

令和3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）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

アレルギー物質検査の改良と開発に関する研究

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	副所長
研究分担者	村上 太郎	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	清田 恭平	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	昌山 敦	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	柿本 葉	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	主任研究員
研究協力者	村野 晃一	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	研究員
研究協力者	山崎 朋美	(地独)	大阪健康安全基盤研究所	研究員

研究要旨

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質は特定原材料として消費者庁からの通知（通知法）により、Enzyme-linked Immunosorbent Assay（ELISA）を用いて測定される。検査対象となる加工食品中の原材料は多種多様であり、その夾雑物によって測定が影響を受ける場合もある。本研究では、これまでに特定原材料（小麦・落花生）の定量で影響が確認されてきたポリフェノールの一種であるProanthocyanidin（PAC）を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行う。今年度は特定原材料の検査における試験室内における不確かさについて評価を行った。当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における試験室内での不確かさについて推定した。評価の結果、特定原材料の測定項目とキットの種類によって、日間変動が大きくなる場合が確認された。一方で、併行して抽出した管理試料や標準物質によって回収率を補正した場合には日間変動は軽減された。次に、改良抽出法の試験室間における評価のために精度管理用試料を調製して安定性について評価したところ、試料は冷蔵保存で84日まで安定であった。調製した精度管理用試料を2試験室の各2試験者で評価を行ったところ、測定者間に有意な変動が確認され、試験室間の変動は有意ではなかった。測定者間の変動は、測定日ごとの抽出条件の変化に起因する可能性もあるため、試験室間共同試験の際には抽出条件と測定条件を統一して実施する必要があると考えられた。調製した精度管理用試料は測定阻害と改良抽出法の評価に適用できることが確認できたため、最終年度は改良抽出法の試験室間共同試験について試験室数を増やして評価を行うことによって、より信頼性の高い検査法の確立に繋げる。

A. 研究目的

食品表示法による食品表示基準（平成27年3月30日消食表第139号）では、28品目の原材料がアレルギーを含む食品として加工食品への表示が推奨されている¹。28品目の原材料のうち卵、乳、小麦、そば、落花生、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。

アレルギーを引き起こす可能性のあるタンパク質の測定には、消費者庁による通知（以下、通知法）によって、**Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)** がスクリーニング法として利用されている¹⁾。ELISAでは検査対象となるタンパク質に対する抗体の特異性を利用し、多くの原材料との交差性の有無が確認されているため、一般的には信頼性が高い。しかしながら、加工食品には多種多様な原材料が使用されており、その夾雑物が特定原材料の定量に影響を与える場合がある。

本課題では、これまでの研究の中で小麦と落花生の定量への影響が確認されてきたポリフェノールの一種であるプロアントシアニジン（**Proanthocyanidin**：以下PAC）を含む試料について、特定原材料を正確に定量することを目的として、分析法の改良について検討を行う²⁾。

今年度は特定原材料の検査における試験室内における不確かさについて評価を行った。当研究所で検査と併行して分析した管理試料と添加回収試験の測定結果を元に、特定原材料の測定における不確かさについて推定を行った。また、改良抽出法の試験室間における評価のために精度管理用試料を調製し、試料の安定性について評価した。

B. 方法

1. 試料

1.1. 管理試料

森永生科学研究所製の多糖類と酒粕を原料とした精度管理用試料QC Material牛乳、卵、小麦を管理試料として使用した。

1.2. 測定阻害評価用試料

表1に生産国と加工法が異なるカカオを含む食品10試料（ココアパウダー5試料、ローストカカオ豆3試料、カカオニブ2試料）を示す。試料は量販店もしくはインターネット通信販売サイトから購入し、測定阻害の評価のために使用した。ローストカカオ豆などの粉状ではない試料はフードプロセッサ（岩谷産業：IFM-700）によって粉碎後に冷凍庫で保存した。その他の試料は室温で保存した。

2 試薬

Polyvinylpyrrolidone（以下PVP）K15は東京化成工業製の試薬を使用した。特定原材料の分析には日本ハム中央研究所製のFASTKIT Ver. IIIキット（FASTKIT）もしくは、森永生科学研究所製のFASPEK IIキット（FASPEK）を使用した。

