

令和4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	若栗 忍	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	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	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	山崎 朋美	(地独) 大阪健康安全基盤研究所	研究員

研究要旨

加工食品中の特定原材料のスクリーニング試験は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的一种である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（小麦）の改良抽出法の試験室間における評価のために、室間共同試験用試料を調製して試験室間共同試験による評価を行った。

改良抽出法の試験室間における評価のために、精度管理用試料として市販されている森永生化学研究所製のQC Material小麦とカカオパウダーを混合して配布試料を調製した。配布試料の安定性について評価したところ、試料は調製後112日まで回収率の低下は確認されず、試験室間共同試験の評価期間中に安定であることが確認された。

改良抽出法の試験室間共同試験の協力依頼を送付し、参加申込のあった合計28試験室に室間共同試験用試料を送付した。評価結果は分布を確認後、ロバスト方式により統計値を算出した。また、算出したロバスト平均値とロバスト標準偏差から z -スコアを算出し、外れ値を評価した。評価の結果FASPEKとFASTKITの各キットで z -スコアが-3未満の機関が1機関ずつ確認された。

配布試料を通常法で分析した際の回収率のロバスト平均とロバスト標準偏差はFASTKITで $12.8 \pm 2.3\%$ 、FASPEKで $16.1 \pm 4.7\%$ と回収率の低下が確認された。一方で、改良抽出法ではFASTKITで $92.7 \pm 12.1\%$ 、FASPEKで $96.0 \pm 8.4\%$ と回収率の改善が確認された。試験室間共同試験による評価結果は通知法に示された定量検査法の評価基準である50-150%の回収率と25%以下の室間精度を満たしており、室間共同試験によって改良抽出法の妥当性が確認された。本評価結果は今後のアレルギー物質のスクリーニング検査法の改定の際には、適切な科学的根拠として活用できると考えられる。

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、くるみ の8品目は特定原材料に指定され、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、その夾雑物により特定原材料の測定が影響を受ける場合もある。

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（小麦）の改良抽出法の試験室間における評価のために、室間共同試験用試料を調製して評価を行った。

B. 方法

1. 試料

1.1. 標準物質

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小麦を標準物質として使用した

1.2. 試料

令和3年度に測定阻害について評価を行ったカカオを原材料とする試料の中でオランダ産ココアパウダーを試料調製のために使用した。試料は量販店で購入し、試料調製まで室温で保存した。

2 試薬

Polyvinylpyrrolidone（以下PVP）K15は東京化成工業製の試薬を使用した。小麦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. 小麦の定量

ELISAによる小麦の定量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）によって試料中の小麦の濃度を計算した。

4. 試験室間共同試験用試料の調製と保存

表1に示す割合で、QC Material小麦とカカオパウダーを50 mL遠沈管内で試料を混合して冷蔵庫内で保存した。保存期間中の温度変動の確認のため、庫内の温度を温度ロガー（CHINO：MR5300）によって、1時間ごとに記録した。

5. 試験室間共同試験用試料の安定性の評価

試料の安定性の評価のために、室間共同試験の評価期間中（56日）と終了後（112日）に保存した試料を抽出し、FASPEKとFASTKITの両キットで分析した。分析値は試料調製日に抽出した試料抽出液の分析値と比較して、試料の冷蔵保存による安定性を評価した。安定性の評価にはFASPEK、FASTKITともに同じLotのキットを使用して分析を行った。

6. 試験室間共同試験

6.1. 試験室間共同試験の実施

令和4年4月に改良抽出法の室間共同試験の協力依頼を送付し、4月28日までに参加申込のあった合計28試験室に5月31日に実施要領と試料1-4を各2試料ずつ宅配便（冷蔵）で送付した。評価結果の回収期限は6月30日として、通知法によって定量を実施した各試料の定量値の報告を受けた。試料抽出液は各評価機関に冷凍保存を依頼した。

6.2. 評価に使用したキットと器材

試料抽出液の分析には、評価機関のうち17機関には、FASPEK（Lot No. 22FESFGD099）とFASTKIT（Lot No. FKEW2169）のキットを送付して評価に使用した。残りの11機関は各試験室が購入したキットを使用した。また、室間共同試験用試料を送付する際に、ひだ折りろ紙（ADVANTEC製5C、150 mm）を同封し、試料抽出時の遠心分離後のろ過を依頼した。

