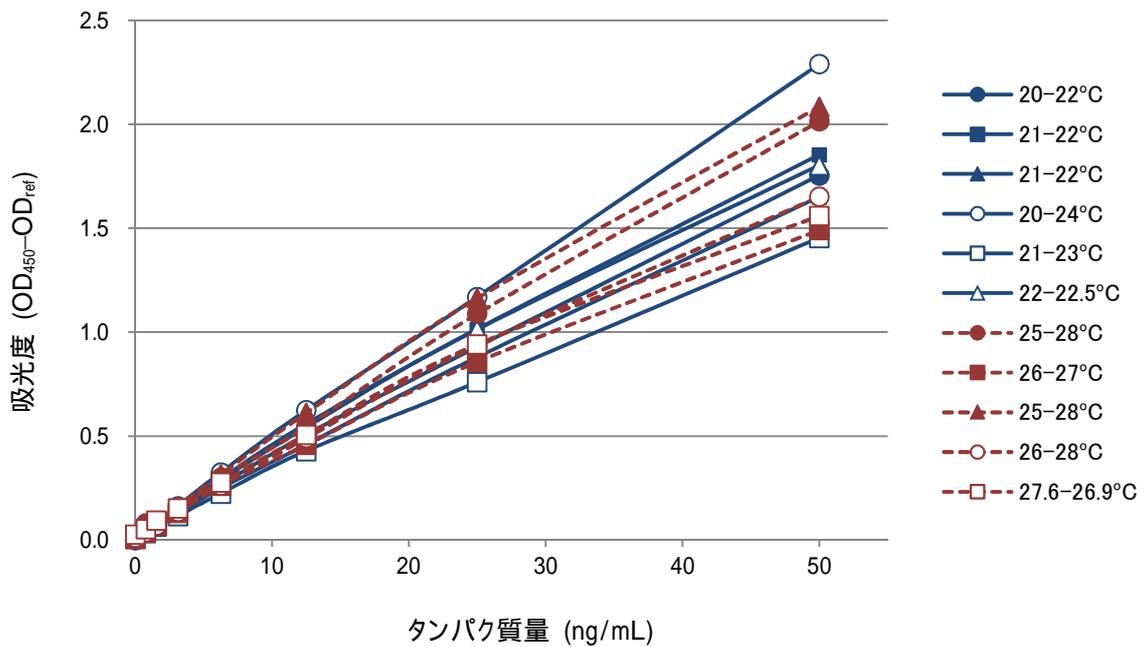
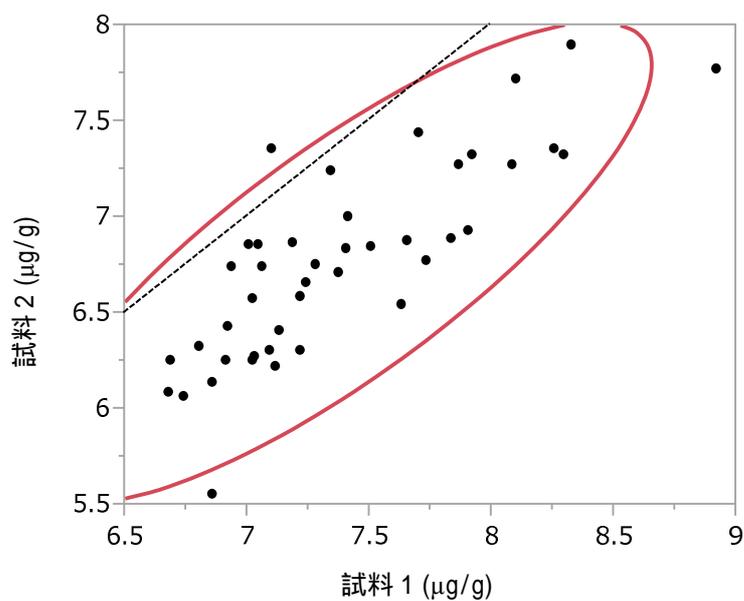


図 18 試験時の室温と検量線

a) モリナガキット (43 機関)



b) 日本ハムキット (42 機関)