3 標準品

通知法に示されている標準品規格に記載の方法に従って、国産生落花生（千葉半立種）から調製した標準溶液を添加回収試験用に使用した。

4. 特定原材料の定量

特定原材料の分析は通知法に従って実施

した。吸光度の測定はマイクロプレートリーダーMultiskan FC (Thermo) を使用し、ソフトウェアSkanIt Ver.2.51 (Thermo) を使用して、試料中のタンパク質濃度を計算した。

5 特定原材料検査における不確かさの評価

5.1 評価対象

本研究では牛乳、卵、小麦、落花生の4項目を評価対象とした。管理試料が市販されている牛乳と卵と小麦は森永生科学研究所製QC Materialを管理試料として使用した。管理試料が市販されていない落花生については、添加回収試験によって評価を行った。

5.2. 管理試料による評価

QC Materialの品質報告書には、FASPEKによる分析値のみが記載されているため、FASPEKについてはQC Materialの品質報告書に示されている平均値に対する回収率を評価し、FASTKITはQC Materialの分析値の精度のみを評価した。

5.3. 添加回収試験による評価

管理試料が市販されていない落花生については、通知法の標準品規格を参考に調製した標準溶液によって添加回収試験で評価を行った。添加用の陰性試料としては難消化性デキストリンを含む健康食品を選定した。各試料に標準溶液を5 µg/gとなるように添加し、併行して抽出した標準溶液の濃度に対する回収率を評価した。

5.4 不確かさの評価

日常検査値の不確かさの推定ソフト

(日本臨床検査標準協議会ver. 5.52) によって、2段枝分かれ分散分析で各要因の分散を推定し、相対標準偏差 (RSD_w; 測定間、RSD_s; 抽出間、RSD_a; 日間) を推定した³⁾。また、各要因の不確かさから各検査キットの室内再現精度 (RSD_L) を評価した。

6. 精度管理用試料の調製と評価

6.1. 測定阻害についての評価

QC Material小麦にカカオ含む試料を等量50 mL遠沈管内で混合した試料について、通常の抽出液とPVP K15を1 % (w/v) 含む抽出液で抽出を行い、併行して抽出したQC Material小麦の分析値に対する回収率を評価した。

6.2. 精度管理用試料の混合比率の最適化

QC Material小麦に、試料2のココアパウダーを10、25、50、75、90 % (w/w) となるように50 mL遠沈管内で混合した試料を評価に使用した。試料は通常の抽出液によって抽出し、併行して抽出したQC Material小麦の分析値に対する回収率を評価した。

6.3. 精度管理用試料の抽出法比較

改良法の抽出法の比較のために、あらかじめPVP K15を抽出液に溶解した場合とPVP K15を最終濃度が1 % (w/v) となるように50 mL遠沈管内に加えた場合の評価を行った。表2に示す配合割合で各試料を50 mL遠沈管内で混合した試料について抽出法ごとの比較を行った。試料1、3、4は通常の抽出液で、試料2はPVP K15を1 % (w/v) となるように溶解した抽出液で抽出を行った。抽出後の評価試料の分析値は

併行して抽出したQC Material小麦の分析値と各評価試料のQC Material小麦の採取量から回収率を算出して評価した。

6.4. 精度管理用試料の安定性の評価

試料の安定性の評価のために、表3に示す配合割合で各試料を50 mL遠沈管内で混合した試料を冷蔵庫内で保存した。保存時の温度変動の確認のため、庫内の温度を温度カードロガー（CHINO：MR5300）によって、1時間ごとに記録した。保存後0、7、28、84日後に精度管理用試料を抽出し、FASPEKとFASTKITの両キットで分析した。抽出後の評価試料の分析値は併行して抽出したQC Material小麦の分析値と各評価試料のQC Material小麦の採取量から回収率を算出して評価した。安定性の評価はFASPEK、FASTKITともに同じロットのキットを使用した。

