ノート

管理試料を用いた食物アレルギー ELISA 検査（卵および乳）の
不確かさ評価および内部精度管理桑原 香織^{1,*} 平尾 千波² 平野 晃²Uncertainty Evaluation and Internal Quality Control of ELISA Test
for Food Allergens (in Egg and Milk) Using Control SamplesKaori KUWAHARA^{*1}, Chinami HIRAO² and Akira HIRANO²¹Morinaga & Co., Ltd.: 5-33-1 Shiba, Minato-ku, Tokyo 108-8403, Japan;²Morinaga & Co., Ltd.: 2-1-1, Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama-shi, 230-8504, Japan;

*Corresponding author

We evaluated measurement uncertainty and performed internal quality control of an ELISA test for allergens in egg and milk, using control samples. For the evaluation of measurement uncertainty, the following three important factors were identified: 1) Differences in test-kit lots, 2) Different-day reproducibility, 3) Same-time reproducibility. A three-stage nested design was used, and the combined standard uncertainty of the three factors mentioned above was calculated based on the results obtained. Measurement uncertainty was defined as the expanded uncertainty obtained by multiplying the combined standard uncertainty by a coverage factor of two. As a result, the expanded uncertainty of egg was 1.9 $\mu\text{g/g}$ when the total egg protein concentration was 13.4 $\mu\text{g/g}$, and the expanded uncertainty of milk was 1.8 $\mu\text{g/g}$ when the total milk protein concentration was 13.5 $\mu\text{g/g}$. For the internal quality control, we first set the reference range of the measured value of the control sample, using the obtained combined standard uncertainty as an index. Each control sample was then measured for every test, and we concluded that the test was performed without any errors, when the result of the control sample was within the reference range. Second, the measured values of the control samples were plotted on a graph for continuous monitoring. This enabled us to check whether inspection accuracy was maintained. There were no large chronological changes and no major differences between the standard deviations of the control samples and the combined standard uncertainty in egg or milk. Therefore, it was determined that the dispersion was at an acceptable range and inspection accuracy was maintained.

(Received March 25, 2019; Accepted May 16, 2019)

Key word: 管理試料 Control sample; ELISA; 食物アレルギー food allergens; 不確かさ uncertainty; 内部精度管理 internal quality control

緒 言

食物アレルギーとは「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」のことである^{*1}。食物アレルギー患者が特定の食物を摂取すると、皮膚のかゆみや蕁麻疹、粘膜の腫れ、喘息などさまざまな症状が誘発される。日本における食物アレルギー患者数は医師の診断を受けた人数として乳幼児期で約30~50万人、学童期で約35万人と推計され¹⁾、有症率は全年齢を通して1~2%程度と考えられてい

る^{*2}。

アレルギー患者にとって、アレルギー症状を誘発するアレルギー物質（アレルギー）の摂取を避けることが発症予防となる。そのため、食品表示によって食品中に含まれるアレルギー情報の提供を求める声が高まり、平成14年4月から加工食品へのアレルギー表示が義務化された。現在、食品表示法にて表示義務が定められている「特定原材料」は、えび、かに、小麦、そば、卵、乳、落花生の7品目である。

これらの特定原材料について、消費者庁次長通知『食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）』

* 連絡先 k-kuwahara-jd@morinaga.co.jp

¹ 森永製菓株式会社: 〒108-8403 東京都港区5-33-1² 森永製菓株式会社: 〒230-8504 横浜市長見区下末吉2-1-1^{*1} 日本小児アレルギー学会, “第1章定義・分類・症状”, 食物アレルギー診療ガイドライン2016ダイジェスト版。^{*2} 海老澤元宏, “総論”, AMED研究班による食物アレルギーの診療の手引き2017, p. 3

の『別添アレルゲンを含む食品の検査方法』および『別添2判断樹について』では、食品採取重量1g当たり10 µg以上の特定原材料由来タンパク質が検出された場合にスクリーニング検査陽性と判断するとされており、その検査法として「抗原抗体反応によって食品中の特定原材料等由来のタンパク質を定量するELISA法」が記載されている。

