

(別添 1)

アレルギー物質を含む食品の検査方法

序文

本検査法は、特定原材料等の表示制度を科学的に検証する目的で、現時点で最も信頼性の高いと考えられる方法によって構成されたものである。該当する検査対象検体は流通する食品原料、添加物及び加工食品であるが、本検査法を全ての食品へ適用することは、實際上不可能である。さらに応用例を蓄積し、問題点を改訂していくこととしているので、御留意願いたい。

なお加工による特定原材料成分の変化・分解や食品からの特定原材料成分の抽出効率の変動により、本検査法による特定原材料総タンパク質含有量の測定結果は実際の含有量と必ずしも正確に一致しない。

1. 検査原則及び試料調製法

1.1. 検査原則

当検査は、あらゆる加工食品が検査対象検体として想定されるため、その性状により測定結果は変動する。これらを縮小するための原則について記す。

- ・ 検査対象検体は、一包装を一単位とする。
- ・ 検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とする。
- ・ 試料中の特定原材料成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に均質化操作を行う。
- ・ 均質化した試料を調製試料とする。
- ・ 検査に供する調製試料は固体や液体の性状に関わらず、重量測定にて一定量を採取する。
- ・ 試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない場所で行う。
- ・ 微量測定のため、粉砕器、フードカッター、秤量用器具は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。あるいは超音波洗浄機を用い、30 分間の超音波処理を行う。
- ・ 試料の調製場所と検査場所は、区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐ。

1.2. 試料調製法

食品一包装単位に含まれる可食部全体を試料とする。その後、試料の全量を粉砕器あるいはフードカッター等*で十分に破碎し、均質混和して調製試料とす

る。

*エースホモジナイザーAM-11(日本精機製作所社製)、レッチェ GM200 (レッチェ社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

注)

- ①インスタント食品（カップ麺、カップスープ等）には、スープ、かやく及び麺などに小分けされ包装されているものが含まれる。そのような包装形態を持つインスタント食品については全体を一包装単位として考え、小分け包装されたもののすべてを混合し、次いで均質化操作を行った後に調製試料とする。
- ②幕の内弁当などの組み合わせ食品では弁当全体を一包装単位として考え、ご飯、おかず及び小分け包装された調味料等のすべてを混合し、次いで均質化操作を行った後に調製試料とする。

2. 特定原材料等の検査方法

特定原材料等の検査方法は、以下を満たすものを用いること。

- ・ 定量検査法においては、試験室数 8 以上、試料数 5 以上（ただし、試料に含まれる特定原材料タンパク質濃度レベルには、10 µg/g を含むこと）で実施した試験室間バリデーションで、50%以上、150%以下の回収率及び 25%以下の室間精度であること。
- ・ 定性検査法においては、試験室数 6 以上、試料数 5 以上で実施した試験室間バリデーションで、特定原材料タンパク質を含む試料についての陽性率は90%以上、ブランク試料における陰性率は90%以上とする。定量検査法より特異性が高いことを示すデータの提示が必要である。なお、特定原材料タンパク質を含む試料のタンパク質濃度レベルには10 µg/gを含むことが望ましい。
- ・ これら試験室間バリデーションの結果及び偽陽性、偽陰性のデータについて、説明書等に添付し、公表していること。
- ・ これらの検査方法の評価にあたって、参考として添付した「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に準拠していること。

2.1. 定量検査法

2.1.1. 定量検査法の概要

食品中の特定原材料等由来のタンパク質を定量的に検出する手法である。一般的には、抗原抗体反応を利用したELISA法が用いられる。

なお、ELISA法以外の定量検査法を用いることは妨げないが、この場合には、この検査法と同等あるいは同等以上の性能をもっていること。

操作にあたっては、試薬、注意事項を含め各検査の説明書に記載された手技に従って検査する。

2.1.2. 定量検査法の結果の判定

食品採取重量1gあたりの特定原材料等由来のタンパク質含量が10 μ g以上の試料については、微量を超える特定原材料が混入している可能性があるものと判断する。（ただし、えび、かにの場合には、これらを区別できず、甲殻類としてまとめて検出される。）

なお、1度目の測定を行った結果、得られた数値が8-12 μ g/gの範囲内にある場合には、再度、同じ調製試料からの操作をあらためて行い、2度目の測定を行う。測定結果の判定は、1度目に得られた値と2度目に得られた値とを平均した値で行う。調製試料から2度目の採取が不可能である場合には、別の同検査対象検体を入手し検査を行う。

また、ELISA法を用いる場合にあっては、以下の点に注意すること。

- ・ ELISA法を用いて得られた測定結果において、3ウェル間のCV値が20%以上を示した場合には、再度ELISA操作以降の操作を行う。
- ・ 各濃度の標準液から得られた測定値に4係数logistic曲線をフィッティングして得られた検量線から各ウェルの特定原材料等由来のタンパク質濃度を算出し、得られた値に各検査毎に定められた希釈倍率を乗じて食品採取重量あたりの特定原材料等由来のタンパク質量を算出する。

