

特定原材料(卵)測定の厚生労働省通知 ELISA 法 の複数機関による評価研究

(平成 15 年 2 月 4 日受理)

穂山 浩^{*1, †} 五十鈴川和人^{*1} 張替直輝^{*1} 渡邊裕子^{*2} 飯島 賢^{*3}
 山川宏人^{*3} 水口岳人^{*4} 吉川礼次^{*4} 山本美保^{*5} 佐藤秀隆^{*5}
 渡井正俊^{*5} 荒川史博^{*6} 小笠原 健^{*6} 西原理久香^{*7} 加藤 久^{*7}
 山内 淳^{*8} 高畑能久^{*9} 森松文毅^{*9} 豆越慎一^{*10}
 村岡嗣朗^{*10} 本庄 勉^{*10} 渡邊敬浩^{*1} 和久井千世子^{*1}
 今村知明^{*11} 豊田正武^{*1, a} 米谷民雄^{*1}

Inter-laboratory Evaluation Studies of Notified ELISA Methods for Allergic Substances (Egg)

Hiroshi AKIYAMA^{*1, †}, Kazuto ISUZUGAWA^{*1}, Naoki HARIKAI^{*1}, Hiroko WATANABE^{*2}, Ken IJIMA^{*3},
 Hirohito YAMAKAWA^{*3}, Yamato MIZUGUCHI^{*4}, Reiji YOSHIKAWA^{*4}, Miho YAMAMOTO^{*5},
 Hidetaka SATO^{*5}, Masatoshi WATAI^{*5}, Fumihiko ARAKAWA^{*6}, Takeshi OGASAWARA^{*6},
 Rikuka NISHIHARA^{*7}, Hisashi KATO^{*7}, Atsushi YAMAUCHI^{*8}, Yoshihisa TAKAHATA^{*9},
 Fumiki MORIMATSU^{*9}, Shinichi MAMEGOSHI^{*10}, Shiroo MURAOKA^{*10},
 Tsutomu HONJOH^{*10}, Takahiro WATANABE^{*1}, Chiseko WAKUI^{*1},
 Tomoaki IMAMURA^{*11}, Masatake TOYODA^{*1, a}
 and Tamio MAITANI^{*1}

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;
 *²Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 1-3-1, Shitamachiya, Chigasaki-shi, Kanagawa
 253-0087, Japan; *³Nisshin Seifun Group Inc.: 5-3-1, Tsurugaoka, Oi-machi, Iruma-gun, Saitama
 356-8511, Japan; *⁴Japan Inspection Association of Food and Food Industry Environment: 3-7-4,
 Kyobashi, Chuo-ku, Tokyo 104-0031, Japan; *⁵Japan Food Research Laboratories: 6-11-10, Naga-
 yama, Tama-shi, Tokyo 206-0025, Japan; *⁶San-Ei Gen F.F.I., Inc.: 1-1-11, Sanwa-cho, Toyonaka-
 shi, Osaka 561-8588, Japan; *⁷Showa Sangyo Co., Ltd.: 2-20-2, Hinode, Funabashi-shi, Chiba 273-
 0015, Japan; *⁸National Institute of Health and Nutrition: 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo
 162-8636, Japan; *⁹Nippon Meat Packers, Inc.: 3-3, Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646,
 Japan; *¹⁰Morinaga Institute of Biological Science: 2-1-1, Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama
 230-8504, Japan; *¹¹University of Tokyo Hospital: 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655,
 Japan; ^aPresent Address: Jissen Woman's University: 4-1-1, Osakaue, Hino, Tokyo 191-8510,
 Japan; †Corresponding author)

Inter-laboratory evaluation studies were conducted for the notified ELISA methods for allergic substances (Egg). Standard extracts of egg spiked in extracts of sausage, sauce, cookie, bread and cereal at a level of 5-20 ng/mL as the sample solution were analyzed in replicate in 10 laboratories. Coefficients of variation (CVs) of all three ELISA methods using an Egg Protein ovalbumin ELISA Kit (ovalbumin kit), an Egg Protein ovomucoid ELISA Kit (ovomucoid kit) and a FASTKIT™ Egg ELISA kit (Egg ELISA kit) were mostly less than 10%. Mean recoveries of the standard extract of egg were over 40% in the three ELISA methods. Repeatability relative standard deviations of egg standard solution in five food extracts were in the ranges of 18.7-25.5%, 18.6-41.8%, 21.3-43.3% for the ovalbumin kit, the ovomucoid kit and the Egg ELISA kit, respectively. Reproducibility relative standard deviations of egg standard solution in five food extracts were 16.8-35.1%, 19.6-35.8%, 24.7-51.1% for the ovalbumin kit, the ovomucoid kit and the Egg ELISA kit, respectively. The detection limits of all the ELISA methods were 4-5 ng/mL in sample solutions. These results suggested that the notified ELISA methods are reliable and reproducible for the inspection of egg protein levels in extracts of sausage, sauce, cookie, bread and cereal.