一方、近年国際的に測定結果の信頼性確保への要求が高まっており、信頼性確保のための条件や手法についてのガイドラインが国内外のさまざまな機関や団体から公表されている^{2), 3)}。信頼性確保のための方法として一般的に品質管理マネジメントシステムに関するものと技術的能力に関するものがあり、後者では妥当性が確認された方法で分析して測定の不確かさを評価すること、内部精度管理を行うこと、技能試験に参加して力量を確認すること、試験所認定の要求事項に適合することなどが挙げられる。本稿では、このうち「測定の不確かさ評価」と「内部精度管理」に着目する。

「測定の不確かさ」とは「用いる情報に基づいて、測定対象量に帰属する量の値のばらつきを特徴付ける負でないパラメータ」と定義されており^{*3}、測定結果の性能を総合的な観点から評価しようとする概念である⁴⁾。1993年に国際度量衡局（BIPM）を含む7機関によって「測定における不確かさの表現のガイド（GUM: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement）」が作成され、ISO国際文書として発行されて以来、測定結果とともに測定の不確かさを表明して測定の信頼性を表現することが国際的に求められてきた。また、ISO/IEC 17025認定を取得する際にも技術的要求事項の1つとして不確かさを評価することが求められており^{*4}、信頼ある測定機関として不確かさ評価は必須となっている。

「内部精度管理」については『食安監発第0323003号（平成16年3月23日）別紙登録検査機関における製品検査の業務管理要領』で、理化学的検査、細菌学的検査および動物を用いる検査に関して、検査の技能を評価するために添加量が明らかな試験品を用いて検査して精度管理を行うことが定められている。これは消費者庁次長通知『食品表示基準について（平成27年3月30日消食表第139号）別添アレルゲンを含む食品の検査方法（別添4）アレルゲンを含む食品の検査方法を評価するガイドライン』でも引用され、食物アレルゲンの検査において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。

そこで、当試験所内における食物アレルゲンELISA検査の信頼性を確保するために、管理試料を用いた「食物アレルゲンELISA測定キット（卵）および（牛乳）」の不確かさ評価および得られた不確かさを指標とした内部精度管

理手法の検討を行ったのでここに報告する。

実験方法

1. 管理試料を用いた不確かさ評価

1.1 食物アレルゲン（卵）および（乳）の測定方法

食物アレルゲン（卵）および（乳）の測定は、森永生科学研究所製『モリナガFASPEK ELISAI卵（卵白アルブミン）』（以下、FASPEKII卵）および『モリナガFASPEK ELISAI牛乳（カゼイン）』（以下、FASPEKII牛乳）を用い、操作は付属の取扱説明書に従った。そのほかの使用機器や使用器具は、以下のとおり。

秤量天秤: PB1502-S（メトラー・トレド社製）、マイクロピペット: ピペットマンP-200 L, P-1000 L（ギルソン社製）、Proline Plus 8channel手動ピペット（ザルトリウス社製）、抽出液分注器: フィックスアレット®（柴田科学製）、マイクロプレートリーダー: VersaMax（モレキュラーデバイス社製／主波長450 nm、副波長630 nmで吸光度を測定）。これらの使用機器は、その特性に従って定期的に内部点検、内部校正および外部校正機関によるJCSS校正を行い、精度や真度、性能が管理されたものを使用した。

1.2 測定試料

分析法の妥当性確認や内部精度管理における真値の確認などを行う際には、測定対象成分の認証値が定められている認証標準物質（Certified Reference Material: CRM）が利用され⁵⁾、不確かさ評価においても適切なCRMがあれば、これを利用するのが望ましいと考えられる。しかしながら、アレルゲンELISA検査用CRMは、現在国内で市販されておらず、海外製品のCRMについては、Masayamaらによって繰り返し測定の結果が報告されており、国内検査キットでは高感度に反応してしまうものや、均一性が確認されなかったものがあったことが指摘されている⁶⁾。そこで本研究では、市販品としては国内初食物アレルゲンELISA検査用内部精度管理試料である『QCマテリアル卵』および『QCマテリアル牛乳』（森永生科学研究所製）を使用した。QCマテリアルは、一定濃度の卵タンパク質または牛乳タンパク質を含む、多糖類と酒粕を主体とした粉末食品状試料であり、その均質性はThompsonらの文献⁷⁾に従って確認され、安定性については、4℃保管品において製造後30カ月間にわたり、製造後測定値（初期値）の10%以内の変動に抑えられていることが確認されている。なお、今回使用したロットの製造元付与値は、卵タンパク質濃度13.0 µg/g、牛乳タンパク質濃度13.8 µg/gであった。