2.2. 定性検査法

2.2.1. 定性検査法の概要

定性検査法には、ウェスタンブロット法やPCR法がある。一般に、卵、乳については、ウェスタンブロット法が用いられる。一方、小麦、そば、えび、かに、落花生については、一般にPCR法が用いられる。

なお、ウェスタンブロット法、PCR法以外の定性検査法を用いることは妨げないが、この場合には、これらの検査法と同等あるいは同等以上の性能をもっていること。

操作にあたっては、試薬、注意事項を含め各検査の説明書に記載された手技に従って検査する。

2.2.2. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法においては、各特定原材料等由来のタンパク質の分子量（SDS-PAGEにおける見かけ上の分子量：卵白アルブミン M.W. 50,000、オボムコイド M.W. 38,000、カゼイン M.W. 33,000-35,000、 β -ラクトグロブリン M.W. 18,400）付近に明瞭なバンドが検出されたものを陽性と判定する。適宜、標準液のバンド位置を参照して判定する。なお、陽性対照として検査対象の卵あるいは乳の標準液（1 μ g/mL）が検出されているかどうか確認する。標準液（1 μ g/mL）が検出されない場合は、検査が不適であると考え、再度試料の調製から行う。卵タンパク質測定の際は、卵白アルブミンあるいはオボムコイド、乳タンパク質測定の際はカゼインあるいは β -ラクトグロブリンのどちらか一方の抗体を用いて陽性の場合、各特定原材料（卵、乳）が微量を超える混入があると判断する。

2.2.3. PCR法

食品からのDNA抽出精製法（2.2.3.2.）に従いDNA抽出を行い、得られたDNA試料液を用いて以下に示す定性PCRを行う。なお、DNA抽出は1調製試料につき2点並行で行い、それ以降、PCR増幅産物の確認に至るまでの全操作は、この2点に対し独立並行で行う。

2.2.3.1. 試料調製法

1.1. 及び1.2. に従って、試料を調製する。

ただし、試料中、ミキサーミル等を用いた単純な粉砕により均質化が困難なものについては、均質化処理過程において、試料と同重量の水を加え、十分に均質化操作を行う。その後、凍結乾燥処理を行い、再度粉砕操作を行ったものを調製試料とする。また、試料が液体の場合には、ミキサーミル等を用いた均質化を行った後、凍結乾燥処理に供し、処理後、再びミキサーミル等を用いた粉砕処理を経たものを調製試料とする。

2.2.3.2. DNA抽出精製法

界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）とフェノール/クロロホルム混合液を用いてDNAを抽出精製するCTAB法は、応用範囲が広い上、PCR阻害物質が残存しにくく、純度の高いDNAを得ることが出来る非常に優れた方法であるが、クロロホルム等の有害試薬、及び煩雑な精製操作が必要である。これに対し、市販のDNA抽出キットを用いることで比較的簡易にDNAの抽出精製を行うことが可能である。市販のDNA抽出キットには、シリカゲル膜タイプキット、イオン交換樹脂タイプキット等がある。これらのキットはそれぞれに特徴を有

するため、各検査対象検体に適した方法にてDNAの抽出を行う。本項では、CTAB法とシリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini）、イオン交換樹脂タイプのキット（QIAGEN Genomic-Tip 20/G）を用いた精製法を記す。なおDNAの抽出精製の際に用いる水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製したRO水または蒸留水をMilli-Q等で17 M Ω /cmまで精製した超純水を121℃、20分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

2.2.3.2.1. シリカゲル膜タイプキット法^{*1}

調製試料2 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り^{*2}、同遠沈管に予め65℃に温めておいたAP1緩衝液10 mLとRNase A 10 μ Lを加える。その後、試料塊が残らないようボルテックスミキサーで激しく混合し、65℃で15分間加温する。その間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。加温処理後、AP2緩衝液3,250 μ Lを加え室温で5分間静置し、その後、室温下、3,000 x gの条件で5分間遠心する。遠心終了後、速やかに上清を別の遠沈管に移す。次いで分取した上清をQIAshredder spin columnに負荷し、室温下、10,000 x g、の条件で2分間遠心する。得られた溶出液は新しいポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移しておく。この際、1回あたりの負荷量は500 μ Lとし、得られた上清のうち3 mLを負荷し終えるまで数回繰り返す。最終的に得られた溶出液に、溶出液量の1.5倍量のAP3緩衝液・エタノール混液^{*3}を加え、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、溶解液を得る。得られた溶解液のうち500 μ Lをmini spin columnに負荷し、室温下、10,000 x gの条件で1分間遠心し溶出液を捨てる。次いで残りの溶解液のうち、さらに500 μ Lを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に溶解液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで、columnにAW緩衝液500 μ Lを負荷し、室温下、10,000 x gの条件で1分間遠心する。得られた溶出液を捨て、同じ操作をもう1度繰り返す。溶出液を捨てた後、mini spin columnを乾燥させるため、室温下、10,000 x g以上の条件で15分間遠心する。乾燥処理後、mini spin columnをキット付属の遠沈管に移し、予め65℃に温めておいた水 50 μ Lを加え、5分間静置した後、室温下、10,000 x gの条件で1分間遠心しDNAを溶出する。もう1度同様の溶出操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液（計100 μ L）とする。

