

ELISA 法による特定原材料(卵・乳・小麦)検査における測定の不確かさの推定

昌山 敦^{1),2)}、清田恭平^{1),2)}、村上太郎¹⁾、紀 雅美¹⁾、高取 聡²⁾、梶村計志²⁾、山野哲夫¹⁾

Uncertainty estimation of quantitative food allergen analysis by ELISA for internal quality control

Atsushi MASAYAMA^{1),2)}, Kyohei KIYOTA^{1),2)}, Taro MURAKAMI¹⁾, Masami KI^{1),2)}
Satoshi TAKATORI²⁾, Keiji KAJIMURA²⁾, and Tetsuo YAMANO¹⁾

Abstract

For the estimation of measurement uncertainty and following internal quality control (IQC) in food allergen analysis (egg, milk, and wheat), reference materials (RMs) mainly used in Europe and incurred materials spiked with allergic proteins were analyzed. Analysis was performed by two-laboratory trials using two validated ELISA kits in Japan. Results of RM for milk showed that relative standard deviations (RSDs) among laboratories, plates, samples and wells in the notified methods were below 10%. However, results of RMs for egg and wheat showed a broad range of RSDs and high measurement values compared to certified values. In recovery experiments with incurred materials, intra-laboratory evaluation showed low RSD values, whereas between laboratory RSD showed higher values of 8-34%. When the recovery rate was corrected with added standard concentration measured in the same plate, both trueness and measurement uncertainty were improved and fell into acceptable ranges with respect to all combinations of allergens and ELISA kits. Thus, corrected recovery rate could be useful for uncertainty estimation and IQC of food allergen analysis with ELISA.

Key words: ELISA, internal quality control, uncertainty

I 緒言

特定の食品に対してアレルギー体質を持つ消費者の健康危害発生を防止する観点から、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義務化された[1]。現在では特定原材料 7 品目(卵、乳、小麦、落花生、そば、えび、かに)の表示が義務化され、特定原材料に準ずるものとして 20 品目の表示が奨励されている[2]。大阪市においても、市内で製造・流通する食品の表示監視や検査を実施することにより不適正表示食品の排除に努めている。

食品に含まれる特定原材料 7 品目の検査は、平成 22 年 9 月 10 日消食表第 286 号「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」消費者庁次長通知(以下、通知法)に基づいて行われる。検査方法の一つとして、抗原抗体反応を利用した ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法が用いられ、同通知の別添 1、5 および 6 に基づいて性能が確認された市販検査キットを用いて定量的な評価を行っている。検査結果は、試料中の特定原材料等由来タンパク質含有量 10 µg/g を基準

値として判断される。しかしながら、本検査方法は食品試料中の夾雑物の影響を受けることがあり、偽陽性や偽陰性を示す場合もある。通知法の別添 4 において「標準品規格」が示されているが、高濃度標準溶液は販売されていないため、分析法の真度・精度を確認し、測定の信頼性を確保することが課題とされている。

食品分野における業務管理要領[3]では、「測定の不確かさの評価の検討に努めること」とされている。不確かさは分析システム全体の信頼性を表す非常に重要な数字であるが、標準品の課題などもあり、特定原材料の ELISA 分析に関する検討は従来あまりなされていない。本研究では、大阪市立環境科学研究所と大阪府立公衆衛生研究所の 2 試験室において市販の管理試料や標準品添加試料の繰り返し測定を行い、特定原材料の ELISA 分析における不確かさの推定を試みた。また、得られた不確かさを指標としての内部品質管理 (IQC) 手法について検討した。

1) 大阪市立環境科学研究所
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34
Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 大阪府立公衆衛生研究所
〒537-0025 大阪市東成区中道1丁目 3-69
Osaka Prefectural Institute of Public Health, 3-69, Nakamichi 1-chome, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

II 実験方法

1) 試料

Food Allergen Laboratory 社製アレルギー原材料分析管理試料(以下、管理試料)(卵、乳、小麦を含有)を(株)プラクティカルより購入して用いた。含有する原材料濃度は 10 µg/g のものを使用した。添加回収試験に用いた卵と乳の標準品は、通知法の別添 4 にならって調製した。小麦の標準品は Working Group for Prolamin Analysis and Toxicity より入手した PWG-Gliadin を使用した[4]。陰性試料としてはビーフン(米粉のみを含む)を用いた。

