

(別添1)

## 特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生）の検査方法

### 序文

本検査法は、特定原材料 5 品目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、実際上不可能である。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実施する。
- ・ 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

粉碎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 5 品目の検査方法

### 卵、乳、小麦、そば、落花生の検査方法

#### 2.1. ELISA 法

食品中の特定原材料由来のタンパク質を検出する手法である。調製試料に対して、改良された複合抗原認識抗体を用いた日本ハム (株) 製 FASTKIT エライザ Ver. II シリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、落花生) と改良された単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた (株) 森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生) の両キットを用いるか、複合抗原認識抗体を用いた日本ハム (株) 製 FASTKIT エライザシリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、落花生) と単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた (株) 森永生科学研究所製特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生) の両キットを用い、検査を行う。

#### ELISA 法を用いた測定検査における注意事項

・改良された単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた (株) 森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キットを用いた測定検査においては、乳を検知対象とする場合にはカゼインキットを用いて測定を行う。当該キットは加工食品への適用範囲が比較的広い。

・単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた（株）森永生科学研究所製特定原材料測定キットを用いた測定検査においては、卵を検知対象とする場合には卵白アルブミンキット、乳を検知対象とする場合にはカゼインキットを用いて測定を行う。上記両キットは加工食品への適用範囲が比較的広い。

・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。

・1度目の測定を行った結果、得られた数値が8-12  $\mu\text{g/g}$ の範囲内にある場合には、再度、同じ調製試料から2g採取し、抽出操作以降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。なお、改良された複合抗原認識抗体を用いた日本ハム（株）製FASTKIT エライザ Ver. IIシリーズ（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）と改良された単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた（株）森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット（卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生）の両キットを用いた場合の2度目の測定は、調製試料の採取量について2gを1gと読み替えて、同様の操作を行う。

#### 2.1.1. 改良検査法について

改良された複合抗原認識抗体を用いた日本ハム（株）製FASTKIT エライザ Ver. IIシリーズ（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）と改良された単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた（株）森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット（卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生）の両キットを用いる場合には、2.1.1.1. から 2.1.1.4. までの方法により検査を行うこと。

##### 2.1.1.1. 改良検査法における検体抽出操作

調製試料1gをプラスチック製遠沈管(50 mL容)に量り採り、検体抽出液\*1 19 mLを加え、よく振り混ぜて混合し、固形分を均等に分散させる。この際に、あまり泡立たせないよう注意しながら、ボルテックスなどを用いて試料を十分に分散させる。振とう機に遠沈管を横にして置き、室温で一晩（12時間以上）振とうしながら抽出する。振とう回数は1分間に90から110往復程度、振とう幅は3 cm程度として、振とうにより液が遠沈管の両端に打ち付けるようになるくらいに調整する。時々遠沈管の上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿っ

て付着する調製試料を分散させる。

抽出液の pH を確認し、必要であれば、中性付近 (pH 6.0-8.0) となるように調整<sup>\*2</sup>する。室温で、3000×g の条件で 20 分間遠心し、遠心後に得られる上清を別の容器に分取する。分取する上清の量はなるべく一定とする。沈査が得られない場合はろ過を行う。可能であれば油層を除く。

#### \*1 検体抽出液

日本ハム (株) 製FASTKITエライザVer. IIシリーズを用いた検査については、付属の抽出用試薬①、抽出用試薬②、抽出用試薬③、精製水を1:1:1:17の比率で混合したものを、(株) 森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キットを用いた検査については、付属の検体希釈液 (20倍濃縮液)、抽出用A液、抽出用B液、精製水を1:1:1:17の比率で混合したものをを用いる。なお、両者は同一の組成である。

あるいは、ラウリル硫酸ナトリウムと2-メルカプトエタノールを含む緩衝液又はこれと同等のものを用いる。

#### \*2 pH調整

pHを測定し、調整が必要な場合には適宜、調整を行う。また、調整に要したアルカリ (あるいは酸) 溶液の液量を2.1.1.4.の項にある希釈倍率に加味し、最終的な特定原材料由来のタンパク質含有量算出を行う。