^{*1} 本法は主に加工程度の低い検査対象検体（小麦粉、そば粉、落花生粉碎物、並びにそれらに準ずる加工食品）に適用が可能である。加工程度が高く、糖、並びに油脂成分含量の高い検査対象検体ではDNAの精製度が低く、DNA量としても十分な量が抽出されないことがあるため留意する。また、本法によりDNAが抽出されない調製試料については、2.2.3.2.2. に示すイオン交換樹脂タイ

プキット法を用いたDNA抽出を試みる。

*2 試料の調製、採取は2.2.3.1.に記載の方法に従う。

*3 AP3緩衝液・エタノール混液

AP3緩衝液とエタノール（96-100 %）を1 : 2 (V/V)の割合で混合したものをAP3緩衝液・エタノール混液とする。

2.2.3.2.2. イオン交換樹脂タイプキット法^{*1}

調製試料2 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採る^{*2}。同遠沈管にG2緩衝液^{*3} 7.5 mLを加えてボルテックスミキサーで激しく混合し、混合後さらにG2緩衝液7.5 mL、並びに α -アミラーゼ^{*4}（1 mg/mL）200 μ Lを加え再びボルテックスミキサーで混合する。混合処理後、37°Cで1時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。加温処理後、Proteinase K^{*5} 100 μ LならびにRNase A 20 μ Lを加えボルテックスミキサーで混合し、その後、50°Cで2時間加温する。この間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。次いで、低温下（4°C）、3,000 x g 以上の条件で15分間遠心する。遠心終了後得られる上清をポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移す。移し終えた後、溶液中に浮遊する残存物を除くためさらに軽く遠心する。この遠心操作の間にQIAGEN Genomic-Tip 20/GをQBT緩衝液^{*3} 1 mLを用いて平衡化しておく。遠心操作終了後の上清を平衡化済みQIAGEN Genomic-Tip 20/Gに2 mLずつ数回に分けて負荷する。上清全量の負荷操作を終了した後、tipにQC緩衝液^{*3} 2 mLを負荷し、洗浄する。同様の洗浄操作を合計3回繰り返した後、tipを新しいポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移し変える。洗浄操作終了後のtipに予め50°Cに温めておいたQF緩衝液^{*3} 1 mLを加えDNAを溶出する。同tipに対し、もう1度同様の溶出操作を行う。得られた計2 mLの溶出液に対し、0.7倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、低温下（4°C）、10,000 x g 以上の条件で15分間遠心し、沈殿^{*6}を除かないよう注意を払いつつ上清のみを除く。上清を除いた後の遠沈管に70 %エタノール 1 mLを加え、低温下（4°C）、10,000 x g 以上の条件で5分間遠心する。上清を捨て、残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて5分間程度の真空乾燥処理を行う。このとき完全に乾燥しないように注意する。沈殿が乾燥したことを確認した後、水100 μ Lを加え、65°C、5分間の条件での加温処理、ならびにピペッティングによりDNAを溶解させ、DNA試料原液とする。

*1 本法は主に加糖、油脂処理、加熱混合、発酵などの処理が施された加工程

度の高い検査対象検体に適用が可能である。また、本法によりDNAが抽出されない調製試料については、2.2.3.2.1.に示したシリカゲル膜タイプキット法を用いたDNA抽出を試みる。

- *2 試料の調製、採取は2.2.3.1.に記載の方法に従う。
- *3 G2緩衝液、QBT緩衝液、QC緩衝液、及びQF緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。
- *4 SIGMA社製 (Cat. No. A-6380)、または、同等の効力を持つものを用いる。
- *5 QIAGEN社製 (Cat. No. 19133)、または、同等の効力を持つものを用いる。
- *6 この沈殿が抽出されたDNAである。検査対象検体によってはDNAが極微量しか抽出されないため、目視する事が不可能な場合もあるが、遠沈管の底には沈殿があるということに注意を払いながら操作を行う。

2.2.3.2.3. CTAB法^{*1}

調製試料 2 gをポリプロピレン製遠沈管 (50 mL容) に量り採り、同遠沈管にCTAB緩衝液^{*2} 15 mLを加え、ホモジナイザーを用いて混合する。遠沈管の縁ならびにホモジナイザーの先端部を洗浄するように CTAB緩衝液 30 mLを加え、転倒混和後 55℃で30分間加温する。加温処理後、溶液を攪拌し、均質となった溶液 600 μ Lをマイクロ遠沈管 (1.5 mL容) に量り採る。次いで量り採った溶液に対し 500 μ Lのフェノール/クロロホルム混合液^{*3} を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁後、7,500 x g、室温条件下で15分間遠心し、分離した水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。この際、中間層にさわらないように注意する。分取した水層に対し、再び500 μ L のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液^{*4} を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁後、7,500 x g、室温条件下で15分間遠心し、分離した水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。分取した溶液に等容量のイソプロピルアルコール (室温) を加え、転倒混和後、7,500 x g、室温条件下で15分間遠心し、沈殿に留意しながらデカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、500 μ Lの70 %エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 x g、室温条件下で1分間遠心する。遠心後、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。遠沈管に残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて2～3分間の真空乾燥処理を行う。この時、完全に乾燥しないように注意す

