

## 報 文

## 特定原材料（牛乳）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 15 年 10 月 14 日受理）

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

### Inter-laboratory Evaluation Studies for Development of Notified ELISA Methods for Allergic Substances (Milk)

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

(\*<sup>1</sup>National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;  
 \*<sup>2</sup>Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 1-1-1, Nakao, Asahi-ku, Yokohama 241-0815,  
 Japan; \*<sup>3</sup>Nisshin Seifun Group Inc.: 5-3-1, Tsurugaoka, Oi-machi, Iruma-gun, Saitama 356-8511,  
 Japan; \*<sup>4</sup>Japan Inspection Association of Food and Food Industry Environment: 3-7-4, Kyobashi,  
 Chuo-ku, Tokyo 104-0031, Japan; \*<sup>5</sup>Japan Food Research Laboratories: 6-11-10, Nagayama,  
 Tama-shi, Tokyo 206-0025, Japan; \*<sup>6</sup>San-Ei Gen F.F.I., Inc.: 1-1-11, Sanwa-cho, Toyonaka-shi,  
 Osaka 561-8588, Japan; \*<sup>7</sup>Showa Sangyo Co., Ltd.: 2-20-2, Hinode, Funabashi-shi, Chiba 273-  
 0015, Japan; \*<sup>8</sup>National Institute of Health and Nutrition: 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo  
 162-8636, Japan; \*<sup>9</sup>Nippon Meat Packers, Inc.: 3-3, Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-2646,  
 Japan; \*<sup>10</sup>Morinaga Institute of Biological Science: Shimosueyoshi, 2-1-1, Tsurumi-ku, Yokohama  
 230-8504, Japan; \*<sup>11</sup>University of Tokyo Hospital: 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655,  
 Japan; <sup>a</sup>: Present Address: Jissen Woman's University: 4-1-1, Osakaue, Hino 191-8510, Japan;

†Corresponding author)

Extracts of sausage, sauce, cookie, cereal and pasta sauce spiked with milk standard protein at  
 a level of 5–20 ng/mL as sample solutions were analyzed in replicate in 10 laboratories. Coeffi-  
 cients of variation (CVs) of the three ELISA methods using a Milk Protein Casein ELISA Kit  
 (Casein kit), a Milk Protein  $\beta$ -Lactoglobulin ELISA Kit ( $\beta$ -Lactoglobulin kit) and a FASTKIT™  
 Milk ELISA Kit (Milk ELISA kit) were mostly below 10%. Mean recoveries of the milk standard  
 protein from the food extracts were over 40% in the three ELISA methods with a few exceptions.  
 The recoveries of milk standard protein from the sauce extract in Casein kit were improved by  
 adjusting the extract to neutrality before the Casein kit assay. The recoveries of milk standard  
 protein from cookie, cereal and pasta sauce were improved by the increasing the amount of  
 antibody coated in the Milk ELISA kit.

The detection limits of all the ELISA methods were 1 ng/mL in sample solutions. These  
 results suggested that the notified ELISA methods are reliable and reproducible for the inspection  
 of milk protein levels in extracts of sausage, sauce, cookie, cereal and pasta sauce.

(Received October 14, 2003)

**Key words:** 牛乳 milk; 特定原材料 allergic substances; 酵素免疫測定法 ELISA method; カゼイン casein; 複数機関の評価研究 inter-laboratory evaluation study

## 緒言

近年、食品を原因とするアレルギーに関して、小児にのみでなく、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。このため情報提供の必要性が高まり、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<sup>1)</sup>。

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  $\mu\text{g}/\text{g}$  または数  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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された<sup>2), 3)</sup>。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確立の検討を行った<sup>4)</sup>。特定原材料検討会では、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した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牛乳測定キット(カゼイン)<sup>5)</sup>、モリナガ牛乳測定キット( $\beta$ -ラクトグロブリンキット)、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™乳エライザキット<sup>6)</sup>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、厚生労働省においてさらに吟味され、通知として検査法が公表されることになる<sup>7)</sup>。

これらのことを踏まえ、ELISA法の標準化を確立し、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。我々はすでに卵の

ELISA法について複数機関による評価研究を行っている<sup>8)</sup>。

本研究は、牛乳測定ELISA法である(株)森永生科学研究所製モリナガ牛乳測定キット(カゼイン)<sup>5)</sup>、モリナガ牛乳測定キット( $\beta$ -ラクトグロブリンキット)<sup>5)</sup>および日本ハム(株)製FASTKIT™乳エライザキット<sup>6)</sup>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