### 2.1.1.2. 改良された複合抗原認識抗体を用いた日本ハム (株) 製 ELISA キット (FASTKIT エライザ Ver. II シリーズ) の実験操作

試薬、注意事項等を含め、複合抗原認識抗体を用いたELISAキットの説明書に記載された手技に従って試験する。以下、方法について記述する。

試験開始前に、希釈用緩衝液を室温<sup>\*1</sup>に戻し、キットに添付された抗体固相化プレートはアルミパウチを開封せずに室温に戻しておく。抽出操作で得られた上清又はろ過液 100 μLに対して希釈用緩衝液1,900 μLを加え、混合し測定溶液とする。測定溶液、ならびに検量線作成用に調製した標準溶液<sup>\*2</sup>の各々を1 ウェルあたり100 μLずつ加える。プレート用カバーを取り付け、各溶液がウェル一様に広がるように軽く振とうした後に、室温で60分間静置する。静置後、ウェル内の各溶液を捨て、1回あたり250-300 μLの洗浄液<sup>\*3</sup>を用いてウェルを5回洗浄する。洗浄後、1ウェルあたり100 μLのビオチン結合抗体溶液<sup>\*4</sup>を加え、カバーを取り付けてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で60分間静置する。静置後、ウェル内のビオチン結合抗体溶液を捨て、洗浄液を用いてウェルを5回洗浄する。次いで、1 ウェルあたり100 μLの酵素-ストレプトアビジ

ン結合物溶液<sup>\*5</sup>を加え、カバーを取り付けてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で30分間静置する。静置後、ウェル内の酵素-ストレプトアビジン結合物溶液を捨て、洗浄液を用いてウェルを5回洗浄する。洗浄後、1 ウェルあたり100  $\mu$ Lの発色剤<sup>\*6</sup>を加え、カバーを取り付けてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で20分間静置する。次いで、1 ウェルあたり100  $\mu$ Lの反応停止液を加え発色反応を停止させる。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の条件で吸光度を測定する。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特定原材料由来のタンパク質の濃度を求める。なお、同一の実験を3 ウェル並行で行い、各ウェルから得られた値を平均化する。

**\*1 室温**

室温とは20-25  $^{\circ}$ Cとする。

**\*2 標準溶液**

キット付属の説明書に従い、標準溶液(50 ng/mL)を標準品希釈液を用いて順次希釈したものとする。標準品希釈液は、検体抽出液を希釈用緩衝液で20倍に希釈して調製する。

**\*3 洗浄液**

キット付属の濃縮洗浄液を、精製水を用いて10倍希釈して調製する。

**\*4 ビオチン結合抗体溶液**

キット付属のビオチン結合抗体を希釈用緩衝液で100倍希釈する。希釈操作はプレートに加える直前に行う。

**\*5 酵素-ストレプトアビジン結合物溶液**

キット付属の酵素-ストレプトアビジン結合物を希釈用緩衝液で100倍希釈する。希釈操作はプレートに加える直前に行う。

**\*6 発色剤**

使用前に室温に戻しておく。

2.1.1.3. 改良された単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた(株)森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キットの実験操作

試薬、注意事項等を含め、単一あるいは精製抗原認識抗体を用いたELISAキッ

トの説明書に記載された手技に従って試験する。以下、方法について記述する。

予め、抗体固相化モジュールをアルミパウチを開封せずに室温<sup>\*1</sup>に戻した後、フレームに必要量セットする。抽出操作で得られた上清又はろ過液 100  $\mu\text{L}$ に対して検体希釈液 I <sup>\*2</sup>1,900  $\mu\text{L}$ を加え、混合し測定溶液とする。測定溶液、ならびに検量線作成用に調製した標準溶液<sup>\*3</sup>の各々を1ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ ずつ加える。各溶液がウェル一様に広がるように軽く振とうし、モジュール用フタを取り付けた後、室温で60分間静置する。静置後、ウェル内の各溶液を捨て、1回あたり250-300  $\mu\text{L}$ の洗浄液<sup>\*4</sup>を用い、6回繰り返しの洗浄操作を行う。洗浄後、1ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ の酵素標識抗体溶液<sup>\*5</sup>を加え、ウェル一様に広がるよう軽く振とうし、フタをした後に、室温で30分間静置する。静置後、ウェル内の酵素標識抗体溶液を捨て、洗浄液を用いて6回の洗浄操作を行う。洗浄後、1ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ の酵素基質溶液<sup>\*6</sup>を加え、ウェル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分間静置する。静置後、反応停止液100  $\mu\text{L}$ を加え、発色反応を停止させる。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の条件で吸光度を測定する<sup>\*7</sup>。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特定原材料由来のタンパク質の濃度を求める。なお、同一の実験を3ウェル並行で行い、各ウェルから得られた値を平均化する。

