

ノート

特定原材料(そば)測定の厚生労働省通知 ELISA 法確立のための複数機関による評価研究

(平成 16 年 6 月 10 日受理)

穂山 浩^{*1,†} 中村 健人^{*1, a} 張替直輝^{*1, b} 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} 坂田こずえ^{*1}
 今村 知明^{*11} 豊田 正武^{*1, c} 松田りえ子^{*1} 米谷 民雄^{*1}

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

Hiroshi AKIYAMA^{*1,†}, Kenjin NAKAMURA^{*1, a}, Naoki HARIKAI^{*1, b}, 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}, Kozue SAKATA^{*1}, Tomoaki IMAMURA^{*11}, Masatake TOYODA^{*1, c},
 Rieko MATSUDA^{*1} and Tamio MAITANI^{*1}

(^{*1}National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

^{*2}Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 1-3-1, Shimomachiya, Chigasaki, Kanagawa 253-0087, Japan; ^{*3}Nisshin Seifun Group Inc.: 5-3-1, Tsurugaoka, Oi-machi, Iruma-gun, Saitama 356-8511, Japan; ^{*4}Japan Inspection Association of Food and Food Industry Environment:

3-7-4, Kyobashi Chuo-ku, Tokyo 104-0031, Japan; ^{*5}Japan Food Research Laboratories: 6-11-10, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-0025, Japan; ^{*6}San-Ei Gen F.F.I., Inc.:

1-1-11, Sanwa-cho, Toyonaka-shi, Osaka 561-8588, Japan; ^{*7}Showa Sangyo Co., Ltd.:

2-20-2, Hinode, Funabashi-shi, Chiba 273-0015, Japan; ^{*8}National Institute of Health and

Nutrition: 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan; ^{*9}Nippon Meat Packers, Inc.:

3-3, Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646, Japan; ^{*10}Morinaga Institute of

Biological Science: Shimosueyoshi 2-1-1, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-8504, Japan; ^{*11}University of Tokyo Hospital: 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan;

^aPresent Address: FASMAC Co., Ltd., 5-1-3, Midorigaoka, Atsugi-shi, Kanagawa 243-0041,

Japan; ^bPresent Address: School of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University:

11-68, Kyuban-chou, Koshien, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, Japan; ^cPresent Address:

Jissen Woman's University: 4-1-1, Osakaue, Hino, Tokyo 191-8510, Japan;

[†]Corresponding Author)

† 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} 財団法人食品環境検査協会: 〒104-0031 東京都中央区京橋 3-7-4

^{*5} 財団法人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 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} 独立行政法人 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 神奈川県横浜市鶴見区下末吉 2-1-1

^{*11} 東京大学医学部附属病院: 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1

^a 現住所: (株)ファスマック: 〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3

^b 現住所: 武庫川女子大学薬学部: 〒663-8179 兵庫県西宮市甲子園九番町 11-68

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

Inter-laboratory evaluation studies were conducted for the ELISA methods for allergic substances (buckwheat). Extracts of snack, bun and udon spiked with buckwheat standard protein at a level of 5–20 ng/mL as sample solutions were analyzed in replicate at 10 laboratories. Coefficients of variation (CVs) of the ELISA methods using a Buckwheat Protein ELISA Kit (Buckwheat kit) and a FASTKIT™ Buckwheat ELISA kit (Buckwheat ELISA kit) were mostly below 10%. Mean recoveries of the buckwheat standard protein from the food extracts were over 40% in the two ELISA methods. Repeatability relative standard deviations of buckwheat standard protein in three food extracts were in the ranges of 6.8–78.5% and 5.0–33.9% for the Buckwheat kit and the Buckwheat ELISA kit, respectively. Reproducibility relative standard deviations of buckwheat standard protein in three food extracts were 11.9–69.5% and 16.5–34.1% for the Buckwheat kit and the Buckwheat ELISA kit, respectively. The detection limits of both ELISA methods were 1 ng/mL in sample solutions. These results suggest that the notified ELISA methods are reliable and reproducible for the inspection of buckwheat protein levels in extracts of snack, bun and udon.