1.3 不確かさの要因の抽出と不確かさの定義

測定結果になんらかの影響を与えられとされる不確かさ要因を挙げ、特性要因図（フィッシュボーンダイアグラム）に示した（Fig. 1）。これを参照して特に影響が大きく重要と考えられる不確かさ要因を抽出し、不確かさ成分を評価した²⁾。

*3 TS Z 0032: 2012 (ISO/IEC Guide 99) 国際計量用語—基本および一般概念並びに関連用語（VIM）

*4 “7.6 測定不確かさの評価”，JISQ17025: 2018 (ISO/IEC17025: 2017) 試験所および校正機関の能力に関する一般要求事項，日本規格協会発行

Fig. 1. Fishbone diagram of the error factors in ELISA

消費者庁次長通知『食品表示基準について（平成27年3月30日消費表第139号）別添アレルギーを含む食品の検査方法（別添4）アレルギーを含む食品の検査方法を評価するガイドライン 参考3 定量検査用ELISAキットの精度』には、サンドイッチELISA法の併行精度は、マイクロピペットによる注入量のばらつきやプレートのウェル間の吸光度のばらつきによって求められるとされており、これらは重要な不確かさ要因であると考えられる。また、併行精度として評価されるこれらのばらつきのほかには、測定日（回）ごとの検量線のばらつきや、使用する検査キットのロットの違いによるばらつきなどの中間精度として評価されるばらつきも重要な不確かさ要因であると考えられる。以上のことから、当該検査における測定の不確かさの主な要因を、①食物アレルギー測定キットのロットの違いによる不確かさ $u_{\text{lot}}(x_i)$ 、②測定日（回）による不確かさ $u_{\text{day}}(x_{ij})$ 、③併行条件での繰り返し測定による不確かさ $u_{\text{repeat}}(x_{ijk})$ の3点として、以下（1）式の通り①～③の各要因の標準不確かさから合成標準不確かさ $u_c(y)$ を算出した。さらに、以下（2）式の通り合成標準不確かさ $u_c(y)$ に包含係数（ $k=2$ ）を乗じて求めた拡張不確かさを U として、これを食物アレルギーELISA検査の不確かさとした。

$$u_c(y) = \sqrt{u_{\text{lot}}^2(x_i) + u_{\text{day}}^2(x_{ij}) + u_{\text{repeat}}^2(x_{ijk})} \quad (1)$$

$$U = 2 \times u_c(y) \quad (2)$$

1.4 不確かさの評価

1.3で抽出した不確かさ要因①～③は、試験所内における枝分かれ実験によって評価した^{*5}。

1.4.1 測定方法

食物アレルギーELISA検査（卵）については、1回の測定につき『QCマテリアル卵』5点を併行して抽出し、抽出試料1点につき、FASPEKII卵の固相化プレート中2ウェルを使用して測定を行った。検量線は、検査キット付

Fig. 2. Experimental Design

属の標準品を段階希釈して調製した標準溶液を4係数logistic解析して作成し、それを元に2ウェルの各測定値（ng/mL）を算出して、それらの平均値を測定溶液の濃度とした。さらに測定溶液の濃度に希釈倍率を乗じて、試料中の卵総タンパク質濃度（μg/mL）を算出した。これを検査キット2ロットで日を変えて2回ずつ行い、計20点の試料を測定した（Fig. 2）。食物アレルギーELISA検査（乳）についても、FASPEKII牛乳を用いて卵と同様に測定した。