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。シリアルおよびパスタソースは、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

試薬類は、既報と同様のものをを用いた<sup>8)</sup>。(株)森永生科学研究所製モリナガ牛乳測定カゼインキット(カゼインキット)および同モリナガ牛乳測定 $\beta$ -ラクトグロブリンキット( $\beta$ -ラクトグロブリンキット)は、(株)森永生科学研究所から提供された。日本ハム(株)製FASTKIT™牛乳エライザキット(牛乳エライザキット)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を用いた<sup>8)</sup>。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、冷却遠心機は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: 〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1

\*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 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

<sup>a</sup> 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

標準溶液に用いる牛乳は、日本ハム(株)から提供されたホルスタイン種(牛乳用)の新鮮乳より調製した。凍結乾燥した新鮮乳の粉末 30 mg に 0.05% BRONIDOX-K (AMRESCO 社製) を含む phosphate buffered saline (pH 7.4) (PBS) 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  $\mu$ m マイクロフィルター処理し、タンパク質量を行い、100~300  $\mu$ g/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、シリアル、パスタソースの各 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 は既報と同様に行った<sup>8)</sup>。すなわち IUPAC のプロトコル<sup>9)</sup>を参考に、試料: 5, 試験機関数: 10, 繰返し数: 3 で実施した。すなわち、ソーセージ、ソース、クッキー、シリアル、パスタソースの 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  $\mu$ g/mL に調製した標準溶液、添加用牛乳未知濃度標準溶液 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。カゼインおよび $\beta$ -ラクトグロブリン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、シリアル、パスタソースの各抽出液に、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。同様に牛乳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

##### カゼインキットおよび $\beta$ -ラクトグロブリンキット

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  $\mu$ L に試験機関には濃度未知の添加用牛乳標準溶液 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L ずつ加え、各溶液がウェル内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  $\mu$ L 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  $\mu$ L の酵素標識抗カゼイン抗体溶液 (キット付属) あるいは酵素標識抗 $\beta$ -ラクトグロブリン抗体溶液 (キット付属) を加え、ウェル内一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  $\mu$ L の酵素基質溶液 (TMB 溶液) (キット付属) を加え、ウェル内一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 (キット付属) 100  $\mu$ L 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牛乳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した。

##### 牛乳エライザキット

食品抽出液各 990  $\mu$ L に試験機関には濃度未知の添加用牛乳未知濃度標準溶液 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  $\mu$ L ずつ添加し混合した。次に、これらの溶液を 50  $\mu$ L 採って緩衝液 450  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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一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  $\mu$ L のビオチン結合抗牛乳タンパク抗体溶液 (牛乳エライザキット付属) を加え、ふたをしてウェル内一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、ビオチン結合抗牛乳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  $\mu$ L の酵素-アビジン結合物溶液(牛乳エライザキット付属)を加え、ふたをしてウェル内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  $\mu$ L の発色溶液(牛乳エライザキット付属)を加え、ふたをしてウェル内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  $\mu$ L の反応停止液(牛乳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<sup>8)</sup>。すなわち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<sup>10)</sup>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<sub>r</sub>)は、実験機関内の再現性を示す値で、 $100 Sr/\text{mean}(Sr=(\sum di^2/2L)^{1/2})$ 、 $di$ : 各実験機関における 2 回測定での値の差、 $L$ : 機関数、 $\text{mean}$ : 平均

値)の式で算出される。室間再現性の標準偏差(RSD<sub>R</sub>)は、実験機関間の再現性を示す値で、 $100 \{(Sd^2+Sr^2)/2\}^{1/2}/\text{mean}(Sd^2=\sum(Ti-T)^2/\{2(L-1)\})$ 、 $Ti$ : 各実験機関における 2 回測定での値の和、 $T$ :  $Ti$  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  $>\mu \pm 3.3\sigma$  ( $\mu$ : ブランク溶液の吸光値の平均値、 $\sigma$ : 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  $>\mu \pm 10\sigma$  ( $\mu$ : ブランク溶液の吸光値の平均値、 $\sigma$ : 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