6.3. 評価結果の解析

評価結果の分布の確認のために、統計解析システムJMP（ver.17.0.0、SAS Institute

Japan）によって、ヒストグラムと箱ひげ図と正規確率プロットを作成した。また、評価結果の統計解析には z -スコアによる方法を用いた。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）により実施した。各機関の試料4の定量値からロバスト平均値とロバスト標準偏差を算出して、 z -スコアによって評価した。

6.4. Lot間差の検証

各試験室でキットを購入した11評価機関のうち8評価機関は、いずれかのキットが配布したキットと異なるLotによって評価が実施された。これらの評価機関には冷凍保存された試料抽出液の送付を依頼した。宅配便（冷凍）で送付された試料抽出液は当研究所で冷凍保存後、評価機関の終了後に解凍して、配布したキットと同じLotのキットで測定を行った。報告値と再測定値の比較を行って、キットのLot間差による定量値への影響を検証した。

6.5 室間共同試験用試料の評価

室間共同試験用試料の各試料はそれぞれ次のように評価を行った。試料1は陰性試料として取り扱い、疑陽性について評価した。また、試料2と3は、試料4の定量値に対する回収率を算出し、抽出法ごとに評価した。

（倫理面への配慮）

本研究では実験動物と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. 室間共同試験用試料の安定性評価

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4.0 °C、最低温度2.4 °C、最高温度6.3 °Cであり、保存期間中の冷蔵庫内の温度の大きな変動は確認されなかった。保存した試料を調製後56、112日に抽出して評価した結果、試料調製後112日まで試料4のQC Materail小麦の分析値の変動は確認されなかった(図1)。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11.3%、FASTKITで2.8%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での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³⁾。評価期間中の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。また、試料2と試料3の回収率の低下も確認されなかったため、調製した試料は室間共同試験の評価期間中に安定であることが確認された(図1)。

2. 室間共同試験

2.1. 評価結果の解析

各評価機関から報告を受けた試料4の報告値をヒストグラムおよび正規確率プロットによって評価結果の分布の確認を行った(図2、表2、3)。次に、評価結果からロバスト平均値とロバスト標準偏差を算出して、z-スコアによる評価を行った(図3)。FASPEKとFASTKITの各キットでz-スコアが-3未満の機関が1機関ずつ確認された。

2.2 Lot間差の検証

配布したキットといずれかが異なるLotのキットによって評価を実施された評価機関には試料抽出液の送付を依頼し、当研究所で配布したキットと同じLotのキットにより測定を行った。各評価機関と当研究所の測定値を図4に示す。評価機関23-27、29では測定値に有意な差異は確認されなかった。一方で、z-スコアによる評価で外れ値として確認された評価機関18、22の測定値は有意な差異が確認された。これらのことから、室間共同試験においてキットのLot間差による影響は少なかったと考えられた。一方で、外れ値が確認された機関では試料の抽出操作もしくは試料抽出液の保存の際の操作によって、測定値が影響を受けた可能性があることが示唆された。

2.3 室間共同試験用試料の評価

2.3.1 陰性試料

陰性試料としてカカオパウダーのみを含む試料1について評価を行った。全ての評価機関で試料はN.D.(検出限界0.31 µg/g未満)と判定された。

2.3.2 通常法

カカオパウダーとQC Material小麦を当重量混合した試料2について、通常の抽出法によって評価を行った。試料2の回収率のロバスト平均と標準偏差はFASTKITで12.8 ± 2.3%、FASPEKで16.1 ± 4.7%となり、通常の抽出液ではカカオ中のPACによって回収率の低下が確認された(表4)。

2.3.3 改良抽出法

カカオパウダーとQC Material小麦を当重

量混合した試料3について、PVP K15を1% (w/v) 含む改良抽出法によって評価を行った。試料3の回収率のロバスト平均と標準偏差はFASTKITで $92.7 \pm 12.1\%$ 、FASPEKで $96.0 \pm 8.4\%$ と改良抽出法による回収率の改善が確認された(表4)。前年度に検討を行った通り、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て測定阻害に対する効果が確認された。

E. 結論

室間共同試験による改良抽出法の評価結果は通知法¹に示された定量検査法の評価基準である50-150%の回収率と25%以下の室間精度を満たしており、室間共同試験によって改良抽出法の妥当性が確認された。

本評価結果は今後のアレルギー物質のスクリーニング検査法の改定の際には、適切な科学的根拠として活用できると考えられる。

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、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：精度管理用試料を利用した特定原材料(小麦)の測定阻害評価と改良抽出法についての検討：日本食品化学学会 第28回総

会・学術大会, 5月19~20日、東京ビックサイト(東京都), 2022.

2) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製：AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION第25回年次大会, 7月15日、東京大学 弥生講堂・一条ホール(東京都), 2022.

3) 村上太郎、村野晃一、山崎朋美、柿本葉、若栗忍、高取聡、角谷直哉、渡辺卓穂：特定原材料(小麦)の改良抽出法の評価に向けた室間共同試験用試料の調製：第59回全国衛生化学技術協議会年会, 10月31日~11月1日、キングスカイフロント川崎(神奈川), 2022.

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 アレルゲン関係)

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

3) 桑原香織 他, 食衛誌 60, 113-117 (2019)

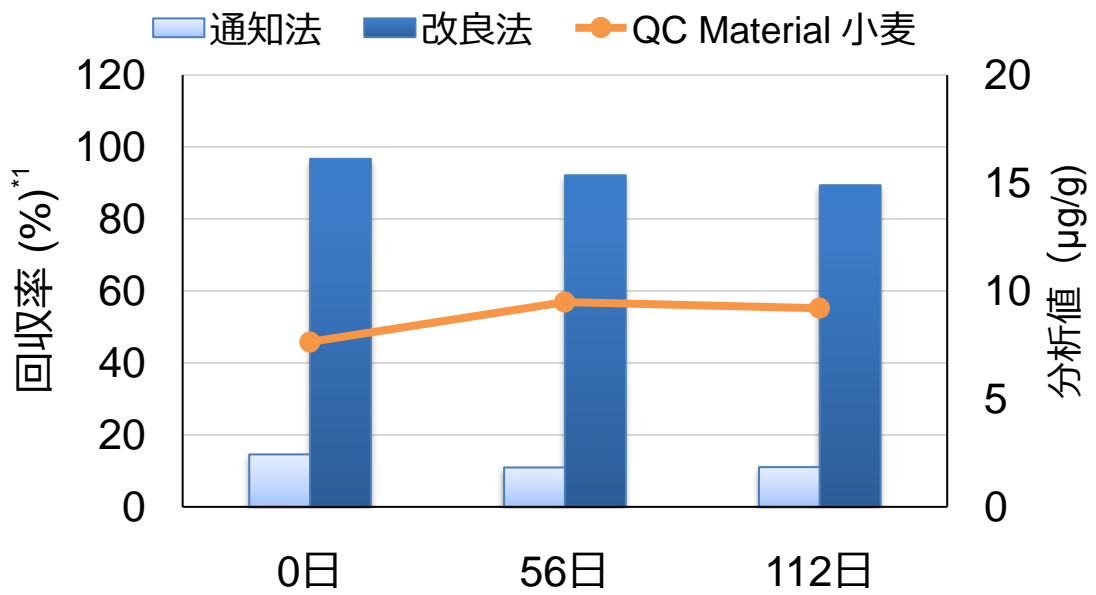
以下 图表

表1 室間共同試験用試料の調製法

番号	試料区分	試料	配合割合
1	陰性試料	カカオパウダー	1 g
2	通常法	カカオパウダー	0.5 g
		QC Material小麦	0.5 g
3	改良抽出法	カカオパウダー	0.5 g
		QC Material小麦	0.5 g
		Polyvinylpyrrolidone K15 ^{*1}	0.19 g
4	試験室間評価	QC Material小麦	0.5 g