6.5. 精度管理用試料の試験室間評価

安定性を確認した精度管理用試料について、当研究所の2試験室で評価を行った。表4に示す試料について、各試験室2名による評価を行った。試験室間評価はFASPEK、FASTKITともに同じロットのキットを使用した。評価結果を2元配置の分散分析によって、抽出間、測定者間、試験室間の変動について評価した

（倫理面への配慮）

本研究では実験動物や生体試料などの取扱いはないため、倫理面に配慮する研究には該当しない。

C. D. 研究結果および考察

1. 特定原材料検査における不確かさの

評価

1.1. 管理試料による評価

牛乳と卵と小麦のキットごとの回収率と各要因の相対不確かさを表5-1,2に示す。FASPEKの回収率についてはいずれの項目でもアレルギーを含む食品の検査方法を評価するガイドラインで示された評価基準の50–150 %の範囲内に収まった¹⁾。両キットのRSD_wとRSD_sは全ての項目で10 %以下となり、過去の報告における精度と同等の精度を示した^{4), 5)}。一方で、RSD_dについては特定のタンパク質を測定対象とするFASPEKと比較して、複数のタンパク質を測定対象とするFASTKITでの変動が大きかった。RSD_dの要因には測定キットのLotが異なることに由来する要因も含まれているため、管理試料の品質報告書の分析値によって回収率の補正を行ったFASPEKではRSD_dが軽減されたと推察される。また、いずれの項目でもRSD_LもFASTKITと比較してFASPEKが低い傾向が確認された。

1.2. 添加回収試験による評価

落花生では、健康食品を陰性試料に選定して添加回収試験を実施したところ、回収率は50–150 %の範囲内に収まった（表5-1,2）。添加回収試験では試料由来のマトリクスが回収率に影響を及ぼす場合もあるため、内部品質管理に適した試料を事前に確認する必要がある。両キットのRSD_wとRSD_sは全ての項目で10 %以下となった。添加回収試験では、併行して抽出した標準溶液の濃度で回収率の補正を行うことによってLotが異なることに由来する要因が補正されたため、両キットでRSD_dは軽減された。RSD_Lも両キットで20 %以内となり、

管理試料で評価した場合と同等の精度を示した。

2. 精度管理用試料の調製と評価

2.1. 測定阻害についての評価

図1に示すように、カカオを含む食品に QC Material小麦を混合して通常の抽出液で抽出した場合には、いずれの試料でも回収率の低下が確認された。小麦グリアジンを対象とするFASPEKでは、10試料中8試料で小麦が検出されず、カカオの夾雑物による影響を受けやすい傾向が確認された。一方で、改良抽出法では両キットの全ての試料で回収率の上昇が確認された。全ての試料で回収率の改善が確認されたため、2.2以降の評価では試料2のオランダ製のココアパウダーを使用した。

2.2. 精度管理用試料の混合比率の最適化

試料2のココアパウダーの比率を変えて混合した試料について評価を行った結果、FASPEKでは25 % (w/w) 以上混合した試料で、FASTKITでは90 % (w/w) 以上混合した試料で小麦タンパク質が検出されなかった。QC Material小麦の採取量を減らした場合には試料の均質性によって評価結果が影響を受ける可能性があるため、2.3以降の評価ではQC Material小麦とココアパウダーを等量混合した試料について評価を行った。

2.3 精度管理用試料の抽出法の比較

改良法の抽出法の比較のために、PVP K15をあらかじめ抽出液に溶解した場合とPVP K15を最終濃度が1 % (w/v) となるように50 mL遠沈管内に加えた場合の評価を行った。図2に示すように、PVP K15を

あらかじめ抽出液に溶解した試料2の回収率とPVP K15を最終濃度が1 % (w/v) となるように50 mL遠沈管内に加えた試料3の回収率はFASPEKとFASTKITのいずれのキットでも回収率の差異は確認されなかった。PVP K15は水溶性のポリマーであり、室温での抽出時に容易に溶解するため、あらかじめ抽出液に添加しない場合にも抽出液に溶解し測定阻害に対する効果が確認された。このため、安定性評価と試験室間評価では50 mL遠沈管内でPVP K15を混合した試料で検討を行った。

