

## 特定原材料（卵・乳）のスクリーニング検査における内部品質管理手法の検討

紀 雅美、村上太郎、工藤鮎子、昌山 敦、山野哲夫、清水 充

Study on the Internal Quality Control Methods of the Screening tests  
for Allergenic Substances (Egg and Milk)Masami KI, Taro MURAKAMI, Ayuko KUDO, Atsushi MASAYAMA,  
Tetsuo YAMANO, Mitsuru SHIMIZU

## Abstract

Internal quality control (IQC) is the inevitable requirement for production of reliable data. In Japan, the determination of allergic proteins in foods for regulatory purpose performs with notified ELISA method, and it is less established how to control the quality of the data with respect to these methods.

By analyzing allergic egg protein or milk protein in positive samples in five different days, protein concentration and its standard deviation were estimated for four kits. With two kits, however, estimated value of the interday variation was far large compared to the daily variation. In order to reduce interday variation, ovalbumin and casein were used as egg and milk proteins, respectively, and these proteins were spiked to the blank samples. The concentrations of these proteins in the spiked samples were quantified using added proteins per se as the calibrators. Ovalbumin and casein concentrations showed improved interday variation and it seemed possible to control the data of food allergens obtained with ELISA method by using spiked samples as control materials.

**Key words:** egg, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), food allergy, intermediate precision, internal quality control (IQC), milk

## I 緒言

食物アレルギーによる健康被害予防の見地から、食品衛生法に基づき平成13年4月よりアレルギー物質を含む食品の表示が開始され[1]、乳、卵、小麦、そば、落花生、えび、かこの7品目が特定原材料として表示が義務化されている[2]。そのため大阪市では、市内で製造・流通している食品の表示監視や検査を行い、不適正表示食品の排除に努めている。

特定原材料の検査は、平成22年9月10日消食表第286号消費者庁通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（以下、通知法とする）に基づいて行われる。最初にスクリーニング検査として市販のELISAキットを用いた定量検査を行う。ELISAとは

酵素標識した抗体あるいは抗原を用いて、標的とする物質を抗体抗原反応の特異性を利用し定量的に検出する手法である。一方、食品の理化学検査においては、内部品質管理(IQC)を実施することが求められている。具体的には、認証標準物質や管理試料を用いて、検査対象品と併行して検査を行い、その分析値が認証値内または管理基準値内に収まることを確認する。管理基準から外れた場合、原因究明と改善措置を講じ、検査が精確に行われるように管理しなければならない[3]。しかしながら、ELISAキットを用いた検査に関するIQCの手法は十分に検討されているとはいえないのが現状である。そこで今回、特定原材料である卵および乳について定期的に検査を実施するにあたり、IQCの手法を検討した。

## II 実験方法

### 1) 卵および乳タンパク質の定量

定量に使用したキットは、日本ハム社製FASTKIT エライザ Ver.II 卵測定キット(N 卵キット)、森永生科学研究所社製モリナガ FASPEK 卵(卵白アルブミン)測定キット(M 卵キット)、日本ハム社製 FASTKIT エライザ Ver.II 牛乳測定キット(N 乳キット)、森永生科学研究所社製モリナガ FASPEK 牛乳(カゼイン)測定キット(M 乳キット)の4種類である。両キットの大きな違いは、M 卵キットは卵白アルブミン、M 乳キットはカゼインといった特定のタンパク質に対するポリクローナル抗体を用いているのに対し、N 卵キットおよびN 乳キットは複数の抗体を組み合わせることで複数のタンパク質を検出している点である[4]。

操作は通知法およびキットの説明書に従った。標準溶液(0~50 ng/mL) および試料から調製した測定溶液は各溶液につき3ウェル併行で測定を行った。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー(MTP300、コロナ電気(株)製)を使用し、主波長 450 nm、副波長 620 nm の吸光度を測定した。得られた吸光度より機器に付属のデータ処理ソフト MTP-SF5 によって4係数 logistic 解析により検量線を作成し、測定溶液中のタンパク質濃度(ng/mL)を算出した。得られたタンパク質濃度に、抽出および測定溶液調製時の希釈倍率(20×20=400倍)を乗じて試料中のタンパク質濃度( $\mu\text{g/g}$ )を求めた。