*1 東京化成工業製 平均分子量10000

a) FASPEK



b) FASTKIT

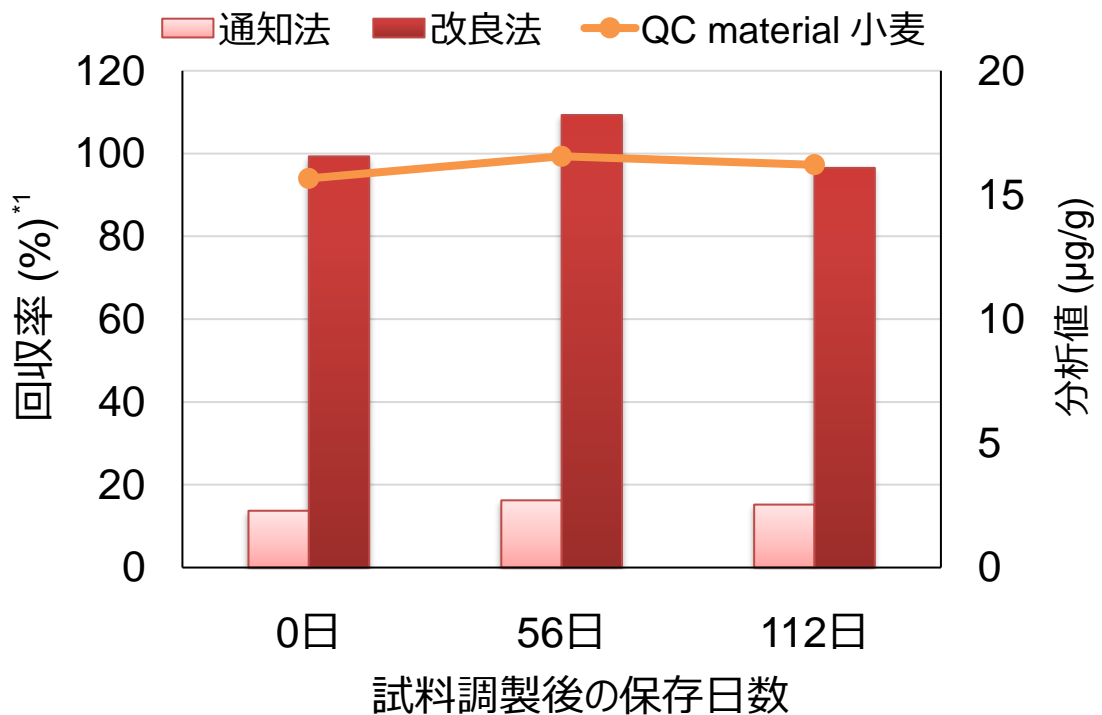


図1 室間共同試験用試料の安定性評価

*1 QC Material小麦の分析値と各試料の採取量から算出した回収率

a) FASPEK

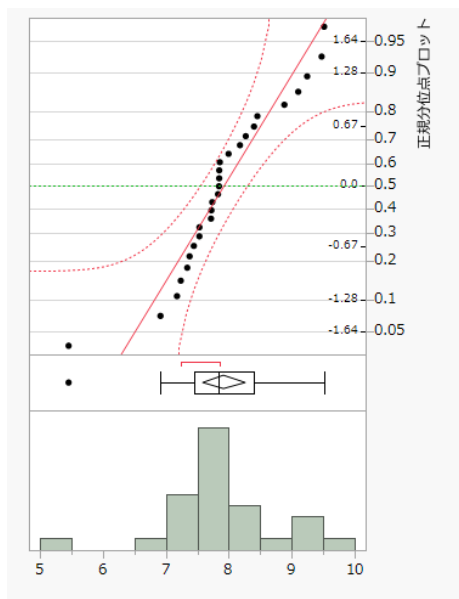


表2 FASPEKによる評価の統計量

ロバスト平均値	7.940
ロバスト分散	0.514
ロバスト標準偏差	0.717
変動係数(%)	9.032
第1四分位数	7.467
中央値	7.846
第3四分位数	8.380
最大値	8.997
最小値	6.884