(Received February 4, 2003)

Key words: 卵 egg; 特定原材料 allergic substances; 酵素免疫測定法 ELISA method; 卵白アルブミン ovalbumin; 複数機関の評価研究 inter-laboratory evaluation studies

緒言

近年、アレルギー物質を含む食品に起因する健康危害が多く見られるようになり、表示による情報提供の必要性が高まっていた。平成13年4月の食品衛生法関連法令の改定に伴い、平成14年4月より本格的にアレルギー物質を含む食品の表示が義務づけられた。厚生労働省では食物アレルギー研究班の調査報告の発症数、重篤度などから検討し、省令で定める特定原材料5品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）については、すべての流通段階での表示を義務づけることとなった¹⁾。

これに伴い平成13年度より厚生労働省食品表示研究班では「アレルギー表示検討会」と「特定原材料検出法検討会」が組織された。食品表示研究班のアレルギー表示検討会では表示方法に関して検討され、特定原材料などの総タンパク質として数 $\mu\text{g/g}$ または数 $\mu\text{g/mL}$ 濃度レベル以上含有する食品には表示が必要であり、表示の必要性を判断する上で同一レベル以下まで検出可能な検出法が不可欠とした^{2), 3)}。これを受けて特定原材料検出法検討会では、産官学の支援研究機関が協力して、省令で定めた特定原材料5品目について検出法の検討を行った⁴⁾。平成14年11月6日には、特定原材料の表示の監視の目的で、特定原材料検出法検討会で開発および評価された検出法をもとに、厚生労働省医薬局食品保健部長通知として「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（食発第1106001号）が特定原材料5品目の検査法として公表された⁵⁾。本通知された検査法は、地方自治体あてにアレルギー表示の監視の目的に示されたものであり、表示違反の場合は、この検査法の結果と製造記録に基づき、行政処分することになる。本検査法は、2種類のELISA法により定量し、判定が困難な場合のみ、ウエスタンブロット法で確認することになる。それゆえ、2種類のELISA法で測定された値の信頼性を把握しておくことが、誤判定を回避するために重要であると考えられる。

これらのことを踏まえ、本通知を公表する以前に、ELISA法の標準化に向け、真度、精度の評価を行うことが重要な課題であった。本研究は、通知に示された卵測定

ELISA法である(株)森永生科学研究所製モリナガ卵白アルブミンキット⁶⁾および日本ハム(株)製FASTKIT™卵エライザキット⁷⁾と、通知に示されていないが同じく卵測定ELISA法である(株)森永生科学研究所製モリナガオボムコイドキット⁶⁾の真度および精度を評価するために、10機関によるInter-laboratory Evaluationを実施したので報告する。

実験方法

1. 試料

ソーセージおよびソースは、アレルゲン除去食品として市販されているものを日本ハム(株)から入手した。クッキーは、アレルゲン除去食品として市販されているものを(株)森永製菓から入手した。パンおよびシリアルは、東京都内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。

2. 試薬

水は、日本ミリポア(株)製Millipore Milli-Q Synthesis A10で精製した超純水を用いた。0.45 μm マイクロフィルターは、Advantec Toyo社製DISMIC-25CSを用いた。他の試薬は、すべて特級品を用いた。(株)森永生科学研究所製モリナガ卵白アルブミンキット（卵白アルブミンキット）および同モリナガオボムコイドキット（オボムコイドキット）は、(株)森永生科学研究所から提供された。日本ハム(株)製FASTKIT™卵エライザキット（卵エライザキット）は日本ハム(株)から提供された。

3. 機器

国立医薬品食品衛生研究所（国立衛研）で食品の抽出液調製およびELISA測定時に用いた機器を以下に示す。ホモジナイザーは、日本精機(株)製エースホモジナイザーAM-3あるいはAM-11、卓上遠心機はフナコシ(株)製KR-1000、タッチミキサーはヤマト(株)製MT-51、冷却遠心器はBeckman社製Avantii HP25およびトミー社製MRX-150、マイクロプレートリーダーはMolecular Devices社製Emaxを使用した。マイクロプレートウォッシャーは大日本製薬(株)製S8/12Jを用いた。

† 連絡先

*1 国立医薬品食品衛生研究所：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

*2 神奈川県衛生研究所：〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎市下町屋1-3-1

*3 (株)日清製粉グループ本社：〒356-8511 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡5-3-1

