（改正後全文）　　最終改正　令和８年10月１日消食表第749号

食品表示基準について

（総則関係）

1　適用範囲について

（１）　食品表示法における「販売」について

食品表示法（平成25年法律第70号）における「販売」については、たとい無償の譲渡であっても、不特定又は多数の者に対して食品を譲渡する場合は、販売と同等の規制を課すことが適当であるため、不特定又は多数の者に対する販売以外の譲渡を含む概念としている（同法第１条）。したがって、食品表示基準（平成27年内閣府令第10号）においても、「販売」とは有償での譲渡及び不特定又は多数の者に対する無償での譲渡を意味することになり、者と者の間で食品の所有権の移転が行われるか否かが、「販売」行為を行っているか否かの境界となる。

（２）　栄養成分表示について

栄養成分表示をすることにより、健康で栄養バランスがとれた食生活を営むことの重要性を消費者自らが意識し、商品選択に役立てることで適切な食生活を実践する契機となる効果が期待されること、国際的にもコーデックス委員会において「栄養表示に関するガイドライン」（CAC/GL 2-1985）の見直しがなされ、原則、あらかじめ包装された食品の栄養表示を義務とすべき旨が追記されたこと等を踏まえ、原則として、全ての一般用加工食品及び一般用の添加物に栄養成分表示を義務付ける。

なお、店頭で表示されるポップやポスターなど、食品の容器包装以外のものに栄養表示する場合は、食品表示基準は適用されない。

（３）　加工食品の原料原産地表示について

消費者の自主的かつ合理的な選択機会の確保に資するよう、可能な限り産地情報を充実することが望ましいという観点を基本とし、原則国内で製造した全ての加工食品について、使用した原材料に占める重量の割合が最も高い原材料に原産地の表示を義務付ける。また、食品表示基準に基づく表示方法は、当該原材料に占める重量の割合の高いものから順に原料原産地を表示する「国別重量順表示」を原則とし、それが可能でない場合についても、消費者の誤認を招かないよう、消費者の選択に資する一定の有用な情報が必ず表示される制度とした。

（４）　試験検査の業務管理の実施について

「別添　栄養成分等の分析方法等」、「別添　アレルゲンを含む食品の検査方法」及び「別添　安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」に係る食品表示法第８条の規定に基づく試験検査については、その信頼性を確保する観点から、食

品衛生検査施設（食品衛生法（昭和22年法律第233号）第29条に規定する検査施設をいう。）における検査等の業務管理に関する通知である「食品衛生検査施設における検査等の業務管理について」（平成９年１月16日衛食第８号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）の別紙「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領」及び「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成９年４月１日衛食第117号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）の別添「精度管理の一般ガイドライン」に準拠した適切な業務管理を実施すること。

なお、個別の試験検査の実施において、特に留意すべき事項がある場合には、必要に応じて別途通知するので適宜参照すること。

（５） その他

特別用途食品の表示事項等については、食品表示基準及び本通知のほか、健康増進法に規定する特別用途表示の許可等に関する内閣府令（平成21年内閣府令第57号）、特別用途食品の表示許可等について（令和元年９月９日消食表第296号消費者庁次長通知）及び特定保健用食品の表示許可等について（平成26年10月30日消食表第259号消費者庁次長通知）を確認すること。

２ 定義

（１） 加工食品

① 食品表示基準別表第19に掲げる「冷凍食品」には、果物、生鮮野菜、生鮮魚介類（切り身又はむき身にした魚介類は除く。）、食肉及びアイスクリーム類は含まない。

② ブランチングした野菜等を凍結させたものであって容器包装に入れられたものは、食品表示基準別表第19に掲げる冷凍食品として取り扱うものとする。なお、ブランチングした食品は、凍結させる直前に加熱されたものではない。

（２） 賞味期限

賞味期限の定義について、「ただし、当該期限を超えた場合であっても、これらの品質が保持されていることがあるものとする」は、期限を超過した食品を摂取した場合においても、必ずしも衛生上の危害が生じるわけではないことを明確にする趣旨である。すなわち、食品資源の有効活用の観点から、消費者に対する啓発の意味も含めて記載されたものである。

（３） 栄養機能食品

カリウムについては、正常な血圧を保つのに必要な栄養成分である一方、腎障害を有する場合等には積極的摂取を避けるべきものである。錠剤、カプセル剤の他、濃縮加工されている粉末剤や液剤等については、カリウムの過剰摂取につながる可能性が否定できないことから、これらの形状の加工食品に機能を表示することを認めないこととしている。

（４） 栄養素等表示基準値

栄養素等表示基準値とは、表示を目的として、食事摂取基準の基準値を日本人の人口に基づき加重平均したものであり、必ずしも個人が目指すべき１日当たりの栄養素等摂取量を示すものではない。

栄養素等表示基準値のうち、食物繊維、ナトリウム及びカリウムは、生活習慣病予防のための指標である目標量を基に算出された値であり、食物繊維及びカリウムは積極摂取が、ナトリウムは過剰摂取の回避が望まれるという意味合いがある。

（５） 機能性表示食品

別添　機能性表示食品を参照

（加工食品）

１　義務表示事項

（１） 名称

①　食品の名称については、その内容を的確に表現し、かつ、社会通念上既に一般化したものを表示すること。

②　名称中に主要原材料名を冠する場合は、主要原材料と一致しなければならない。

③　名称に冠すべき主要な原材料を２種以上混合している場合には、１種類の原材料名のみを冠することは認めない。

④　新製品等で業界内にあっても､いまだ名称が広く通用しない食品にあっては、どのような内容の食品であるかを社会通念上判断できるものであれば、それを名称と認める。

⑤　珍味等のように魚介類加工品、菓子、つくだ煮、その他広範の区分にまたがる食品にあっては、「珍味」のみでは食品の内容を適切に表わさないので名称とは認めない。この場合、「珍味たこくん製」等と必ず食品の内容を適切に表わす具体的な名称を表示する。

ただし、それらを複合したいわゆる「おつまみ」等にあっては、固有の名称もなく、食品の区分も不可能なものに限っては「珍味」の名称を認める。

⑥　①から⑤までに関わらず、食品表示基準別表第４において別途、名称の表示方法が規定されている食品については、これらの規定に従い表示すること。

（２） 保存の方法

① 食品衛生法第13条第１項の規定により保存の方法の基準が定められている食品にあっては、保存基準摂氏10度以下の場合「保存温度10℃以下」、「４℃以下で保存」などのようにその基準に合う保存の方法を表示すること。
　また、即席めん類（即席めんのうち生タイプ即席めん以外のものをいう。）の保存基準に合う保存方法の表示は、例えば、「直射日光を避けて保存すること」、「直射日光に当てないこと」等その趣旨が十分に表現されているものであれば差し支えないものであること。
　これらの表示は流通、家庭等において可能な保存の方法を表示すること。

② 食品衛生法第13条第１項の規定により保存の方法の基準が定められていない食品にあっても、「保存温度　10℃以下」、「４℃以下で保存」などのように、保存の方法の表示を具体的かつ平易な用語をもって表示すること。

③ 製造又は加工後流通段階で適切に保存方法を変更したものであって、消費期限又は賞味期限の表示の期限の変更が必要となる場合には、改めて適切に消費期限又は賞味期限及び保存の方法の表示がなされること。

（３） 消費期限又は賞味期限
① 消費期限又は賞味期限については、食品の特性等を十分に考慮した上で、客観的な試験・検査を行い、科学的・合理的に設定すること。

② 消費期限を表示する食品等にあっては、消費期限を過ぎた場合、衛生上の危害が発生するおそれもあることから、消費期限を過ぎた食品等の販売を厳に慎むこと。

③ 賞味期限を年月で表示する食品は、ロット番号を表示する等により、製造日が特定できるような措置を講ずること。

④ 消費期限又は賞味期限（以下「期限」という。）である旨の文字を冠したその年月日の表示（以下「期限表示」という。）は、当該期限であることが明らかに分かるように、年月日の前に当該期限である旨の文字を表示する。
　ただし、この表示が困難と認められる場合には、当該期限である旨の文字を年月日の上下若しくは後ろ等に近接して表示し、又は「消費期限○○に記載」等表示箇所を指定する方法で、年月日を単独で表示しても差し支えない。なお、年月日を単独で表示する場合においては、特に当該年月日の前後又は上下に期限表示以外の日付を併記するなどの期限表示を不明確にする表示は行ってはならない。
　また、製造又は加工の日から賞味期限までの期間が３か月を超えるものであって切れ欠き方式（ビールにおいて従来から行われているようなラベル周辺に年月の部位に切れ込みを入れて日付を表示する方式）で賞味期限を表示する場

合にあっては、ラベルに「賞味期限はラベル周辺部に切れ欠き方式で記載」と表示することにより賞味期限を表示しても差し支えない。

⑤　期限表示は、「消費期限　令和元年５月21日」、「賞味期限　２．６．30」、「消費期限　01．05．21」、「賞味期限　2020年６月30日」、「消費期限　19．５．21」、「賞味期限　20．06．30」のように表示すること。ただし、これらの表示が困難と認められる場合は「消費期限　010521」、「賞味期限　20200630」、「賞味期限　200630」と年、月、日をそれぞれ２桁（西暦年の場合は４桁又は末尾２桁）とする６桁又は８桁で表示しても差し支えない。

⑥　弁当の類にあっては、必要に応じて時間まで表示するよう指導されたい。

⑦　ロット番号、工場記号、その他の記号を期限表示に併記する場合にあっては、次の例に示すように期限表示が明らかに分かるように表示することとし、期限表示について「200630」と年、月、日をそれぞれ２桁とする６桁での表示を行いつつ、ロット番号「A63」を併記するなどのように期限表示を不明確にする表示は行ってはならない。

（例）　「消費期限　令和元年５月21日A63」
　　「賞味期限　02．06．30　ＬＯＴ　A63」
　　「賞味期限　20．６．30／A63」

⑧　クリーム、発酵乳、乳酸菌飲料及び乳飲料のうち、紙で密栓した容器包装に入れられたものであって紙のふたに表示を行う場合は、ふたの表示面積から判断して期限の文字を表示することが不可能な場合に限り、期限の文字は、当該ふた部分を覆う透明な合成樹脂に表示して差し支えない。

なお、この場合、中のふたにされた表示が見えにくくならないようにすること。

（４）　添加物

①　物質名表示関係

ア　食品に含まれる添加物については、加工助剤及びキャリーオーバーを除き、原則当該添加物の物質名を表示するものであること。

また、物質名の表示は、食品衛生法施行規則（昭和23年厚生省令第23号。以下「規則」という。）別表第１に掲げる添加物（食品表示基準別表第８に掲げるものを除く。）については、規則別表第１に掲げる名称により行うこと。

イ　規則別表第１に掲げる添加物の物質名の表示において、規則別表第１に掲げる名称のほかに一般に広く使用されている名称（簡略名又は類別名。以下「簡略名」という。）を用いることができる添加物及びその簡略名は、別添　添加物１－１に掲げる範囲であること。

また、同種の機能の添加物を併用する場合は、別添　添加物１－２に掲げる例示に従い簡略化した表示を用いても差し支えない。

ウ　既存添加物名簿（平成８年厚生省告示第120号。以下「名簿」という。）に掲げる添加物（以下「既存添加物」という。）の物質名の表示は、名簿に掲げる名称又は別添　添加物２－１に掲げる品名（細分類の品名を含む。）により行うこと。

エ　食品衛生法第４条第３項に規定する天然香料（以下「天然香料」という。）の物質名の表示は、別添　添加物２－２に掲げる基原物質名又は別名により行うこと。

なお、天然香料の物質名表示にあっては、基原物質名又は別名に「香料」の文字を付すこと。

オ　一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用されるもの（以下「一般飲食物添加物」という。）の物質名の表示は、別添　添加物２－３に掲げる品名（細分類の品名を含む。）により行うこと。

カ　別添　添加物２－２及び別添　添加物２－３に記載のない天然香料及び一般飲食物添加物の物質名の表示は、当該添加物であることが特定できる科学的に適切な名称をもって行うこと。

キ　規則別表第１に掲げる添加物以外の添加物について、物質名の表示に代えて使用できる簡略名は、別添　添加物２－１及び別添　添加物２－３の「簡略名又は類別名」（細分類の簡略名又は類別名を含む。）の項に示したこと。

なお、別添　添加物２－１及び別添　添加物２－３の用途欄に増粘安定剤と記載された多糖類を２種以上併用する場合には、簡略名として「増粘多糖類」を使用して差し支えない。

②　用途名表示関係

ア　規則別表第１に掲げる添加物のうち、食品表示基準別表第６の上欄に掲げるものとしての使用が主たる用途と考えられる添加物を、別添　添加物１－３に例示したこと。

また、規則別表第１に掲げる添加物以外の添加物にあって、食品表示基準別表第６の上欄に掲げる用途を目的として使用されるものの例は、別添　添加物２－１及び別添　添加物２－３の用途の項に掲げるものであること。

なお、上記以外のものであっても、食品表示基準別表第６の上欄に掲げるものとして使用される場合にあっては、当該添加物に係る用途名の併記が必要となること。

イ　当該添加物の使用において、食品表示基準別表第６の上欄に掲げるもののうち、重複した使用目的を有する場合には、主たる目的に係る用途名を表示すれば足りること。

ウ　食品表示基準別表第６の下欄に複数の用途名が掲げられているものについては、そのうちのいずれかを表示すること。

③　その他

ア　一括名の定義及び物質名の表示において一括名を用いることができる添加物の範囲は、別添　添加物１－４のとおりであること。

イ　加工助剤又はキャリーオーバーに該当するか否かについては、食品表示基準第３条第１項の表の添加物の項の１に示した定義に照らし、当該添加物の使用基準、使用実態等に即して個別に判断されるものであること。

ウ　微粒二酸化ケイ素をろ過助剤の目的以外で食品に使用する場合にあっては、加工助剤には該当せず、食品への添加物表示は、物質名により行うこととなること。

エ　原材料に由来する添加物については、主要原材料か否かを問わず、食品表示基準第３条第１項の表の添加物の項の１にいうキャリーオーバーに該当する場合に表示が免除されるものであること。

オ　規則別表第１に掲げる添加物のうち栄養強化の目的で使用されたものと認められる添加物の範囲は、別添　添加物１－５のとおりであること。

　また、規則別表第１に掲げる以外の添加物であって、栄養強化の目的で使用されたものと認められる添加物の範囲は、別添　添加物２－１及び別添　添加物２－３の用途の項に「強化剤」として例示したこと。

カ　容器包装に入れないで販売される食品のうち、別添　添加物１－６に掲げる添加物を使用した食品にあっては、当該添加物を使用した旨の表示をするよう、指導すること。

　なお、その際には、陳列用容器、値札若しくは商品名を表示した札又はこれらに近接した掲示物に表示するよう、指導すること。

キ　D―マンニトールについては、調味料としての使用はD―マンニトールを塩化カリウム及びグルタミン酸塩を配合した製剤（D―マンニトールが塩化カリウム、グルタミン酸塩及びD―マンニトールの合計量の80%以下である場合に限る。）として使用する場合に限って認められていることに鑑み、当該調味料製剤を使用した食品の添加物表示は、一括名を使用せずに、これら３つの添加物の物質名を表示するよう、指導すること。

ク　クエン酸一カリウム及びクエン酸三カリウム、L―グルタミン酸カリウム、L―グルタミン酸カルシウム、L―グルタミン酸マグネシウム並びに水酸化カリウムについては、調味料又は加工助剤として用いられているものであるが、塩の分散化の目的で当該添加物の使用が認められたことに鑑み、当該添加物を使用した食品の表示は、物質名を表示するよう、指導すること。

ケ　物理的処理（酸処理、アルカリ処理、漂白処理といった加水分解程度の簡単な化学的処理を含む。）又は酵素的処理を行ったでん粉については食品として取り扱うことから、これを加工デンプンと併用する場合には、物理的処理又は酵素的処理を行ったでん粉については原材料としての表示を、加工デンプンについては添加物としての表示をするよう、指導すること。

コ　食品の製造に使用することを目的として、加工デンプンとその他原材料を用いて製造されたものは、添加物製剤と解される。ただし、加工デンプンと

その他の原材料との混合等を行って製造されたものであって、調理を経て食品として喫食することを目的としたものは、加工食品と解されること（食品の例：パン、菓子、うどん、わらび餅、唐揚げ粉等の製造に用いられるミックスパウダー及び液状ミックス。ただし、このようなミックスパウダー等の製造に用いることを目的として製造されたものは、添加物製剤となる。）。

サ　加工デンプンを単独使用し製造した「餅」や水・砂糖・香料・色素以外は加工デンプンだけからなる「わらび餅」、加工デンプン100%のものを例えば「片栗粉」や「わらび粉」として販売する場合、「餅」「わらび餅」はそのまま食品として喫食されるものであり、また、「片栗粉」「わらび粉」は調理を経て食品として喫食することを目的としているものであるため、「餅」や「わらび餅」等そのもの自体は添加物製剤ではなく、加工食品と解される。このため、「餅」や「わらび餅」等の加工食品の表示に当たっては、添加物として加工デンプンを表示する必要がある。

シ　サッカリン又はサッカリンナトリウムを含む食品については、量り売り等する場合であっても、製造業者又は卸売業者は最終小売業者においてサッカリン又はサッカリンナトリウム含有の有無が確認できるような措置を講ずること。

（５）　栄養成分の量及び熱量

①　当該食品の販売される状態における可食部分の100ｇ若しくは100ml又は１食分、１包装その他の１単位（以下「食品単位」という。）当たりのたんぱく質、脂質、炭水化物、ナトリウムの量及び熱量並びに表示しようとする栄養成分の量を表示する場合、栄養成分の量、熱量及び食品単位は、販売される状態における可食部分について行うこと。

水等を加えることによって、販売時と摂食時で重量に変化があるもの（粉末ジュース、粉末スープ等）においても販売時の栄養成分の量及び熱量で表示すること。

調理により栄養成分の量が変化するもの（米、乾めん、塩抜きをする塩蔵品等）は、販売時の栄養成分の量に加えて、標準的な調理方法と調理後の栄養成分の量を併記することが望ましい。

②　１包装が１食分である食品等、１食分の量を適切に設定できる食品については、食品単位は、１食分とすることが望ましい。食品単位を１食分とする場合は、当該１食分の量を併せて表示すること。この場合の１食分の量は、通常人が当該食品を１回に摂食する量として、事業者等が定めた量とするものであること。

③　食品表示基準第３条第１項の表の栄養成分（たんぱく質、脂質、炭水化物及びナトリウム。以下この項において同じ。）の量及び熱量の項の２による表示は、次のいずれかの文言を含むこと。

ア　「推定値」
イ　「この表示値は、目安です。」
　なお、消費者への的確な情報提供を行う観点から、例えば「日本食品標準成分表〇〇〇年版（〇訂）の計算による推定値」、「サンプル品分析による推定値」など、表示値の設定根拠等を追記することは差し支えない。

④　表示された含有量については、当該食品の期限内において、一定値をもって表示されている場合は、食品表示基準別表第９第３欄に掲げる方法で得られた値が、その表示した一定値を基準とした同表第４欄に掲げる許容差の範囲内、また、下限値及び上限値で表示されている場合は、その幅の中に含まれていなければならない。
　ただし、合理的な推定により得られた値を記載する場合は除く。

⑤　食品表示基準第３条第１項の栄養成分（たんぱく質、脂質、炭水化物及びナトリウム。以下この項において同じ。）の量及び熱量の項の１の三に掲げる「別表第九の第三欄に掲げる方法」等、栄養成分等の分析方法等の詳細については、別添　栄養成分等の分析方法等による。

⑥　食品表示基準第３条第１項の表の栄養成分（たんぱく質、脂質、炭水化物及びナトリウム。以下この項において同じ。）の量及び熱量の項の２に規定する「根拠資料」については、次のとおり取り扱うこと。
ア　内容
　例えば、最新版の日本食品標準成分表からの計算値やサンプル品の分析値等が考えられるが、行政機関等の求めに応じて説明ができる資料として、次の例を参考に判断すること。
(ｱ) 分析値の場合
・分析試験成績書
・季節間、個体間、期限内の栄養成分等の変動を把握するために十分な数の分析結果
・表示された栄養成分等の含有量を担保するための品質管理に関する資料
(ｲ) 計算値の場合
・採用した計算方法
・引用したデータベースの名称
・原材料について、配合量が重量で記載されたレシピ
・原材料について、その栄養成分等の含有量を示す妥当な根拠に基づくデータ
・調理加工工程表
・調理加工前後における重量変化率に関するデータ
イ　保管方法
　文書、電子媒体のいずれの方法でも構わない。

ウ　保管期間

その資料を基に表示が行われる期間。販売を終了する製品については、最後に製造した製品の賞味（消費）期限が経過するまでの間。

エ　その他

定期的に確認を行うことが望ましい。

⑦　栄養表示の解釈について

ア　栄養表示に該当しないもの

(ｱ) 原材料名又は添加物としての栄養成分名のみの表示

(ｲ) 食品表示法及びその下位法令以外の法令により義務付けられた栄養成分名の表示

イ　食品表示基準が適用される栄養表示とは、健康増進法施行規則（平成15年厚生労働省令第86号）第11条に規定する栄養素及び熱量そのものを表示する場合はもちろんのこと、その総称（ミネラル、ビタミンなど)、その種類である栄養成分(脂質における不飽和脂肪酸､炭水化物における食物繊維など)、別名称（プロテイン、ファットなど)、その構成成分（たんぱく質におけるアミノ酸など)、前駆体（β－カロテンなど）その他これらを示唆する一切の表現（果実繊維、カルシウムイオンなど）が含まれた表示をいう。

ウ　「うす塩味」､「甘さひかえめ」など味覚に関する表示は、栄養表示ではないので食品表示基準の適用対象にはならないものであること。

なお､「あま塩」､「うす塩」､「あさ塩」などの表示は、栄養表示として適用対象となる。

エ　栄養成分が添加されたものでなく、天然に含まれる栄養成分について表示した場合も食品表示基準が適用される栄養表示に該当するものであること。

オ　原材料に対し栄養表示を行う場合も食品表示基準が適用される栄養表示に該当する（例えば、青汁飲料におけるケールに含まれる栄養成分について表示した場合、販売に供する食品（最終製品である青汁飲料）について食品表示基準にのっとった表示が必要である。)。

⑧　品名の中に一般名称として栄養成分名が表示される場合も､栄養表示とする。ただし､「ミネラルウォーター」のように広く浸透した一般的な品名であって、一般消費者に対し栄養成分が添加された又は強化されたという印象や期待感を与えないものについては例外とする。

⑨　栄養の供給源としての寄与の程度が小さいものとは、次のいずれかの要件を満たすものとする。

ア　熱量、たんぱく質、脂質、炭水化物及びナトリウムの全てについて、０と表示することができる基準を満たしている場合

イ　１日に摂取する当該食品由来の栄養成分（たんぱく質、脂質、炭水化物及びナトリウム）の量及び熱量が、社会通念上微量である場合

⑩　極めて短い期間で原材料が変更される食品とは、次の要件のいずれかを満たすものとする。

ア　日替わり弁当（サイクルメニューを除く。）等、レシピが３日以内に変更される場合

イ　複数の部位を混合しているため都度原材料が変わるもの（例：合挽肉、切り落とし肉等の切り身を使用した食肉加工品、白もつ等のうち複数の種類・部位を混合しているため都度原材料が変わるもの）

⑪　食品表示基準第３条第３項の表の栄養成分の量及び熱量の項の５の「消費税法（昭和六十三年法律第百八号）第九条第一項において消費税を納める義務が免除される事業者」については、この者に該当するか否かは、消費税法の判断基準による。

また、食品表示基準附則第６条の規定による「中小企業基本法（昭和三十八年法律第百五十四号）第二条第五項に規定する小規模企業者」の判断基準は、当該事業年度の前事業年度において常時使用した従業員数が最多となった時点での数とし、当該事業年度の前事業年度の従業員数が20人（商業又はサービス業に属する事業を主たる事業として営む者については、５人）以下である場合は、当該事業年度は栄養成分表示を省略できる。また、当該事業年度中に従業員数が20人又は５人を超えた場合は、翌年度は、原則として栄養成分表示の省略は認められないが、翌年度の開始日から６か月間は栄養成分表示を省略できるものとする。

（６）　製造所又は加工所の所在地（輸入品にあっては、輸入業者の営業所所在地、乳にあっては、乳処理場（特別牛乳にあっては、特別牛乳搾取処理場）の所在地）及び製造者又は加工者の氏名又は名称（輸入品にあっては、輸入業者の氏名又は名称、乳にあっては、乳処理業者（特別牛乳にあっては、特別牛乳搾取処理業者）の氏名又は名称）

①　製造所又は加工所（輸入品にあっては、輸入業者の営業所、乳にあっては、乳処理場（特別牛乳にあっては、特別牛乳搾取処理場））（以下「製造所等」という。）の所在地の表示は、住居表示に関する法律（昭和37年法律第119号）に基づく住居表示に従って住居番号まで表示する。

ただし、次のような表示は差し支えない。

ア　指定都市（地方自治法（昭和22年法律第67号）第252条の19第１項の指定都市をいう。以下同じ。）及び県庁の所在する市における道府県名を省略すること。

イ　同一都道府県内に、同一町村名がない場合に限り、郡名を省略すること。

ウ　牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム、発酵乳、乳酸菌飲料及び乳飲料のうち紙のふたで密栓した容器包装に入れられたものであって、その販売範囲が限定され、当該都道

府県外に販売されない場合の当該紙のふたの表示における都道府県名の省略。

② 製造所等の所在地又は住所の表示に関し、市町村合併に伴い市町村名が変更された場合であっても、市町村合併後当分の間、合併前の所在地又は住所の表示を認めることとする。

③ 製造者等の氏名又は名称の表示

法人の場合は、法人名を表示すること。ただし、当該容器包装の表示面積、形態等から判断してやむを得ない場合は、次のような表示は差し支えない。

ア 株式会社を「ＫＫ」又は「(株)」、合名会社を「(名)」、合資会社を「(資)」、有限会社を「(有)」等と略記すること。

イ 農業協同組合を「農協」、酪農業協同組合を「酪農協」、酪農業協同組合連合会を「酪連」、経済農業協同組合を「経済農協」、経済農業協同組合連合会を「経済連」等と略記すること。

④ 個人の場合は、個人の氏名を表示する。この場合、屋号等の表示をもって代えることは認めない。

ただし、牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳、加工乳、クリーム、発酵乳、乳酸菌飲料及び乳飲料のうち紙のふたで密栓した容器包装に入れられたものの当該紙のふたの表示については、個人経営であっても経営年数が相当に永く､販売地区住民に広く周知されている場合は、○○○牧場のように屋号又は商号を表示して差し支えない。

⑤ 食品表示基準第３条第１項の表の製造所又は加工所の所在地（輸入品にあっては輸入業者の営業所の所在地、乳にあっては乳処理場（特別牛乳にあっては特別牛乳搾取処理場。以下同じ。）の所在地。以下この章において同じ。）及び製造者又は加工者の氏名又は名称（輸入品にあっては輸入業者の氏名又は名称、乳にあっては乳処理業者（特別牛乳にあっては特別牛乳搾取処理業者。以下同じ。）の氏名又は名称。以下この章において同じ。）の項の３に規定する製造所固有記号の取扱いについては、次のとおりとする。

ア 同一製品について

「同一製品」とは、同一の規格で同一の包材を使用した製品をいう。

(ｱ) 「同一の規格」とは、原則として、その製品の原材料や添加物の配合、内容量等、通常包材に表示される内容が同一であることをいう。

(ｲ) 「同一の包材」とは、包材のうち、いわゆるデザイン部分が同一であることはもちろんのこと、いわゆる表示部分（法定されている表示のみならず、法定されていない表示も指す。）についても同一であることをいう。

ただし、製造所固有記号や消費期限・賞味期限、ロット番号その他製造所において包材に印字することを前提とする表示部分については、包材の

同一性に影響を与えない。

イ　同一製品を二以上の製造所で製造している場合について

(ｱ)「同一製品を二以上の製造所で製造している場合」とは、製造所固有記号の届出時に、次の２つの要件を満たすものとする。

(a) ２以上の製造所が、それぞれ、食品の衛生状態を最終的に変化させる場所であること。

(b) 製造所固有記号の使用によって包材が共有化されること。

(ｲ) ただし、次に掲げる場合に該当するときには、(ｱ)の要件を満たさなくとも、「同一製品を二以上の製造所で製造している場合」と取り扱うこととする。

(a) 届出時に一つの製造所で製造している場合であって、オ(ｴ)の有効期間内に、同一製品につき製造を行うことが計画されている製造所について、製造計画書を添付して届け出るとき

なお、(a)については、将来的に一つの製造所で製造することが確実となった場合は、製造所固有記号の使用を中止し、当該記号の廃止の届出をしなければならないこととする。当該記号の廃止後、計画に変更が生じ、２以上の製造所で製造することになり、製造所固有記号を使用する場合には、再度、新規の届出を行う必要がある。この場合、廃止した製造所固有記号を使用することはできない。

(b) 食品表示基準附則第２条の規定による廃止前の食品衛生法第十九条第一項の規定に基づく表示の基準に関する内閣府令（平成23年内閣府令第45号）第10条に規定する製造所固有の記号を使用することができた場所のうち、食品表示基準において「加工所」と取り扱われる場所が２以上ある場合であって、当該２以上の場所で同一製品を加工しているとき

(c) 他の法令の規定により、最終的に衛生状態を変化させた場所及び当該行為を行った者に関する情報の厳格な管理が行われているような場合であって、かつ、当該法令その他関係法令に基づく表示から、最終的に衛生状態を変化させた者又は場所が特定できるとき

(ｳ) なお、(ｲ)の場合であっても、消費者への情報提供に係る表示義務（食品表示基準第３条第１項の表の製造所又は加工所の所在地（輸入品にあっては輸入業者の営業所の所在地、乳にあっては乳処理場（特別牛乳にあっては特別牛乳搾取処理場。以下同じ。）の所在地。以下この章において同じ。）及び製造者又は加工者の氏名又は名称（輸入品にあっては輸入業者の氏名又は名称、乳にあっては乳処理業者（特別牛乳にあっては特別牛乳搾取処理業者。以下同じ。）の氏名又は名称。以下この章において同じ。）の項の３の一から三までの表示。以下「応答義務」という。）は課せられる。

ウ　表示の方法について

(ｱ) 製造所の所在地（乳にあっては、乳処理場（特別牛乳にあっては、特別牛乳搾取処理場）の所在地）の代わりに製造者（乳にあっては、乳処理業

者（特別牛乳にあっては、特別牛乳搾取処理業者））の住所（法人の場合は原則として本社所在地）をもって表示する場合にあっては、製造所固有記号は、製造者の住所、氏名又は名称の次に、「＋」を冠して表示することを原則とする。

(ｲ) 製造所の所在地及び製造者の氏名又は名称の代わりに販売者（乳、乳製品及び乳又は乳製品を主要原料とする食品を販売する者を除く。）の住所及び氏名又は名称をもって表示する場合には、製造所固有記号は、販売者の住所、氏名又は名称の次に、「＋」を冠して表示することを原則とする。

(ｳ) (ｱ)及び(ｲ)にかかわらず、同一製品を製造者が自らの製造所で製造するとともに、他者の製造所に委託して製造する場合には、食品表示基準別記様式１の「製造者」又は「販売者」の事項名を表示せず、表示内容に責任を有する者として表示される食品関連事業者の住所､氏名又は名称の次に、「＋」を冠して製造所固有記号を表示しても差し支えない。

(ｴ) 製造所固有記号の表示は、(ｱ)、(ｲ)及び(ｳ)のとおり、原則として製造者又は販売者の住所、氏名又は名称の次に連記することとするが、容器包装の形態等から判断してやむを得ず連記しない場合は、製造者又は販売者の氏名又は名称の次に当該製造所固有記号の表示箇所を表示し、かつ、原則として、当該記号が製造所固有記号である旨を明記すること。

なお、製造所固有記号であることが明らかに分かる場合にあっては、次の例に示すように表示をしても差し支えない。

【例】

（表示部分）	（記載部分）
「製造所固有の記号　缶底左側に記載」	「＋ＡＢＣ／Lot.1」
「製造所固有の記号　缶底に記載」	「＋ＡＢＣ」

エ　応答義務について

製造所の所在地及び製造者の氏名又は名称に代えて、製造所固有記号の表示をする場合における応答義務の表示は、次のいずれかによることとする。

(ｱ) 「製造所の所在地又は製造者の氏名若しくは名称の情報の提供を求められたときに回答する者の連絡先」は、製造所固有記号が表す製造所の所在地及び製造者の氏名又は名称について回答できる者の電話番号を表示するものとする。この場合、当該連絡先において製造所の所在地又は製造者の氏名又は名称を回答できない旨の応答をすることは認められない。

(ｲ) 「製造所固有記号が表す製造所の所在地及び製造者の氏名又は名称を表示したウェブサイトのアドレス（二次元コードその他のこれに代わるものを含む。）」は、そのアドレスにアクセスした結果、アクセスした者が速やかに製造所の所在地等の情報を把握することができるアドレスを表示するものとする。

(ｳ) 「当該製品を製造している全ての製造所の所在地又は製造者の氏名若しくは名称及び製造所固有記号」は、当該製品を製造している全ての製造所の所在地、製造者の氏名又は名称及び製造所固有記号を表示するものとす

る。ただし、食品関連事業者と製造者の氏名又は名称が同一である場合には、当該製品を製造している全ての製造所の所在地及び製造所固有記号を表示するものとする。

オ　届出の方法について

(ｱ) 製造所固有記号の届出は、製造所固有記号制度届出データベースにおいて、表示内容に責任を有する製造者（乳にあっては乳処理業者（特別牛乳にあっては特別牛乳搾取処理業者））又は販売者（乳、乳製品及び乳又は乳製品を主要原料とする食品を販売する者を除く。）（以下「届出者」という。）が行うものとする。

(ｲ) 製造所固有記号は、アラビア数字、ローマ字、平仮名若しくは片仮名又はこれらの組合せに限るものとし、文字数は10文字以内とする。

(ｳ) 製造所固有記号は、原則として、一つの製造所につき一つの製造所固有記号の取得が認められる。ただし、一つの製造所が複数の販売者から製造を委託されている場合には、当該製造所と複数ある販売者の組合せごとに、製造所固有記号の取得が必要となるため、一つの製造所に複数の製造所固有記号が認められる。なお、同一の製造所で製造される製品ごとに製造所固有記号を変えることは認められない。

(ｴ) 製造所固有記号の有効期間は５年で満了することとし、有効期間経過後も継続して使用する場合は、製造所固有記号制度届出データベースに備えられたファイルへの記録がされた日から起算して５年の期間が満了する日（以下「更新期限」という。）までに、原則として届出者が製造所固有記号制度届出データベースにおいて、製造所に係る届出情報の更新を行うものとする。

製造所に係る届出情報の更新は、更新期限の90日前から行うことができるものとし、更新期限までに製造所に係る届出情報の更新がされない場合には、当該製造所固有記号は廃止されたものとして扱うこととし、更新期限を経過した日以降に製造した製品には使用することができない。

なお、廃止されたものとして扱われた当該製造所固有記号と異なる製造所固有記号であれば、新たに届出を行うことができるものとする。

(ｵ) 製造所に係る届出情報に変更が生じた場合又は製造所固有記号の使用を中止した場合は、原則として届出者が製造所固有記号制度届出データベースにおいて、速やかに変更又は廃止の届出を行うものとする。

ただし、次に掲げる製造所に係る届出情報の変更については、製造者又は販売者と製造所固有記号の組合せから製造所を特定することが困難となるため、認められない。

(a) 自らの製造所で製造する場合にあっては、製造所の所在地

(b) 他者の製造所に委託して製造する場合にあっては、委託先の製造者の氏名又は名称及び製造所の所在地

これらの場合には、当該製造所固有記号の廃止の届出を行うとともに、廃止した製造所固有記号と異なる製造所固有記号により、新規の届出を行

うものとする。

（７） アレルゲン

別添　アレルゲンを含む食品に関する表示を参照

（８） Ｌ－フェニルアラニンを含む旨

「Ｌ－フェニルアラニン化合物を含む旨」の表示は、「Ｌ－フェニルアラニン化合物を含む」等と表示すること。

ただし、「Ｌ－フェニルアラニン化合物を含む旨」の表示については、表示可能面積がおおむね30平方センチメートル以下であっても省略することができないが、表示可能面積がおおむね30平方センチメートル以下のものに限り、その文字数の多さにより表示が困難な場合は、「Ｌ－フェニルアラニン化合物を含む」の文言を以下のとおりとすることができる。

① 添加物を表示する場合

アスパルテーム（フェニルアラニン）

② 添加物を省略する場合

フェニルアラニンを含む

（９） 指定成分等含有食品

① 「指定成分等含有食品である旨」の表示と「指定成分等について食品衛生上の危害の発生を防止する見地から特別の注意を必要とする成分又は物である旨」の表示は、消費者の誤認を防ぐ必要があるため、近接して表示すること。

② 「食品関連事業者の連絡先」の表示は、食品表示基準第３条第１項の表の製造所又は加工所の所在地及び製造者又は加工者の氏名又は名称の項の３、同条第２項の表の機能性表示食品の項等の規定により、表示内容に責任を有する者の電話番号が表示されている場合、省略しても差し支えない。

③ 国や公的機関の承認を受けたと誤認させる以下のような表現を表示することは、食品表示基準第９条の表示禁止事項に該当する。

（例）

「厚生労働大臣認定」、「消費者庁承認」、「厚生労働省推薦」等

④ 指定成分等含有食品の販売に際し、容器包装以外に指定成分等含有食品に関する事項の表示義務は生じないが、指定成分等含有食品は、食品衛生上の危害の発生を防止する見地から特別の注意を必要とする成分又は物を含む食品であることから、当該食品の陳列棚、カタログ、ウェブサイト等に指定成分等含有食品に関する事項を記載することにより、消費者に対し自主的に情報提供することが望ましい。

(10)　機能性表示食品

別添　機能性表示食品を参照

(11)　遺伝子組換え食品に関する事項

①　分別生産流通管理について

食品表示基準第２条第１項第19号において分別生産流通管理とは、「遺伝子組換え農産物及び非遺伝子組換え農産物を生産、流通及び加工の各段階で善良なる管理者の注意をもって分別管理すること（その旨が書類により証明されたものに限る。）をいう。」と規定されている。その具体的な管理及び証明の方法は、産地、作目、加工食品の種類等により異なるが、輸入量が多く、かつ、流通段階の複雑なバルク輸送される北米産の非遺伝子組換え大豆及びデント種の非遺伝子組換えとうもろこしについては、別添の「バルク輸送される北米産の非遺伝子組換え大豆及びデント種の非遺伝子組換えとうもろこしの分別生産流通管理の指針」（以下「指針」という。）に即した管理及び確認が適切に実施されていれば、基準で規定する非遺伝子組換え農産物の分別生産流通管理が行われたこととなる。

指針の具体的な運用については、「アメリカ及びカナダ産のバルク輸送非遺伝子組換え原料（大豆、とうもろこし）確保のための流通マニュアル」（一般財団法人食品産業センター、平成12年１月）に示されており、これを参照されたい。

また、バルク輸送される北米産の非遺伝子組換え大豆及びデント種の非遺伝子組換えとうもろこし以外のものの分別生産流通管理については、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入の可能性がある段階においては、指針に即した管理及び確認が必要である。

なお、この指針とは異なる分別生産流通管理の方法を用いることもできるが、その場合には、この指針と同等又は同等以上の信頼性及び追跡可能性のある方法を用いることが必要である。

②　意図せざる混入について

分別生産流通管理が適切に行われたことを確認した場合にあっても、意図せざる遺伝子組換え農産物又は非遺伝子組換え農産物の一定の混入の可能性は否定できず、食品表示基準第３条第２項及び第18条第２項の遺伝子組換え食品に関する事項の項でいう「一定の混入」とは、非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が５％以下であること又は非遺伝子組換えとうもろこしの場合で遺伝子組換えとうもろこしの混入率が５％以下であることとする。

なお、分別生産流通管理が行われたことを確認した非遺伝子組換え農産物として取り扱うためには、分別生産流通管理が適切に行われ、そのことが確認されていること及び混入が意図的に行われたものではないことが必要であり、分別生産流通管理を確認していない場合や、意図的に遺伝子組換え農産物を混入した場合には５％以下の混入率であっても、分別生産流通管理を行ったことと

はならない。

③　基準の遵守状況の監視について

ア　食品表示基準第３条第１項の製造業者等は、基準に基づいて遺伝子組換えに関する表示を適正に行うとともに、国、都道府県若しくは指定都市又は独立行政法人農林水産消費安全技術センター（以下「センター」という。）から要請があった場合には、その遺伝子組換えに関する表示を行った対象農産物又はこれを原材料とする加工食品について分別生産流通管理を適正に実施したことを証明する書類を提出する等適切な協力を行う。

イ　センターは､アにより提出を受けた書類の記載内容を確認すること、当該書類に係る食品に組み換えられたＤＮＡ又はこれによって生じたタンパク質が残存しているかどうかを分析すること等により、遺伝子組換えに関する表示が適正に行われているかどうかを監視する。

ウ　都道府県又は指定都市は、食品表示法第15条の規定による権限の委任等に関する政令（平成27年政令第68号）第５条第１項の規定により、主たる事務所及び事業所が一の都道府県又は指定都市の区域内のみにある食品関連事業者に対する食品表示法に基づく指示等の権限が当該都道府県の知事又は指定都市の長の自治事務とされていることを十分認識の上、遺伝子組換えに関する表示について疑義がある場合には、指示等の権限を行使する等適切な対応を行う。

④　その他

ア　食品表示基準第３条第２項の表中の遺伝子組換え食品に関する事項の項の１における「別表第17の上欄に掲げる対象農産物」を表示する際、「ばれいしょ」を「じゃがいも」と表示する等、容易に同一性が認識できる表記によっても差し支えない。

イ　遺伝子組換え食品の検査方法については、原則、別添　安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法に基づき実施すること。

なお、組換えＤＮＡ技術は、科学技術分野の中でも最も進歩が早い分野の一つであることから、技術の進歩に対応し、検査方法については順次見直しを行っていくこととしているので、御留意願いたい。

(12)　乳児用規格適用食品である旨

①　食品表示基準の対象について

食品表示基準の対象となる乳児用食品の範囲は、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号。以下「規格基準」という。）において規定された「乳児用食品」の対象である食品と同じであり、したがって、「乳児用食品」の対象となる「乳児」の年齢については、児童福祉法（昭和22年法律第164号）等に準じて「１歳未満」をその対象とするものであること。

② 乳児用規格適用食品である旨の表示について

乳児用規格適用食品である旨の表示の方法は、「乳児用規格適用食品（食品衛生法に基づき、乳児用食品に係る放射性物質の規格が適用される食品）」とすることとする。

③ 表示の省略について

食品表示基準第３条第３項において乳児用規格適用食品であることが容易に判別できるものにあっては、乳児用規格適用食品である旨の表示を省略できることとしたところであるが、本規定の対象となる食品は、以下の食品である。

ア （健康増進法（平成14年法律第103号）第43条第１項の規定に基づく特別用途食品の）乳児用調製粉乳及び乳児用調製液状乳

イ （健康増進法第43条第１項の規定に基づく特別用途食品の病者用食品のうち）アレルゲン除去食品及び無乳糖食品のうち、乳児（１歳未満）を対象とした粉乳及び液状乳

ウ （乳及び乳製品の成分規格等に関する命令（昭和26年厚生省令第52号）第２条第38項及び第39項に規定する）調製粉乳及び調製液状乳

エ 上記アからウまでに掲げる食品以外の場合において、乳児の飲食に供することを目的として販売する食品であることが容易に判別できる食品

④ 紛らわしい表示の禁止規定について

消費者が商品を選択する際に、乳児用規格適用食品でないものを乳児用規格適用食品であると誤認することを防止する必要があることから、乳児用規格適用食品以外の食品にあっては、乳児用規格適用食品である旨の表示を付したり、これと紛らわしい表示を付することを禁止する規定（食品表示基準第９条第１項）を設けることとしたものであるが、乳児用規格適用食品と紛らわしい表示の例としては、乳児用規格の対象でない食品に「乳幼児用規格適用食品」や「乳児用規格適合食品」などの表示をすることが考えられる。

なお、例えば、「ベビー○○○」（「小さい（食品）」という趣旨で「ベビー」という用語を使用している場合。）や「こども○○○」等の表記が付された食品であっても、対象年齢が１歳以上であることが社会通念上明らかな食品については、この表記のみをもって、直ちに乳児用規格適用食品と紛らわしい表示とみなされることはないこと。

(13) 原料原産地名（食品表示基準別表第15の１から６に掲げるものを除く。）

① 対象加工食品及び原材料並びに表示方法について

ア 対象加工食品

全ての一般用加工食品（輸入品を除く。）を対象とする。

イ 対象原材料

使用した原材料に占める重量の割合が最も高い原材料（酒税の保全及び酒類業組合等に関する法律（昭和28年法律第７号）第86条の６第１項の規定に

基づく酒類の表示の基準において原産地を表示することとされている原材料及び米穀等の取引等に係る情報の記録及び産地情報の伝達に関する法律（平成21年法律第26号）第２条第３項に規定する指定米穀等（米穀及び別表第15の１の（６）に掲げるもちを除く。）の原材料である米穀を除く。）であり、添加物及び水は含まない。

ウ　表示方法

食品表示基準第３条第２項の表の輸入品以外の加工食品の項の１の一の規定により表示する。また、表示することとされる原産地が２以上ある場合にあっては、原則、対象原材料に占める重量の割合の高いものから順に表示（以下「国別重量順表示」という。）する。

②　「製造地表示」（食品表示基準第３条第２項の表の輸入品以外の加工食品の項の１の二の規定による表示）

ア　呼称について

「製造地表示」とする。

イ　定義

「製造地表示」の製造とは、製品の内容についての実質的な変更をもたらす行為をいい、製品の小分け、詰め合わせ、単なる切断、単なる混合、冷凍等の加工行為とみなされるものは含まれない。

ウ　表示方法

(ｱ) 製造地表示を行う原産地が２以上ある場合は、原則、国別重量順表示し、国名ごとに「製造」の文字を付すこと。

(ｲ) 「○○製造」の文字に代えて、「○○加工」と表示することはできない。

(ｳ) 生鮮食品の原材料名に対応させて、「○○製造」と表示することはできない。

(ｴ) 加工食品の原材料に占める重量割合が最も高い生鮮食品の原産地が分かる場合には、製造地表示に代えて、当該生鮮食品の名称と共にその原産地を表示することができる。

③　「又は表示」（食品表示基準第３条第２項の表の輸入品以外の加工食品の項の１の五のイの規定による表示）

ア　呼称について

「又は表示」とする。

イ　「又は表示」を使用できる場合について

原材料の過去の一定期間における産地別使用実績（新製品又は原料調達先の変更が確実な場合は、今後の一定期間における産地別使用計画）からみて、国別重量順表示をしようとした場合に、表示をする時点（製造日）を含む１年間で重量順位の変動又は産地切替えが行われる見込みで、国別重量順表示が困難であり、根拠資料を保管し、一定期間使用割合の高いものから順に表示した旨を、容器包装の原料原産地名に近接した箇所に表示している場合に

限る。

なお、容器包装に表示した原産地の範囲内での使用を認めるものであり、表示されていない原産地の原料を使用することは認めない。

④　「大括り表示」（食品表示基準第３条第２項の表の輸入品以外の加工食品の項の１の五のロの規定による表示）

ア　呼称について

「大括り表示」とする。

イ　「大括り表示」を使用できる場合について

原材料の過去の一定期間における産地別使用実績（新製品の場合又は原料調達先の変更が確実な場合は、今後の一定期間における産地別使用計画）からみて、国別重量順表示をしようとした場合に、３以上の外国産の産地表示について、表示をする時点（製造日）を含む１年間で重量順位の変動又は産地切替えが行われる見込みで、国別重量順表示が困難であり、根拠資料を保管している場合に限る。

ウ　輸入品である旨について

「輸入」のほかに、「外国産」、「外国」などの表示でも可能とする。また、輸入より狭い範囲を表す、一般に知られている地域名等（EU、NAFTA、ASEAN、アフリカ、南米等）の表示も可能とする。

⑤　「又は表示」と「大括り表示」の併用（食品表示基準第３条第２項の表の輸入品以外の加工食品の項の１の五のハの規定による表示）

「又は表示」と「大括り表示」の併用が使用できる場合について

「大括り表示」の認められる条件を満たした上で、輸入品の合計と国産品の重量順位に変動があり、「国産、輸入」や「輸入、国産」の表示が困難な場合であって、「又は表示」の認められる条件を満たす場合に限る。

⑥　根拠資料について

ア　保管が必要な根拠資料

(ｱ) 過去又は今後の一定期間における原産地ごとの重量順位の変動又は産地の切替えがあることを示す資料。

(ｲ) 同期間における原産地ごとの使用割合の順を示す資料。

イ　保管期間

(ｱ) 根拠資料を基に表示が行われている製品の賞味期限又は消費期限に加えて１年間。

(ｲ) 賞味期限又は消費期限を省略しているものについては、製造から５年間。

ウ　保管方法

文書又は電子媒体のいずれの方法でも構わない。

⑦　過去の一定期間の時期及び期間について

過去の一定期間における産地別使用実績は、表示をする時点（製造日）を含む１年間（製造年、製造年度等）から遡って３年以内の中での１年以上の実績に限る。

⑧　今後の一定期間における産地別使用計画を使用する場合について

過去の一定期間における産地別使用実績に基づく「又は表示」、「大括り表示」又は「又は表示」と「大括り表示」の併用を基本とし、新製品又は原料調達先の変更が確実な場合など、過去の産地別使用実績が使用できない場合は、今後の一定期間における産地別使用計画に基づく表示を使用しなければならない。なお、産地別使用計画は、当該計画に基づく製造の開始日から１年間以内の予定に限る。

⑨　上記③から⑤までの表示をする場合について、産地別使用実績及び産地別使用計画に求められる合理性

以下の場合は、③から⑤までの表示をすることができない。

ア　過去の一定期間における産地別使用実績又は今後の一定期間における産地別使用計画と、実際の使用実績が大きく異なり（３か国目以降を「その他」と表示している製品で、「その他」と表示していた国が結果として大部分を占める場合等）、その理由について合理的な説明ができない場合。

イ　策定した産地別使用計画の根拠について、合理的な説明ができない場合。

⑩　国別重量順表示が困難な場合について

以下の場合は、困難とは認めない。

ア　産地の切替えの都度、表示を切り替えること又は包材自体を切り替えることができる場合。

イ　「大括り表示」を行うためだけに、意図的に、ごく短期間だけ複数国から原料調達を行う場合。

⑪　ウェブサイト等による自主的な情報提供について

原料原産地表示が義務付けられていない原材料や、「製造地表示」、「又は表示」、「大括り表示」等を行った場合における詳細な産地情報、使用割合等について、ウェブサイト等により、消費者に対して自主的かつ積極的な情報提供に努めることが望ましい。