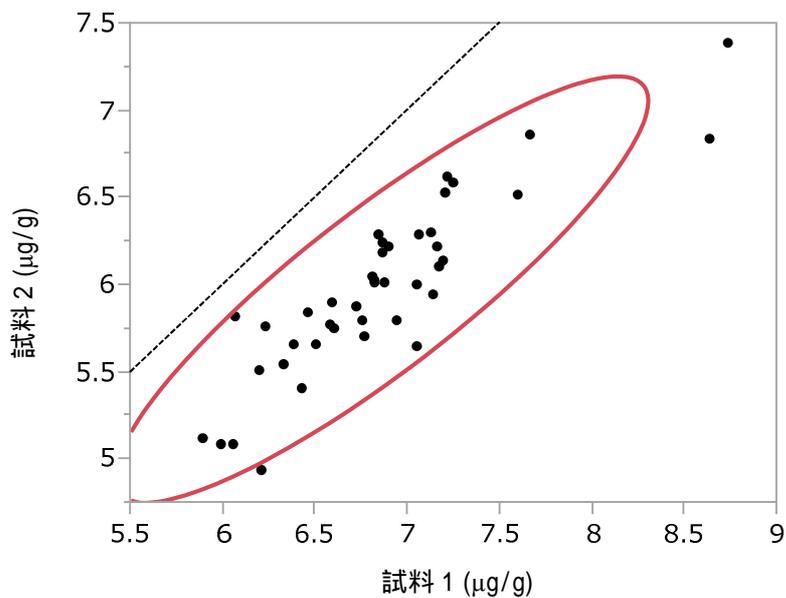


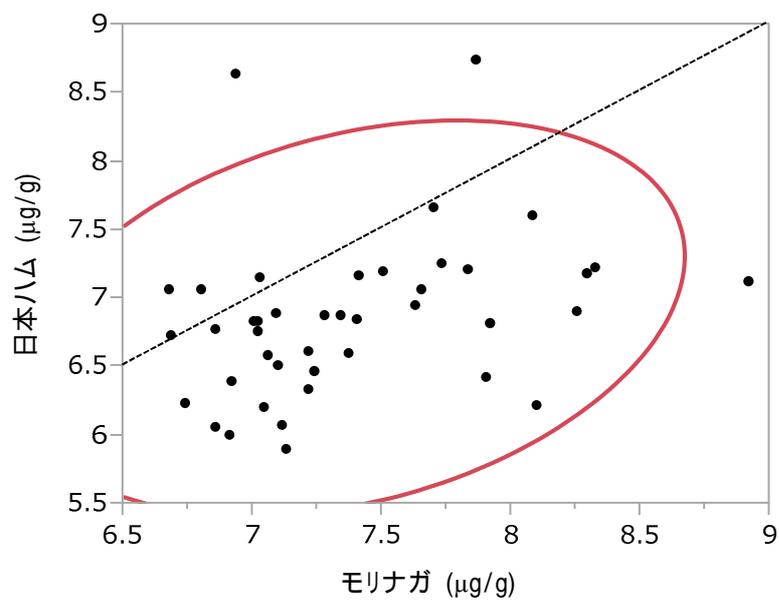
図 19 同一キット内における測定値の試料間の相関性

図中の楕円は 95%の確率楕円を示す。点線は試料 1 (μg/g) = 試料 2 (μg/g)

a) 試料 1:  $7.38 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$ 、試料 2:  $6.76 \pm 0.51 \mu\text{g/g}$ 、 $R = 0.821$  ( $p < 0.0001$ )

b) 試料 1:  $6.85 \pm 0.59 \mu\text{g/g}$ 、試料 2:  $5.97 \pm 0.50 \mu\text{g/g}$ 、 $R = 0.886$  ( $p < 0.0001$ )

a) 試料 1 (42 機関)



b) 試料 2 (42 機関)

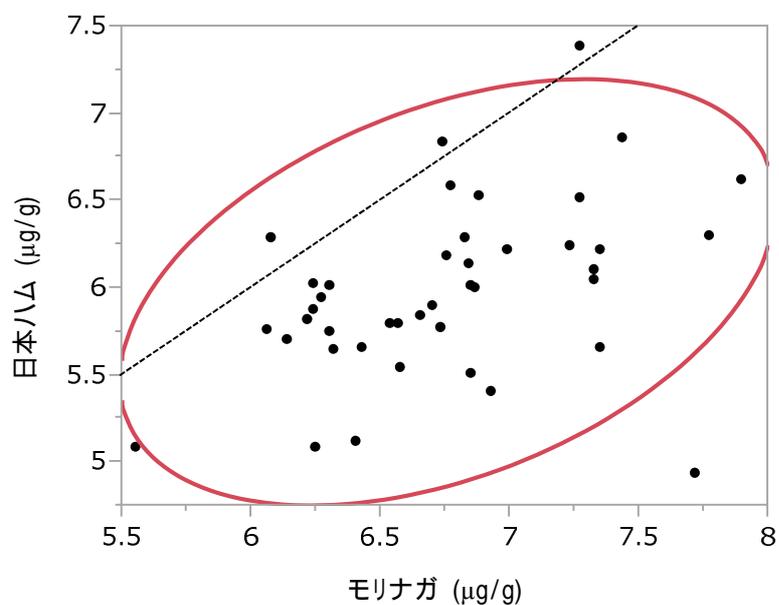


図 20 同一試料内での測定値のキット間の相関性

楕円は 95%の確率楕円を示す。点線はモリナガ(μg/g) = 日本ハム(μg/g)