**\*1 室温**

室温は20-25  $^{\circ}\text{C}$ とする。

**\*2 検体希釈液 I**

キット付属の検体希釈液(20倍濃縮液)を精製水で20倍に希釈し、検体希釈液 I とする。

**\*3 標準溶液**

使用前に室温に戻し、キット付属の説明書に従い、標準品 (50 ng/mL)を検体希釈液 II を用いて順次希釈し標準溶液とする。検体希釈液 II は、検体抽出液を検体希釈液 I を用いて20倍に希釈して調製する。

**\*4 洗浄液**

キット付属の洗浄液を、精製水を用いて20倍希釈して調製する。

**\*5 酵素標識抗体溶液**

使用前に室温に戻しておく。

\*6 酵素基質溶液

使用前に室温に戻しておく。

\*7 測定

吸光度の測定は、反応停止後30分以内に行う。

2.1.1.4 改良検査法における結果の判定

各濃度の標準液から得られた吸光度に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由来のタンパク質濃度を算出し、得られた値に希釈倍率\*を乗じて食品採取重量あたりの特定原材料由来のタンパク質量を算出する。2.1.1.2. 及び2.1.1.3. で得られた食品採取重量1 gあたりの特定原材料由来のタンパク質含量が10  $\mu$ 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。

\* 希釈倍率

希釈倍率は400となる。

2.1.2. 従来検査法について

複合抗原認識抗体を用いた日本ハム（株）製 FASTKIT エライザシリーズ（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）と単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた（株）森永生科学研究所製特定原材料測定キット（卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生）の両キットをもちいる場合には、2.1.2.1. から2.1.2.3. までの方法により検査を行うこと。

2.1.2.1. 複合抗原認識抗体を用いた日本ハム（株）製 ELISA キット（FASTKIT エライザシリーズ）の実験操作

試薬、注意事項等を含め、複合抗原認識抗体を用いたELISAキットの説明書に記載された手技に従って試験する。以下、方法について記述する。

調製試料2 gをホモジナイザー専用カップあるいはポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り、抽出用緩衝液\*<sup>1</sup>38 mLを加え、ホモジナイザー\*<sup>2</sup>を用いて攪拌操作を行う\*<sup>3</sup>。攪拌した後、溶液のpHを確認し、必要であれば、中性付近（pH 6.0-8.0）となるように調整\*<sup>4</sup>する。その後、同様の攪拌操作を2回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行う\*<sup>5</sup>。抽出操作終了後、低温（4 °C）、3,000 x gの条件で20分間遠心し、遠心後に得られる上清を分取し濾過する。次いで、得られた濾過液 100  $\mu$ Lに対して希釈用緩衝液900  $\mu$ Lを加え、混合し、当混合溶液を

測定溶液とする。抗体固相化プレート中、使用するウェルを1回あたり250-300  $\mu\text{L}$  の洗浄液<sup>\*6</sup>を用いて5回繰り返し洗浄した後に、測定溶液、ならびに検量線作成用に調製した標準溶液<sup>\*7</sup>の各々を1 ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ ずつ加える。モジュール用フタを取り付け各溶液がウェル一様に広がるように軽く振とうした後に、室温<sup>\*8</sup>で60分間静置する。静置後、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う。洗浄後、1ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ のビオチン結合抗体溶液を加え、フタをしてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で60分間静置する。静置後、ビオチン結合抗体溶液を捨て、洗浄液を用いて5回のウェル洗浄操作を行う。次いで、1 ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ の酵素-アビジン結合物溶液を加え、フタをしてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で30分間静置する。静置後、酵素-アビジン結合物溶液を捨て、洗浄液を用いて5回の洗浄操作を行う。洗浄後、1 ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ の発色溶液を加え、フタをしてウェル一様に広がるよう軽く振とうした後に、室温で20分間静置する。次いで、1 ウェルあたり100  $\mu\text{L}$ の反応停止液を加え発色反応を停止させる。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405又は450 nm<sup>\*9</sup>、副波長600-650 nmの条件で測定を行う。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特定原材料由来のタンパク質の濃度を求める。なお、同一の実験を3 ウェル並行で行い、各ウェルから得られた値を平均化する。

#### \*1 抽出用緩衝液

キット付属の濃縮抽出用緩衝液を、精製水を用いて10倍希釈したものとする。

#### \*2 ホモジナイザー

ミルサーIFN-700G (岩谷産業社製)、ラボミルサーLM-2 (大阪ケミカル社製)、エースホモジナイザーAM-3-50(日本精機製作所社製)及び同等の結果が得られるものを用いる。