(14)　食品表示基準別表第15の６に定めるおにぎり

①　おにぎりの定義

炊飯米又は炊飯米と具材を組み合わせた料理をのりで巻いたもの（のりを自ら巻く形態で販売されているものを含む。）。

②　おにぎりに該当しないもの

ア　おにぎりと他の食材を組み合わせたもの。
イ　酢飯と具材を組み合わせた料理をのりで巻いたもの。

(15)　食品表示基準別表第19に定めるもの

①　食肉

ア　容器包装に入れられた食肉について、国内処理のもの、又は輸入のものとを問わず、メリヤス白布、麻袋等で包装した枝肉についても表示を要するものであること。

イ　「調味料に浸潤させる処理」とはタンブリング処理をいうこと。

ウ　「その他病原微生物による汚染が内部に拡大するおそれのある処理」とは、ポーションカット（肉塊又はひき肉を金属製容器にきつく詰め、凍結して形を整えた後、一定の厚みに切ること。）、タレかけ（小肉塊を容器包装に入れた後、調味液を加えること。）、漬け込み（小肉塊を調味液に浸漬すること。）、及びミキシング（小肉塊に調味料を加え、ミキサーで揉みほぐすこと。）等、処理を施していない食肉と外観上の区別が困難な処理をいうものであること。

なお、外観上、容易に未処理の食肉と区別ができるような処理を施したもの（ハンバーグ等）にあっては、適用されない。

②　食肉製品

ア　「乾燥食肉製品」である旨の表示は、ドライソーセージにあっては「ドライソーセージ」、サラミソーセージにあっては「サラミソーセージ」、ビーフジャーキーにあっては「ビーフジャーキー」、ポークジャーキーにあっては「ポークジャーキー」と表示することにより代えることができること。

イ　「非加熱食肉製品」である旨の表示は、ラックスハムにあっては「ラックスハム」と表示することにより代えることができること。

ウ　「加熱食肉製品」である旨の表示は、プレスハムにあっては「プレスハム」、ウインナーソーセージにあっては「ウインナーソーセージ」、フランクフルトソーセージにあっては「フランクフルトソーセージ」と表示することにより代えることができること。

エ　缶詰及び瓶詰の食肉製品のうちコンビーフにあっては「コンビーフ」、コーンドミートにあっては「コーンドミート」（ただし、牛肉と馬肉を併用したもの（牛肉の重量が牛肉及び馬肉の合計重量の20％以上のものに限る。）にあっては、「ニューコーンドミート」又は「ニューコンミート」）、ランチョンミートにあっては「ランチョンミート」と表示することにより、「加熱食肉製品」である旨の表示に代えることができること。

オ　食肉販売施設が飲食店営業の許可を得て調理する自家製ソーセージ（原料肉に豚肉又は牛肉を用い、ケーシングに充填した後、蒸煮又は湯煮により殺菌したものであって、異なる業者の手を経ることなく、直接消費者に販売するものに限る。）であって、容器包装に入れて販売する場合は、次の事項に

よること。
(ｱ) 名称は、「自家製ソーセージ」とすること。
(ｲ) 「手造り」、「手造り風」等の表示は、次の全ての条件に合致するものについてのみ表示できること。
(a) 良質の原料肉を使用し、長期間熟成したもの
(b) 自動化された機械若しくは装置を用いないもの
(c) 結着材料を含まないもの
(d) 調味料、結着補強剤、発色剤、酸化防止剤及び香辛料抽出物以外の食品添加物を含まないもの
(ｳ) 使用上の注意として、次の事項を表示すること。
(a) 「10℃以下で冷蔵保存すること。」等保存の方法
(b) 「消費期限　○年○月○日」等期限表示

③ 乳、乳製品及び乳又は乳製品を主要原料とする食品
ア 種類別
(ｱ) 種類別の表示に当たっては、ナチュラルチーズを「チーズ（ナチュラルチーズ)」、ラクトアイスを「アイスクリーム類（ラクトアイス)」等と、練乳を「れん乳」又は「煉乳」、発酵乳を「はっ酵乳」又は「醗酵乳」等と表示することは差し支えない。
(ｲ) 種類別の表示は、「種類別○○○」と記載するなど、その種類別が明らかに判断できるように表示すること。
(ｳ) 乳酸菌飲料のうち、無脂乳固形分３．０％以上のものにあっては、乳製品である旨を種類別の表示に併記することとされているが、その表示は次の例の表示でも差し支えない。
（例）「種類別：乳酸菌飲料（乳製品)」、「種類別：乳製品乳酸菌飲料」
イ その他
(ｱ) 成分調整牛乳にあっては、除去した成分を表示するよう指導すること。なお、表示については一括表示以外の場所に表示しても差し支えない。
（例）「除去成分：水分」、「水分を除去しています。」
(ｲ) リステリア・モノサイトゲネスは、一般的な食中毒菌が増殖できないような４度以下の低温や12%食塩濃度下でも増殖可能であるが、食品の特性（食品の水分活性、pH）や添加物の使用等によりその増殖が抑制されることがあり、また、健常者には、リステリアの汚染菌数が10,000cfu/g以下であれば発症リスクは極めて低いとされているため、増殖の可能性がある食品であっても消費期限内に食品中のリステリアが100cfu/g以下であることを事業者が担保することができれば安全性には問題ないとされている。
このため、保存温度及び期限表示の設定については、「食品表示基準Q&A」（平成27年3月30日消食表第140号）の別添に位置付けている「食品期限表示の設定のためのガイドライン」等を踏まえ、適切に科学的根拠に基づき設定、表示が行われるよう関係事業者に対して改めて指導されたい。

また、必要に応じて賞味期限ではなく消費期限を用いる必要があることに留意されたい。

(ｳ) 妊婦や高齢者等の免疫機能が低下した者等では、健常者より低い菌数で発症する可能性があり、髄膜炎や敗血症等の重篤な症状に陥ることもあるため、リステリアのリスクに係る注意喚起や、表示されている保存温度及び期限表示等が必ず遵守されるよう、事業者のウェブサイトや容器包装への表示等により消費者に周知することが望ましい旨、関係事業者に対して指導されたい。

④　鶏の液卵

ア　鶏の液卵には、割卵しただけの状態のいわゆる液全卵ホールも含まれるものであること。

イ　鶏の液卵の名称については、(ア)殺菌、未殺菌の別、(イ)凍結しているものにあってはその旨、(ウ)全卵、卵黄、卵白の別が分かるように表示すること。

ウ　加糖し、又は加塩した鶏の液卵については、その糖分又は塩分の含有量により殺菌温度、時間が異なることから糖分又は塩分の重量百分率について表示すること。

エ　未殺菌の鶏の液卵について、飲食に供する際に加熱殺菌を要する旨の表示は、加熱加工用の鶏の殻付き卵と同様、枠で囲ったり、太字で表示する等加熱殺菌が必要であることが使用者に明確になるようにすること。

⑤　生かき

ア　生食用かきの採取水域の表示は、ノロウイルスに汚染されたかきにより食中毒が発生した際に、採取水域までの遡り調査を緊急に行うとともに、食中毒の被害拡大防止に資するためのものであるので、国内産かきと外国産かきを混合し、同一包装で販売しないこと。

イ　国内産かきの場合においても、隣接する採取水域等で、加工施設の立地条件等によりやむを得ない場合を除き、異なる採取水域で採取されたものを混合し、同一包装で販売しないこと。なお、やむを得ず混合する場合においても、全ての採取水域の名称を表示すること。

ウ　輸入されたかきの採取水域の表示は､次により表示するよう指導すること。

(ｱ) 輸入生食用かきの採取水域の表示に当たっては、輸入時に添付される衛生証明書（Certificate）に記載されている採取水域（Harvest Area/Growing Area）をカタカナ表記等に改めて表記するとともに、輸出国名（必要に応じ、州名等を加える。）を併記すること。

なお、各輸出国別の採取水域の表示例については、別添　輸入される生食用かきの採取水域区分（名称）の例示を参考とされたい。

(ｲ) オーストラリアについては､水域名の後に州名を表す略号を付すること。

なお、州名の略称については、別添　輸入される生食用かきの採取水域

区分（名称）の例示を参考とされたい。

(ｳ) ニュージーランドについては、衛生証明書中の採取水域がコードで記載されているので、別添　Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption inAccordance with Regulation 48 of the Animal Productsを参考にし、各コードが示す水域の名称を表示すること。

(ｴ) 輸入者から包装業者等に販売される場合は、衛生証明書の写しを送り状に添付する等採取水域に関する情報を包装業者等に提供するよう関係事業者を指導すること。

(ｵ) 生産者の登録番号等のみをもって採取水域の表示とすることはできないこと。

エ　蓄養等複数の採取水域において生育されたかきについては、原則として採取される直前の採取水域の名称を表示すること。

オ　容器包装に入れずに包装業者等に販売される場合は、送り状等により採取水域に関する情報を伝達するよう指導すること。

カ　生食用以外のかきについて、飲食に供する際は「加熱調理用」、「加熱加工用」、「加熱用」等加熱しなければならないことを明確に表示するよう、指導すること。

キ　採取水域に係る報告について

(ｱ) 都道府県等が、自然環境等を考慮した上で採取水域の範囲及びその範囲を適切に表す名称を定めたときは、採取水域の範囲及びその範囲の名称を消費者庁食品表示課に報告すること。

(ｲ) (ｱ)の採取水域の範囲及びその範囲の名称を変更する場合についても、消費者庁食品表示課に報告すること。

⑥　ふぐ

ロットが特定できるものとして、ロット番号等を表示する際には、消費期限又は賞味期限に頼らなくてもロットが特定でき、かつ、加工年月日表示よりもロット単位が粗くならないようにすることとし、容易に判読可能な番号等を表示すること。なお、加工年月日は、製品となった日（個包装された日）とする。

⑦　冷凍食品

ア　名称のほか、冷凍食品である旨を表示する。

イ　凍結させる直前に加熱されたものであるかどうかの別の表示にあっては、「凍結直前未加熱」、「凍結直前加熱」など、食品衛生法に基づく規格が適用される食品であることがわかるよう、冷凍食品である旨の表示に近接した箇所に表示する。

⑧　容器包装に密封された常温で流通する食品（清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品及び魚肉練り製品を除く。）のうち、水素イオン指数が4.6を超え、かつ、水分活性が0.94を超え、かつ、その中心部の温度を摂氏120度で４分間に満た

ない条件で加熱殺菌されたものであって、ボツリヌス菌を原因とする食中毒の発生を防止するために摂氏10度以下での保存を要する食品

一括表示の保存方法の欄に摂氏10度以下で保存しなければならない旨を表示するとともに、要冷蔵食品であることが消費者等に明確に分かるように、加えて、容器包装のおもて面に冷蔵を要する食品である旨の文字（「要冷蔵」等）をわかりやすい大きさ（おおむね20ポイント以上）で、色彩、場所等を工夫して表示すること。

2　表示の省略

表示を省略することができる食品についても、表示が可能なものについては、できるだけ表示することが望ましい。

3　義務表示の特例

食品表示基準第５条第１項柱書の「前二条の規定にかかわらず、次の表の上欄に掲げる場合にあっては、同表の下欄に掲げる表示事項の表示は要しない。」とは、上欄に掲げる場合にあっては､そもそも表示義務が課されていないということを意味する。したがって、食品表示基準第３条第３項の規定に基づき表示を省略することが可能な食品とは異なり、任意で下欄の表示事項を表示をする場合であっても、表示方法が定められているものではない。

ただし、食品表示基準第41条第１項の規定に基づき、食品表示基準第３条及び第４条に定める方法により表示するよう努めるものとされていることから、そのような表示が望ましい旨指導等を行っていただきたい。

4　任意表示

（１）　栄養機能食品に係る栄養成分の機能

①　表示内容の主旨が同じものであっても食品表示基準別表第11で定める栄養成分の機能及び摂取をする上での注意事項に変化を加えたり、省略したりすることは認められない。

なお、一つの食品で二つ以上の栄養成分について栄養成分の機能や摂取をする上での注意事項を表示する際、当該栄養成分の機能や摂取をする上での注意事項が同一の場合にはまとめて記載しても差し支えない（例１及び例２）。

また、一つの栄養成分に二つ以上の栄養成分の機能があり、かつ、文末表現が同一の場合は、次のようにまとめて表示することで差し支えない（例３）。

（例１）一つの食品で二つ以上の栄養成分について栄養成分の機能を表示する場合（パントテン酸、ビタミンB_1及びビタミンB_2の栄養機能食品の例）

パントテン酸、ビタミンB_1及びビタミンB_2は、エネルギーを作るのを助ける栄養素のひとつです。

ビタミンB_2は、皮膚や粘膜の健康維持を助ける栄養素のひとつです。

（例２）一つの食品で二つ以上の栄養成分について摂取をする上での注意事項を

表示する場合

（ｉ）ビタミンA、ビタミンC及びビタミンKの栄養機能食品の例

本品は、多量摂取により疾病が治癒したり、より健康が増進するものではありません。一日の摂取目安量を守ってください。妊娠三か月以内又は妊娠を希望する女性は、ビタミンAの過剰摂取にならないよう注意してください。血液凝固阻止薬を服用している方は本品の摂取を避けてください。

（ⅱ）亜鉛及びマグネシウムの栄養機能食品の例

本品は、多量摂取により疾病が治癒したり、より健康が増進するものではありません。亜鉛の摂り過ぎは、銅の吸収を阻害するおそれがありますので、過剰摂取にならないよう注意してください。マグネシウムを多量に摂取すると軟便（下痢）になることがあります。一日の摂取目安量を守ってください。乳幼児・小児は本品の摂取を避けてください。

（例３）一つの栄養成分に二つ以上の栄養成分の機能がある場合（ビタミンCの栄養機能食品の例）

ビタミンCは、抗酸化作用により細胞を保護するのを助ける栄養素のひとつです。

ビタミンCは、皮膚や粘膜、骨、血管のコラーゲン合成を助けるとともに、鉄の吸収を助ける栄養素です。

複数の栄養機能食品を摂取することによる過剰リスクを防ぐため、機能を表示しない栄養成分であっても、強化されているものは積極的にその含有量を表示することが望ましい。

② 「栄養素等表示基準値の対象年齢及び基準熱量に関する文言」とは、「栄養素等表示基準値（18歳以上、基準熱量2,200kcal）」その他これに類する文言とする。令和７年４月１日改正後の栄養素等表示基準値に関する表示をする場合、従前の基準と区別するために、「栄養素等表示基準値（2025）」等、日本人の食事摂取基準（2025年版）を基にしていることが分かるような表示とすることが望ましい。

③ 必要的表示事項である栄養素等表示基準値に対する割合、栄養素等表示基準値の対象年齢及び基準熱量に関する文言を表示した上で、小児や月経ありの女性等、特定の性・年齢階級を対象とした食事摂取基準を任意で表示することは差し支えない。その場合、出典を明記すること。

④ 栄養機能食品の基準を満たしているか否かは販売時に判断するものであるが、販売時に栄養機能食品の基準を満たすものであっても、摂取時に栄養機能食品の基準を満たさなくなる食品に栄養成分の機能を表示することは望ましくない。

（２） 栄養成分の補給ができる旨及び栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨

① 共通事項

ア 栄養表示等の範囲

食品表示基準が適用される栄養表示とは、邦文によるものであること。なお、全体として邦文表示を行っていて、食品表示基準に適合しない栄養強調表示のみを邦文以外で行うこと等は適当でない。

食品表示基準を満たしていないにもかかわらず、文字の色や大きさ等を変えることにより、目立たせて表示することは望ましくない。

イ 高い、低いに言及せずに栄養成分名のみ目立たせて表示するものについては、栄養強調表示の基準は適用されないものの、消費者に誤認を与えないような表示とすること。

なお、塩、シュガー、脂肪、糖といった表現でも栄養強調表示の基準が適用される。

ウ 栄養強調表示の基準を満たしているか否かは販売時に判断するものであるが、販売時に栄養強調表示の基準を満たすものであっても、摂取時に栄養強調表示の基準を満たさなくなる食品に強調表示することは望ましくない。

エ 原材料について栄養強調表示をする場合、最終製品についても栄養強調表示の基準を満たしていることが望ましい。すなわち、最終製品中の含有量が極めて低い（高い）にもかかわらず、原材料についてのみ栄養成分の補給ができる旨及び栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨を表示することは不適当である。

オ 相対表示（「強化された旨の表示」（食品表示基準第７条及び第21条の表の栄養成分の補給ができる旨の項の３）及び「低減された旨の表示」（食品表示基準第７条及び第21条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の３））については、以下のとおりとする。

(ｱ) 当該他の同種の食品を特定するために必要な事項（食品表示基準第７条の表の栄養成分の補給ができる旨の項の３の一及び同表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の３の一）は、「自社従来品○○○」、「日本食品標準成分表○○○年版（○訂）」、「コーヒー飲料標準品」等当該食品を特定するために必要な事項を表示すること。

(ｲ) 比較対象食品名及び増加（低減）量又は割合は、相対表示と近接した場所に記載すること。ただし、比較対象食品が全く同種の食品である場合は、比較対象食品名の表示は、近接した場所でなくてもよい。

(ｳ) 比較対象食品は、全く同種の食品でなくても、例えばバターとマーガリンを比較する等も可能であるが、次の場合は不適当である。

(a) 比較対象食品の当該栄養成分が一般流通品と比べて高く、「低減された旨」を表示する食品の当該栄養成分が一般流通品と比較して大差がない場合

(b) 比較対象食品の流通がかなり以前に終了している等、事実上比較が不可能な場合

カ　熱量や栄養成分値に関して「ハーフ」、「２倍」、「１／４」等を表示する場合、相対表示に該当する。

キ　食品単位当たりの使用量が異なる食品を比較対象食品とした場合も、強化（低減）された量及び割合は、100g（一般に飲用に供する液状の食品の場合は100ml）当たりで基準を満たして表示する必要がある。その上で、容器包装へ強化（低減）された量又は割合を食品単位当たりでの比較して表示する場合、消費者への適切な情報提供の観点から、食品単位当たりの比較である旨を表示することが望ましい。

② 栄養成分の補給ができる旨

ア　高い旨の表示（食品表示基準第７条の表の栄養成分の補給ができる旨の項の１）とは、「高」、「多」、「豊富」その他これに類する表示をいうものであること。

イ　高い旨の表示は、当該栄養成分を強化していなくても、その食品本来の性質として基準を満たしていれば行うことができるが、例えば、単に「高たんぱく質チーズ」と表示するなど、当該チーズが他のチーズに比べて、たんぱく質が多いという誤解を招くような表示は適当ではないため、「チーズは高たんぱく質食品です。」などと表示するよう指導されたい。

ウ　含む旨の表示（食品表示基準第７条の表の栄養成分の補給ができる旨の項の２）とは、「源」、「供給」、「含有」、「入り」、「使用」、「添加」その他これに類する表示をいうものであること。

エ　強化された旨の表示は、他の食品と比べて栄養成分の量が強化された旨の表示であること（食品表示基準第７条の表の栄養成分の補給ができる旨の項の３）。比較対象食品名及び増加量又は割合を記載せずに、単に「高」等の表示がされた場合は、強化された旨の表示ではなく、高い旨の表示となる。

オ　「ビタミンを含む」、「ミネラルたっぷり」のように、ビタミンやミネラルの総称について栄養強調表示を行う場合は、食品表示基準で規定する全てのビタミン又はミネラルについて栄養強調表示の基準が適用される。一部のビタミンやミネラルについてのみ栄養強調表示の基準を満たしている場合は、その栄養成分名を表示する必要がある。

③ 栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨

ア　含まない旨の表示（食品表示基準第７条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の１）とは、「無」、「ゼロ」、「ノン」その他これに類する表示をいうものであり、「不使用」、「無添加」は該当しないものであること。

「ノンシュガー」、「シュガーレス」のような表示は、糖類に係る含まない旨の表示の基準が適用されるものであること。

低い旨の表示（食品表示基準第７条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の２）とは、「低」、「ひかえめ」、「少」、「ライト」その他こ

れに類する表示をいうものであること。

適切な摂取ができる旨の表示の基準が適用される栄養成分及び熱量は、あくまで「国民の栄養摂取の状況からみてその過剰な摂取が国民の健康の保持増進を妨げている」（健康増進法第16条の２第２項第２号ロ）ものであって、そもそも栄養成分や熱量である以上、エネルギーを供給し、又は生命の維持・成長に必要不可欠なものであり、本来、有害な成分でないことは当然であること。

イ　ノンオイルドレッシングの取扱いについては、食品表示基準別表第13の備考１によることとするが、ノンオイルドレッシングのうち食品表示基準別表第13の備考１の基準値（３ｇ／100ｇ未満）は満たすものの、食品表示規準別表第13の第２欄の基準値（0.5ｇ／100ｇ未満）を超えるものにあっては、消費者に適切な情報提供を図るため、原材料として食用油脂を使用していない旨及び当該食品の脂質量の由来を明らかにする旨の表示を行うよう努めること。

ウ　低減された旨の表示（食品表示基準第７条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の３）は、他の食品と比べて栄養成分量が低減された旨の表示であること。比較対象食品及び低減量又は割合を記載せずに単に「低」等の表示がなされた場合は、低減された旨の表示ではなく低い旨の表示となること。

「減塩」や「食塩〇〇％カット」という表示は、ナトリウムに係る低減された旨の表示の基準が適用されるものであること。

エ　食品表示基準第７条の表の栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨の項の３の「ナトリウムの含有量を二十五パーセント以上低減することにより、当該食品の保存性及び品質を保つことが著しく困難な食品」については、以下のものをいう。

みそ

しょうゆ

なお、これらの食品についてナトリウムの適切な摂取ができる旨の表示をする場合は、他の食品に比べて低減されたナトリウムの含有量の割合が以下に定める割合以上である場合に行うものとする。

みそ　15％

しょうゆ　20％

（３）　糖類を添加していない旨

糖類を添加していない旨の表示の例は、「糖類無添加」、「砂糖不使用」その他これに類する表示をいう。

添加糖類に代わる原材料の具体例は、ジャム、ゼリー、甘味の付いたチョコレート、甘味の付いた果実片、非還元濃縮果汁、乾燥果実ペースト等のこと。

（４）　ナトリウム塩を添加していない旨

ナトリウム塩を添加していない旨の表示の例は、「食塩無添加」その他これに類する表示をいう。

添加ナトリウム塩に代わる原材料の具体例は、ウスターソース、ピクルス、ペパローニ、しょう油、塩蔵魚、フィッシュソース等のこと。

5　表示の方式

（1）　「邦文をもって」

第８条第１号の「邦文をもって」とは、原則として、漢字、平仮名、片仮名又はアラビア数字を用いて表示することをいう。

ただし、以下の場合は、ローマ字等を用いて表示しても「邦文をもって」とみなす。

①　「食品関連事業者名の氏名又は名称」又は「製造者又は加工者の氏名又は名称（輸入品にあっては、輸入業者の氏名又は名称、乳にあっては、乳処理業者（特別牛乳にあっては、特別牛乳搾取処理業者）の氏名又は名称)」を法人登記どおりに表示する場合。

ただし、片仮名で読み方を併記することが望ましい。

②　製造所固有記号が表す製造所の所在地及び製造者の氏名又は名称を表示したウェブサイトのアドレスを表示する場合

③　添加物の物質名等について、化学記号等を表示する場合。

④　単位を表示する場合

⑤　ローマ字等の表記が一般的であり、かつ、漢字、平仮名又は片仮名で表記した方が分かりにくい場合。

⑥　その他

（2）　小売のための包装

容器包装の上に更に小売のための包装（外装）を行う場合は、中の表示が透視できる場合を除き、外装に必要な表示を行わなければならない。

なお、容器包装の上に包装（外装）されている場合、それが小売のためのものでないときは、当該外装にも名称、製造者の氏名、住所並びに保存基準が定められた食品及び添加物にあっては、その保存方法を表示することが望ましい。

（3）　添加物表示

添加物の物質名又は簡略名の表示は、規則別表第１、名簿、別添　添加物１－１、別添　添加物２－１、別添　添加物２－２及び別添　添加物２－３に掲げる名称のとおりに表示することが原則であるが、食品関連事業者等及び一般消費者に誤解を与えない範囲内で平仮名、片仮名、漢字を用いても差し支えないものであること。

（4）　栄養成分表示

①　栄養成分表示に用いる食品表示基準別表第９の第１欄に掲げる栄養成分名又

は熱量は、以下のとおり表示することができる。
熱量にあっては、「エネルギー」
たんぱく質にあっては、「蛋白質」、「たん白質」、「タンパク質」、「たんぱく」、「タンパク」
ミネラルにあっては、元素記号
（例）カルシウムにあっては「Ｃａ」、鉄にあっては「Ｆｅ」、ナトリウムにあっては「Ｎａ」
ビタミン（ナイアシン、パントテン酸、ビオチン及び葉酸を除く。）にあっては、ビタミン名の略語
（例）ビタミンＡにあっては、「Ｖ．Ａ」、「ＶＡ」

② kcalはキロカロリー、ｇはグラム、mgはミリグラム、μgはマイクログラムと表示することができる。
ＩＵ又は国際単位は表示不可とする。

③ 幅表示の幅は、適切に設定すること。例えば、過度に広い幅で表示することは適当ではない。

④ 少なくとも、栄養成分の補給ができる旨及び栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨を表示する栄養成分については、消費者の商品選択に資するため、栄養素等表示基準値に占める割合を併せて表示することが望ましい。

⑤ 最小表示の位は、次のとおりとする。
なお、位を下げることを妨げるものではなく、その場合は、その下の位を四捨五入して表示する。

たんぱく質	１の位※1	マグネシウム	１の位
脂質	１の位※1	マンガン	小数第１位
飽和脂肪酸	１の位※1	モリブデン	１の位
ｎ－３系脂肪酸	小数第１位	ヨウ素	１の位
ｎ－６系脂肪酸	小数第１位	リン	１の位
コレステロール	１の位※1	ナイアシン	１の位
炭水化物	１の位※1	パントテン酸	小数第１位
糖質	１の位※1	ビオチン	１の位
糖類	１の位※1	ビタミンＡ	１の位
食物繊維	１の位	ビタミンB_1	小数第１位
亜鉛	小数第１位	ビタミンB_2	小数第１位
カリウム	１の位	ビタミンB_6	小数第１位
カルシウム	１の位	ビタミンB_{12}	小数第１位
クロム	１の位	ビタミンＣ	１の位

セレン	１の位	ビタミンD	小数第１位
鉄	小数第１位	ビタミンE	小数第１位
銅	小数第１位	ビタミンK	１の位
ナトリウム	１の位※1	葉酸	１の位
食塩相当量	小数第１位※2	熱量	１の位※1

※１　１の位に満たない場合であって、０と表示することができる量（別表第９の第５欄）以上であるときは、有効数字１桁以上とする。

※２　小数第１位に満たない場合であって、ナトリウムの量が０と表示することができる量（別表第９の第５欄）以上であるときは、有効数字１桁以上とする。なお、食塩相当量を０と表示できる場合には、「０．０」、「０」と表示しても差し支えない。

⑥　含有量が０の場合であるものについても表示事項の省略はできないものであること。ただし、近接した複数の表示事項が０である場合は、例えば、「たんぱく質と脂質が０」というように一括して表示することができるものであること（食品表示基準別記様式２の備考３）。

⑦　セットで販売され、通常一緒に食される食品（即席めんなどにおけるめん、かやく、スープの素、ハンバーグセットにおけるハンバーグとソース等）の表示については、セット合計の含有量を表示すること。これに併せて、セットを構成する個々の食品についても、含有量を表示することは差し支えない。

⑧　食品表示基準第３条第１項の表の栄養成分の量及び熱量の項の２の一の記載は、別記様式２又は別記様式３に近接した場所に表示すること。

⑨　表示値は許容差の範囲の基準となるものであり、意図的に操作されるべきでないことから、表示を行う製品を代表する製品を分析して得られたデータの加重平均値とすべきである（合理的な推定により得られた値を除く。）。ただし、含有量の表示に際しては、必ず分析を行わなければならないものではなく、結果として表示された含有量が許容差の範囲内であれば表示基準違反にはならないこと。

機能を表示する栄養成分、栄養強調表示をする栄養成分の量及び熱量は、別添　栄養成分等の分析方法等に規定された分析法により測定すること。

６　業務用加工食品における製造所又は加工所の所在地及び製造者又は加工者の氏名又は名称

１（６）（⑤ア、イ及びエを除く。）に係る記述を参照すること。

なお、食品表示基準第10条第２項の表の下欄の「製造所」には、食品表示基準附則第２条の規定による廃止前の食品衛生法第十九条第一項の規定に基づく表示の基準に

関する内閣府令第10条に規定する製造所固有の記号を使用することができた場所のうち、食品表示基準において「加工所」と取り扱われる場所を含むものとする。

7　業務用加工食品の表示の方式

（1）　送り状等への表示は、食品表示基準第13条第１項第２号の表に掲げる食品について、送り状、納品書等又は規格書等（以下「送り状等」という。）へ表示する場合においては、送り状等及び当該容器包装の双方に、名称、製造所又は加工所の所在地及び製造者又は加工者の氏名又は名称、当該記号並びに購入者の氏名及び住所（法人にあっては、その名称及び主たる事務所の所在地）のほか、ロット記号等当該食品と送り状等との同一性を確認できる記号を表示する必要があること。

なお、送り状等の表示をする場合は、当該食品を原料として使用するまでの間、ロット管理のために送り状等を保管すること。

（2）　容器包装に入れられた食肉については、合成樹脂フィルム等で包装された食肉の一定数をまとめてカートンボックス詰めにし、このカートン単位で取り引きすることが通常のものについては、そのカートンに所要の表示をして差し支えない。

また、表示の方法は、容器包装に直接印刷する方法、スタンプで押印する方法、ステッカーを貼布する方法又は荷札様のものを付けても差し支えない。ただし、荷札様のものについては、その包装形態からみて、他の方法が不可能な場合に限り、かつ、不正に再使用してはならないこと。

（生鮮食品）

1　義務表示事項

（1）　特定保健用食品に係る事項

加工食品に係る記述を参照すること。

（2）　機能性表示食品に係る事項

別添　機能性表示食品を参照すること。

（3）　遺伝子組換え農産物に関する事項

加工食品に係る記述を参照すること。

（4）　乳児用規格適用食品である旨

加工食品に係る記述を参照すること。

（5）　食品表示基準別表第24に定めるもの

①　アボカド、あんず、おうとう、かんきつ類、キウィー、ざくろ、すもも、西洋なし、ネクタリン、パイナップル、バナナ、パパイヤ、ばれいしょ、びわ、マルメロ、マンゴー、もも及びりんごに関する事項

別添　添加物１－６の「１　防かび剤又は防ばい剤」に掲げる添加物及びこ

れを含む製剤を使用したアボカド、あんず、おうとう、かんきつ類、キウィー、ざくろ、すもも、西洋なし、ネクタリン、パイナップル、バナナ、パパイヤ、ばれいしょ、びわ、マルメロ、マンゴー、もも及びりんごを、容器包装に入れないで消費者に販売する場合であっても、これを使用した旨の表示を行うよう食品関連事業者に指導すること。

② 食肉に関する事項

ア 食品表示基準の対象となる食品（牛肉（内臓を除く。）であって生食用のものに限る。）は、「食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号)」の生食用食肉の規格基準の対象である食品と同じであり、いわゆるユッケ及び牛刺しが含まれる。

なお、仮に、規格基準の加工基準(７)に規定する「容器包装に入れ、密封」した状態の食肉を同加工基準(７)に規定する加熱殺菌を行うために別の事業者に販売する場合にあっては、その販売時の食肉には本表示基準の表示義務はかからないが、当該食肉の容器包装に「(同加工基準(７)に規定する）加熱殺菌を行う前の食肉である」旨が分かるように表示するよう指導すること。

イ 生食用である旨の表示について

生食用である旨の表示は、「生食用」、「生のまま食べられます」等のように明確に生食用である旨について表示する必要があり、「ユッケ用」、「牛刺し用」等の表示を生食用である旨の表示とみなすことはできない。

ウ と畜場名、加工施設名等の表示について

(ｱ) と畜場の名称の表示については、と畜場番号や牛の個体識別のための情報の管理及び伝達に関する特別措置法（平成15年法律第72号）に規定する個体識別番号の表示をもって代えることはできない。

(ｲ) 生食用食肉の加工基準に適合する方法で加工が行われた施設が複数存在する場合には、それぞれの加工施設を表示すること。その際、加工工程順に表示するよう指導すること。また、加工施設の表示とは別に、食肉の最終加工を行った者については、従来どおり加工者の氏名（名称）等の表示が必要であること。

(ｳ) 加工施設の名称については、食中毒発生時に迅速に施設を特定することができるよう、営業者が営業許可申請書に記載した営業所の名称、屋号又は商号を記載するよう指導すること。

(ｴ) 同一都道府県内に同一の名称のと畜場や加工施設が存在する場合には、と畜場や加工施設が特定できる程度に詳細に所在地を表示するよう指導すること。

エ 注意喚起に係る表示基準である「子供、高齢者その他食中毒に対する抵抗力の弱い者は食肉の生食を控えるべき旨」において、「子供」、「高齢者」、「その他食中毒に対する抵抗力の弱い者」については例示ではなく、これら全てを表示する必要がある。

オ 生食用食肉の規格基準の調理基準において、「調理を行った生食用食肉は、

速やかに提供しなければならない。」とされていることから、凍結させていない生食用食肉を小売店等において消費者に対して直接販売する場合には、消費者が速やかに消費するよう適切な消費期限を表示するよう指導すること。

カ　「刃を用いてその原形を保ったまま筋及び繊維を短く切断する処理」とはテンダライズ処理をいう。

③　鶏の殻付き卵に関する事項

ア　鶏の殻付き卵について、選別包装を行った施設の所在地を表示する場合にあっては、食品衛生上の問題が生じた場合の遡り調査を容易にするため、選別包装を行った者は採卵を行った施設が特定できるよう必要な記録を作成すること。

イ　鶏の殻付き卵については使用の方法、生食用の鶏の殻付き卵にあっては生食用である旨等を表示することとしたが、これらの表示については、「生で食べる場合は賞味期限内に使用し、賞味期限経過後は、十分に加熱調理する必要がある」旨の表示でも差し支えない。なお、生食用としての賞味期限経過後は、できる限り速やかに消費するよう指導すること。

ウ　生食用の鶏の殻付き卵については、特に家庭や飲食店等において、摂氏10度以下で保存することが望ましい旨の表示をすることとしたが、営業者が流通過程で卵を一時的に冷蔵し、その後、冷蔵状態から高温多湿の環境下で流通させる場合にあっては、卵殻表面に結露が生じる等卵の品質に悪い影響を及ぼすことが懸念されることから、卵を冷蔵する場合にあっては、できる限り流通から消費に至るまで一貫して冷蔵流通することが望ましいこと。

エ　加熱加工用の鶏の殻付き卵については、加熱加工用である旨及び飲食に供する際に加熱殺菌を要する旨の表示をすることとしたが、この場合、表示内容を枠で囲んだり、太字で表示する等加熱殺菌が必要であることが消費者に明確になるようにすること。

④　ふぐの内蔵を除去し、皮をはいだもの並びに切り身にしたふぐ、ふぐの精巣及びふぐの皮であって、生食用でないものに関する事項

処理事業者の氏名又は名称及び住所の表示は、処理事業者の氏名又は名称及び処理施設の所在地を表示すること。

⑤　冷凍食品のうち、切り身又はむき身にした魚介類（生かきを除く。）を凍結させたものに関する事項

名称のほか、冷凍食品である旨を表示すること。

⑥　生かきに関する事項

加工食品に係る記述を参照すること。

2　任意表示

栄養成分は、加熱等により栄養成分に大きく変化が生じる食品については、機能を表示する栄養成分の量が食品表示基準別表第11の上下限値の範囲内にあることを担保する調理法を表示すること。

3　表示の方式

（1）　容器包装に入れられた生鮮食品の表示

生鮮食品の表示については、一部の事項を除き容器包装（容器包装が小売りのために包装されている場合は、当該包装。以下同じ。）の見やすい箇所に表示することとされているが、容器包装の形状等により当該容器包装に直接表示することが困難な場合は、以下の箇所への表示をもって、容器包装への表示に代えることができることとする。

①　透明な容器包装に包装されている等、必要な表示事項が外部から容易に確認できる場合にあっては、当該容器包装に内封されている表示書

なお、鶏の殻付き卵に関する賞味期限の表示については、表示書に代えて全ての卵の殻に直接印字することにより表示しても差し支えない。

②　容器包装に結び付ける等、当該容器包装と一体となっている場合にあっては、当該容器包装に結び付けられた札、票せん、プレート等

（2）　添加物表示

加工食品に係る記述を参照すること。

（3）　上記１の（５）①の表示

以下のいずれかの方法により表示すること。

①　値札若しくは商品名を表示した札、又はこれらに近接した掲示物に表示する。

②　陳列用容器に表示する。

③　その他消費者等が容易に識別できるような方法で表示する。

4　表示禁止事項

食品表示基準第23条第１項柱書本文の「第十八条、第十九条及び第二十一条に掲げる表示事項に関連して」とは、義務表示事項又は任意表示事項に関連する限りにおいて、食品表示基準第23条第１項各号の表示禁止事項が適用されるということを意味する。すなわち、表示禁止事項が適用される表示媒体については、食品表示基準第23条第１項第２号及び第３号の規定に連動して規制がかかることになる。

したがって、例えば、特定保健用食品、機能性表示食品及び栄養機能食品の表示ルールは容器包装に入れられた生鮮食品についてのみ規定されているため、食品表示基準第23条第１項第８号の「保健機能食品以外の食品にあっては、保健機能食品と紛らわしい名称、栄養成分の機能及び特定の保健の目的が期待できる旨を示す用語」の表示の禁止も、容器包装に入れられた生鮮食品の容器包装についてのみ適用される。

（添加物）

1　義務表示事項

（1）　名称

①　添加物の名称及びその製剤の成分の表示にあっては、一括名又は簡略名を名称として用いることはできないこと。

②　製剤である添加物にあっては、原則として次のいずれかの名称を表示する。

ア　製剤である旨を表示できる文字を付した使用目的を表す名称を表示する。

（例）甘味料製剤、保存料製剤等

イ　製剤である旨を表示できる文字を付した主要成分を表す名称を表示する。その主要成分は規則別表第１に掲げる添加物にあっては規則別表第１の名称、その他の添加物にあっては名簿に掲げる名称又は別添　添加物２－１に掲げる品名を使用する。

（例）エリソルビン酸製剤、カンゾウ抽出物製剤等

③　規則別表第１に掲げる添加物の表示は規則別表第１に掲げる名称により行うこと。既存添加物の表示は、名簿に掲げる名称又は別添　添加物２－１に掲げる品名により行うものであること。また、天然香料及び一般飲食物添加物の表示は、別添　添加物２－２及び別添　添加物２－３に掲げる品名により行うものであること。ただし、別添　添加物２－２及び別添　添加物２－３に記載のない添加物にあっては、当該添加物であることが特定できる科学的に適切な名称をもって表示するものであること。

なお、天然香料にあっては、「香料」の文字を付すこと。

（2）　保存の方法

加工食品に係る記述を参照すること。

（3）　消費期限又は賞味期限

加工食品に係る記述を参照すること。

（4）　製造所又は加工所の所在地（輸入品にあっては、輸入業者の営業所所在地）及び製造者又は加工者の氏名又は名称（輸入品にあっては、輸入業者の氏名又は名称）

加工食品に係る記述を参照すること。

（5）　使用の方法

①　使用の方法の表示は、規格基準に使用されている用語をそのまま表示することを原則とするが、内容を改変しない限り、一般的な平易な用語をもって表示することは差し支えない。

②　規格基準の第２添加物の部Ｆ使用基準の項の添加物一般の目中添加物製剤のみなし規定にいう「添加物製剤に含まれる原料たる添加物」とは、当該製剤を

食品に使用した場合において、その成分による影響を当該食品に及ぼす添加物をいうものであること。

したがって、その成分による影響を当該食品に及ぼさない添加物であって、それが保存、酸化防止、矯臭等当該製剤の品質保持に必要不可欠な場合にあっては、当該添加物の使用はみなし規定に該当しないものとするものであること。

③　使用の方法の表示の省略の運用は、次のとおりとする。

ア　当該添加物製剤の成分及び重量パーセントから判断して、用途を限定することが適当と考えられるものであって、使用の方法の表示中に当該用途にのみ使用する旨を表示した場合にあっては、表示された用途以外に用いる場合の使用の方法に係る表示は省略できるものであること。例えば、酢酸ビニール樹脂はチューインガムの基礎剤及び果実果菜の表皮の被膜剤として使用が認められているが、チューインガムの基礎剤用と表示してある場合には、その使用方法の表示のみでよい。

イ　添加物一般の使用基準に規定される添加物製剤に含まれる原料たる添加物以外の添加物にあっては、当該添加物の使用方法に係る表示は省略できるものであること。

（6）　成分及び重量パーセント

①　食品表示基準第32条第２項の表中の製剤である添加物の項において、「成分（着香の目的で使用されるものを除く。）及び重量パーセント」を表示することとしているが、この「成分」には、添加物製剤に含まれる原料たる添加物（当該製剤を食品に使用した場合において、その成分による影響を当該食品に及ぼす添加物をいう。）のほか、添加物製剤に含まれる原料たる添加物以外の添加物、賦形剤等の食品素材についても含むものであること。

②　添加物製剤の成分の重量パーセント表示については、当該製剤の製造における当該添加物の配合量を基準として行うこと。

③　規格基準により規定されている「亜硫酸水素カリウム液」、「亜硫酸水素ナトリウム液」、「酢酸」、「水溶性アナトー」、「Ｄ－ソルビトール液」、「ピロリン酸第二鉄液」等については、製剤に準じて、その成分及び重量パーセントを表示するものであること。また、これら及び表示量の規定のあるものを用いて製剤を製造する場合には、添加物原体に換算して重量パーセントを表示するものであること。

④　重量パーセントの表示に当たっては、秤取量の有効数字に配慮して表示することが望ましいものであること。

（7）　その他

タール色素の製剤にあっては、「製剤」の文字を冠した実効の色名、例えば、

「着色料製剤黄赤色」と表示すること。

２　表示の方式

加工食品に係る記述を参照すること。

３　表示禁止事項

添加物の表示においては、いずれの場合においても「天然」又はこれに類する表現の使用は認められない。

（附則）

施行の際に加工食品の製造所又は加工所で製造過程にある加工食品（令和４年４月１日以降に販売予定であり、長期醸造されている酒類や果実酢等）については、令和４年４月１日以降もなお従前の例によることができるが、消費者への情報提供の観点から、可能な限り当該基準に基づく原料原産地表示を行うことが望ましい。

別添一覧

添加物関係

別添　添加物１－１　簡略名又は類別名一覧表
別添　添加物１－２　同種の機能の添加物を併用した場合における簡略名の例
別添　添加物１－３　規則別表第１に掲げる添加物のうち用途名併記を要するものの例示
別添　添加物１－４　各一括名の定義及びその添加物の範囲
別添　添加物１－５　栄養強化の目的が考えられる添加物の範囲
別添　添加物１－６　容器包装に入れないで販売される食品のうち、添加物の表示を要する添加物一覧
別添　添加物２－１　既存添加物名簿収載品目リスト
別添　添加物２－２　天然香料基原物質リスト
別添　添加物２－３　一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用される品目リスト

栄養表示関係

別添　栄養成分等の分析方法等

アレルゲン関係

別添　アレルゲンを含む食品に関する表示
―　別表１　特定原材料等の範囲
別表２　特定原材料等由来の添加物についての表示例
別表３　特定原材料等の代替表記等方法リスト
別添　アレルゲンを含む食品の検査方法
―　アレルゲンを含む食品の検査方法別添１
アレルゲンを含む食品の検査方法別添２　判断樹について
アレルゲンを含む食品の検査方法別添３　標準品規格
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を評価するガイドライン
アレルゲンを含む食品の検査方法別添５　アレルゲンを含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン

機能性表示食品関係

別添　機能性表示食品

遺伝子組換え食品表示関係

別添　バルク輸送される北米産の非遺伝子組換え大豆及びデント種の非遺伝子組換えとうもろこしの分別生産流通管理の指針
別添　安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

生かき関係

別添　輸入される生食用かきの採取水域区分（名称）の例示

別添　Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products

別添　添加物１－１

簡略名又は類別名一覧表

物　　質　　名	簡略名又は類別名
亜硝酸ナトリウム	亜硝酸 Na
Ｌ―アスコルビン酸	アスコルビン酸，V.C
Ｌ－アスコルビン酸カルシウム	アスコルビン酸 Ca，ビタミンＣ，V.C
Ｌ―アスコルビン酸ステアリン酸エステル	アスコルビン酸エステル，ビタミンＣ，V.C
Ｌ―アスコルビン酸ナトリウム	アスコルビン酸 Na，ビタミン C，V.C
Ｌ―アスコルビン酸 2―グルコシド	アスコルビン酸，ビタミン C，V.C
Ｌ―アスコルビン酸パルミチン酸エステル	アスコルビン酸エステル，ビタミンＣ，V.C
Ｌ―アスパラギン酸ナトリウム	アスパラギン酸ナトリウム，アスパラギン酸 Na
アセチル化アジピン酸架橋デンプン	加工デンプン
アセチル化酸化デンプン	加工デンプン
アセチル化リン酸架橋デンプン	加工デンプン
亜セレン酸ナトリウム	亜セレン酸 Na
β－アポ－８’－カロテナール	アポカロテナール、アポカロテナール色素、カロチノイド、カロチノイド色素、カロテノイド、カロテノイド色素
DL―アラニン	アラニン
亜硫酸水素アンモニウム水	亜硫酸塩，亜硫酸アンモニウム
亜硫酸ナトリウム	亜硫酸塩，亜硫酸 Na
Ｌ―アルギニンＬ―グルタミン酸塩	アルギニングルタミン酸塩
アルギン酸カリウム	アルギン酸 K
アルギン酸カルシウム	アルギン酸 Ca
アルギン酸ナトリウム	アルギン酸 Na
アルギン酸プロピレングリコールエステル	アルギン酸エステル
安息香酸ナトリウム	安息香酸 Na
Ｌ―イソロイシン	イソロイシン
5′―イノシン酸二ナトリウム	イノシン酸ナトリウム，イノシン酸 Na
5′―ウリジル酸二ナトリウム	ウリジル酸ナトリウム，ウリジル酸 Na
エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム	EDTA カルシウムナトリウム，EDTA―Ca・Na
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム	EDTA ナトリウム，EDTA―Na
エリソルビン酸ナトリウム	エリソルビン酸 Na，イソアスコルビン酸 Na
エルゴカルシフェロール	ビタミンＤ，V.D
塩化カリウム	塩化Ｋ
塩化カルシウム	塩化 Ca

塩化第二鉄	塩化鉄
塩化マグネシウム	塩化 Mg
オクテニルコハク酸デンプンナトリウム	加工デンプン，オクテニルコハク酸デンプン Na
オルトフェニルフェノール	OPP
オルトフェニルフェノールナトリウム	オルトフェニルフェノール Na，OPP―Na
オレイン酸ナトリウム	オレイン酸 Na
カゼインナトリウム	カゼイン Na
カルボキシメチルセルロースカルシウム	CMC―Ca，繊維素グリコール酸 Ca
カルボキシメチルセルロースナトリウム	CMC―Na，繊維素グリコール酸 Na，CMC
β―カロテン	カロチン，カロチン色素，カロチノイド，カロチノイド色素，カロテン，カロテン色素，カロテノイド，カロテノイド色素
カンタキサンチン	カロチノイド、カロチノイド色素、カロテノイド、カロテノイド色素
5′―グアニル酸二ナトリウム	グアニル酸ナトリウム，グアニル酸 Na
クエン酸イソプロピル	クエン酸エステル
クエン酸三エチル	クエン酸エチル
クエン酸一カリウム	クエン酸カリウム，クエン酸K
クエン酸三カリウム	クエン酸カリウム，クエン酸K
クエン酸カルシウム	クエン酸 Ca
クエン酸第一鉄ナトリウム	クエン酸鉄 Na
クエン酸三ナトリウム	クエン酸 Na
グリセリン脂肪酸エステル	グリセリンエステル
グリチルリチン酸二ナトリウム	グリチルリチン酸ナトリウム，グリチルリチン酸 Na
グルコン酸カリウム	グルコン酸K
グルコン酸カルシウム	グルコン酸 Ca
グルコン酸ナトリウム	グルコン酸 Na
L―グルタミン酸	グルタミン酸
L―グルタミン酸アンモニウム	グルタミン酸アンモニウム
L―グルタミン酸カリウム	グルタミン酸カリウム，グルタミン酸K
L―グルタミン酸カルシウム	グルタミン酸カルシウム，グルタミン酸 Ca
L―グルタミン酸ナトリウム	グルタミン酸ナトリウム，グルタミン酸 Na
L―グルタミン酸マグネシウム	グルタミン酸マグネシウム，グルタミン酸 Mg
ケイ酸カルシウム	ケイ酸 Ca
ケイ酸マグネシウム	ケイ酸 Mg
コハク酸一ナトリウム	コハク酸ナトリウム，コハク酸 Na
コハク酸二ナトリウム	コハク酸ナトリウム，コハク酸 Na

コレカルシフェロール	ビタミンD，V.D
コンドロイチン硫酸ナトリウム	コンドロイチン硫酸 Na
酢酸カルシウム	酢酸 Ca
酢酸デンプン	加工デンプン
酢酸ナトリウム	酢酸 Na
サッカリンカルシウム	サッカリン Ca
サッカリンナトリウム	サッカリン Na
酸化カルシウム	酸化 Ca
酸化デンプン	加工デンプン
酸化マグネシウム	酸化 Mg
三二酸化鉄	酸化鉄
次亜塩素酸ナトリウム	次亜塩素酸 Na
次亜硫酸ナトリウム	次亜硫酸 Na，亜硫酸塩
Ｌ―システイン塩酸塩	システイン塩酸塩，システイン
5′―シチジル酸二ナトリウム	シチジル酸ナトリウム，シチジル酸 Na
ジフェニル	DP
ジフェノコナゾール	トリアゾール
ジブチルヒドロキシトルエン	BHT
ジベンゾイルチアミン	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
ジベンゾイルチアミン塩酸塩	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
DL―酒石酸	酒石酸
Ｌ―酒石酸	酒石酸
DL―酒石酸カリウム	酒石酸カリウム，酒石酸K
Ｌ―酒石酸カリウム	酒石酸カリウム，酒石酸K
Ｌ―酒石酸カルシウム	酒石酸カルシウム，酒石酸 Ca
DL―酒石酸水素カリウム	酒石酸カリウム，酒石酸K，重酒石酸カリウム，重酒石酸K
Ｌ―酒石酸水素カリウム	酒石酸カリウム，酒石酸K，重酒石酸カリウム，重酒石酸K
DL―酒石酸ナトリウム	酒石酸ナトリウム，酒石酸 Na
Ｌ―酒石酸ナトリウム	酒石酸ナトリウム，酒石酸 Na
硝酸カリウム	硝酸K
硝酸ナトリウム	硝酸 Na
食用赤色 2 号	赤色 2 号，赤 2
食用赤色 2 号アルミニウムレーキ	食用赤色 2 号，赤色 2 号，赤 2，アマランス
食用赤色 3 号	赤色 3 号，赤 3
食用赤色 3 号アルミニウムレーキ	食用赤色 3 号，赤色 3 号，赤 3，エリスロシン
食用赤色 40 号	赤色 40 号，赤 40