### 2) 陽性試料

特定原材料である卵または乳の検査を実施した試験品(大阪市内で入手した加工食品)の中から、N および M キットで基準値  $10\mu\text{g/g}$  と定量下限値 ( $0.3\mu\text{g/g}$ ) の中間値に近い濃度を示した食パンおよびクラッカーをそれぞれ卵および乳の陽性試料として用いた。各陽性試料はミルサー(800DG、岩谷産業(株)製)を用いて粉碎し、 $1\text{g}$  ずつポリプロピレン製試験管に分取して使用するまで冷凍保存した。

試料の均一性確認試験は、The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of

(Chemical) Analytical Laboratories[5]の方法を参考にして行った。すなわち  $2\text{g}$  ずつ分取した陽性試料から6個をランダムに選び、さらに各分取試料から分析用試料を2点採取した。合計12点について卵および乳タンパク質の定量を行い、各陽性試料  $1\text{g}$  あたりのタンパク質濃度( $\mu\text{g/g}$ )を用いて一元配置分散分析によりサンプル間の分散とサンプル内の分散を推定した。

### 3) 添加試料

あらかじめ4種類のキットを用いて、卵および乳タンパク質濃度が定量下限値 ( $0.3\mu\text{g/g}$ ) 未満であることを確認したポテトチップスを陰性試料とした。陽性試料と同様に、ミルサーにて均一に粉碎後、 $1\text{g}$  ずつ分取して冷凍保存した。

市販試薬の卵白アルブミン(SIGMA、Grade III)またはカゼイン(SIGMA、SAJ 一級)を  $20\mu\text{g/mL}$  になるように検体抽出液で調製したものを添加タンパク質とした。添加タンパク質は一定液量に分取して冷凍保存した。測定に際して添加タンパク質を解凍し、同じく解凍して常温に戻した陰性試料に卵白アルブミン溶液は  $5\mu\text{g/g}$ 、カゼイン溶液は  $10\mu\text{g/g}$  となるように加えてボルテックスミキサーで攪拌し、10分間以上静置したものを添加試料とした。

### 4) 試料測定における室内再現精度の推定

陽性試料中の卵または乳タンパク質濃度をELISAキットにて測定した際の精度を①同一抽出液を同一プレートの複数ウェルで測定したときのウェル間精度、②分取した複数のサンプルから得られた抽出液を同一プレートで測定したときの抽出間精度、③日を変えて測定したときの日間精度に分け、それぞれの大きさを推定した。すなわち同一抽出液の測定ウェル数を3、同一プレートで測定した抽出サンプル数を3、測定日の試行数を5とした枝分かれ実験計画に従って分取したサンプル計15個(45ウェル)の測定を行い、得られた測定結果を分散分析により解析して各精度の標準偏差( $SD_w$ 、 $SD_e$ 、 $SD_d$ )を求めた。室内再現精度の標準偏差( $SD_i$ )は各SDを合成して以下のように求めた。

Table1. Homogeneity test results of the positive samples

sample	kit	mean $\mu\text{g/g}$	RSD <sup>a</sup> %	n	F-ratio	F-crit <sup>b</sup>
bread (for egg)	N kit(egg)	3.25	6.1	6	0.19	4.39
	M kit(egg)	4.35	2.0	6	0.90	4.39
cracker (for milk)	N kit(milk)	3.08	5.7	6	4.23	4.39
	M kit(milk)	2.94	2.7	6	0.54	4.39

a Calculated from SD of sampling and SD of analysis

b Critical F value at  $p=0.05$

$$SD_t = \sqrt{SD_w^2 + SD_e^2 + SD_d^2}$$

添加試料測定における卵白アルブミンおよびカゼイン濃度測定値の  $SD_w$ 、 $SD_e$ 、 $SD_d$ 、 $SD_t$  は測定日の試行数を4とした以外は陽性試料と同様に求めた。

### III 結果と考察

#### 1) 陽性試料の均一性確認

卵陽性試料および乳陽性試料ともに、各2種類のキット測定において  $F_{-ratio}$  (サンプル間の分散/サンプル内の分散) は  $F_{-crit}$  (危険率0.05のときのF分布の棄却限界値) よりも低く、両陽性試料は均一であることが確認された(Table1)。