2.4 精度管理用試料の安定性評価

精度管理用試料の保存後0、7、28、84日後に精度管理用試料を抽出し、FASPEK、FASTKITの両キットで評価した結果を図3に示す。回収率の算出のために使用するQC Material小麦の分析値は評価期間内に相対標準偏差としてFASPEKで12.6 %、FASTKITで4.3 %の変動が確認された。QC Materialの製造元である森永生科学研究所での評価では、QC Material卵と乳の安定性については、4 °C保管において製造後30カ月間にわたり、製造後測定値の10%以内の変動に抑えられていることが報告されている⁶⁾。評価期間内のQC Material小麦の変動は森永生科学研究所による乳と卵での変動と同程度の変動が確認された。一方で、併行して分析した精度管理用試料のQC Material小麦の分析値に対する回収率は調製後84日まで低下は確認されなかった。また、冷蔵庫内で試料を保存した際のデータロガーで記録した平均温度は3.3 °C、最低温度1.7 °C、最高温度5.1 °Cであった。調製した試料は冷蔵で保存することによって

調製後84日まで評価できることが確認された。

2.5 精度管理用試料の試験室間評価

当研究所の2試験室の各2試験者で、精度管理用試料を調製後60日以内に抽出して評価を行った。評価者A,B,C,Dの評価結果を図4に示す。各キットの回収率の平均値と標準偏差はFASPEKで $10.5 \pm 2.1\%$ 、FASTKITで $19.8 \pm 2.8\%$ と回収率の低下が確認された。一方で、改良抽出法ではFASPEKで $95.7 \pm 3.3\%$ 、FASTKITで $92.3 \pm 6.6\%$ と回収率の改善が確認された。評価結果を2元配置の分散分析によって、抽出間、測定者間、試験室間の変動について評価した。評価の結果、測定者間に有意な変動が確認され、試験室間の変動は有意ではなかった。測定者間の変動は、測定日ごとの抽出条件の変化に起因する可能性もあるため、試験室間共同試験の際には抽出条件と測定条件を統一して実施する必要があると考えられた。

E. 結論

今年度は試験室内での特定原材料の検査における不確かさを推定し、室間共同試験用の試料の調製法について検討した。調製した試料は84日まで安定であり、測定阻害と改良抽出法の評価に適用できることが確認できた。このため、最終年度は試験室数を増やして改良抽出法の試験室間共同試験を実施する予定である。改良した検査法を複数機関による室間共同試験で評価することができれば、改良法の適切な科学的根拠を示すことに繋がると考える。

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) 村上太郎、工藤鮎子、村野晃一、高取聡、角谷直哉、若栗忍、渡辺卓穂：ELISA法による特定原材料（落花生）の測定における阻害因子の解析と改良抽出法の検討：日本食品化学学会 第27回総会・学術大会、WEB開催、2021.

2) 村上太郎、村野晃一、工藤鮎子、清田恭平、昌山敦、高取聡、山野哲夫：特定原材料検査の内部品質管理における課題と不確かさの推定：第58回全国衛生化学技術協議会年会、WEB開催、2021.

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) 消費者庁「食品表示基準について」（平成27年3月30日消食表第139号、別添アレルギー関係）

2) Taro Satsuki-Murakami, Ayuko Kudo, Atsushi Masayama, Masami Ki, Tetsuo Yamano. *Food Control* 84, 70–74, 2018