食用赤色 40 号アルミニウムレーキ	食用赤色 40 号，赤色 40 号，赤 40，アルラレッド AC
食用赤色 102 号	赤色 102 号，赤 102
食用赤色 104 号	赤色 104 号，赤 104
食用赤色 105 号	赤色 105 号，赤 105
食用赤色 106 号	赤色 106 号，赤 106
食用黄色 4 号	黄色 4 号，黄 4
食用黄色 4 号アルミニウムレーキ	食用黄色 4 号，黄色 4 号，黄 4，タートラジン
食用黄色 5 号	黄色 5 号，黄 5
食用黄色 5 号アルミニウムレーキ	食用黄色 5 号，黄色 5 号，黄 5，サンセットイエローFCF
食用緑色 3 号	緑色 3 号，緑 3
食用緑色 3 号アルミニウムレーキ	食用緑色 3 号，緑色 3 号，緑 3，ファストグリーン FCF
食用青色 1 号	青色 1 号，青 1
食用青色 1 号アルミニウムレーキ	食用青色 1 号，青色 1 号，青 1，ブリリアントブルーFCF
食用青色 2 号	青色 2 号，青 2
食用青色 2 号アルミニウムレーキ	食用青色 2 号，青色 2 号，青 2，インジゴカルミン
ショ糖脂肪酸エステル	ショ糖エステル
シリコーン樹脂	シリコーン
水酸化カリウム	水酸化K
水酸化カルシウム	水酸化 Ca
水酸化マグネシウム	水酸化 Mg
ステアリン酸カルシウム	ステアリン酸 Ca
ステアリン酸マグネシウム	ステアリン酸 Mg
ステアロイル乳酸カルシウム	ステアロイル乳酸 Ca，ステアリル乳酸 Ca
ステアロイル乳酸ナトリウム	ステアロイル乳酸 Na，ステアリル乳酸 Na
ソルビタン脂肪酸エステル	ソルビタンエステル
D―ソルビトール	ソルビトール，ソルビット
ソルビン酸カリウム	ソルビン酸K
ソルビン酸カルシウム	ソルビン酸 Ca
炭酸カリウム（無水）	炭酸カリウム，炭酸K
炭酸カルシウム	炭酸 Ca
炭酸水素カリウム	炭酸水素K，炭酸K，重炭酸K
炭酸水素ナトリウム	炭酸水素 Na，重炭酸 Na，重曹
炭酸ナトリウム	炭酸 Na

炭酸マグネシウム	炭酸 Mg
チアベンダゾール	TBZ
チアミン塩酸塩	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
チアミン硝酸塩	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
チアミンセチル硫酸塩	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
チアミンチオシアン酸塩	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
チアミンナフタレン―1,5―ジスルホン酸塩	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
チアミンラウリル硫酸塩	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
Ｌ―テアニン	テアニン
鉄クロロフィリンナトリウム	鉄クロロフィリン Na，鉄葉緑素
デヒドロ酢酸ナトリウム	デヒドロ酢酸 Na
デンプングリコール酸ナトリウム	加工デンプン，デンプングリコール酸 Na
銅クロロフィリンナトリウム	銅クロロフィリン Na，銅葉緑素
銅クロロフィル	銅葉緑素
dl―α―トコフェロール	トコフェロール，ビタミンＥ，V.E
トコフェロール酢酸エステル	酢酸トコフェロール，酢酸ビタミンＥ，酢酸 V.E
d―α―トコフェロール酢酸エステル	酢酸トコフェロール，酢酸ビタミンＥ，酢酸 V.E
DL―トリプトファン	トリプトファン
Ｌ―トリプトファン	トリプトファン
DL―トレオニン	トレオニン，スレオニン
Ｌ―トレオニン	トレオニン，スレオニン
ニコチン酸アミド	ニコチン酸，ナイアシン
二酸化硫黄	二酸化イオウ，亜硫酸塩
二酸化ケイ素	酸化ケイ素（微粒二酸化ケイ素を用いる場合は，酸化ケイ素のほか，「微粒二酸化ケイ素」，「微粒酸化ケイ素」，「微粒シリカゲル」という簡略名を用いることができる。）
二酸化炭素	炭酸
二酸化チタン	酸化チタン
乳酸カリウム	乳酸 K
乳酸カルシウム	乳酸 Ca
乳酸ナトリウム	乳酸 Na
ノルビキシンカリウム	ノルビキシンＫ，水溶性アナトー，アナトー，アナトー色素，カロチノイド，カロチノイド色素，カロテノイド，カロテノイド色素
ノルビキシンナトリウム	ノルビキシン Na，水溶性アナトー，アナトー，アナトー色素，カロチノイド，カロチノイド色素，カロテノイド，カロテノイド色素

パラオキシ安息香酸イソブチル	パラオキシ安息香酸，イソブチルパラベン
パラオキシ安息香酸イソプロピル	パラオキシ安息香酸，イソプロピルパラベン
パラオキシ安息香酸エチル	パラオキシ安息香酸，エチルパラベン
パラオキシ安息香酸ブチル	パラオキシ安息香酸，ブチルパラベン
パラオキシ安息香酸プロピル	パラオキシ安息香酸，プロピルパラベン
Ｌ―バリン	バリン
パントテン酸カルシウム	パントテン酸 Ca
パントテン酸ナトリウム	パントテン酸 Na
Ｌ―ヒスチジン塩酸塩	ヒスチジン塩酸塩，ヒスチジン
ビスベンチアミン	チアミン，ビタミンB_1，V.B_1
ビタミンＡ	V.A
ビタミンＡ脂肪酸エステル	ビタミンＡエステル，レチノールエステル，ビタミンＡ，V.A
ヒドロキシプロピル化リン酸架橋デンプン	加工デンプン
ヒドロキシプロピルセルロース	ＨＰＣ
ヒドロキシプロピルデンプン	加工デンプン
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	ＨＰＭＣ
ヒマワリレシチン	レシチン
氷酢酸	酢酸
ピリドキシン塩酸塩	ピリドキシン，V.B_6
ピロ亜硫酸カリウム	亜硫酸塩，亜硫酸カリウム，亜硫酸Ｋ，重亜硫酸カリウム，重亜硫酸Ｋ
ピロ亜硫酸ナトリウム	亜硫酸塩，亜硫酸ナトリウム，亜硫酸 Na，重亜硫酸ナトリウム，重亜硫酸 Na，亜硫酸ソーダ
ピロリン酸四カリウム	ピロリン酸Ｋ
ピロリン酸二水素カルシウム	ピロリン酸カルシウム，ピロリン酸 Ca
ピロリン酸二水素二ナトリウム	ピロリン酸ナトリウム，ピロリン酸 Na
ピロリン酸第二鉄	ピロリン酸鉄
ピロリン酸四ナトリウム	ピロリン酸 Na
フィチン酸カルシウム	フィチン酸 Ca
Ｌ―フェニルアラニン	フェニルアラニン
フェロシアン化カリウム	フェロシアン化Ｋ
フェロシアン化カルシウム	フェロシアン化 Ca
フェロシアン化ナトリウム	フェロシアン化 Na
ブチルヒドロキシアニソール	BHA
フマル酸一ナトリウム	フマル酸 Na
プロピオン酸カルシウム	プロピオン酸 Ca
プロピオン酸ナトリウム	プロピオン酸 Na

プロピコナゾール	トリアゾール
プロピレングリコール脂肪酸エステル	プロピレングリコールエステル
没食子酸プロピル	没食子酸
ポリアクリル酸ナトリウム	ポリアクリル酸Na
ポリビニルアルコール	ＰＶＡ
ポリビニルピロリドン	ポビドン、ＰＶＰ
ポリリン酸カリウム	ポリリン酸Ｋ
ポリリン酸ナトリウム	ポリリン酸Na
Ｄ―マンニトール	マンニトール，マンニット
メタリン酸カリウム	メタリン酸Ｋ
メタリン酸ナトリウム	メタリン酸Na
DL―メチオニン	メチオニン
Ｌ―メチオニン	メチオニン
メチルヘスペリジン	ヘスペリジン，ビタミンＰ，V.P
dl―メントール	メントール
l―メントール	メントール
モルホリン脂肪酸塩	モルホリン
Ｌ―リシンＬ―アスパラギン酸塩	リシン，リジン，リシンアスパラギン酸塩，リジンアスパラギン酸塩
Ｌ―リシン塩酸塩	リシン，リジン，リシン塩酸塩，リジン塩酸塩
Ｌ―リシンＬ―グルタミン酸塩	リシン，リジン，リシングルタミン酸塩，リジングルタミン酸塩
5′―リボヌクレオチドカルシウム	リボヌクレオチドカルシウム，リボヌクレオチドCa，リボヌクレオタイドカルシウム，リボヌクレオタイドCa
5′―リボヌクレオチド二ナトリウム	リボヌクレオチドナトリウム，リボヌクレオチドNa，リボヌクレオタイドナトリウム，リボヌクレオタイドNa
リボフラビン	V.B_2
リボフラビン酪酸エステル	リボフラビン，ビタミンＢ$_2$，V.B_2
リボフラビン 5′―リン酸エステルナトリウム	リボフラビン，ビタミンＢ$_2$，V.B_2
硫酸アルミニウムアンモニウム	アンモニウムミョウバン
硫酸アルミニウムカリウム	カリミョウバン，ミョウバン
硫酸カリウム	硫酸K
硫酸カルシウム	硫酸Ca
硫酸第一鉄	硫酸鉄
硫酸ナトリウム	硫酸Na

硫酸マグネシウム	硫酸 Mg
DL―リンゴ酸	リンゴ酸
DL―リンゴ酸ナトリウム	リンゴ酸ナトリウム，リンゴ酸 Na
リン酸架橋デンプン	加工デンプン
リン酸化デンプン	加工デンプン
リン酸三カリウム	リン酸カリウム，リン酸K
リン酸三カルシウム	リン酸カルシウム，リン酸 Ca
リン酸三マグネシウム	リン酸マグネシウム，リン酸 Mg
リン酸水素二アンモニウム	リン酸アンモニウム
リン酸二水素アンモニウム	リン酸アンモニウム
リン酸水素二カリウム	リン酸カリウム，リン酸K
リン酸二水素カリウム	リン酸カリウム，リン酸K
リン酸一水素カルシウム	リン酸カルシウム，リン酸 Ca
リン酸一水素マグネシウム	リン酸マグネシウム，リン酸 Mg
リン酸二水素カルシウム	リン酸カルシウム，リン酸 Ca
リン酸水素二ナトリウム	リン酸ナトリウム，リン酸 Na
リン酸二水素ナトリウム	リン酸ナトリウム，リン酸 Na
リン酸三ナトリウム	リン酸ナトリウム，リン酸 Na
リン酸モノエステル化リン酸架橋デンプン	加工デンプン

別添　添加物１－２

同種の機能の添加物を併用した場合における簡略名の例

１　酸及びその塩類を併用した場合

酸の名称の後に括弧を付して、使用した塩の元素記号を表示する（括弧内の塩は、使用量の多い順に表示する。以下同じ。）。

併用する物質名	簡　略　名
安息香酸及び安息香酸ナトリウム	安息香酸（Na）
クエン酸及びクエン酸ナトリウム	クエン酸（Na）
ソルビン酸，ソルビン酸カリウム及びソルビン酸カルシウム	ソルビン酸（K，Ca）
乳酸，乳酸ナトリウム及び乳酸カルシウム	乳酸（Na，Ca）
氷酢酸及び酢酸ナトリウム	酢酸（Na）
リン酸及びリン酸三ナトリウム	リン酸（Na）

２　同じ酸の塩類を２種類以上併用した場合

酸の名称に「塩」を付し、その後に括弧を付して、使用した塩の元素記号を表示する。

併用する物質名	簡　略　名
Ｌ－グルタミン酸カリウム及びＬ―グルタミン酸カルシウム	グルタミン酸塩（K，Ca）
DL―酒石酸水素カリウム及びDL―酒石酸ナトリウム	酒石酸塩（K，Na）
ステアリン酸カルシウム及びステアリン酸マグネシウム	ステアリン酸塩（Ca，Mg）
ステアロイル乳酸カルシウム及びステアロイル乳酸ナトリウム	ステアロイル乳酸塩（Ca，Na）
炭酸ナトリウム及び炭酸マグネシウム	炭酸塩（Na，Mg）

３　各種のリン酸の塩類を併用した場合

一括して「リン酸塩」と表示した後に括弧を付して、使用した塩の元素記号を表示する。

リン酸三ナトリウム及びピロリン酸四カリウム	リン酸塩（Na，K）
ピロリン酸二水素カルシウム及びピロリン酸四ナトリウム	リン酸塩（Ca，Na）
ポリリン酸カリウム及びメタリン酸カリウム	リン酸塩（K）
ピロリン酸四ナトリウム及びポリリン酸ナトリウム	リン酸塩（Na）
ピロリン酸四ナトリウム及びメタリン酸カリウム	リン酸塩（Na，K）

４　塩違いの同種の化合物を２種類以上併用した場合

化合物名を表示した後に括弧を付して、使用した塩の元素記号を表示する。

塩化カルシウム及び塩化マグネシウム	塩化物（Ca，Mg）
酸化カルシウム及び酸化マグネシウム	酸化物（Ca，Mg）
フェロシアン化カリウム及びフェロシアン化ナトリウム	フェロシアン化物（K，Na）

別添　添加物１－３

規則別表第１に掲げる添加物のうち用途名併記を要するものの例示

1	甘味料	アセスルファムカリウム アスパルテーム アドバンテーム キシリトール グリチルリチン酸二ナトリウム サッカリン サッカリンカルシウム サッカリンナトリウム スクラロース
2	着色料	β－アポ－８’－カロテナール β―カロテン カンタキサンチン 食用赤色２号及びそのアルミニウムレーキ 食用赤色３号及びそのアルミニウムレーキ 食用赤色 40 号及びそのアルミニウムレーキ 食用赤色 102 号 食用赤色 104 号 食用赤色 105 号 食用赤色 106 号 食用黄色４号及びそのアルミニウムレーキ 食用黄色５号及びそのアルミニウムレーキ 食用緑色３号及びそのアルミニウムレーキ 食用青色１号及びそのアルミニウムレーキ 食用青色２号及びそのアルミニウムレーキ 三二酸化鉄 鉄クロロフィリンナトリウム 銅クロロフィル 銅クロロフィリンナトリウム 二酸化チタン ノルビキシンカリウム ノルビキシンナトリウム リボフラビン リボフラビン酪酸エステル リボフラビン５′―リン酸エステルナトリウム

3	保存料	安息香酸 安息香酸ナトリウム ソルビン酸 ソルビン酸カリウム ソルビン酸カルシウム デヒドロ酢酸ナトリウム ナイシン ナタマイシン パラオキシ安息香酸イソブチル パラオキシ安息香酸イソプロピル パラオキシ安息香酸エチル パラオキシ安息香酸ブチル パラオキシ安息香酸プロピル プロピオン酸 プロピオン酸カルシウム プロピオン酸ナトリウム 亜硫酸ナトリウム 次亜硫酸ナトリウム 二酸化硫黄 ピロ亜硫酸カリウム ピロ亜硫酸ナトリウム
4	増粘剤，安定剤，ゲル化剤又は糊料	アセチル化アジピン酸架橋デンプン アセチル化酸化デンプン アセチル化リン酸架橋デンプン アルギン酸ナトリウム アルギン酸プロピレングリコールエステル オクテニルコハク酸デンプンナトリウム カルボキシメチルセルロースカルシウム カルボキシメチルセルロースナトリウム 酢酸デンプン 酸化デンプン デンプングリコール酸ナトリウム ヒドロキシプロピル化リン酸架橋デンプン ヒドロキシプロピルデンプン ポリアクリル酸ナトリウム ポリビニルピロリドン メチルセルロース リン酸架橋デンプン

		リン酸化デンプン リン酸モノエステル化リン酸架橋デンプン
5	酸化防止剤	エチレンジアミン四酢酸カルシウム二ナトリウム エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム エリソルビン酸 エリソルビン酸ナトリウム クエン酸イソプロピル ジブチルヒドロキシトルエン ブチルヒドロキシアニソール 没食子酸プロピル アスコルビン酸 アスコルビン酸ステアリン酸エステル アスコルビン酸ナトリウム アスコルビン酸パルミチン酸エステル *dl*―α―トコフェロール 亜硫酸ナトリウム 次亜硫酸ナトリウム 二酸化硫黄 ピロ亜硫酸カリウム ピロ亜硫酸ナトリウム
6	発色剤	亜硝酸ナトリウム 硝酸カリウム 硝酸ナトリウム
7	漂白剤	亜硫酸ナトリウム 次亜硫酸ナトリウム 二酸化硫黄 ピロ亜硫酸カリウム ピロ亜硫酸ナトリウム
8	防かび剤又は防ばい剤	アゾキシストロビン イマザリル オルトフェニルフェノール オルトフェニルフェノールナトリウム ジフェニル ジフェノコナゾール チアベンダゾール ピリメタニル フルジオキソニル プロピコナゾール

別添　添加物１－４

各一括名の定義及びその添加物の範囲

１　イーストフード

（１）定　義　パン，菓子等の製造工程で，イーストの栄養源等の目的で使用される添加物及びその製剤

（２）一括名　イーストフード

（３）添加物の範囲　以下の添加物をイーストフードの目的で使用する場合

塩化アンモニウム	塩化マグネシウム
グルコン酸カリウム	グルコン酸ナトリウム
酸化カルシウム	焼成カルシウム
炭酸アンモニウム	炭酸カリウム（無水）
炭酸カルシウム	硫酸アンモニウム
硫酸カルシウム	硫酸マグネシウム
リン酸三カルシウム	リン酸水素二アンモニウム
リン酸二水素アンモニウム	リン酸一水素カルシウム
リン酸一水素マグネシウム	リン酸二水素カルシウム

２　ガムベース

（１）定　義　チューインガム用の基材として使用される添加物製剤

（２）一括名　ガムベース

（３）添加物の範囲　以下の添加物をガムベースとしての目的で使用する場合

エステルガム	グリセリン脂肪酸エステル
酢酸ビニル樹脂	ショ糖脂肪酸エステル
ソルビタン脂肪酸エステル	炭酸カルシウム
ポリイソブチレン	ポリブテン
プロピレングリコール脂肪酸エステル	リン酸一水素カルシウム
リン酸三カルシウム	別添　添加物２－１の用途欄に「ガムベース」と記載されている添加物

３　かんすい

（１）定　義　中華麺類の製造に用いられるアルカリ剤で，炭酸カリウム，炭酸ナトリウム，炭酸水素ナトリウム及びリン酸類のカリウム又はナトリウム塩のうち１種以上を含むもの

（２）一括名　かんすい

（３）添加物の範囲　以下の添加物をかんすいとしての目的で使用する場合

炭酸カリウム（無水）	炭酸ナトリウム

炭酸水素ナトリウム	ピロリン酸四カリウム
ピロリン酸二水素二ナトリウム	ピロリン酸四ナトリウム
ポリリン酸カリウム	ポリリン酸ナトリウム
メタリン酸カリウム	メタリン酸ナトリウム
リン酸三カリウム	リン酸水素二カリウム
リン酸二水素カリウム	リン酸水素二ナトリウム
リン酸二水素ナトリウム	リン酸三ナトリウム

4　苦味料

（1）定　義　食品の製造又は加工の工程で，苦味の付与又は増強による味覚の向上又は改善のために使用される添加物及びその製剤

（2）一括名　苦味料

（3）添加物の範囲　別添　添加物２－１及び別添　添加物２－３の用途欄に「苦味料等」と記載されている添加物（香辛料抽出物を除く。）

5　酵素

（1）定　義　食品の製造又は加工の工程で，その有する触媒作用を目的として使用された，生活細胞によって生産された酵素類であって，最終食品においても失活せず，効果を有する添加物及びその製剤

（2）一括名　酵素

（3）添加物の範囲　アスパラギナーゼ及びプシコースエピメラーゼ並びに別添　添加物２－１の用途欄に「酵素」と記載された添加物

6　光沢剤

（1）定　義　食品の製造又は加工の工程で，食品の保護及び表面に光沢を与える目的で使用される添加物及びその製剤

（2）一括名　光沢剤

（3）添加物の範囲　別添　添加物２－１の用途欄に「光沢剤」と記載された添加物を光沢剤としての目的で使用する場合

7　香料

（1）定　義　食品の製造又は加工の工程で，香気を付与又は増強するため添加される添加物及びその製剤

（2）一括名　香料

（3）添加物の範囲　以下の添加物を香料としての目的で使用する場合

アセトアルデヒド	アセト酢酸エチル
アセトフェノン	アニスアルデヒド
(3－アミノ－3－カルボキシプロピル)	アミルアルコール

ジメチルスルホニウム塩化物
α―アミルシンナムアルデヒド
アンモニウムイソバレレート
イソアミルアルコール
イソブチルアルデヒド
イソ吉草酸エチル
イソチオシアネート類
イソバレルアルデヒド
イソブチルアミン
イソプロピルアミン
インドール及びその誘導体
エステル類

エチルバニリン
3－エチルピリジン
2―エチル―5―メチルピラジン
5－エチル－2―メチルピリジン
オイゲノール
オクタン酸
ギ酸イソアミル
ギ酸シトロネリル
ケイ皮酸
ケイ皮酸メチル
ゲラニオール
酢酸エチル
酢酸シクロヘキシル
酢酸シンナミル
酢酸フェネチル
酢酸ベンジル
酢酸リナリル
2,3－ジエチルピラジン
シクロヘキシルプロピオン酸アリル
シトロネラール
1，8―シネオール
脂肪族高級アルコール類
脂肪族高級炭化水素類
2，5－ジメチルピラジン

アントラニル酸メチル
イオノン
イソオイゲノール
イソ吉草酸イソアミル
イソキノリン
イソチオシアン酸アリル
イソブタノール
イソプロパノール
イソペンチルアミン
γ―ウンデカラクトン
2―エチル―3，5―ジメチルピラジン及び2―エチル―3，6―ジメチルピラジンの混合物
2－エチルピラジン
2―エチル―3―メチルピラジン
2－エチル－6－メチルピラジン
エーテル類
オクタナール
オクタン酸エチル
ギ酸ゲラニル
クエン酸三エチル
ケイ皮酸エチル
ケトン類
酢酸イソアミル
酢酸ゲラニル
酢酸シトロネリル
酢酸テルピニル
酢酸ブチル
酢酸ｌ―メンチル
サリチル酸メチル
2，3－ジエチル－5－メチルピラジン
シトラール
シトロネロール
脂肪酸類
脂肪族高級アルデヒド類
2，3－ジメチルピラジン
2，6－ジメチルピラジン

2，6－ジメチルピリジン

シンナミルアルコール　シンナムアルデヒド

チオエーテル類　チオール類

デカナール　デカノール

デカン酸エチル　5，6，7，8－テトラヒドロキノキサリン

2，3，5，6―テトラメチルピラジン　テルピネオール

テルペン系炭化水素類　トリメチルアミン

2，3，5―トリメチルピラジン　γ―ノナラクトン

バニリン　パラメチルアセトフェノン

バレルアルデヒド　ヒドロキシシトロネラール

ヒドロキシシトロネラールジメチルアセタール　ピペリジン

ピペロナール　ピラジン

ピロリジン　ピロール

フェニル酢酸イソアミル　フェニル酢酸イソブチル

フェニル酢酸エチル　2－（3－フェニルプロピル）ピリジン

フェネチルアミン　フェノールエーテル類

フェノール類　ブタノール

ブチルアミン　*sec*－ブチルアミン

ブチルアルデヒド　フルフラール及びその誘導体

プロパノール　プロピオンアルデヒド

プロピオン酸　プロピオン酸イソアミル

プロピオン酸エチル　プロピオン酸ベンジル

プロピルアミン　ヘキサン酸

ヘキサン酸アリル　ヘキサン酸エチル

ヘキシルアミン　ヘプタン酸エチル

1―ペリルアルデヒド　ベンジルアルコール

ベンズアルデヒド　2－ペンタノール

ペンチルアミン　*trans*－2－ペンテナール

1－ペンテン－3－オール　芳香族アルコール類

芳香族アルデヒド類　*d*―ボルネオール

マルトール　N―メチルアントラニル酸メチル

5―メチルキノキサリン　6－メチルキノリン

5－メチル－6，7－ジヒドロ－5*H*－シクロペンタピラジン　1－メチルナフタレン

メチルβ―ナフチルケトン　2－メチルピラジン

2―メチルブタノール　3－メチル－2－ブタノール

2－メチルブチルアミン　2－メチルブチルアルデヒド

trans－2－メチル－2－ブテナール　　3－メチル－2－ブテナール
3－メチル－2－ブテノール　　*dl*―メントール
l―メントール　　酪酸
酪酸イソアミル　　酪酸エチル
酪酸シクロヘキシル　　酪酸ブチル
ラクトン類　　リナロオール
別添　添加物２－２に掲げる添加物

8　酸味料

（1）定　義　食品の製造又は加工の工程で，酸味の付与又は増強による味覚の向上又は改善のために使用される添加物及びその製剤

（2）一括名　酸味料

（3）添加物の範囲　以下の添加物を酸味料としての目的で使用する場合

アジピン酸　　クエン酸
クエン酸三ナトリウム　　グルコノデルタラクトン
グルコン酸　　グルコン酸カリウム
グルコン酸ナトリウム　　コハク酸
コハク酸一ナトリウム　　コハク酸二ナトリウム
酢酸ナトリウム　　DL―酒石酸
Ｌ―酒石酸　　DL―酒石酸ナトリウム
Ｌ―酒石酸ナトリウム　　二酸化炭素
乳酸　　乳酸ナトリウム
氷酢酸　　フマル酸
フマル酸一ナトリウム　　DL―リンゴ酸
DL―リンゴ酸ナトリウム　　リン酸
別添　添加物２－１の用途欄に「酸味料」と記載された添加物

9　チューインガム軟化剤

（1）定　義　チューインガムを柔軟に保つために使用する添加物及びその製剤

（2）一括名　軟化剤

（3）添加物の範囲　以下の添加物をチューインガム軟化剤としての目的で使用する場合

グリセリン　　プロピレングリコール
Ｄ－ソルビトール

10　調味料

（1）定　義　食品の製造又は加工の工程で，味の付与又は味質の調整等味覚の向上又は改善のために使用される添加物及びその製剤。ただし，もっぱら甘味の目的で使用される甘味料，酸味の目的で使用される酸味料又は苦味の目的で使用される苦味料を

除く。

（２）一括名　調味料（アミノ酸等）等

（３）添加物の範囲　以下の添加物を調味料としての目的で使用する場合

①　アミノ酸

Ｌ―アスパラギン酸ナトリウム	DL―アラニン
Ｌ―アルギニンＬ―グルタミン酸塩	Ｌ―イソロイシン
グリシン	グルタミルバリルグリシン
Ｌ―グルタミン酸	Ｌ―グルタミン酸アンモニウム
Ｌ―グルタミン酸ナトリウム	Ｌ―システイン塩酸塩
Ｌ―テアニン	DL―トリプトファン
Ｌ―トリプトファン	DL―トレオニン
Ｌ―トレオニン	Ｌ―バリン
Ｌ―ヒスチジン塩酸塩	Ｌ―フェニルアラニン
DL―メチオニン	Ｌ―メチオニン
Ｌ―リシンＬ―アスパラギン酸塩	Ｌ―リシン塩酸塩
Ｌ―リシンＬ―グルタミン酸塩	

別添　添加物２－１の用途欄に「調味料」と記載された添加物（アミノ酸に限る。）

②　核酸

5′―イノシン酸二ナトリウム	5′―ウリジル酸二ナトリウム
5′―グアニル酸二ナトリウム	5′―シチジル酸二ナトリウム
5′―リボヌクレオチドカルシウム	5′―リボヌクレオチド二ナトリウム

③　有機酸

クエン酸カルシウム	クエン酸三ナトリウム
グルコン酸カリウム	グルコン酸ナトリウム
コハク酸	コハク酸一ナトリウム
コハク酸二ナトリウム	酢酸ナトリウム
DL－酒石酸水素カリウム	Ｌ－酒石酸水素カリウム
DL－酒石酸ナトリウム	Ｌ－酒石酸ナトリウム
乳酸カリウム	乳酸カルシウム
乳酸ナトリウム	フマル酸一ナトリウム
DL－リンゴ酸ナトリウム	

④　無機塩

塩化カリウム	硫酸カリウム
リン酸三カリウム	リン酸水素二カリウム
リン酸二水素カリウム	リン酸水素二ナトリウム

リン酸二水素ナトリウム　　リン酸三ナトリウム
塩水湖水低塩化ナトリウム液　　粗製海水塩化カリウム
ホエイソルト

11　豆腐用凝固剤

（1）定　義　大豆から調製した豆乳を豆腐様に凝固させる際に用いられる添加物及びその製剤

（2）一括名　豆腐用凝固剤又は凝固剤

（3）添加物の範囲　以下の添加物を豆腐用凝固剤としての目的で使用する場合

塩化カルシウム　　塩化マグネシウム
グルコノデルタラクトン　　硫酸カルシウム
硫酸マグネシウム　　粗製海水塩化マグネシウム

12　乳化剤

（1）定　義　食品に乳化，分散，浸透，洗浄，起泡，消泡，離型等の目的で使用される添加物及びその製剤

（2）一括名　乳化剤

（3）添加物の範囲　以下の添加物を乳化剤としての目的で使用する場合

①　乳化剤を主要用途とするもの

オクテニルコハク酸デンプンナトリウム　クエン酸三エチル
グリセリン脂肪酸エステル　　ショ糖脂肪酸エステル
ステアロイル乳酸カルシウム　　ステアロイル乳酸ナトリウム
ソルビタン脂肪酸エステル　　ヒマワリレシチン
プロピレングリコール脂肪酸エステル　　ポリソルベート 20
ポリソルベート 60　　ポリソルベート 65
ポリソルベート 80　　別添　添加物２－１の用途欄に「乳化剤」と記載された添加物

②　プロセスチーズ，チーズフード及びプロセスチーズ加工品に①に掲げるものに加えて乳化剤として使用されるもの

クエン酸カルシウム　　クエン酸三ナトリウム
グルコン酸カリウム　　グルコン酸ナトリウム
ピロリン酸四カリウム　　ピロリン酸二水素カルシウム
ピロリン酸二水素二ナトリウム　　ピロリン酸四ナトリウム
ポリリン酸カリウム　　ポリリン酸ナトリウム
メタリン酸カリウム　　メタリン酸ナトリウム
リン酸三カリウム　　リン酸三カルシウム
リン酸水素二アンモニウム　　リン酸二水素アンモニウム
リン酸水素二カリウム　　リン酸二水素カリウム

リン酸一水素カルシウム　　リン酸二水素カルシウム
リン酸水素二ナトリウム　　リン酸二水素ナトリウム
リン酸三ナトリウム

13　水素イオン濃度調整剤

（1）定　義　食品を適切な pH 領域に保つ目的で使用される添加物及びその製剤。ただし，中華麺類にかんすいの目的で使用される場合を除く。

（2）一括名　水素イオン濃度調整剤又は pH 調整剤

（3）添加物の範囲　以下の添加物を水素イオン濃度調整剤としての目的で使用する場合

アジピン酸　　クエン酸
クエン酸三ナトリウム　　グルコノデルタラクトン
グルコン酸　　グルコン酸カリウム
グルコン酸ナトリウム　　コハク酸
コハク酸一ナトリウム　　コハク酸二ナトリウム
酢酸ナトリウム　　DL－酒石酸
Ｌ－酒石酸　　DL－酒石酸水素カリウム
Ｌ－酒石酸水素カリウム　　DL－酒石酸ナトリウム
Ｌ－酒石酸ナトリウム　　炭酸カリウム（無水）
炭酸水素ナトリウム　　炭酸ナトリウム
二酸化炭素　　乳酸
乳酸カリウム　　乳酸ナトリウム
氷酢酸　　ピロリン酸二水素二ナトリウム
フマル酸　　フマル酸一ナトリウム
DL－リンゴ酸　　DL－リンゴ酸ナトリウム
リン酸　　リン酸水素二カリウム
リン酸二水素カリウム　　リン酸水素二ナトリウム
リン酸二水素ナトリウム
別添　添加物２－１の用途欄に「酸味料」と記載された添加物

14　膨張剤

（1）定義　パン，菓子等の製造工程で添加し，ガスを発生して生地を膨張させ多孔性にするとともに食感を向上させる添加物及びその製剤

（2）一括名　膨張剤，膨脹剤，ベーキングパウダー又はふくらし粉

（3）添加物の範囲　以下の添加物を膨張剤としての目的で使用する場合

アジピン酸　　Ｌ―アスコルビン酸
塩化アンモニウム　　クエン酸
クエン酸カルシウム　　グルコノデルタラクトン
DL―酒石酸　　Ｌ―酒石酸

DL―酒石酸水素カリウム
炭酸アンモニウム
炭酸カルシウム
炭酸水素ナトリウム
炭酸マグネシウム
乳酸カルシウム
ピロリン酸二水素カルシウム
ピロリン酸四ナトリウム
フマル酸一ナトリウム
ポリリン酸ナトリウム
メタリン酸ナトリウム
硫酸アルミニウムアンモニウム
DL―リンゴ酸
リン酸三カルシウム
リン酸二水素カリウム
リン酸二水素カルシウム
リン酸二水素ナトリウム
Ｌ―酒石酸水素カリウム
炭酸カリウム（無水）
炭酸水素アンモニウム
炭酸ナトリウム
乳酸
ピロリン酸四カリウム
ピロリン酸二水素二ナトリウム
フマル酸
ポリリン酸カリウム
メタリン酸カリウム
硫酸カルシウム
硫酸アルミニウムカリウム
DL―リンゴ酸ナトリウム
リン酸水素二カリウム
リン酸一水素カルシウム
リン酸水素二ナトリウム

別添　添加物１－５

栄養強化の目的が考えられる添加物の範囲

（１）ビタミン類（33 品目）

Ｌ―アスコルビン酸	Ｌ－アスコルビン酸カルシウム
Ｌ―アスコルビン酸ステアリン酸エステル	Ｌ－アスコルビン酸ナトリウム
Ｌ―アスコルビン酸 2―グルコシド	Ｌ―アスコルビン酸パルミチン酸エステル
エルゴカルシフェロール	β―カロテン
コレカルシフェロール	ジベンゾイルチアミン
ジベンゾイルチアミン塩酸塩	チアミン塩酸塩
チアミン硝酸塩	チアミンセチル硫酸塩
チアミンチオシアン酸塩	チアミンナフタレン―1,5―ジスルホン酸塩
チアミンラウリル硫酸塩	トコフェロール酢酸エステル
d―α―トコフェロール酢酸エステル	ニコチン酸
ニコチン酸アミド	パントテン酸カルシウム
パントテン酸ナトリウム	ビオチン
ビスベンチアミン	ビタミンＡ
ビタミンＡ脂肪酸エステル	ピリドキシン塩酸塩
メチルヘスペリジン	葉酸
リボフラビン	リボフラビン酪酸エステル
リボフラビン 5′―リン酸エステルナトリウム	

（２）ミネラル類（34 品目）

亜鉛塩類（グルコン酸亜鉛及び硫酸亜鉛に限る。）	Ｌ－アスコルビン酸カルシウム
亜セレン酸ナトリウム	塩化カルシウム
塩化第二鉄	塩化マグネシウム
クエン酸カルシウム	クエン酸第一鉄ナトリウム
クエン酸鉄	クエン酸鉄アンモニウム
グリセロリン酸カルシウム	グルコン酸カルシウム
グルコン酸第一鉄	酢酸カルシウム
酸化カルシウム	酸化マグネシウム
水酸化カルシウム	水酸化マグネシウム
ステアリン酸カルシウム	炭酸カルシウム
炭酸マグネシウム	銅塩類（グルコン酸銅及び硫酸銅に限る。）
乳酸カルシウム	乳酸鉄
ピロリン酸二水素カルシウム	ピロリン酸第二鉄

硫酸カルシウム	硫酸第一鉄
硫酸マグネシウム	リン酸三カルシウム
リン酸三マグネシウム	リン酸一水素カルシウム
リン酸一水素マグネシウム	リン酸二水素カルシウム

（３）アミノ酸類（24 品目）

Ｌ―アスパラギン酸ナトリウム	DL―アラニン
Ｌ―アルギニンＬ―グルタミン酸塩	Ｌ―イソロイシン
グリシン	Ｌ―グルタミン酸
Ｌ―グルタミン酸カリウム	Ｌ―グルタミン酸カルシウム
Ｌ―グルタミン酸ナトリウム	Ｌ―グルタミン酸マグネシウム
Ｌ―システイン塩酸塩	Ｌ―テアニン
DL―トリプトファン	Ｌ―トリプトファン
DL―トレオニン	Ｌ―トレオニン
Ｌ―バリン	Ｌ―ヒスチジン塩酸塩
Ｌ―フェニルアラニン	DL―メチオニン
Ｌ―メチオニン	Ｌ―リシンＬ―アスパラギン酸塩
Ｌ―リシン塩酸塩	Ｌ―リシンＬ―グルタミン酸塩

別添　添加物１－６

容器包装に入れないで販売される食品のうち、添加物の表示を要する添加物一覧

１　防かび剤又は防ばい剤

・アゾキシストロビン
・イマザリル
・オルトフェニルフェノール
・オルトフェニルフェノールナトリウム
・ジフェニル
・ジフェノコナゾール
・チアベンダゾール
・ピリメタニル
・フルジオキソニル
・プロピコナゾール

２　甘味料

・サッカリン
・サッカリンカルシウム
・サッカリンナトリウム

別添　添加物２－１

既存添加物名簿収載品目リスト

番号	品名		簡略名又は類別名	基原･製法･本質	用途	備考
	名称	別名				
1	アウレオバシジウム培養液（アウレオバシジウム培養液から得られた、β-1,3-1,6-グルカンを主成分とするものをいう。）			黒酵母（Aureobasidium pullulans）の培養液より、分離して得られたものである。主成分はβ-1,3-1,6-グルカンである。	増粘安定剤	Aureobasidium cultured solution
2	アガラーゼ			※	酵素	Agarase
3	アクチニジン			※	酵素	Actinidin
4	アグロバクテリウムスクシノグリカン（アグロバクテリウムの培養液から得られた、スクシノグリカンを主成分とするものをいう。）	スクシノグリカン		※	増粘安定剤	Agrobacterium Succinoglycan
5	アシラーゼ			※	酵素	Acylase
6	アスコルビン酸オキシダーゼ	アスコルベートオキシダーゼ ビタミンCオキシダーゼ	オキシダーゼ V.Cオキシダーゼ	※	酵素	Ascorbate Oxidase
7	L-アスパラギン		アスパラギン	※	調味料 強化剤	L-Asparagine
8	L-アスパラギン酸		アスパラギン酸	※	調味料	L-Aspartic Acid
9	アスペルギルステレウス糖たん白質（アスペルギルステレウスの培養液から得られた、糖タンパク質を主成分とするものをいう。）	ムタステイン		※	製造用剤	Aspergillus Terreus Glycoprotein
10	α-アセトラクタートデカルボキシラーゼ		リアーゼ	※	酵素	α-Acetolactate Decarboxylase
11	5'-アデニル酸	アデノシン5'一リン酸	5'-AMP	※	強化剤	5'-Adenylic Acid
12	アナトー色素（ベニノキの種子の被覆物から得られた、ノルビキシン及びビキシンを主成分とするものをいう。）		アナトー カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素	ベニノキ科ベニノキ（Bixa orellane LINNE）の種子の被覆物より、熱時油脂若しくはプロピレングリコールで抽出して得られたもの、室温時ヘキサン若しくはアセトンで抽出し、溶媒を除去して得られたもの、又は熱時アルカル性水溶液で抽出し、加水分解し、中和して得られたものである。主色素はビキシン及びノルビキシンである。黄色～橙色を呈する。	着色料	Annatto Extract
	アナトー色素（ノルビキシン）	ノルビキシン	アナトー（ノルビキシン）	※		Annatto Extract (Norbixin) Norbixin
	アナトー色素（ビキシン）	ビキシン	アナトー（ビキシン）	※		Annatto Extract (Bixin) Bixin
13	アマシードガム（アマの種子から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）		アマシード	アマ科アマ（Linum usitatissimum LINNE）の種子の胚乳部分より、室温時～温時水又は含水アルコールで抽出して得られたものである。主成分は多糖類である。	増粘安定剤	Linseed gum Linseed extract
14	アミノペプチダーゼ			※	酵素	Aminopeptidase
15	α-アミラーゼ	液化アミラーゼ G3分解酵素	アミラーゼ カルボヒドラーゼ	※	酵素	α-Amylase
16	β-アミラーゼ		アミラーゼ カルボヒドラーゼ	※	酵素	β-Amylase
17	L-アラニン		アラニン	※	調味料 強化剤	L-Alanine
	L-アラニン液			※		L-Alanine Solution

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
18	アラビアガム （アカシアの分泌液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	アカシアガム	アカシア	※	増粘安定剤	Gum Arabic Arabic Gum Acacia Gum
19	アラビノガラクタン			マツ科セイヨウカラマツ（Larix occidentalis NUTT.）又はその他同属植物の根又は幹より、室温時水で抽出して得られたものである。成分は多糖類（構成糖はガラクトース、アラビノース等）である。	増粘安定剤	Arabino galactan
20	L-アラビノース		アラビノース	※	甘味料	L-Arabinose
21	L-アルギニン		アルギニン	※	調味料 強化剤	L-Arginine
22	アルギン酸	昆布類粘質物		※	増粘安定剤	Alginic Acid
23	アルギン酸リアーゼ			※	酵素	Alginate Lyase
24	アルミニウム	アルミ末		^{27}Al	着色料	Aluminium
25	アントシアナーゼ			※	酵素	Anthocyanase
26	イソアミラーゼ	枝切り酵素		※	酵素	Isoamylase
27	イソアルファー苦味酸 （ホップの花から得られた、イソフムロン類を主成分とするものをいう。）	イソアルファー酸	ホップ	※	苦味料等	Iso-α-bitter Acids
28	イソマルトデキストラナーゼ			※	酵素	Isomaltodextranase
29	イナワラ灰抽出物 （イネの茎又は葉の灰化物から抽出して得られたものをいう。）	ワラ灰抽出物	植物灰抽出物	イネ科イネ（Oryza sativa LINNE）の茎又は葉を灰化したものより、室温時水で抽出して得られたものであって、アルカリ金属及びアルカリ土類金属を含む。	製造用剤	Rice straw ash extract
30	イヌリナーゼ	イヌラーゼ		※	酵素	Inulinase
31	イノシトール	イノシット		「フィチン酸」を分解したものより、又はアカザ科サトウダイコン（Beta vulgaris LINNE var.rapa DUMORTIER）の糖液又は糖蜜より、分離して得られたものである。成分はイノシトールである。	強化剤	Inositol
	myo－イノシトール	myo－イノシット		※		myo-Inositol
32	インベルターゼ	サッカラーゼ シュークラーゼ スクラーゼ		※	酵素	Invertase
33	ウェランガム （アルカリゲネスの培養液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	ウェラン多糖類		※	増粘安定剤	Welan Gum
34	ウコン色素 （ウコンの根茎から得られた、クルクミンを主成分とするものをいう。）	ターメリック色素 クルクミン	ウコン	※	着色料	Turmeric Oleoresin Curcumin
35	ウルシロウ （ウルシの果実から得られた、グリセリンパルミタートを主成分とするものをいう。）			※	ガムベース 光沢剤	Urushi Wax
36	ウレアーゼ		アミダーゼ	※	酵素	Urease
37	エキソマルトテトラオヒドロラーゼ	G4生成酵素	アミラーゼ カルボヒドラーゼ	※	酵素	Exomaltotetraohydrolase
38	エステラーゼ			※	酵素	Esterase
39	エレミ樹脂 （エレミの分泌液から得られた、β-アミリンを主成分とするものをいう。）			※	増粘安定剤 ガムベース	Elemi Resin

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
40	塩水湖水低塩化ナトリウム液 （塩水湖水から塩化ナトリウムを析出分離して得られた、アルカリ金属塩類及びアルカリ土類金属塩類を主成分とするものをいう。）		塩水湖水ミネラル液	※	調味料	Sodium Chloride-decreased Brine (Saline Lake)
41	オゾン			O_3	製造用剤	Ozone
42	オリゴガラクチュロン酸			「ペクチン」をペクチナーゼで酵素分解し、限外ろ過して得られたものであって、ガラクチュロン酸の1～9量体の混合物からなる。	製造用剤	Oligogalacturonic acid
43	γ-オリザノール (米ぬか又は胚芽油から得られた、ステロールとフェルラ酸及びトリテルペンアルコールとフェルラ酸のエステルを主成分とするものをいう。)		オリザノール	※	酸化防止剤	γ-Oryzanol
44	オレガノ抽出物 （オレガノの葉から得られた、カルバクロール及びチモールを主成分とするものをいう。）			シソ科オレガノ（Origanum vulgare LINNE）の葉より、室温時～温時エタノール、含水エタノール又はヘキサンで抽出して得られたものである。成分としてチモール及びカルバクロールを含む。	製造用剤	Oregano extract
45	オレンジ色素 （アマダイダイの果実又は果皮から得られた、カロテン及びキサントフィルを主成分とするものをいう。）		カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素 果実色素	ミカン科アマダイダイ（Citrus sinensis OSBECK）の果実又は果皮より、搾汁したもの、又は熱時エタノール、ヘキサン若しくはアセトンで抽出し、溶媒を除去して得られたものである。主色素はβ-クリプトキサンチンの脂肪酸エステルである。黄色を呈する。	着色料	Orange colour
46	海藻灰抽出物 （褐藻類の灰化物から得られた、ヨウ化カリウムを主成分とするものをいう。）			褐藻類を焼成灰化したものより、水で抽出して得られたものである。主成分はヨウ化カリウムである。	製造用剤	Seaweed ash extract
47	カオリン	白陶土	不溶性鉱物性物質	※	製造用剤	Kaolin
48	カカオ色素 （カカオの種子から得られた、アントシアニンの重合物を主成分とするものをいう。）	ココア色素	カカオ フラボノイド フラボノイド色素	※	着色料	Cacao Color
49	カキ色素 （カキの果実から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。）		果実色素 フラボノイド フラボノイド色素	※	着色料	Japanese Persimmon Color
50	花こう斑岩		麦飯石 不溶性鉱物性物質	花こう斑岩を洗浄、粉砕したものを、乾燥後、滅菌して得られたものである。	製造用剤	Granite porphyry
51	カシアガム （エビスグサモドキの種子を粉砕して得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	カッシャガム		マメ科エビスグサモドキ（Cassia tora LINNE）の種子の胚乳部を、粉砕して得られたものである。主成分は多糖類である。	増粘安定剤	Cassia gum
52	カタラーゼ		オキシダーゼ	※	酵素	Catalase
53	活性炭 （含炭素物質を炭化し、賦活化して得られたものをいう。）			※	製造用剤	Active Carbon
54	活性白土		不溶性鉱物性物質	※	製造用剤	Activated Acid Clay
55	ガティガム （ガティノキの分泌液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）		ガティ	※	増粘安定剤	Gum Ghatti
56	カテキン			ツバキ科チャ（Camellia sinensis O.KZE.）の茎若しくは葉、マメ科ベグアセンヤク（Acacia catechu WILLD.）の幹枝又はアカネ科ガンビール（Uncaria gambir ROXBURGH）の幹枝若しくは葉より、乾留した後、水又はエタノールで抽出し、精製して得られたもの、又は熱時水で抽出した後、メタノール若しくは酢酸エチルで分配して得られたものである。成分はカテキン類である。	酸化防止剤	Catechin
57	カードラン （アグロバクテリウム又はアルカリゲネスの培養液から得られた、β-1,3-グルカンを主成分とするものをいう。）		ブドウ糖多糖	※	増粘安定剤 製造用剤	Curdlan
58	カフェイン（抽出物） （コーヒーの種子又はチャの葉から得られた、カフェインを主成分とするものをいう。）		カフェイン	※	苦味料等	Caffeine (Extract)