*4 (財)食品環境検査協会：〒104-0031 東京都中央区京橋3-7-4

*5 (財)日本食品分析センター：〒206-0025 東京都多摩市永山6-11-10

*6 三栄源エフ・エフ・アイ(株)：〒561-8588 大阪府豊中市三和町1-1-11

*7 昭和産業(株)総合研究所：〒273-0015 千葉県船橋市日の出2-20-2

*8 (独)国立健康栄養研究所：〒162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1

*9 日本ハム(株)中央研究所：〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原3-3

*10 (株)森永生科学研究所：〒230-8504 横浜市鶴見区下末吉2-1-1

*11 東京大学医学部付属病院：〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1

^a 現住所：実践女子大学 〒191-8510 東京都日野市大坂上7-3-1

4. 標準溶液の調製

標準溶液に用いる卵は、日本ハム(株)から提供された白色レグホン種(産卵鶏)の新鮮卵より調製した。凍結乾燥した新鮮卵の粉末 30 mg に 0.05% BRONIDOX-K (AM-RESCO 社製)を含む phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) 30 mL を加え、スターラーにて室温で 3 時間抽出した。10,000×g, 30 分間で遠心後、その抽出液を 0.45 μm マイクロフィルター処理し、タンパク質定量を行い、100~300 μg/mL の範囲に入るよう同抽出緩衝液で調製した。調製後、標準抽出液は 4°C で保存した。タンパク質定量は、バイオラッド(株)製 BCA protein assay kit を用いた。

5. 抽出溶液の調製

ソーセージ、ソース、クッキー、パン、シリアル各 5 食品の1包装単位に含まれる可食部全体を試料とした。試料の全量をホモジナイザーで十分に破碎し、均質混和して調製試料とした。以下、調製試料から下記の抽出操作に従って抽出溶液を調製した。

調製試料 3 g に対し、PBS (0.05% BRONIDOX-K 含有)を 27 mL の割合で加え、ホモジナイザーを用いて 10,000 rpm で 5 分間かくはん操作を行った。かくはん終了後、カップ内容物の全量をポリプロピレン製遠沈管に移し、低温(4°C)で 3,000×g の条件で 30 分間遠心し、遠心後に得られる上清をろ過し抽出溶液とした。

6. 10 機関による Inter-laboratory Evaluation Studies

Inter-laboratory Evaluation Studies は IUPAC のプロトコル⁸⁾を参考に、試料: 5, 試験機関数: 10, 繰返し数(ウェル数): 3 (各濃度につき同様の操作を 2 回調製して 2 回試行するが、1 回試行はウェル 3 回測定 of 平均値で示す)で実施した。すなわち、ソーセージ、ソース、クッキー、パン、シリアル各 5 品目について、国立衛研で調製した各同一抽出液、各キット、100~300 μg/mL に調製した標準溶液、添加用卵未知濃度標準溶液 3 種類および実験プロトコルを 10 分析機関(神奈川県衛生研究所、(株)日清製粉グループ本社 QE センター、(財)食品環境検査協会、(財)日本食品分析センター多摩研究所、三栄源エフ・エフ・アイ(株)、昭和産業(株)総合研究所、(独)国立健康・栄養研究所、日本ハム(株)中央研究所、(株)森永生科学研究所、国立衛研)に送付して行った。その後、各分析機関において、おのおのが所有するマイクロプレートリーダー、プレートウォッシャーなどの機器を用いて添加回収試験を実施した。卵白アルブミンおよびオボムコイドキットを用いた添加回収実験の添加濃度は、ソーセージ、ソース、クッキー、パン、シリアル各抽出液に、測定溶液の最終濃度が 5 ng/mL と 20 ng/mL となるよう標準溶液をそれぞれ添加した。同様に卵エライザキットでは、測定溶液の濃度が 5 ng/mL と 10 ng/mL となるように標準溶液をそれぞれ添加した。また各機関における各キットの検量線作成時、各濃度を 2 回調製し試行した。1