a) モリナガ:  $7.39 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$ 、日本ハム:  $6.85 \pm 0.59 \mu\text{g/g}$ 、 $R = 0.315$  ( $p = 0.042$ )

b) モリナガ:  $6.76 \pm 0.52 \mu\text{g/g}$ 、日本ハム:  $5.97 \pm 0.50 \mu\text{g/g}$ 、 $R = 0.417$  ( $p = 0.006$ )

表7 平成29年度外部精度管理調査研究における各機関の操作手法(全般)

項目	1	2	3	4
抽出方法	振盪 43	ホモジナイズ 1	その他 0	
振盪時間 (h)	< 14 2	14 - 16 22	> 16 19	
振盪速度 (rpm)	< 90 2	90 - 110 39	> 110 2	
ろ過	実施 29	実施せず 14		
遠心分離	実施 43	実施せず 0		
抽出溶液等の 希釈操作	手動 43	自動 0		
試薬添加時の ピペット	連続分注		マルチチャンネル 34	シングルチャンネル 1
	マルチチャンネル 6	シングルチャンネル 2		
洗浄方法	手動 19	自動 24		
検量線の 回帰法	4PL 40	5PL 3	その他 0	

表 8 平成 29 年度外部精度管理調査研究における各機関の操作手法(キット別)

a) モリナガキット

項目	1	2	3	4
抽出液の 保存期間(日)	0 30	1 5	2 - 7 7	7 - 14 1
試料添加時間 (分)	< 10 25	10 - 30 17	> 30 1	
操作中の室温	25 以下 27	25 を越える時間あり 8	25 以上 8	
検量線の 相関(R <sup>2</sup> ) <sup>*</sup>	< 0.99 2	≥ 0.99 <sup>**</sup> 38		

\* 検量線の回帰法が 5PL の場合、相関係数がないため 40 機関

\*\* 1 桁表示が 2 機関あり

b) 日本ハムキット

項目	1	2	3	4
抽出液の 保存期間(日)	0 19	1 14	2 - 7 8	7 - 14 1
試料添加時間 (分)	< 10 25	10 - 30 16	> 30 1	
操作中の室温	25 以下 25	25 を越える時間あり 12	25 以上 5	
検量線の 相関(R <sup>2</sup> ) <sup>*</sup>	< 0.99 3	≥ 0.99 <sup>**</sup> 36		

\* 検量線の回帰法が 5PL の場合、相関係数がないため 39 機関

\*\* 1 桁表示が 2 機関あり

c) プリマハムキット

項目	1	2	3	4
抽出液の 保存期間(日)	0 1	1	2 - 7	7 - 14
試料添加時間 (分)	< 10 1	10 - 30	> 30	
操作中の室温	25 以下 1	25 を越える時間あり	25 以上	
検量線の 相関(R <sup>2</sup> )	< 0.99	≥ 0.99 1		

表 9 平成 28 年度の特定原材料 6 種(卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類)の検査実績種類数

	特定原材料 6 種中の実施種類数						
	0	1	2	3	4	5	6
実施機関数	1	4	6	7	5	5	15

表 10 平成 28 年度の参加機関検査実績および使用キット

		特定原材料					
		卵	乳	小麦	そば	落花生	甲殻類
ELISA	実施機関数	36	34	33	27	21	21
	使用キット [複数回答]						
	モリナガ	33	31	31	25	20	
	日本ハム	36	34	33	27	21	
	プリマハム	4	3	3	2	1	
	ニッスイ						20
	マルハ						21
	総試験数	1482	1831	1010	499	359	551
確認試験	実施機関数	5	4	7	2	0	3
	試験数	8	8	64	2	0	10