る。50 μ LのTE緩衝液^{*5}を加えてよく混和し、その後、室温で15分間静置する。この間、数回転倒混和し、沈殿が完全に溶解する事を促す。得られた溶解液にRNase A 5 μ Lを加え、37℃で30分間加温する。加温処理後の溶液に200 μ LのCTAB 緩衝液、次いで250 μ Lのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁処理後、7,500 x g、室温条件下で15分間遠心し、分離した水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時、中間層にさわらないように分取する。分取した溶液に200 μ Lのイソプロピルアルコールを加え、転倒混和する。転倒混和後、7,500 x g、室温条件下で10分間遠心し、沈殿に留意しながらデカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、200 μ Lの70 %エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 x g、室温条件下で1分間遠心する。遠心後、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。遠沈管に残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて2～3分間の真空乾燥処理を行う。この時、完全に乾燥しないよう注意する。50 μ Lの水を加えて混合した後、室温下に15分間静置する。この間、数回転倒混和する事で沈殿が溶解することを促す。完全に溶解したものをDNA試料原液とする。

*1 シリカゲル膜タイプキット法ならびにイオン交換樹脂タイプキット法を実施し、その結果、2.2.3.2.4.に記載の方法にて定量を行い、充分量のDNAが抽出できない場合に実施する。

*2 CTAB緩衝液

ビーカーに、8 mL の0.5 mM EDTA (pH 8.0)、20 mL の1M Tris / 塩酸 (pH 8.0)及び56 mL の5 M NaCl水溶液を量り採り、混合した後、約150 mLとなるように水を加える。この溶液に対してセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 4gを攪拌しながら加え、完全に溶解する。さらに水を加え全量を200 mLとし、オートクレーブで滅菌したものをCTAB緩衝液とする。

*3 フェノール/クロロホルム混合液

1M Tris/塩酸 (pH 8.0) 飽和フェノールとクロロホルム/イソアミルアルコールを1 : 1 (v/v) の割合で混合したものをフェノール/クロロホルム混合液とする。

*4 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24 : 1 (v/v) の割合で混合したものをクロロホルム/イソアミルアルコール混合液とする。

*5 TE 緩衝液

各最終濃度が10 mM Tris/塩酸 (pH 8.0) 、 1 mM EDTA (pH 8.0) となるように水を用いて調製したものをTE 緩衝液とする。

2.2.3.2.4. DNAの精製度の確認と定量

DNA試料原液 5 μ Lを取り、TE緩衝液45 μ Lを加えて50 μ Lとし、200–320 nmの範囲で紫外吸収スペクトルを測定する。この際230 nm、260 nm及び280 nmの吸光度 (O.D. 230、O.D. 260及びO.D. 280*) を記録する。次いでO.D. 260の値の1を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出する。またO.D. 260 / O.D. 280を計算し、この比が1.2–2.5であることを確認する。吸光度比が1.2に達しない場合は抽出をやり直す。

2.2.3.2. に記載のある3種のDNA抽出法のうち、いずれかの抽出法を用いてDNA抽出を行い、吸光度測定を行った結果、O.D. 260の値として相当量のDNAの抽出が確認されない場合、また、上記条件を満たすDNA試料原液の品質が確認されない場合には、他の抽出法を用いて抽出操作を行う。

なお、2.2.3.3.2. 項に示すように、原則としてDNA試料液は20 ng/ μ Lの濃度で調製するが、検査対象検体によってはDNAの抽出効率が悪く、20 ng/ μ Lの濃度で調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、最も20 ng/ μ Lに近い濃度で調製し、DNA試料液とする。また、O.D. 260 / O.D. 280の吸光度比に関しては、1.2–2.5の範囲であることを原則とするが、3種の抽出法を行っても、上記条件を満たしたDNAが抽出されない場合には、原則のO.D. 260 / O.D. 280の吸光度比の範囲である1.2–2.5に最も近い値を示したDNA試料原液を用いてDNA試料溶液を調製し、PCR増幅を行う。

* O.D. 230値は糖、フェノール等の低分子化合物由来の吸光度であり、O.D. 260 / O.D. 230を計算する。この比が2.0を下回る場合には、上記夾雑物の影響によりPCR反応がうまく行われない場合がある。O.D. 260がDNA由来の吸光度、O.D. 280がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