回につきウェル 3 回測定で得られた平均値および変動係数(CV)を求め、分析結果は国立衛研で集計し、統計処理を行った。

7. 各キットの操作法

1) 卵白アルブミンキットおよびオボムコイドキット

すべての試薬は、キットに付属の試薬を用いた。抽出溶液 990 μL に試験機関には濃度未知の添加用卵標準溶液 3 濃度(測定溶液濃度として各 0 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL となる溶液)をそれぞれ 10 μL ずつ添加した後、よく混合し、測定溶液とした。測定溶液ならびに検量線作成用に調製した標準溶液のおのおのを 1 ウェル当たり 100 μL ずつ加え、各溶液がウェル様に広がるように軽く振とうし、モジュール用ふたを取り付けた後、室温で 60 分間静置した。静置後、各溶液を捨て、1 回当たり 250~300 μL の洗浄液を用い、6 回繰り返しの洗浄操作を行った。洗浄後、1 ウェル当たり 100 μL の酵素標識抗アルブミン抗体溶液(キット付属)あるいは酵素標識抗オボムコイド抗体溶液(キット付属)を加え、ウェル様に広がるよう軽く振とうし、ふたをした後に、室温で 30 分間静置した。静置後、酵素標識抗体溶液を捨て、洗浄液を用いて 6 回の洗浄操作を行った。洗浄後、1 ウェル当たり 100 μL の酵素基質溶液(TMB 溶液)(キット付属)を加え、ウェル様に広がるよう軽く振とうした後に、室温、遮光条件下で 10 分間静置した。静置後、反応停止液 100 μL を加え、発色反応を停止させた。発色反応停止後、マイクロプレートリーダーを用い、主波長 450 nm, 副波長 600~650 nm の条件で測定を行い、450 nm で得られた吸光値から、副波長で得られた吸光値を差し引いた測定値を計算し、各濃度の標準溶液に対して得られる測定値より作成した検量線に基づき、測定溶液中に含まれる卵総タンパク質の濃度を求めた。なお、同一の実験を 3 ウェル併行で行い、各ウェルから得られた値を平均化した。

2) 卵エライザキット

食品抽出液各 990 μL に、試験機関には濃度未知の添加用卵未知濃度標準溶液 3 種類(測定溶液濃度として各 0 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL となる溶液)をそれぞれ 10 μL ずつ添加し混合した。次に、これらの溶液を 50 μL 採って緩衝液 450 μL とよく混合し、測定溶液とした。抗体固相化プレート中、使用するウェルを 1 回当たり 250~300 μL の洗浄液を用いて 5 回繰り返しの洗浄した後に、測定溶液、ならびに検量線作成用に調製した標準溶液のおのおのを 1 ウェル当たり 100 μL ずつ加えた。モジュール用ふたを取り付け各溶液がウェル様に広がるように軽く振とうした後に、室温で 60 分間静置し、各溶液を捨て、洗浄液を用いて 5 回のウェル洗浄操作を行った。洗浄後、1 ウェル当たり 100 μL のビオチン結合抗卵タンパク抗体溶液(卵エライザキット付属)を加え、ふたをしてウェル様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で 60 分間静置し、ビオチン結合抗卵タンパク抗体溶液を捨て、洗浄液を用いて 5 回のウェル洗浄操作を行った。次

いで、1 ウェル当たり 100 μ L の酵素-アビジン結合物溶液 (卵エライザキット付属) を加え、ふたをしてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で 30 分間静置し、酵素-アビジン結合物溶液を捨て、洗浄液を用いて 5 回の洗浄操作を行った。洗浄後、1 ウェル当たり 100 μ L の発色溶液 (卵エライザキット付属) を加え、ふたをしてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で 20 分間静置した。次いで、1 ウェル当たり 100 μ L の反応停止液 (卵エライザキット付属) を加え発色反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用い、主波長 450 nm、副波長 600~650 nm の条件で測定を行い、450 nm で得られた吸光値から、副波長で得られた吸光値を差し引いた測定値を計算し、各濃度の標準溶液に対して得られた測定値より作成した検量線に基づき、測定溶液中に含まれる特定原材料由来のタンパク質の濃度を求めた。なお、同一の実験を 3 ウェル併行で行い、各ウェルから得られた値を平均化した。

8. 実験結果の統計処理

各食品について得られた回収率 (10 機関 \times 2 濃度 \times 5 食品抽出液) の値を AOAC の統計処理マニュアル⁹⁾ を参考に解析し、各食品ごとに回収率の平均値、併行再現性お