(Received June 10, 2004)

Key words: そば buckwheat; 特定原材料 allergic substance; 酵素免疫測定法 ELISA method; 複数機関の評価研究 Inter-laboratory Evaluation Study

緒 言

近年、我が国ではアレルギー疾患の増加が社会問題となっている。特に食品を原因とするアレルギー（食物アレルギー）に関しては、小児のみではなく、成人においても増加の傾向があることが明らかとなってきた。そのため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、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⁾。特定原材料タンパク質を簡易で迅速に測定する手法としては、動物抗体を用いた酵素免疫測定法（ELISA法）が、各検査機関において統一的な測定結果を示す点で一般的に有効であると考えられた。そこで、特定原材料検討会では特定原材料タンパク質中の単一抗原あるいは精製した抗原を認識するELISA法である（株）森永生科学研究所製モリナガそばキット⁵⁾、および特定原材料タンパク質中のタンパク質全体を認識するELISA法である日本ハム（株）製FASTKIT™そばエライザキット⁶⁾が標準化を目指し検討された。特定原材料検討会で確立された検査法の試案が、厚生労働省でさらに吟味され、通知として検査法が公表されることになる⁷⁾。

これらのことを踏まえ、本通知を公表する以前に、ELISA法の標準化を検討し、さらには真度、精度の評価を行い、問題点があれば改良をすることが重要な課題であった。我々はすでに卵、牛乳、小麦のELISA法について複数機関による評価研究を行っている^{8)~10)}。

本研究は、通知に示されたそば測定ELISA法である（株）森永生科学研究所製モリナガそばキット⁵⁾および日本ハム（株）製FASTKIT™そばエライザキット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、検査法の標準化を検討したので報告する。

実験方法

1. 試 料

タマゴボーロ、黒糖まん、およびゆでうどんは東京都内のスーパーマーケットで購入したものを用いた。

2. 試 薬

試薬類は、既報と同様のものを用いた⁸⁾。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（株）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そば測定キット（そばキット）は、（株）森永生科学研究所から提供された。日本ハム（株）製FASTKIT™そばエライザキット（そばエライザキット）は日本ハム（株）から提供された。

3. 機 器

機器は、既報と同様のものを用いた⁸⁾。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（株）トミー製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。

4. 標準溶液の調製

標準溶液に用いるそばは、(株)ファスマックから提供された国内で一般的に流通している全粒粉等量混合物より調製した。そば粉末 300 mg に 0.05% BRONIDOX-K (AMRESCO 社製) および 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (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 0.8 μm マイクロフィルター処理し、タンパク質定量を行い、タンパク質濃度が 100~300 μg/mL の範囲に入るよう同抽出緩衝液で調整した。調製後、標準抽出液は 4℃ 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

タマゴボーロ、黒糖まん、ゆでうどんの各 3 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℃) 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 は既報と同様に行った⁸⁾。すなわち IUPAC のプロトコール¹¹⁾を参考に、試料: 3, 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 回行って 2 回試行するが、各試行はウェル 3 回測定の平均値で示す) で実施した。すなわち、タマゴボーロ、黒糖まん、ゆでうどんの 3 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、添加用そば未知濃度標準溶液 3 種類および実験プロトコールを 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。そばキットを用いた添加回収実験の添加濃度は、タマゴボーロ、黒糖まん、ゆでうどんの各抽出液に、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。同様にそば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では、各濃度を 2 回調製し測定した。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

そばキット

すべての試薬は、キットに付属の試薬を用いた。試験機関には濃度未知の添加用そば標準溶液 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 ずつ抽出溶液 990 μL に添加した後、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、各溶液がウェル内に一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 (キット付属) を用い、6 回繰返し洗浄操作を行った。洗浄後、1 ウェル当たり 100 μL の酵素標識抗そば抗体溶液 (キット付属) を加え、ウェル内に一様に広がるように軽く振とうし、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、ウェル内に一様に広がるよう軽く振とうした後、室温、遮光条件下で 10 分間静置した。静置後、反応停止液 (キット付属) 100 μL を加え、発色反応を停止させた後、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そば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。