2. 管理試料を用いた内部精度管理

2.1 検査の有効性判断

検査によって何らかの測定結果が得られたとしても、測定そのものに問題があれば、その結果に信頼性があるとは言えない。結果の信頼性を確保するためには、使用した検査キットや使用機器、測定操作などがすべて正常であり、検査そのものが有効であったと都度確認されることが望ましい。

2.1.1 方法

検査の有効性を確認する手段として『管理試料による統

^{*5} JIS Z 8404-2: 2008 (ISO/TS 21749:2005) “5.2.2.3 段枝分かれ計画を用いた実験 “Measurement uncertainty Part 2: Measurement uncertainty for metrological applications Repeated measurements and nested experiments (Japanese Industrial Standards Committee),

Table 1. Multiple measurement of QC Materials (egg and milk) by ELISA

QC material egg									
Test kit lot	Day	Egg protein concentration (μg/g)						Mean (μg/g)	RSD (%)
1	1	12.6	12.9	12.1	12.7	12.0	12.4	13.4	5.7
	2	14.5	14.1	14.0	13.8	14.5	14.2		
2	1	13.0	13.2	13.5	13.1	13.7	13.3		
	2	13.1	14.5	14.3	14.0	13.0	13.8		
QC material milk									
Test kit lot	Day	Milk protein concentration (μg/g)						Mean (μg/g)	RSD (%)
1	1	13.4	13.8	13.2	13.1	12.9	13.3	13.5	5.5
	2	12.9	14.3	13.1	13.9	13.9	13.6		
2	1	13.6	13.3	12.6	12.1	12.7	12.9		
	2	14.2	14.6	13.8	14.9	14.6	14.4		

Table 2. Analysis of variance for 3-stage nested design

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares	Expectation of the mean square
Factor (A)	S_A	$f_A = a - 1$	$V_A = S_A / f_A$	$\sigma_e^2 + n\sigma_B^2 + bn\sigma_A^2$
Factor (B)	S_B	$f_B = a(b - 1)$	$V_B = S_B / f_B$	$\sigma_e^2 + n\sigma_B^2$
Repeat Error (e)	S_e	$f_e = ab(n - 1)$	$V_e = S_e / f_e$	σ_e^2
Total (T)	S_T	$f_T = abn - 1$		

a: the number of test kit lot (2), b: the number of test days (2), n: the number of repetitions (5)

$$S_A = bn \sum_{i=1}^a (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2, S_B = n \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (\bar{x}_{ij} - \bar{x})^2, S_e = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (x_{ijk} - \bar{x}_{ij})^2,$$

$$u_{Lot}(x_i) = \sigma_A, u_{day}(x_{ij}) = \sigma_B, u_{repeat}(x_{ijk}) = \sigma_e$$

計学的内部精度管理⁸⁾が利用できる。これは、測定サンプルと併行して管理試料を測定し、その測定値がある一定範囲内にあれば、分析系の偏りとはばらつきが統計的に安定な状態であると判断する方法である⁸⁾。Masayamaらは標準添加試験の補正值の回収率を z 値で評価することにより検査の品質管理を行える可能性を示唆している⁶⁾。そこでMasayamaらの手法を参考に、測定回ごとに測定サンプルと併行して管理試料としてQCマテリアルを1点ずつ測定し、その測定値が試験所内不確かさを指標として設定した一定の管理範囲内であるかを評価して検査の有効性を判断する指標とした。