よび室間再現性を求めた。棄却検定は AOAC のマニュアルに従って行った。すなわち、Cochran 検定により異常な分散を示した分析機関を棄却した後、Grubbs 検定により異常な平均値を示した分析機関を棄却する。Grubbs 検定により累積棄却機関が全機関の 2/9 以下であった場合、再度 Cochran 検定を行い、続いて Grubbs 検定を行う。このサイクルを繰り返して、累積棄却機関が全機関の 2/9 を超えた場合は、超える直前でサイクルを終了する。また最終的に棄却が発生しなかった場合は、その時点でサイクルを終了し、残った機関により統計量を計算した。併行再現性の相対標準偏差 (RSD_i) は、実験機関内の再現性を示す値で、 $100 \text{ Sr}/\text{mean}$ ($\text{Sr} = (\sum \text{di}^2/2\text{L})^{1/2}$, di: 各実験機関における 2 回施行での値の差, L: 機関数, mean: 平均値) の式で算出される。室間再現性の標準偏差 (RSD_R) は、実験機関間の再現性を示す値で、 $100\{(\text{Sd}^2 + \text{SR}^2)/2\}^{1/2}/\text{mean}$ ($\text{Sd}^2 = \sum (\text{Ti} - \text{T})^2 / \{2(\text{L} - 1)\}$, Ti: 各実験機関における 2 回施行での値の和, T: Ti の平均値) の式で算出される。検出限界の判断は、日本薬局方の基準から $>\mu \pm 3.3\sigma$ (μ : ブランク溶液の吸光値の平均値, σ : ブランク溶液吸光値の標準偏差) に従った。定量限界の判断は、同じく日本薬局方の基準から $>\mu \pm 10\sigma$ (μ : ブランク溶液の吸

Table 1. CVs of Determination of Egg Standard Solution by Using Egg Protein ELISA Kit (Ovalbumin)

Conc. (ng/mL)	0		1		2		4		8		16		32		64	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Laboratory																
1	3.1	0.8	2.6	0.7	3.0	0.4	2.9	1.7	1.3	1.3	0.7	0.8	0.9	0.7	1.5	0.4
2	4.3	8.3	1.0	5.9	2.1	1.9	1.6	2.4	1.6	4.4	2.0	1.4	3.6	1.0	1.4	4.8
3	4.4	5.0	1.3	2.1	2.5	1.4	0.7	1.6	36.6	0.4	19.7	1.7	14.4	0.9	4.7	2.8
4	3.4	4.1	3.9	0.9	2.5	4.7	3.3	1.5	1.7	2.7	3.0	2.4	3.0	1.4	5.0	2.6
5	4.3	1.8	5.8	4.3	5.9	3.4	4.0	3.1	1.3	4.2	3.6	4.5	2.3	2.4	0.3	1.9
6	2.5	5.9	3.7	0.9	3.4	4.1	4.2	4.2	2.7	0.3	1.6	10.8	2.1	4.6	4.2	1.8
7	3.1	1.6	3.2	1.6	3.2	1.4	2.3	2.1	1.1	2.0	15.5	1.4	0.7	1.9	2.1	2.1
8	1.1	2.4	1.7	3.4	1.9	1.0	1.3	1.8	1.5	2.7	0.7	1.4	1.1	1.2	1.0	0.9
9	3.9	15.3	3.9	3.5	2.5	3.5	2.4	3.9	0.9	1.4	2.1	2.0	3.9	1.3	0.6	1.3
10	2.1	15.0	0.9	5.8	2.0	5.1	2.1	3.0	7.7	5.6	4.7	4.0	6.2	1.2	2.2	0.9
Mean (%)	3.2	6.0	2.8	2.9	2.9	2.7	2.5	2.5	5.7	2.5	5.4	3.0	3.8	1.7	2.3	2.0

Data represent mean values of 3 wells

Table 2. CVs of Determination of Egg Standard Solution by Using Egg Protein ELISA Kit (Ovomucoid)

Conc. (ng/mL)	0		1		2		4		8		16		32		64	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Laboratory																
1	5.4	4.8	6.0	2.5	6.7	3.6	5.1	3.3	1.3	1.8	1.6	3.9	2.6	1.1	3.2	1.7
2	16.0	4.3	16.2	6.3	13.5	7.7	6.2	8.9	3.1	15.1	5.5	7.0	4.8	8.0	5.6	7.9
3	58.0	13.5	7.5	6.9	2.1	5.3	3.5	3.1	2.5	5.9	4.2	7.5	3.7	2.5	4.2	1.3
4	3.6	2.2	10.8	5.4	9.4	7.1	10.8	11.0	8.5	8.2	1.7	3.9	2.6	1.9	0.8	4.2
5	20.1	13.7	43.5	5.0	38.1	3.0	24.3	5.4	8.8	8.8	6.6	5.1	7.6	4.5	3.4	3.1
6	8.9	9.9	13.9	9.0	6.4	4.7	6.4	13.7	2.9	1.8	4.4	1.8	6.1	2.9	5.6	0.4
7	8.5	2.6	5.6	4.8	7.5	7.9	4.1	7.8	7.6	8.0	1.8	2.9	0.6	2.2	2.8	0.6
8	5.3	4.6	2.6	3.4	7.3	4.1	5.1	4.3	7.2	5.3	5.9	3.9	4.3	3.1	3.8	1.8
9	12.4	17.6	17.8	5.4	14.4	9.6	13.3	17.8	5.7	2.0	1.4	1.8	1.4	1.9	4.0	2.3
10	0.0	13.4	4.5	16.3	16.0	16.1	1.8	12.1	7.2	8.6	2.8	4.3	2.2	2.1	0.6	3.8
Mean (%)	13.8	8.7	12.8	6.5	12.1	6.9	8.1	8.7	5.5	6.5	3.6	4.2	3.6	3.0	3.4	2.7