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
59	カラギナン （イバラノリ、キリンサイ、ギンナンソウ、スギノリ又はツノマタの全藻から得られた、ι-カラギナン、κ-カラギナン及びλ-カラギナンを主成分とするものをいう。）	カラギーナン カラゲナン カラゲーナン カラゲニン			増粘安定剤	Carrageenan
	加工ユーケマ藻類		ユーケマ	※		Semirefined Carrageenan Processed Eucheuma Algae Processed Red Algae
	精製カラギナン		紅藻抽出物	※		Purified Carrageenan Refined Carrageenan
	ユーケマ藻末		ユーケマ	ミリン科キリンサイ属（Eucheuma）の全藻を、乾燥、粉砕して得られたものである。		Powdered red algae
60	α-ガラクトシダーゼ	メリビアーゼ	カルボヒドラーゼ	※	酵素	α-Galactosidase
61	β-ガラクトシダーゼ	ラクターゼ	カルボヒドラーゼ	※	酵素	β-Galactosidase
62	カラシ抽出物 （カラシナの種子から得られた、イソチオシアン酸アリルを主成分とするものをいう。）		マスタード抽出物	※	製造用剤	Mustard Extract
63	カラメルⅠ （でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物を熱処理して得られたものをいう。ただし、「カラメルⅡ」、「カラメルⅢ」及び「カラメルⅣ」を除く。）	カラメル	カラメル色素	※	着色料 製造用剤	CaramelⅠ (Plain caramel)
64	カラメルⅡ （でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物に亜硫酸化合物を加えて熱処理して得られたものをいう。ただし、「カラメルⅣ」を除く。）	カラメル	カラメル色素	※	着色料 製造用剤	CaramelⅡ (Sulfite caramel)
65	カラメルⅢ （でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物にアンモニウム化合物を加えて熱処理して得られたものをいう。ただし、「カラメルⅣ」を除く。）	カラメル	カラメル色素	※	着色料 製造用剤	CaramelⅢ (Ammonia caramel)
66	カラメルⅣ （でん粉加水分解物、糖蜜又は糖類の食用炭水化物に亜硫酸化合物及びアンモニウム化合物を加えて熱処理して得られたものをいう。）	カラメル	カラメル色素	※	着色料 製造用剤	CaramelⅣ (Sulfite ammonia caramel)
67	カラヤガム （カラヤ又はキバナワタモドキの分泌液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）		カラヤ	※	増粘安定剤	Karaya Gum
68	カルナウバロウ （ブラジルロウヤシの葉から得られた、ヒドロキシセロチン酸セリルを主成分とするものをいう。）	カルナウバワックス ブラジルワックス	植物ワックス	※	ガムベース 光沢剤	Carnauba Wax Brazil Wax
69	カルボキシペプチダーゼ			※	酵素	Carboxypeptidase
70	カロブ色素 （イナゴマメの種子の胚芽を粉砕して得られたものをいう。）		カロブ カロブジャーム フラボノイド フラボノイド色素	※	着色料 製造用剤	Carob Germ Color
71	カロブビーンガム （イナゴマメの種子の胚乳を粉砕し、又は溶解し、沈殿して得られたものをいう。）	ローカストビーンガム	ローカスト	※	増粘安定剤	Carob Bean Gum Locust Bean Gum
72	カワラヨモギ抽出物 （カワラヨモギの全草から得られた、カピリンを主成分とするものをいう。）		カワラヨモギ	※	保存料	Rumput Roman Extract
73	カンゾウ抽出物 （ウラルカンゾウ、チョウカカンゾウ又はヨウカンゾウの根又は根茎から得られた、グリチルリチン酸を主成分とするものをいう。）	カンゾウエキス グリチルリチン リコリス抽出物	カンゾウ カンゾウ甘味料 リコリス	ウラルカンゾウ（Glycyrrhiza uralensis Fischer）、チョウカカンゾウ（Glycyrrhiza inflata Batalin）、ヨウカンゾウ（Glycyrrhiza glabra Linne）、又はそれらの近縁植物の根若しくは根茎から得られた、グリチルリチン酸を主成分とするものである。本品には、粗製物と精製物がある。	甘味料	Licorice Extract

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
	カンゾウ抽出物（粗製物）	カンゾウエキス（粗製物） グリチルリチン（粗製物） リコリス抽出物（粗製物）		※		Licorice Extract (Crude)
	カンゾウ抽出物（精製物）	カンゾウエキス（精製物） グリチルリチン（精製物） リコリス抽出物（精製物）		※		Licorice Extract (Purified)
74	カンゾウ油性抽出物 （ウラルカンゾウ、チョウカカンゾウ又はヨウカンゾウの根又は根茎から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。）		油性カンゾウ	※	酸化防止剤	Licorice Oil Extract
75	カンデリラロウ （カンデリラの茎から得られた、ヘントリアコンタンを主成分とするものをいう。）	カンデリラワックス キャンデリラロウ キャンデリラワックス	植物ワックス	※	ガムベース 光沢剤	Candelilla Wax
76	キサンタンガム （キサントモナスの培養液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	キサンタン多糖類 ザンサンガム	キサンタン	※	増粘安定剤	Xanthan Gum
77	キシラナーゼ			※	酵素	Xylanase
78	D-キシロース		キシロース	※	甘味料	D-Xylose
79	キチナーゼ			※	酵素	Chitinase
80	キチン			エビ、カニ等甲殻類の甲殻又はイカの甲を、室温時～温時酸性水溶液で炭酸カルシウムを除去した後、温時～熱時弱アルカル性水溶液でタンパク質を除去したもので、N-アセチル-D-グルコサミンの多量体からなる。	増粘安定剤	Chitin
81	キトサナーゼ			※	酵素	Chitosanase
82	キトサン			「キチン」を、温時～熱時水酸化ナトリウム水溶液で脱アセチル化したもので、D-グルコサミンの多量体からなる。	増粘安定剤 製造用剤	Chitosan
83	キナ抽出物 （アカキナの樹皮から得られた、キニジン、キニーネ及びシンコニンを主成分とするものをいう。）			アカネ科アカキナ（Cinchona succirubra PAVON）の樹皮より、水又はエタノール等で抽出して得られたものである。有効成分はキニーネ、キニジン及びシンコニンである。	苦味料等	Redbark cinchona extract
84	キハダ抽出物 （キハダの樹皮から得られた、ベルベリンを主成分とするものをいう。）		キハダ	ミカン科キハダ（Phellodendron amurense RUPR.）の樹皮より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。主成分はベルベリンである。	苦味料等	Phellodendron bark extract
85	キラヤ抽出物 （キラヤの樹皮から得られた、サポニンを主成分とするものをいう。）	キラヤサポニン	サポニン	※	乳化剤	Quillaia Extract Quillaja Extract
86	金	金箔		^{197}Au	着色料 製造用剤	Gold
87	銀	銀箔		^{107}Ag, ^{109}Ag	着色料	Silver
88	グァーガム （グァーの種子から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。ただし、「グァーガム酵素分解物」を除く。）	グァーフラワー グァルガム	グァー	※	増粘安定剤	Guar Gum
89	グァーガム酵素分解物 （グァーの種子を粉砕し、分解して得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	グァーフラワー酵素分解物 グァルガム酵素分解物	グァー分解物	※	増粘安定剤	Enzymatically Hydrolyzed Guar Gum
90	クエルセチン	ケルセチン	ルチン分解物	※	酸化防止剤	Quercetin

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
91	クチナシ青色素 （クチナシの果実から得られたイリドイド配糖体とタンパク質分解物の混合物にβ-グルコシダーゼを添加して得られたものをいう。）		クチナシ クチナシ色素	※	着色料	Gardenia Blue
92	クチナシ赤色素 （クチナシの果実から得られたイリドイド配糖体のエステル加水分解物とタンパク質分解物の混合物にβ-グルコシダーゼを添加して得られたものをいう。）		クチナシ クチナシ色素	※	着色料	Gardenia Red
93	クチナシ黄色素 （クチナシの果実から得られた、クロシン及びクロセチンを主成分とするものをいう。）		カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素 クチナシ クチナシ色素 クロシン	※	着色料	Gardenia Yellow
94	クリストバル石		不溶性鉱物性物質	鉱床より採掘したクリストバル石を、粉砕乾燥、800～1200℃で焼成、又は塩酸処理して焼成したものである。	製造用剤	Cristobalite
95	グルカナーゼ		カルボヒドラーゼ ヘミセルラーゼ	※	酵素	Glucanase
96	グルコアミラーゼ	糖化アミラーゼ	アミラーゼ カルボヒドラーゼ	※	酵素	Glucoamylase
97	グルコサミン			※	増粘安定剤 製造用剤	Glucosamine
98	α-グルコシダーゼ	マルターゼ		※	酵素	α-Glucosidase
99	β-グルコシダーゼ	ゲンチオビアーゼ セロビアーゼ		※	酵素	β-Glucosidase
100	α-グルコシルトランスフェラーゼ	4-α-グルカノトランスフェラーゼ 6-α-グルカノトランスフェラーゼ		※	酵素	α-Glucosyltransferase 4-α-Glucanotransferase 6-α-Glucanotransferase
101	α-グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビア （「ステビア抽出物」から得られた、α-グルコシルステビオシドを主成分とするものをいう。）	酵素処理ステビア	ステビア ステビア甘味料 糖転移ステビア	※	甘味料	α-Glucosyltransferase Treated Stevia
	α－グルコシルトランスフェラーゼ処理ステビオール配糖体	酵素処理ステビオール配糖体		※		α-Glucosyltransferase Treated Steviol Glycosides
102	グルコースイソメラーゼ			※	酵素	Glucose Isomerase
103	グルコースオキシダーゼ			※	酵素	Glucose Oxidase
104	グルタミナーゼ		アミダーゼ	※	酵素	Glutaminase

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
105	L-グルタミン		グルタミン	※	調味料 強化剤	L-Glutamine
106	グレープフルーツ種子抽出物 （グレープフルーツの種子から得られた、脂肪酸及びフラボノイドを主成分とするものをいう。）		グレープフルーツ種子	ミカン科グレープフルーツ（Citrus paradisi MACF.）の種子より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。主成分は脂肪酸及びフラボノイドである。	製造用剤	Grapefruit seed extract
107	クローブ抽出物 （チョウジのつぼみ、葉又は花から得られた、オイゲノールを主成分とするものをいう。）	チョウジ抽出物	チョウジ油	フトモモ科チョウジ（Syzygium aromaticum MERRILL et PERRY）のつぼみ、葉又は花より、エタノール又はアセトンで抽出して得られたもの、又は水蒸気蒸留により得られたものである。主成分はオイゲノール等である。	酸化防止剤	Clove extract
108	クロロフィリン		葉緑素	「クロロフィル」を、温時アルカリ性エタノール水溶液で加水分解し、希塩酸で中和した後、含水エタノールで抽出して得られたものである。主成分はマグネシウムクロロフィリンである。緑色を呈する。	着色料	Chlorophylline
109	クロロフィル		葉緑素	※	着色料	Chlorophyll
110	くん液 （サトウキビ、竹材、トウモロコシ又は木材を燃焼して発生したガス成分を捕集し、又は乾溜して得られたものをいう。）	スモークフレーバー	木酢液 リキッドスモーク	※	製造用剤	Smoke Flavourings
111	ケイソウ土		不溶性鉱物性物質	※	製造用剤	Diatomaceous Earth
112	ゲンチアナ抽出物 （ゲンチアナの根又は根茎から得られた、アマロゲンチン及びゲンチオピクロシドを主成分とするものをいう。）			※	苦味料等	Gentian Root Extract
113	高級脂肪酸 （動植物性油脂又は動植物性硬化油脂を加水分解して得られたものをいう。）		脂肪酸	動植物性油脂又は動植物性硬化油脂より、加水分解したものより得られたものである。	製造用剤	Higher Fatty Acid
	高級脂肪酸（カプリル酸）		脂肪酸（カプリル酸）	※		Higher Fatty Acid (Caprylic Acid)
	高級脂肪酸（カプリン酸）		脂肪酸（カプリン酸）	※		Higher Fatty Acid (Capric Acid)
	高級脂肪酸（ステアリン酸）		脂肪酸（ステアリン酸）	※		Higher Fatty Acid (Stearic Acid)
	高級脂肪酸（パルミチン酸）		脂肪酸（パルミチン酸）	※		Higher Fatty Acid (Palmitic Acid)
	高級脂肪酸（ベヘニン酸）		脂肪酸（ベヘニン酸）	※		Higher Fatty Acid (Behenic Acid)
	高級脂肪酸（ミリスチン酸）		脂肪酸（ミリスチン酸）	※		Higher Fatty Acid (Myristic Acid)
	高級脂肪酸（ラウリン酸）		脂肪酸（ラウリン酸）	※		Higher Fatty Acid (Lauric Acid)

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
114	香辛料抽出物 （アサノミ、アサフェチダ、アジョワン、アニス、アンゼリカ、ウイキョウ、ウコン、オールスパイス、オレガノ、オレンジピール、カショウ、カッシア、カモミール、カラシナ、カルダモン、カレーリーフ、カンゾウ、キャラウェー、クチナシ、クミン、クレソン、クローブ、ケシノミ、ケーパー、コショウ、ゴマ、コリアンダー、サッサフラス、サフラン、サボリー、サルビア、サンショウ、シソ、シナモン、シャロット、ジュニパーベリー、ショウガ、スターアニス、スペアミント、セイヨウワサビ、セロリー、ソーレル、タイム、タマネギ、タマリンド、タラゴン、チャイブ、ディル、トウガラシ、ナツメグ、ニガヨモギ、ニジェラ、ニンジン、ニンニク、バジル、パセリ、ハッカ、バニラ、パプリカ、ヒソップ、フェネグリーク、ペパーミント、ホースミント、マジョラム、ミョウガ、ラベンダー、リンデン、レモングラス、レモンバーム、ローズ、ローズマリー、ローレル又はワサビから抽出し、又はこれを水蒸気蒸留して得られたものをいう。ただし、「ウコン色素」、「オレガノ抽出物」、「オレンジ色素」、「カラシ抽出物」、「カンゾウ抽出物」、「カンゾウ油性抽出物」、「クチナシ黄色素」、「クローブ抽出物」、「ゴマ油不けん化物」、「ショウガ抽出物」、「精油除去ウイキョウ抽出物」、「セイヨウワサビ抽出物」、「セージ抽出物」、「タマネギ色素」、「タマリンド色素」、「タマリンドシードガム」、「タンニン（抽出物）」、「トウガラシ色素」、「トウガラシ水性抽出物」、「ニガヨモギ抽出物」、「ニンジンカロテン」及び「ローズマリー抽出物」を除く。）	スパイス抽出物	香辛料 スパイス	※	苦味料等	Spice Extracts
115	酵素処理イソクエルシトリン （「ルチン酵素分解物」から得られた、α-グルコシルイソクエルシトリンを主成分とするものをいう。）	糖転移イソクエルシトリン	酵素処理ルチン 糖転移ルチン	※	酸化防止剤	Enzymatically Modified Isoquercitrin
116	酵素処理ナリンジン （「ナリンジン」から得られた、α-グルコシルナリンジンを主成分とするものをいう。）	糖転移ナリンジン	ナリンジン	「ナリンジン」とデキストリンの混合物に、シクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを用いてグルコースを付加させたものである。有効成分はα-グルコシルナリンジンである。	苦味料等	Enzymatically modified naringin
117	酵素処理ヘスペリジン （「ヘスペリジン」にシクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼを用いてグルコースを付加して得られたものをいう。）	糖転移ヘスペリジン 糖転移ビタミンP	ヘスペリジン	※	強化剤	Enzymatically Modified Hesperidin
118	酵素処理ルチン（抽出物） （「ルチン（抽出物）」から得られた、α-グルコシルルチンを主成分とするものをいう。）	糖転移ルチン（抽出物）	酵素処理ルチン 糖転移ルチン	※	酸化防止剤 強化剤 着色料	Enzymatically Modified Rutin (Extract)
119	酵素処理レシチン （「植物レシチン」又は「卵黄レシチン」から得られた、ホスファチジルグリセロールを主成分とするものをいう。）		レシチン	※	乳化剤	Enzymatically Modified Lecithin
120	酵素分解カンゾウ （「カンゾウ抽出物」を酵素分解して得られた、グリチルレチン酸-3-グルクロニドを主成分とするものをいう。）		カンゾウ	※	甘味料	Enzymatically Hydrolyzed Licorice Extract
121	酵素分解リンゴ抽出物 （リンゴの果実を酵素分解して得られた、カテキン類及びクロロゲン酸を主成分とするものをいう。）		リンゴ抽出物 リンゴエキス	バラ科リンゴ（Malus pumila MILLER）の果実を搾汁し、パルプを分離した後、得られた上清を酵素処理し、精製して得られたものである。有効成分はクロロゲン酸及びカテキン類である。	酸化防止剤	Enzymatically decomposed apple extract
122	酵素分解レシチン （「植物レシチン」又は「卵黄レシチン」から得られた、フォスファチジン酸及びリゾレシチンを主成分とするものをいう。）		レシチン	※	乳化剤	Enzymatically Decomposed Lecithin
123	酵母細胞壁 （サッカロミセスの細胞壁から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）		酵母細胞膜	※	増粘安定剤 製造用剤	Yeast Cell Wall

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
124	コウリャン色素 （コウリャンの種子から得られた、アピゲニニジン及びルテオリニジンを主成分とするものをいう。）	キビ色素	フラボノイド フラボノイド色素	※	着色料	Kaoliang Color
125	コチニール色素 （エンジムシから得られた、カルミン酸を主成分とするものをいう。）	カルミン酸色素	カルミン酸 コチニール	※	着色料	Cochineal Extract Carminic Acid
126	骨炭 （ウシの骨から得られた、炭末及びリン酸カルシウムを主成分とするものをいう。）			※	製造用剤	Bone Charcoal
127	ゴマ油不けん化物 （ゴマの種子から得られた、セサモリンを主成分とするものをいう。）		ゴマ油抽出物	ゴマ科ゴマ（Sesamum indicum LINNE）の種子又は種子の搾油糟より、エタノールで抽出して得られたものである。主成分はセサモリンである。	酸化防止剤	Sesame seed oil unsaponified matter
128	ゴム （パラゴムの分泌液から得られた、ポリイソプレンを主成分とするものをいう。ただし、パラゴムノキの分泌液を分解して得られた、ポリイソプレンを主成分とするものを除く。）	カウチョック		※	ガムベース	Rubber Natural Rubber
129	コメヌカ油抽出物 （米ぬか油から得られた、フェルラ酸を主成分とするものをいう。）	コメヌカ油不けん化物		※	酸化防止剤	Rice Bran Oil Extract
130	コメヌカ酵素分解物 （脱脂米ぬかから得られた、フィチン酸及びペプチドを主成分とするものをいう。）			イネ科イネ（Oryza sativa LINNE）の種子より得られる脱脂米ぬかを酵素分解したものより、水で抽出して得られたものである。主成分はペプチド及びフィチン酸である。	酸化防止剤	Enzymatically decomposed rice bran
131	コメヌカロウ （米ぬか油から得られた、リグノセリン酸ミリシルを主成分とするものをいう。）	コメヌカワックス ライスワックス	植物ワックス	※	ガムベース 光沢剤	Rice Bran Wax
132	サイリウムシードガム （ブロンドサイリウムの種皮から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	サイリウムハスク	サイリウム	※	増粘安定剤	Psyllium Seed Gum
133	サトウキビロウ （サトウキビの茎から得られた、パルミチン酸ミリシルを主成分とするものをいう。）	カーンワックス ケーンワックス	植物ワックス	※	ガムベース 光沢剤	Cane Wax
134	サバクヨモギシードガム （サバクヨモギの種皮から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	アルテミシアシードガム サバクヨモギ種子多糖類		※	製造用剤 増粘安定剤	Artemisia Seed Gum
135	酸性白土		不溶性鉱物性物質	※	製造用剤	Acid Clay
136	酸性ホスファターゼ	ホスホモノエステラーゼ		※	酵素	Acid Phosphatase
137	酸素			O_2	製造用剤	Oxygen
138	シアノコバラミン	ビタミンB_{12}	V.B_{12}	※	強化剤	Cyanocobalamin
139	シェラック （ラックカイガラムシの分泌液から得られた、アレウリチン酸とシェロール酸又はアレウリチン酸とジャラール酸のエステルを主成分とするものをいう。）	セラック			ガムベース 光沢剤	Shellac
	シェラック（白シェラック）	セラック(白セラック)	白シェラック 白セラック 白ラック	※		Shellac(White Shellac)
	シェラック（精製シェラック）	セラック(精製セラック)	精製シェラック 精製セラック	※		Shellac(Purified Shellac)
140	シェラックロウ （ラックカイガラムシの分泌液から得られた、ろう分を主成分とするものをいう。）	セラックロウ		※	ガムベース 光沢剤	Shellac Wax
141	ジェランガム （シュードモナスの培養液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	ジェラン多糖類	ジェラン	※	増粘安定剤	Gellan Gum

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
142	ジェルトン （ジェルトンの分泌液から得られた、アミリンアセタート及びポリイソプレンを主成分とするものをいう。）	ポンチアナック		※	ガムベース	Jelutong
143	シクロデキストリン	サイクロデキストリン	環状オリゴ糖	デンプンを、酵素処理し、非還元性環状デキストリンとして得られたものである。成分はシクロデキストリンである。	製造用剤	Cyclodextrin
	α－シクロデキストリン	α－サイクロデキストリン		※		α-Cyclodextrin
	β－シクロデキストリン	β－サイクロデキストリン		※		β-Cyclodextrin
	γ－シクロデキストリン	γ－サイクロデキストリン		※		γ-Cyclodextrin
	分岐シクロデキストリン	分岐サイクロデキストリン		※		Branched Cyclodextrin
144	シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ		トランスフェラーゼ	※	酵素	Cyclodextrin glucanotransferase
145	L-シスチン		シスチン	※	調味料 強化剤	L-Cystine
146	シタン色素 （シタンの幹枝から得られた、サンタリンを主成分とするものをいう。）	サンダルウッド色素	サンダルウッド フラボノイド フラボノイド色素	※	着色料	Sandalwood Red
147	5'-シチジル酸		5'-CMP	※	強化剤	5'-Cytidylic Acid
148	ジャマイカカッシア抽出物 （ジャマイカカッシアの幹枝又は樹皮から得られた、クアシン及びネオクアシンを主成分とするものをいう。）	カッシアエキス	カッシア	※	苦味料等	Jamaica Quassia Extract
149	ショウガ抽出物 （ショウガの根茎から得られた、ショウガオール及びジンゲロールを主成分とするものをいう。）	ジンジャー抽出物	ジンジャー抽出物	ショウガ科ショウガ（Zingiber officinale ROSC.）の根茎より、室温時エタノール、アセトン又はヘキサンで抽出して得られたものである。主成分はジンゲロール類及びショウガオール類である。	製造用剤	Ginger extract
150	焼成カルシウム （うに殻、貝殻、造礁サンゴ、ホエイ、骨又は卵殻を焼成して得られた、カルシウム化合物を主成分とするものをいう。）		焼成Ca		強化剤 製造用剤	Calcinated Calcium
	うに殻焼成カルシウム		うに殻カルシウム うに殻Ca	※		Calcinated Sea Urchin Shell Calcium
	貝殻焼成カルシウム		貝カルシウム 貝Ca	※		Calcinated Shell Calcium
	骨焼成カルシウム	骨カルシウム	骨Ca	※		Calcinated Bone Calcium
	造礁サンゴ焼成カルシウム		コーラルカルシウム コーラルCa サンゴカルシウム サンゴCa	※		Calcinated Coral Calcium
	乳清焼成カルシウム	乳清第三リン酸カルシウム ホエイ第三リン酸カルシウム ホエイリン酸三カルシウム	乳清リン酸カルシウム 乳清リン酸Ca ホエイリン酸カルシウム ホエイリン酸Ca	※		Calcinated Whey Calcium
	卵殻焼成カルシウム		卵殻カルシウム 卵殻Ca	※		Calcinated Eggshell Calcium

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
151	植物性ステロール （油糧種子から得られた、フィトステロールを主成分とするものをいう。）	フィトステロール	ステロール	油糧種子を粉砕し、抽出して得られた植物性油脂より、室温時～温時メタノール、エタノール、イソプロパノール、酢酸エチル、アセトン、又はヘキサンで抽出したものより得られたものである。主成分はフィトステロールである。	乳化剤	Vegetable Sterol
	植物性ステロール（遊離体高濃度品）	フィトステロール（遊離体高濃度品）		※		Vegetable Sterol (High Concentration Free Sterol)
	植物性ステロール（遊離体低濃度品）	フィトステロール（遊離体低濃度品）		※		Vegetable Sterol (Low Concentration Free Sterol)
152	植物炭末色素 （植物を炭化して得られた、炭素を主成分とするものをいう。）	炭末色素	炭末	※	着色料	Vegetable Carbon Black
153	植物レシチン （アブラナ又はダイズの種子から得られた、レシチンを主成分とするものをいう。	レシチン		アブラナ科アブラナ（Brassica campestris LINNE）、マメ科ダイズ（Glycine max MERRILL）の種子より得られた油脂より、分離して得られたものである。主成分はレシチンである。	乳化剤	Vegetable lecithin
154	しらこたん白抽出物 （魚類の精巣から得られた、塩基性タンパク質を主成分とするものをいう。）	しらこたん白 しらこ分解物 プロタミン	核たん白 しらこ	※	保存料	Milt Protein
155	水素			H_2	製造用剤	Hydrogen
156	ステビア抽出物 （ステビアの葉から抽出して得られた、ステビオール配糖体を主成分とするものをいう。）	ステビアエキス	ステビア ステビア甘味料	※	甘味料	Stevia Extract
	ステビオール配糖体	ステビオシド レバウジオシド		※		Steviol Glycosides
157	ステビア末 （ステビアの葉を粉砕して得られた、ステビオール配糖体を主成分とするものをいう。）		ステビア	キク科ステビア（Stevia rebaudiana BERTONI）の葉を、粉末としたものである。主甘味成分はステビオール配糖体（ステビオシド及びレバウジオシド）である。	甘味料	Powdered stevia
158	スピルリナ色素 （スピルリナの全藻から得られた、フィコシアニンを主成分とするものをいう。）	スピルリナ青色素	スピルリナ青	※	着色料	Spirulina Color
159	スフィンゴ脂質 （米ぬかから得られた、スフィンゴシン誘導体を主成分とするものをいう。）			イネ科イネ（Oryza sativa LINNE）の種子又は小麦（Triticum aestivum LINNE）の胚芽から得られた米ぬかより、室温時～温時エタノール、含水エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、ヘキサン又は酢酸エチルで抽出したものより得られたものである。主成分はスフィンゴシン誘導体である。	乳化剤	Sphingolipid
160	生石灰			※	製造用剤	Quicklime
161	精油除去ウイキョウ抽出物 （ウイキョウの種子から得られた、グルコシルシナピルアルコールを主成分とするものをいう。）	精油除去フェンネル抽出物		※	酸化防止剤	Essential Oil Removed Fennel Extract
162	セイヨウワサビ抽出物 （セイヨウワサビの根から得られた、イソチオシアナートを主成分とするものをいう。）	ホースラディッシュ抽出物		※	酸化防止剤 製造用剤	Horseradish Extract
163	ゼイン （トウモロコシの種子から得られた、植物性タンパク質を主成分とするものをいう。）	トウモロコシたん白		イネ科トウモロコシ（Zea mays LINNE）の種子を粉末化したものより、エタノール又はアセトンで抽出し、精製して得られたものである。主成分はプロラミンに属する植物性タンパク質である。	製造用剤	Zein
164	ゼオライト		不溶性鉱物性物質	鉱床より採掘したゼオライトを精製して得られたものである。主成分は結晶性アルミノケイ酸塩である。	製造用剤	Zeolite
165	セージ抽出物 （サルビアの葉から得られた、カルノシン酸及びフェノール性ジテルペンを主成分とするものをいう。）			シソ科サルビア（Salvia officinalis LINNE）の葉より、水、エタノール又はヘキサンで抽出して得られたものである。有効成分はフェノール性ジテルペノイド（ジテルペン）及びカルノシン酸である。	酸化防止剤	Sage extract
166	L-セリン		セリン	※	調味料 強化剤	L-Serine
167	セルラーゼ	繊維素分解酵素	カルボヒドラーゼ	※	酵素	Cellulase

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
168	粗製海水塩化カリウム （海水から塩化ナトリウムを析出分離して得られた、塩化カリウムを主成分とするものをいう。）			※	調味料	Crude Potassium Chloride (Sea Water)
169	粗製海水塩化マグネシウム （海水から塩化カリウム及び塩化ナトリウムを析出分離して得られた、塩化マグネシウムを主成分とするものをいう。）	塩化マグネシウム含有物		※	製造用剤	Crude Magnesium Chloride (Sea Water)
170	ダイズサポニン （ダイズの種子から得られた、サポニンを主成分とするものをいう。）		サポニン	マメ科ダイズ（Glycine max MERRILL）の種子を粉砕し、水又はエタノールで抽出し、精製して得られたものである。主成分はサポニン（ソヤサポニン等）である。	乳化剤	Soybean saponin
171	タウマチン （タウマトコッカスダニエリの種子から得られた、タウマチンを主成分とするものをいう。）	ソーマチン		※	甘味料	Thaumatin
172	タウリン（抽出物） （魚類又はほ乳類の臓器又は肉から得られた、タウリンを主成分とするものをいう。）		タウリン	※	調味料	Taurine (Extract)
173	タマネギ色素 （タマネギのりん茎から得られた、クエルセチンを主成分とするものをいう。）		フラボノイド フラボノイド色素 野菜色素	※	着色料	Onion Color
174	タマリンド色素 （タマリンドの種子から得られた、フラボノイドを主成分とするものをいう。）		フラボノイド フラボノイド色素	※	着色料	Tamarind Color
175	タマリンドシードガム （タマリンドの種子から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	タマリンドガム タマリンド種子多糖類	タマリンド	※	増粘安定剤	Tamarind Seed Gum
176	タラガム （タラの種子から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）			※	増粘安定剤	Tara Gum
177	タルク		不溶性鉱物性物質	※	ガムベース 製造用剤	Talc
178	単糖・アミノ酸複合物 （アミノ酸と単糖類の混合物を加熱して得られたものをいう。）		糖・アミノ酸複合物	※	酸化防止剤	Amino Acid-Sugar Reaction Product
179	タンナーゼ			※	酵素	Tannase
180	タンニン（抽出物） （カキの果実、五倍子、タラ末、没食子又はミモザの樹皮から得られた、タンニン及びタンニン酸を主成分とするものをいう。）	タンニン酸（抽出物）	タンニン タンニン酸		製造用剤	Tannin (extract)
	柿タンニン	柿渋 柿抽出物		カキ科カキ（Diospyros kaki THUNB.）の実より、搾汁したもの、又は水若しくはエタノールで抽出して得られたものである。主成分はタンニン及びタンニン酸である。		Tannin of persimmon
	植物タンニン			※		Vegetable Tannin
	ミモザタンニン			マメ科ミモザ（Acacia dealbata LINNE）の樹皮より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。主成分はタンニン及びタンニン酸である。		Tannin of silver wattle
181	チクル （サポジラの分泌液から得られた、アミリンアセタート及びポリイソプレンを主成分とするものをいう。）	クラウンガム チクブル ニスペロ		※	ガムベース	Chicle
182	窒素			N_2	製造用剤	Nitrogen
183	チャ乾留物 （チャの葉を乾留して得られたものをいう。）			ツバキ科チャ（Camellia sinensis O.KZE.）の葉より製した茶を、乾留して得られたものである。有効成分は特定できないが、アミノ酸、カフェイン、タンニン、カテキン類を含む。	製造用剤	Tea dry distillate

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
184	チャ抽出物 （チャの葉から得られた、カテキン類を主成分とするものをいう。）	ウーロンチャ抽出物 紅茶抽出物 緑茶抽出物		※	酸化防止剤 製造用剤	Tea Extract
185	L-チロシン		L-チロジン チロシン チロジン	※	調味料 強化剤	L-Tyrosine
186	ツヤプリシン（抽出物） （ヒバの幹枝又は根から得られた、ツヤプリシン類を主成分とするものをいう。）	ヒノキチオール（抽出物）	ヒノキチオール	※	保存料	Thujaplicin (Extract) Hinokitiol(Extract)
187	5'-デアミナーゼ			※	酵素	5'-Deaminase
188	デキストラナーゼ			※	酵素	Dextranase
189	デキストラン		ブドウ糖多糖	※	増粘安定剤	Dextran
190	鉄			^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{58}Fe	強化剤 製造用剤	Iron
191	デュナリエラカロテン （デュナリエラの全藻から得られた、β-カロテンを主成分とするものをいう。）	藻類カロチン 藻類カロテン デュナリエラカロチン ドナリエラカロチン ドナリエラカロテン 抽出カロチン 抽出カロテン	カロチノイド カロチノイド色素 カロチン カロチン色素 カロテノイド カロテノイド色素 カロテン カロテン色素	※	強化剤 着色料	Dunaliella Carotene
192	銅			^{63}Cu, ^{65}Cu	製造用剤	Copper
193	トウガラシ色素 （トウガラシの果実から得られた、カプサンチン類を主成分とするものをいう。）	カプシカム色素 パプリカ色素	カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素	※	着色料	Paprika Color Paprika Oleoresin
194	トウガラシ水性抽出物 （トウガラシの果実から抽出して得られた、水溶性物質を主成分とするものをいう。）	カプシカム水性抽出物 パプリカ水性抽出物	カプシカム抽出物 トウガラシ抽出物 パプリカ抽出物	※	製造用剤	Capsicum Water-soluble Extract
195	動物性ステロール （魚油又は「ラノリン」から得られた、コレステロールを主成分とするものをいう。）	コレステロール	ステロール	※	乳化剤	Cholesterol
196	トコトリエノール			※	酸化防止剤	Tocotrienol
197	d-α-トコフェロール	α-ビタミンE	抽出V.E トコフェロール α-トコフェロール ビタミンE V.E 抽出トコフェロール 抽出ビタミンE	※	酸化防止剤 強化剤	d-α-Tocopherol
198	d-γ-トコフェロール	γ-ビタミンE	抽出V.E トコフェロール γ-トコフェロール ビタミンE V.E 抽出トコフェロール 抽出ビタミンE	※	酸化防止剤 強化剤	d-γ-Tocopherol
199	d-δ-トコフェロール	δ-ビタミンE	抽出V.E トコフェロール δ-トコフェロール ビタミンE V.E 抽出トコフェロール 抽出ビタミンE	※	酸化防止剤 強化剤	d-δ-Tocopherol
200	トマト色素 （トマトの果実から得られた、リコピンを主成分とするものをいう。）	トマトリコピン	カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素 野菜色素	※	着色料	Tomato Color

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
201	トラガントガム （トラガントの分泌液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）		トラガント	※	増粘安定剤	Tragacanth Gum
202	トランスグルコシダーゼ			※	酵素	Transglucosidase
203	トランスグルタミナーゼ			※	酵素	Transglutaminase
204	トリプシン			※	酵素	Trypsin
205	トレハロース			※	製造用剤	Trehalose
206	トレハロースホスホリラーゼ			※	酵素	Trehalose Phosphorylase
207	トロロアオイ （トロロアオイの根から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）			アオイ科トロロアオイ（Abelmoschus manihot MED.）の根を、乾燥、粉砕して得られたものである。主成分は多糖類である。	増粘安定剤	Tororoaoi
208	納豆菌ガム （納豆菌の培養液から得られた、ポリグルタミン酸を主成分とするものをいう。）	納豆菌粘質物	ポリグルタミン酸	※	増粘安定剤 製造用剤	Bacillus Natto Gum
209	生コーヒー豆抽出物 （コーヒーの種子から得られた、クロロゲン酸及びポリフェノールを主成分とするものをいう。）			アカネ科コーヒー（Coffea arabica LINNE）の種子より、温時アスコルビン酸又はクエン酸酸性水溶液で抽出して得られたものである。有効成分は、クロロゲン酸及びポリフェノールである。	酸化防止剤	Coffee Bean Extract
	生コーヒー豆抽出物（ペースト品、液体品）			※		Coffee Bean Extract (Paste, Liquid)
210	ナリンジナーゼ	ナリンギナーゼ		※	酵素	Naringinase
211	ナリンジン	ナリンギン		※	苦味料等	Naringin
212	ニガヨモギ抽出物 （ニガヨモギの全草から得られた、セスキテルペンを主成分とするものをいう。）		ニガヨモギ	キク科ニガヨモギ（Artemisia absinthium LINNE）の全草より、水又は室温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はセスキテルペン（アブシンチン等）である。	苦味料等	Absinth extract
213	ニッケル			^{58}Ni, ^{60}Ni, ^{61}Ni, ^{62}Ni, ^{64}Ni	製造用剤	Nickel
214	ニンジンカロテン （ニンジンの根から得られた、カロテンを主成分とするものをいう。）	キャロットカロチン キャロットカロテン ニンジンカロチン 抽出カロチン 抽出カロテン	カロチノイド カロチノイド色素 カロチン カロチン色素 カロテノイド カロテノイド色素 カロテン カロテン色素	※	強化剤 着色料	Carrot Carotene
215	ばい煎コメヌカ抽出物 （米ぬかから得られた、マルトールを主成分とするものをいう。）			イネ科イネ（Oryza sativa LINNE）の米ぬかを脱脂し、ばい煎したものを、熱時水で抽出後、温時エタノールでタンパク質を除去したものである。成分としてマルトールを含む。	製造用剤	Roasted rice bran extract
216	パーオキシダーゼ	ペルオキシダーゼ		※	酵素	Peroxidase
217	白金			^{192}Pt, ^{194}Pt, ^{195}Pt, ^{196}Pt, ^{198}Pt	製造用剤	Platinum
218	パパイン			※	酵素	Papain
219	パーム油カロテン （アブラヤシの果実から得られた、カロテンを主成分とするものをいう。）	パーム油カロチン 抽出カロチン 抽出カロテン	カロチノイド カロチノイド色素 カロチン カロチン色素 カロテノイド カロテノイド色素 カロテン カロテン色素	※	強化剤 着色料	Palm Oil Carotene

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
220	パーライト		不溶性鉱物性物質	※	製造用剤	Perlite
221	パラジウム			^{102}Pd, ^{104}Pd, ^{105}Pd, ^{106}Pd, ^{108}Pd, ^{110}Pd	製造用剤	Palladium
222	パラフィンワックス	パラフィン		※	ガムベース 光沢剤	Paraffin Wax
223	パンクレアチン			※	酵素	Pancreatin
224	ヒアルロン酸		ムコ多糖	※	製造用剤	Hyaluronic Acid
225	微結晶セルロース （パルプから得られた、結晶セルロースを主成分とするものをいう。）	結晶セルロース	セルロース	※	製造用剤	Microcrystalline Cellulose
226	微小繊維状セルロース （パルプ又は綿を微小繊維状にして得られた、セルロースを主成分とするものをいう。）		セルロース	※	増粘安定剤 製造用剤	Microfibrillated Cellulose
227	L-ヒスチジン		ヒスチジン	※	調味料 強化剤	L-Histidine
228	ビートレッド （ビートの根から得られた、イソベタニン及びベタニンを主成分とするものをいう。）	アカビート色素	アカビート 野菜色素	※	着色料	Beet Red
229	L-ヒドロキシプロリン	L-オキシプロリン	オキシプロリン ヒドロキシプロリン	※	調味料 強化剤	L-Hydroxyproline
230	ヒマワリ種子抽出物 （ヒマワリの種子から得られた、イソクロロゲン酸及びクロロゲン酸を主成分とするものをいう。）	ヒマワリエキス ヒマワリ種子エキス ヒマワリ抽出物	ヒマワリ種子	キク科ヒマワリ（Helianthus annuus LINNE）の種子又は種子の搾油相より、熱時水又は含水エタノールで抽出して得られたものである。有効成分はイソクロロゲン酸及びクロロゲン酸である。	酸化防止剤	Sunflower seed extract
231	ファーセレラン （フルセラリアの全藻から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）			ススカケベニ科フルセラリア（Furcellaria fastigiata HUD.）の全藻より、熱時水又はアルカリ性水溶液で抽出して得られたものである。主成分は多糖類である。	増粘安定剤	Furcellaran
232	ファフィア色素 （ファフィアの培養液から得られた、アスタキサンチンを主成分とするものをいう。）		カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素	酵母（Phaffia rhodozyma MILLER）の培養液より、室温時アセトン、エタノール、含水エタノール、ヘキサン又はこれらの混合液で抽出し、溶媒を除去して得られたものである。主色素はアスタキサンチンである。橙色～赤色を呈する。	着色料	Phaffia colour
233	フィシン	ファイシン		※	酵素	Ficin
234	フィターゼ		ホスホヒドロラーゼ	※	酵素	Phytase
235	フィチン酸 （米ぬか又はトウモロコシの種子から得られた、イノシトールヘキサリン酸を主成分とするものをいう。）			イネ科イネ（Oryza sativa LINNE）の種子より得られた米ぬか又はイネ科トウモロコシ（Zea mays LINNE）の種子より、室温時水又は酸性水溶液で抽出し、精製して得られたものである。主成分はイノシトールヘキサリン酸である。	酸味料 製造用剤	Phytic Acid
	フィチン酸（液体品）			※		Phytic Acid(Liquid)
	フィチン酸（粉末品）			※		Phytic Acid(Powder)
236	フィチン（抽出物） （米ぬか又はトウモロコシの種子から得られた、イノシトールヘキサリン酸マグネシウムを主成分とするものをいう。）		フィチン	※	製造用剤	Phytin(Extract)
237	フェルラ酸			※	酸化防止剤	Ferulic Acid
238	フクロノリ抽出物 （フクロノリの全藻から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）		フクロノリ多糖類 フクロフノリ多糖類 フクロフノリ抽出物	※	増粘安定剤	Fukuronori Extract

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
239	ブタン			石油若しくは天然ガス成分中、n-ブタンの沸点付近の留分である。	製造用剤	Butane
240	ブドウ果皮色素 （アメリカブドウ又はブドウの果皮から得られた、アントシアニンを主成分とするものをいう。）	エノシアニン	アントシアニン アントシアニン色素 ブドウ色素	※	着色料	Grape Skin Extract Grape Skin Color
241	ブドウ果皮抽出物 （アメリカブドウ又はブドウの果皮から得られた、ポリフェノールを主成分とするものをいう。）			ブドウ科アメリカブドウ（Vitis labrusca LINNE）又はブドウ科ブドウ（Vitis vinifera LINNE）のうち、生食用又は醸造用ブドウの甲州、シャルドネ若しくはリースリング種の果皮搾粕より、室温時～微温時エタノールで抽出して得られたものである。主成分はポリフェノールである。	製造用剤	Grape skin-derived substance
242	ブドウ種子抽出物 （アメリカブドウ又はブドウの種子から得られた、プロアントシアニジンを主成分とするものをいう。）		プロアントシアニジン	※	酸化防止剤 製造用剤	Grape Seed Extract
243	ブラジルカンゾウ抽出物 （ブラジルカンゾウの根から得られた、ペリアンドリンを主成分とするものをいう。）	ペリアンドリン	ブラジルカンゾウ	マメ科ブラジルカンゾウ（Periandra dulcis MART.）の根より、水で抽出したものより得られたものである。甘味成分はペリアンドリンである。	甘味料	Brazilian licorice extract
244	フルクトシルトランスフェラーゼ			※	酵素	Fructosyl Transferase
245	プルラナーゼ		アミラーゼ カルボヒドラーゼ	※	酵素	Pullulanase
246	プルラン			※	増粘安定剤 製造用剤	Pullulan
247	プロテアーゼ	たん白分解酵素		※	酵素	Protease
248	プロパン			石油若しくは天然ガス成分中、n-プロパンの沸点付近の留分である。	製造用剤	Propane
249	ブロメライン		ブロメリン	※	酵素	Bromelain
250	L-プロリン		プロリン	※	調味料 強化剤	L-Proline
	L-プロリン液			※		L-Proline Solution
251	分別レシチン （「植物レシチン」又は「卵黄レシチン」から得られた、スフィンゴミエリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミン及びフォスファチジルコリンを主成分とするものをいう。）	レシチン分別物 レシチン		「植物レシチン」又は「卵黄レシチン」より、室温時～温時メタノール、エタノール、含水エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、ヘキサン又は酢酸エチルで抽出して得られたものである。主成分は、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリンである。	乳化剤	Fractionated lecithin Cephalin Lipoinositol
252	粉末セルロース （パルプを分解して得られた、セルロースを主成分とするものをいう。ただし、「微結晶セルロース」を除く。）		セルロース	※	製造用剤	Powdered Cellulose
253	粉末モミガラ （イネのもみ殻から得られた、セルロースを主成分とするものをいう。）			イネ科イネ（Oryza sativa LINNE）のもみ殻を、微粉砕して得られたものである。主成分はセルロースである。	ガムベース	Powdered rice hulls
254	ヘキサン			※	製造用剤	Hexane
255	ペクチナーゼ		カルボヒドラーゼ	※	酵素	Pectinase
256	ペクチン			※	増粘安定剤	Pectin
257	ペクチン分解物 （「ペクチン」から得られた、ガラクチュロン酸を主成分とするものをいう。）		分解ペクチン	※	保存料	Pectin Digests
258	ヘスペリジナーゼ			※	酵素	Hesperidinase
259	ヘスペリジン	ビタミンP		※	強化剤	Hesperidin
260	ベタイン			※	調味料	Betaine

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
261	ベニコウジ黄色素 （ベニコウジカビの培養液から得られた、キサントモナシン類を主成分とするものをいう。）	モナスカス黄色素	紅麹 紅麹色素 モナスカス モナスカス色素	※	着色料	Monascus Yellow
262	ベニコウジ色素 （ベニコウジカビの培養液から得られた、アンカフラビン及びモナスコルブリンを主成分とするものをいう。）	モナスカス色素	紅麹 モナスカス	※	着色料	Monascus Color
263	ベニバナ赤色素 （ベニバナの花から得られた、カルタミンを主成分とするものをいう。）	カーサマス赤色素	フラボノイド フラボノイド色素 紅花赤 紅花色素	※	着色料	Carthamus Red
264	ベニバナ黄色素 （ベニバナの花から得られた、サフラーイエロー類を主成分とするものをいう。）	カーサマス黄色素	フラボノイド フラボノイド色素 紅花黄 紅花色素	※	着色料	Carthamus Yellow
265	ペプシン			※	酵素	Pepsin
266	ヘプタン			※	製造用剤	Heptane
267	ペプチダーゼ			※	酵素	Peptidase
268	ヘマトコッカス藻色素 （ヘマトコッカスの全藻から得られた、アスタキサンチンを主成分とするものをいう。）		カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素	※	着色料	Haematococcus Algae Color
269	ヘミセルラーゼ	ペントサナーゼ	カルボヒドラーゼ	※	酵素	Hemicellulase
270	ヘム鉄			※	強化剤	Heme Iron
271	ヘリウム			^{2}He	製造用剤	Helium
272	ベントナイト		不溶性鉱物性物質	※	製造用剤	Bentonite
273	ホスホジエステラーゼ			※	酵素	Phosphodiesterase
274	ホスホリパーゼ	ホスファチダーゼ レシチナーゼ		※	酵素	Phospholipase
275	没食子酸			※	酸化防止剤	Gallic Acid
276	ポリフェノールオキシダーゼ	フェノラーゼ		※	酵素	Polyphenol Oxidase
277	ε-ポリリシン	ε-ポリリジン	ポリリジン	※	保存料	ε-Polylysine
278	マイクロクリスタリンワックス	ミクロクリスタリンワックス		※	ガムベース 光沢剤	Microcrystalline Wax
279	マクロホモプシスガム （マクロホモプシスの培養液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	マクロホモプシス多糖類		※	増粘安定剤	Macrophomopsis Gum
280	マスチック （ヨウニュウコウの分泌液から得られた、マスチカジエノン酸を主成分とするものをいう。）			ウルシ科ヨウニュウコウ（Pistacia lentiscus LINNE）の分泌液より、低沸点部を蒸留により除去し、熱時エタノールで抽出し、エタノールを留去して得られたものである。主構成成分はマスチカジエノン酸である。	ガムベース	Mastic gum
281	マリーゴールド色素 （マリーゴールドの花から得られた、キサントフィルを主成分とするものをいう。）		カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素 マリーゴールド	※	着色料	Marigold Color
282	マルトースホスホリラーゼ			※	酵素	Maltose Phosphorylase

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
283	マルトトリオヒドロラーゼ	G3生成酵素	アミラーゼ カルボヒドラーゼ	※	酵素	Maltotriohydrolase
284	未焼成カルシウム （貝殻、真珠の真珠層、造礁サンゴ、骨又は卵殻を乾燥して得られた、カルシウム塩を主成分とするものをいう。）		未焼成Ca		強化剤	Non-calcinated calcium
	貝殻未焼成カルシウム		貝カルシウム 貝Ca	貝殻を、殺菌、乾燥し、粉末にして得られたものである。主成分は炭酸カルシウムである。		Non-calcinated shell calcium
	骨未焼成カルシウム		骨カルシウム 骨Ca	獣骨又は魚骨を、殺菌、乾燥し、粉末にして得られたものである。主成分はリン酸カルシウムである。		Non-calcinated bone calcium
	サンゴ未焼成カルシウム	コーラルカルシウム サンゴカルシウム	コーラルCa サンゴCa	※		Non-calcinated Coral Calcium
	真珠層未焼成カルシウム		真珠層カルシウム 真珠層Ca	ウグイスガイ科アコヤガイ（Pinctada fucata）から得られる真珠の核を除いた真珠層を、殺菌、乾燥し、粉末にして得られたものである。主成分は炭酸カルシウムである。		Non-calcinated mother-of-pearl layer calcium
	卵殻未焼成カルシウム		卵殻カルシウム 卵殻Ca	卵殻を、殺菌、乾燥し、粉末にして得られたものである。主成分は炭酸カルシウムである。		Non-calcinated eggshell calcium
285	ミックストコフェロール （植物性油脂から得られた、d-α-トコフェロール、d-β-トコフェロール、d-γ-トコフェロール及びd-δ-トコフェロールを主成分とするものをいう。）	ミックスビタミンE	抽出V.E トコフェロール ビタミンE V.E ミックスV.E 抽出トコフェロール 抽出ビタミンE	※	酸化防止剤 強化剤	Mixed Tocopherols
286	ミツロウ （ミチバチの巣から得られた、パルミチン酸ミリシルを主成分とするものをいう。）	オウロウ ビースワックス ベースワックス		※	ガムベース 光沢剤	Bees Wax
287	ミルラ （ボツヤクの分泌液から抽出して得られたものをいう。）	ミル		※	ガムベース	Myrrh
288	ムラサキイモ色素 （サツマイモの塊根から得られた、シアニジンアシルグルコシド及びペオニジンアシルグルコシドを主成分とするものをいう。）		アントシアニン アントシアニン色素 野菜色素	※	着色料	Purple Sweet Potato Color
289	ムラサキトウモロコシ色素 （トウモロコシの種子から得られた、シアニジン-三-グルコシドを主成分とするものをいう。）	ムラサキコーン色素	アントシアニン アントシアニン色素	※	着色料	Purple Corn Color
290	ムラサキヤマイモ色素 （ヤマイモの塊根から得られた、シアニジンアシルグルコシドを主成分とするものをいう。）		アントシアニン アントシアニン色素 ムラサキヤマイモ野菜色素	ヤマノイモ科ヤマイモ（Dioscorea alata LINNE）の紫色の塊根より、室温時水又は弱酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素はシアニジンアシルグルコシドである。紫赤色を呈する。	着色料	Purple yam colour
291	ムラミダーゼ			※	酵素	Muramidase
292	メナキノン（抽出物） （アルトロバクターの培養液から得られた、メナキノン-四を主成分とするものをいう。）	ビタミンK_2（抽出物）	ビタミンK_2 ビタミンK V.K_2 V.K メナキノン	※	強化剤	Menaquinone (Extract) Vitamin K_2 (Extract)
293	メバロン酸			※	製造用剤	Mevalonic Acid
294	メラロイカ精油 （メラロイカの葉から得られた、精油を主成分とするものをいう。）			フトモモ科メラロイカ（Melaleuca alternifolia CHEEL）の葉より、水蒸気蒸留により得られたものである。成分は精油（α-テルピネン及びγ-テルピネン等）である。	酸化防止剤	Melaleuca oil
295	モウソウチク乾留物 （モウソウチクの茎を乾留して得られたものをいう。）		竹乾留物	イネ科モウソウチク（Phyllostachys heterocycla MITF.）の茎をチップ状にしたものを、減圧加熱下で乾留したものより得られたものである。	製造用剤	Mousouchiku dry distillate
296	モウソウチク抽出物 （モウソウチクの茎の表皮から得られた、2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを主成分とするものをいう。）			イネ科モウソウチク（Phyllostachys heterocycla MITF.）の茎の表皮を、粉砕したものより、微温時エタノールで抽出して得られたものである。成分として2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンを含む。	製造用剤	Mousouchiku extract