カゼイ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 回測定につきウェル 3 回測定で得られた変動係数(CV)、各濃度の CV 値の 2 回測定での平均値を Table 1 に示す。機関 5 で 0 ng/mL から 4 ng/mL までの濃度領域で、ほかの機関より高い CV 値を示したが、それ以外の機関では、明らかに試験ミスであると思われる測定値を除いておおむね 10% 以下の CV 値であり、良好な同時再現性が示された。機関 5 で CV 値の高い原因として、プレートの洗浄操作が不十分であったと考えられた。 $\beta$ -ラクトグロブリンキットの同様の結果を Table 2 に示す。カゼインキットと同様に、機関 5 で低濃度で高い CV 値を示した以外は、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カゼインキットおよび  $\beta$ -ラクトグロブリンキットともに検出限界は 1 ng/mL、定量限界は 2 ng/mL であった。

牛乳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 3 回測定で得られた

Table 1. CVs of Determination of Milk Standard Protein Using Milk Protein ELISA Kit (Casein)

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	1.4	2.5	1.7	1.8	2.7	1.9	2.3	5.6	6.3	2.6	2.5	5.9	0.9	1.8	2.2	3.6
2	27.7	8.9	5.6	7.7	9.1	6.5	9.9	5.7	29.6	9.6	7.9	8.0	7.8	4.4	2.7	5.3
3	10.7	19.8	3.5	10.2	2.6	12.5	0.9	3.3	0.9	3.3	3.7	0.4	0.9	2.4	1.8	0.9
4	21.3	12.7	8.6	2.6	19.1	0.4	7.8	1.9	3.2	4.2	1.7	1.6	2.4	0.3	2.3	2.0
5	13.3	35.0	23.3	18.8	11.0	33.7	12.1	10.0	7.3	17.4	9.6	8.8	3.4	4.4	1.7	2.0
6	9.1	3.4	3.6	50.1	6.1	3.9	1.2	1.8	3.8	1.3	2.6	1.7	1.2	0.3	1.4	1.0
7	4.4	2.6	3.4	3.8	19.8	0.0	1.6	0.8	3.5	2.9	1.8	1.0	4.0	3.8	0.4	1.5
8	2.4	11.4	6.6	1.0	5.3	2.6	2.0	3.4	3.6	0.6	1.3	1.9	2.9	5.2	1.1	2.1
9	14.9	11.0	10.8	6.0	5.6	3.3	2.9	3.1	0.0	5.0	2.9	1.5	0.8	1.9	2.6	3.0
10	2.4	2.3	8.2	1.0	3.7	3.7	1.1	3.4	1.2	1.7	3.4	3.0	1.4	2.6	0.9	0.8
Mean (%)	10.8	11.0	7.5	10.3	8.5	6.9	4.2	3.9	5.9	4.8	3.7	3.4	2.6	2.7	1.7	2.2

Data represent mean values of 3 wells

**Table 2.** CVs of Determination of Milk Standard Protein Using Milk Protein ELISA Kit ( $\beta$ -Lactoglobulin)

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	6.7	3.4	3.7	4.5	0.8	4.1	3.6	2.2	1.1	5.1	2.4	1.8	2.7	1.4	1.2	2.5
2	2.3	9.5	12.5	7.0	8.5	1.1	4.9	0.5	7.9	4.5	6.9	1.4	5.8	4.8	4.0	0.6
3	2.1	2.7	9.4	2.3	8.5	2.4	2.3	3.9	9.8	1.9	2.6	0.0	1.2	2.0	1.8	1.2
4	1.8	3.6	5.5	2.7	4.6	1.5	4.2	4.2	5.2	1.9	2.6	2.2	0.2	3.3	1.6	2.1
5	13.1	2.4	15.2	7.5	6.3	11.3	15.2	3.6	2.8	2.1	3.1	3.6	3.5	2.1	0.4	1.9
6	7.9	5.2	4.9	3.8	7.3	5.0	5.3	3.8	1.1	4.4	4.4	5.4	2.2	1.1	4.7	2.3
7	7.4	4.4	5.6	8.5	11.0	11.2	7.9	7.6	18.9	2.4	1.5	3.7	1.3	11.2	1.0	0.8
8	6.1	5.6	9.6	11.6	5.2	5.5	2.5	8.5	0.4	2.1	4.6	0.9	1.5	2.8	2.7	3.2
9	13.1	12.6	7.9	8.1	4.3	5.2	6.2	2.9	1.9	3.1	2.0	3.2	0.3	4.4	4.2	0.9
10	7.3	10.5	6.5	8.7	8.3	4.4	9.5	0.5	1.6	21.2	4.8	3.6	0.6	2.7	2.6	0.3
Mean (%)	6.8	6.0	8.1	6.5	6.5	5.2	6.2	3.8	5.1	4.9	3.5	2.6	1.9	3.6	2.4	1.6