Data represent mean values of 3 wells

Table 3. CVs of Determination of Egg Standard Solution by Using FASTKIT™ Egg ELISA Kit

Conc. (ng/mL)	0		0.5		1		5		25		100	
	Laboratory	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
1	5.1	4.4	12.4	4.0	3.7	4.5	5.2	5.8	7.3	6.9	37.5	3.8
2	5.2	4.0	5.9	14.2	4.4	2.3	3.5	2.8	1.4	1.7	2.9	6.4
3	5.4	3.6	8.0	9.3	6.1	15.8	8.2	8.1	5.0	6.4	8.7	4.0
4	11.4	4.9	18.4	2.2	7.6	8.9	7.1	5.5	8.8	7.1	3.3	4.7
5	4.3	4.4	15.6	1.9	3.4	4.6	5.5	2.9	5.7	15.4	4.8	7.9
6	3.9	6.1	15.5	18.8	3.0	6.7	4.9	4.2	8.4	1.9	2.4	2.4
7	7.3	7.1	9.2	18.8	4.7	8.5	7.0	3.4	2.2	3.0	4.9	5.0
8	10.4	3.5	25.0	13.9	9.0	7.7	6.0	6.2	4.0	2.6	2.7	3.6
9	3.8	3.0	22.7	19.6	1.8	4.1	1.9	15.0	2.5	3.1	1.2	2.9
10	4.1	3.4	5.0	10.3	2.8	3.8	3.9	3.0	6.9	2.9	9.0	3.5
Mean (%)	6.1	4.5	13.8	11.3	4.6	6.7	5.3	5.7	5.2	5.1	7.7	4.4

Data represent mean values of 3 wells

光値の平均値, σ , ブランク溶液吸光値の標準偏差) に従った。

結果および考察

1. 同時再現性の検証

卵白アルブミンキットの各機関における検量線作成時の各濃度 (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ng/mL) の 1 回試行につきウェル 3 回測定で得られた変動係数 (CV), 各濃度の CV 値の 2 回試行の平均値を Table 1 に示す。2 機関で 8 ng/mL および 16 ng/mL の濃度領域で高い CV 値を示した以外は、全体を通して 10% 以下の CV 値であり、良好な同時再現性が示された。オボムコイドキットの同様の結果を Table 2 に示す。卵白アルブミンと同様に、数機関が低濃度で高い CV 値を示した以外は、全体を通しておおむね 10% 以下の CV 値であり、良好な同時再現性が示された。国立衛研で行った実験において卵白アルブミンキットおよびオボムコイドキットともに検出限界は 4 ng/mL, 定量限界は 8 ng/mL であった。

卵エライザキットの各機関における検量線作成時の各濃度 (0, 0.5, 1, 5, 25, 100 ng/mL) の 1 回試行につきウェル 3 回測定で得られた CV, 各濃度の CV 値の平均値を

Table 3 に示す。0.5 ng/mL における CV 値が 10% を超えるものがあったが、1 ng/mL 以上の濃度では、おおむね 10% 以下の CV 値を示し、良好な同時再現性を示した。国立衛研で行った実験において、卵エライザキットの検出限界は 5 ng/mL で、定量限界は 10 ng/mL から 25 ng/mL であった。

2. 添加回収実験

卵白アルブミンキットを用いて各機関で行ったデータを統計解析し、棄却後に残った機関の添加回収率の平均値, RSD_r および RSD_R を Table 4 に示した。なお、10 機関で分析した結果、各食品抽出液における測定溶液の測定値は、おおむね 0 ng/mL から 2 ng/mL の範囲にあり、5 ng/mL を超える値はなく、測定溶液濃度から換算した元の食品の卵含有量は、すべて 100 ng/g 以下であった。各食品抽出液からの平均回収率は、ソースにおける測定溶液濃度 (20 ng/mL) の回収率 70.9% からソーセージにおける測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 105.2% の範囲にあり、ELISA の結果としてはほぼ満足できる結果であったと思われる^{10), 11)}。回収率の RSD_r は 18.7~25.5% であり、 RSD_R は 16.8~35.1% であった。測定溶液濃度から判断して、いずれの RSD_R の値も、室間精度を検証する