b) FASTKIT

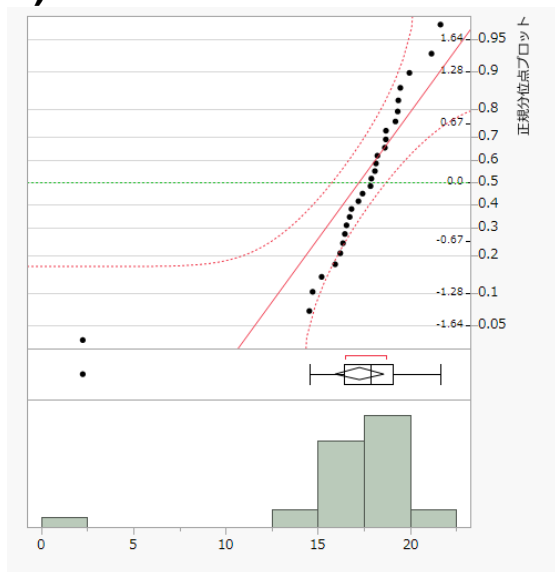


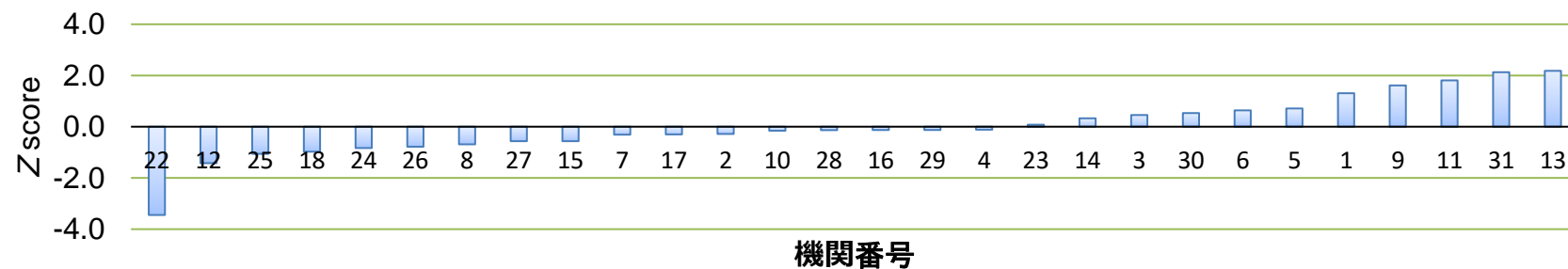
表3 FASTKITによる評価の統計量

ロバスト平均値	17.634
ロバスト分散	3.728
ロバスト標準偏差	1.931
変動係数(%)	10.950
第1四分位数	16.386
中央値	17.876
第3四分位数	19.076
最大値	20.478
最小値	14.790