2.2.3.3. 定性PCR法

定性PCR法においては、抽出されたDNAに含まれる目的塩基配列領域を、プライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドを用いてpolymerase chain reaction (PCR) * を行うことにより増幅し、その増幅産物を電気泳動法により分離、染色することで検出する。本法により、対象とする特定原材料を特異的に検知する事が可能であり、増幅産物の有無によって、検査対象検体中における特定原材

料の有無を判定する。

* PCRでは、鋳型DNAが極微量でも存在していれば目的塩基配列領域が増幅され得る。従って、実際の実験操作、ならびに日頃の実験環境の保全にあたり、DNA（特にPCR増幅産物）の混入に充分注意を払う必要がある。また、DNAは、人間の皮膚表面から分泌されているDNA分解酵素により分解されるため、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使用するチューブ、チップは使用する直前に121℃、20分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものを用い、使い捨てとする。またチップに関しては、滅菌済みフィルター付きチップを使い捨てで使用することも意図せざるDNAの混入防止に有効である。さらに、定性PCR法において用いる水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製したR0水または蒸留水をMilli-Q等で17 MΩ/cmまで精製した超純水を121℃、20分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

2.2.3.3.1. PCR増幅

定性PCR法により検知が可能な特定原材料は落花生、小麦、そば、えび、かにの5種である。その各につきPCR増幅の条件が異なる。2.2.3.3.2. から2.2.3.3.6. に記載するPCR増幅条件のうち、検知対象とする特定原材料種に即したPCR条件を用いて検査を行う。また、各検査とも、1調製試料より2点並行で抽出されたDNAの各を規定濃度に調製した後、PCR法の鋳型DNAとして供する。PCR増幅は、まず、植物DNA検出用プライマー対^{*1*3}または動物DNA検出用プライマー対^{*2*3}を用いて行い、その結果を2.2.3.5. 項に記載のある判定例に照らして判じ、判定に準じた2度目のPCR増幅を各特定原材料検出用プライマー対を用いて行う。

1 植物DNA検出用のプライマー対及び増幅バンド長^{}は以下のとおりである。

植物DNA検出用プライマー対

F-primer (CP03-5') : 5'-CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T-3'

R-primer (CP03-3') : 5'-TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A-3'

増幅バンド長

124 bp

使用機器、反応液の調製法、ならびにPCR反応条件ともに2.2.3.3.2. 記載の落花生の検知を目的としたPCR増幅に同じ。

2 動物DNA検出用のプライマー対、増幅バンド長^{}及び反応条件等^{*}は以下のとおりである。

動物DNA検出用プライマー対

F-primer

AN1-5' : 5'-TGA CCG TGC GAA GGT AGC-3'

AN2-5' : 5'-TAA CTG TGC TAA GGT AGC-3'

AN1-5'及びAN2-5'を1:1の比率で混合して使用する。

R-primer (AN-3') : 5'-CTT AAT TCA ACA TCG AGG TC-3'

増幅バンド長

370-470 bp

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、1 x PCR緩衝液*、0.20 mM dNTP、3.0 mM 塩化マグネシウム、0.2 μ M 5' 及び3' プライマー、及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼ* を含む液に、20 ng/ μ L に調製したDNA試料液* 2.5 μ L (DNAとして50 ng) を加え、全量を25 μ Lにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置*にセットする。反応条件は次の通りである。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5分間、50°C 0.5分間、72°C 0.5分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として72°Cで7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCR反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないもの並びにDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。

PCR緩衝液、Taq DNAポリメラーゼ、DNA試料液、PCR増幅装置については2.2.3.3.2. 記載の落花生の検知を目的としたPCR増幅の項を参照。

*3 植物DNA検出用プライマー対あるいは動物DNA検出用プライマー対は、広く植物DNAあるいは動物DNAを検知することを目的として設計されている。そのため、標的遺伝子には植物界あるいは動物界に広く分布し、高度に保存されている遺伝子を選定しているが、完全に保存されているものではなく、植物間あるいは動物間で塩基配列の挿入や欠失が認められるものがある。このため、検査対象検体によっては、得られる増幅バンド長に若干の違いが認められる場合があるので注意する。植物DNA検出用プライマー対あるいは動物DNA検出用プライマー対の選択は検査対象検体の原材料の特性に応じて行う。

2.2.3.3.2. 落花生の検知を目的としたPCR増幅

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、1 x PCR緩衝液*¹、0.20 mM dNTP、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.2 μ M 5' 及び3' プライマー*²、及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼ*³ を含む液に、20 ng/ μ L に調製したDNA試料液*⁴ 2.5 μ L (DNAとして50 ng) を加え、全量を25 μ Lにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置*⁵にセットする。反応条件は次の通りである。

95℃に10分間保ち反応を開始させた後、95℃ 0.5分間、60℃ 0.5分間、72℃ 0.5分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として72℃で7分間保った後、4℃で保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCR反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないもの並びにDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。検査手順としては、まず、植物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行い、その結果からPCR増幅に必要とされる品質を備えたDNAが抽出されていることの確認を行う。次いで、2.2.3.5. に記載のある判定例に従い、落花生検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行う。