そばエライザキット

試験機関には濃度未知の添加用そば未知濃度標準溶液 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 ずつ食品抽出液各 990 μL に添加し混合した。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 (キット付属) を用いて 5 回繰返し洗浄した後に、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内に一様に広がるように軽く振とうした後、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 のビオチン結合抗そばタンパク抗体溶液 (キット付属) を加え、ふたをしてウェル内に一様に広がるよう軽く振とうした後、室

温で 60 分間静置し、ビオチン結合抗そば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（キット付属）を加え、ふたをしウェル内に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。その後、1 ウェル当たり 100 μ L の発色溶液（キット付属）を加え、ふたをしてウェル内に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（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 405 nm、副波長 600～650 nm の条件で測定を行い、405 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

実験結果の統計処理は既報と同様に行った⁸⁾。すなわち各食品について得られた回収率（10 機関×2 濃度×3 食品抽出液）の値を AOAC の統計処理マニュアル¹²⁾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した。累積棄却機関数が全機関数の 2/9 以下であった場合、再度 Cochran 検定を行い、続いて Grubbs 検定を行った。このサイクルを繰り返して、累積棄却機関数が全機関数の 2/9 を超えた場合は、超える直前でサイクルを終了した。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_r) は、実験機関内の再現性を示す値で、

$100 \text{ Sr}/\text{mean} (\text{Sr} = (\sum di^2/2L)^{1/2}, di: \text{各実験機関における 2 回施行での値の差}, L: \text{機関数}, \text{mean}: \text{平均値})$ の式で算出された。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、 $100 \{(\text{Sd}^2 + \text{Sr}^2)/2\}^{1/2}/\text{mean} (\text{Sd}^2 = \sum (Ti - T)^2 / \{2(L - 1)\}, Ti: \text{各実験機関における 2 回施行での値の和}, T: Ti \text{ の平均値})$ の式で算出した。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. 抽出溶液調製法案の確立

試料抽出時のホモジナイズとその後の遠心操作の操作性を考慮し、試料を 3 g 採取して PBS を 27 mL 添加し、ホモジナイズすることにした。

2. 同時再現性の検証

そば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。機関 3, 機関 5, 機関 7, 機関 9 に関しては、低濃度で CV 値が高く、ばらつきが見られた。0 ng/mL から 4 ng/mL までは、定量限界以下のレベルであり、検出精度に安定性が欠けることが考えられた。4 ng/mL 以上では明らかに測定ミスと思われるものを除いて、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そばキットの検出限界は 1 ng/mL, 定量限界は 4 ng/mL であった。

そば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, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL) の 1 回試行につき、ウェル 3 回測定で得られた CV 値, 各濃度の CV 値の平均値を Table 2 に示す。明らかに測定ミスと思われる測定値を除いて、10% 以下の CV 値を示し、良好な

Table 1. CVs of Determination of Buckwheat Standard Protein Using Buckwheat Protein ELISA Kit