Data represent mean values of 3 wells

**Table 3.** CVs of Determination of Milk Standard Protein Using FASTKIT™ Milk ELISA Kit

Conc. (ng/mL)	0		0.5		1		5		25		100	
Laboratory	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	3.2	1.3	2.3	2.5	1.6	0.9	1.1	5.7	1.9	4.8	1.4	5.4
2	3.9	4.7	3.8	3.3	4.2	1.9	5.2	2.2	2.5	3.5	3.0	2.8
3	2.6	6.2	3.9	19.7	1.2	7.9	11.9	7.8	2.2	6.4	1.1	10.6
4	4.2	5.2	2.5	4.3	2.2	6.0	2.7	3.2	3.0	2.1	4.4	2.4
5	2.5	3.7	2.2	3.8	3.3	2.7	1.4	3.2	1.6	1.7	2.9	1.3
6	3.5	2.5	1.8	15.3	2.4	0.7	2.9	2.3	4.3	35.2	2.7	4.4
7	2.1	2.7	4.6	7.9	2.3	2.2	2.2	4.1	4.7	3.9	4.8	1.8
8	6.5	3.4	9.6	2.7	2.9	2.9	2.4	3.6	2.1	3.8	2.2	1.4
9	7.4	16.3	5.3	5.6	5.8	4.7	4.6	4.4	3.2	3.6	1.9	1.5
10	3.6	3.1	4.6	3.7	2.8	2.1	3.6	7.5	1.2	1.2	2.8	1.6
Mean (%)	4.0	4.9	4.1	6.9	2.9	3.2	3.8	4.4	2.7	6.6	2.7	3.3

Data represent mean values of 3 wells

CV, 各濃度の CV 値の平均値を Table 3 に示す. 各濃度で明らかに試験ミスであると思われる測定値が数検体あったが, 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, 牛乳エライザキットの検出限界は 1 ng/mL で, 定量限界は 5 ng/mL であった.

### 3. 添加回収実験

カゼイ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, 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 4 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牛乳含有量は, 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, ソースを除いては, パスタソースにおける測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 34.3% からクッキーにおける測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 90.5% の範囲にあり, ソースとパスタソース以外は ELISA の結果としてほぼ満足できる結果であった<sup>11)~16)</sup>. しかし, ソース抽出液からの平均回収率は, 5.4% (測定溶液濃度として 5

ng/mL となるように添加), 8.0% (測定溶液濃度として 20 ng/mL となるよう添加) と悪かった. パスタソースにおいても, ほかの食品抽出液に比べ比較的回収率が低いことから, ソース類において回収率が悪くなる原因が考えられた. ソース類の pH を測定したところ, pH が 2~3 とほかの食品抽出液に比べ極めて低かった. そのため, ソース抽出液に標準溶液を添加した後に, pH を中性 (pH 6~8) となるように調整後, 以下同様の操作を行った結果, 平均回収率は 106% (測定溶液濃度として 5 ng/mL となるよう添加), 97% (測定溶液濃度として 20 ng/mL となるよう添加) と改善した. この結果から, 食品抽出液の pH が極端に酸性側に偏っていると回収率が悪くなること が示唆された. カゼインキットによるソース類を除いた回収率の  $RSD_r$  は 4.8~31.0% であり,  $RSD_R$  は 8.5~35.6% 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<sup>11)</sup>.