*1 PCR緩衝液

PCR buffer II（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

*2 落花生検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (agg04-5') : 5'-CGA AGG AAA CCC CGC AAT AAA T-3'

R-primer (agg05-3') : 5'-CGA CGC TAT TTA CCT TGT TGA G-3'

増幅バンド長

95 bp

*3 Taq DNAポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

*4 原則としてDNA試料液は20 ng/μLの濃度で調製することとするが、検査対象検体によってはDNAの抽出効率が悪く、それ以下の濃度でしか調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、原則に最も近い最大の濃度で調製し、DNA試料液とする。

*5 PCR増幅装置

GeneAmp PCR System 9600、9700（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.3.3.3. そばの検知を目的としたPCR増幅

使用機器、反応液の調製法、ならびにPCR反応条件ともに2.2.3.3.2. 記載の落

花生の検知を目的としたPCR増幅に同じ。また、5' 及び3' プライマー*、をそば検出用プライマー対に変更する点を除いて、反応液組成も同一。

* そば検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (FAG19-5') : 5' -AAC GCC ATA ACC AGC CCG ATT-3'

R-primer (FAG22-3') : 5' -CCT CCT GCC TCC CAT TCT TC-3'

増幅バンド長

127 bp

2.2.3.3.4. 小麦の検知を目的としたPCR増幅

使用機器、反応液の調製法及びPCR反応条件ともに2.2.3.3.2. 記載の落花生の検知を目的としたPCR増幅に同じ。また、5' 及び3' プライマー*、を小麦検出用プライマー対に変更する点を除いて、反応液組成も同一。

* 小麦検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (Wtr01-5') : 5' -CAT CAC AAT CAA CTT ATG GTG G-3'

R-primer (Wtr10-3') : 5' -TTT GGG AGT TGA GAC GGG TTA-3'

増幅バンド長

141 bp

2.2.3.3.5. えびの検知を目的としたPCR増幅^{*1}

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、1 x PCR緩衝液^{*2}、0.20 mM dNTP、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.3 μ M 5' 及び3' プライマー^{*3}、及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼ^{*4} を含む液に、20 ng/ μ L に調製したDNA試料液^{*5} 2.5 μ L (DNAとして50 ng) を加え、全量を25 μ Lにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置^{*6}にセットする。反応条件は次の通りである。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 1分間、56°C 1分間、72°C 1分間を1サイクルとして、45サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として72°C で7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCR反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないもの並びにDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。検査手順としては、まず、植物DNA検出用プライマー対または動物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行い、その結果からPCR増幅に必要とされる品質を備えたDNAが抽出されていることの確認を行う。次いで、2.2.3.5. に記載のある判定例に従い、えび検出用

プライマー対を用いたPCR増幅を行う。

*1 シャンハイガニ、ダンジネスクラブ、タカアシガニ、ベニズワイガニ、マルズワイガニ、ワタリガニは、えびの検知を目的としたPCR増幅において増幅産物が検出される場合があることが確認されている。得られたPCR増幅産物がえびに由来するものかこれらのかに由来するものか判断がつかない場合は、PCR増幅産物を以下の制限酵素処理に供し判断する。

PCR増幅反応液17 μ L、制限酵素10×Mバッファー2 μ L*、制限酵素HaeIII 1 μ L*を混合し、37℃で16時間処理する。得られた反応液を2.2.3.4. のアガロースゲル電気泳動により分析し、えび由来の制限酵素消化断片を確認する。

制限酵素10×Mバッファー及び制限酵素HaeIIIはタカラバイオ(株)製及び同等の結果が得られるものを用いる。

制限酵素処理断片の長さ

149bp

但し、えびDNA検出用プライマー対は、甲殻類の十脚目に属する様々なえびのDNAを検知することを目的として設計されているため、えびの種間で塩基配列の挿入や欠失が認められるものがある。このため、検査対象によっては、得られる制限酵素処理断片の長さに若干の違いが認められる場合があるので注意する。

*2 PCR緩衝液

PCR buffer II (アプライドバイオシステムズ社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

*3 えび検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (ShH12-05') :

5'-TTA TAT AAA GTC TRG CCT GCC-3'

ShH12-05'は3'末端から8塩基目をAとGの混合塩基(R)として合成する。

R-primer (ShH13-03') :

ShH13-03'-1: 5'-GTC CCT CTA GAA CAT TTA AGC CTT TTC-3'

ShH13-03'-2: 5'-GTC CCT TTA TAC TAT TTA AGC CTT TTC-3'

ShH13-03'-3: 5'-GTC CCC CCA AAT TAT TTA AGC CTT TTC-3'

ShH13-03'-1、ShH13-03'-2、ShH13-03'-3を1:1:1の比率で混合して使用する。

増幅バンド長

187 bp

えび DNA 検出用プライマー対は、甲殻類の十脚目に属する様々なえびの DNA を検知することを目的として設計されている。そのため、えびの種間で塩基配列の挿入や欠失が認められるものがある。このため、検査対象によっては、得られる増幅バンド長に若干の違いが認められる場合があるので注意する。