3) 細萱茂実 他, 臨床化学 34, 40-46,

2005

4) 紀雅美 他, 大阪市立環科研報告 75,

35-39, 2012

5) 昌山 敦 他, 大阪市立環科研報告 78 ,

37-41, 2016

6) 桑原香織 他, 食衛誌 60 , 113-117

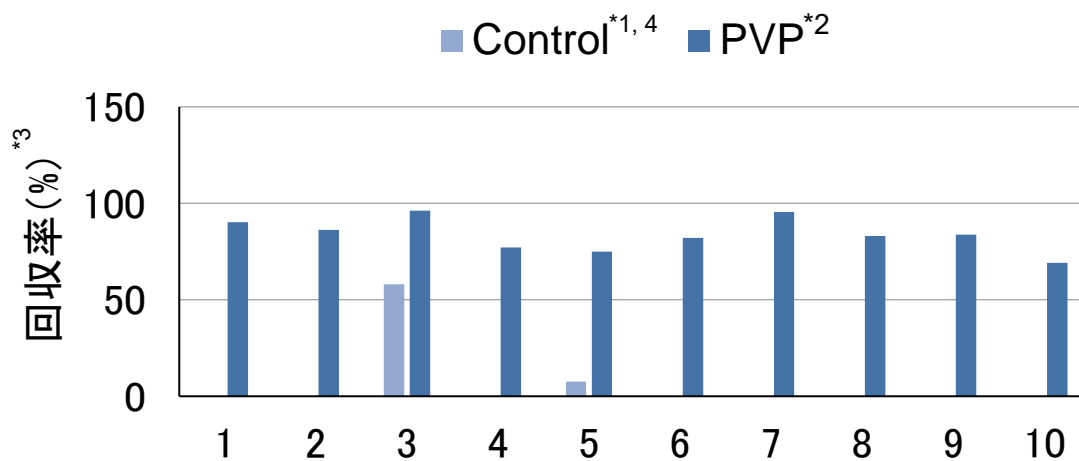
(2019)

以下 図表

表1 測定阻害評価用試料

	試料	生産国
1	ココアパウダー	オランダ
2	ココアパウダー	オランダ
3	ココアパウダー	マレーシア
4	ココアパウダー	マレーシア
5	ココアパウダー	フランス
6	ローストカカオ豆	タイ
7	ローストカカオ豆	エクアドル
8	ローストカカオ豆	インドネシア
9	カカオニブ	トーゴ
10	カカオニブ	コロンビア

FASPEK



FASTKIT

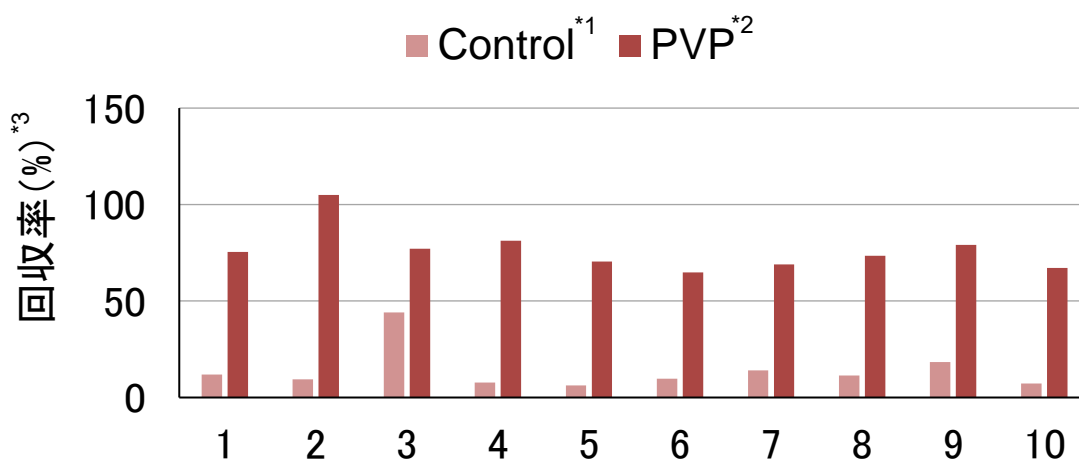


図1 測定阻害評価用試料の評価

- *1 キットの抽出液によって抽出
- *2 抽出液にPVPを1% (w/v) 添加して抽出
- *3 併行して抽出したQC material小麦の分析値に対する回収率
- *4 試料1, 2, 4, 6-10は検出限界以下のため回収率は算出不可