#### 2) 陽性試料における測定

陽性試料3点を併行して抽出を行いELISAキットにて測定するという一連の操作を日を変えて5回行い、測定日ごとの平均タンパク質濃度( $\mu\text{g/g}$ )をプロットした(Fig.1)。卵において、測定に用いたキットのロットはN

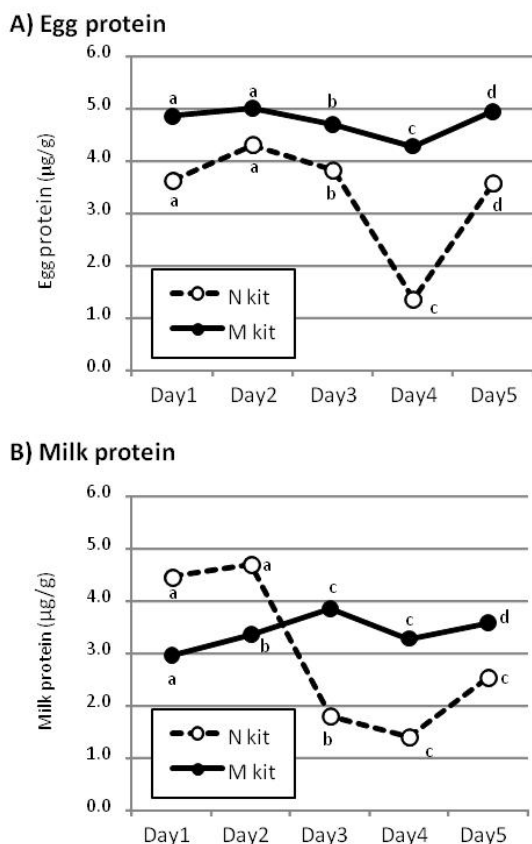


Fig.1 Egg and milk protein concentrations in positive samples determined with ELISA kits on five different days

Food samples with incurred analyte of egg protein (bread) and milk protein (cracker) were used. In every assay, three samples were extracted and every extract was assayed in three wells. Each symbol represents mean of nine wells measurements per plate per sample. Same letter indicates the same lot within every kit.

卵キットおよびM卵キットそれぞれ4ロット(Day1、2が同ロット)であった。M卵キットでは  $4.3 \sim 5.0 \mu\text{g/g}$  (平均  $\pm SD$ ;  $4.7 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ ) と Day1~5 を通じて比較的安定した数値が得られた。一方、N卵キットでは日間変動が大きく、 $1.4 \sim 4.3 \mu\text{g/g}$  ( $3.3 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ ) と測定値に最大3倍程度の開きがみられた(Fig.1A)。乳では、測定に用いたキットのロットはN乳キットで3ロット(Day1、2とDay4、5がそれぞれ同ロット)、M乳キットで4ロット(Day3、4が同ロット)であった。卵の結果と同様にM乳キットでは  $3.0 \sim 3.9 \mu\text{g/g}$  ( $3.4 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ ) となり、Day1~5 を通じて比較的安定した数値が得られたが、N乳キットでは  $1.4 \sim 4.7 \mu\text{g/g}$  ( $3.0 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$ ) と最大で3倍以上の開きがみられた(Fig.1B)。

陽性試料の測定に用いた各キット5プレートから得られた検量線のパラメータ(3ウェルの吸光度平均および相対標準偏差(RSD)、タンパク質濃度、タンパク質濃度の相対誤差)について比較した。検量線の同じ濃度で比較した場合、定量下限付近の濃度ではキットの種類により濃度の相対誤差やウェル間の併行精度に違いはみられるが、本研究で定量に使用した範囲(標準溶液濃度で  $3.13 \text{ ng/mL}$  以上、試料重量換算  $1.3 \mu\text{g/g}$  以上)に関しては各パラメータに大きな差はみられなかった。したがって、N卵キットおよびN乳キットにおける日間変動は、検量線のばらつきによるものではないと考えられた。