***4 Taq DNAポリメラーゼ**

AmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

***5** 原則としてDNA試料液は20 ng/ μ Lの濃度で調製することとするが、検査対象検体によってはDNAの抽出効率が悪く、それ以下の濃度でしか調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、原則に最も近い最大の濃度で調製し、DNA試料液とする。

***6 PCR増幅装置**

GeneAmp PCR System 9600、9700、Veritiサーマルサイクラー（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。GeneAmp PCR System 9700、Veritiサーマルサイクラーを使用する場合は9600 Emulation Modeで行う。

2.2.3.3.6. かにの検知を目的としたPCR増幅

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、1 x PCR緩衝液^{*1}、0.20 mM dNTP、2.0 mM 塩化マグネシウム、0.2 μ M 5' 及び3' プライマー^{*2}、及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼ^{*3} を含む液に、20 ng/ μ L に調製したDNA試料液^{*4} 2.5 μ L（DNAとして50 ng）を加え、全量を25 μ Lにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置^{*5}にセットする。反応条件は次の通りである。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5分間、54°C 0.5分間、72°C 0.5分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行った後、4°Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCR反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないもの並びにDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。検査手順としては、まず、植物DNA検出用プライマー対または動物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行い、その結果からPCR増幅に必要とされる品質を備えたDNAが抽出されていることの確認を行う。次いで、2.2.3.5.に記載のある判定例に従い、かに検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行う。

*1 PCR緩衝液

PCR buffer II（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

*2 かに検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (CrH16-05') :

CrH16-05'-1: 5'-GCG TTA TTT TTT TTG AGA GTT CWT ATC GTA-3'

CrH16-05'-2: 5'-GCG TAA TTT TTT CTG AGA GTT CTT ATC ATA-3'

CrH16-05'-3: 5'-GCG TTA TTT TTT TTA AGA GTA CWT ATC GTA-3'

CrH16-05'-4: 5'-GCG TTA TTT CTT TTG AGA GCT CAT ATC GTA -3'

CrH16-05'-1 及び CrH16-05'-3 は 3'末端から 8 塩基目を A と T の混合塩基 (W) として合成する。

CrH16-05'-1、CrH16-05'-2、CrH16-05'-3、CrH16-05'-4 を 10:1:6:3 の比率で混合して使用する。

R-primer (CrH11-03') : 5'-TTT AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA AGT-3'

増幅バンド長

62 bp

*3 Taq DNAポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

*4 原則としてDNA試料液は20 ng/ μ Lの濃度で調製することとするが、検査対象検体によってはDNAの抽出効率が悪く、それ以下の濃度でしか調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、原則に最も近い最大の濃度で調製し、DNA試料液とする。

*5 PCR増幅装置

GeneAmp PCR System 9600、9700、Veritiサーマルサイクラー（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。GeneAmp PCR System 9700、Veritiサーマルサイクラーを使用する場合は9600 Emulation Modeで行う。

2.2.3.4. アガロースゲル電気泳動

PCR増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分析し、DNA増幅バンドを確

認する。

2.2.3.4.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE緩衝液^{*1}を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に100 mL当たり5 μ Lのエチジウムブロミド溶液 (10 mg/mL) ^{*2} を加え、ゲルが50℃前後まで冷えたらゲルメーカーにゲルを流し込み、十分に室温で冷やし固めてゲルを作製する^{*3}。ゲルはすぐに使用する事が望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することが可能である。ゲルの濃度は泳動するDNAの長さに応じて決める必要があるので、泳動する目的産物のバンド長にあわせてゲル濃度 (2.0-4.0 %) を決める。(特定原材料の検知においては2.5-4.0%濃度のアガロースゲルを使用するのが適当である)

*1 TAE緩衝液

各最終濃度が40 mM Tris-酢酸、1 mM EDTAとなるように蒸留水を用いて調製したものをTAE緩衝液とする。

*2 エチジウムブロミド

2本鎖DNAの鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いの際には必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

*3 前染色

ここでは、前染色法について述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.2.3.4.3. に述べる後染色法に従って、染色を行っても良い。(予想増幅バンド長の短い場合には、可視化を容易にするためにも後染色をすることが望ましい)

2.2.3.4.2. 電気泳動

TAE緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR増幅反応液7.5 μ Lと適量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ウェルへの注入に時間がかかりすぎると、DNAが拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100 V定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれるBPPBがゲルの2/3程度まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.2.3.4.3. ゲルの染色 (後染色)

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

ゲルが十分に浸る量のTAE緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液100 mL当たり、5 μ Lのエチジウムブロミド溶液（10 mg/mL）を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら20分程度染色する。その後、TAE緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、20分程度軽く振とうしながら脱染色を行う。

2.2.3.4.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ*を置き、その上に電気泳動及び染色操作を完了したゲルをのせて紫外線（312 nm）を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標準マーカーと比較して目的のバンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応するPCR増幅バンドが検出された場合は、DNA抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