表 2 抽出法比較用試料

試料	調製方法	抽出	併行数
試料 1	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g	通常法	3
試料 2	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g	改良法 ^{*1}	3
試料 3 ^{*2}	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g+PVP K15 0.19 g	通常法	3
試料 4	QC Material 小麦 1 g	通常法	1

^{*1} 抽出液に PVP K15 を 1% (w/v) 添加

^{*2} 抽出液を加えた後の PVP K15 の濃度 1% (w/v)

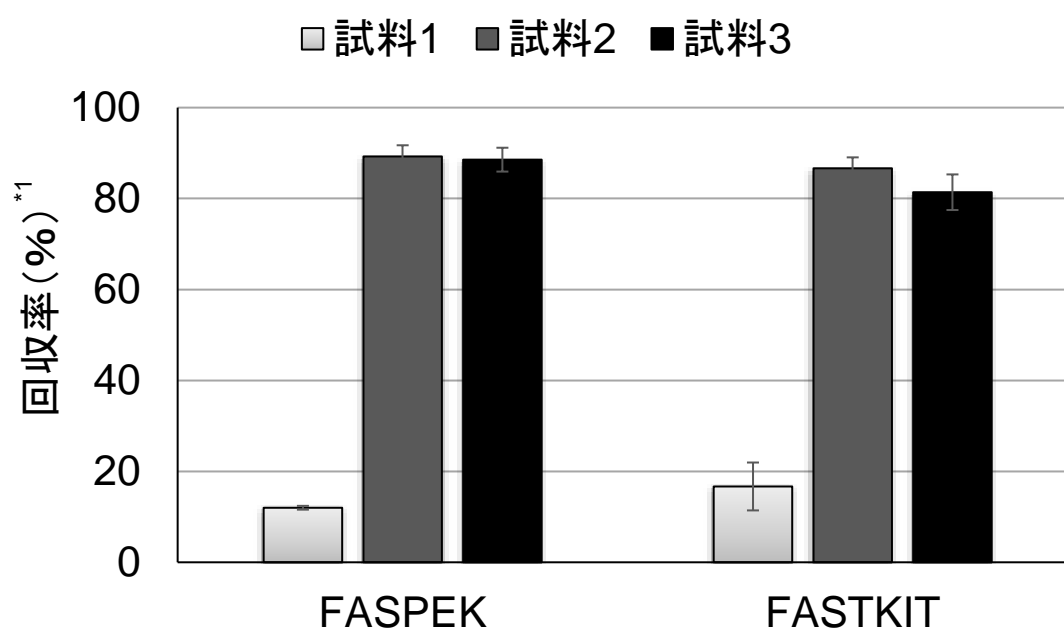


図2 精度管理用試料の抽出法比較

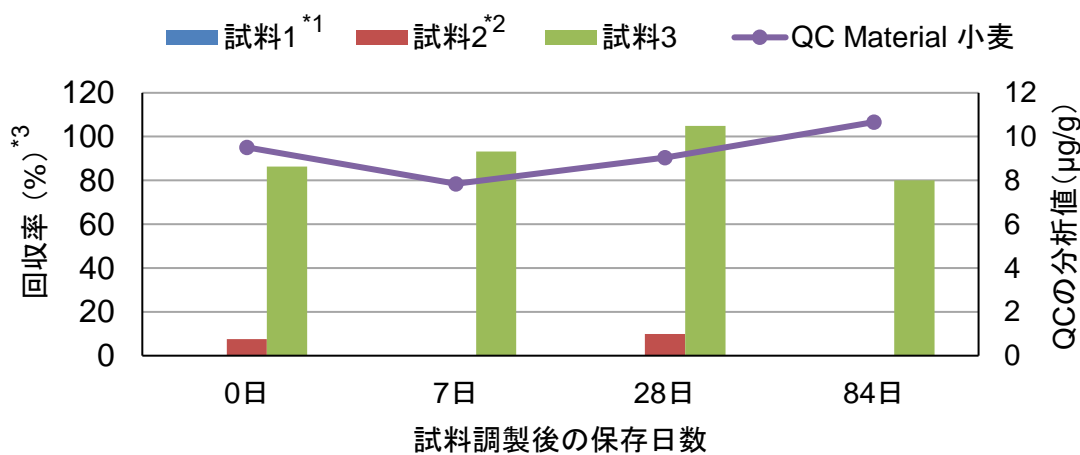
^{*1} 併行して抽出した試料4 (QC material小麦) に対する回収率