2) ELISA 法による特定原材料由来タンパク質の定量

定量検査には、日本ハム社製 FASTKIT エライザ Ver. III シリーズ(卵、乳、小麦)と森永生科学研究所社製モリナガ FASPEK エライザ II(卵(卵白アルブミン)、乳(カゼイン)、小麦(グリアジン))の 2 つの日本製検査キットを用い、操作は各検査キットに添付された説明書に従って行った。

試料は 3 点を併行して抽出し、1 試料分の抽出液を 3 ウェルで測定した。この操作を 2 試験室において、2 つの検査キットで 2 回ずつ行った。本論文中では、2 つの試験室および 2 つの検査キットを各々試験室 I、II およびキット A、B とする。

マイクロプレートリーダーは MTP300 あるいは SH-1200Lab(コロナ電気(株)製)を用い、主波長 450 nm、副波長 620 nm にて吸光度を測定した。検査キットに付属する標準溶液を用いて検量線を 4 係数 logistic 解析で作成し、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測定溶液調製時の希釈倍率を乗じて試料中タンパク質濃度 (µg/g) を求めた。

3) 試料測定における精度および不確かさの推定

試験室(× 2)、プレート(× 2)、サンプル(× 3)を 3 要因とする枝分かれ実験計画を用いて各要因における分散を推定し、各要因における精度の相対標準偏差(試験室間、 RSD_L ; プレート間、 RSD_P ; サンプル間、 RSD_S ; ウェル間、 RSD_W)を算出した。

また、得られた RSD より測定値の不確かさを以下の式で算出した。

① 1 プレート、1 サンプル、3 ウェル測定の平均値の不確かさ(u_1)

$$u_1 = \sqrt{\frac{RSD_P^2}{1} + \frac{RSD_S^2}{1} + \frac{RSD_W^2}{3}} \quad (式 1)$$

② 1 試験室、1 プレート、1 サンプル、3 ウェル測定の総平均値の不確かさ(u_2)

$$u_2 = \sqrt{\frac{RSD_L^2}{1} + \frac{RSD_P^2}{1} + \frac{RSD_S^2}{1} + \frac{RSD_W^2}{3}} \quad (式 2)$$

③ 1 プレート、3 サンプルを併行で測定した平均値の不確かさ(u_3)

$$u_3 = \sqrt{\frac{RSD_P^2}{1} + \frac{RSD_S^2}{3} + \frac{RSD_W^2}{3 \times 3}} \quad (式 3)$$

III 結果と考察

1) 管理試料を用いた測定の真度と精度

分析法の性能を確認する方法として認証値が決められている認証標準物質を利用する方法がある[5]。しかしながら、国内における特定原材料の検査に対応した認証標準物質は現時点で販売されていない。そのため、我々は Food Allergen Laboratory 社製の管理試料(卵、乳、小麦)を用い、本試料が検査における不確かさを推定するための試料として適しているか否かを検討した。本試料は特定原材料由来タンパク質濃度を海外製 ELISA キットにより値付けされており、欧米ではアレルギー分析における品質管理用試料として用いられている。

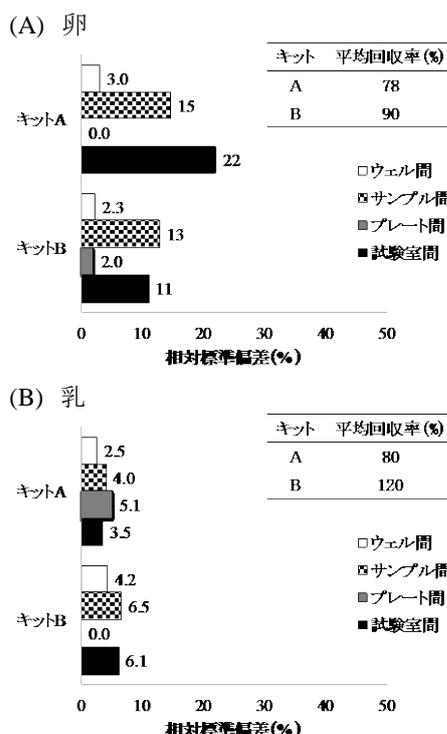


図1 管理試料の測定における平均回収率と各要因の変動

2 試験室において 2 プレート、1 プレートにつき 3 サンプル、1 サンプルにつき 3 ウェルで測定し、平均回収率および 3 要因の分散分析により要因別の精度を相対標準偏差で求めた。(A) 卵、(B) 乳