\*3 ミルサーIFN-700G (岩谷産業社製) あるいはラボミルサーLM-2 (大阪ケミカル社製) を使用する場合、1回の攪拌操作は回転数が約20,000 rpmの条件で30秒間行う。エースホモジナイザーAM-3-50(日本精機製作所社製)を使用する場合、1回の攪拌操作は回転数が約12,000 rpmの条件で1分間行う。

#### \*4 pH調整

pHを測定し、調整が必要な場合には適宜、調整を行う。また、調整に要したアルカリ(あるいは酸)溶液の液量を2.1.2.3.の項にある希釈倍率を加味し、最



最終的な特定原材料由来のタンパク質含有量算出を行う。

\*5 ホモジナイザー専用カップを用いた場合、3回目の攪拌操作終了後にカップ内容物の全量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に移し、遠心操作を行う。

\*6 洗浄液

キット付属の濃縮洗浄液を、精製水を用いて10倍希釈したものとする。

\*7 標準溶液

キット付属の説明書に従い、標準溶液を希釈用緩衝液を用いて順次希釈したものとする。

\*8 室温

室温とは20-25℃とする。

\*9 測定波長

各ELISAキットで測定波長が異なるのでELISAキットの説明書に従う。

#### 2.1.2.2. 単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた（株）森永生科学研究所製ELISAキットの実験操作

試薬、注意事項等を含め、単一あるいは精製抗原認識抗体を用いたELISAキットの説明書に記載された手技に従って試験する。以下、方法について記述する。

調製試料2 gをホモジナイザー専用カップあるいはポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り、検体希釈液<sup>\*1</sup>38 mLを加え、ホモジナイザー<sup>\*2</sup>を用いて攪拌操作を行う<sup>\*3</sup>。攪拌した後、溶液のpHを確認し、必要であれば、中性付近（pH 6.0-8.0）となるように調整<sup>\*4</sup>する。その後、同様の攪拌操作を2回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行う<sup>\*5</sup>。抽出操作終了後、低温（4℃）、3,000 x gの条件で20分間遠心し、遠心後に得られる上清を分取し濾過する。次いで、得られた濾過液 50 μLに対して検体希釈液950 μLを加え、混合し、当混合溶液を測定溶液とする。予め、必要量の抗体固相化モジュールをフレームにセットしておき、測定溶液、ならびに検量線作成用に調製した標準溶液<sup>\*6</sup>の各々を1ウェルあたり100 μLずつ加える。各溶液がウェル一様に広がるように軽く振とうし、モジュール用フタを取り付けた後、室温<sup>\*7</sup>で60分間静置する。静置後、各溶液を捨て、1回あたり250-300 μLの洗浄液<sup>\*8</sup>を用い、6回繰り返しの洗浄操作を行う。洗浄後、1 ウェルあたり100 μLの酵素標識抗体溶液を加え、ウェル一様に広がるよう軽く振とうし、フタをした後に、室温で30分間静置する。静置後、酵素

標識抗体溶液を捨て、洗浄液を用いて6回の洗浄操作を行う。洗浄後、1 ウェルあたり100  $\mu$ Lの酵素基質溶液を加え、ウェル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分間静置する。静置後、反応停止液100  $\mu$ Lを加え、発色反応を停止させる。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の条件で測定を行う。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特定原材料由来のタンパク質の濃度を求める。なお、同一の実験を3 ウェル並行で行い、各ウェルから得られた値を平均化する。

#### \*1 検体希釈液

キット付属の20倍濃縮検体希釈液を、精製水を用いて20倍希釈したものとす  
る。

#### \*2 ホモジナイザー

ミルサーIFN-700G (岩谷産業社製)、ラボミルサーLM-2 (大阪ケミカル社製)、  
エースホモジナイザーAM-3-50 (日本精機製作所社製)及び同等の結果が得られ  
るものを用いる。

\*3 ミルサーIFN-700G (岩谷産業社製) あるいはラボミルサーLM-2 (大阪ケミ  
カル社製) を使用する場合、1回の攪拌操作は回転数が約20,000 rpmの条件で30  
秒間行う。エースホモジナイザーAM-3-50(日本精機製作所社製)を使用する場合、  
1回の攪拌操作は回転数が約12,000 rpmの条件で 1分間行う。

#### \*4 pH調整

pHを測定し、調整が必要な場合には適宜、調整を行う。また、調整に要した  
アルカリ(あるいは酸)溶液の液量を2.1.2.3.の項にある希釈倍率を加味し、最  
終的な特定原材料由来のタンパク質含有量算出を行う。