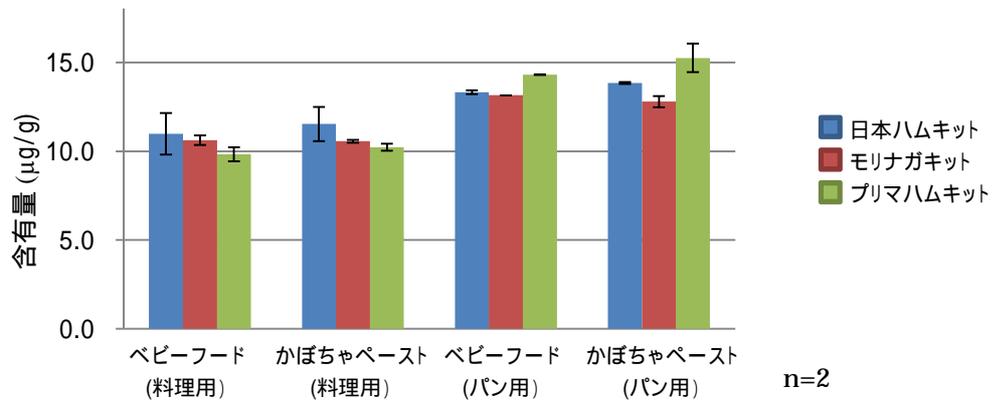


図 21 料理用小麦粉及びパン用小麦粉から調製した小麦タンパク質添加試料の ELISA 法結果

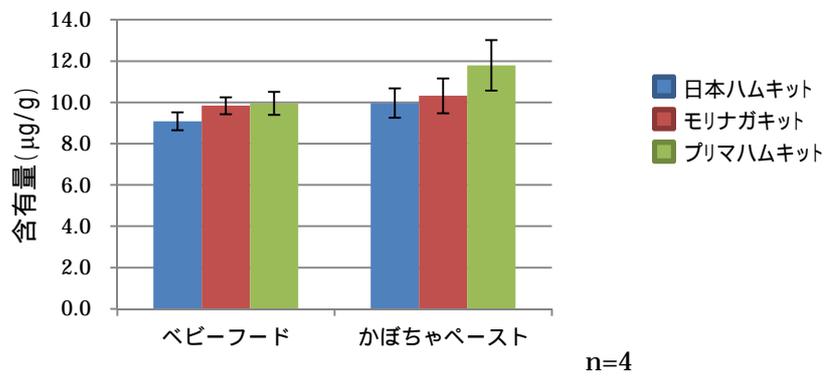


図 22 料理用小麦粉から調製した小麦タンパク質添加試料の ELISA 法結果

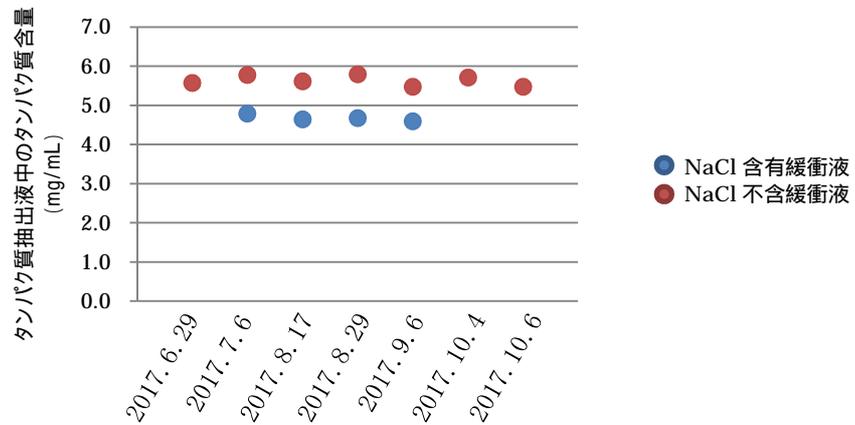
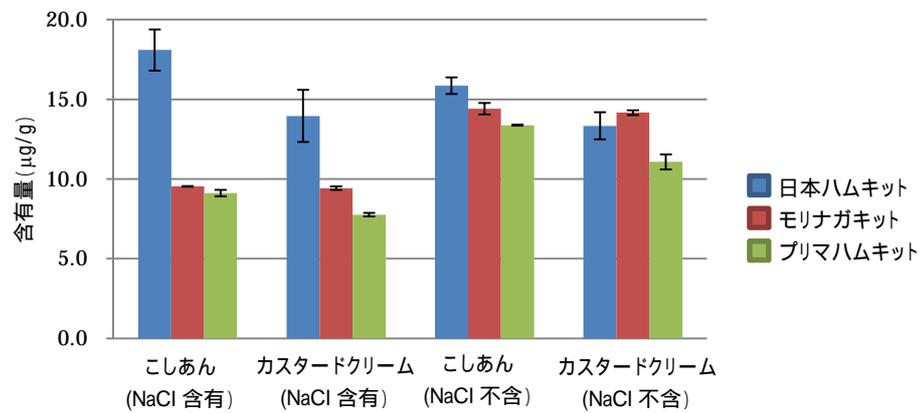