Conc. (ng/mL)	0		1		2		4		8		16		32		64	
Laboratory	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	1.3	12.3	6.7	2.7	4.5	1.8	6.1	7.7	8.7	7.8	4.2	8.1	2.3	9.0	8.0	10.9
2	9.8	10.8	6.7	48.1	3.5	2.3	15.0	8.6	6.2	19.4	1.3	3.9	6.1	5.3	4.0	1.0
3	44.6	15.2	51.0	16.1	30.6	9.2	15.7	7.2	4.7	3.3	4.3	6.2	3.1	1.8	1.1	4.3
4	6.7	6.4	2.6	4.5	1.6	2.7	1.1	1.3	2.9	5.1	2.3	1.8	3.9	0.8	2.2	0.7
5	37.5	25.3	15.3	32.6	16.3	10.8	18.5	8.3	8.7	6.0	19.6	2.6	6.2	4.1	3.4	4.3
6	6.9	4.2	9.2	7.5	7.6	2.9	2.6	2.1	1.9	3.6	2.2	2.8	3.2	6.1	2.3	8.8
7	24.3	55.9	13.3	13.1	8.0	6.3	6.0	9.5	2.4	7.2	2.5	3.8	0.3	4.4	0.4	2.2
8	1.5	13.2	2.5	3.7	1.6	2.5	3.0	3.6	1.8	4.4	3.8	5.0	3.7	3.1	5.2	3.6
9	13.0	91.7	7.1	11.0	6.4	3.6	2.9	9.1	0.5	8.5	1.1	9.7	4.4	4.3	1.7	5.8
10	13.2	9.9	9.2	14.3	3.7	6.5	3.6	11.2	4.3	4.7	7.3	0.6	1.8	1.9	3.0	1.7
Mean (%)	15.9	24.5	12.4	15.4	8.4	4.9	7.4	6.9	4.2	7.0	4.9	4.4	3.5	4.1	3.1	4.3

Data represent mean values of 3 wells.

Table 2. CVs of Determination of Buckwheat Standard Protein Using FASTKIT™ Buckwheat ELISA Kit

Conc. (ng/mL)	0		1		2.5		5		10		25		50		100	
Laboratory	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	4.7	1.5	4.0	24.6	1.8	0.2	2.8	1.4	1.1	0.8	2.3	4.5	6.5	5.7	5.3	5.8
2	11.7	1.7	2.8	1.6	2.5	1.0	1.5	2.4	1.4	1.4	2.9	2.7	0.6	2.9	3.3	1.9
3	3.9	1.8	2.4	0.8	4.0	2.1	1.9	3.7	2.1	1.7	1.6	0.9	3.1	0.1	1.2	0.7
4	1.4	4.1	0.8	3.3	1.8	2.5	3.5	2.4	1.8	1.7	3.0	1.0	2.9	4.7	1.6	4.7
5	1.3	6.4	0.8	2.8	0.5	0.8	1.8	2.5	0.5	1.2	0.3	1.2	0.5	1.5	1.0	1.1
6	0.8	3.0	2.9	2.5	6.1	2.0	2.4	0.7	3.3	3.3	2.3	2.4	1.6	2.0	2.4	2.7
7	3.7	2.2	6.1	3.2	3.1	2.2	1.9	3.7	2.1	1.9	1.0	1.3	3.3	0.9	0.6	2.4
8	2.1	2.1	3.3	5.2	2.3	1.3	1.9	1.7	1.7	1.1	1.3	2.1	2.4	1.4	0.5	2.4
9	1.3	0.4	0.8	7.5	2.2	0.3	1.3	0.3	0.7	0.8	0.3	1.2	1.2	2.4	1.3	2.8
10	2.8	7.5	2.5	4.5	0.9	11.0	3.4	4.8	3.1	5.4	2.1	3.0	1.7	2.4	1.8	3.5
Mean (%)	3.4	3.1	2.7	5.6	2.5	2.4	2.2	2.3	1.8	1.9	1.7	2.0	2.4	2.4	1.9	2.8

Data represent mean values of 3 wells.

Table 3. Results of Inter-laboratory Evaluation for Recovery Test of Buckwheat Standard Protein Using Buckwheat Protein ELISA Kit

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Number of laboratories	Accuracy Recovery (%)		Precision	
			Mean	Bias	Repeatability (%)	Reproducibility (%)
					RSD _r	RSD _R
Snack	5	8	54.0	-46.0	35.3	35.9
	20	8	50.1	-49.9	9.0	13.6
Bun	5	8	102.4	2.4	10.4	17.0
	20	8	61.6	-38.4	6.8	11.9
Udon	5	8	56.3	-43.7	78.5	69.5
	20	7	42.9	-57.1	23.2	32.4

Table 4. Results of Inter-laboratory Evaluation for Recovery Test of Buckwheat Standard Protein Using FASTKIT™ Buckwheat ELISA Kit