* 食品包装用ラップ

ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

2.2.3.5. 結果の判定

2.2.3.5.1. 落花生を対象とした検査結果の判定

1 調製試料より2点並行で抽出したDNAを規定濃度に調製した後、鋳型DNAとして用い、PCR法を実施する。まず1度目のPCR増幅は植物DNA検出用プライマー対を用いて実施し、その結果、DNA試料液2点のいずれを用いた場合も共に124 bpのPCR増幅バンドが検出された場合には（下記植物DNA検出用プライマー対判定例試料番号1）、両試料液においてPCR増幅に必要な品質を有するDNAが抽出されたと判断し、次いで、落花生検出用プライマー対を用いたPCR増幅を各試料液に対し実施する。落花生検出用プライマー対を用いた2度目のPCR増幅の結果、DNA試料液2点の両方あるいは、そのいずれかにおいて95 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は落花生陽性と判定する（下記検出用プライマー対判定例試料番号1ならびに2）。また、1度目の植物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅の結果、DNA試料液2点のうちいずれかにおいてPCR増幅バンドが検出されなかった場合（下記植物DNA検出用プライマー対判定例試料番号2及び3）には、当該試料液を用いた検査を中止し、PCR増幅バンドが得られた試料液のみを鋳型として、検出用プライマー対を用いた2度目のPCR増幅を実施する。その結果、95 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は落花生陽性と判定する。なお、下記植物DNA検出用プライマー対判定例試料番号4

にあるように、植物DNA検出用プライマー対を用いた1度目のPCR増幅の結果において、DNA試料液2点ともにPCR増幅バンドが得られなかった場合には、PCR増幅に必要な品質を有するDNAが抽出されていなかったと判断し、2.2.3.2.に示されている先に用いたDNA抽出法以外の抽出法を試みる。2.2.3.2.に示されている3種のDNA抽出法を用いても、同様の結果が得られる場合には、当該検査対象検体からのDNA抽出が不可能であり、PCR法による検知不能と判断する。以下に判定例を示す。

植物DNA検出用プライマー対判定例

	試料番号	1	2	3	4
抽出1		+	+	-	-
抽出2		+	-	+	-
		事例1	事例2		事例3

+：増幅バンド検出、-：増幅バンド非検出

事例1：検出用プライマー対を用いたPCR増幅をDNA試料液2点に対し行う。

事例2：増幅バンドの得られたDNA試料液のみに対して、検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行う。

事例3：本法によるDNA抽出は困難であると判断し、DNA抽出法の最適化を図る。3種のDNA抽出法を試みてなお、同じ結果のみ得られる場合には、当該検査対象検体からのDNA抽出は不可能であり、PCR法による検知不能と判断する。

検出用プライマー対判定例

	試料番号	1	2	3
抽出1		+	+	-
抽出2		+	-	-
判定		陽性	陽性	陰性

+：増幅バンド検出、-：増幅バンド非検出

2.2.3.2.に記したとおり、検査対象検体に最適な抽出法を選択しなかった場合、量、質ともにPCRの鋳型となりうるDNAを抽出することが難しい。PCR法に供するDNA試料液は最適な抽出法にて抽出、精製され、原則として2.2.3.2.4.に示す基準を満たしているものとする。

2.2.3.5.2. そばを対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpまたは370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、そば検出用プライマー対を用いたレーンで127 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はそば陽性と判定する。なお、

結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.3.5.3. 小麦を対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpまたは370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、小麦検出用プライマー対を用いたレーンで141bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は小麦陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.3.5.4. えびを対象とした検査結果の判定

植物または動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpまたは370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、えび検出用プライマー対を用いたレーンで187 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はえび陽性と判定する。但し、えび検出用プライマー対を用いたPCR増幅反応では、現在までの検討から、シャンハイガニ、ダンジネスクラブ、タカアシガニ、ベニズワイガニ、マルズワイガニ、ワタリガニが偽陽性を示す場合があることが確認されている。従って、得られたPCR増幅産物がえびに由来するものかこれらのかにに由来するものか判断がつかない場合は、PCR増幅産物の制限酵素消化を2.2.3.3.5.記載の方法で行い、えび由来PCR増幅産物の酵素消化断片（149 bp）を確認する*。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

* 制限酵素消化

制限酵素消化処理後においてもシャンハイガニは偽陽性を示すことが確認されている。

2.2.3.5.5. かにを対象とした検査結果の判定

植物または動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpまたは370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、かに検出用プライマー対を用いたレーンで62 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はかに陽性と判定する*。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

* 偽陽性を示すかにの種類

シャコは偽陽性を示すことが確認されている。その他にも一部のえびで偽

陽性を示すものがあることが確認されている。

3. 留意点

食品中の特定原材料等に係る検査は、原則として別添2の「判断樹」に従って実施する。別添3の「判断樹について」も必ず参照すること。

なお、本検査方法において使用する標準品の規格を別添4に示すので、検査を行う場合の参考にされたい。