図 23 そば粉抽出用緩衝液の違いによる抽出液中のタンパク質含量

a) こしあんとカスタードクリーム



b) ベビーフードとかぼちゃペースト

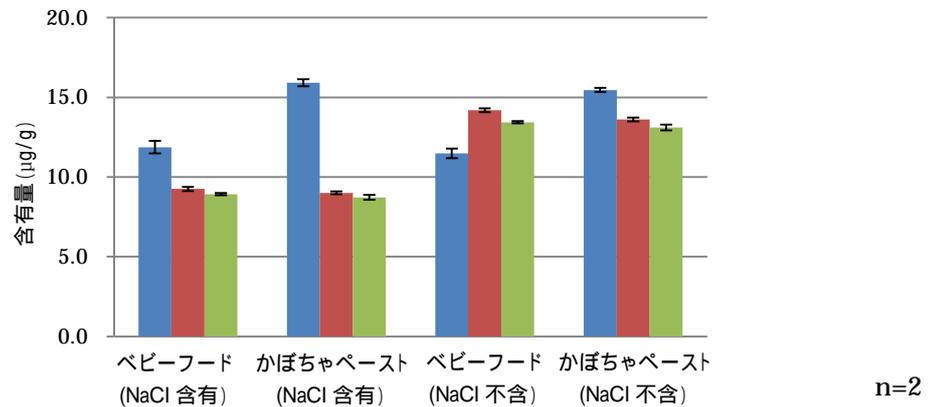


図 24 そば粉抽出用緩衝液と基材の違いによる ELISA 法における検出量の比較

表 11 そば粉抽出用緩衝液と基材の違いによる ELISA 法における測定値

基材	そば粉抽出試料(w/ NaCl) (μg/g)			そば粉抽出試料(w/o NaCl) (μg/g)		
	日本ハム	モリナガ	プリマハム	日本ハム	モリナガ	プリマハム
こしあん	18.1 ± 1.3	9.5 ± 0.0	9.1 ± 0.2	15.9 ± 0.5	14.4 ± 0.4	13.4 ± 0.0
カスタードクリーム	14.0 ± 1.6	9.4 ± 0.1	7.8 ± 0.1	13.3 ± 0.9	14.2 ± 0.2	11.1 ± 0.5
ベビーフード	11.9 ± 0.4	9.3 ± 0.1	8.9 ± 0.1	11.5 ± 0.3	14.2 ± 0.1	13.4 ± 0.1
かぼちゃペースト	15.9 ± 0.2	9.0 ± 0.1	8.7 ± 0.2	15.5 ± 0.1	13.6 ± 0.1	13.1 ± 0.2

補足資料

平成 29 年度特定原材料検査外部精度管理調査研究参加機関

北海道立衛生研究所  
札幌市衛生研究所  
青森県環境保健センター  
仙台市衛生研究所  
茨城県衛生研究所  
栃木県保健環境センター  
群馬県食品安全検査センター  
さいたま市健康科学研究センター  
千葉県衛生研究所(仁戸名研究室部門)  
東京都健康安全研究センター  
杉並保健所 生活衛生課衛生検査係  
神奈川県衛生研究所 理化学部  
横浜市衛生研究所  
川崎市健康安全研究所  
相模原市衛生研究所  
新潟県保健環境科学研究所  
新潟市衛生環境研究所  
長野県環境保全研究所  
岐阜県保健環境研究所  
静岡市環境保健研究所  
浜松市保健環境研究所  
愛知県衛生研究所  
三重県保健環境研究所  
滋賀県衛生科学センター  
京都府保健環境研究所  
京都市衛生環境研究所  
地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 森ノ宮センター  
地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター  
神戸市環境保健研究所  
岡山県環境保健センター 衛生化学科  
広島県立総合技術研究所保健環境センター  
山口県環境保健センター

福岡県保健環境研究所

福岡市環境局保健環境研究所 保健科学課

宮崎県衛生環境研究所

一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所

公益社団法人日本食品衛生協会 食品衛生研究所

一般財団法人 食品環境検査協会 東京事業所

一般社団法人 日本海事検定協会 食品衛生分析センター

一般社団法人東京都食品衛生協会 東京食品技術研究所

イカリ消毒株式会社 LC 環境検査センター

一般財団法人 食品分析開発センター SUNATEC

一般財団法人 広島県環境保健協会 環境生活センター