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
297	木材チップ （ハシバミ又はブナの幹枝を粉砕して得られたものをいう。）	シュペーネ		カバノキ科ハシバミ（Corylus heterophylla FISCHER var.thunberglii BLUME）又はブナ科ブナ（Fagus crenata BLUME）の幹枝を熱水殺菌したものを、粉砕して得られたものである。	製造用剤	Wood chip
298	木炭 （竹材又は木材を炭化して得られたものをいう。）			イネ科マダケ（Phyllostachys bambusoides SIEB. et ZUCC.）若しくはイネ科モウソウチク（Phyllostachys heterocycla MITF.）の茎又はカバノキ科シラカバ（Betula platyphylla SUKAT. var. japonica HARA）、チョウセンマツ（Pinus koraiensis SIEB. et ZUCC.）、ブナ科ウバメガシ（Quercus phyllliraeoides）等の幹枝又は種子を、炭化して得られたものである。	製造用剤	Charcoal
299	モクロウ （ハゼノキの果実から得られた、グリセリンパルミタートを主成分とするものをいう。）	日本ロウ ハゼ脂	植物ワックス	※	ガムベース	Japan Wax
300	木灰 （竹材又は木材を灰化して得られたものをいう。）			ブナ科ブナ（Fagus crenata BLUME）等の幹枝を、灰化して得られたものである。	製造用剤	Timber ash
301	木灰抽出物 （「木灰」から抽出して得られたものをいう。）			ブナ科ブナ（Fagus crenata BLUME）、クスノキ科クスノキ（Cinnamomum Camphora SIEB.）等の幹枝を灰化して得られた灰化物を、精製して得られたものである。	製造用剤	Timber ash extract
302	モモ樹脂 （モモの分泌液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）		ピーチガム	バラ科モモ（Prunus persica BATSCH）の幹枝の樹脂成分を、分離して得られたものである。主成分は多糖類である。	増粘安定剤	Peach gum
303	ヤマモモ抽出物 （ヤマモモの果実、樹皮又は葉から抽出して得られたものをいう。）			※	酸化防止剤	Chinese Bayberry Extract
304	ユッカフォーム抽出物 （ユッカアラボレセンス又はユッカシジゲラの全草から得られた、サポニンを主成分とするものをいう。）	ユッカ抽出物	ユッカフォーム ユッカ・フォーム	※	乳化剤 製造用剤	Yucca Foam Extract
305	ラカンカ抽出物 （ラカンカの果実から得られた、モグロシド類を主成分とするものをいう。）	ラカンカエキス	ラカンカ	※	甘味料	Luohanguo Extract
306	ラクトパーオキシダーゼ			※	酵素	Lactoperoxidase
307	ラクトフェリン濃縮物 （ほ乳類の乳から得られた、ラクトフェリンを主成分とするものをいう。）		ラクトフェリン	※	製造用剤	Lactoferrin Concentrates
308	ラック色素 （ラックカイガラムシの分泌液から得られた、ラッカイン酸類を主成分とするものをいう。）	ラッカイン酸	ラック	※	着色料	Lac Color
309	ラノリン （ヒツジの毛に付着するろう様物質から得られた、高級アルコールとα-ヒドロキシ酸のエステルを主成分とするものをいう。）	羊毛ロウ		※	ガムベース 光沢剤	Lanolin
310	ラムザンガム （アルカリゲネスの培養液から得られた、多糖類を主成分とするものをいう。）	ラムザン多糖類	ラムザン	※	増粘安定剤	Rhamsan Gum
311	L-ラムノース		ラムノース	※	甘味料	L-Rhamnose
312	卵黄レシチン （卵黄から得られた、レシチンを主成分とするものをいう。）	レシチン		卵黄より得られた卵黄油より、分離して得られたものである。主成分はレシチンである。	乳化剤	Yolk lecithin
313	L-リシン	L-リジン	リシン リジン	※	調味料 強化剤	L-Lysine
	L-リシン液	L-リジン液		※		L-Lysine Solution
314	リゾチーム	卵白リゾチーム		※	酵素	Lysozyme
315	リパーゼ	脂肪分解酵素	エステラーゼ	※	酵素	Lipase
316	リポキシゲナーゼ	リポキシダーゼ		※	酵素	Lipoxygenase

番号	品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
	名称	別名				
317	D-リボース		リボース	※	甘味料	D-Ribose
318	流動パラフィン	ミネラルオイルホワイト	パラフィン	※	製造用剤	Liquid Paraffin
319	リンターセルロース （ワタの単毛から得られた、セルロースを主成分とするものをいう。）		セルロース	アオイ科ワタ（Gossypium hirsutum LINNE）の実の単毛を、精製して得られたものである。主成分はセルロースである。	製造用剤	Linter cellulose
320	ルチン酵素分解物 （「ルチン（抽出物）」から得られた、イソクエルシトリンを主成分とするものをいう。）		イソクエルシトリン	※	酸化防止剤	Enzymatically Decomposed Rutin
321	ルチン（抽出物） （アズキの全草、エンジュのつぼみ若しくは花又はソバの全草から得られた、ルチンを主成分とするものをいう。）		フラボノイド ルチン アズキ全草抽出物 エンジュ抽出物 ソバ全草抽出物	※	酸化防止剤 着色料	Rutin (Extract)
322	ルテニウム			^{96}Ru, ^{98}Ru, ^{99}Ru, ^{100}Ru, ^{101}Ru, ^{102}Ru, ^{104}Ru	製造用剤	Ruthenium
323	レイシ抽出物 （マンネンタケの子実体から抽出して得られたものをいう。）	マンネンタケ抽出物（子実体）	レイシ レイシ（子実体）	※	苦味料等	Carpophore Derived Mannentake Extract (Fruiting body)
324	レンネット	キモシン レンニン		※	酵素	Rennet
325	L-ロイシン		ロイシン	※	調味料 強化剤	L-Leucine
326	ロシン （マツの分泌液から得られた、アビエチン酸を主成分とするものをいう。）	ロジン		※	ガムベース	Rosin
327	ローズマリー抽出物 （マンネンロウの葉又は花から得られた、カルノシン酸、カルノソール及びロスマノールを主成分とするものをいう。）	マンネンロウ抽出物		シソ科マンネンロウ（Rosmarinus officinalis LINNE）の葉又は花より、二酸化炭素、温時～熱時含水エタノール若しくはエタノールで抽出して得られたもの、又は温時～熱時ヘキサン、メタノール若しくは含水メタノールで抽出し、溶媒を除去して得られたものである。有効成分は、フェノール性ジテルペノイド（ロスマノール、カルノソール及びカルノシン酸等）である。	酸化防止剤	Rosemary Extract
	ローズマリー抽出物（水溶性）	マンネンロウ抽出物（水溶性）		※		Rosemary Extract (Water Soluble)
	ローズマリー抽出物（非水溶性）	マンネンロウ抽出物（非水溶性）		※		Rosemary Extract (Water Insoluble)

※食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）第２添加物の部Ｄ成分規格・保存基準各条の規定に従う。

なお、組換えＤＮＡ技術によって得られた生物を利用して製造された添加物の場合は、厚生労働大臣が定める安全性審査の手続を経た旨が公表されていなければならない。

別添　添加物２－２

天然香料基原物質リスト

基原物質名	別 名	備 考
アイスランドモス	アイスランド苔	Iceland moss
アカヤジオウ		Akayajio
アケビ		Akebia
アサ	麻	Hemp
アサフェチダ		Asafetida
アジアンタム		Maidenhair fern
アジョワン		Ajowan
アズキ	小豆	Red beans
アスパラサスリネアリス	ルイボス、ロオイボス	Rooibos
アップルミント		Apple mint
アーティチョーク	チョウセンアザミ	Artichoke
アニス		Anise
アボカド		Avocado
アマ		Flax
アマチャ	甘茶	Amacha
アマチャヅル		Amachazuru
アミガサユリ		Amigasayuri
アミリス		Amyris
アーモンド		Almond
アリタソウ		Aritaso
アルカンナ		Alkanet
アルテミシア		Artemisia
アルニカ		Arnica
アルファルファ		Alfalfa
アロエ		Aloe
アロニア		Chokeberry
アンゴスツラ		Angostura
アンゴラウィード		Angola weed
アンズ	アプリコット	Apricot
アンズタケ		Anzutake, Chanterelle
アンゼリカ	アンゲリカ	Angelica
アンバー		Amber
アンバーグリス	竜涎香	Ambergris
アンブレット		Ambrette
イカ		Squid
イカリソウ		Ikariso
イグサ		Rush
イースト	酵母	Yeasts
イタドリ		Itadori
イチゴ	ストロベリー	Strawberry
イチゴノキ	ストロベリーツリー	Strawberry tree
イチジク	フィグ	Fig
イチョウ		Ginkgo, Gingko
イヌゴマ	ベトニー	Betony
イノコヅチ		Inokozuchi
イランイラン		Ylang-ylang
イワオウギ		Iwaohgi
インペラトリア		Imperatoria
インモルテル		Immortelle, Everlasting flower
ウィンターグリーン		Wintergreen
ウォータークレス	オランダガラシ	Water cress
ウコギ		Ukogi
ウコン	ターメリック	Turmeric
ウスバサイシン		Usubasaishin
ウッドラフ	クルマバソウ	Woodruff
ウニ		Sea urchin
ウメ		Ume, Japanese apricot
ウーロンチャ		Oolong tea
エゴマ		Egoma
エノキダケ		Enokidake
エビ		Lobster, Prawn, Shrimp
エビスグサ		Ebisugusa
エリゲロン		Erigeron
エルダー	セイヨウニワトコ	Elder
エレウテロコック		Eleutherococcus
エレカンペン		Elecampane

基原物質名	別 名	備 考
エレミ		Elemi
エンゴサク		Engosaku
エンジュ		Enju, Japanese-pagoda-tree
エンダイブ	キクヂシャ	Endive
欧州アザミ		Blessed thistle
オウレン		Goldthread
オオアザミ		Milk thistle
オオバコ	プランテン	Plantain
オカゼリ		Cnidium fruit
オキアミ		Krill
オーク		Oak
オークモス		Oak moss
オケラ		Okera
オスマンサス	モクセイ	Osmanthus
オポポナックス		Opoponax
オミナエシ		Ominaeshi
オモダカ		Sagiomodaka
オランダセンニチ		Para cress
オリガナム		Origanum
オリス		Orris
オリバナム	乳香	Olibanum
オリーブ		Olive
オールスパイス		Allspice
オレンジ		Orange
オレンジフラワー		Orange flower
カイ	貝	Shellfish
海藻	シーウィード	Seaweed
カイニンソウ		Kaininso
カカオ	ココア	Cacao
カキ	柿	Japanese persimmon
カサイ	果菜	Fruit vegetables
カシューナッツ		Cashew nut
カスカラ		Cascara
カスカリラ		Cascarilla
カストリウム	海狸香	Castoreum
カタクリ		Katakuri
カツオブシ		Dried bonito
カッシー		Cassie
カッシャフィスチュラ		Purging cassia
カテキュ		Catechu
カニ		Crab
カーネーション		Carnation
カノコソウ		Valerian
カモミル		Camomile
カヤプテ		Cajeput, Cajuput
カラクサケマン		Fumitory
カラシ	マスタード	Mustard
カラスウリ		Karasuuri
カラスビシャク		Karasubishaku, Dragon root
ガラナ		Guarana
カラバッシュナツメグ		Calabash nutmeg
カラマンシー	シキキツ	Calamondin
カラミント		Calamint
カラムス		Calamus
ガランガ		Galanga
カーラント		Currant
カリッサ		Carissa, Karanda
カリン		Chinese quince
カルダモン	ショウズク	Cardamon
ガルバナム		Galbanum
カレー		Curry powder
カレーリーフ	カリーリーフ	Curry leaf
カワミドリ		Kawamidori
カンゾウ	リコリス	Licorice
ガンビア		Gambir
カンラン		Chinese olive
キウィーフルーツ		Kiwifruit
キカイガラタケ		Kikaigaratake
キキョウ		Kikyo, Baloon flower
キク		Chrysanthemum
キクラゲ		Kikurage, Jew's-ear

基原物質名	別 名	備 考
キササゲ		Kisasage
ギシギシ		Gishigishi, Dock
キダチアロエ		Kidachi aloe
キナ		Cinchona
キハダ		Kihada
キバナオウギ		Kibanaohgi
ギボウシ		Giboshi
ギムネマシルベスタ		Gymnema sylvestre
キャットニップ	イヌハッカ	Catnip
キャラウェイ	ヒメウイキョウ	Caraway
キャロブ	イナゴマメ、カロブ	Carob, Locust bean
キュウリ	キューカンバー	Cucumber
キラヤ		Quillaja, Quillaia
キンミズヒキ		Agrimony
グァバ		Guava
グァヤク		Guaiacum
クコ		Kuko
クサスギカズラ		Kusasugikazura
クサボケ	シドミ	Kusaboke, Dwarf Japanese quince
クズ		Kuzu, Thunberg kudzu vine
クスノキ		Camphor tree
クスノハガシワ		Kamala
グーズベリー		Gooseberry
クチナシ	ガーデニア	Gardenia
クベバ		Cubeb
クマコケモモ		Bearberry
グミ		Gumi, Oleaster
クミン		Cumin
グラウンドアイビー	カキドウシ	Ground ivy
クララ	クサエンジュ	Kurara
クラリセージ		Clary sage
クランベリー		Cranberry
クリ	チェスナッツ	Chestnut
クルミ	ウォルナッツ	Walnut
クリーム		Cream
グレインオブパラダイス		Grains of paradise
クレタディタニー		Dittany of Crete
グレープフルーツ		Grapefruit
クローバー		Clover
クローブ		Clove
クロモジ		Kuromoji
クロレラ		Chlorella
クワ	マルベリー	Mulberry
クワッシャ	ニガキ	Quassia
ケイパー	ケーパー	Caper
ゲットウ	月桃	Getto
ケード		Cade
ケブラコ		Quebracho
ゲルマンダー		Germander
ケンチュール		Kencur
ケンポナシ		Kenponashi, Japanese raisin tree
ゲンノショウコ	フウロソウ	Gennoshoko
コウジ		Koji
コウタケ		Koutake
コウチャ	紅茶	Black tea
コウホネ		Kohone
コカ		Coca
コガネバナ		Koganebana
コクトウ	黒糖	Brown sugar
コクルイ	穀類	Cereals
ココナッツ	ココヤシ	Coconut
コゴメグサ	アイブライト	Eyebright
ゴシュユ		Goshuyu
コショウ	ペパー	Pepper
コスタス		Costus
コストマリー		Costmary
コパイバ		Copaiba
コーヒー		Coffee
コブシ	ヤマモクレン	Kobushi
ゴボウ		Burdock
ゴマ	セサミ	Sesame

基原物質名	別 名	備 考
コーラ		Cola
コリアンダー	コエンドロ	Coriander
コルツフート	フキタンポポ	Coltsfoot
ゴールデンロッド		Golden rod
コロンボ		Colombo
コンサイ	根菜	Root and tuber vegetables
コンズランゴ		Kondurango
コンブ		Kombu kelp
コンフリー		Comfrey
サイプレス	イトスギ、シプレス	Cypress
魚	フィッシュ	Fish
サクラ		Cherry tree
サクランボ	チェリー	Cherry
ザクロ	グレナディン	Common pomegranate
サケカス	酒粕	Pressed sake cake
ササ		Sasa, Bamboo grass
ササクサ		Sasakusa
サーチ		Sea buckthorn
サッサフラス		Sassafras
サフラン		Saffron
サポジラ		Sapodilla
サボテン		Cactus
サラシナショウマ		Sarashinashoma
サルサパリラ		Sarsaparilla
サルシファイ	セイヨウゴボウ	Salsify
サルノコシカケ		Sarunokoshikake
サンザシ	ホウソーン	Hawthorn
サンシュユ		Sanshuyu
サンショウ		Japanese pepper
サンタハーブ		Santa herb
サンダラック		Sandarac
サンダルウッド	ビャクダン	Sandalwood
サンダルレッド	シタン	Red sandalwood
シイタケ		Shiitake
ジェネ	エニシダ	Genet
シソ		Perilla
シダー	セダー	Cedar
シトラス	カンキツ	Citrus
シトロネラ		Citronella
シヌス		Schinus molle
シベット	霊猫香	Civet
シマルーバ		Simarouba
シメジ		Shimeji
シャクヤク		Shakuyaku, Chinese peony
ジャスミン		Jasmin
ジャノヒゲ		Janohige
ジャボランジ	ヤボランジ	Jaborandi
シャロット		Shallot
シュクシャ		Shukusha
ジュウニヒトエ	ビューグル	Bugle
ジュニパーベリー	ネズ	Juniper berry
ショウガ	ジンジャー	Ginger
ショウユ		Soy sauce
ショウユカス		Pressed soy sauce cake
ジョウリュウシュ	蒸留酒	Spirits
ショウロ		Shoro
シルバーウィード		Silver weed
シロタモギタケ	ブナシメジ	Elm-mushroom
ジンセン	高麗ニンジン	Ginseng
シンナモン	シナモン	Cinnamon
酢	ビネガー	Vinegar
スイカ	ウォーターメロン	Watermelon
スイセン	ナルシス	Narcissus
スギ		Sugi, Peacock pine
スターアニス	ダイウイキョウ	Star anise
スターフルーツ	キャランボラ	Starfruit, Carambora
スチラックス		Styrax
スッポン		Suppon, Snapping turtle
スッポンタケ		Suppontake
ズドラベッツ		Zdravetz
スネークルート		Snakeroot, Serpentary

基原物質名	別 名	備 考
スパイクナード		Spikenard
スピンネル		Spignel
スプルース	ヘムロック	Spruce
スペアミント	ミドリハッカ	Spearmint
スベリヒユ		Suberihiyu, Pigweed
スローベリー		Sloe berry
セイボリー	キダチハッカ	Savory
セイヨウダイコンソウ		Avens, Herb bennet
セイヨウナナカマド		Rowan tree, European mountain ash
セキショウ		Sekisho
セージ		Sage
ゼドアリー		Zedoary
セネガ		Senega
ゼラニウム		Geranium
セロリー		Celery
センキュウ		Senkyu
センタウリア		Centaury
センダン		Sendan
セントジョーンズウォルト	セイヨウオトギリソウ	St.John's wort
センナ		Senna
ソース		Sauces
ダイオウ	ルバーブ	Rhubarb
ダイズ	大豆	Soybeans
タイム	タチジャコウソウ	Thyme
タケノコ		Bamboo shoot
タコ		Octopus
タデ		Tade, Water pepper
ダバナ		Davana
タマゴ	エッグ	Egg
タマゴタケ		Royal agaric
タマネギ	オニオン	Onion
タマリンド		Tamarind
ダミアナ		Damiana
タモギタケ	ヒメヒラタケ	Tamogitake
タラゴン	エストラゴン	Tarragon
タラノキ		Tara, Angelica tree
タンジー	ヨモギギク	Tansy
タンジェリン	マンダリン	Tangerine, Mandarin
タンポポ	ダンデリオン	Dandelion
チェリモラ	チェリモヤ	Cherimoya
チェリーローレル		Cherry laurel
チェリーワイルド		Wild cherry
チガヤ		Chigaya
チコリ		Chicory
チーズ		Cheese
チチタケ		Chichitake
チャイブ		Chive
チャービル		Chervil
チャンパカ		Champac
チュベローズ	月下香	Tuberose
チョウセンゴミシ		Chosengomishi
チラータ		Chirata
ツクシ		Tsukushi, Fern-ally
ツケモノ	漬物	Pickled products
ツタ		Ivy
ツバキ	カメリア	Camellia
ツユクサ		Tsuyukusa
ツリガネニンジン		Tsuriganeninjin
ツルドクダミ		Tsurudokudami
ディアタング	リアトリス	Deertongue
ティスル	キバナアザミ	Thistle
ディタニー		Dittany
ディル	イノンド	Dill
デーツ	ナツメヤシ	Date palm
テンダイウヤク		Lindera root
テンマ		Tenma
テンリョウチャ		Tenryocha
トウガラシ	カプシカム	Capsicum
トウキ		Toki
ドウショクブツタンパクシツ	動植物蛋白質	Proteins
ドウショクブツユシ	動植物油脂	Oil and fats

基原物質名	別 名	備 考
トウミツ	糖蜜、モラセス	Molasses
トウモロコシ	コーン	Maize
ドクダミ		Dokudami
トチュウ		Tochu
ドッググラス		Dog grass, Couch grass
トマト		Tomato
ドラゴンブラッド		Doragon's blood
ドリアン		Durian
トリュフ		Truffle
トルーバルサム		Tolu balsam
トンカ	トンコ	Tonka beans
ナギナタコウジュ		Naginatakoju
ナシ	ペア	Pear
ナスターシャム		Common nasturtium
ナッツ		Nut
ナットウ	納豆	Natto
ナツメ		Jujube
ナツメグ	ニクヅク、メース	Nutmeg, Mace
ナデシコ		Nadeshiko
ナメコ		Nameko
ナラタケ		Naratake
ナンテン		Nanten
ニアウリ		Ti-tree
ニュウサンキンバイヨウエキ	乳酸菌培養液	Cultured lactic acid bacteria solution
ニレ	エルム	Elm
ニンジン	キャロット	Carrot
ニンニク	ガーリック	Garlic
ネズミモチ		Nezumimochi
ネットル	イラクサ	Nettle
ネムノキ		Nemunoki, Silk tree
ノットグラス	ニワヤナギ	Knotgrass
ノリ	海苔	Nori, Laver
バイオレット	スミレ	Violet
パイナップル		Pineapple
ハイビスカス	ローゼル	Hibiscus. Roselle
麦芽	モルト	Malt
ハコベ		Hakobe, Common chickweed
バシクルモン		Basikurumon
バジル	メボウキ	Basil
ハス		Lotus
ハスカップ		Hasukappu
パースニップ	アメリカボウフウ	Parsnip
パセリ	オランダゼリ	Parsley
バター		Butter
バターオイル		Butter oil
バターミルク		Butter milk
バーチ	カバノキ	Birch
ハチミツ	ハネー	Honey
パチュリー	パチョリ	Patchouli
ハッカ		Corn-mint, Japanese mint
バックビーン		Buckbeans
ハッコウシュ	発酵酒	Fermented alcoholic beverages
ハッコウニュウ	発酵乳	Fermented milk
ハッコウミエキ	発酵味液	Fermented seasoning solution
パッションフルーツ	クダモノトケイソウ	Passion fruit
ハツタケ		Hatsutake
バッファローベリー		Buffaloberry
ハトムギ		Job's tears
ハナスゲ		Hanasuge
バナナ		Banana
バニラ	ワニラ	Vanilla
ハネーサックル	スイカズラ	Honeysuckle
パパイヤ		Papaya
バーベリー	メギ	Barberry
ハマゴウ		Hamago
ハマスゲ		Hamasuge
ハマナス		Hamanasu, Rugosa rose
ハマボウフウ		Hamabofu
ハマメリス		Winter bloom
バラ	ローズ	Rose

基原物質名	別 名	備 考
パルマローザ		Palmarosa
パンダナ		Pandanus
バンレイシ	シャカトウ	Sugar apple, Sweet sop
ヒキオコシ		Hikiokoshi
ヒシ		Hishi, Water chestnut
ピスタチオ		Pistachio
ヒソップ	ヤナギハッカ	Hyssop
ヒッコリー		Hickory
ピーナッツ	ラッカセイ	Peanut
ヒノキ		Hinoki
ヒバ		Hiba
ピプシシワ		Common popsissewa
ヒマワリ		Sunflower
ヒメハギ		Himehagi
ヒヤシンス		Hyacinth
ヒヨドリバナ		Eupatorium
ヒラタケ		Hiratake
ビワ		Biwa, Loquat
ピンピネラ		Burnet
ビンロウ		Areca nut, Betel nut
フェイジョア		Feijoa, Pineapple guava
フェネグリーク	コロハ	Fenugreek
フェンネル	ショウウイキョウ	Fennel
フジバカマ		Fujibakama
フジモドキ		Fujimodoki
フスマ		Bran
フーゼル油		Fusel oil
プチグレイン		Petitgrain
ブチュ	ブッコ	Buchu
ブドウ	グレープ	Grape
ブドウサケカス	ブドウ酒粕	Wine lees
フトモモ		Rose apple
ブナ		Beech
ブナハリタケ		Bunaharitake
ブラックキャラウェイ	ニジェラ	Black caraway, Nigella
ブラックベリー		Blackberry
プラム	スモモ	Plum
ブリオニア		Bryonia
プリックリーアッシュ	アメリカサンショウ	Prickly ash
プリムローズ	サクラソウ	Primrose
プルネラ	ウツボグサ	Prunella, Self-heal
ブルーベリー		Blueberry
ブレッドフルーツ	パンノキ	Breadfruit
ヘイ		Hay
ベイ		Bay
ヘーゼルナッツ	ハシバミ	Hazelnut
ヘザー	ヒース	Heather
ベチバー	ベチベルソウ	Vetiver
ベーテル	キンマ	Betel
ベニノキ		Annatto
ベニバナ	サフラワー	Safflower
ペニーロイヤル	メグサハッカ	Pennyroyal
ペパーミント	セイヨウハッカ	Peppermint
ヘビ		Snake
ペピーノ		Pepino
ペプトン		Peptone
ペリトリー		Pellitory
ベルガモット		Bergamot
ベルガモットミント		Bergamot mint
ペルーバルサム		Peru balsam
ベルベナ	バーベナ、ベルベイン	Verbena, Vervain
ベロニカ		Veronica
ベンゾイン	安息香	Benzoin
ヘンナ		Henna
ボアドローズ	ローズウッド	Rosewood
ホアハウンド	ニガハッカ	Hoarhound
ホウ		Haw
ホウキタケ		Houkitake
ホウショウ	芳樟	Houshou
ボウフウ		Saposhinikovia root
ホエイ		Whey

基原物質名	別 名	備 考
ホオノキ		Honoki
ホースミント	ヤグルマハッカ	Horsemint
ホースラディッシュ	セイヨウワサビ、ワサビダイコン	Horseradish
ボタン		Moutan bark
ホップ		Hop
ポピー		Poppy
ポプラ		Poplar
ポポー		Papaw
ホホバ		Jojoba
ホヤ		Sea squirt
ボルドー		Boldo
ボロニア		Boronia
マイタケ		Maitake
マグウォルト		Mugwort
マシュマロー	ウスベニタチアオイ	Marshmallow
マジョラム	マヨラナ	Marjoram
マスティック		Mastic
マソイ		Massoi
マタタビ		Matatabi, Silver vine
マチコ		Matico
マツ	パイン	Pine
マツオウジ		Matsuoji
マッシュルーム		Mushroom
マツタケ		Matsutake
マツブサ		Matusbusa
マツホド		Matsuhodo
マテチャ	マテ	Mate tea
マメ		Beans
マリーゴールド		Marigold
マルバダイオウ	食用ダイオウ	Garden rhubarb, Edible rhubarb
マルメロ	クインス	Quince
マレイン		Mullein
マロー	ゼニアオイ	Mallow
マンゴー		Mango
マンゴスチン		Mangosteen
マンナノキ		Manna ash
ミカン		Mikan
ミシマサイコ		Mishimasaiko
ミソ	味噌	Miso, Soybean paste
ミツマタ		Mitsumata
ミツロウ	オウロウ、 ビースワックス 、ベースワックス	Bees wax
ミート	肉	Meat
ミモザ		Mimosa
ミョウガ		Myoga
ミルク		Milk
ミルテ		Myrtle
ミルフォイル	セイヨウノコギリソウ	Milfoil
ミルラ	没薬	Myrrh
ミロバラン		Myrobalan
ムカゴニンジン	スキレット	Skirret
ムギチャ	ムギ茶	Roasted barley
ムスク		Musk
ムラサキ		Murasaki, Gromwell
メスキート		Mesquite
メドウスィート	シモツケソウ	Meadowsweet
メハジキ		Mehajiki
メープル	サトウカエデ	Maple
メリッサ	バーム	Melissa, Balm
メリロット		Melilot
メロン		Melon
モウセンゴケ		Sundew
モニリアバイヨウエキ	モニリア培養液	Cultured Moniliaceae solution
モミノキ	ファー	Fir
モモ	ピーチ	Peach
モロヘイヤ		Jew's mallow
ヤクチ		Yakuchi
ヤドリギ		Mistletoe
ヤマブシタケ		Yamabushitake
ヤマモモ		Chinese bayberry
ユーカリ		Eucalyptus

基原物質名	別 名	備 考
ユキノシタ		Yukinoshita
ユズ		Yuzu
ユッカ		Yucca
ユリ	リリー	Lily
ヨウサイ	葉菜	Leaf vegetables
ヨロイグサ		Yoroigusa
ライオンズフート		Lion's foot
ライチ		Litchi
ライフエバーラスティングフラワー		Life-everlasting flower
ライム		Lime
ライラック	リラ	Lilac
ラカンカ		Rakanka, Lo han kuo
ラカンショウ		Long-leaved podocarp
ラズベリー		Raspberry
ラタニア		Rhatany
ラディッシュ	ハツカダイコン	Radish
ラブダナム	システ	Labdanum, Ciste
ラベンダー		Lavender
ラングウォルト		Lungwort
ラングモス		Lungmoss
ランブータン		Ramboutan
リキュール		Liqueur
リーク		Leek
リツェア	タイワンヤマクロモジ	Litsea
リナロエ		Linaloe
リュウガン		Longan
リュウゼツラン		Century plant
リョウフンソウ		Ryofunso
リョクチャ	緑茶	Green tea
リンゴ	アップル	Apple
リンデン	ボダイジュ	Linden
リンドウ		Gentian
ルー	ヘンルーダ	Rue
ルリジサ		Borage
レセダ	モクセイソウ	Reseda
レモン		Lemon
レモングラス		Lemongrass
レンギョウ		Rengyo
レンゲ		Renge
レンブ		Wax jambu, Mankil
ローズマリー	マンネンロウ	Rosemary
ロベージ		Lovage
ローレル	ゲッケイジュ	Laurel
ロンゴザ		Longose
ワサビ		Wasabi
ワスレナグサ		Forger me not, Mouse ears
ワタフジウツギ		Watafujiutsugi
ワームウッド	ニガヨモギ	Wormwood
ワームシード		Wormseed
ワラビ		Warabi, Eagle fern
ワレモコウ		Waremoko, Garden burnet

別添　添加物２－３

一般に食品として飲食に供されている物であって
添加物として使用される品目リスト

品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
名称	別名				
アカキャベツ色素	ムラサキキャベツ色素	アカキャベツ アントシアニン アントシアニン色素 野菜色素	※	着色料	Red Cabbage Color
アカゴメ色素		アカゴメ アントシアニン アントシアニン色素	イネ科イネ（Oryza sativa LINNE）の赤い種子（赤米）より、温時水、弱酸性水溶液又は含水エタノールで抽出して得られたものである。主色素はシアニジン-3-グルコシド等である。赤色を呈する。	着色料	Red rice colour
アカダイコン色素		アカダイコン アントシアニン アントシアニン色素 野菜色素	アブラナ科ダイコン（Raphanus sativus LINNE）の赤紫の根（赤ダイコン）より、室温時水、弱酸性水溶液又は含水エタノールで抽出して得られたものである。主色素はペラルゴニジンアシルグリコシドである。	着色料	Red radish colour
アズキ色素		アズキ	マメ科アズキ（Azukia angularis OHWI）の種子より水で抽出して得られたもの、又はこれを乾燥したものである。赤色を呈する。	着色料	Azuki colour
アマチャ抽出物	アマチャエキス	アマチャ	ユキノシタ科アマチャ（Hydrangea macrophylla SER. var.thungbergii MAKINO）の葉より、水で抽出して得られたものである。甘味成分はフィロズルシンである。	甘味料	Amacha extract Hydrangea leaves extract
イカスミ色素		イカ墨	コウイカ科モンゴウイカ（Sepia officinalis LINNAEUS）等の墨袋の内容物を水洗いしたものより、弱酸性含水エタノール及び含水エタノールで洗浄し、乾燥したものである。主色素はユーメラニンである。黒色を呈する。	着色料	Sepia colour
ウグイスカグラ色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	スイカズラ科クロミノウグイスカグラ（Lonicera caerulea LINNE var.emphyllocalyx NAKAI）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～青色を呈する。	着色料	Uguisukagura colour
ウコン	ターメリック			着色料	Turmeric
エタノール	エチルアルコール	アルコール 酒精	デンプン、糖蜜を原料とし、糖化、発酵後、蒸留して得られたものである。成分は専売法による発酵アルコールである。	製造用剤	Ethanol
エルダーベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	スイカズラ科エルダーベリー（Sambucus caerulea RAFIN., Sambucus canadensis LINNE, Sambucus nigra LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は室温時～微温時水若しくは酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素は、シアニジングリコシド、デルフィニジングリコシドである。赤色～青色を呈する。	着色料	Elderberry colour
オクラ抽出物			アオイ科オクラ（Abelmoschus escaulentus MOENCH）のさやより、水で抽出して得られた粘質物である。	増粘安定剤	Okra extract
オリーブ茶			モクセイ科オリーブ（Olea europaea LINNE）の葉より、茶と同様の製法により製したものである。	着色料 苦味料等	Olive tea
海藻セルロース		セルロース	海藻を、乾燥、粉砕して得られたセルロースである。	増粘安定剤	Seaweed cellulose
カウベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	ツツジ科コケモモ（Vaccinium Vitis-Idaea LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はシアニジングリコシド及びデルフィニジングリコシドである。赤色～青色を呈する。	着色料	Cowberry colour
果汁	フルーツジュース			着色料	Fruit juice
ウグイスカグラ果汁	ウグイスカグラジュース				Uguisukagura juice
エルダーベリー果汁	エルダーベリージュース				Elderberry juice
オレンジ果汁	オレンジジュース				Orange juice
カウベリー果汁	カウベリージュース				Cowberry juice
グースベリー果汁	グースベリージュース				Gooseberry juice
クランベリー果汁	クランベリージュース				Cranberry juice
サーモンベリー果汁	サーモンベリージュース				Salmonberry juice

品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
名称	別名				
ストロベリー果汁	ストロベリージュース				Strawberry juice
ダークスィートチェリー果汁	ダークスィートチェリージュース				Dark sweet cherry juice
チェリー果汁	チェリージュース				Cherry juice
チンブルベリー果汁	スィムブルベリージュース				Thimbleberry juice
デュベリー果汁	デュベリージュース				Dewberry juice
パイナップル果汁	パイナップルジュース				Pineapple juice
ハクルベリー果汁	ハクルベリージュース				Huckleberry juice
ブドウ果汁	ブドウジュース、グレープ果汁、グレープジュース				Grape juice
ブラックカーラント果汁	ブラックカーラントジュース				Black currant juice
ブラックベリー果汁	ブラックベリージュース				Blackberry juice
プラム果汁	プラムジュース				Plum juice
ブルーベリー果汁	ブルーベリージュース				Blueberry juice
ベリー果汁	ベリージュース				Berry juice
ボイセンベリー果汁	ボイセンベリージュース				Boysenberry juice
ホワートルベリー果汁	ホワートルベリージュース				Whortleberry juice
マルベリー果汁	マルベリージュース				Mulberry juice
モレロチェリー果汁	モレロチェリージュース				Morello cherry juice
ラズベリー果汁	ラズベリージュース				Raspberry juice
レッドカーラント果汁	レッドカーラントジュース				Red currant juice
レモン果汁	レモンジュース				Lemon juice
ローガンベリー果汁	ローガンベリージュース				Loganberry juice
カゼイン	酸カゼイン	乳たん白	※	製造用剤	Casein
褐藻抽出物	褐藻粘質物		アラメ、オキナワモズク、コンブ又はワカメより、水で抽出して得られたものである。成分はポリウロン酸及び硫酸多糖である。	増粘安定剤	Kelp extract
カンゾウ末		カンゾウ	マメ科ウラルカンゾウ（Glycyrrhiza uralensis FISCHER）、マメ科チョウカカンゾウ（Glycyrrhiza inflata BATALIN）又は、マメ科ヨウカンゾウ（Glycyrrhiza glabra LINNE）の根茎を粉砕したものである。甘味成分はグリチルリチン酸である。	甘味料	Powdered licorice
寒天				製造用剤	Agar
グーズベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	ユキノシタ科グースベリー（Ribes grossularia LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～青色を呈する。	着色料	Gooseberry colour
クランベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	ツツジ科クランベリー（Oxycoccus macrocarpus PERS.）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はシアニジングリコシド、ペラルゴニジングリコシドである。赤色～青色を呈する。	着色料	Cranberry colour
グルテン				増粘安定剤	Gluten
グルテン分解物				増粘安定剤	Gluten decomposites
クロレラ抽出液		クロレラエキス	緑藻類クロレラ（Chlorella）を、熱時水で抽出後、濃縮、精製して得られたものである。	調味料 製造用剤	Chlorella extract
クロレラ末			緑藻類クロレラ（Chlorella）を、乾燥し、粉末化したものである。	着色料	Powdered chlorella
ココア	ココアパウダー			着色料	Cocoa
小麦粉				製造用剤	Wheat flour

品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
名称	別名				
コムギ抽出物			イネ科コムギ（Triticum aestivum LINNE）の種子（玄麦）を、ばい煎後、熱時水で抽出して得られたものである。	製造用剤	Wheat extract
コラーゲン				製造用剤	Collagen
コンニャクイモ抽出物	グルコマンナン		サトイモ科コンニャク（Amorphophallus konjac）の根茎を、乾燥、粉砕後、含水エタノールで洗浄して得られたもの、又はこれを冷時～温時水で抽出して得られたもので、グルコースとマンノースで構成される多糖類からなる。	増粘安定剤 製造用剤	Konjac extract
サツマイモセルロース		セルロース	ヒルガオ科サツマイモ（Ipomoea batatas POIR.）の塊根より得られたものである。主成分はセルロースである。	製造用剤 増粘安定剤	Sweetpotato cellulose
サフラン				着色料	Saffron
サフラン色素		カロチノイド カロチノイド色素 カロテノイド カロテノイド色素 クロシン サフラン	アヤメ科サフラン（Crocus sativus LINNE）の雌芯頭より、エタノールで抽出して得られたものである。主色素は、カロテノイド系のクロシン、クロセチンである。黄色を呈する。	着色料	Saffron colour
サーモンベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科サーモンベリー（Rubus spectabilis PURSH.）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～青色を呈する。	着色料	Salmonberry colour
シソ色素		アントシアニン アントシアニン色素 野菜色素	シソ科シソ（Perilla frutescens BRITT. var.acuta KUDO）の葉より、室温時水、弱酸性水溶液又は含水エタノールで抽出して得られたものである。主色素は、シソニン、マロニルシソニンである。赤色～赤紫色を呈する。	着色料	Beefsteak plant colour Perilla colour
ストロベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科オランダイチゴ（Fragaria ananassa DUCHESNE）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素は、シアニジングリコシド、ペラルゴニジングリコシドである。赤色～青色を呈する。	着色料	Strawberry colour
ゼラチン				製造用剤	Gelatin
ダイズ多糖類	ダイズヘミセルロース		マメ科ダイズ（Glycine max MERRILL）の種子から得られた多糖類である。主成分はヘミセルロースである。	製造用剤 増粘安定剤	Soybean polysaccharides
ダイダイ抽出物			ミカン科ダイダイ（Citrus aurantium LINNE）の果皮より、エタノールで抽出して得られたものである。主成分はリモニンである。	苦味料等	Daidai extract
ダークスィートチェリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 チェリー色素	バラ科セイヨウミザクラ（Prunus avium LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は室温時～温時水若しくは弱酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～赤紫色を呈する。	着色料	Dark sweet cherry colour
チェリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素	バラ科カラミザクラ（Prunus pauciflora BUNGE）の果実より、搾汁したもの、又は室温時～温時水若しくは弱酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素はシアニジングリコシドである。赤色～赤紫色を呈する。	着色料	Cherry colour
チコリ色素		チコリ 野菜色素	キク科キクニガナ（Cichorium intybus LINNE）の根をばい煎したものより、温時水で抽出して得られたものである。黄褐色を呈する。	着色料	Chicory colour
茶		抹茶		着色料	Tea
チンブルベリー色素	スィムブルベリー色素	アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科クロミキイチゴ（Robus occidentalis LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～青色を呈する。	着色料	Thimbleberry colour
デュベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科オオナワシロイチゴ（Rubus caesius LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～青色を呈する。	着色料	European dewberry colour
トウモロコシセルロース	コーンセルロース	セルロース	イネ科トウモロコシ（Zea mays LINNE）の種皮から得られたものである。主成分はセルロース、ヘミセルロース及びリグニンである。	製造用剤	Corn cellulose
ナタデココ	醸造セルロース 発酵セルロース	セルロース		増粘安定剤 製造用剤	Fermentation-derived cellulose
乳酸菌濃縮物		乳酸菌	乳酸菌を培養した後、集菌、濃縮し、凍結又は乾燥したものである。	酵素	Lactic acid bacteria concentrates

品名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用途	備考
名称	別名				
ノリ色素	海苔色素		ウシケノリ科アマノリ（Porphyra tenera KJELLM.）の葉より、温時水又は弱酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素はフィコエリトリンである。桃色～赤色を呈する。	着色料	Laver colour
ハイビスカス色素	ローゼル色素	アントシアニン アントシアニン色素 ローゼル	アオイ科ローゼル（Hibiscus sabdariffa LINNE）の花弁及び萼部より、室温時水で抽出して得られたものである。主色素はデルフィニジン-3-サンブビオシド等である。赤色～紫赤色を呈する。	着色料	Hibiscus colour
麦芽抽出物	麦芽エキス	モルトエキス	イネ科オオムギ（Hordeum vulgare LINNE）の麦芽又はこれを焙煎したものを室温時～温時水で抽出して得られたものである。	着色料	Malt extract
ハクルベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	ツツジ科ブラックハクルベリー（Gaylussacia baccata C.KOCH.）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～青色を呈する。	着色料	Black huckleberry colour
パプリカ粉末				着色料	Paprika
ブドウ果汁色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ブドウ色素	ブドウ科アメリカブドウ（Vitis Labrusca LINNE）又はブドウ科ブドウ（Vitis vinifera LINNE）の果実より、搾汁し、沈殿を除去して得られたものである。主色素はマルビジン-3-グルコシド等である。赤色～赤紫色を呈する。	着色料	Grape juice colour
ブラックカーラント色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	※	着色料	Black Currant Color
ブラツクベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科ヨーロッパブラックベリー（Rubus fruticosus LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はシアニジングリコシドである。赤色～青色を呈する。	着色料	Black berry colour
プラム色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素	バラ科プラム（Prunus domestica LINNE）の果実より、エタノールで抽出して得られたものである。主色素はシアニジングルコシド等である。赤色～赤紫色を呈する。	着色料	Plum colour
ブルーベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	ツツジ科ハイブッシュブルーベリー（Vaccinium corymbosum LINNE）又はツツジ科ローシィートブルーベリー（Vaccinium angustifolium AIT.）の果実より、搾汁したもの、又は室温時～微温時水若しくは弱酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素はアントシアニンである。赤色～青色を呈する。	着色料	Blueberry colour
ボイセンベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科エゾイチゴ（Rubus strigosus MICHX.）の果実より、搾汁したもの、又は室温時～微温時水若しくは弱酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素はシアニジン-3-グルコシド等である。赤色～青色を呈する。	着色料	American red raspberry colour Boysenberry colour
ホエイソルト	乳清ミネラル ホエイミネラル		乳清（チーズホエイ）より、乳清タンパクと乳糖を分離除去し、精製して得られたものである。成分は、カリウム、カルシウム、ナトリウム等の塩類である。	調味料	Whey salt Whey mineral
ホップ抽出物	ホップエキス	ホップ		苦味料等	Hop extract
ホワートルベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素 ビルベリー色素	ツツジ科ホワートルベリー（Vaccinium myrtillus LINNE）の果実より、搾汁したもの、水若しくはエタノールで抽出して得られたもの、又は室温時メタノールで抽出し、溶媒を除去したものである。主色素はマルビジングルコシド等である。赤色～青色を呈する。	着色料	Whortleberry colour
マルベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	クワ科ブラックマルベリー（Morus nigra LINNE）又はクワ科ホワイトマルベリー（Morus alba LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はシアニジングルコシド等である。赤色～青色を呈する。	着色料	Mulberry colour
マンナン				増粘安定剤	Mannan
モレロチェリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 チェリー色素	バラ科モレロチェリー（Prunus cerasus LINNE var.austera LINNE）の果実より、室温時～温時エタノールで抽出して得られたものである。主色素はシアニジングリコシルルチノシド等である。赤色～赤紫色を呈す。	着色料	Morello cherry colour
野菜ジュース アカキャベツジュース	ベジタブルジュース			着色料	Vegetable juice Red cabbage juice

品 名		簡略名又は類別名	基原・製法・本質	用 途	備 考
名 称	別 名				
アカビートジュース シソジュース タマネギジュース トマトジュース ニンジンジュース					Beet red juice Beefsteak plant juice Onion juice Tomato juice Carrot juice
ヨモギ抽出物			キク科ヨモギ（Artemisia princeps PAMPAN.）の茎又は葉より、水又はエタノールで抽出して得られたものである。主成分はカフェタンニン及び精油類である。	苦味料等	Mugwort extract
ラズベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科セイヨウキイチゴ（Rubus Idaeus LINNE）の果実より、搾汁したもの、又は室温時～微温時水若しくは弱酸性水溶液で抽出して得られたものである。主色素はシアニジングリコシドである。赤色～青色を呈する。	着色料	Raspberry colour
卵白				製造用剤	Egg white
レッドカーラント色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	ユキノシタ科アカスグリ（Ribes sativum SYME.）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素は、ペラルゴニジンガラクトシド、ペチュニジンガラクトシド等である。赤色～青色を呈する。	着色料	Red currant colour
レンネツトカゼイン		カゼイン 乳たん白		増粘安定剤	Rennet casein
ローガンベリー色素		アントシアニン アントシアニン色素 果実色素 ベリー色素	バラ科ローガンベリー（Rubus loganobaccus BAILEY）の果実より、搾汁したもの、又は水で抽出して得られたものである。主色素はシアニジングリコシドである。赤色～青色を呈する。	着色料	Loganberry colour

※食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）第２添加物の部D成分規格・保存基準各条の規定に従う。

別添　栄養成分等の分析方法等

通則 1
１　たんぱく質 4
（１）　窒素定量換算法 4
１）　ケルダール法 5
２）　燃焼法 7
２　脂質 8
（１）　ゲルベル法 9
（２）　溶媒抽出－重量法 10
１）　エーテル抽出法 10
２）　クロロホルム・メタノール混液抽出法 13
３）　酸分解法 14
４）　レーゼゴットリーブ法 16
５）　酸・アンモニア分解法 18
６）　ヘキサン－イソプロパノール法 20
３　飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸 21
（１）　ガスクロマトグラフ法 21
１）　脂質の抽出Ⅰ（けん化法） 22
２）　脂質の抽出Ⅱ（酸分解法） 23
３）　脂肪酸メチルエステルの調製 24
４）　ガスクロマトグラフィー 25
４　コレステロール 27
（１）　ガスクロマトグラフ法 27
５　炭水化物 30
ア　灰分 31
（１）　酢酸マグネシウム添加灰化法 31
（２）　直接灰化法 32
（３）　硫酸添加灰化法 33
イ　水分 34
（１）　カールフィッシャー法 34
（２）　乾燥助剤法 37
（３）　減圧加熱乾燥法 38

（４）　常圧加熱乾燥法 39
（５）　プラスチックフィルム法 41
６　糖質 42
７　糖類 43
（１）　ガスクロマトグラフ法 44
（２）　高速液体クロマトグラフ法 46
８　食物繊維 49
（１）　プロスキー法（酵素-重量法） 50
（２）　高速液体クロマトグラフ法 54
１）　酵素-HPLC 法１ 54
２）　酵素-HPLC 法２ 58
９　亜鉛 65
（１）　原子吸光光度法 65
（２）　キレート抽出-原子吸光光度法 66
（３）　誘導結合プラズマ発光分析法 67
10　カリウム 68
（１）　原子吸光光度法（灰化法） 68
（２）　原子吸光光度法（塩酸抽出法） 69
（３）　誘導結合プラズマ発光分析法 70
11　カルシウム 71
（１）　過マンガン酸カリウム容量法 71
（２）　原子吸光光度法 73
（３）　誘導結合プラズマ発光分析法 74
12　クロム 75
（１）　キレート抽出-原子吸光光度法 75
（２）　誘導結合プラズマ発光分析法 77
（３）　誘導結合プラズマ質量分析法 78
13　セレン 80
（１）　蛍光光度法 80
（２）　水素化物 - 原子吸光光度法 82
（３）　誘導結合プラズマ質量分析法 83

14　鉄 85
（1）　オルトフェナントロリン吸光光度法 85
（2）　原子吸光光度法 87
（3）　誘導結合プラズマ発光分析法 88
15　銅 89
（1）　原子吸光光度法 89
（2）　キレート抽出-原子吸光光度法 90
（3）　誘導結合プラズマ発光分析法 92
16　ナトリウム（食塩相当量） 93
（1）　原子吸光光度法（灰化法） 93
（2）　原子吸光光度法（塩酸抽出法） 94
（3）　誘導結合プラズマ発光分析法 95
17　マグネシウム 96
（1）　原子吸光光度法 96
（2）　誘導結合プラズマ発光分析法 97
18　マンガン 98
（1）　原子吸光光度法 98
（2）　キレート抽出-原子吸光光度法 99
（3）　誘導結合プラズマ発光分析法 101
19　モリブデン 102
（1）　誘導結合プラズマ質量分析法 102
（2）　誘導結合プラズマ発光分析法 104
20　ヨウ素 107
（1）　滴定法 107
（2）　ガスクロマトグラフ法 108
（3）　誘導結合プラズマ質量分析法 109
21　リン 111
（1）　バナドモリブデン酸吸光光度法 111
（2）　モリブデンブルー吸光光度法 112
（3）　誘導結合プラズマ発光分析法 114