表 3 安定性評価用試料

No.	調製方法	併行数
試料 1	カカオ 1 g	2
試料 2	カカオ 0.5 g+QC Material 0.5 g	2
試料 3*	カカオ 0.5 g+QC Material 0.5 g+PVP K15 0.19 g	2
試料 4	QC Material 小麦 1 g	2

*抽出液を加えた後の PVP K15 濃度 1 % (w/v)

FASPEK



FASTKIT

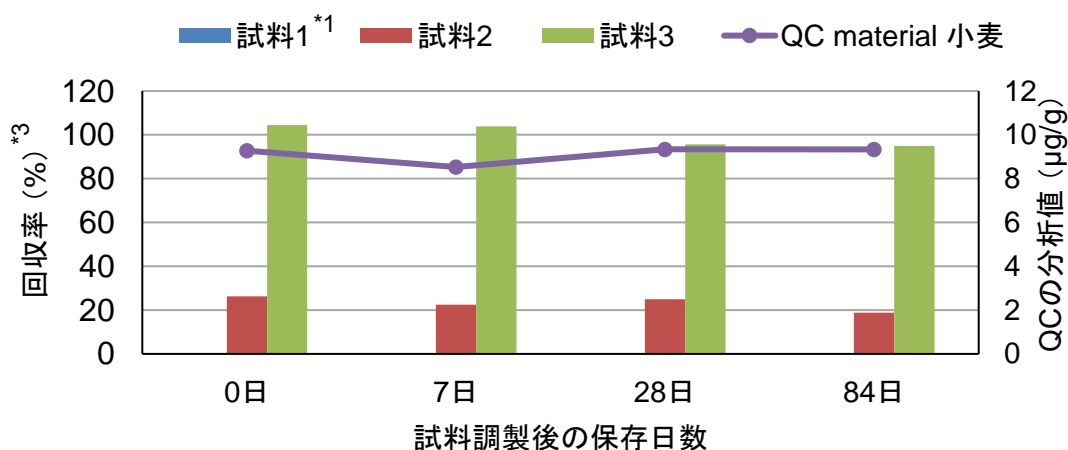


図3 精度管理用試料の安定性評価

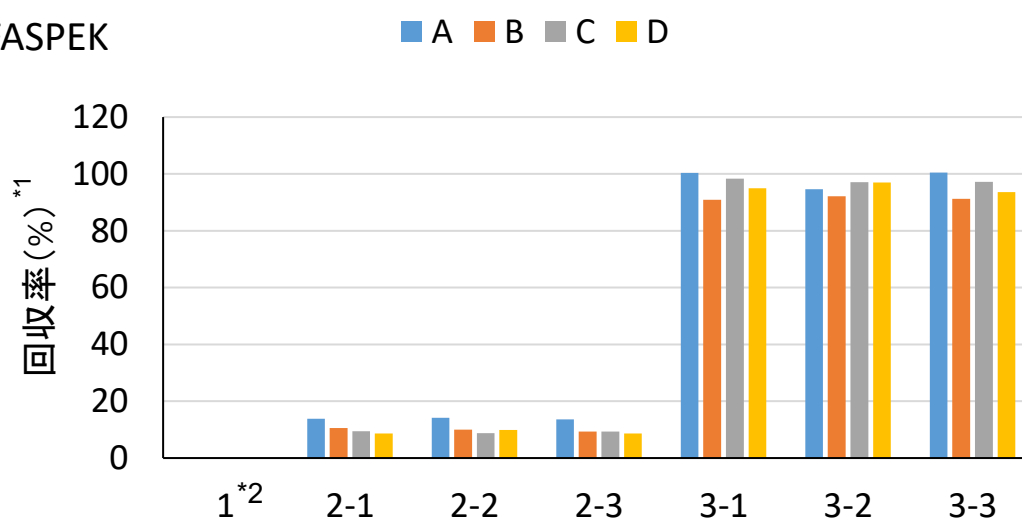
- *1 試料1は検出限界以下のため回収率は算出不可
- *2 試料2の7日、84日は検出限界以下のため回収率は算出不可
- *3 QC Material小麦の分析値と採取量から算出した各試料の回収率