2.1.2 管理試料測定値の管理基準の設定

不確かさ評価で得たQCマテリアル測定値の平均値および合成標準不確かさをを用いて、式(3)のとおり管理試料の z 値を算出した⁶⁾。| z | ≤ 2となる範囲を管理基準とし、これを外れた場合は検査の有効性について都度検証することとした。

$$z = \frac{\text{不確かさ評価データの平均値} - \text{管理試料の測定値}}{\text{合成標準不確かさ}} \quad (3)$$

2.2 管理試料測定値のモニタリング

内部精度管理の一つとして、2.1.1で測定した管理試料の値を記録してその値をモニタリングすることを検討した。

同一条件下で測定した均質で安定な管理試料の測定結果をグラフ化して長期的にモニタリングすることで、検査精度が維持されているか否かを確認した。

結果および考察

1. 不確かさ評価における測定および解析結果

アレルゲンELISA検査(卵)および(乳)の測定の結果、平均値は、卵で13.4 μg/g、乳で13.5 μg/g、相対標準偏差(RSD%)は、卵で5.7%、乳で5.5%であった(Table 1)。測定試料の製造元付与値が、卵タンパク質濃13.0 μg/g、牛乳タンパク質濃度13.8 μg/gであったため、この測定結果の平均値は妥当と考えられた。

測定結果を枝分かれ実験として分散分析し、分散の期待値から不確かさ要因①～③の分散を算出して不確かさを求めた^{*5)}(Table 2)。

分散分析の結果をTable 3に示す。

分散分析の結果、卵については、分散の期待値から各要因の不確かさは以下のとおりとなった。

$$\begin{aligned} \sigma_{a-\text{egg}}^2 &= u_{lot-\text{egg}}^2(x_i) = -0.37 < 0, u_{lot-\text{egg}}(x_i) = 0 \\ \sigma_{b-\text{egg}}^2 &= u_{day-\text{egg}}^2(x_{ij}) = 0.76, u_{day-\text{egg}}(x_{ij}) = 0.87 \\ \sigma_{e-\text{egg}}^2 &= u_{repeat-\text{egg}}^2(x_{ijk}) = 0.19, u_{repeat-\text{egg}}(x_{ijk}) = 0.44 \end{aligned}$$

乳の分散分析の結果は、以下のとおりとなった。

$$\sigma_{a-milk}^2 = u_{lot-milk}^2(x_i) = -0.30 < 0, u_{lot-milk}(x_i) = 0$$

$$\sigma_{b-milk}^2 = u_{day-milk}^2(x_{ij}) = 0.57, u_{day-milk}(x_{ij}) = 0.75$$

$$\sigma_{e-milk}^2 = u_{repeat-milk}^2(x_{ijk}) = 0.25, u_{repeat-milk}(x_{ijk}) = 0.50$$

負の値はその影響が無視できるくらいに小さいと考えられるため0として、各要因の不確かさを式(1)に代入すると、 $u_{c-egg} = 0.97$, $u_{c-milk} = 0.91$. 式(2)より $U_{egg}(X) = 1.9$, $U_{milk}(X) = 1.8$.

したがって、当試験所においてアレルゲン ELISA 検査(卵)で卵総タンパク質濃度 $13.4 \mu\text{g/g}$ の試料を測定した場合の拡張不確かさ(包含係数 $k=2$)は $1.9 \mu\text{g/g}$, アレルゲン ELISA 検査(牛乳)で牛乳総タンパク質濃度 $13.5 \mu\text{g/g}$ の試料を測定した場合の拡張不確かさ(包含係数 $k=2$)は $1.8 \mu\text{g/g}$ と評価された。また、今回の評価結果では、卵、乳ともに不確かさへの影響は日間差が最も大きく、ロット間差の影響は無視できるくらいに小さかったが、ロット間差の影響については、検討したロット数が少なかつたため、今後より多くのロットを用いた再評価が必要と考えられた。

2. 検査の有効性判断のための管理試料の測定結果

卵の合成標準不確かさ $u_{c-egg}(y) = 0.97$, 乳の合成標準不確かさ $u_{c-milk}(y) = 0.91$ であり、これらの値を(3)式に代入して計算したところ、 $|z| \leq 2$ となる管理試料の測定値の範囲は、卵が $11.4 \sim 15.4 \mu\text{g/g}$, 乳が $11.7 \sim 15.3 \mu\text{g/g}$ で

Table 3. Analysis of variance for the measurement results of QC Materials

QC material egg			
Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squares
Test kit lot	0.258	1	0.258
Test day	7.955	2	3.977
Error	3.084	16	0.193
Total	11.296	19	