$\beta$ -ラクトグロブリンキットでの同様の結果を Table 5 に示す. 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, ほぼ 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牛乳含有量は, すべて

**Table 4.** Results of Inter-laboratory Evaluation for Recovery Test of Milk Standard Protein Using Milk Protein ELISA Kit (Casein)

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Number of laboratories	Accuracy recovery (%)		Precision	
					Repeatability (%)	Reproducibility (%)
			Mean	Bias	RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>R</sub>
Sausage	5	9	62.9	-37.1	15.2	21.9
	20	8	49.6	-50.4	8.3	15.0
Sauce	5	10	5.4	-94.6	118.6	130.9
	20	10	8.0	-92.0	44.9	52.7
Cookie	5	10	90.5	-9.5	15.9	19.2
	20	8	82.3	-17.7	4.8	8.5
Cereal	5	10	64.9	-35.1	16.4	22.4
	20	8	62.9	-37.1	7.2	11.6
Pasta sauce	5	10	34.3	-65.7	31.0	35.6
	20	10	34.5	-65.5	19.0	27.4

**Table 5.** Results of Inter-laboratory Evaluation for Recovery Test of Milk Standard Protein Using Milk Protein ELISA Kit ( $\beta$ -Lactoglobulin)

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Number of laboratories	Accuracy recovery (%)		Precision	
					Repeatability (%)	Reproducibility (%)
			Mean	Bias	RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>R</sub>
Sausage	5	8	94.8	-5.2	19.4	18.4
	20	8	74.2	-25.8	19.8	18.7
Sauce	5	10	49.0	-51.0	44.5	44.0
	20	9	58.6	-41.4	17.2	17.7
Cookie	5	8	93.0	-7.0	25.5	22.8
	20	8	85.4	-14.6	17.1	17.7
Cereal	5	9	53.2	-46.8	26.8	41.3
	20	8	66.8	-33.2	13.2	17.4
Pasta sauce	5	9	61.3	-38.7	47.4	49.0
	20	9	64.0	-36.0	27.9	31.0

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 (5 ng/mL) の回収率 49% からソーセージにおける測定溶液濃度 (5 ng/mL) の回収率 94.8% 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。回収率の RSD<sub>r</sub> は 13.2~47.4% であり、RSD<sub>R</sub> は 17.4~49.0% であった。

牛乳エライザキットでの同様の結果を Table 6 に示す。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牛乳含有量は、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 (10 ng/mL) の回収率 23.3% からソーセージの測定溶液濃度 (10 ng/mL) の回収率 48.4% の範囲にあった。回収率の RSD<sub>r</sub> は 28.4~69.7% であり、RSD<sub>R</sub> は 35~69.9% であった。回収率の結果は、カゼインキットおよび  $\beta$ -ラクトグロブリンキットに比べ、低い傾向を示していた。特にクッキー、シリアル、パスタソースの添加回収率が低く、精度も良好でなかったことから、その後プレートにコートする抗体の結合量を 2 倍にする改良を行い、国立衛研においてクッキー、シリアル、パスタソースにおける添加回収実験を行ったところ、クッキーでは 5 ng/mL で 75.7% (CV 値 12.2%)、

10 ng/mL で 83% (CV 値 0.6%)、シリアルでは 5 ng/mL で 58.4% (CV 値 8.6%)、10 ng/mL で 72.5% (CV 値 23.7%)、パスタソースでは 5 ng/mL で 59.1% (CV 値 17.2%)、10 ng/mL で 59.4% (CV 値 23.1%) と回収率は改善された。このため厚生労働省の通知 ELISA 法の試案には、抗体量を 2 倍にした牛乳エライザキットを採用することになった。

牛乳エライザキットは、卵エライザキットと同様に牛乳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関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、牛乳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。そのため牛乳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、牛乳由来タンパク質との結合を妨害されやすい抗体があったと推察される。一方、カゼインキットおよび

**Table 6.** Results of Inter-laboratory Evaluation for Recovery Test of Milk Standard Protein Using FASTKIT™ Milk ELISA Kit

Extract	Sample solution conc. (ng/mL)	Number of laboratories	Accuracy recovery (%)		Precision	
			Mean	Bias	Repeatability (%)	Reproducibility (%)
					RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>R</sub>
Sausage	5	10	41.0	-59.0	35.2	37.7
	10	10	48.4	-51.6	34.5	37.9
Sauce	5	8	40.9	-59.1	36.3	35.0
	10	9	42.5	-57.5	28.4	40.0
Cookie	5	9	34.2	-65.8	41.0	46.3
	10	10	41.2	-58.8	60.9	55.0
Cereal	5	8	25.4	-74.6	69.7	69.9
	10	9	23.3	-76.7	58.4	59.1
Pasta sauce	5	7	27.1	-72.9	59.8	63.9
	10	10	40.4	-59.6	57.4	55.9