22　ナイアシン（ナイアシン当量として） 115
ア　ニコチン酸及びニコチン酸アミド 116
（1）　高速液体クロマトグラフ法 116
（2）　微生物学的定量法 117
イ　トリプトファン 119
（1）　高速液体クロマトグラフ法 119
23　パントテン酸 121
（1）　微生物学的定量法 121
（2）　高速液体クロマトグラフ法 124
24　ビオチン 126
（1）　微生物学的定量法 126
25　ビタミンA（レチノール活性当量として） 129
ア　レチノール（ビタミンAアルコール） 129
（1）　高速液体クロマトグラフ法 129
イ　カロテン 132
（1）　吸光光度法：総カロテン 132
（2）　高速液体クロマトグラフ法：α-カロテン、β-カロテン 134
26　ビタミンB_1 137
（1）　高速液体クロマトグラフ法 138
（2）　チオクローム法 141
27　ビタミンB_2 143
（1）　高速液体クロマトグラフ法 143
（2）　ルミフラビン法 145
28　ビタミンB_6 146
（1）　微生物学的定量法 146
（2）　高速液体クロマトグラフ法 148
29　ビタミンB_{12} 150
（1）　微生物学的定量法 150
（2）　高速液体クロマトグラフ法 153
30　ビタミンC 154

（１）　2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法 154
（２）　インドフェノール・キシレン法 155
（３）　高速液体クロマトグラフ法 157
（４）　酸化還元滴定法 159
（５）　逆相高速液体クロマトグラフ法 160
31　ビタミンD..... 162
（１）　高速液体クロマトグラフ法 162
32　ビタミンE..... 165
（１）　高速液体クロマトグラフ法 165
33　ビタミンK..... 167
（１）　高速液体クロマトグラフ法 167
34　葉酸 169
（１）　微生物学的定量法 169
35　熱量 173
（１）　修正アトウォーター法 173
（２）　アルコール 173
１）　浮ひょう法 174
２）　振動式密度計法 174
３）　ガスクロマトグラフ法 175
４）　酸化法１ 175
５）　酸化法２ 176
（３）　飽和脂肪酸の熱量 178
（４）　有機酸 178
１）　高速液体クロマトグラフ法 178
（５）　糖アルコール類 180
（６）　難消化性糖質のエネルギー換算係数 183
（７）　食物繊維のエネルギー換算係数 184

通則

1　食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）別表第９の第３欄に掲げる方法の詳細（以下「規定の方法」という。）は、本通知によることとする。

2　規定の方法に代わる方法で、それが規定の方法と同等以上の真度及び精度がある場合（簡易・迅速な試験法を用いる場合を含むが、別表第９の第３欄に掲げる方法名の範囲内に限る。）は、その方法を用いることができる注)。ただし、その結果について疑いのある場合は、規定の方法で最終の判定を行う。

3　試験の本質に影響のない限り、試験法の細部については変更することができる（規定の方法として各章に示された操作にて、測定成分の抽出、妨害成分との分離、試験菌株の成育等に不具合が生じる場合等は、試験の本質に影響のない範囲内で、試験法の細部を変更することができる。）。

4　主な計量の単位は次の記号を用いる。

メートル	m
センチメートル	cm
ミリメートル	mm
マイクロメートル	μm
グラム	g
ミリグラム	mg
マイクログラム	μg
ナノグラム	ng
セルシウス度	℃
モル	mol
ミリモル	mmol
リットル	L
ミリリットル	mL
マイクロリットル	μL
モル毎リットル	mol/L
ミリモル毎リットル	mmol/L

5　質量分率を示すには%、質量百万分率を示すには ppm の記号を用いる。溶液 100 mL 中の物質含量（g）を示すには w/v%の記号を用いる。液体 100 mL 中の物質含量（mL）を示すには v/v%を用いる。

6　試験に用いる水は、原水を超ろ過（逆浸透、限外ろ過）、イオン交換、蒸留又はそれらの組み合わせにより精製した水とし、試験を妨害する物質を含まないなど、試験に適した水を用いる。

7　溶質名の次に溶液と記載し、特にその溶媒名を示さないものは水溶液を示す。

8　１mol/Ｌ塩酸、50 v/v%エタノールなど液状の試薬名に単に濃度を示したものは、水を用いて希釈したものを示す。

9　試験に用いる次の試薬は、別に規定する場合を除き、「特級」、「精密分析用」、「高速液体クロマトグラフ用」、「原子吸光分析用」等の市販試薬を用い、試験を

妨害する物質を含まないなど、試験に適したものを用いる。
塩酸、硫酸、硝酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水、クロロホルム、n-ヘキサン、アセトン、ジエチルエーテル、塩化ナトリウム、過酸化水素、過塩素酸、イソプロピルアルコール、エタノール、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル

10　溶液の濃度を（１→２）、（１→４）等と記載したものは、固形の物質は１ｇ、液状の物質は１mL を溶媒に溶かして全量をそれぞれ２mL、４mL 等とする割合を示す。また、混液を（９：１）、（５：４：１）等と記載したものは、液状の物質の９容量と１容量の混液、５容量と４容量と１容量の混液等を示す。試薬名（a+b）と記載したものは、水（b 容量）に試薬（a 容量）を加えて調製した溶液を示す。

11　質量を「精密に量る」とは、１mg 又は 0.1 mg まで量ることを意味する。

12　容量を「正確に加える」等と記載した場合は、全量ピペット、ビュレット又はこれらと同等以上の精度のある体積計を用いて計量することを意味する。また、「正確に 100 mL とする」「定容する」等と記載した場合は、全量フラスコを用いて操作する。

13　本通知に記載された、試料採取量、定容量、希釈倍数、検量線の濃度範囲、検量線の測定点数、内標準物質の種類、内標準溶液の濃度、内標準溶液の添加量は例示であり、必要に応じて変更する。

14　必要に応じて空試験（試料を用いず、あるいは試料と同量の水等を用いて、試料の試験操作と同じ方法で空試験溶液を調製して測定を行う試験）を実施して、試験操作由来のきょう雑物のないことを確認する。

15　試験によって得られる値は、表示値より１桁下まで求め、その多く求めた１桁について四捨五入し、表示値の許容差の範囲と比較することにより判定を行う。

16　ろ過は、別に規定するもののほか、ろ紙（JIS　５種 A 又は同等品）を用いて行う。

17　デシケーターは、乾燥剤を入れて用いる。デシケーター用の乾燥剤として硫酸、シリカゲル、塩化カルシウム、五酸化リン等がある。青色シリカゲルの場合、コバルト塩の青色が減退したら、135 ℃で２～３時間乾燥し再生して使用することができる。

18 「恒量」とは、別に規定する場合を除き、追加乾燥又は強熱の前後２回の秤量差が、目安として、0.5 mg 以下であることをいう。

19　当該食品の栄養成分の量及び熱量が 100　mL 等の容量当たりの量で表示されている場合、試料を容量で量り取ることにより定量結果を得ることができる。

20　ガスクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーにおける分析条件は、一例を示したもので、適切なクロマトグラムが得られるように、カラムの内径、カラムの長さ、カラムの温度、流速、注入量、移動相溶媒の混合比率、グラジエント条件、昇温条件等を調整する。

［注］

通常の食品と形態又は成分組成が大きく異なる食品（カプセル、錠剤等の食品、食品添加物等）、通常の食品に存在しない形態の栄養成分（油溶性ビタミンＣ誘導体等）を強化した食品等が想定される。

1　たんぱく質

（1）　窒素定量換算法

食品中のたんぱく質の定量では、全窒素を定量し、それに一定の係数[注1)]を乗じて得たたんぱく質量とする[注2)]。

［注］

1）　窒素・たんぱく質換算係数を次表に示す。

下記以外の食品については、窒素・たんぱく質換算係数として 6.25 を用いる。

食　品　名	換算係数
アーモンド	5.18
アマランサス、ナッツ類（アーモンド、ブラジルナッツ、らっかせいを除く。）、種実類（あさ、えごま、かぼちゃ、けし、ごま、すいか、はす、ひし、ひまわり）	5.30
ブラジルナッツ、らっかせい	5.46
ふかひれ、ゼラチン、腱（うし）、豚足、軟骨（ぶた、にわとり）	5.55
小麦粉、フランスパン、うどん・そうめん類、中華めん類、マカロニ・スパゲティ類、ふ類、小麦たんぱく、ぎょうざの皮、しゅうまいの皮	5.70
だいず、だいず製品（豆腐竹輪を除く。）、えだまめ、だいずもやし、しょうゆ類、みそ類	5.71
小麦（はいが）	5.80
オートミール、おおむぎ、小麦（玄穀、全粒粉）、ライ麦	5.83
こめ、こめ製品（赤飯を除く。）	5.95
乳及び乳製品、バター類、マーガリン類	6.38

なお、本表に記載されていない食品については、窒素・たんぱく質換算係数として、最新版の日本食品標準成分表に記載されている数値を用いることもできる。また、アミノ酸サプリメントや食品添加物等で、製品に含まれる含窒素化合物の分子式が明確な場合は、たんぱく質として利用されるアミノ酸については分子式から窒素・たんぱく質換算係数を算出し使用しても良い。それ以外の含窒素化合物については、窒素・たんぱく質換算係数を０とする。

2）　食品中の窒素化合物は必ずしもたんぱく質のみでなく、食品によっては多量のアミノ酸類、アミド類、プリン塩基類及びクレアチン類等を含有することもあるが、一般的には全窒素をたんぱく質に由来するものとみなし換算する。

したがって、たんぱく質以外の窒素成分を豊富に含む食品（例えば、

白子のように核酸を豊富に含む食品、大豆レシチン含有食品のように含窒素脂質であるレシチンを豊富に含む食品）にあっては、本法の適用が必ずしも妥当ではない点を留意すべきである。

なお、緑茶、紅茶、コーヒー、ココア等カフェインやテオブロミンを比較的多く含むもの及びアセスルファムK及びアスパルテーム等の窒素を含む合成甘味料を主体とする食品等の場合には、これらを別に定量して補正することが多い。

［参考文献］

1） 日本食品分析センター編:“日本食品標準成分表 2020 年版(八訂)分析マニュアル・解説”, 45 カフェイン, 275-278 (2023)

2） 日本食品分析センター編:“日本食品標準成分表 2020 年版(八訂)分析マニュアル・解説”, 47 テオブロミン, 283-285 (2023)

3） 厚生労働省医薬・生活衛生局食品基準審査課長・食品監視安全課長通知:「食品中の食品添加物分析法」の改正について 別添 3 アセスルファムカリウム, 令和 5 年 5 月 29 日薬生食基発 0529 第 1 号・薬生食監発 0529 第 1 号 (2023)

4） 43 アスパルテーム、食品衛生検査指針 食品添加物編, 216-220 (2003)

1） ケルダール法

① 装置及び器具[注1)]

・ドラフト
・200～500 mL 容ケルダール分解フラスコ
・分解用加熱装置：ガス又は電熱式の分解用架台を用いる。200 mL の水と４～５粒の沸騰石を入れた分解フラスコを載せて加熱するとき、約５分で沸騰し始めるように調節できる熱源が必要。
・アンモニア直接蒸留装置
・ビュレット：テフロンコック付き、容量 25 mL 以下で 0.05 mL の刻線付きのもの又は同等品。

② 試薬[注1)]

・硫酸カリウム：特級、粉状のもの。
・硫酸銅（Ⅱ）五水和物：特級、12 メッシュ以上に粉砕したもの。
・濃硫酸
・水酸化ナトリウム
・ホウ酸：特級
・分解促進剤：硫酸カリウムと硫酸銅（Ⅱ）五水和物を９：１の質量比で混合したもの。タブレット状に成形された市販品（ケルタブ C、株式会社アクタック等）を用いても良い。
・沸騰石：10～12 メッシュ程度の粒度のもの。

・粒状亜鉛：20 メッシュ程度より大きい粒度のもの。
・30 w/v%水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 300 g を水約 500 mL に溶解した後、さらに水を加えて１L に希釈したもの。市販の 30～40 w/v%水酸化ナトリウム溶液を使用しても良い。
・４%ホウ酸溶液：ホウ酸 40 g を水 960 mL に加温溶解し、冷却したもの。
・混合指示薬：0.2 w/v%メチルレッドと 0.2 w/v%ブロムクレゾールグリーンの 95 v/v%エタノール溶液を１：５の容量比で混合したもの[注2)]。調製済み市販品（026-14573、富士フイルム和光純薬等）を使用しても良い。
・0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液:水酸化ナトリウム約 4.5 g を量り、水約 950 mL を加えて溶かし､新たに調製した水酸化バリウム飽和溶液を、沈殿が生じなくなるまで加える。液をよく振り混ぜた後、密栓し、一夜放置する。上澄み液を傾斜するか、又は液をろ過する。本液は、ゴム栓で密栓するか、又は二酸化炭素吸収管（ソーダ管）を付けた瓶に保存し、度々標定し直す[注3)]。
・0.05 mol/L 硫酸標準溶液:濃硫酸約 28 mL に水を加えて 10 L に定容する。これを 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム標準溶液で標定した後、使用する。市販のファクターが記載された 0.05 mol/L 硫酸を使用しても良い。
・ショ糖：特級

③ 測定[注1)]

試料の適量 0.5～2.0g（W g）をケルダール分解フラスコに精密に量り、分解促進剤[注4)] ５g を加え、次いで濃硫酸 15 mL を加え、穏やかに振り混ぜた後、弱火で加熱する。また、必要に応じて、30 w/v%過酸化水素水を加えても良い。分解が始まると、液は黒化し泡立つ[注5)]。黒色粘稠液になったら加熱を強める。反応が進むと、亜硫酸ガスと炭酸ガスを発生しながら液は徐々に黒褐色から褐色になり、最後に青色ないし青緑色で澄明な液になる[注6)]。さらに、１～２時間強熱を続けて分解を完了させる。

冷却後、分解液に脱イオン水約 120 mL を加え、沸騰石数個又は粒状亜鉛を少量加えてから、静かに 30 w/v%水酸化ナトリウム溶液 70 mL を加えて、蒸留装置に連結させる。蒸留液の留出口に４%ホウ酸溶液 40 mL[注7)] を入れた三角フラスコを留出口がホウ酸溶液の液面より下にあるように装着した後、加熱蒸留し、液量が 120 mL になったら留出口を液面から離し、さらに 150 mL まで蒸留する。

蒸留液に混合指示薬を数滴加え、0.05 mol/L 硫酸標準溶液で滴定する。青色、青緑色を経て汚無色から桃色になったところを終点とする（V_1 mL）。別に空試験として試料を用いず、あるいは試料の代わりにショ糖等を用いて、前記同様に操作して分解、蒸留、次いで滴定する（V_0 mL）。

④ 計算

$$\text{試料中の窒素含量 (g/100 g)} = \frac{0.0014 \times (V_1 - V_0) \times f}{W} \times 100$$

f：0.05 mol/L 硫酸標準溶液のファクター

試料中のたんぱく質含量 (g/100 g)

＝試料中の窒素含量 (g/100 g) × 窒素･たんぱく質換算係数

［注］

1） 窒素定量換算法には、多種多様な改変・改良法がある。ここに示した機器、試薬及び測定操作は、比較的広く用いられている条件の１つに過ぎない。また、窒素定量換算法の操作の一部を自動化した機器も市販されており、活用できる。自動化した装置を使用する場合の試薬及び測定操作等については、装置に付属の説明書等に従う。

2） 終点近くの汚無色が滴定時に明らかに出現するように、二つの指示薬溶液のいずれかを追加する。

3） 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の第２添加物の一般試験法の C「試薬･試液」又は第十八改正日本薬局方 一般試験法「容量分析用標準液」の方法により標定する。

4） 分解促進剤、硫酸カリウム、二酸化チタン、硫酸銅（Ⅱ）五水和物を 20:1:1 の質量比で混合したもの 5.5 g を用いてもよい。タブレット状に成形された市販品（ケルタブ CT、株式会社アクタック等）も利用できる。

5） でんぷん、糖、脂質含量の多い試料は発泡が激しく、分解フラスコからあふれることがあるため、最初のうちは加熱に注意する。

6） 分解に要する時間は、試料によって異なるが、通常１～２時間で終了する。

7） ホウ酸は、滴定に直接関与しないので、ホウ酸溶液の濃度及び採取量を厳密にする必要はない。受器中のホウ酸が 40 ℃以上に加温されるとアンモニアの吸収が不完全になる。

2） 燃焼法

① 装置及び器具

・燃焼法全窒素測定装置：次のアからエまでに掲げる能力を有するもの[注1)]

ア 酸素(純度 99.9 %以上のもの)中で試料を熱分解するため、最低 870 ℃以上の操作温度を保持できる燃焼炉を持つこと。

イ 熱伝導度検出器による窒素（N_2）の測定のため、遊離した窒素（N_2）を他の燃焼生成物から分離することができる構造を持つこと。

ウ 窒素酸化物（NO_x）を窒素（N_2）に変換する機構を持つこと。

エ ニコチン酸を用いて 10 回繰り返し測定したときの窒素分の平均値が理論値±0.15 %であり、相対標準偏差が 1.3 %以下であること。

② 試薬

・ニコチン酸：純度 99 %以上のもの。

・検量線作成用標準品：エチレンジアミン四酢酸（EDTA）又は DL-アスパラ

ギン酸（純度 99 %以上で窒素率が記載されたもの）[注2)]。

③　測定

固形の試料の場合、粉砕機で粉砕し均質化する。試料の適量(200～500 mg)[注3)]を 0.1 mg 以下の単位まで正確に量り取り、装置に適した方法で測定する。あらかじめ 0.1 mg 以下の単位まで正確に量り取った検量線作成用標準品を測定して得られた検量線から試料中の窒素含量（g/100 g）を算出する[注4)]。

④　計算

試料中のたんぱく質含量 (g/100 g)

＝試料中の窒素含量 (g/100 g) × 窒素･たんぱく質換算係数

［注］

1）　乾燥スープ、しょうゆ等塩分濃度が高い試料を測定する場合は、ナトリウムの酸化物、遊離した塩素等による腐食を防止する対策がとられていること。

2）　ニコチン酸を除く、他の同純度の標準品を用いることもできる。

3）　採取量は装置に付属の取扱説明書等に従う。

4）　燃焼法では、葉菜類等の硝酸態窒素も測り込まれる。必要に応じて、別に硝酸態窒素を求め、差し引くことにより、たんぱく質に由来する窒素を計算する。

［参考文献］

日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，42 硝酸イオン，261-264（2023）

2　脂質

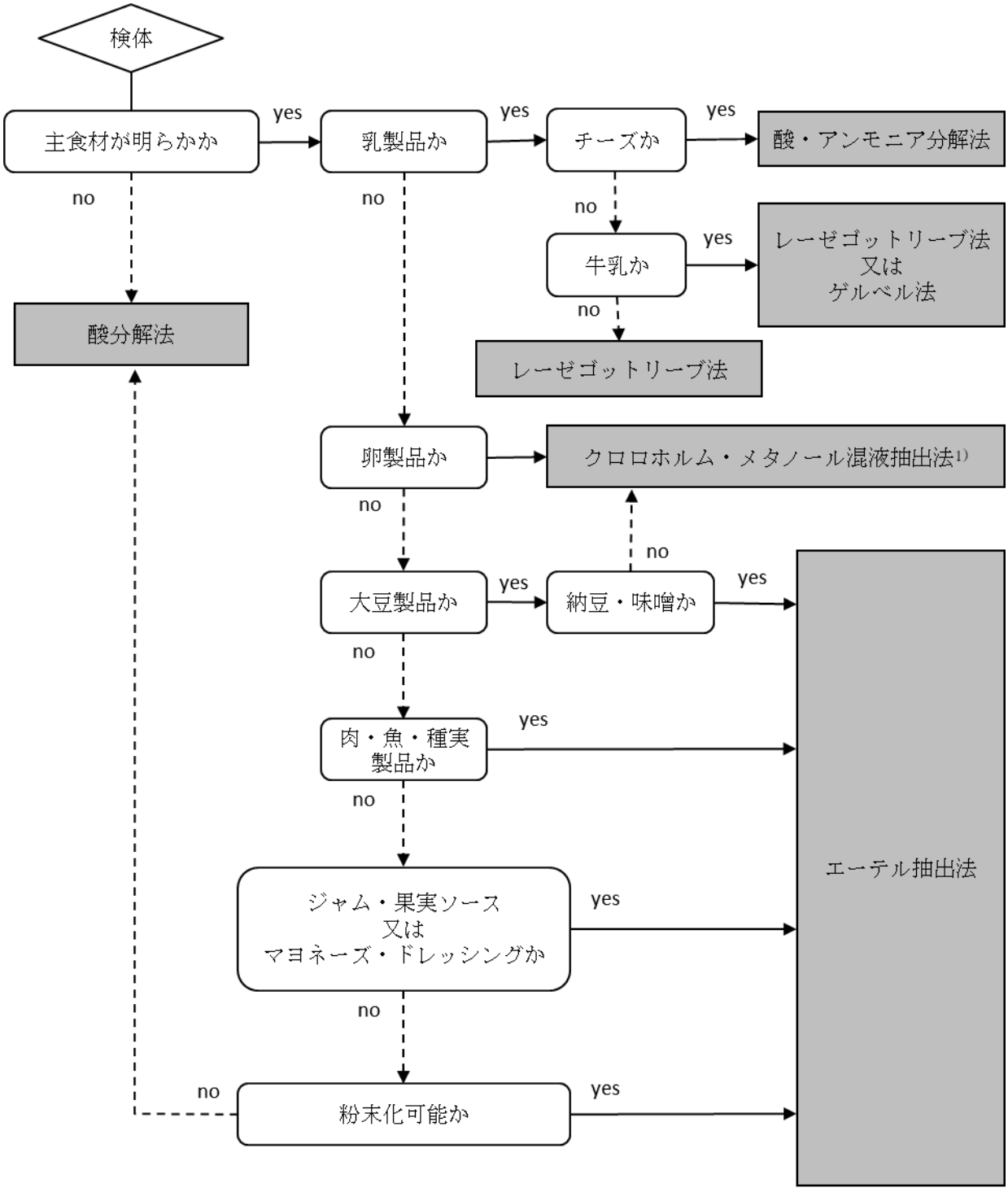
ジエチルエーテル、石油エーテル等の溶剤に可溶な成分の総量を脂質とする[注1)][注2)]。

［注］

1）　脂溶性ビタミン、カロテノイド等も脂質として定量される。通常の食品においては、脂溶性ビタミン、カロテノイド等の含量は、脂質含量と比較してごくわずかであるため、脂質に含めて定量を行う。ただし、脂溶性ビタミン、カロテノイド等を多量に含むカプセル、錠剤等の食品や食品添加物等、その寄与が無視できない場合、脂溶性ビタミン、カロテノイド等の含量を差し引いて脂質とすることができる。

2）　脂質の分析方法を選択するための参考として、フローチャートを次図に示す。また、「日本食品標準成分表分析マニュアル」に記載の［付表］脂質定量法：食品別試料採取量と測定方法一覧表も参考とされたい。

（図．参考）



1）卵及び卵製品はヘキサン－イソプロパノール法でも代用可能。

（1） ゲルベル法

① 適用される食品

牛乳、特別牛乳、殺菌山羊乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳及び加工乳に適用される[注1)]。

② 装置及び器具

・ゲルベル用遠心分離機
・ゲルベル乳脂計
・牛乳用ピペット：容量 11 mL を用いる。
・硫酸用ピペット：容量 10 mL を用いる。
・電気恒温水槽：65 ℃に調節できるものを用いる。

③ 試薬

・硫酸：15 ℃で比重 1.820～1.825（90～91 %）のものを用いる。
・アミルアルコール：比重が 15 ℃で約 0.81 のもの。あらかじめ２mL について水 11 mL を用い、牛乳の場合と同様にして空試験を行い、一夜放置して油状物の分離を認めないものを用いる。

④ 測定

硫酸 10 mL を硫酸用ピペットを用いて､なるべく管壁をぬらさないように、ゲルベル乳脂計に注入し、次に乳試料 11 mL を牛乳用ピペットを用いて管壁に沿って徐々に硫酸上に層積し、さらに、アミルアルコール１mL を加え、ゴム栓をする。牛乳と硫酸が反応して高熱を発するから厚い布で乳脂計を巻いて握り、親指で栓を押さえて振り、乳を溶解した後、65 ℃の温湯中に 15 分間浸す。次に３～５分間 700 回転/分以上の回転数で遠心分離する。さらに、65℃の温湯中に５分間浸して温度を一定にし、脂肪層を読み取る。この読みは脂肪の質量%（g/100 g）を示す[注2)]。

［注］

１） 乳及び乳製品の成分規格等に関する命令(昭和 26 年厚生省令第 52 号)に規定されている。

２） 乳脂計の目盛りは８%が１mL に相当し、１%目盛りが 0.125 mL になるように作られている。11 mL のピペットを用いた場合、0.1 mL がピペットの内壁に付着するとして、10.9 mL の牛乳が実際の測定に用いられていることになる。牛乳の平均比重を 1.032 とすると 10.9 mL の牛乳は 11.25 g に相当する。60 ℃付近における牛乳脂肪の比重は 0.9 であるので、その１mL は 0.9 g に相当する。

したがって、牛乳脂肪１mL は、(0.9/11.25) ×100=８%となり、0.125 mL が１%に相当する計算になる。

［参考文献］

日本薬学会編：“乳製品試験法・注解”，46，金原出版（1984）

（２） 溶媒抽出－重量法

１） エーテル抽出法[注1)]

① 適用される食品

一般食品、特に比較的脂質含量が高く、組織成分と結合している脂質が少なく、かつ乾燥時粉末又は容易に粉砕し得る状態にある食品に適用される。

このため、試料を直接粉砕するか又は適当な前処理を行って、水分等を除去し、脂質を抽出しやすい乾燥状態にした後、ソックスレー抽出器を用いて抽出する[注2)]。

② 装置及び器具

・電気恒温水槽
・電気定温乾燥器
・ソックスレー抽出器[注3)]：試料採取量に応じて抽出管のサイズや、受器のフラスコの容量を選択する。
・円筒ろ紙：直径及び長さは、抽出管のサイズに応じて選択する[注4)]。
・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③ 試薬

・けいそう土：セライト No. 545[注5)]。
・ジエチルエーテル
・硫酸ナトリウム（無水）：特級
・硫酸銅溶液：硫酸銅（Ⅱ）五水和物（特級）70 g を水に溶かして１L とする。
・水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 10 g を水に溶かして１L とする。

④ 試料の調製

１） 乾燥試料、肉類、魚類、種実類

そのまま円筒ろ紙に移して 100～105 ℃の電気定温乾燥器で２～３時間乾燥するか、又は試料をビーカーに精密に量り、水を加えて組織を膨潤させてからけいそう土又は硫酸ナトリウム（無水）を加えて脱水し、乳鉢中で粉砕して円筒ろ紙に移す。ビーカー及び乳鉢は少量のジエチルエーテルを含ませた脱脂綿でふき取り、脱脂綿ごと円筒ろ紙に入れる。水分量が多く、たんぱく質に富む肉、魚又は種実類のうち、脂質含量の多いものでは、均質化した調製試料にけいそう土又は硫酸ナトリウム（無水）を加えて同様に脱水した後、100～105 ℃の電気定温乾燥器で２～３時間乾燥し、乳鉢中で粉砕して円筒ろ紙に移す。

２） みそ類、納豆類

調製試料 10 g を精密に量り、100 mL の熱水で溶解する。あらかじめろ紙を敷いたブフナー漏斗に水に懸濁した５g のけいそう土を流し込んでけいそう土層を作り、試料液をこれでろ過する。漏斗ごと電熱式乾燥器等で乾燥した後、試料を吸着したけいそう土を乳鉢に移し、必要に応じて硫酸ナトリウム（無水）を適量加えてよく混ぜて円筒ろ紙に移す。

３） ジャム、果実類等

あめ状やゼリー状で粉末になりにくく、かつ多量の糖及び有機酸を含む食品、例えばジャム、ゼリー又は果実類ソース類の場合は、温湯 200 mL を加えて溶解し、冷却後、硫酸銅溶液 10 mL を加えて混和し、かき混ぜなが

ら水酸化ナトリウム溶液を pH6.0 前後になるまで加える。沈降させ、ろ紙上に沈殿物を集める。これを 100～105℃の電気定温乾燥器に入れて２時間乾燥した後、円筒ろ紙に入れる。

４） マヨネーズ、ドレッシング

ビーカー等にけいそう土約 10 g をとり、これに適量の試料を加えてよく混和した後、電熱式乾燥器等で乾燥し、乳鉢中で粉砕して円筒ろ紙に移す。

⑤ 測定

粉砕又は前処理が必要な試料の場合は、上記④の調製を行った後、試料を円筒ろ紙に入れる[注6)]。その上に脱脂綿を軽く詰め、抽出管に入れる。受器のフラスコは前もって 100～105 ℃の電気定温乾燥器で１～２時間乾燥し、デシケーターに移し、１時間放冷した後、0.1 mg まで量って恒量（W_0 g）を求める。これにジエチルエーテル[注7)]を約２/３容入れ、冷却管を連結して 50～70℃の電気恒温水槽上で８～16 時間抽出を行う[注8)]。

抽出終了後、手早く抽出管を取りはずして、円筒ろ紙をピンセットで抜き出し、再び冷却管に連結して、電気恒温水槽上で加温し、フラスコ中のジエチルエーテルがほとんど全部抽出管に移ったら、フラスコを取り外してさらに加温し、フラスコ中のジエチルエーテルを完全に蒸発させる。フラスコの外側をガーゼでふき、100～105 ℃の電気定温乾燥器に入れ、１時間乾燥し、デシケーターに移して放冷後秤量し、恒量（W_1 g）を求める[注9)]。

⑥ 計算

$$\text{試料中の脂質含量（g/100 g）} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

W：試料採取量（g）

［注］

１） ここに記載するもののほか、乳及び乳製品の成分規格等に関する命令（昭和 26 年厚生省令第 52 号）ではバター及びバターオイルの乳脂肪分を石油エーテルで、マーガリン類の日本農林規格（昭和 60 年農林水産省告示第 932 号）ではマーガリンの油脂含有率をジエチルエーテルで直接抽出する方法等がある。

２） 乾燥が不十分な場合は、抽出が不完全になるか、逆に水分と一緒に水溶性物質が溶出したりする。しかし、長時間の乾燥や高温での乾燥は、脂肪酸の酸化や揮発による成分変化を誘発したり、組織を変化させて脂質が抽出されにくくなることがある。

３） 通則第２項に基づき、ジエチルエーテル等を循環させてエーテル可溶成分を抽出できるよう設計された自動分析装置を用いることもできる。

４） No. 84（アドバンテック東洋）又は同等品を用いる。

５） Fisher Scientific Co.製等

６）　試料は円筒ろ紙の２/３以上占めてはならない。

７）　コーヒー焙豆、インスタントコーヒーは、AOAC920.97 法に準じてジエチルエーテルの代わりに石油エーテルを用いて抽出する。

８）　みそ類及び納豆類は、ソックスレー抽出器で 10 時間抽出する。

９）　フラスコにジエチルエーテル又は石油エーテルを加えて穏やかに加温し、抽出物が可溶性物質であることを確認する。もし、不溶物が含まれている場合は、ジエチルエーテル又は石油エーテルでフラスコを洗浄し、別のフラスコに移して溶媒留去、秤量を行う。又は、不溶物が生成してくる可能性があると予想される場合は、あらかじめジエチルエーテル及び石油エーテル層を分液漏斗等に全量移し、水による洗浄操作を２～３回行う。ろ紙又は脱脂綿を入れた漏斗に適量の硫酸ナトリウム（無水）等を乗せ、脱水ろ過しながらエーテル層をフラスコに集め、溶媒を留去して恒量を求める。

［参考文献］

AOAC Official Method 920.97: Petroleum Ether Extract of Roasted Coffee

２）　クロロホルム・メタノール混液抽出法[注1)]

①　適用される食品

大豆及び大豆製品（みそ類、納豆類は除く。）、卵類のように、リン脂質等の極性脂質を含む食品に適用される。

②　装置及び器具

・ドラフト
・電気恒温水槽
・電気定温乾燥器
・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
・遠心分離機：3,000 回転/分で操作でき、50 mL 容の遠心管が４～８本かけられるものを用いる。
・遠心管：50 mL 容の共栓付きガラス遠心管（直径 35 mm、高さ 100 mm 程度のもの）を用いる。
・抽出装置：還流冷却管と 200 mL 容の共通すり合わせ三角フラスコからなる装置。
・秤量瓶：直径 45 mm、高さ 45 mm でふた付きのガラス製のものを用いる。
・ガラスろ過器：ブフナー漏斗形 11G-３、フィルター板直径 40 mm、容量 60～100 mL のものを用いる。
・なす形フラスコ：300 mL 容の共栓付きなす形フラスコ[注2)]
・ロータリーエバポレーター：一式

③　試薬

・クロロホルム：97 v/v%以上のものを用いる。

・メタノール：96 v/v%以上のものを用いる。
・クロロホルム・メタノール混液（２：１）：クロロホルム２容に対してメタノール１容を加え、混和する。
・石油エーテル：特級
・硫酸ナトリウム（無水）：特級、120～135 ℃で１～２時間乾燥後、ポリエチレン瓶等に保存する。

④　測定

試料の適量を 200 mL 容共栓三角フラスコに精密に量り（W g）[注3)]、クロロホルム・メタノール混液（２：１）50～60 mL を加え、還流冷却管を接続した後、65 ℃に調節した恒温水槽の中に入れる。穏やかに沸騰を始めたら、そのまま約１時間抽出を行う。抽出終了後、冷却管から三角フラスコを取りはずし、ガラスろ過器を用いて 300 mL 容共栓なす形フラスコに抽出液をろ過し、次いでクロロホルム・メタノール混液で抽出に用いた三角フラスコとガラスろ過器を洗い、洗液はろ液に合わせる。

捕集したろ液からクロロホルム・メタノール混液をロータリーエバポレーターで留去させ、フラスコを傾けたときに内容物が粘性を示す程度に濃縮して、乾固させない。

冷却した後、石油エーテル 25 mL を正確に加えて内容物を溶解させ、さらに硫酸ナトリウム（無水）５～15 g を加え、栓をして１分間振り混ぜた後、素早く遠心管に移し、遠心分離（3,000 回転/分、５分間）する。あらかじめ 100～105 ℃の電気定温乾燥器で１時間乾燥後、デシケーター中で 60 分間放冷し、恒量（W_0 g）とした秤量瓶に遠心上澄み液 10 mL を速やかに正確に量り、石油エーテルを留去した後 100～105 ℃の電気定温乾燥器で１時間乾燥し、デシケーター中で 60 分間放冷後、秤量して恒量（W_1 g）を求める。

⑤　計算

$$\text{試料中の脂質含量}(\text{g}/100\,\text{g}) = \frac{(W_1 - W_0) \times 2.5}{W} \times 100$$

2.5：石油エーテル 25 mL 中の 10 mL を採取して乾燥を行ったので、係数として 2.5 を乗ずる。

［注］

１）　クロロホルムは発がん性のある環境汚染物質であることから、局所排気装置を備えた設備で取り扱う等十分な安全衛生上の配慮が必要である。

２）　200～300 mL 容共栓付き三角フラスコを用いてもよい。

３）　乾燥試料には水２～３ mL を加え、水分の多い場合は、適量のけいそう土を加えて水分量を調節する。

３）　酸分解法

①　適用される食品

組織に結合又は包含されている脂質（複合脂質）を相対的に多く含む食品で、例えば穀類、パン、マカロニ類、いも及びでんぷん類、脂質含量の少ない種実類、豆類、野菜類、卵類、きのこ類、藻類、調理加工食品等に適用される。

② 装置及び器具

・電気恒温水槽
・電気定温乾燥器
・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
・抽出管：マジョニア管又はレーリッヒ管を用いる。
・分液漏斗
・ロータリーエバポレーター：一式

③ 試薬

・ジエチルエーテル
・エタノール：95 v/v%
・濃塩酸
・塩酸（25→36）：濃塩酸 25 容に水 11 容を加えたもの。
・石油エーテル：特級
・ジエチルエーテル－石油エーテル混液（１：１）：エーテル 1 容と石油エーテル 1 容を混和する。

④ 測定

試料の適量（乾物として１～２g 以下）を 50 mL 容のビーカーに[注1)]精密に量り（W g）、エタノール２mL を加えて、ガラス棒でよく混和する。次いで、乾燥試料のときは塩酸（25→36）、多水分試料のときは濃塩酸 10 mL を加えて十分に混和し、時計皿で覆って 70～80 ℃の電気恒温水槽上で 30～40 分間時々かき混ぜながら加温する。放冷後、内容物をマジョニア管又はレーリッヒ管に移し、ビーカーとガラス棒をエタノール 10 mL で洗い、さらにジエチルエーテル 25 mL で洗浄し、洗液は先の抽出管に集める[注2)]。栓をして軽く振って混和した後、栓をゆっくり回してジエチルエーテルのガスを抜く。再び栓をして 30 秒間激しく振り混ぜる。次いで、石油エーテル 25 mL を加え、同様にして 30 秒間激しく振り混ぜる。上層が透明になるまで静置した後、あらかじめ適量の水（目安として 30 mL）を入れた分液漏斗にエーテル層を集める。抽出管内の水層に再びジエチルエーテルと石油エーテル各 20 mL ずつの混液を加え、上記と同様に操作した後静置し、エーテル層を同様に分液漏斗に集める。さらに、ジエチルエーテルと石油エーテル各 15 mL ずつの混液を加え、この操作をもう一度繰り返した後、抽出管の先端及び栓をジエチルエーテル－石油エーテル混液（１：１）で十分に洗いこれも集める。混液を捕集した分液漏斗を十分に振り混ぜた後、静置して分離した水層を捨てる。エーテル層に水 30 mL を加え、同様の操作を１～２ 回行う[注3)]。漏斗に、ろ紙又は脱脂綿を入れ、この中に硫酸ナトリウム（無水）約 10 g を乗

せたものを準備し、ここへ、水洗が終わったエーテル層を分液漏斗から流下し、脱水、ろ過する。ろ液はあらかじめ 100～105 ℃の電気定温乾燥器で１時間乾燥後デシケーター中で１時間放冷し、恒量（W_0 g）にしたフラスコに集める。分液漏斗及び漏斗はジエチルエーテルー石油エーテル混液（１：１）で洗い込み、これも同様に脱水、ろ過してエーテル層と合わせる。フラスコをロータリーエバポレーターで溶媒留去し、混液がわずかになったら電気恒温水槽で残りの混液を十分に留去する。フラスコの外側をガーゼでふき、100～105 ℃の電気定温乾燥器中で１時間乾燥後、デシケーターに移して放冷後秤量し、恒量（W_1 g）を求める[注4)]。

⑤　計算

$$\text{試料中の脂質含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

［注］

１）　直接マジョニア管に採取し、エタノール、塩酸で壁に付着した試料を洗い入れ、加温分解することもできる。

２）　水層の全量が約 25 mL より少なくなるように液量を調節する。

３）　エーテル層にジエチルエーテルー石油エーテル（１：１）に不溶の物質が含まれないと予想される場合は、水洗操作を省略することができる。

４）　フラスコにジエチルエーテル又は石油エーテルを加えて穏やかに加温し、抽出物が可溶性物質であることを確認する。もし、不溶物が含まれている場合は、ジエチルエーテルー石油エーテル（１：１）でフラスコを洗浄し、別のフラスコに移して溶媒留去、秤量を行う。

４）　レーゼゴットリーブ法

①　適用される食品

主として乳及び乳製品に用いられるが、乳脂肪を含む食品及び比較的脂質含量の高い液状又は乳状の食品にも適用される[注1)]。

②　装置及び器具

・電気恒温水槽
・電気定温乾燥器
・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
・抽出管：マジョニア管又はレーリッヒ管を用いる。
・溶媒留去用電気恒温水槽
・ロータリーエバポレーター：一式

③　試薬

・ジエチルエーテル
・エタノール：95 v/v%
・石油エーテル：特級
・アンモニア水：25 %（20 ℃での比重約 0.91）のもの。

・ジエチルエーテルー石油エーテル混液（１：１）：エーテル１容と石油エーテル１容を混和する。

④　試料の調製

・全粉乳、クリームパウダー、加糖粉乳、乳児用調製粉乳、乳飲料、発酵乳及び乳酸菌飲料：そのまま使用する。

・アイスクリーム類：固形物を含む場合の試料で試験を行うときは、良く混合してから用いる。

・濃縮乳、練乳：試料 20 g を量り、必要に応じて、温水で希釈し、100 mL に定容し、その 10 mL を用いる。

⑤　測定

試料の適量を小型ビーカーに[注2)]精密に量り（W g）、粉末試料の場合は温湯約４mL を加え、十分にかき混ぜながら試料を溶解して抽出管に移し、さらに３mL の温湯で２回洗う。液体試料の場合は、適量の温湯で抽出管に移す[注3)]。次に、アンモニア水 1.5～２mL 及びエタノール 10 mL を用いて順次ビーカーを洗い、洗液を抽出管に加え、その度に栓をしてよく混ぜ合わせる[注4)]。ジエチルエーテル 25 mL を加え、栓をして軽く混合した後、栓を回転してガス抜きの穴からジエチルエーテルのガスを抜く。再び栓をして約 30 秒間激しく振り混ぜる。次いで、石油エーテル 25 mL を加え、同様にして 30 秒間激しく振り混ぜる。上層が透明になるまで静置した後、脱脂綿を詰めた漏斗でろ過する。ろ液はあらかじめ 100～105 ℃の電気定温乾燥器で１時間乾燥後デシケーター中で１時間放冷し、恒量（W_0 g）にしたフラスコに集める。管内の水層に再びジエチルエーテルと石油エーテル各 20 mL ずつの混液を加え、上記と同様に操作した後静置し、エーテル層を同様にろ過してフラスコに集める。さらに、ジエチルエーテルと石油エーテル各 15 mL ずつの混液を加え、この操作をもう一度繰り返した後、抽出管の先端、栓及び漏斗の先端をジエチルエーテルー石油エーテル混液（１：１）で十分に洗いこれも集める。混液を捕集したフラスコをロータリーエバポレーターで溶媒留去し、混液がわずかになったら電気恒温水槽で残りの混液を十分に留去する。フラスコの外側をガーゼでふき、100～105 ℃の電気定温乾燥器中で１時間乾燥後、デシケーターに移し、１時間放冷して秤量する。乾燥、放冷、秤量の操作を繰り返し、恒量（W_1 g）を求める。

⑥　計算

$$\text{試料中の脂質含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

［注］

１）　豆乳にこの方法が適用されることもある。

２）　試料を直接マジョニア管に採取し、その後の操作を行うこともできる。

３）　酸分解法と同様に、水層の全量が約 25 mL より少なくなるように液

量を調節する。

４）　アイスクリーム類は、試料４ｇを小型ビーカーに量り水３　mL を加えてよく混ぜ合わせ、抽出管に移す。ビーカーは水３ml でよく洗い、その洗液は抽出管に加えて振り混ぜる。アンモニア水及びエタノールを加えたならば、抽出管を 60 ℃の水浴中で時々振り混ぜながら、20 分間加熱する。

５）　酸・アンモニア分解法[注1)]

①　適用される食品

チーズ類に用いる。

②　装置及び器具

・ホットプレート
・電気定温乾燥器
・デシケーター：乾燥剤を入れておく。
・抽出管：マジョニア管又はレーリッヒ管を用いる。
・分液漏斗
・電気恒温水槽
・ロータリーエバポレーター:一式

③　試薬

・アンモニア水溶液（１：９）：アンモニア水 1 容と水９容を混和する。
・塩酸
・ジエチルエーテル
・石油エーテル：特級
・ジエチルエーテル－石油エーテル混液（１：１）：ジエチルエーテル 1 容と石油エーテル 1 容を混和する。
・硫酸ナトリウム（無水）：特級

④　測定

試料（W）を 100　mL コニカルビーカーに量り取り、アンモニア水溶液 10 mL を加え、ガラス棒でよくつぶして均質の乳濁液にする[注2)]。塩酸 11　mL を加え、時計皿でふたをして、ときどきかき混ぜながらホットプレートで加熱分解する[注3)]。冷却後、分解物を抽出管に移し、ビーカー、ガラス棒を少量の水[注4)]とエタノール 10 mL で洗い、さらにジエチルエーテル 25 mL で洗浄し、洗液は抽出管に加える。栓をして軽く振って混和した後、栓をゆっくり回してジエチルエーテルのガスを抜く。再び栓をして 30 秒間激しく振り混ぜる。次いで、石油エーテル 25 mL を加え、同様にして 30 秒間激しく振り混ぜる。上層が透明になるまで静置した後、あらかじめ適量の水（目安として 30 mL）を入れた分液漏斗にエーテル層を集める。抽出管内の水層に再びジエチルエーテルと石油エーテル各 20 mL ずつの混液を加え、上記と同様に操作した後静置し、エーテル層を同様に分液漏斗に集める。さらに、ジエチルエーテ

ルと石油エーテル各 15 mL ずつの混液を加え、この操作をもう一度繰り返した後、抽出管の先端及び栓をジエチルエーテルー石油エーテル混液（１：１）で十分に洗い、これも集める。混液を捕集した分液漏斗を十分に振り混ぜた後、静置して分離した水層を捨てる。エーテル混液に水 30 mL を加え、同様に操作する。同様の操作を１～２回行う[注5)]。漏斗に、ろ紙又は脱脂綿を入れ、この中に硫酸ナトリウム（無水）約 10 g を乗せたものを準備し、ここへ、水洗が終ったエーテル層を分液漏斗から流下し、脱水、ろ過する。ろ液はあらかじめ 100～105 ℃の電気定温乾燥器で１時間乾燥後デシケーター中で１時間放冷し、恒量（W_0 g）にしたフラスコに集める。分液漏斗及び漏斗はジエチルエーテルー石油エーテル混液（１：１）で洗い込み、これも同様に脱水、ろ過してエーテル層と合わせる。フラスコをロータリーエバポレーターで溶媒留去し、混液がわずかになったら電気恒温水槽で残りの混液を十分に留去する[注6)]。フラスコの外側をガーゼでふき、100～105 ℃の電気定温乾燥器中で１時間乾燥後、デシケーターに移して放冷後秤量し、恒量（W_1 g）を求める。

⑤　計算

$$\text{脂質含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

［注］

１）　別名 Schmid-Bondzski-Ratzlaff 法といい、酸分解法とレーゼゴットリーブ法を組み合わせた方法で、乳及び乳製品の成分規格等に関する命令（昭和 26 年厚生省令第 52 号）ではプロセスチーズなどに適用されている。

２）　溶けにくいときには、時計皿でふたをして水浴上で温めながらつぶす。

３）　電気コンロにセラミック板を敷いて突沸しないように注意しながら加熱してもよい。加熱は穏やかに沸騰し始めてから５～６分間程度が目安である。分解が十分に進むと酸分解法と同様に分解溶液がサラサラとした感じの褐色液体になる。純粋なチーズの場合、あまり濃い色は付かない。

４）　水層の全量が約 25 mL より少なくなるように液量を調節する。もし、液量が多くなりそうなときは、コニカルビーカーを水浴上に置き、時計皿をとって水分を蒸発させる。

５）　エーテル層に不溶の物質が含まれないと予想される場合は、水洗操作を省略することができる。

６）　エーテル混液をほとんど留去した残留物中に、黒いタール状のものが認められるときは、分解物が水とともに混入したためであり、定量値増大の誤差となるので、ジエチルエーテル―石油エーテル混液（1:1v/v）20mL を加えて加温溶解し、ろ過して混液を別のフラスコに集める。元の

フラスコは混液で数回洗浄し、同様にして別のフラスコに集め、混液の留去操作を行う。

6） ヘキサンーイソプロパノール法

① 適用される食品

卵及び卵製品に適用される。

② 装置及び器具

・吸引ろ過装置
・ホモジナイザー
・ロータリーエバポレーター：一式
・電気定温乾燥器
・デシケーター
・遠心管：容量 50 mL
・分液漏斗：容量 200 mL
・なす形フラスコ：容量 100 mL

③ 試薬

・n-ヘキサンーイソプロピルアルコール混液（３：２ v/v）
・n-ヘキサンーイソプロピルアルコール混液（７：２ v/v）
・6.7 %硫酸ナトリウム溶液

④ 測定

試料１g（W）[注1)]を遠心管に正確に量り取り、n-ヘキサンーイソプロピルアルコール混液（３：２）10 mL を加え、ホモジナイザーで均質化する。n-ヘキサンーイソプロピルアルコール混液（３：２）1.5 mL で溶媒に触れたホモジナイザーの先端部を洗い、洗液も遠心管に合わせ抽出液とする。ガラスろ過器[注2)]にろ紙[注3)]を敷き、抽出液を不溶物と共に移し、吸引ろ過する（受器：分液漏斗）。残渣を回収し、n-ヘキサンーイソプロピルアルコール混液（３：２）８mL を加え、同様の抽出操作を行う。吸引を止め、n-ヘキサンーイソプロピルアルコール混液（３：２）1.5 mL を残留物に注ぎ、２分間浸した後、吸引ろ過する。残留物からの抽出操作をもう一度行う。ろ液を回収した分液漏斗に 6.7 %硫酸ナトリウム溶液 13.5 mL を加え、１分間振り混ぜる。静置して二層に分離したことを確認後、上層を回収し、下層に n-ヘキサンーイソプロピルアルコール混液（７：２）20 mL を加え、１分間振り混ぜる。質量既知（W_0）のなす形フラスコに合わせた液をとり、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、100～105 ℃の電気定温乾燥器で１時間乾燥し、デシケーター中で１時間放冷後、秤量して恒量（W_1）を求める[注4)]。

⑤ 計算

$$\text{脂質含量（g/100 g）} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100$$

［注］

1） 脂質の量が 50～500 mg になるようにする。満たない場合は採取量を増やす。その際、試液の量は比率を変えないようにスケールアップする。

2） 11G３又は同等品を用いる。

3） JIS５種 C 又は同等品を用いる。

4） 脂質の量が 100 mg 未満の場合は、なす形フラスコから恒量としたアルミニウム製はかり容器に移して測定すると精度のよい結果が得られる。

3 飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸

（1） ガスクロマトグラフ法

脂肪酸は直鎖炭化水素のモノカルボン酸で、総炭素数が４～24 のものを食品表示基準における測定対象とする[注1)]。飽和脂肪酸は炭素鎖に二重結合を有さない脂肪酸であり、不飽和脂肪酸は炭素鎖に１個以上の二重結合を有する脂肪酸（ただし、トランス脂肪酸[注2)]を除く。）である。また、炭素鎖に２個以上の二重結合を有する脂肪酸のうち、メチル基末端から数えた最初の二重結合が３番目の位置にあるものが n-３系脂肪酸、６番目の位置にあるものが n-６系脂肪酸である。