\*5 ホモジナイザー専用カップを用いた場合、3回目の攪拌操作終了後にカップ  
内容物の全量をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL容) に移し、遠心操作を行う。

#### \*6 標準溶液

凍結乾燥標準品を500  $\mu$ Lの精製水を用いて溶解したものを標準原液とし、当  
該標準原液を調製済み検体希釈液を用いて順次希釈し、調製する。

#### \*7 室温

室温とは20-25 °Cとする。

#### \*8 洗浄液

キット付属の20倍濃縮洗浄液を、精製水を用いて20倍希釈したものとする。

#### 2.1.2.3. 結果の判定

4係数logistic解析より得られた検量線から各ウェルの特定原材料由来のタンパク質濃度を算出し、得られた値に希釈倍率\*を乗じて食品採取重量あたりの特定原材料由来のタンパク質量を算出する。2.1.2.1. 及び2.1.2.2. で得られた食品採取重量1 gあたりの特定原材料由来のタンパク質含量が10  $\mu$ 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。

#### \*希釈倍率

複合抗原認識抗体を用いたELISAキットにおける希釈倍率は200、また、単一あるいは精製抗原認識抗体を用いたELISAキットにおける希釈倍率は400となる。

#### 2.2. ウェスタンブロット法

試料中のタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、転写膜に転写後、特定原材料由来のタンパク質に対する特異的ポリクローナル抗体を用いて検出する定性試験法である。卵、乳についての ELISA 法陽性判定の確認とする。卵タンパク質の検出の際は（株）森永生科学研究所社製モリナガ卵ウェスタンブロットキット（卵白アルブミン及びオボムコイド）、乳タンパク質の検出の際は同モリナガ牛乳キット（カゼイン及び $\beta$ -ラクトグロブリン）を用いてそれぞれ行う。

#### ウェスタンブロット法を用いた検査における注意事項

2.2.1. のポリアクリルアミドゲル電気泳動用混合溶液の調製において、2.1.2.2. の（株）森永生科学研究所製 ELISA キットにおける測定の際に調製した濾過液を用いて、ローディング緩衝液と混和以降の操作から行うことが望ましい。濾過液は低温（4 °C）で3日間は保存可能である。ELISA キットにおける同一の濾過液からの測定が不可能である場合は、再度同じ調製試料から2 g 採取し、2.2.1 に従って試料を調製する。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。

#### 2.2.1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動用混合溶液の調製

調製試料 2 g をホモジナイザー専用カップあるいはポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、検体希釈液<sup>\*1</sup> 38 mL を加え、ホモジナイザー<sup>\*2</sup> を用いて攪拌操作を行う。攪拌した後、溶液の pH を確認し、必要であれば、中性付近 (pH 6.0-8.0) となるように調整をする。その後、同様の攪拌操作を 2 回繰り返すことで、タンパク質の抽出を行う。抽出操作終了後、低温 (4℃)、3,000 x g の条件で 20 分間遠心し、遠心後に得られる上清を分取し濾過する。次いで、得られた濾過液とローディング緩衝液<sup>\*3</sup> を 1:2 (V/V) の割合で混和後、沸騰水浴中で 5 分間加温<sup>\*4</sup> し、加温後の混合溶液を電気泳動に供する。また、陽性対照として検査対象の卵あるいは乳の標準液<sup>\*5</sup> をローディング緩衝液で希釈し、0.5 μg/mL、1 μg/mL 及び 10 μg/mL の 3 濃度の標準溶液を調製し、各々電気泳動に供する。

**\*1 検体希釈液**

(株) 森永生科学研究所社製モリナガウエスタンブロットキットまたは (株) 森永生科学研究所社製 ELISA キットに付属の 20 倍濃縮検体希釈液を、精製水を用いて 20 倍希釈したものとする。

**\*2 ホモジナイザー**

ミルサー IFN-700G (岩谷産業社製)、ラボミルサー LM-2 (大阪ケミカル社製)、エースホモジナイザー AM-3-50 (日本精機製作所社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

**\*3 ローディング緩衝液**

Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD 社製) と 2-mercaptoethanol を 19:1 (V/V) の割合で混和したもの及び同等の結果が得られるものを用いる。

**\*4 加温**

加温時に試料溶液の突沸により蓋が外れない容器を用いる。

**\*5 標準液**

(株) 森永生科学研究所製モリナガウエスタンブロットキットに付属の標準液を用いる。

**2.2.2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動**

ポリアクリルアミドゲルプレート<sup>\*1</sup> を電気泳動槽<sup>\*2</sup> にセットする。電気泳動槽に泳動用緩衝液<sup>\*3</sup> を注ぎ、ゲルのウェルを完全に満たす。液漏れのないことを確認し、2.2.1. において調製した混合溶液ならびに各標準溶液を各ウェルに 20 μ