#### 3) 陽性試料における室内再現精度

陽性試料の測定結果を分散分析し、得られた分散より  $SD_w$ 、 $SD_e$ 、 $SD_d$  を推定し、これらを合成して  $SD_t$  を算

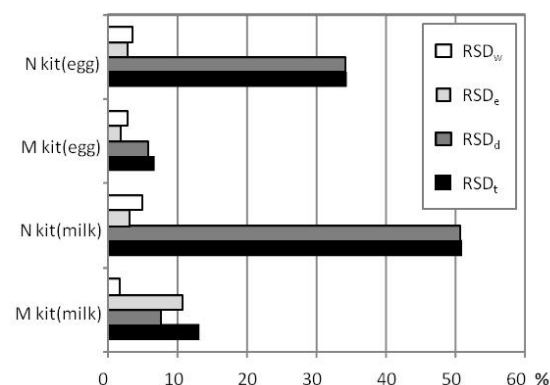


Fig.2 Contributions of variations in three factors to intermediate reproducibility of egg and milk protein determination in positive samples with ELISA kits

Data were analyzed by two way nested ANOVA to estimate the standard deviations of among wells ( $RSD_w$ ), among extractions ( $RSD_e$ ), and in the daily interval ( $RSD_d$ ) precisions. Standard deviation of intermediate reproducibility was calculated by combining these three values ( $RSD_t$ ). For the sake of comparison between two kits, data are expressed as percent to the corresponding mean concentrations of five days determinations.

出した。キット間での比較のため、それぞれの総平均値に対する相対標準偏差 ( $RSD_w$ ,  $RSD_e$ ,  $RSD_d$ ,  $RSD_t$ ) として Fig.2 に示した。  $RSD_t$  は N 卵キット、M 卵キット、N 乳キット、M 乳キットの順に 34%、6.8%、51%、13% であり、M キットに比較して N キットで高い値を示した。内訳は  $RSD_d$  の寄与が大きく、N 卵キット、N 乳キットともに  $RSD_t$  の 98% 以上を占めていた。

本検査において日間変動に寄与する要因としては、抽出効率、ELISA キット測定における検出抗体溶液濃度や発色溶液濃度、反応時間、反応温度、検量線などの日によるばらつきが考えられる。この中で検出抗体溶液濃度や発色溶液濃度、あるいはそれらの反応時間や反応温度については、同一プレートで標準溶液と

試料測定溶液を一度に反応させるので日間変動の主たる要因としては考えにくい。また検量線の影響は、4 種類のキットではほぼ同等であると考えられた。一方、N 乳キットにおいて 1 つの抽出液を、2 ロットの ELISA キットを用いて測定を行ったところ、含有量に 2.5 倍程度の開きがみられた。したがって日間変動の要因としてキットのプレート(ロット)間での反応性の違いが寄与している可能性が考えられた。

#### 4) 添加試料における測定

市販の ELISA キットを用いているため、プレート間の反応性の違いをコントロールすることは不可能である。そこで、プレート間の変動を低減でき、常に一定の値を得られるものとして、添加試料を用いることにした。実際には卵および乳共通の陰性試料であるポテトチップスに、卵白アルブミン(食品重量換算  $5\mu\text{g/g}$ 、測定溶液中の濃度  $12.5\text{ng/mL}$ )あるいはカゼイン(食品重量換算  $10\mu\text{g/g}$ 、測定溶液中の濃度  $25\text{ng/mL}$ )を加えた添加試料を調製し、ELISA キットによる測定を行った。