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Number of laboratories	Accuracy Recovery (%)		Precision	
			Mean	Bias	Repeatability (%)	Reproducibility (%)
					RSD _r	RSD _R
Snack	5	9	64.3	-35.7	13.0	23.3
	10	9	63.3	-36.7	5.0	16.5
Bun	5	8	127.7	27.7	13.7	21.7
	10	9	88.6	-11.4	5.5	21.8
Udon	5	9	94.2	-5.8	14.5	22.6
	10	10	75.9	-24.1	33.9	34.1

同時再現性を示した。国立衛研で行った実験において、そばエライザキットの検出限界は 1 ng/mL で、定量限界は 1 ng/mL であった。

3. 添加回収実験

そば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、併行再現性の相対標準偏差 (RSD_r) および室間再現性の標準偏差 (RSD_R) を Table 3 に示す。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そばタンパク質含有量は、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、ゆでうどんにおける測定溶液濃度 (20 ng/mL) の回収率 42.9% から黒糖まんにおける測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 102.4% の範囲であった^{13), 14)}。回収率の RSD_r は 6.8~78.5% であり、RSD_R は 11.9~69.5% であった。黒糖まんの 5 ng/mL を除いては、測定溶液濃度 (ng/mL) から判断して、いずれの RSD_R の値も、室間精度を検証する指標の 1 つである Horwitz の式から計算される数値 (45%) を下回っていた¹³⁾。黒糖まんの 5 ng/mL は、定量限界付近の精度が悪いことから起因するものと予想された。

そばエライザキットでの同様の結果を Table 4 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そばタンパク質含有量は、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、タマゴボーロにおける測定溶液濃度 (10 ng/mL) の回収率 63.3% から黒糖まんにおける測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 127.7% の範囲にあった。回収率の RSD_r は 5.0~33.9% であり、 RSD_R は 16.5~34.1% であった。測定溶液濃度 (ng/mL) 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 (45%) を下回っていた¹³⁾。添加回収率結果は、そばキットに比べ、そばエライザキットの方が高い傾向を示した。

今回、特定原材料 (そば) の ELISA 法の標準化を目的に、タマゴボーロ、黒糖まん、ゆでうどんの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、そばキットならびにそば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^{14)~18)}。したがって、上記 2 種 ELISA 法は、特定原材料のそばの定量検査に有効であることが示唆された。そばタンパク質の 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、食品衛生行政の見地から、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、厚生労働科学研究費補助金 (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」によった。本研究に当たり、そば試料をご提供いただいた (株)ファスマック布藤 聡社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**, J269-J271 (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) Mamegoshi, S., Detection methods for allergic substances in foods by enzyme-linked immunosorbent assay (2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J277-J279 (2002).
- 6) Takahata, Y., Detection methods for allergic substances in foods by enzyme-linked immunosorbent assay (1). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J275-277 (2002).
- 7) 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).
- 8) Akiyama, H., Isuzugawa, K., Harikai, N., Inter-laboratory evaluation of notified ELISA methods for allergic substances (egg). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **44**, 213-219 (2003).
- 9) Akiyama, H., Isuzugawa, K., Harikai, N., Inter-laboratory evaluation studies for development of notified ELISA methods for allergic substances (milk). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **45**, 120-127 (2004).
- 10) Akiyama, H., Isuzugawa, K., Harikai, N., Inter-laboratory evaluation studies for development of notified ELISA methods for allergic substances (wheat). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **45**, 128-134 (2004).
- 11) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).
- 12) Youden, W., Steiner, E. H., "Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists", Arlington, Association of Official Analytical Chemists, 1975, p. 72-83. (ISBN 0-935584-15-3)
- 13) 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).
- 14) Bennett, A. Glenn., Nelsen, C. T., Miller, M. B., Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearaleone in corn, wheat and pig feed: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **77**, 1,500-1,508 (1994).
- 15) Skerrett, H. J., Hill, S. A., Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **74**, 257-264 (1991).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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).