Lずつ注入する。また、別のウェルにタンパク質分子量マーカー<sup>\*4</sup>を2  $\mu$ L注入する。注入の際に混合溶液が隣のウェルに混入しないよう注意する。ゲルプレート1枚あたり30 mAの定電流で泳動する。ローディング緩衝液に含まれているBPB (Bromophenol Blue : BPB) がゲルの下端から1-1.5 cmのあたりまで進んだところで泳動を終了する。

\*1 ポリアクリルアミドゲル

SDS-PAGE mini 15 % 1.0 mm x 12 well (TEFCO 社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

\*2 電気泳動槽

セイフティーセルミニ STC-808 (TEFCO 社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

\*3 泳動用緩衝液

10  $\times$  Tris/glycine/SDS (BIO-RAD 社製) を蒸留水で10倍希釈したもの及び同等の結果が得られるものを用いる。

\*4 タンパク質分子量マーカー

Kaleidoscope Prestained Standards (BIO-RAD 社製 161-0324) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

### 2.2.3. ブロットティング

ブロットティングに際しては予め、転写膜<sup>\*1</sup>、濾紙<sup>\*2</sup> 2枚をブロットティングバッファー<sup>\*3</sup>に30分間浸しておく。ブロットティングバッファーを転写装置<sup>\*4</sup>の陽極面に展開し、濾紙、転写膜、ゲル、濾紙の順に重層する。重層する際、気泡が入らないように注意する。また、ゲルの乾燥を防ぐために速やかに作業する。重層後、ブロットティングバッファーを静かに少量滴下し、陰極のついた上部蓋を閉じる。転写装置を傾け余分なブロットティングバッファーを除く。転写膜の面積1平方センチあたり2 mAの定電流で60分間転写する。

\*1 転写膜

Hybond-P (アマシャムバイオサイエンス社製) 及び同等の結果が得られるPVDF (Poly vinylidene difluoride) 膜を100%メタノールに10~30秒間浸してから使用する。

## \*2 濾紙

Extra Thick Filter Paper (BIO-RAD 社製) 及び同等の結果が得られる濾紙を使用する転写膜と同じ大きさにカットして用いる。

## \*3 ブロッキングバッファー

10 × Tris/glycine (BIO-RAD 社製) /メタノール/蒸留水を 1 : 2 : 7 (V/V/V) の割合で混合したもの及び同等の結果が得られるものを用いる。

## \*4 転写装置

トランスブロット SD セル (BIO-RAD 社製) 及び同等の結果が得られるものを用いる。

### 2.2.4. 免疫染色

転写後の膜を速やかにブロッキング溶液<sup>\*1</sup> に浸し、60 分間振とうする。振とう後、ブロッキング溶液を捨て、一次抗体溶液<sup>\*2</sup> に浸し、60 分間振とうする。振とう後、一次抗体溶液を捨てる。次いで、洗浄液<sup>\*3</sup> に浸し 5 分間振とう後、洗浄液を捨てる。この洗浄操作を更に 2 回行う。3 回目の洗浄終了後、二次抗体溶液<sup>\*4</sup> に浸し、30 分間振とうする。振とう後、二次抗体溶液を捨て、上記と同様に洗浄液で 3 回洗浄操作を行う。洗浄終了後、転写膜をアルカリフォスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液<sup>\*5</sup> に浸し、20 分間振とうする。振とう後、アルカリフォスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液を捨て、上記と同様に 3 回洗浄操作を行う。洗浄終了後、100 mM Tris/塩酸 (pH 9.5) 溶液に浸し、15 分間振とう後、100 mM Tris/塩酸 (pH 9.5) 溶液を捨て、転写膜を検出試薬<sup>\*6</sup> に 3-10 分間程度浸し、振とうする。この際、検査対象の卵あるいは乳の標準液 (1 µg/mL) のバンドが検出されていることを確認し、バックグラウンドが高くなるように注意する。次いで、検出試薬を除き、転写膜を蒸留水で軽くすすいだ後、蒸留水中で遮光下、15 分間振とうする。転写膜を遮光下で風乾して判定を行う。