Table 4. Results of Inter-laboratory Validation for Recovery Test of Egg Standard Solution Using Egg Protein ELISA Kit (Ovalbumin)

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Retained laboratories	Accuracy Recovery (%)		Precision	
			Mean	Bias	RSD_r	RSD_R
Sausage	5	10	105.17	5.2	23.7	28.3
	20	10	91.7	-8.3	20.2	22.6
Sauce	5	9	82.3	-17.7	24.7	26.0
	20	8	70.9	-29.1	19.0	16.8
Cookie	5	9	100.7	0.7	26.9	35.1
	20	10	90.1	-9.9	18.7	20.7
Bread	5	9	80.6	-19.4	24.5	30.7
	20	9	85.8	-14.2	19.6	22.5
Cereal	5	9	87.3	-12.8	25.5	26.1
	20	8	84.8	-15.3	21.9	17.7

Table 5. Results of Inter-laboratory Validation for Recovery Test of Egg Standard Solution Using Egg Protein ELISA Kit (Ovomucoid)

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Retained laboratories	Accuracy Recovery (%)		Precision	
			Mean	Bias	Repeatability (%) RSD _r	Reproducibility (%) RSD _R
	20	8	91.2	-8.8	41.8	33.8
Sauce	5	7	65.0	-35.0	41.0	35.8
	20	8	57.1	-42.9	34.2	30.7
Cookie	5	8	166.9	66.9	24.0	20.1
	20	8	103.7	3.7	18.6	20.0
Bread	5	8	107.4	7.4	32.4	31.9
	20	8	87.8	-12.2	19.5	20.3
Cereal	5	8	107.9	7.9	30.4	28.6
	20	8	89.2	-10.8	22.7	19.6

Table 6. Results of Inter-laboratory Validation for Recovery Test of Egg Standard Solution Using FASTKIT™ Egg ELISA Kit

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Retained laboratories	Accuracy Recovery (%)		Precision	
			Mean	Bias	Repeatability (%) RSD _r	Reproducibility (%) RSD _R
	10	8	44.7	-55.3	33.2	30.6
Sauce	5	8	48.9	-51.1	38.5	37.0
	10	8	46.0	-54.0	21.6	24.7
Cookie	5	8	47.7	-52.3	37.3	34.7
	10	8	44.7	-55.3	30.6	26.1
Bread	5	8	48.9	-51.0	21.3	32.3
	10	10	45.3	-54.7	36.2	36.8
Cereal	5	8	41.8	-58.2	43.3	51.1
	10	10	42.4	-57.6	36.6	36.0

指標の1つである Horwitz の式から計算される数値を下回っていた¹⁰⁾。

オボムコイドキットでの同様の結果を Table 5 に示した。10 機関で分析した結果、各食品抽出液の測定溶液の測定値は、おおむね 0 ng/mL から 2 ng/mL の範囲にあり、測定溶液濃度から換算した元の食品の卵含有量は、すべて 100 ng/g 以下であった。各食品抽出液からの平均回収率は、ソースにおける測定溶液濃度 (20 ng/mL) の回収率 57.1% からクッキーにおける測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 166.9% の範囲にあった。回収率の RSD_r は 18.6~41.8% であり、RSD_R は 19.6~35.8% であった。測定溶液濃度から判断して、おおむね RSD_R は Horwitz の式から計算される数値を下回っていた¹⁰⁾。卵アルブミンキットに比べ、ソーセージとクッキーで回収率が 100% 以上になるケースがあった。この理由として、ソーセージ中あるいはクッキー中の無添加抽出液が高い値を示さなかったことから、標準溶液と抽出液成分の相互作用により高い値を示す可能性が示唆された。また RSD_r が卵アルブミンキットに比べ高かった。

卵エライザキットでの同様の結果を Table 6 に示した。10 機関で分析した結果、各食品抽出液の測定溶液の測定値は、おおむね 0 ng/mL から 2 ng/mL の範囲にあり、

測定溶液濃度から換算した元の食品の卵含有量は、すべて 500 ng/g 以下であった。各食品抽出液からの平均回収率は、シリアル中の測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 41.8% からパン中の測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 48.9% の範囲にあった。回収率の RSD_r は 21.3~43.3% であり、RSD_R は 24.7~51.1% であった。測定溶液濃度から判断して、おおむね RSD_R は Horwitz の式から計算される数値を下回っていた¹⁰⁾。回収率結果は、卵白アルブミンキットおよびオボムコイドキットに比べ、低い傾向を示しているが、ほぼすべての食品で 40~50% の安定した回収率を示した。卵エライザキットは卵の複数のタンパク抗原に対するポリクローナル抗体を用いており、主要アレルゲンのほかにマイナーアレルゲンのタンパク質に対しても検出することを想定して構成されている。また未変性の抗原に対する抗体に加え、熱で変性した抗原に対する抗体もプレート上にコートされており、加工品への応用性を考慮している。しかし、卵エライザキットのポリクローナル抗体の中で、主要アレルゲン中で抗原性の高いエピトープを認識する抗体が多く存在するが、抗原性の低いエピトープを認識する抗体は、単一および精製抗原を認識する抗体より少ないと考えられる。そのため卵エライザキットの複数タンパク質に対する抗原性の高いエピトープを認識する抗体の中