図 1 に示すように、卵および乳の管理試料では平均回収率が 78-120%であったが、小麦管理試料では測定時の吸光度値が 3.0 以上となり検量線範囲を大きく外れた。すなわち、今回使用した日本製の検査キットでは高感度に反応してしまうことが示唆された。精度においては、乳の測定ではいずれの項目も RSD として 10%未満であり、良好な再現性が得られた。しかし、卵ではサンプル間精度 RSD_sが 10%以上の値を示した(13-15%)。サンプル間精度の変動は試料の均一性によるのではないかと考えたが、ミルサーによる均一化を行っても精度のばらつきに変化はなかった。

以上のことから、今回用いた市販の管理試料を卵および小麦測定における不確かさの推定および IQC に用いることは困難であると判断した。

2) 添加試料を用いた測定の真度と精度

前述のように、本検査方法では添加回収試験に利用可能な高濃度標準溶液が販売されていない。そこで、通知法の規格にならって卵および乳の標準品を調製し、2 試験室において測定を行った。小麦の標準品は、調製に必要な小麦 14 銘柄を入手することが困難であったため、EU で販売されている標準品を購入して使用した。各標準品を総タンパク質濃度として終濃度 10 μg/g となるように陰性試料であるビーフンへ添加し、一連の操作にて測定を行った。

図 2 に示すように、卵および乳の平均回収率は 94-134%であったが、小麦の平均回収率は 257-373%であった。小麦測定時の吸光度値は検量線範囲を大きく外れたため、キットの検量線範囲内で測定するために測定溶液を 2 倍に希釈して測定した。今回使用した PWG-Gliadin は海外において標準物質(reference material)として利用されているが、キットに付属する抗体の種類によって反応性が異なると報告されている[6]。本研究では PWG-Gliadin に対して日本製のキットが高感度に反応したため、回収率が 200%以上になったと考えられた。添加試料を用いた測定では、卵、乳、小麦の全てにおいて試験室内では概ね安定した精度が保たれていたが、室間精度に大きな変動が示された。複数社から販売される ELISA キットで測定を行う場合、キットに用いられる抗体が異なるためにキット間で定量値が若干異なる。また、同一社から購入した検査キットでもロット(プレート)間によって吸光度や測定値が変化することも報告されている[7]。そうした条件下では、使用する検査キットにおいて、調製あるいは購入した標準品に含まれる特定原材料等由来タンパク質の測定値(濃度)を使用の都度に確認し、補正する必要があると考えた。そのため、我々は測定の都度、抽出液(抽出用溶液)に標準品を総タンパク質濃度として終濃度 10μg/g 添加したものを併行して分析することにし

た。陰性試料への添加回収試験から得られる測定値を以下の式により補正計算を行い、補正回収率を算出した。

補正回収率(%)

$$= \frac{\text{標準品を陰性試料へ添加して得られるタンパク質濃度}(\mu\text{g/g})}{\text{標準品を抽出液に添加して得られるタンパク質濃度}(\mu\text{g/g})} \times 100$$

その結果、卵、乳、小麦の全てにおいて各要因での変動は軽減され、特に試験室間精度のばらつきが大幅に軽減された(図 3)。補正計算により、キットにおけるプレート間の変動だけでなく、ロット間および日間の変動を全て包括することができる。そのため、補正計算を利用することで試験室間の精度を大幅に軽減することができた。補正計算の利用は IQC 法として最も適していることが示唆された。