#### \*1 ブロッキング溶液

ウシ由来血清アルブミン (SIGMA社製A-7030) を最終濃度0.1 %及びTween-20 を最終濃度0.05 %となるようにTris-Buffered Saline (TBS) (BIO-RAD社製の10 X TBSを蒸留水を用いて10倍希釈し、調製) を用いて調製した溶液を用いる。なおTBSは各最終濃度が20 mM Tris、500 mM 塩化ナトリウムとなるように溶解し、pH 7.5となるように調整したものを用いてもよい。

#### \*2 一次抗体溶液

特定原材料由来のタンパク質（卵：卵白アルブミン及びオボムコイド、乳：カゼイン及び $\beta$ -ラクトグロブリン）に対するウエスタンブロットキットの各抗体をブロッキング溶液を用いて 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した溶液を用いる。

### \*3 洗浄液

Tween-20 を最終濃度 0.05 %となるように TBS を用いて調製した溶液(TBS-T)を用いる。

### \*4 二次抗体溶液

VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit (VECTOR 社製) に含まれるビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体をブロッキング溶液で 10000 倍に希釈したものをを用いる。

### \*5 アルカリフォスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液

VECTASTAIN ABC-AP Standard Kit 又は VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG Kit (VECTOR 社製) に含まれる A 液 1 滴と B 液 1 滴をブロッキング溶液 10 mL に加えたもの。当溶液は使用する 30 分前に調製する。

### \*6 検出試薬

Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV<BCIP/NBT> (VECTOR社製) に含まれる1液2滴を100 mM Tris/塩酸(pH 9.5) 10 mLに加え混和後、2液と3液を順次各2滴加えたもの。用時調製する。

## 2.2.5. 結果の判定

各特定原材料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、 $\beta$ -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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) が検出されているかどうか確認する。標準液 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) が検出されない場合は、検査が不適であると考え、再度ポリアクリルアミドゲル電気泳動混合溶液の調製から行う。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 $\beta$ -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。

## 2.3. PCR 法

小麦、そば、落花生についての ELISA 法陽性判定の確認とする。

食品からの DNA 抽出精製法 (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。

### 2.3.1. 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。

### 2.3.2. 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 $\Omega$ /cm まで精製した超純水を 121°C、20 分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

#### 2.3.2.1. シリカゲル膜タイプキット法<sup>\*1</sup>

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<sup>\*2</sup>、同遠沈管に予め 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 10 mL と RNase A 10  $\mu$ 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°C 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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<sup>\*3</sup> 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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°C に温めておいた水 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ ) 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、落花生粉砕物、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、2.3.2. 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 2.3.1. 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。

2.3.2.2. イオン交換樹脂タイプキット法<sup>\*1</sup>

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<sup>\*2</sup>。同遠沈管に G2 緩衝液<sup>\*3</sup> 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  $\alpha$ -アミラーゼ\*4 (1 mg/mL) 200  $\mu$ 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  $\mu$ L ならびに RNase A 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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、2.3.2.1. 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 2.3.1. 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。

### 2.3.2.3. CTAB 法<sup>\*1</sup>

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<sup>\*2</sup> 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°C 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  $\mu$ 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  $\mu$ L のフェノール/クロロホルム混合液<sup>\*3</sup> 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  $\mu$ L のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液<sup>\*4</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ L の TE 緩衝液<sup>\*5</sup> 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  $\mu$ L を加え、37°C で 30 分間加温する。加温処理後の溶液に 200  $\mu$ L の CTAB 緩衝液、次いで 250  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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、2.3.2.4.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1 M 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) 4 g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

1 M 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。

### 2.3.2.4. DNA の精製度の確認と定量

DNA 試料原液 5  $\mu$ Lを取り、TE 緩衝液 45  $\mu$ Lを加えて 50  $\mu$ 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/ $\mu$ 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。

2.3.2.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、2.3.3.2.項に示すように、原則としてDNA試料液は20 ng/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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/ $\mu$ 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。

### 2.3.3. 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出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使い、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 RO 水または蒸留水を Milli-Q 等で 17 M $\Omega$ /cm まで精製した超純水を 121°C、20 分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

#### 2.3.3.1. 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、そばの 3 種である。その各につき PCR 増幅の条件が異なる。2.3.3.2. から 2.3.3.4. 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\*を用いて行い、その結果を 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。

\* 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

\*植物 DNA 検出用プライマー対は、広く植物 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。

#### 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\*<sup>1</sup>、0.20 mM dNTP、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.2  $\mu$ M 5' 及び 3' プライマー\*<sup>2</sup>、及び 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ\*<sup>3</sup>を含む液に、20 ng/ $\mu$ L に調製した DNA 試料液\*<sup>4</sup> 2.5  $\mu$ L (DNA として 50 ng) を加え、全量を 25  $\mu$ L にする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置\*<sup>5</sup> 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、60°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。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 増幅に必要な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、2.3.5. 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/ $\mu$ 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 (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。