本試験法により個々の飽和脂肪酸含量を測定し、それらの総和を飽和脂肪酸量とする。また、個々の不飽和脂肪酸含量を測定し、それらの総和から不飽和脂肪酸の総量並びに n-３系脂肪酸及び n-６系脂肪酸の総量も同様に定量することができる。

［注］

1） 原則として、日本食品標準成分表脂肪酸成分表編に記載されている脂肪酸を測定対象とする。

2） トランス脂肪酸の含有量を表示する場合は、トランス脂肪酸の情報開示に関する指針（平成 23 年２月 21 日消費者庁）に従う。同指針では、脂肪酸とトランス脂肪酸を分別定量できる方法として AOCS Ce1h-05 法及び AOAC996.06 法がある。

［参考文献］

1） 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会報告：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）脂肪酸成分表編”，表３脂肪酸成分表の脂肪酸名、記号及び分子量，5-6（2021）

2） AOCS Official Method Ce 1h-05: cis-,trans-,Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-Ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC

３） AOAC Official Method 996.06: Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods. Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic Method

１） 脂質の抽出Ⅰ（けん化法）

① 適用される食品

魚介類や肉類等多糖類の含量が少ない食品[注)]に適用される。

② 装置及び器具

・ホットプレート
・ロータリーエバポレーター：一式

③ 試薬

・ヘプタデカン酸：純度 98 %以上のもの
・内標準溶液：ヘプタデカン酸を 5 mg/mL の濃度となるように n-ヘキサンに溶解する。
・水酸化カリウム
・エタノール：95 v/v%
・１mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液（ただし、エタノールには水５v/v%を含む。）：水酸化カリウム 5.6 g をエタノールに溶解し 100 mL にする。
・エーテル
・n-ヘキサン
・ピロガロール：特級
・30 w/v% 硫酸：特級
・硫酸ナトリウム（無水）：特級
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

④ 操作

共栓付き三角フラスコに内標準溶液１～６mL（ヘプタデカン酸として５～30 mg）を正確に量り取り、溶媒を留去する。試料 0.5～５g（脂肪酸として 20～100 mg）を精密に量る。１mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液 50 mL 及びピロガロール 0.5 g を加え、必要に応じて沸騰石を加えた後、冷却器を付しホットプレート上で穏やかに 30 分間加熱けん化する。室温まで冷やし分液漏斗に水 150 mL で移す。30 w/v%硫酸を加え、pH を約２としてジエチルエーテル - n-ヘキサン（１：１）100 mL 及び 50 mL で２回振とう抽出する。抽出液を合わせ水 40 mL で４回洗浄した後硫酸ナトリウム（無水）で乾燥する。これをろ過して硫酸ナトリウムを除き、なす形フラスコに抽出液を集め、溶媒をロータリーエバポレーターで留去（40 ℃以下）する。

[注]

糖質のグリコシド結合は、酸には弱いがアルカリにはかなり安定である。アルカリによる分解は、還元末端から糖残基が１つずつ離れていく

形をとり、時間が掛かるとともに不完全になるため、けん化法は穀類等多糖類を多く含む食品には適さない。

また、酪酸等の低級脂肪酸は、分析操作におけるその挙動が他の脂肪酸（高級脂肪酸）と異なる（例えば、水に可溶であること、揮発性が高いこと。）。したがって、本法は、後述の脂質の抽出Ⅱの方法を含め低級脂肪酸を多く含む食品には適さない。乳脂肪を含む菓子類、乳類等で、飽和脂肪酸の総量に対して、酪酸等の低級脂肪酸の寄与が無視できない場合は、最新版の「日本食品標準成分表分析マニュアル」に記載された方法に準拠して測定を行う。

［参考文献］

日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，38-2-3 プロピルエステル化法，241-243(2023)

２） 脂質の抽出Ⅱ（酸分解法）

① 適用される食品

穀類等、多糖類を多く含む食品に適用される。

② 装置及び器具

・ウォーターバス
・ロータリーエバポレーター：一式

③ 試薬

・ヘプタデカン酸：純度 98 %以上のもの
・内標準溶液：ヘプタデカン酸を 5 mg/mL の濃度となるように n-ヘキサンに溶解する。
・塩酸溶液：濃塩酸と水を 25：11 の容量比で混合する。
・エーテル
・石油エーテル：特級
・硫酸ナトリウム（無水）：特級
・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

④ 操作

ビーカー[注1)]に内標準溶液 1～6 mL（ヘプタデカン酸として５～30 mg）を正確に量り取り、溶媒を留去する。試料 0.5～５g(脂肪酸として 20～100 mg)を精密に量る。エタノール５mL を加えガラス棒で混和する。塩酸溶液 25 mL を加え、水浴（80℃）中で、蒸発を防ぐため時計皿を載せ、時々かくはんしながら 30 分間加熱[注2)]する。放冷後、分液漏斗に移し、エタノール 20 mL とジエチルエーテル 60 mL を加え振とうする。次いで石油エーテル 60 mL を加え振とうする。下層を別の分液漏斗に移し、ジエチルエーテル - 石油エーテル（１：１）60 mL で２回、同様に振とう抽出する。抽出液を合わせ水 40 mL で４回洗浄した後硫酸ナトリウム（無水）で脱水する。これをろ過して硫酸ナトリウムを除き、なす形フラスコに抽出液を集め、溶媒をロータリーエバ

ポレーターで留去（40℃以下）する。

［注］

１）　試料を直接マジョニア管に採取し、その後の操作を行うこともできる。

２）　塩酸溶液による分解では、温度が高くなると多価不飽和脂肪酸の分解が促進されるので、正しく温度を調節する。

３）　脂肪酸メチルエステルの調製

①　装置及び器具

・オイルバス又はアルミブロックヒーター

・スクリューキャップ（テフロンをコーティングしたもの）付き試験管：12 mL 容

②　試薬

・メタノール

・水酸化ナトリウム

・0.5 mol/L 水酸化ナトリウム - メタノール溶液：水酸化ナトリウム２g をメタノールに溶解し 100 mL にする。

・三フッ化ホウ素 - メタノール試薬（濃度約 14 %）：ガスクロマトグラフ用

・n-ヘキサン

・塩化ナトリウム

・飽和塩化ナトリウム溶液

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③　操作

１）又は２）で得られた脂質 30 mg（最大 100 mg）を精密に量り、スクリューキャップ付き試験管にとる。0.5 mol/L 水酸化ナトリウム - メタノール溶液 1.5 mL を加え、容器内を窒素で置換した後キャップを締め混合してから 100 ℃で７分間加熱する。冷却し、三フッ化ホウ素 - メタノール試薬２mL を加える。容器内を窒素で置換した後キャップを締め混合してから 100 ℃で５分間加熱する。30～40 ℃まで放冷し、n-ヘキサン１mL を加え容器内を窒素で置換した後 30 秒間激しく振とうする。次いで飽和塩化ナトリウム溶液５mL を加え容器内を窒素で置換し、よく振り混ぜる。n-ヘキサン層が分離したら別の試験管に移す。下層にさらに n-ヘキサン１mL を加え、振とう抽出する。抽出液を合わせた後[注)]、n-ヘキサンで定容とし試験溶液とする。

［注］

脂肪酸メチルエステルの精製が必要な場合は以下のように行う。

カラム：シリカゲル８g（130 ℃で 16 時間活性化したもの）クロマト管（内径１cm）

溶出液：n-ヘキサン 100 mL（洗浄）

：n-ヘキサン - ジエチルエーテル（98：２）100 mL（脂肪酸メチル

エステルの溶出）

上記の方法のほか、シリカゲル固相抽出カートリッジを用いて精製を行うこともできる。

［参考文献］

日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル･解説”，38-2-1 メチルエステル化法(1)，235-238(2023)，235-238（2023）

4） ガスクロマトグラフィー

① 装置及び器具

・ガスクロマトグラフ（水素炎イオン化検出器、スプリット/スプリットレス注入口付き）一式

・データ処理装置

・キャピラリーカラム：長さ 15～30 m、内径 0.2～0.32 mm、フューズドシリカキャピラリーにシアノプロピル系又はポリエチレングリコール - 20M 等の液相を結合させたもの。

② 試薬

・キャリヤーガス：ヘリウム

・各種の脂肪酸メチルエステル：標準品としての品質を有するもの。

③ 測定

３）脂肪酸メチルエステルの調製で調製した試験溶液を、ガスクロマトグラフに0.5～１μL注入し､データ処置装置を用いてピーク面積を測定する。

＜ガスクロマトグラフ操作条件例[注1)]＞

カラム：J&W DB-23 0.25 mm×30 m, df. 0.25 μm 又は同等品

温度：注入口及び検出器 250 ℃

カラム 60 ℃（１分保持）→ 6℃/分 → 160 ℃ → 1.8 ℃/分 → 200 ℃

流量：2.0 mL/分

ガス流量：メイクアップガス：50 mL/分

注入モード：スプリットレス

④ 計算[注2)]

$$\text{試料中の脂肪酸含量 (g/100 g)} = \frac{A \times C \times K}{B \times W} \times 0.1$$

A：被定量脂肪酸メチルの面積

B：ヘプタデカン酸メチルの面積

C：ヘプタデカン酸の添加量（mg）

K：感度補正係数[注3)]

W：試料採取量（g）

［注］

１）　スプリット注入法でも分析は可能である。以下に長さ 25～30 m、内径 0.20～0.35 mm のキャピラリーカラムを用いたときの操作例を示す。

温度：注入口　250 ℃、検出器　270 ℃

カラム　170 ℃（０分保持）→ １℃/分 → 225 ℃

ガス流量：キャリヤーガス　1.0～2.0 mL/分　メイクアップガス 50 mL/分

注入モード：スプリット（スプリット比：１/50）

２）　植物性の食品ではヘプタデカン酸メチルと重なるピークはほとんど認められないが、魚介類を含め動物性の食品には通常少量含まれる。この場合、内標準物質をトリコサン酸（C23:０）に変えるか、又は試料に内標準物質を加えずに調製した脂肪酸メチルの試験溶液（ブランク）を用意し、ここで得られたクロマトグラムに基づき計算により内標準物質のピーク面積から重なるピーク面積を差し引き補正する。

３）　被定量脂肪酸の感度補正係数は標準品を用いて測定するが、標準品が入手できない場合等は文献値を引用しても良い。ガスクロマトグラフ操作条件が適切ならば、通常の脂肪酸の感度補正係数は１に近い値となる。ただし、炭素鎖の短い脂肪酸は感度が低下し１より大きい値をとる。

［参考文献］

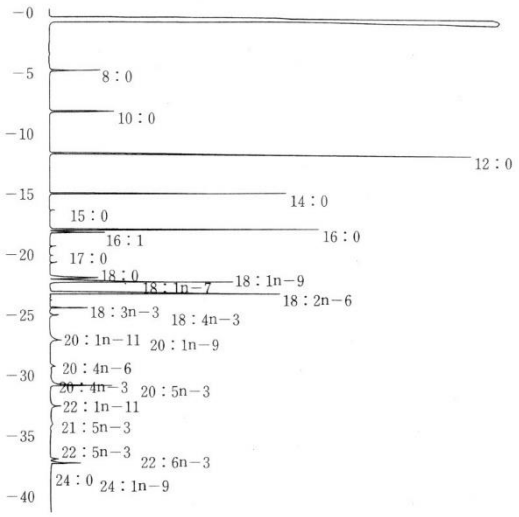
１）　科学技術庁資源調査会：“四訂日本食品標準成分表のフォローアップに関する調査報告Ⅱ―日本食品脂溶性成分表（脂肪酸、コレステロール、ビタミンE）―”、177（1989）

２）　W.R.Morrison, S.L.Tan and K.D.Hargin：J.Sci.Food Agri., 31, 329（1980）

３）　Official Methods of the American Oil Chemists’ Society Ce １b-89

４）　日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”, 感度補正係数の求め方, 237-238（2023）

５）　AOCS Official Method Ce 1h-05: cis-,trans-,Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-Ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC



図−１　やし油、大豆油及び魚油を混合した試料のクロマトグラム（参考）

４　コレステロール

（１）　ガスクロマトグラフ法[注１）]

①　装置及び器具

・ガスクロマトグラフ：一式（水素イオン型検出器付き）
・ホットプレート
・ロータリーエバポレーター：一式

②　試薬

・コレステロール：99 %以上の純度を有するもの
・エタノール：95 v/v%
・5−α−コレスタン－エタノール溶液：濃度 0.5 mg/mL
・水酸化カリウム
・１mol/L 水酸化カリウム－エタノール溶液（ただし、エタノールには５v/v%の水を含む。）：水酸化カリウム 5.6 g をエタノールに溶解し 100 mL にする。
・石油エーテル：特級
・硫酸ナトリウム（無水）：特級
・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③　試験溶液の調製

試料 0.1～５g（コレステロールとして約１mg）[注２）]を精密に量り、共栓付三角フラスコに入れる。内標準物質として５−α−コレスタン－エタノール溶液１mL を正確に加える。次いで、１mol/L 水酸化カリウム－エタノール溶液 50 mL を加え、必要に応じて沸騰石を加えた後、冷却管を付し１時間穏やかに加熱けん化する。室温まで放冷後、水 50 mL 及び石油エーテル 50 mL で分液漏斗に移し、振とう抽出する。さらに、石油エーテル 50 mL で２回抽出する。抽出液を集め、水 40 mL で４回洗浄する。抽出液を硫酸ナトリウム（無

水）で乾燥する。硫酸ナトリウムをろ過操作で除去した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固する[注3)]。残留物をn-ヘキサンに溶かし10 mLに定容し試験溶液とする。

④　標準溶液の調製

段階的に濃度を変えたコレステロールに、5-α-コレスタンの一定量を加えたものを調製する。コレステロールの濃度は３段階以上を用意する[注4)]。

⑤　測定

試験溶液の一定量をガスクロマトグラフに注入し、内標準物質に対するコレステロールのピーク面積比を求める。あらかじめ作成した検量線から試料中のコレステロール含量を求める。

＜ガスクロマトグラフ操作条件例＞

キャピラリーカラム：長さ15 m、内径0.53 mm、フューズドシリカキャピラリーに５%ジフェニール - 95 %ジメチルシロキサンのポリマーを結合させたもの。膜厚1.0～1.5 μm（CP-Sil 8 CB、アジレント・テクノロジー（株）製又は同等品）

温度：注入口及び検出器　280 ℃

オーブン　250 ℃

流量：15 mL/分（ヘリウム、コレステロールが８～９分に溶出するように調節する。）

注入モード：スプリットレス

注入量：１μL

⑥　計算

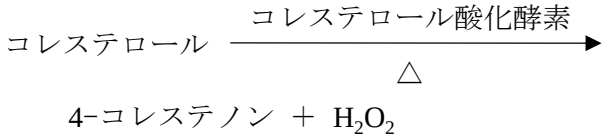
$$\text{試料中のコレステロール含量 (mg/100 g)} = \frac{A \times 100}{W}$$

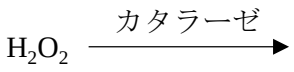
A：検量線から読み取ったコレステロール量（mg）

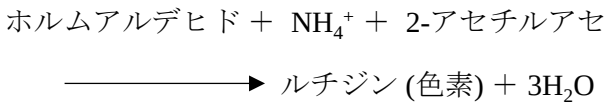
W：試料採取量（g）

[注]

１）　ここに示したガスクロマトグラフ法の他に有用な方法として酵素法がある。例えば、コレステロール酸化酵素を用い、下記の反応系で生成する色素（ルチジン）の量がコレステロールの量に比例するのを利用してコレステロールを定量する方法がある。なお、コレステロール酸化酵素は３位の炭素原子の水酸基がβ配位をとっているステロール類なら全て酸化できるので、スチグマステロールやシトステロール等の植物性ステロール類（フィトステロール類）を含む食品に対しては、コレステロール酸化酵素を用いる方法の適用は避けるべきである。また、コレステロール定量用の酵素法をキット化した製品も市販されている。







2） 試料採取量は 10 g まで増やせるが、この場合は、1 mol/L 水酸化カリウム - エタノール溶液、水及び石油エーテルを倍量用いる必要がある。また、試料採取量を 10 g にした場合は、1 mg/100 g のコレステロールの測定が可能である。

3） ガスクロマトグラム上、5-α-コレスタンやコレステロールに近似した位置にピークが認められ、測定の妨害となる場合は以下の方法で精製する。ただし、この操作で 5-α-コレスタンは除去されるため、精製操作後に新たに添加する必要がある。

コレステロールの精製

シリカゲル（活性化：130 ℃、16 時間）8 g を n-ヘキサンで内径 1.5 cm のカラムに詰め、先の濃縮物を下記の条件で処理しステロール画分を得る。

第 1 溶出液：20 v/v%ジエチルエーテル - n-ヘキサン 150 mL：洗浄

第 2 溶出液：35 v/v%ジエチルエーテル - n-ヘキサン 150 mL：ステロール画分

4） 例えば、コレステロール 0.25、0.75 及び 2.0 mg に、5-α-コレスタン 0.5 mg を加え、n-ヘキサンで 10 mL とする。

[参考文献]

1） 科学技術庁資源調査会：“四訂日本食品標準成分表のフォローアップに関する調査報告Ⅱ－日本食品脂溶性成分表（脂肪酸、コレステロール、ビタミン E）－”、p. 178（1989）

2） Adams M.L., Sullivan D.M., Smith R.L. and Richter E.F.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69, 844 (1986)

3） Kovacs M.I.P.: J. Cereal Sci., 11, 291 (1990)

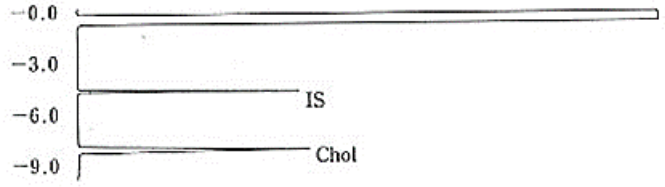


図-２　５-α-コレスタン（50 ng）とコレステロール（100 ng）のクロマトグラム

５　炭水化物

炭水化物は、当該食品の質量から、たんぱく質[注1)]、脂質、灰分[注2)]及び水分量を除いて算出する[注3）注4）注5）注6）注7)]。

［注］

１）　たんぱく質以外の窒素成分を豊富に含む食品（例えば、白子のように核酸を豊富に含む食品、大豆レシチン含有食品のように含窒素脂質であるレシチンを豊富に含む食品）にあっては、窒素定量換算法を適用して得られたたんぱく質量は実際量より過大である点に留意すべきである。

２）　大豆レシチン含有食品等含リン脂質であるレシチンを豊富に含む食品にあっては、リンが脂質と灰分の両方に重複して測り込まれる点に留意すべきである。

３）　エネルギーとして利用されない成分（抹茶に含まれるタンニン及びカフェイン、ココアに含まれるテオブロミン、チョコレート及びココアに含まれるポリフェノール、カプセル、錠剤等の食品に含まれる水溶性ビタミン等）が炭水化物として算出され、その寄与が無視できない場合、これらの成分を別途に測定し、差し引いたものを炭水化物とすることもある。なお、タンニン、カフェイン、テオブロミン及びポリフェノールの分析は「日本食品標準成分表分析マニュアル」に記載された方法に準拠する。

４）　差し引きの結果、数値が負の値となる場合は、炭水化物含量を０として差し支えない。

５）　カフェイン、テオブロミン、アセスルファム K、アスパルテーム等をたんぱく質の定量値から差し引く場合は、炭水化物からも差し引く。

６）　脂溶性ビタミン、カロテノイド等を脂質の定量値から差し引く場合は、炭水化物からも差し引く。

７）水分以外の揮発成分（アルコール類及び酢酸等の揮発酸）を水分の定量値から差し引く場合は、炭水化物からも差し引くことが望ましい。

［参考文献］

１）　日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，46 タンニン，279-282（2023）

２）　日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）

分析マニュアル・解説”，48 ポリフェノール，286-293（2023）

ア　灰分

食品の灰分は、ある温度で灰化して有機物及び水分を除いた残留物の量とする[注)]。

［注］

厳密には灰分と無機質の総量とは一致しない。例えば、有機物に由来する炭素が灰化中に炭酸塩になることがあり、また、塩素の一部が灰化によって失われることもある。それらの程度は試料中の無機質の組成と、灰化の温度や時間等によっても異なってくる。

（１）　酢酸マグネシウム添加灰化法[注)]

①　適用される食品

リン酸を多く含む試料に有効な方法で、小麦粉を始めとして米、麦等の穀物及びその加工品に適用される。

②　装置及び器具

・灰化容器：直径６cm 程度の磁製蒸発皿、又は容量 15～30 mL 程度の磁製るつぼを用いる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 550～600±10 ℃に設定できるものを用いる。

・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③　試薬

・酢酸

・メタノール

・酢酸マグネシウム溶液：酢酸マグネシウム（特級）15　g に脱イオン水約 150　mL を加え、さらに酢酸２mL を添加し、かき混ぜながら水浴上で加温して溶解する。これにメタノールを加えて１L とする。

④　測定

あらかじめ恒量を求めた灰化容器（W_0 g）に、試料約３g を精密に量る（W_1 g）。酢酸マグネシウム溶液３mL を正確に量り、試料全体に均一にしみわたるように加える。約５分間放置して、過剰のメタノールを蒸発させ、さらに予備乾燥した後、予備灰化し、600 ℃に達した電気炉に入れ、３～４時間灰化する。灰化後、温度が 200 ℃近くまで放冷された後、灰化容器をデシケーターに移し、室温に戻った後秤量する。同じ操作を恒量（W_2 g）になるまで繰り返す。

別に酢酸マグネシウム溶液３mL を恒量を求めた灰化容器（W_3 g）に量り、以下同様に灰化操作を行った後秤量（W_4 g）し、空試験値を求める。

⑤　計算

$$\text{試料中の灰分含量 (g/100 g)} = \frac{(W_2 - W_0) - (W_4 - W_3)}{W_1 - W_0} \times 100$$

［注］

過剰のリン酸を含む試料では、灰化時に灰が溶融して完全な灰化が困難となる。酢酸マグネシウム添加灰化法は、このリン酸を中和してマグネシウム塩とし、溶融を防いで迅速に灰化する方法である。

（２） 直接灰化法

① 適用される食品

550～600 ℃で試料を灰化したとき、恒量の得られる全食品に適用される。乾燥試料はそのまま、そのほかの試料は適当な前処理を行い、灰化しやすい状態にして適用する。

② 装置及び器具

・灰化容器：直径６cm 程度の磁製蒸発皿、又は容量 15～30 mL 程度の磁製るつぼを用いる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 550～600±10 ℃に設定できるものを用いる。

・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③ 試料の調製及び前処理

試料により、次のような前処置を行う。

１） 前処理不要なもの

穀類、豆類、そのほか以下に含まれない乾燥食品等。

２） 予備灰化を要するもの

予備灰化は、できれば全食品に適用するのがよい。特に、砂糖、砂糖菓子の類、精製でんぷん、卵白、まぐろ、かつお、いか、えび等の魚介類等、灰化時にふくれて容器の外へあふれ出るおそれのあるものは、あらかじめ弱火で灰化容器の下面のみを熱し、内容物があふれ出ないように注意しながら徐々に灰化する必要がある。

３） 予備乾燥を必要とするもの

野菜、果実、多くの動物性食品のように、水分の多いものや酒、ジュース、牛乳等の液体試料は水浴上又は乾燥器内で水分を蒸発させる必要がある。

４） 予備燃焼を要するもの

油脂類、バター等は十分に乾燥後、試料を加熱し、あるいは加熱しつつ点火して燃焼させる必要がある。

④ 測定

あらかじめ恒量にした灰化容器（W_0 g）に、適量の試料（１～３g 程度、液体の場合は５mL 程度）を精密に量り（W_1 g）、必要な前処理を行った後、550～600 ℃の温度に達した電気炉に入れ、白色又はこれに近い色になるまで[注]

[1] ５～６時間を目安として灰化する。灰化後、灰化容器を取り出し[注2)]、温度が 200 ℃近くになるまで放冷してからデシケーターに移し、室温に戻った後秤量する。同じ操作（灰化、放冷、秤量）を恒量（W_2 g）になるまで繰り返す[注3)]。

灰化した際に、炭塊の残存が認められる場合は灰に水を加えて溶かし、未灰化物を露出させた後水浴上で蒸発乾固する。次いで、水浴上又は 100 ℃程度のホットプレート上で十分に乾燥後、再び 550～600 ℃で灰化を行い、恒量になるまで数回この操作を繰り返す。

また、残存する炭塊がかなり多い場合、放冷後熱水で灰を湿らせた後炭塊をガラス棒で突き砕き、熱水約 10 mL を加えてよくかき混ぜ、可溶物を抽出する。炭塊の量に応じ、７～９cm のろ紙[注4)]を用いて、傾斜法にてろ過し、50 mL 容のビーカー中にろ液を集める。再び灰化容器に少量の熱水を加え、同様にろ過する。残渣をろ紙ごと灰化容器に移し、用いた漏斗を洗ってろ液に合わせる。灰化容器は乾燥後、再び 550～600 ℃で灰化を行い、炭塊が残るようならこの操作をもう一度行う。灰化、放冷後、先のろ液を灰化容器に移し少量の水でビーカーを洗ってこれも移し、水浴上又は 100 ℃程度のホットプレート上で蒸発乾固後、再び 550～600 ℃で灰化し、恒量を求める。

⑤ 計算

$$\text{試料中の灰分含量 (g/100 g)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100$$

［注］

１） 完全に焼けた灰でも必ずしも白くはならない。例えば、鉄を多く含む食品の灰は褐色を示し、マンガンや銅を多く含む食品は青緑色を示す。

２） 灰が舞い上がることもあるので、灰化容器にふたをしておくと安全である。

３） 灰の表面が白くなっていても、内部に炭塊などが残っている場合がある。恒量に達した後、灰をガラス棒で突き砕くなどして確認する。

４） JIS ５種 A 又は６種相当のろ紙を用い、表示されているろ紙中の灰分量を試料灰分量から差し引く。無灰ろ紙を用いた場合、ろ紙の灰分は無視して差し支えない。

（３） 硫酸添加灰化法[注)]

① 適用される食品

精製度の高い砂糖等に適用される。

② 装置及び器具

・灰化容器：直径６cm 程度の磁製蒸発皿、又は容量 15～30 mL 程度の磁製るつぼを用いる。

・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 550～800±10 ℃に設定できるものを

用いる。

③　試薬

・濃硫酸

④　測定

あらかじめ恒量にした灰化容器（W_0 g）に、試料５～30 g を精密に量る（W_1 g）。液状試料の場合は水浴上で蒸発乾固する。試料に濃硫酸 0.5～５mL を加え、加温して全体を炭化膨潤させた後、ゆっくりと加熱して過剰の硫酸を追い出す。灰化容器を電気炉に入れて 550 ℃でほとんど炭素分のなくなるまで灰化する。冷却後、再び数滴の濃硫酸で湿らせ、800 ℃で灰化する。灰化後、灰化容器を取り出し、アルミトレイ等の上で温度が 200 ℃近くになるまで放冷してデシケーターに移し、室温に戻った後、秤量する。

同じ操作を恒量（W_2 g）になるまで繰り返す。灰分含有率を硫酸灰分として算出する。

⑤　計算

$$\text{試料中の硫酸灰分含量 (g/100 g)} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100$$

［注］

硫酸添加灰化法が記載されているものには、製糖便覧、ICUMSA Methods（International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis）等がある。

ただし、硫酸添加灰化法で得られる残留物は硫酸灰分であるため、灰分の多い黒糖、粗糖蜜等の試料では過大に評価されるので、これらの試料への適用は望ましくない。

イ　水分[注1)]

代表的な水分の分析法にカールフィッシャー法と加熱乾燥法[注2)]がある。加熱乾燥法には減圧加熱乾燥法と常圧加熱乾燥法とがあり、さらにこれらの補完的な方法として乾燥助剤法とプラスチックフィルム法とがある。

［注］

１）　ここに記載するほか、水と混り合わない有機溶剤と試料を一緒に加熱し、共沸により留出する水の容量そのものを量り、水分とする蒸留法等がある。蒸留法はほとんどの食品に適用できるが、水分が非常に多いもの、又は非常に少ない試料には適さない。特に、香辛料及び水分含量の多い油脂食品に適用できる。

２）　水分以外の揮発成分（アルコール類、酢酸等の揮発酸）が含まれる場合には、これらも水分として測り込まれるので、これらのものを別途に測定し、差し引くことが必要である。

（１）　カールフィッシャー法[注1)]

カールフィッシャー法は、メタノール等の低級アルコール及びピリジン等の有機塩基の存在下で、水がヨウ素及び二酸化硫黄と次の式に示すように定量的に反応することを利用して水分を測定する方法である。

$$I_2+SO_2+3C_5H_5N+CH_3OH+H_2O \rightarrow 2(C_5H_5N^+H)I^-+(C_5H_5N^+H)^-OSO_2OCH_3$$

① 装置及び器具

・カールフィッシャー電気滴定装置：通例、自動ビュレット、滴定フラスコ、かき混ぜ機及び定電圧分極電流滴定装置又は定電流分極電位差滴定装置からなる。カールフィッシャー試液は吸湿性が非常に強いので、装置は外部からの吸湿を防ぐようにする。防湿には、シリカゲル又は水分滴定用塩化カルシウム等を用いる。

② 試薬[注2)]

・カールフィッシャー試液[注3)]
・メタノール（脱水）：水分が 0.05 w/v%以下のもの
・水・メタノール標準溶液[注4)]

③ 測定[注2)]

カールフィッシャー試液による滴定は湿気を避けて行い、原則として、これを標定したときの温度と同一の温度で行う。被滴定液中に一対の白金電極を浸し、可変抵抗器を適当に調節して電極間に微小電圧を加え、カールフィッシャー試液を滴下するとき変化する電流（μA）を測定し（定電圧分極電流滴定法）、滴定が進むにつれて回路中の電流が大きく変化し、数秒で再び元の位置に戻る。滴定の終点に達すると、この電流の変化が一定時間持続する（通例、30 秒間以上）。この状態になったときを滴定の終点とする。又は電極間に微小電流を流しておき、カールフィッシャー試液を滴下するとき変化する電位差（mV）を測定し（定電流分極電位差滴定法）、滴定が進むにつれて回路中の電圧計の値が数百ミリボルトの分極状態から急に減少し、消極状態となり数秒で再び元の位置に戻る。滴定の終点に達すると、消極状態が一定時間持続する（通例、30 秒間以上）。この状態になったときを滴定の終点とする。ただし、逆滴定により定電圧分極電流滴定法を用いる場合は、カールフィッシャー試液が過量に存在する間は電流計の針が振り切れ、終点に達すると急に元の位置に戻る。定電流分極電位差滴定法を用いる場合はカールフィッシャー試液が過量に存在する間はミリボルトメーターの値が元の位置にあり、終点に達すると一定の電圧がかかる。

カールフィッシャー試液による滴定は、次のいずれの方法によってもよい。

1） 直接滴定

カールフィッシャー用メタノール（脱水）適量を乾燥滴定フラスコにとり、これをあらかじめカールフィッシャー試液で終点まで滴定してフラスコ内を無水の状態にしておく。次に水分の適量（５～30 mg 程度）を含む試料を精密に量り（W mg）、速やかに滴定フラスコに入れ、かき混ぜて溶かし、激しくかき混ぜながらカールフィッシャー試液で終点まで滴定する

（V mL）。

２）　逆滴定

カールフィッシャー用メタノール（脱水）適量を乾燥滴定フラスコにとり、これをあらかじめカールフィッシャー試液で終点まで滴定してフラスコ内を無水の状態にしておく。次に水分５～30 mg を含むような量の試料を精密に量り（W′　mg）、速やかに滴定フラスコに入れ、過量のカールフィッシャー試液の一定量（V′　mL）を加え、かき混ぜて溶かし、激しくかき混ぜながら水・メタノール標準溶液で終点まで滴定する（H mL）。

④　計算

１）　直接滴定

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{V \times f}{W} \times 100$$

２）　逆滴定

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{V' \times f - H \times f'}{W'} \times 100$$

f：カールフィッシャー試液の１mL に対応する水（H_2O）の mg 数（力価）

f′：水・メタノール標準溶液１mL 中の水（H_2O）の mg 数

［注］

１）　測定法には、容量測定法と電量測定法があるが、ここでは容量測定法の例を示した。容量測定法は、反応に必要なヨウ素を水分測定用試液に溶解させ、試料中の水と反応して消費されたヨウ素の滴定量より、水分を測定する方法である。電量法は、ヨウ化物イオンを混合した水分測定用試液を用い、電解によりヨウ素を発生させる。ヨウ素が定量的に水と反応することに基づき、電解に要した電気量より、水分を測定する方法である。いずれも装置、試薬の調製、取扱いに注意を要するので、取扱説明書等を参考にすること。

なお、アスコルビン酸やアルデヒド等還元力の強いものはヨウ素を消費するので、これらが多量に存在する試料には適さない。

２）　自動化した装置を使用する場合の試薬及び測定操作等については、装置に付属の説明書等に従う。

３）　市販品を用いることができる（三菱ケミカル製、カールフィッシャー試液 SS 等）。カールフィッシャー試液は通常ヨウ素、二酸化硫黄及びピリジンのモル比が１：３:10 であり、これにメタノールが加わる。しかし、カールフィッシャー試液はメタノールが共存すると分解が速い。市販の試液はメタノールを含まないので、必ずメタノールを含む溶剤中で滴定する。

この試液の標定は以下のように行う。

標定：測定の操作法に従い、メタノール（脱水）25 mL を乾燥滴定フラスコに入れ、カールフィッシャー試液を終点まで注意して加える。次

に水約 50 mg を精密に量って速やかに加え、湿気を遮り、カールフィッシャー試液で終点まで測定する。カールフィッシャー試液の１mL に対応する水（H_2O）の mg 数 f を次式によって求める。

f＝水（H_2O）の採取量（mg）/水に対するカールフィッシャー試液の滴定量（mL）

４）　メタノール（脱水）500 mL を量り、1,000 mL の乾燥全量フラスコに入れ、水２mL を量って加え、メタノールを加えて 1,000 mL とする。この液の標定は、カールフィッシャー試液の標定に続いて行う。遮光して湿気を避け、冷所に保存する。

市販品を用いることができる（三菱ケミカル製、標準水メタノール２ mgH_2O/mL（20℃））。

水・メタノール標準溶液の標定は以下のように行う。

標定：測定の操作法に従い、メタノール（脱水）25 mL を乾燥滴定フラスコに入れ、カールフィッシャー試液を終点まで注意して加える。次にカールフィッシャー試液 10 mL を正確に量って加え、この水・メタノール標準溶液で終点まで滴定する。水・メタノール標準溶液１ mL 中の水（H_2O）の mg 数 f′を次式によって求める。

f′＝（f×10）/水・メタノール標準溶液の滴定量（mL）

f：カールフィッシャー試液１mL に対応する水（H_2O）の mg 数

［参考文献］

１）　日本食品科学工学会　新・食品分析法編集委員会編：“新・食品分析法”，24，光琳（1996）

２）　日本薬学会編：“衛生試験法・注解”，258，金原出版（1990）

３）　食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の第２添加物の B 一般試験法「水分測定法」（カールフィッシャー法）

４）　第十六改正日本薬局方　一般試験法「水分測定法」（カールフィッシャー法）

（２）　乾燥助剤法

①　適用される食品

加熱すると融解し、表面に堅い被膜を形成し、内部の水分が蒸発しにくい食品に適用する。ケイ砂等の乾燥助剤を用いて表面積を大きくし、水蒸気が食品組織から抜け出る道を作って乾燥させる。

②　装置及び器具

・電気定温乾燥器[注1)]（又は真空乾燥器）

・秤量皿：アルミ製又はガラス製、上部の直径 55 mm、底部の直径 55 mm、深さ 40 mm 程度のもの[注2)]。

・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③　試薬

・乾燥助剤：精製ケイ砂（40～60 メッシュ程度）又はけいそう土[注3)]。

④　測定

秤量皿にケイ砂約 30 g、又はけいそう土約 10 g をとり、かき混ぜ用ガラス棒を１本入れ、所定の温度[注4)]で１～２時間乾燥後室温まで放冷し、試料を入れないときの恒量（W_0 g）を求めておく。これに適量の試料（通常２～３g）を採取し、秤量（W_1 g）する。次いで、試料と乾燥助剤がよく混和するように、ガラス棒でかき混ぜる。必要があれば、水浴上での加熱[注5)]や少量の水を加えて混和を促す。その後の本乾燥は、試料によって常圧加熱乾燥法又は減圧加熱乾燥法を適用し、室温まで放冷し秤量する（W_2 g）。

⑤　計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

［注］

１）　60～150 ℃の温度範囲において所定の温度の±２℃に調節可能なもので、器内の温度分布の均一なものが望ましく、強制循環通風式が一般的に用いられる。

２）　必要に応じて、ふた付きの秤量容器を用いる。その際は、容器にふたをしたとき、この中に斜めにして入る長さのかき混ぜ用ガラス棒を秤量容器ごとに用意する。

３）　ケイ砂は種々の粒度のものが市販されている。吸湿性の高いものは、次のように精製する。すなわち、希塩酸（１→４）を加え、水浴上で加温し、希塩酸を除いた後、酸性反応がなくなるまで水洗する。これを乾燥後 600～700 ℃に強熱した後、デシケーター中で放冷し、密栓して保存する。けいそう土（商品名：セライト）も吸湿性が少なければ、特に精製する必要はない。吸湿性の高いものは、約２倍量の希塩酸（１→２）を加えて沸騰前後の温度で数時間加温した後、酸性反応がなくなるまで水洗し、次いで約 135 ℃で乾燥後、ポリエチレン容器等に保存する。

４）　試料を加熱乾燥するときと同じ温度で行う。

５）　本乾燥を 60 ℃で行う試料のときは、水浴上の加熱温度も 60 ℃付近で行うが、非常に時間が掛かる。かき混ぜるとき、助剤が飛散しないよう細心の注意が必要である。

（３）　減圧加熱乾燥法

①　適用される食品

多くの食品に基準的な方法として適用できる。一般に 0.0007～0.0133 MPa の真空度で、熱によって変化しやすい食品は 60～70 ℃で、比較的安定な食品は 90～100 ℃で加熱する。

②　装置及び器具

・真空乾燥器

・アルミ製秤量皿[注1)]：上部の直径 55 ㎜、底部の直径 50 ㎜、深さ 25 ㎜、厚さ 0.2～0.3 ㎜程度、ふたの深さは約 10 ㎜で、そのうち５㎜ぐらいが容器にはまるようになっているもの。

・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③　測定

所定の温度に調節した定温乾燥器に秤量皿を入れ、１～２時間加熱後デシケーターに移す。放冷して室温に達したら、直ちに秤量する。再び加熱、放冷、秤量の操作を繰り返し恒量（W_0 g）を求める。次に、適量の試料（通常２～３g）を精密に量り（W_1 g）、ふたをわずかにずらし[注2)]、所定の温度に調節した真空乾燥器に入れ、真空ポンプで吸引しながら、所定の真空度に設定する[注3)]。一定時間（約５時間）減圧乾燥後に真空ポンプを止め、シリカゲルを充填した乾燥管等を用いて除湿した空気を乾燥器内に静かに導入して常圧に戻し、秤量皿を取り出し、ふたをしてデシケーター中で放冷後秤量する。一般には、恒量（W_2 g）に達するまで減圧、乾燥、放冷、秤量を繰り返す[注4)]。ケイ砂やけいそう土等の乾燥助剤を用いるべき食品は、乾燥助剤法の場合と同じ操作で、一度水浴上でほとんど乾燥させたものを所定の温度と減圧下で乾燥する。

④　計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

［注］

１）　ガラス製のはかり瓶でもよいが、質量が大きいため、測定の真度に影響する。

２）　乾燥終了後、急激に空気を入れて常圧に戻すと、試料が舞い上がることがある。軽い粉末等のときはふたを取らずに、ずらしたほうがよい。

３）　乾燥器の温度は、減圧にするといったん５℃ぐらい降下するが、徐々に設定温度に戻るので、調節し直さずそのまま放置してよい。

４）　繰り返しの乾燥は、普通２時間ずつ行う。室温に達しないうちに秤量を行うと、空気の対流のため、実際の質量よりも軽く量られる。前後２回の質量差が 0.5 ㎎以下となったら恒量とみなす。試料によっては熱分解のために、秤量のたび、数㎎以上質量減を来す場合があるので、水分の定量値の変化が 0.1 g/100 g 以下となったときを恒量とみなすこともある。

（４）　常圧加熱乾燥法

①　適用される食品

常圧加熱乾燥法は操作が容易であるため、多くの食品に適用される。一般に 100～135 ℃の範囲の一定の加熱温度及び乾燥時間が適用される。減圧加熱乾燥法も含めた加熱乾燥法による水分定量条件の例を表１に示す。

② 装置及び器具

・電気定温乾燥器[注1)]

・アルミ製秤量皿：上部の直径 55 mm、底部の直径 50 mm、深さ 25 mm、厚さ 0.2～0.3 mm 程度、ふたの深さは約 10 mm で、そのうち５ mm ぐらいが容器にはまるようになっているもの。

・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③ 測定

所定の温度に調節した電気定温乾燥器に秤量皿を入れ、１～２時間加熱後デシケーターに移す。放冷して室温に達したら、直ちに秤量する。再び加熱、放冷、秤量の操作を繰り返し恒量（W_0 g）を求める。次に、適量の試料（通常２～10 g）を素早く精密に量り、平らに広げ、ふたをし秤量（W_1 g）する。電気定温乾燥器の中にふたをずらして入れる。電気定温乾燥器が所定の温度に達してから、定められた時間乾燥後、乾燥器中で素早く容器にふたをし、デシケーターに移し放冷する。室温に達したら直ちに秤量する（W_2 g）。一般には、恒量が得られるまでこの操作を繰り返し行う[注2)]。加熱乾燥後に試料の色が変わったり、焦げ等が発生した場合は、加熱温度を下げるか、減圧加熱乾燥法を用いて再測定を行う。

④ 計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

［注］

１） 60～150 ℃の温度範囲において所定の温度の±２ ℃に調節可能なもので、器内の温度分布の均一なものが望ましく、強制循環通風式が一般的に用いられる。

２） 室温に達しないうちに秤量を行うと、空気の対流のため、実際の質量よりも軽く量られる。前後２回の質量差が 0.5 mg 以下となったら恒量とみなす。試料によっては熱分解のために、秤量のたび、数 mg 以上質量減をきたす場合があるので、水分の定量値の変化が 0.1 g/100 g 以下となったときを恒量とみなすこともある。

表１ 加熱乾燥法による水分定量条件の例*

食品群	乾燥温度（℃）	乾燥時間（時間）
穀粒、乾めん、せんべい類	135	3
穀粉（小麦粉、そば粉等）、でんぷん類	135	１－２
めし、生めん、ゆでめん	135	2
パン類（菓子パン等異種材料を多く含むものを除く）	135	1
いも類	100	5
切干しいも、乾燥マッシュポテト	105	3

大豆及び油の多い豆類（全粒）	130	3
その他の豆類	135	3
きな粉、脱脂大豆、凍豆腐	130	1
煮豆	V100**	5
油あげ、豆腐、納豆	100	5
みそ	V70	5
精製糖	105	3
液状糖、転化糖	V100	２－３
糖みつ	V90	3
油脂	105	1
種実（乾燥品、ロースト品）	130	1
くり、ぎんなん	130	2
魚介類及びその加工品	105	5
獣、鳥、鯨肉及びその加工品	135	2
卵	V100	5
液状乳、クリーム、アイスクリーム	98－100	3
発酵乳、乳酸菌飲料	V100	4
粉乳、練乳	98－100	３－４
チーズ	105	5
野菜、果実及びその加工品	V70	5
きのこ、海藻	105	5
甘酒、酒粕	V70	5
茶	98－100	5
コーヒー豆、ココア	105	5
しょうゆ、ソース、乾燥スープ等調味料	V70	5
生・半生菓子	105	5
洋菓子	V70	5

＊ ：全ての食品を本表の食品群に当てはめることはできない。一般的には、原材料等を考慮し最適な条件を設定する必要がある。

**：V は減圧加熱乾燥（Vacuum）を示す。

（５） プラスチックフィルム法[注1)]

① 適用される食品

粘質状、ペースト状等の食品に適用する。

② 装置及び器具

・電気定温乾燥器[注2)]（又は真空乾燥器）

・ポリエチレンフィルム製袋：硬質ポリエチレンフィルム製で、幅５～7.5 cm、長さ 12～14 cm、厚さ 0.04～0.06 mm くらいの低圧～中圧重合のもの[注3)]。

・デシケーター：乾燥剤を入れておく。

③　測定

袋の質量を精密に量り（W_0 g）、これに適量の試料[注4)]を採取後、袋の口を三つ折りにして、秤量（W_1 g）する。丸い棒をローラーにして、袋の折りしろを残し、外側から試料を圧延し、試料を袋の内面に薄く伸ばす。袋の口を開き袋をふくらませ、乾燥中閉じないようにする。所定の温度に調節された電気定温乾燥器又は真空乾燥器に入れ、所定の時間加熱乾燥する。次いで、フィルム袋の口を三つ折りにして閉じ、クリップで止めてデシケーター中で放冷する。室温に達したらクリップをはずし、秤量（W_2 g）する。通常は、一度で恒量に達するが、必要ならば袋の口を開き、再び所定の時間乾燥を行い放冷、秤量を繰り返す。

④　計算

$$\text{試料中の水分含量 (g/100 g)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

［注］

1）　フィルム袋のみで乾燥する直接フィルム法と、乾燥助剤としてけいそう土を添加混合してフィルム袋で乾燥するけいそう土添加フィルム法がある。乾燥は常圧加熱及び減圧加熱のいずれも適用できるが、ポリエチレンフィルムの耐熱限度から加熱温度は105 ℃以下に限定される。105 ℃以上の加熱乾燥が必要で、かつ粘質状の食品の水分測定にはアルミニウムはく製袋を用いて測定する方法もある。

2）　60～150 ℃の温度範囲において所定の温度の±２℃に調節可能なもので、器内の温度分布の均一なものが望ましく、強制循環通風式が一般的に用いられる。

3）　一般的なポリエチレンフィルム製袋の吸湿はごくわずかであるため、食品の水分測定には恒量を出す必要がなく、使用時に質量を量って用いる。ただし、プラスチックは静電気を帯びやすく、帯電すると秤量誤差が大きくなるので、不必要に擦ったりすることは避けなければならない。

4）　乾物量として１～2.5 g、袋の内面に薄く伸びる程度。

6　糖質

糖質は、当該食品の質量から、たんぱく質[注1)]、脂質、食物繊維、灰分[注2)]及び水分量を除いて算出する[注3）注4）注5）注6）注7)]。

ア　たんぱく質、脂質、食物繊維

イ　灰分及び水分の分析方法等は、それぞれ１、２、８並びに５ア及びイによる。

［注］

1）　たんぱく質以外の窒素成分を豊富に含む食品（例えば、白子のように核酸を豊富に含む食品や、大豆レシチン含有食品のように含窒素脂質であるレシチンを豊富に含む食品）にあっては、窒素定量換算法を適用

して得られたたんぱく質量は実際量より過大である点に留意すべきである。

2） 大豆レシチン含有食品等含リン脂質であるレシチンを豊富に含む食品にあっては、リンが脂質と灰分の両方に重複して測り込まれる点に留意すべきである。

3） エネルギーとして利用されない成分（抹茶に含まれるタンニン及びカフェイン、ココアに含まれるテオブロミン、チョコレート及びココアに含まれるポリフェノール、カプセル、錠剤等の食品に含まれる水溶性ビタミン等）が糖質として算出され、その寄与が無視できない場合、これらの成分を別途に測定し、差し引いたものを糖質とすることもある。なお、タンニン、カフェイン、テオブロミン及びポリフェノールの分析は「日本食品標準成分表分析マニュアル」に記載された方法に準拠する。

4） 当該食品の炭水化物量から食物繊維量を除く下記の計算式で算出することができる。なお、差引きの結果、数値が負の値となる場合は、糖質含量を０として差し支えない。

試料中の糖質含量（g/100 g）
= 炭水化物含量（g/100 g）－食物繊維含量（g/100 g）

5） カフェイン、テオブロミン、アセスルファム K、アスパルテーム等をたんぱく質の定量値から差し引く場合は、糖質からも差し引く。

6） 脂溶性ビタミン、カロテノイド等を脂質の定量値から差し引く場合は、糖質からも差し引く。

7） 水分以外の揮発成分（アルコール類及び酢酸等の揮発酸）を水分の定量値から差し引く場合は、糖質からも差し引くことが望ましい。

［参考文献］

1） 日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，46 タンニン，279-282（2023）

2） 日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，48 ポリフェノール，286-293（2023）

7 糖類

単糖類又は二糖類であって、糖アルコールでないものを糖類とする。ブドウ糖、果糖、ガラクトース、ショ糖、麦芽糖及び乳糖の６糖を基本的な測定対象[注1)]とし、必要に応じて原材料由来の特徴的な糖類[注2)]及び添加した糖類についても測定対象とする。測定した個々の糖類含量の総和を糖類含量とする。

［注］

1） 最新版の日本食品標準成分表炭水化物成分表編等から、検体に含まれていない事を示す合理的な根拠が得られる糖類については測定対象から

除くことができる。

2） 小麦製品・きのこ類等に含まれるトレハロースや、はちみつ・みそ等に含まれるイソマルトース等がある。

（1） ガスクロマトグラフ法[注1)]

① 装置及び器具

・ガスクロマトグラフ（GC）：水素炎イオン化検出器（FID）付き
・ロータリーエバポレーター
・充填カラム：ガスクロマトグラフィー用けいそう土を担体とし、50 %トリフルオロプロピル-メチルシリコンを液相としたもの又は同等品。

② 試薬

・標準品：水分を測定し[注2)]、無水物に換算する。
・エタノール
・石油エーテル：特級
・水酸化ナトリウム
・50 v/v%エタノール：99.5 v/v%エタノール - 水（1：1）
・10 w/v%水酸化ナトリウム溶液
・ピリジン：特級試薬に水酸化カリウム（粒状）を加え、よく振り混ぜて脱水する。
・トリメチルクロロシラン（TMCS）：GC 用トリメチルシリル化試薬
・ヘキサメチルジシラザン（HMDS）：GC 用トリメチルシリル化試薬
・ピレン：内標準物質