図2 試料4 (QC Material小麦) の分析値の確率分布^{*1}

^{*1} 試料4の平均値のヒストグラムと箱ひげ図および正規確率プロット

a) FASPEK



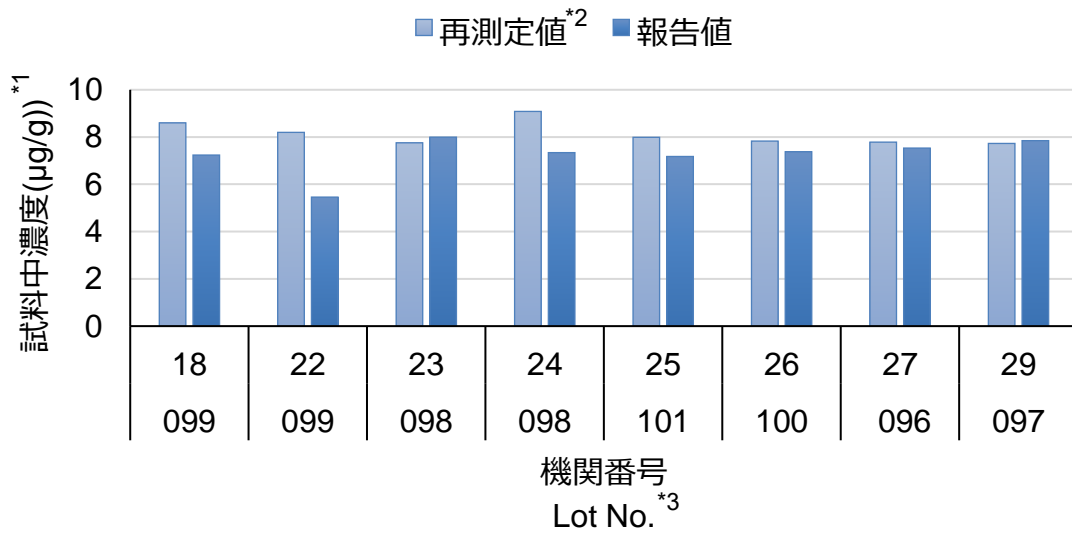
b) FASTKIT



図3 各評価機関の試料4(QC Material小麦)のz-スコア*1

*1 HuberのH15法によるロバスト平均値とロバスト標準偏差から算出

a) FASPEK



b) FASTKIT

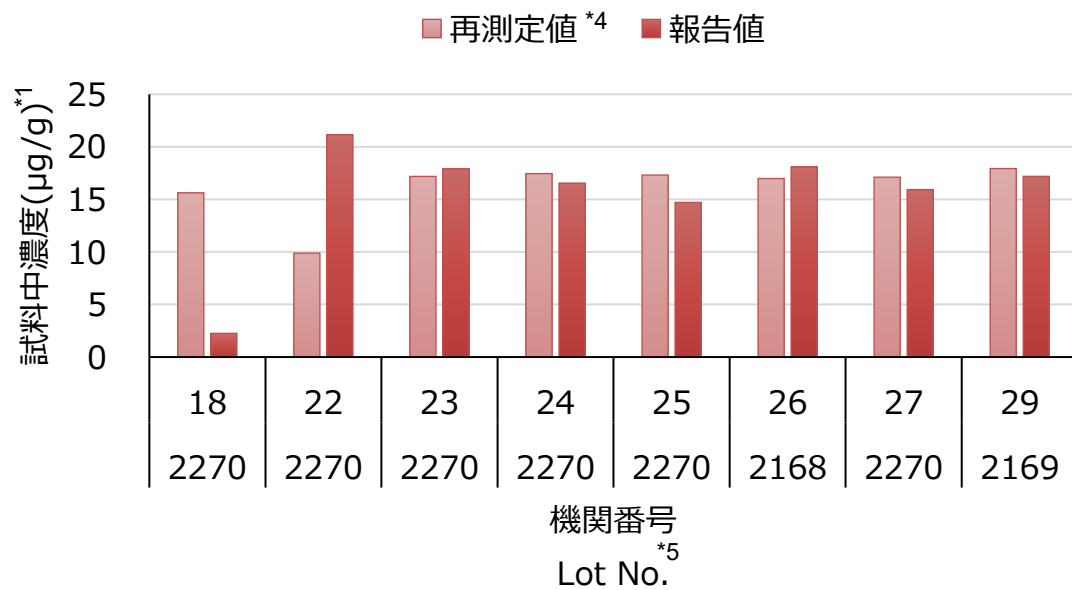


図4 キットのLot間差についての評価

- *1 試料4 (QC Material小麦) の分析値の平均
- *2 試料抽出液をFASPEK (Lot No. 22FESFGD099) で再測定した分析値
- *3 各評価機関で使用されたFASPEKのLot番号の下3桁
- *4 試料抽出液をFASTKIT (Lot No. FKEW2169) で再測定した分析値
- *5 各評価機関で使用されたFASTKITのLot番号の下4桁

表 4 室間共同試験用試料の評価結果

キット	試料 1 陰性試料		試料 2 通常法		試料 3 改良抽出法	
	含有量*1	回収率*2	含有量*1	回収率*2	含有量*1	回収率*2
	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)
FASPEK	N.D.	N.A.*3	1.3 ± 0.4	16.1 ± 4.7	7.6 ± 0.7	96.0 ± 8.4
FASTKIT	N.D.	N.A.*3	2.3 ± 0.4	12.8 ± 2.3	16.4 ± 2.1	92.7 ± 12.1

*1 各試料のロバスト平均値とロバスト標準偏差

*2 試料 4 (QC Material 小麦) の分析値と各試料の採取量から算出した回収率

*3 検出限界以下のため算出不可

補足資料

令和4年度試験室間共同試験研究協力機関

岩手県環境保健研究センター
青森県環境保健センター
一般財団法人 東京顕微鏡院 食と環境の科学センター
一般財団法人 食品環境検査協会
日東富士製粉株式会社
テーブルマーク株式会社
杉並保健所
川崎市健康安全研究所
森永製菓株式会社
株式会社ファスマック
千葉県衛生研究所
株式会社 生活品質科学研究所 中央研究所
日本生協連 商品検査センター
株式会社 三遠食品分析センター
愛知県衛生研究所
豊田市保健所
一般財団法人 食品分析開発センターSUNATEC
滋賀県衛生科学センター
オリエンタル酵母工業株式会社 長浜工場 長浜ライフサイエンスラボラトリー
株式会社 生活品質科学研究所 関西総合検査センター
京都市衛生環境研究所
神戸市健康科学研究所
兵庫県立健康科学研究所
岡山県環境保健センター
福岡市保健環境研究所
新潟市衛生環境研究所
宮城県保健環境センター