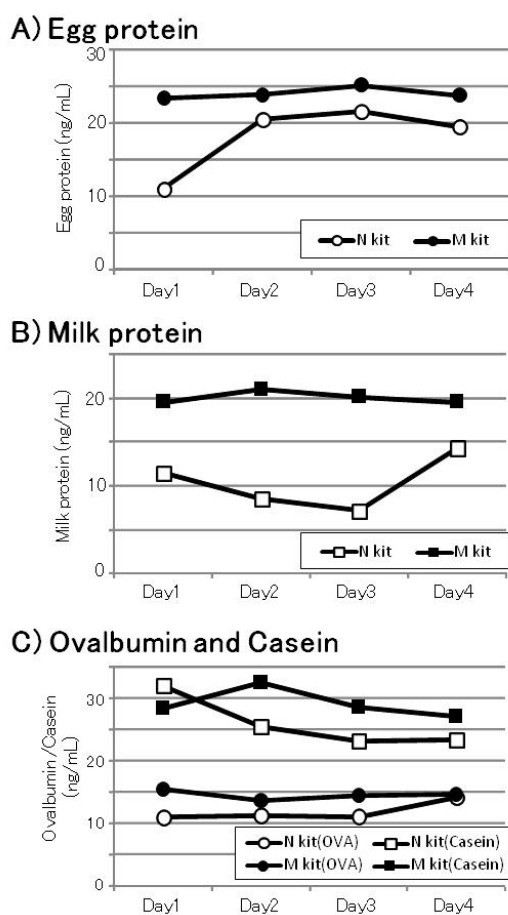
卵白アルブミン添加試料中の卵タンパク質濃度は、卵白アルブミン溶液自身の測定値を用いて卵白アルブミン濃度として求めた。データは示していないが、予め卵白アルブミン溶液の 2 倍希釈系列を N 卵キットあるいは M 卵キットで測定し、両キットにおいて卵白アルブミン溶液濃度と卵タンパク質濃度が比例関係にあることを確認した。卵白アルブミン添加試料では、測定溶液中の卵白アルブミン濃度の理論値は  $12.5\text{ng/mL}$  になる。卵白アルブミン添加試料の測定に際しては同一プレートで  $12.5\text{ng/mL}$  卵白アルブミン溶液を同時に測定し、両者の濃度を卵タンパク質として求めたのち、それらの比を用いて添加試料測定溶液の卵白アルブミン濃度を下記の式を用いて算出した。

添加試料中の卵白アルブミン濃度 (ng/mL)

$$= \frac{12.5 \times \text{添加試料卵タンパク濃度 (ng/mL)}}{12.5\text{ng/mL 卵白アルブミン溶液の卵タンパク濃度 (ng/mL)}}$$

乳に関しても、N 乳キットおよび M 乳キットにおいてカゼイン溶液と乳タンパク質濃度が比例関係にあることが確認したうえで、カゼイン溶液濃度を  $25\text{ng/mL}$  とした以外は上記と同様に添加試料測定溶液のカゼイン濃度を算出した。

測定は陽性試料と同様、3 点併行して抽出を行い ELISA キットにて測定するという一連の操作を日を変えて 4 回行った。なお、ELISA キットは 4 種類とも測定ごとに異なるロットを使用した。Fig.3A および Fig.3B に示すように通常の卵タンパク質濃度あるいは乳タンパク質濃度として定量した場合、M キットでは Day1~4 を通じてほぼ安定した測定値が得られたのに対し、N キットでは



**Fig.3** Protein concentrations in spiked samples determined with ELISA kits on four different days

Ovalbumin (OVA) and casein were used as egg and milk proteins respectively. These proteins were spiked to the blank sample (potato chips for both) to make the final concentration of 5 and  $10\mu\text{g/g}$ , respectively, and extracted for ELISA. Final dilutions rate was 1:400, thus theoretical concentrations were  $12.5$  and  $25\text{ng/mL}$  for OVA and casein, respectively. In Fig A and B, protein concentrations of spiked samples were determined using standard solutions of each kit as calibrators. In Fig C, protein concentrations were determined using ovalbumin or casein as a calibrator.

陽性試料と同様に大きな日間変動みられた。しかしながら、Fig.3Cに示すように、それぞれの添加タンパク質濃度として換算すると日間変動に軽減がみられ、特にNキットでは顕著であった。上記の式で表したように、添加タンパク質濃度は、添加試料中のタンパク質濃度を添加タンパク質で除することにより求められる。そのため両者の変動は相殺され、結果として日間変動が軽減したものと考えられる。