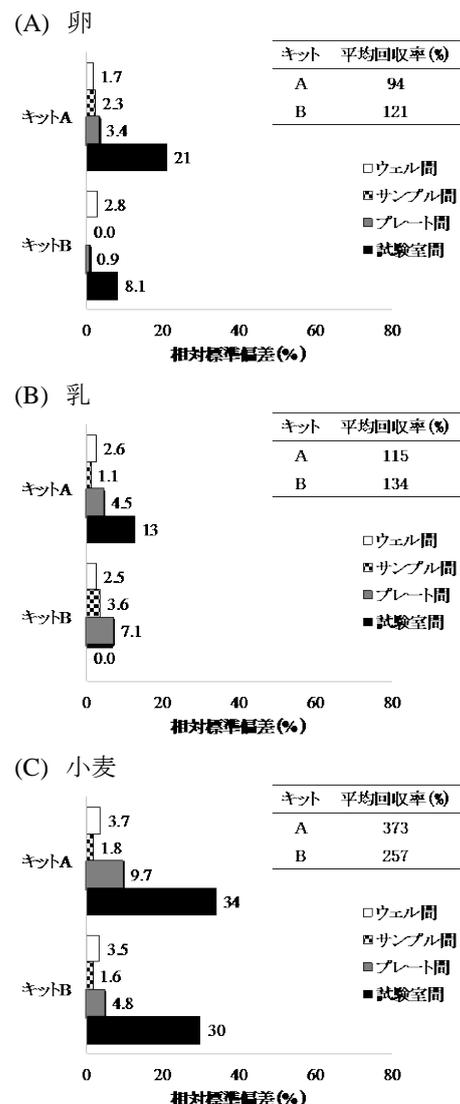


図 2 添加試料の測定における平均回収率と各要因の変動

2 試験室において 2 プレート、1 プレートにつき 3 サンプル、1 サンプルにつき 3 ウェルで測定し、平均回収率および 3 要因の分散分析により要因別の精度を相対標準偏差で求めた。(A) 卵、(B) 乳、(C) 小麦

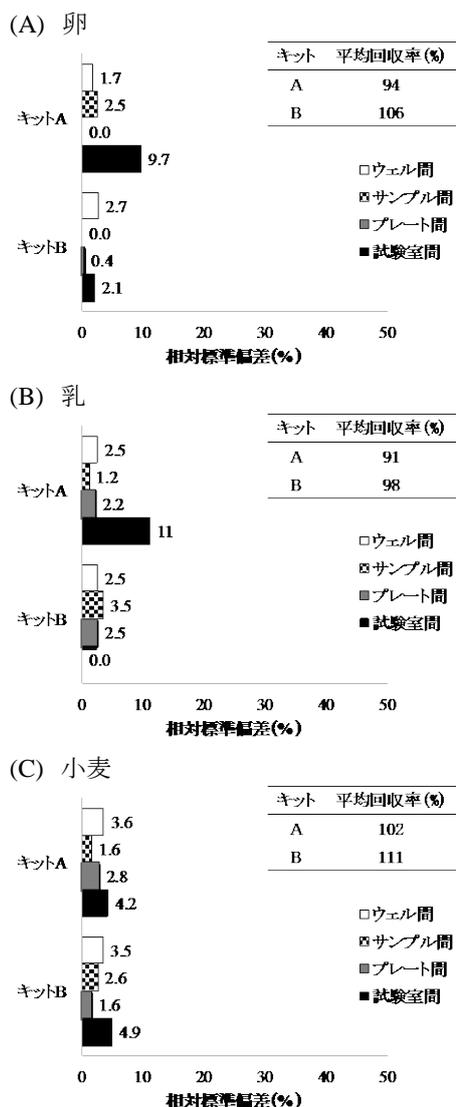


図 3 添加試料の測定と補正計算から得られる平均補正回収率と各要因の変動
2 試験室において 2 プレート、1 プレートにつき 3 サンプル、1 サンプルにつき 3 ウェルで測定し、平均補正回収率および 3 要因の分散分析により要因別の精度を相対標準偏差で求めた。(A) 卵、(B) 乳、(C) 小麦

3) ELISA 分析によるアレルゲン測定の不確かさの推定

近年、分析の信頼性を確保するため、分析値には不確かさを付随させることが求められ、食品分析においても報告が求められる傾向にある[8, 9, 10]。食品分析における測定の不確かさを推定するとき、試験室間共同試験によって得られる標準偏差を不確かさとして用いること (top-down 法) が妥当であると考えられている[11, 12]。本研究の 2 試験室において繰り返し測定された結果を補正計算し、得られる不確かさをを用いた IQC について検討した (表 1)。

通常、ある試験室において試料を 1 サンプル、3 ウェルで測定すると、その不確かさは u_1 として算出される。さらに、試験室の違いを加えると、その不確かさは u_2 となる。表 1 に添加回収試験における補正回収率の不確かさを示した。試験室の違いを加えることで不確かさは大きな値を示す。