には、食品抽出液成分の影響により、卵由来タンパク質との結合に妨害されやすい抗体があったと推察される。一方、卵白アルブミンキットおよびオボムコイドキットでは、それぞれ卵白アルブミンに対するポリクローナル抗体および卵白オボムコイドに対するポリクローナル抗体のみ使用しており、これらの抗体は、特定のタンパク質の多くのエピトープを認識する抗体の集団であり、今回使用した食品抽出液成分では妨害を受けにくいため、回収率が高かったと考えられる。

通知特定原材料(卵)の ELISA 法の妥当性を評価するために、ソーセージ、ソース、クッキー、パン、シリアル食品抽出液を用いて、10 機関による Inter-laboratory Evaluation Studies を実施した。その結果、卵白アルブミンキット、オボムコイドキット、ならびに卵エライザキットでは、試験した食品の抽出溶液において、ELISA 測定としては、実用上支障がない回収率および再現性が得られたと考えている^{11)~15)}。したがって、上記 3 種 ELISA 法は、特定原材料の卵の定量検査に有効であることが示唆された。

今回、著者らは特定原材料と指定された卵の ELISA キットにおける測定において、10 機関による分析法の真度・精度を初めて検証した。卵タンパク質の ELISA 法による複数機関による検証の報告はなく、試験機関内および試験機関間での変動を評価することは、衛生行政的な見地から、アレルギー表示制度の適正化を監視する上で、極めて重要であると考えられる。

謝 辞

本研究は、厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)「食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究」による。本研究に当たり、統計解析に関してご指導いただいた国立医薬品食品衛生研究所 食品部 松田りえ子室長に深謝いたします。またご指導、ご助言いただきました特定原材料検討会の協力研究者および支援研究者の諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Kanagawa, Y., Imamura, T., The labeling system of foods containing allergic substances and the detection methods. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, J-269-J-271 (2002).
- 2) Marui, E., Activities of the research group on "Labeling of food allergens." *Shokuhin Eisei Kenkyu (Food*

- Sanitation Research)*, **52**(5), 7-13 (2002).
- 3) Horiguchi, I., Research on "labelling of food allergens" —What kind of issues did we find out?—. *Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research)*, **52**(5), 15-24 (2002).
- 4) Akiyama, H., Toyoda, M., Outline of detection method of allergic substances. *Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research)*, **52**(6), 65-73 (2002).
- 5) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知 "アレルギー物質を含む食品の検査方法について" 平成 14 年 11 月 6 日, 食発第 106001 号 (2002).
- 6) Mamegoshi, S., Detection methods for allergic substances in foods by enzyme-linked immunosorbent assay (2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, J-277-J-279 (2002).
- 7) Takahata, Y., Detection methods for allergic substances in foods by enzyme-linked immunosorbent assay (1). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, J-275-J-277 (2002).
- 8) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).
- 9) Youden, W., Steiner, E. H. ed., "Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists", Arlington, Association of Official Analytical Chemists, 1975, p. 72-83. (ISBN 0-935584-15-3)
- 10) Pocklington, W. D., Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics. *Pure Appl. Chem.*, **62**, 149-162 (1990).
- 11) Bennett, A. G., Nelsen, C. T., Miller, M. B., Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in corn, wheat and pig feed: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **77**, 1,500-1,508 (1994).
- 12) Skerritt, H. J., Hill, S. A., Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **74**, 257-264 (1991).
- 13) Ohtsuka, T., Seguro, K., Motoki, M., Microbial transglutaminase estimation in enzyme-treated surimi-based products by enzyme immunosorbent assay. *J. Food Sci.*, **61**, 81-84 (1996).
- 14) Kech-Gassenmeier, B., Benet, S., Rosa, C., Hischenhuber, C., Determination of peanut traces in food by a commercially-available. *Food and Agricultural Immunology*, **11**, 243-250 (1999).
- 15) Yeung, M. J., Collins, G. P., Enzyme immunoassay for determination of peanut proteins in food products. *J. AOAC Int.*, **79**, 1,411-1,416 (1996).