2.3.3.3. 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 2.3.3.2. 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

本プライマーについては(株)日清製粉グループ本社が特許出願中である。保健所、衛生試験所など官公庁分析機関を除く分析機関において、本プライマーを使用した受託試験を業として実施する場合は、別途協議が必要であり、下記に連絡すること。但し、本プライマーを試験研究のために製造、使用することについては一切制限はない。

(連絡先：(株)日清製粉グループ本社 研究推進グループ、Tel. 049-267-3916、Fax. 049-266-5166)

#### 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 2.3.3.2. 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

本プライマーについては(株)日清製粉グループ本社が特許出願中である。保健所、衛生試験所など官公庁分析機関を除く分析機関において、本プライマーを使用した受託試験を業として実施する場合は、別途協議が必要であり、下記に連絡すること。但し、本プライマーを試験研究のために製造、使用することについては一切制限はない。

(連絡先：(株)日清製粉グループ本社 研究推進グループ、Tel. 049-267-3916、Fax. 049-266-5166)

#### 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離し、DNA 増幅バンドを確認する。



#### 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\*<sup>1</sup>を加え、加熱してアガースを溶解する。次に 100 mL 当たり 5  $\mu$ L のエチジウムブロミド溶液 (10 mg/mL) \*<sup>2</sup>を加え、ゲルが 50°C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\*<sup>3</sup>。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は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ため、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、2.3.4.3. 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)

#### 2.3.4.2. 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  $\mu$ L と適当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 BPB 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。

#### 2.3.4.3. 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  $\mu$ 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。

#### 2.3.4.4. 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。

#### 2.3.5. 結果の判定

##### 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、2.3.2. 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。2.3.2. 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

2.3.2. 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 2.3.2.4. に示す基準を満たしているものとする。

#### 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 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 2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果

の判定に同じ。

#### 2.3.5.3. 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 124bp 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 2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

(参考)

1. FASTKIT エライザ Ver. II シリーズ及び FASTKIT エライザシリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、落花生)は、日本ハム株式会社中央研究所(〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原 3-3. Tel. 029-847-7825 Fax. 029-847-7824)から購入可能である。
2. (株) 森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生)、モリナガ特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生) 及びモリナガウエスタンプロットキットは、株式会社森永生科学研究所(〒236-0003 横浜市金沢区幸浦 2-1-16 Tel. 045-791-7673 Fax. 045-791-7675)から購入可能である。
3. 改良検査法で検査する際の検体抽出液は「特定原材料抽出用試薬」として株式会社森永生科学研究所(〒236-0003 横浜市金沢区幸浦 2-1-16 Tel. 045-791-7673 Fax. 045-791-7675) から購入可能である。
4. そば及び小麦検出用プライマーはオリエンタル酵母工業(株)(〒526-0804 滋賀県長浜市加納町 50、オリエンタル酵母工業(株) 長浜ライフサイエンスラボラトリー(長浜LSL)Tel.0749-64-2346、Fax.0749-63-7910)から購入可能である。

#### 検査概要

同一調製試料を対象とし、改良された複合抗原認識抗体を用いた日本ハム(株)製 FASTKIT エライザ Ver. II シリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、落花生) 及び改良された単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた(株) 森永生科学研究所製モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット (卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生) の2種のキット、又は、複合抗原認識抗体を用いた日本ハム(株)製 FASTKIT エライザシリーズ (卵、牛乳、小麦、そば、

落花生)及び単一あるいは精製抗原認識抗体を用いた(株)森永生科学研究所製特定原材料測定キット(卵白アルブミン、カゼイン、小麦グリアジン、そば、落花生)の2種のキットを用いて測定検査を実施する。なお、両者の検体抽出液の組成は異なっているので、それぞれに対応した検体抽出液を使用する。

ELISA法による検査以降の検査は、上記いずれかの2種の組合せのELISA法を用いて実施された結果に基づき、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。適宜、ウエスタンブロット法(卵、乳)、PCR法(小麦、そば、落花生)による確認検査を行う。

また現時点で判明している偽陽性及び偽陰性を示す可能性のある食品群を別添4「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」に示す。全ての検査において、各キットに係る偽陽性、偽陰性の確認を別添4の「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」を参照にして必ず行うこと。