#### 5) 添加試料における室内再現精度

Fig.3Cに示した添加試料測定溶液の卵白アルブミンあるいはカゼイン濃度について、分散分析によりSD<sub>w</sub>、SD<sub>e</sub>、SD<sub>d</sub>を求め、これらを合成しSD<sub>i</sub>を算出した。陽性試料と同様にそれぞれの総平均値に対する相対値(RSD<sub>w</sub>、RSD<sub>e</sub>、RSD<sub>d</sub>、RSD<sub>i</sub>)として示した(Fig.4)。添加試料の卵白アルブミンあるいはカゼイン濃度より得られたRSD<sub>i</sub>は陽性試料のRSD<sub>i</sub>と比較して値が大きく軽減され、それはN卵キットおよびN乳キットで顕著であった。RSD<sub>i</sub>はN卵キット、M卵キット、N乳キット、M乳キットの順に13%、6.2%、17%、8.8%と4種類のキットを通じて20%未満となった。

AOACのガイドラインによると濃度レベルにおけるRSD<sub>i</sub>の目安は10μg/gでは6%、1μg/gでは8%とされている[6]。添加試料における卵白アルブミン溶液は5μg/g、カゼイン溶液は10μg/gであることを考えると、M卵キットおよびM乳キットにおけるRSD<sub>i</sub>は、ELISAという機器分析とは異なる分析手法により得られたRSD<sub>i</sub>でありながらもガイドラインの目安値と同程度の精度であった。

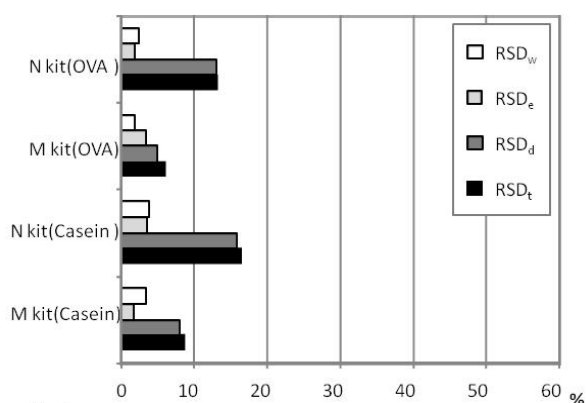


Fig.4 Contributions of variations in three factors to intermediate reproducibility of ovalbumin and casein determination in spiked samples with ELISA kits

Data were analyzed by two way nested ANOVA to estimate the standard deviations of among wells (RSD<sub>w</sub>), among extractions (RSD<sub>e</sub>) and the daily interval (RSD<sub>d</sub>) precisions. Standard deviation of intermediate reproducibility was calculated by combining these three values (RSD<sub>i</sub>). For the sake of comparison between two kits, data are expressed as percent to the corresponding mean concentrations of four day determinations.

このように添加試料の卵白アルブミンあるいはカゼイン濃度換算では、陽性試料に比べると、分析値が一定の範囲に収束し、RSD<sub>i</sub>が低減することが分かった。今後、データ数を増やして管理目標値の設定を行い、分析の評価を行うことが可能になるものと考ええる。

## IV 結論

市販ELISAキットを用いて、内部精度管理手法の検討を行った。陽性試料を用いた場合、実際のサンプルと同じ条件で併行再現精度を評価できるが、一部のキットでは日間変動が大きくIQCを行うのは困難であった。添加試料では、添加タンパク質をキャリアプレートとして用いることにより、プレート間での変動という因子の影響を低減させることができた。今後、管理目標値の設定および検査の評価が可能になると考えられる。

(本研究は平成22年度当研究所重点研究「食の安全性確保のための天然有害物質の系統的分析手法に関する研究」として実施した。)

## 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部企画課長および監視安全課長通知. アレルギー物質を含む食品に関する表示について. 平成13年3月21日食企発第2号および食監発第46号 (2001).
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長および厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知. 「アレルギー物質を含む食品に関する表示について」の一部改正について. 平成20年6月3日食安基発第0603001号および食安監発第0603001号 (2008).
- 3) Thompson M, Wood R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. Pure & Appl. Chem. 1995; 67(4): 649-666.
- 4) Matsuda R, Yoshioka Y, Akiyama H, Aburatani K, Watanabe Y, Matsumoto T. et al. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods. J. AOAC Int. 2006; 89(6): 1600-1608.
- 5) Thompson M, Wood R. The International harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. Pure & Appl. Chem. 1993; 65(9): 2123-2144.
- 6) AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Official methods of analysis of AOAC Int. 2002.