$\beta$ -ラクトグロブリンキットでは、それぞれカゼインに対するポリクローナル抗体および $\beta$ -ラクトグロブリン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。

上記のことを考慮して厚生労働省の通知検査法の試案では、すべてのELISAキット(牛乳エライザキット、カゼインキットおよび $\beta$ -ラクトグロブリンキット)とも、ホモジナイザーを用いてかくはん操作を行う際には、かくはんした後溶液のpHを確認し、必要があれば中性付近(pH 6.0~8.0)となるように調整し、その後、同様のかくはん操作を2回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行うよう反映された。また牛乳エライザキットでは、プレートに結合する抗体量を2倍にすることにした。なお抽出操作は、操作性を考慮してすべてのすべてのELISAキットで試料を2g採取し、38 mLの抽出緩衝液あるいは検体希釈液を加え、ホモジナイザーなどによりかくはんすることにされた。

また特定原材料検出法検討会では、複合抗原を認識する抗体を利用したELISA法(牛乳エライザキット)と単一あるいは精製抗原を認識する抗体を利用したELISA法(カゼインキットおよび $\beta$ -ラクトグロブリンキット)の2種類の 방법이評価されたが、両検出法とも優れた長所を有しており、またお互いの検出系の欠点を相補う関係にあるために、どちらかの方法に絞ることに決着がつかず、特定原材料検討会では両検出系により1次スクリーニング試案を作成した。

なお、単一あるいは精製抗原を認識する抗体を利用したELISA法は、カゼインキットの抽出時のpHによる影響を除けばカゼインキットおよび $\beta$ -ラクトグロブリンキットともに良好な結果だったが、通知検査法においては、乳を検知対象とする場合にはカゼインキットのみを用いて測定を行うことになった。これは上記の理由により、複合抗原を認識する抗体を利用したELISA法と単一あるいは精製抗原を認識する抗体を利用したELISA法の両検出系に

より1次スクリーニングすることになった場合、3種類のキット(カゼインキット、 $\beta$ -ラクトグロブリンキットおよび牛乳エライザキット)で検査を行うことが必要になる。そのため検査の効率性と検査側の負担軽減を考慮して、単一あるいは精製抗原を認識する抗体を利用したELISA法は、カゼインキットのみを採用することになった。これはカゼインキットが $\beta$ -ラクトグロブリンキットに比べ、加工食品への適用範囲が比較的広いと判断されたためである。

今回、特定原材料(牛乳)のELISA法の標準化の目的で、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。同時再現性の検証では、カゼインキット、 $\beta$ -ラクトグロブリンキット、ならびに牛乳エライザキットとも、おおむね良好であったと考えられる。添加回収率の検証では、カゼインキットにおいて食品抽出液が酸性側に傾いていると回収率が大幅に悪くなることが判明した。また、牛乳エライザキットにおいて、クッキー、シリアル、パスタソースなどの食品抽出液においては、併行再現性および室間再現性が悪かったことから、プレートにコートする抗体の結合量を2倍にする改良を行い回収率が改善された。牛乳タンパク質の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。

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確立された検査法の試案をもとに、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<sup>5)</sup>。本通知された検査法は、地方自治体宛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。

## 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および国際比較に関する研究」によった。本研究に当たり、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-J277 (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., Watanabe, H., Iijima, K., Yamakawa, H., Mizuguchi, Y., Yoshikawa, R., Yamamoto, M., Sato, H., Watai, M., Arakawa, F., Ogasawara, T., Nishihara, R., Kato, H., Yamauchi, A., Takahata, Y., Morimatsu, F., Mamegoshi, S., Muraoka, S., Honjoh, T., Watanabe, T., Sakata, K., Imamura, T., Toyoda, M., Maitani, T., Inter-laboratory evaluation studies of notified ELISA methods for allergic substances (egg). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 213-219 (2003).
- 9) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).
- 10) 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)
- 11) 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).
- 12) Bennett, A. Glenn., 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**, 1500-1508 (1994).
- 13) Skerritt, H. J., Hill, S. A., Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **74**, 257-264 (1991).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) Yeung, M. J., Collins, G. P., Enzyme immunoassay for determination of peanut proteins in food products. *J. AOAC Int.*, **79**, 1411-1416 (1996).