QC Material Milk			
Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Squares
Test kit lot	0.235	1	0.235
Test day	6.239	2	3.119
Error	4.061	16	0.254
Total	10.535	19	

Fig. 3. Transition of the measured values of control samples

あった。

卵の管理試料を32回、乳の管理試料を35回測定したところ、管理基準を外れたのは、卵で0回、乳で1回であった。管理基準外となった「乳」の1回の検査については、検査の有効性について検証の必要があると判断し、あらかじめ試験所内標準手順書にて定められた手順に従って、検量線、QCマテリアルおよび測定サンプルの吸光度の確認ならびに検査記録の確認などを行い、検査の有効性を総合的に検証した。その結果、当該検査結果は最終的に有効な結果として取り扱うことが可能と判断された。このようにして、この手法によって検査の有効性の判断を簡便に行うことが可能であると考えられた。

3. 管理試料測定値のモニタリング結果

2.の管理試料(卵および乳)の測定値の推移をFig. 3に示す。

卵32点で、最小値 $11.8 \mu\text{g/g}$, 最大値: $14.6 \mu\text{g/g}$, 平均値: $13.1 \mu\text{g/g}$, 標準偏差は $0.7 \mu\text{g/g}$, 相対標準偏差は 5.1% であった。乳35点で、最小値 $11.4 \mu\text{g/g}$, 最大値 $14.9 \mu\text{g/g}$, 平均値 $13.1 \mu\text{g/g}$, 標準偏差は $0.8 \mu\text{g/g}$, 相対標準偏差は 6.4% であった。また、前述のとおり、卵は管理基準を外れたものではなく、乳は1点のみであった。

測定結果に経時的な数値の上昇や低減は見られず、また、合成標準不確かさと管理試料測定値の標準偏差の値に大きな差がないことから、そのばらつきは許容範囲内であり検査精度は維持されていると判断された。

結 論

食物アレルゲン ELISA 検査の測定結果の信頼性を確保することを目的として、まず、管理試料を用いて試験所内不確かさ評価を行った。次に、得られた不確かさと管理試料の測定値を指標として、検査の有効性判断を行う内部精度管理を検討した。それにより、有効性が疑われる検査を検出することが可能となった。さらに、管理試料の測定値を記録してグラフ化しその推移を継続的にモニタリングすることで、試験所内検査精度が維持されているか否かを確認することが可能となった。これらの手法によって試験所内の内部精度管理を簡便に行うことが可能であることが示された。

文 献

- 1) 松原優里, 他. “日本における食物アレルギー患者数の推計: 疫学調査の現状と課題”. アレルギー, 67巻, 6号, 767-773 (2018).
- 2) Kojima, T., Takenaka, R., Mihara, T., Tsuchita, H, Ohki, S. Accuracy management system for food analysis. Milk Science, **56**(4), 187-197 (2008).
- 3) Yasui, A. For Quality Control and Quality Assurance in Food Analysis. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, **54**(7), 356-361 (2007).
- 4) 今井秀孝. “第2章不確かさ評価の理論的背景 2.1 GUM

- の基本理念”, 測定不確かさ評価の最前線 (一般財団法人日本規格協会), p. 41 (ISBN978-4-542-30184-9)
- 5) 安井明美. 標準物質, *Nihon Shokuhin Kagaku Kougak-kai*, (JAPANESE SOCIETY FOR FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY), **58**(1), p. 30 (2011)
  - 6) Masayama, A., Kiyota, K., Murakami, T., Ki, M., Takatori, S., Kajimura, K., Yamano, T. Uncertainty estimation of quantitative food allergen analysis by ELISA for internal. Quality control. *Oosakashiritsu Kankaken Houkoku*, **78**, 37–41 (2016).
  - 7) Thompson, M. and Wood, R. International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical laboratories. *J. AOAC Int.*, **76**(4), 926–940 (1993).
  - 8) Sugimoto, T. Daily Internal Quality Control in Food Analytical Laboratories., *Mycotoxins*, **59**(2), 119–122 (2009).