通知法の別添 5 では、「導入時のバイアス、室内精度などの能力が保持されていることの証拠を示すためにも、適切な管理試料を用いて内部精度管理を実施することが望ましい」とされている。今回、標準添加試験における補正回収率は、いずれの試料とキットの組み合わせにおいても良好な真度と精度が得られることを明らかとした。したがって、毎回の検査において検体と併行して標準品添加試料を測定することにより、導入時の性能維持を評価することは可能である。

例えば、添加試料を 3 併行で測定した場合、下記の式で測定値の Z 値を算出し、これを指標として特定原材料検査の品質管理を行うことができると考えられる。

$$Z = \left| \frac{\text{目標平均回収率} - \text{測定平均値}}{\text{目標標準不確かさ}} \right|$$

表 2 に示すように、本研究により 1 試験室における IQC の目標値 (目標平均回収率および目標標準不確かさ) を示すことができた。現時点では結果の積み重ねが十分とは言えないが、特定原材料検査の ELISA 法における IQC 手法として補正回収率を Z 値で評価することが今後は期待できる。

表 1 添加試料の測定における補正回収率と測定の不確かさ

特定原材料	キット 試験室	A			B		
		I ^a	II ^a	I&II ^b	I ^a	II ^a	I&II ^b
卵	補正回収率 (%)	100	87	94	108	105	106
	測定の不確かさ (%)	1.6	3.2	9.5	2.2	1.9	2.8
乳	補正回収率 (%)	84	99	91	97	99	98
	測定の不確かさ (%)	3.0	2.3	10.5	1.8	6.1	4.5
小麦	補正回収率 (%)	99	105	102	107	115	111
	測定の不確かさ (%)	4.6	3.1	5.8	3.4	5.6	6.8

^a試験室 I、II における測定の不確かさは (式 1) より算出した。

^b試験室 I & II における測定の不確かさは (式 2) より算出した。

表 2 試験室における目標平均回収率と目標標準不確かさ

特定 原材料	キット	試験室 I		試験室 II	
		目標平均 回収率(%)	目標標準 不確かさ(%) ^a	目標平均 回収率(%)	目標標準 不確かさ(%) ^a
卵	A	100	0.9	87	1.9
	B	108	1.3	105	1.3
乳	A	84	2.8	99	1.6
	B	97	1.3	99	4.4
小麦	A	99	4.0	105	2.4
	B	107	3.0	115	3.0

^a試験室 I、II における目標標準不確かさは(式 3)より算出した。

IV 結論

特定原材料の検査法における不確かさの推定および IQC 手法について、欧米製の値付けされた管理試料や標準品添加試料を用いて検討した。

複数試験室における繰り返し測定の結果から不確かさを推定したところ、標準添加試験の補正值を用いることによって適正な真度と不確かさが得られ、補正回収率を Z 値で評価することにより試験室における分析値の品質管理を行える可能性を示唆した。

参考文献

- 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).
- 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. 平成 22 年 9 月 10 日消食表第 286 号. 最終改正平成 26 年 3 月 26 日消食表第 36 号(2015).
- 平成 20 年 7 月 9 日食安監発第 0709001 号:登録検査機関における製品検査の業務管理について別紙.
- R. van Eckert, E. Berghofer, P.J. Ciclitira, *et al.* Toward a new gliadin reference material-isolation and characterization. *Journal of Cereal Science* 2006;**43**: 331-341.
- 安井明美. 食品の分析データの信頼性確保システムの確立. *日本食品科学工学会誌*2007;**54**:356-361.
- Z. Bugyi, K. Török, L. Hajas, *et al.* Comparative study of commercially available gluten ELISA kits using an incurred reference material. *Quality Assurance and Safety of crops & foods* 2013;**5**(1):79-87.
- 紀雅美、村上太郎、工藤鮎子、昌山敦、山野哲夫、清水充. 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. *大阪市立環科研報告*2012;**75**:35-39.
- Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food. *CODEX, in CAC/GL 27-1997* (1997).
- Guidelines on measurement uncertainty. *CODEX, in CAC/GL 54-2004* (2004).
- Guidelines on estimation of uncertainty of results. *CODEX, in CAC/GL 59-2006* (2006).
- 山野哲夫. 食品分析における不確かさと criteria approach. *生活衛生*2007;**51**:156-159.
- 松田りえ子. 食品分析値の品質保証 *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* 2012;**130**:21-30.