表 4 試験室間評価用試料

No.	調製方法	併行数
試料 1	カカオ 1 g	1
試料 2	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g	3
試料 3*	カカオ 0.5 g+QC Material 小麦 0.5 g+PVP K15 0.19 g	3
試料 4	QC Material 小麦 1 g	1

*抽出液を加えた後の PVP K15 濃度 1 % (w/v)

FASPEK



FASTKIT

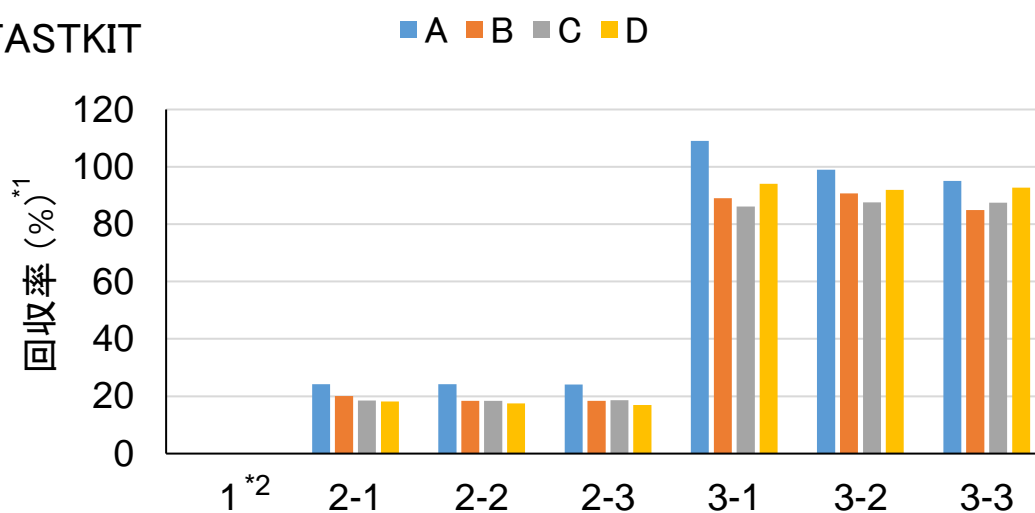


図 4 精度管理用試料の試験室間評価

*1 QC Material小麦の分析値と採取量から算出した各試料の回収率

*2 試料1は検出限界以下のため回収率は算出不可

表 5-1 FASPEK での回収率と相対不確かさ

項目	精度管理	相対不確かさ (%)				回収率 (%)
		RSD_w^{*1}	RSD_s^{*2}	RSD_d	RSD_L	
卵	管理試料	3.8	2.7	11.6	12.5	100.8
乳	管理試料	3.1	0.6	10.1	10.5	97.1
小麦	管理試料	6.4	1.3	14.4	15.8	96.7
落花生	添加回収試験	4.0	0.0	16.0	16.5	104.8

表 5-2 FASTKIT での回収率と相対不確かさ

項目	精度管理	相対不確かさ (%)				回収率 (%)
		RSD_w^{*1}	RSD_s^{*2}	RSD_d	RSD_L	
卵	管理試料	3.1	3.2	17.5	18.1	NA
乳	管理試料	2.2	3.4	19.5	19.9	NA
小麦	管理試料	5.9	7.7	31.7	33.2	NA
落花生	添加回収試験	4.7	3.7	18.4	19.3	102.2

*1 3 well の測定から算出

*2 3 併行もしくは 5 併行の抽出から算出

NA : 品質報告値が入手できないため算出不可