③ 試料の調製

固体試料はコーヒーミル等で粉砕する。

④ 試験溶液の調製

1） 基本操作

50 mL 容ビーカーに試料の適当量（0.5～5 g）を精密に量り（W g）、約 30 mL の水を加え、液性が酸性の場合には 10 w/v%水酸化ナトリウム溶液で中和する[注3)]。30 分間超音波抽出[注4)]した後、水で全量を 50 mL 容全量フラスコに移して定容する（V mL）。不溶物がある場合はろ紙[注5)]でろ過し、ろ液をメンブランフィルター（0.45 μm）でろ過して試験溶液とする。不溶物の量が多い場合は、定容する前にろ紙でろ過し、ビーカー及びろ紙を水で洗浄してからろ液を集めて定容する。試験溶液は目的成分の濃度によって適宜希釈又は濃縮して（希釈倍数：D）GC 用試験溶液とする。

2） たんぱく質又は多糖類を多く含む食品の場合

水の代わりに 50 v/v%エタノールを用いて、1）と同様の操作を行う。

3） 塩類を多く含む食品の場合

1）又は2）により調製した試験溶液（水溶液にしたもの）5～10 mL を採取して電気透析装置を用いて脱塩し[注6)]、GC 用試験溶液とする。

４）　脂質を多く含む食品の場合

50 mL 容の遠心管に試料の適当量（0.5～５g）を精密に量る（W g）。これに石油エーテル 40 mL を加えて、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離（2,000 回転/分、10 分間）して上澄み液を傾斜法により除去する。この脱脂操作を再度繰り返した後、窒素気流中又は 40 ℃の水浴中で残存する石油エーテル分を完全に蒸散させる。得られた残留物について、１）又は２）と同様の操作を行う。

⑤　標準溶液の調製

標準品 100 mg を約 80 mL の水に溶解した後、変旋光（α←→β）を平衡に達せしめるため約 80 ℃の水浴中で１時間加熱する。冷後、水を加えて正確に 100 mL（濃度：１mg/mL）とする。

⑥　トリメチルシリル化

試験溶液の適量（糖量として約 10 mg）を正確に量り、ロータリーエバポレーターを用いて水分を留去し、乾固させる。ピレンのピリジン溶液（濃度：0.2 mg/mL）２ mL を加えて溶かした後、TMCS0.1 mL、HMDS 0.2 mL を加えて、室温で 20～60 分間反応させる[注7)]。

⑦　測定

＜ガスクロマトグラフ操作条件例[注8)]＞

カラム：３%Silicone DC QF-１、Chromosorb W（AW、DMCS）60～80 メッシュ、３mm×２m、ガラス製

カラム温度：120～240 ℃（昇温）、６℃/分

注入口温度：250 ℃

キャリヤーガス：窒素又はヘリウム 40～60 mL/分

注入量：0.5～１μL

⑧　検量線の作成

標準溶液の 0.5、１、２、３、５mL をそれぞれ正確に量り、⑥～⑦の操作を試験溶液の場合と同時に行って検量線を作成する。

⑨　計算

$$\text{試料中の各糖類含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times \frac{100}{1{,}000}$$

C：検量線より求めた各糖類の濃度（mg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１）　糖類は一般に分子間の力が強いため揮発性が弱く、しかも熱にも不安定なため、直接 GC で定量することができない。そのために各種の揮発性誘導体に転換して、GC 分析に供する。

糖類の GC 用誘導体としてはトリメチルシリル（TMS）誘導体、トリフ

ルオロアセチル（TFA）誘導体、アセチル（Ac）誘導体、メチル（Me）誘導体、また糖をオキシムにしてから誘導体とする方法等がある。現在、糖の揮発性誘導体としてはTMS誘導体が一般的である。

２）　通常カールフィッシャー法により測定する。標準品の量が少量の場合は、減圧加熱乾燥法（例えば60 ℃、５時間）で乾燥したものを用いる。

３）　酸性のまま抽出すると糖が一部分解してしまうおそれがあるため、あらかじめpH5.0～7.0に調整する。

４）　試料に応じて、ホモジナイザー、乳鉢、振とう器等を用いて糖類の抽出を行っても良い。

５）　JIS ５種B又は同等品のろ紙を用いる。

６）　GC 用試験溶液中にナトリウムイオン等が多量に存在すると、妨害ピークを与えたり、カラムの劣化原因にもなるので、脱塩処理を行ったほうがよい。脱塩の方法は、電気透析装置のほか、イオン交換樹脂によってもよい。

７）　糖がピリジンに溶け難い場合等は、加温しながら反応させる。反応液は塩化アンモニウムの析出によって白濁するが、上澄み液をそのままGCに注入する。

８）　TMS誘導体を用いて、食品中の糖類を定量するのに適しているとされている充てん剤（液相）には、Silicone SE-30、Silicone OV-１、Silicone OV-101、Silicone SE-52、Silicone SE-54、Silicone OV-17、Silicone DC QF-１、Silicone XE-60等がある。

（２）　高速液体クロマトグラフ法

①　装置及び器具

・ロータリーエバポレーター
・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：屈折率検出器付き[注1)]
・カラム[注2)]：アミノプロピル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム

②　試薬

・標準品：水分を測定し[注3)]無水物に換算する。
・アセトニトリル：HPLC用又は残留農薬用
・エタノール
・石油エーテル：特級
・水酸化ナトリウム
・50 v/v%エタノール：99.5 v/v%エタノール-水（１：１）
・10 w/v%水酸化ナトリウム溶液

③　試料の調製

固体試料はコーヒーミル等で粉砕する。

④　試験溶液の調製

１）　基本操作

50 mL 容ビーカーに試料の適当量（0.5～５g）を精密に量り（W g)、約 30 mL の水を加え、液性が酸性の場合には 10 w/v%水酸化ナトリウム溶液で中和する[注4)]。30 分間超音波抽出した後、水で全量を 50 mL 容全量フラスコに移して定容する（V mL)。不溶物がある場合はろ紙[注5)]でろ過し、ろ液をメンブランフィルター（0.45 μm）でろ過して試験溶液とする。不溶物の量が多い場合は、定容する前にろ紙でろ過し、ビーカー及びろ紙を水で洗浄してからろ液を集めて定容する。試験溶液は目的成分の濃度によって適宜希釈又はロータリーエバポレーターで濃縮して HPLC 用試験溶液とする。

２）　たんぱく質又は多糖類を多く含む食品の場合

水の代わりに 50 v/v%エタノールを用いて１）と同様の操作を行う。

３）　塩類を多く含む食品の場合

１）又は２）により調製した試験溶液（水溶液にしたもの）５～10 mL を採取して電気透析装置を用いて脱塩し[注6)]、HPLC 用試験溶液とする。

４）　脂質を多く含む食品の場合

50 mL 容の遠心管に試料の適当量（0.5～５g）を精密に量る（W g)。これに石油エーテル 40 mL を加えて、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離（2,000 回転/分、10 分間）して上澄み液を傾斜法により除去する。この脱脂操作を再度繰り返した後、窒素気流中あるいは 40 ℃の水浴中で残存する石油エーテル分を完全に蒸散させる。得られた残留物について、１）又は２）と同様の操作を行う。

⑤　標準溶液の調製[注7)]

１）　HPLC 用試験溶液の溶媒が水の場合

標準品各 100 mg を精密に量り、水に溶解して 25 mL に定容する。この液から２、５及び 10 mL を採取して、それぞれ水で 20 mL に定容する[注8)]。

２）　HPLC 用試験溶液の溶媒が 50 v/v%エタノールの場合

標準品各 100 mg を精密に量り、50 v/v%エタノールに溶解して 25 mL に定容する。この液から２、５及び 10 mL を採取して、それぞれ 50 v/v%エタノールで 20 mL に定容する[注8)]。

⑥　測定

HPLC 試験溶液の一定量を HPLC に注入し、各糖のピーク高さ[注9)]を測定する。同様に各標準溶液の同量を HPLC に注入して各糖のピーク高さを測定し、検量線を作成する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注10)]＞

カラム：Wakosil 5NH2（富士フイルム和光純薬）又は相当品[注11)]、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

移動相：アセトニトリル - 水（75:25）[注12)]

検出器：屈折率検出器
流速：1.0 mL/分
温度：室温

⑦ 計算

$$\text{試料中の各糖含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times \frac{100}{1{,}000}$$

C：検量線より求めた各糖類の濃度（mg/mL）
V：定容量（mL）
D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

［注］

１） 糖の検出には、屈折率検出器のほかに蛍光検出器（蛍光誘導体化が必要）又はパルス電気化学検出器等も利用できる。

２） 測定する糖の種類や試料により種々のカラムが利用可能であるが、ここでは汎用性の高い代表的なもののみを示す。

３） 通常カールフィッシャー法により測定する。標準品の量が少量の場合は、減圧加熱乾燥法（例えば60℃、５時間）で乾燥したものを用いる。

４） 酸性のまま抽出すると糖が一部分解してしまうおそれがあるため、あらかじめpH5.0～7.0に調整する。

５） JIS ５種B又は同等品のろ紙を用いる。

６） HPLC用試験溶液中にナトリウムイオン等が多量に存在すると、妨害ピークを与えたり、カラムの劣化原因にもなるので、脱塩処理を行ったほうがよい。脱塩の方法は、電気透析装置のほか、８ 食物繊維（２） 高速液体クロマトグラフ法（酵素-HPLC法）等に記されたイオン交換樹脂によってもよい。

７） 溶媒の種類はピーク高さに影響するので、HPLC用試験溶液と標準溶液の溶媒を統一する必要がある。試験溶液にエタノール等揮発成分を含む場合、試験溶液を減圧乾固した後、水に再溶解することで、水で調製した標準溶液を使用することができる。

８） 標準溶液の濃度は、使用する検出器の感度を考慮して設定する。

９） 完全分離しないようなきょう雑ピークが認められる場合、ピーク面積測定では誤差が大きくなるのでピーク高さ測定を採用する。なお、試験溶液を適当な酵素（目的とする糖ときょう雑する糖の組み合わせによりアミログルコシダーゼ、β-フラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ等を使い分ける。）で処理することにより、きょう雑ピークを除去できることがある。

10） HPLC 操作条件を以下に変えることにより、オリゴ糖類の分析を行うこともできる。

カラム：Wakosil 5NH2（富士フイルム和光純薬）又は相当品[注11)]、内径

4.6mm、長さ 250 mm、ステンレス製

移動相：アセトニトリル - 水（70:30）[注 12)]

検出器：屈折率検出器

流速：1.0 mL/分

温度：室温

注入量：20 μL

11） Shodex Asahipak NH_2P-50（昭和電工）等のアミノポリマ系カラムも使用可能。

12） 適切な移動相の条件を調整すること。アミノシリカ系カラムは使用時間とともに徐々に溶出時間が短くなるので、溶出時間をほぼ一定に保つように混合比率を調整する。なお、アセトニトリルの割合を増やすと溶出は遅くなる。

8 食物繊維

基本的にはプロスキー法（Prosky 法、酵素-重量法）によって定量されるもの、すなわち熱安定 α-アミラーゼ、プロテアーゼ及びアミログルコシダーゼによる一連の処理によって分解されない多糖類及びリグニンを食物繊維とする[注)]。

ただし、一連の酵素処理後に約 80 v/v%のエタノール中では沈殿を生成しない低分子量水溶性食物繊維を多く含む食品については、示差屈折率検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC）で測定する酵素-HPLC 法１を適用する[注)]。

さらに、熱安定 α-アミラーゼ処理時における高温で分解してしまう難消化性でん粉を多く含む食品については、酵素-HPLC 法２を適用する[注)]。

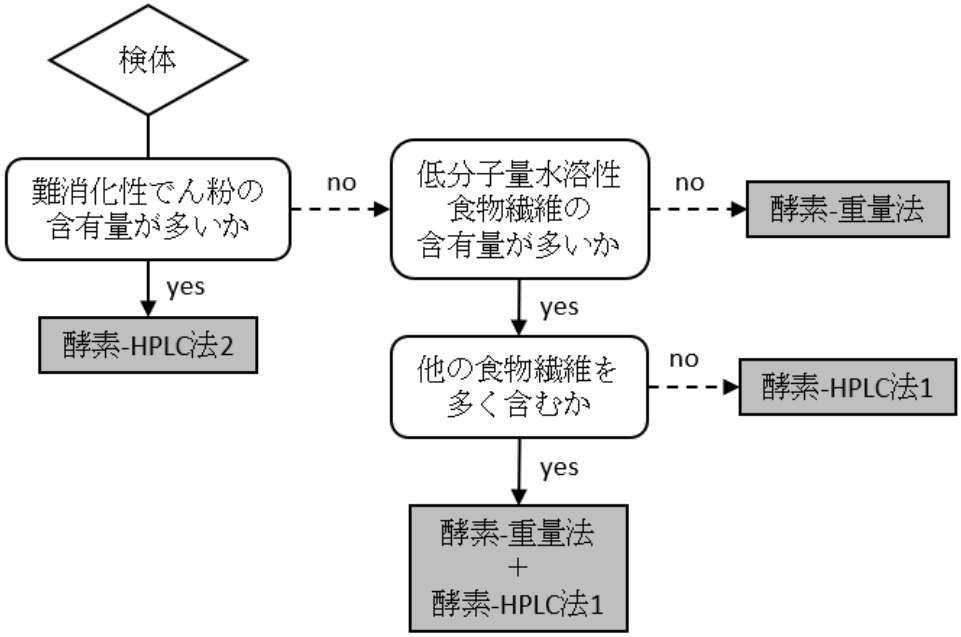
［注］

食物繊維の分析方法を選択するための参考として、フローチャートを次図に示す。また、各食品に含まれる低分子量水溶性食物繊維及び難消化性でん粉の標準的な量については、日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）炭水化物成分表編も参考とされたい。

［参考文献］

文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会食品成分委員会報告：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）炭水化物表編”， 別表１ 可食部 100 g 当たりの食物繊維成分表，89148（2021）

（図．参考）



（１）　プロスキー法（酵素-重量法）[注1)]

①　装置及び器具

・凍結乾燥器
・乾燥器
・減圧乾燥器
・粉砕器
・ふるい
・るつぼ形ガラスろ過器：耐熱性るつぼ形ガラスろ過器 G-２[注2)] をよく洗浄し、525±５℃で 1 時間加熱したものを用いる。けいそう土（セライト）約 0.5 g[注3)] を入れ、水 20 mL で３回以上、さらに 78 v/v%エタノール 20 mL で３回以上洗浄して風乾した後、130±５℃で１時間加熱して恒量を求める。使用前までデシケーター中で保存する。
・ろ過装置：るつぼ形ガラスろ過器が装着できるもの。

②　試薬

・0.08 mol/L リン酸緩衝液[注4)]：リン酸水素二ナトリウム（特級）1.400 g（２水塩の場合は 1.753 g，12 水塩の場合は 3.53 g）と、リン酸二水素ナトリウム１水塩（特級）9.68 g（２水塩の場合は 10.94 g）を水に溶かし、pH を 6.0 に調整して１L とする。
・熱安定 α-アミラーゼ溶液：E-BLAAM（Megazyme（Neogen）製）等[注5) 注6)] の熱安定の α-アミラーゼを用いる。冷蔵する。
・プロテアーゼ溶液：E-BSPRPD（Megazyme（Neogen）製）等[注5) 注6)] のプロテアーゼを 50 mg/mL となるように、0.08 mol/L リン酸緩衝液に溶解する。この溶液は用時調製する。

・アミログルコシダーゼ溶液：E-AMGDFNG（Megazyme（Neogen）製）等[注5）注6）]のアミログルコシダーゼを用いる。冷蔵する。
・ろ過助剤：富士フイルム和光純薬製等のセライトNo. 545（酸洗浄済み）等を、525±５ ℃で１時間以上加熱して用いる。粒度は 30～60 メッシュがよいが、細かい部分はるつぼ形ガラスろ過器とともに、洗浄することによって除かれる。
・エタノール：95 v/v%
・0.275 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 11 g を水に溶かして１ L とする。
・0.325 mol/L 塩酸溶液：塩酸 28 mL に水を加えて 1 L とする。
・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③　試料の調製

穀類、豆類、種実類等、水分の少ない食品では、そのまま粉砕器で粉末とする。果物や糖分の多い加工食品等、乾燥しにくい食品ではホモジナイザーで処理してそのまま試験操作に移る。野菜、きのこ類等水分が多く、そのままでは均一化が難しい食品では、直接又はホモジナイザーで処理した後、凍結乾燥するか、70 ℃で一夜乾燥して粉末とする。いずれの場合も、本法では試料の粒度が定量値に影響するので、粒度は目安として 0.5 mm（30 メッシュ）以下になるようにする。

固体試料でおよそ 10 %以上の脂質を含む場合は、脱脂を次のような操作によって行う。粉末試料の５g を 200 mL 容遠心管に精密に量り、１g につき 25 mL の石油エーテル、ジエチルエーテル、n-ヘキサン等の抽出溶媒を加え、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離し、上澄み液をガラスろ過器（G-３）に流し込む。さらに、同様の操作を２回繰り返し、最後は全量をガラスろ過器に流し込み、風乾後、秤量し粉末とする。

乾燥及び脱脂による質量の変化を記録し、それぞれ生試料に対しての減量割合を求める。脂質及び水分を多く含む試料では、あらかじめ脱脂試料を調製するのではなく、測定操作の中にエーテルによる脱脂処理を組み込んでもよい。

④　測定

１）　熱安定 α-アミラーゼによる消化

試料１～10 g を 0.0001 g まで精密に二つ量り（S_P、S_A mg）[注7）]、それぞれをトールビーカーに入れ、一方（S_P）をたんぱく質測定用、他方（S_A）を灰分測定用とする。それぞれのビーカーに 0.08 mol/L リン酸緩衝液 50 mL を加え[注8）]、pH が 6.0±0.5 であることを確認する。これに熱安定 α-アミラーゼ溶液 0.05 mL を加え、アルミニウムはくで覆い、沸騰水浴中に入れ、５分ごとにかくはんしながら 30 分間放置する。

沸騰水浴は、ビーカーを入れることによって温度が低下しないように、十分な大きさを持つものが望ましい。小さな水浴を用いる場合は、水浴が

再び沸騰し始めてから 30 分間放置する。

2） プロテアーゼによる消化

ビーカーを冷却後、0.275 mol/L 水酸化ナトリウム溶液約 10 mL を加えて、pH 7.5±0.1 に調整する。プロテアーゼ溶液 0.1 mL を加え、ビーカーを再びアルミニウムはくで覆い、60±２ ℃の水浴中で振とうしながら 30 分間反応させる。

3） アミログルコシダーゼによる消化

ビーカーを冷却後、0.325 mol/L 塩酸約 10 mL を加え、pH 4.3±0.3 に調整する。アミログルコシダーゼ溶液 0.1 mL を加え、アルミニウムはくで覆い、60±２℃水浴中で振とうしながら 30 分間反応させる。

4） 沈殿の生成

室温において酵素反応液の４倍量に相当するエタノールを、60±２℃に加温してから酵素反応液に加え、室温に正確に 60 分間放置して、食物繊維を沈殿させる。放置時間が長くなると、無機質の沈殿が生成して、ろ過に時間が掛かり、誤差の原因となる。

5） ろ過

78 v/v%エタノールによって、るつぼ形ガラスろ過器のけいそう土を底に均一にしておく。吸引しながら食物繊維を含む酵素反応液をろ過器に流し込む。ビーカー及びろ過器を 78 v/v%エタノール 20 mL で３回、95 %エタノール 10 mL で２回以上、アセトン 10 mL で２回以上[注9)]順次洗浄する。

6） 乾燥・秤量

残留物を含むろ過器を一夜 105±５℃で乾燥し、デシケーター中で冷却後、0.1 mg まで秤量する。それぞれの質量を R_p mg 及び R_A mg とする。

7） 残留物中のたんぱく質の定量

たんぱく質測定用の残留物は、けいそう土とともにかき取り、窒素定量換算法によって残留物中の窒素含量を定量する。窒素・たんぱく質換算係数 6.25 を乗じてたんぱく質含量（P mg）を求める。

8） 残留物中の灰分の定量

灰分測定用の残留物は、525±５ ℃で５時間灰化する。デシケーター中で冷却後、0.1 mg まで秤量し、残留物の灰分含量（A mg）を求める。

9） 空試験

空試験は、試料を含まずに同様に操作し、それぞれ乾燥・秤量後の残留物を R_{PB} mg、R_{AB} mg、残留物中のたんぱく質含量（P_B mg）及び灰分含量（A_B mg）を求める[注10)]。

⑤ 計算

$$\text{ブランク (B mg)} = \frac{(R_{PB} + R_{AB}) - \left(\frac{P_B}{R_{PB}} + \frac{A_B}{R_{AB}}\right)(R_{PB} + R_{AB})}{2}$$

乾燥・脱脂試料中の食物繊維含量 (D g/100 g)

$$= \frac{(R_P + R_A) - \left(\frac{P}{R_P} + \frac{A}{R_A}\right)(R_P + R_A) - 2B}{S_p + S_A} \times 100$$

生試料中の食物繊維含量 $(TDF\ g/100\ g) = D\left(1 - \frac{W + F}{100}\right)$

W：乾燥減量（%）

F：脱脂減量（%）

［注］

１） 食物繊維の定量法としては、ここに採用した酵素-重量法が簡便で、信頼性の高い方法である。

本法は、Asp ら、Prosky らによって提案され、AOAC 法として採用されて広く用いられるようになった。我が国でも衛生試験法・注解等に採用された。なお、動物性食品やきのこ類に含まれるキチンやキトサンは、食物繊維と考えられるが、窒素を含むため、本法では正確に定量されない。

「キトサン加工食品」のようにキトサンを豊富に含む食品では、この点に留意する必要がある。しかし、食物繊維の主たる給源となる食品は植物性食品であり、これらの食品の多くは、本法の適用にはほとんど問題はない。

また、食品の原材料として用いられる水溶性食物繊維の中には、一連の酵素処理後、約 80 v/v%のエタノール中では沈殿を生成しないための本法では正しく定量できないものがある。それらについては示差屈折率検出器付き高速液体クロマトグラフ法を適用する。

２） フィルターの直径約４cm のもの（２G２）がよい。

３） るつぼ形ガラスろ過器として２G２を使用する場合には、約１g 程度のけいそう土が必要。

４） カルシウムを豊富に含む食品の場合、リン酸緩衝液を用いるとリン酸カルシウムの沈殿が形成され、これが結晶水を含むと残渣の灰分を正しく補正できないために食物繊維量を過大に評価してしまうことがある。したがって、「カルシウム含有食品」のようにカルシウムを豊富に含む食品の場合には、リン酸緩衝液に代えて、MES-TRIS 緩衝液（MES：2-（N-Morpholino）ethanesulfonic acid、TRIS：Tris（hydroxymethyl）aminomethane）の使用が望ましい。なお、使用する熱安定 α-アミラーゼとプロテアーゼの種類及び反応 pH がリン酸緩衝液の場合と微妙に異なるので、詳細については AOAC991.43 法を参照されたい。

５） 調整済みの酵素溶液は、グリセロールを安定剤として含むことがある。酵素-HPLC 法 1 を行う際には、グリセロールを含まない酵素溶液を用いるか、グリセロール以外の内部標準物質を用いる必要がある。

６）　酵素によっては、大麦及びえん麦由来の β-グルカンを分解するエンドセルラーゼ（β-グルカナーゼ）の混入が認められることが報告されている。酵素が試料中の食物繊維の測定に適しているかどうかは参考文献３）に記載された方法により確認することができ、必要に応じ酵素条件を考慮すること。

７）　固形分として約１g 相当量を採取することを目安とするが、粘性が高く、ろ過操作が困難な試料の場合には、採取量を 0.1～0.5 g に下げた方がよい。S_P と S_A の差は 20 mg 以内でなければならない。

８）　試料採取量が多い場合は全量が約 50 mL になるように加える緩衝液の量を加減する。

９）　脂質の多い試料等では、アセトンによる洗浄を 30 mL ずつで５回程度に増やした方がよい。

さらに、アセトンによる洗浄の後、ジエチルエーテル 10 mL で３回以上洗浄すれば、より効果的である。

10）　同一のロットの酵素に限り、10～20 回程度の繰返し測定値からブランク値を係数化してもよい。

[参考文献]

１）　Asp, N.G., et. al：J. Agric. Food Chem., 31, 476 (1983)

２）　Prosky, L., et. al:J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 1044(1984), 68, 677 (1985), 69, 259 (1986)

３）　AOAC Official Method 996.06: Total Dietary Fiber in Foods. Enzymatic-Gravimetric Method

４）　日本薬学会編：“衛生試験法・注解”, 295, 金原出版 (1990)

５）　AOAC Official Method 991.43: Total,Soluble,and Insoluble Dietary Fiber in Foods

（２）　高速液体クロマトグラフ法

１）　酵素-HPLC 法１[注1)]

①　適用される食品

プロスキー法では分析が困難とされる低分子水溶性食物繊維を含む食品に適用される。

本法では、まず、プロスキー法で食物繊維を定量する。次にろ過工程で発生するろ液についてイオン交換樹脂によりたんぱく質、有機酸類、無機塩類を除去し高速液体クロマトグラフィーに供し、得られるクロマトグラム上で食物繊維画分（三糖類以上）と単糖類、二糖類画分とを分け、食物繊維画分とブドウ糖のピーク面積の比率を求める。同時に、内標準物質[注2)]としてでんぷんの分解等により生成するブドウ糖の質量を別途酵素法により求め、ピーク面積比率にブドウ糖質量を掛けることにより低分子水溶性食物繊維含量を求め、先にプロスキー法により求めた値と併せることにより総食物繊

維を求める方法である。

② 装置及び器具

・ろ過装置：ガラスろ過器が装着でき、ろ液が回収しやすいもの。
・ロータリーエバポレーター
・メンブランフィルター（0.45μm）
・高速液体クロマトグラフ：脱気装置、屈折率検出器付き
・カラム：ゲルろ過系、又は配位子交換樹脂系[注3)]
・充填イオン交換樹脂カラム：OH 型及び H 型の二つの樹脂を１：１に混合したもの又は相当品[注4)][注5)]

③ 試薬

・ピラノースオキシダーゼ[注6)]
・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

④ 試料の調製

（１）プロスキー法（酵素-重量法）の、④測定５）ろ過の操作で得られたろ液について、95 v/v%エタノール洗浄までの全量を定量的に回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、エタノール分を除去した後 100 mL 定容とし低分子水溶性食物繊維を含む酵素処理液とする。酵素処理液に不溶物が含まれる場合にはろ過する。

⑤ 測定

１） たんぱく質、有機酸、無機塩類の除去[注7)]（イオン交換樹脂による）

上記の酵素処理液 50 mL をイオン交換樹脂 50 mL を充填したカラム（ガラス管、20 mm×300 mm）に SV1.0（通液速度：50 mL 溶液/１時間）で通液し、さらに蒸留水で押し出し、溶出液 200 mL とする。この溶液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、水で適当な濃度（例えば、Brix５程度）に調整して孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフィーに供する。

２） 高速液体クロマトグラフィー

１）で調製した試験溶液を次に示す高速液体クロマトグラフ操作条件で注入し、高速液体クロマトグラムを得る。内標準物質（ブドウ糖又は添加内標準物質）及び食物繊維画分[注8)]のピーク面積を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

カラム：TSKgel G2500PW$_{XL}$（東ソー）、内径 7.8 mm、長さ 300 mm を２本直列に接続
カラム温度：80 ℃
移動相：水
流速：0.5 mL/分
注入量：20 μL

３） 内標準物質

１）で得られる酵素処理液中のブドウ糖をピラノースオキシダーゼで測

定し、その含量を求め、標準物質とする。酵素処理後に既知質量の内標準物質（種々選択できるが、例えばグリセリン）を添加し同様の操作を行い、ブドウ糖に代わる標準物質とすることができる。ただし、この場合、当該内標準物質の感度をブドウ糖の感度に対して補正する必要がある[注2)]。

⑥ 計算

低分子水溶性食物繊維質量 (B mg)

$$= \frac{\text{食物繊維のピーク面積}}{\text{ブドウ糖のピーク面積}} \times \text{酵素処理溶液中のブドウ糖質量 (mg)}$$

低分子水溶性食物繊維質量 (C mg)

$$= \frac{\text{食物繊維のピーク面積}}{\text{添加内標準物質のピーク面積}} \times \text{補正係数} \times \text{内標準物質質量 (mg)}$$

乾燥・脱脂試料中の低分子水溶性食物繊維含量 (D g/100g)

$$= \frac{\text{食物繊維質量 B or C (mg)}}{\text{試料採取量 (mg)}} \times 100$$

生試料中の低分子水溶性食物繊維含量 (E g/100 g)

$$= \mathrm{D}\left(1 - \frac{\text{乾燥減量\%} + \text{脱脂減量\%}}{100}\right)$$

生試料中の総食物繊維含量（g/100g）=プロスキー法で求めた食物繊維含量（TDF g/100 g）+低分子水溶性食物繊維含量（E g/100 g）

［注］

1） 本法は、国際的に受け入れられているプロスキー法を基本とし、高速液体クロマトグラム上で食物繊維画分を測定する方法であり、「ヒトの消化酵素により分解されない食品成分」としての基本概念を大きく異にするものではない。それ以上に、最近の参考文献３）によると次世代の定量方法として酵素-HPLC 法は期待されているものである。

本法に記載される酵素処理を行った場合、消化性のでんぷん、水飴、デキストリンはほぼ完全にブドウ糖にまで加水分解される。また、還元水飴もブドウ糖及びマルチトールとなり、二糖類までを糖類、また糖アルコールとするならば、ほぼ、完全に食物繊維から除去できる。しかし、難消化性のオリゴ糖を併用した食品の場合、単一カラムでは測定できな

くなるため、別法、又は、他の概念を入れる必要がある[注9)]。

2） 試料の種類又は使用する分離カラムの種類によっては、高速液体クロマトグラム上で共存成分のピークがブドウ糖のピークを妨害する可能性があるので、ブドウ糖に代えてグリセリン等を内標準物質として添加する方法も用いてよい。ただし、その場合、添加内標準物質は酵素処理液を定容する際に既知質量を添加するものとする。なお、ブドウ糖と添加内標準物質の感度（同質量当りのピーク面積）に差があるため、ブトウ糖の感度を基準として添加内標準物質のピーク面積を補正する必要がある。補正は、あらかじめ求めた補正係数（有効数字２桁）を乗ずることによるものとする。例えば、同質量のグリセリンとブドウ糖の同一クロマトグラフ操作条件におけるピーク面積比は、用いる操作条件で多少異なるものの、およそ 0.82:１である。すなわち、補正係数として 0.82 に近い数値が得られることになる。補正係数は一度求めておけば、クロマトグラフ操作条件を変更しない限り同一の係数を用いてよい。グリセリン以外の物質を内標準とする場合についても同様である。

3） カラムは配位子交換系又はゲルろ過系のものを用いる。ただし、前者ではナトリウム型又はカルシウム型のもの（例えば、Ultron PS-80N、MCI-GEL CK08EC 等）が推奨できる。また、後者では 5,000 程度の排除限界分子量を持つもの（例えば、TSKgelG2500PW$_{XL}$、Shodex Asahipak GS220HQ 等）を２本直列に接続して用いることを推奨する。

4） アンバーライト IRA-67（OH 型）アンバーライト 200CT（H 型）：オルガノ（株）製等がある。なお、アンバーライト 200CT（Na 型）を使用する場合は、使用時に希塩酸で H 型に変換し、十分水洗して使用すること。

5） 陽イオン交換固相カラム（Bond Elut Jr SCX 等）に陰イオン交換固相カラム（Bond Elut PSA）を接続したものも使用できる。

6） ピラノースオキシダーゼ法によるブドウ糖測定キット（デタミナーGL-E：日立化成ダイアグノスティックス・システムズ株式会社製）が市販されている。

7） 明らかに低分子水溶性食物繊維だけを使用した食品（飲料等）についてはエタノール沈殿を行う前の酵素処理液についてイオン交換樹脂以降の操作をすることができる。

8） 原則として、三糖類のひとつであるマルトトリオースのピーク溶出位置を指標とし、これと同じかこれより前に溶出するものを食物繊維画分とする。

9） 消化性画分、難消化性オリゴ糖画分と食物繊維画分についての考え方：

二糖類ピーク中には、ショ糖、乳糖が含まれる可能性があるので、三糖類以上のピークを難消化性画分（難消化性オリゴ糖と食物繊維画分よ

りなる）とする。

この難消化性画分に難消化性オリゴ糖（ただし、「35 熱量」の項においてエネルギー換算係数の設定されているもの）が含まれており、その含量表示がなされている試料の場合、オリゴ糖分析カラム（例えば、アミノプロピルカラム：溶液：アセトニトリル-水）を用い、HPLC により三糖類以上の難消化性オリゴ糖を定量し、難消化性画分より差し引いたものを食物繊維量とする。なお、難消化性オリゴ糖の中には食物繊維の定量操作の過程で部分的に分解される可能性のあるものもあるので、この点は酵素処理液（ただし、酵素処理液自体は塩類等を含んでいるので、⑤１）の処理で得られる高速液体クロマトグラフィー用の液）で確認する必要がある。

［参考文献］

１）　日本農芸化学会誌，64，3，539（1990）

２）　J. Assoc. Off. Anal. Chem.，68，677（1985）

３）　J. Assoc. Off. Anal. Chem.，78，22（1995）

４）　特定保健用食品試験検査マニュアル　低分子アルギン酸の項

５）　Anal. Sci.，35，11，1269-1274（2019）

６）　AOAC Official Method 2001.03: Dietary Fiber Containing Supplemented Resistant Maltodextrin(RMD) - High MW RMD by Method 985.29 and low MW RMD by HPLC Enzymatic-Gravimetric Method and Liquid Chromatographic Determination

２）　酵素-HPLC 法２

①　適用される食品

難消化性でん粉の含有量が多い食品に適用される。

②　装置及び器具

・凍結乾燥器

・酵素反応用ボトル：容量 250 mL のプラスチック蓋付の広口ガラスボトル等

・るつぼ形ガラスろ過器：耐熱性るつぼ形ガラスろ過器 G-２[注1)]をよく洗浄し、525±５℃で 1 時間加熱したものを用いる。けいそう土（セライト）約 0.5 g[注2)]を入れ、水 20 mL で３回以上、さらに 78 v/v%エタノール 20 mL で３回以上洗浄して風乾した後、130±５℃で１時間加熱して恒量を求める。使用前までデシケーター中で保存する。

・ろ過装置：るつぼ形ガラスろ過器が装着できるもの。

③　試薬

・エタノール：95 v/v%

・マレイン酸緩衝液：マレイン酸 11.6 g を 1600 mL の水に溶かし、10 w/v%水酸化ナトリウム溶液で pH 6.0 に調整後、塩化カルシウム二水

和物 0.6 g を溶かし２L としたもの。

・膵臓α-アミラーゼ：Megazyme（Neogen）社製、E-PANAA 又は同等品[注3)]

・アミログルコシダーゼ：Megazyme（Neogen）社製、E-AMGDF 又は同等品[注3)]

・プロテアーゼ：Megazyme（Neogen）社製、E-BSPRT 又は同等品[注3)]

・膵臓α-アミラーゼ（50 U/mL）/アミログルコシダーゼ（3.4 U/mL）溶液：膵臓 α-アミラーゼをマレイン酸緩衝液に 50 U/mL の濃度になるように溶かし、５分間かくはん後、アミログルコシダーゼを 3.4 U/mL の濃度になるように加えかくはんする。用時調製する。

・0.75 mol/L トリス緩衝液：トリス 90.8 g を水に溶かし、１L としたもの。

・２mol/L 酢酸溶液：酢酸 115 mL に水を加えて１L としたもの。

・高速液体クロマトグラフ用内標準物質：既知質量の内標準物質をブドウ糖に代わる標準物質として用いる。〔例〕D-ソルビトール、ジエチレングリコール

・高速液体クロマトグラフ用保持時間標準品：マルトトリオースの溶出位置が確認できるもの[注3)]。

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

④　試料の調製

穀類、豆類、種実類等、水分の少ない食品では、そのまま粉砕器で粉末とする。果物や糖分の多い加工食品等、乾燥しにくい食品ではホモジナイザーで処理してそのまま試験操作に移る。野菜、きのこ類等水分が多く、そのままでは均一化が難しい食品では、直接又はホモジナイザーで処理した後、凍結乾燥するか、70 ℃で一夜乾燥して粉末とする。いずれの場合も、本法では試料の粒度が定量値に影響するので、粒度は目安として 0.5 mm（30 メッシュ）以下になるようにする。

固体試料でおよそ 10 %以上の脂質を含む場合は、脱脂を次のような操作によって行う。粉末試料の５g を 200 mL 容遠心管に精密に量り、１g につき 25 mL の石油エーテル、ジエチルエーテル、n-ヘキサン等の抽出溶媒を加え、時々かくはんしながら 15 分間放置した後、遠心分離し、上澄み液をガラスろ過器（G-３）に流し込む。さらに、同様の試料の脱脂操作を２回繰り返し、最後は全量をガラスろ過器に流し込み、風乾後、秤量し粉末とする。

乾燥及び脱脂による質量の変化を記録し、それぞれ生試料に対しての減量割合を求める。脂質及び水分を多く含む試料では、あらかじめ脱脂試料を調製するのではなく、測定操作の中にエーテルによる脱脂処理を組み込んでもよい。

⑤　測定

1）　試料採取

試料（採取する量は１～10 g）は、0.0001 g まで精密に、ほぼ同質量となるように量ったものを２つ用意する。それぞれ酸素反応用ボトルに入れ、一方（W_1）を非消化性たんぱく質測定用、他方（W_2）を灰分測定用とする。ただし、採取する量について、乾燥試料は１g とし、果実類のようにそのままホモジナイズした液状又はペースト状のものは２～10 g とし、粘質性の食品などろ過時間が極端に長くなるものは１g 未満とする[注4)]。

2）　膵臓 α-アミラーゼ/アミログルコシダーゼ処理

試料を１mL の 95 v/v%エタノールで湿らせ、膵臓 α-アミラーゼ（50 U/mL）/アミログルコシダーゼ（3.4 U/mL）溶液 40 mL をそれぞれのボトルに加えて蓋をした後、37 ℃の水浴中で振り混ぜながら 16 時間反応させる[注5)]。

3）　pH8.2 調整、膵臓 α-アミラーゼ/アミログルコシダーゼ不活性化

２）の反応後、水浴中からボトルを取り出し、直ちに 0.75 mol/L トリス緩衝液３mL を加えて、pH7.9～8.4 に調整する。すぐにボトルの蓋を少し緩め、沸とう水浴に入れ、時々軽く振り混ぜながら 20 分間加熱する。

4）　プロテアーゼ処理

約 60 ℃まで冷却後、プロテアーゼ 0.1 mL をボトルに加え、60 ℃の水浴中で振り混ぜながら 30 分間反応させる。

5）　pH4.3 調整、内標準物質の添加

２mol/L 酢酸溶液４mL を各ボトルに加え、pH4.1～4.5 に調整する。さらに、既知質量の内標準物質を各ボトルに加え、よく混合する。

6）　ろ過（水溶性、不溶性食物繊維の分別）

るつぼ形ガラスろ過器に吸引しながら酵素処理液を流し込み、残渣（不溶性食物繊維画分）とろ液（水溶性食物繊維画分）とに分ける。ボトルの内壁及びろ過器上の残渣を少量の水（約 20mL）で洗浄し、洗液はろ液に合わせる。

7）　高分子量水溶性食物繊維の定量

ろ液にその４倍量の 95 v/v%エタノールをあらかじめ 60 ℃に加温してから加え、室温で正確に 60 分間静置して高分子量水溶性食物繊維を沈澱させる。６）と同じ要領で吸引ろ過を行い、残渣とろ液とに分ける。るつぼ型ガラスろ過器上に捕集された残渣を 78 v/v%エタノール 15 mL で２回、95 v/v%エタノール 15 mL で２回、アセトン 15 mL で２回順次洗浄する[注6)]。洗液はろ液に合わせる。ろ過器ごと 105±５℃で一夜乾燥し、デシケーター中で放冷後、0.1 mg の単位で量って、この残渣を非消化性たんぱく質測定用（R_1）、灰分測定用（R_2）とする。これらの残渣中のたんぱく質（P_1）と灰分（A_1）を、それぞれ９）、10）に示す方法で定量し、残渣質量から差し引く。

8）　不溶性食物繊維の定量

６）のろ過操作で得られたろ過器上の残渣を 78 v/v%エタノール 15 mL で２回、95 v/v%エタノール 15mL で２回、アセトン 15 mL で２回順次洗浄する[注6)]。ろ過器ごと 105±５℃で一夜乾燥し、デシケーター中で放冷後、0.1 mg の単位で量って、この残渣を非消化性たんぱく質測定用（R_3）、灰分測定用（R_4）とする。これらの残渣中のたんぱく質（P_2）と灰分（A_2）を、それぞれ９）、10）に示す方法で定量し、残渣質量から差し引く。

９）　残渣中のたんぱく質の定量

残渣（R_1及びR_3）をそれぞれけいそう土とともにかき取り、ケルダール法又は燃焼法によって、これらの残渣中の窒素含量を求める。得られた窒素含量に 6.25 を乗じて、たんぱく質量（P_1及びP_2）とする。

10）　残渣中の灰分の定量

残渣(R_2及びR_4)をガラスろ過器ごと 525±５℃で５時間灰化処理し、デシケーター中で放冷後、0.1 mg の単位で量って、これらの残渣中の灰分（A_1及びA_2）を得る。

11）　ろ液の溶媒留去

６）のろ過操作で得られたろ液について、ロータリーエバポレーターで溶媒を蒸発乾固する。残留物を水 10 mL に溶かし、カラムクロマトグラフィー用試料溶液とする。

12）　カラムクロマトグラフィー

ポリプロピレンカラムに、あらかじめ Amberlite®FPA53 (OH-) 樹脂約４g と Ambersep®200(H+)樹脂約４g を混合したもの又は同等品を充填する。これに 11）の試料溶液２mL を正確に流し入れ、約１mL/分の速さで通液する。カラム上部の液がなくなる直前に水 22 mL を加え、カラム壁内を洗い流す。

13）　試料溶液

溶出液をロータリーエバポレーターで蒸発乾固する。残留物を水２mL に溶かし、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過したものを試料溶液とする。

14）　高速液体クロマトグラフの操作条件例

〔例 1〕

カラム：Waters Sugar-Pak® (Waters)、内径 6.5 mm、長さ 300 mm

移動相：Na_2Ca-EDTA (50 mg/L) を含む水

流速：0.5 mL/分

温度：90 ℃

注入量：50 μL

〔例 2〕

カラム：TSKgel G2500PW_{XL}（東ソー株式会社又は同等品)、内径 7.8 mm、長さ 300 mm を 2 本直列に接続

移動相：水

流速：0.5 mL/分
温度：80 ℃
注入量：50 μL

15)　測定（低分子量水溶性食物繊維の定量）

試料溶液一定量を高速液体クロマトグラフに注入し、内標準物質及び食物繊維画分[注7)]のピーク面積を求める。

⑥　空試験

試料を含まない系で同様に処理し、以下の８種の空試験値を得る。

⑤７）におけるR_1、R_2をR_{B1}、R_{B2}に、P_1をP_{B1}に、A_1をA_{B1}に、８）におけるR_3、R_4をR_{B3}、R_{B4}に、P_2をP_{B2}に、A_2をA_{B2}に置き換えて定量を行う。

高分子量水溶性食物繊維相当空試験	残渣	R_{B1}、R_{B2}	(mg)
同	残渣R_{B1}中のたんぱく質	P_{B1}	(mg)
同	残渣R_{B2}中の灰分	A_{B1}	(mg)
不溶性食物繊維相当空試験	残渣	R_{B3}、R_{B4}	(mg)
同	残渣R_{B3}中のたんぱく質	P_{B2}	(mg)
同	残渣R_{B4}中の灰分	A_{B2}	(mg)

試薬空試験値は、同一ロットの試薬を使用している限り不変と考えられる。そこで、15～20 回の繰り返し試験を実施して各空試験の平均値を求め、同一ロットの試薬を使用している限りにおいて、これを定数として使用するのが多検体処理の場合には合理的である。

⑦　計算

以下の式によって高分子量水溶性食物繊維と不溶性食物繊維の含量を算出する。

高分子量水溶性食物繊維含量（g/100 g）

$$= \frac{\frac{(R_1 + R_2)}{2} - P_1 - A_1 - B_s}{\frac{(W_1 + W_2)}{2}} \times 100 \div 1000$$

ただし、ここで

$$Bs\ (mg) = \frac{R_{B1} + R_{B2}}{2} - P_{B1} - A_{B1}$$

$$不溶性食物繊維含量\ (g/100\ g) = \frac{\frac{R_3 + R_4}{2} - P_2 - A_2 - B_1}{\frac{W_1 + W_2}{2}} \times 100 \div 1000$$

ただし、ここで、

$$B_1\ (mg) = \frac{R_{B3} + R_{B4}}{2} - P_{B2} - A_{B2}$$

W_1、W_2　：試料採取量（g）
R_1、R_2　：高分子量水溶性食物繊維 残渣（mg）
P_1　：同 残渣中のたんぱく質（mg）
A_1　：同 残渣中の灰分（mg）
R_{B1}、R_{B2}：同 空試験の残渣（mg）
P_{B1}　：同 空試験残渣中のたんぱく質（mg）
A_{B1}　：同 空試験残渣中の灰分（mg）
R_3、R_4　：不溶性食物繊維 残渣（mg）
P_2　：同 残渣中のたんぱく質（mg）
A_2　：同 残渣中の灰分（mg）
R_{B3}、R_{B4}：同 空試験の残渣（mg）
P_{B2}　：同 空試験残渣中のたんぱく質（mg）
A_{B2}　：同 空試験残渣中の灰分（mg）

$$低分子量水溶性食物繊維含量\ (g/100\ g) = \frac{P_F}{P_D} \times f \times \frac{M}{W} \times 100 \div 1000$$

P_F：食物繊維画分のピーク面積
P_D：添加内標準物質のピーク面積
f：高速液体クロマトグラフにおけるブドウ糖と内標準物質の補正係数[注8)]
M：添加内標準物質質量（mg）
W：試料採取量（g）　（W_1又はW_2）

総食物繊維含量（g/100 g）
= 高分子量水溶性食物繊維含量 ＋ 不溶性食物繊維含量 ＋ 低分子量水溶性食物繊維含量

凍結乾燥又は脱脂風乾処理をした試料にあっては、下記の式によって食品中の食物繊維含量に換算する。

$$\text{食品中の食物繊維含量（g/100 g）} = D \times \left(1 - \frac{W_D}{100}\right)$$

D ：凍結乾燥又は脱脂風乾試料中の食物繊維含量（g/100 g）

W_D：乾燥減量又は脱脂風乾減量（%）

［注］

1）フィルターの直径約４cm のもの（2G2）がよい。

2） るつぼ形ガラスろ過器として 2G2 を使用する場合には、約１g 程度のけいそう土が必要。

3） Megazyme 社製のキット「K-INTDF」等としても販売されている。

4） ろ過時間が長くなり過ぎると正しい分析値が得られないので、このような場合には、むしろ採取量を少なく（0.1～0.5 g）してろ過時間を短縮する方がより誤差の少ない分析値を得ることができる。

5）文献（Starch/Stärke 67, 860-883 （2015）の 2.2.3 Hydrolysis of starch containing samples with PAA and AMG and measurement of resistant starch）に従う。

6） 脱脂処理で脂質が完全には除去できない試料の場合は、アセトン 30 mL で５回くらい洗浄する。

7） 原則として、三糖類の一つであるマルトトリオースのピーク溶出位置を指標とし、これと同じかこれより前に溶出するものを食物繊維画分とする。

8） ブドウ糖と添加内標準物質の感度（同質量当たりのピーク面積）に差があるため、ブドウ糖の感度を基準として添加内標準物質のピーク面積を補正する必要がある。補正は、あらかじめ求めた補正係数（有効数字２桁）を乗ずることによるものとする。補正係数は一度求めておけば、クロマトグラフ操作条件を変更しない限り同一の係数を用いてよい。

［参考文献］

1） 日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”, 5 食物繊維 5-1～3 AOAC.2011.25 法(1)～(3), 58-68 (2023)

2） AOAC Official Method 2011.25: Insoluble, Soluble, and Total Dietary Fiber in Foods. Enzymatic-Gravimetric-Liquid Chromatography

9　亜鉛

（１）　原子吸光光度法

①　装置及び器具

・原子吸光光度計
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

②　試薬

・塩酸
・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・亜鉛標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２ mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容（V mL）し、試験溶液とする[注)]。

④　測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（１→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン
測定波長：213.8 nm

⑤　計算

$$\text{試料中の亜鉛含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた亜鉛の濃度（μg/mL）
V：定容量（mL）
D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

（２） キレート抽出-原子吸光光度法

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

・分液漏斗

・共栓試験管

② 試薬[注1)]

・25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液：クエン酸二アンモニウム（原子吸光分析用）25 g を水に溶かして 100 mL とする。

・10 w/v%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）溶液：DDTC（原子吸光分析用）10 g を水に溶かして 100 mL とする。この溶液は用時調製する。

・40 w/v%硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム（原子吸光分析用）40 g を水に溶かして 100 mL とする。

・ブロムチモールブルー指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液。

・塩酸

・アンモニア水

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・メチルイソブチルケトン（MIBK）：特級

・亜鉛標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２ mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラス

コにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容（V mL）し、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④　測定

試験溶液の適当量を正確に分液漏斗にとり、25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液 10 mL を加えた後、ブロムチモールブルー指示薬２滴を加え、溶液の色が黄色から緑色になるまでアンモニア水で中和し、40 w/v%硫酸アンモニウム溶液 10 mL 及び水を加えて約 100 mL とする。10 w/v%DDTC 溶液[注2)] 10 mL を加え、５分間放置後、MIBK 10 mL を正確に加え５分間振とうする。静置後、MIBK 層をとり原子吸光光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：213.8 nm

⑤　計算

$$\text{試料中の亜鉛含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた亜鉛の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１）　試薬由来のコンタミネーションが影響する場合、あらかじめ溶媒抽出により精製するほうが望ましい。

２）　ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC、原子吸光分析用）を用いることもできる。

（３）　誘導結合プラズマ発光分析法

①　装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

②　試薬

・塩酸

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・亜鉛標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して、検量線作成用の 0.5、5.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３ mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２ mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容（V mL）し、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 213.856 nm における発光強度を測定する[注2)]。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める[注3)]。

⑤ 計算

$$\text{試料中の亜鉛含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた亜鉛の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１） 必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２） 必要に応じて他の波長を用いても良い。

３） 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

10 カリウム

（１） 原子吸光光度法（灰化法）[注)]

① 装置及び器具

・原子吸光光度計
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

② 試薬

・塩酸（１→４）、塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・カリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g を石英ビーカーに精密に量り（W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１→４）５mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→４）５mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で正確に 50 mL（V mL）とし、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（１→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D)。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：766.5 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のカリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカリウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

脂質含量の高い試料は灰化法が望ましい。

（２） 原子吸光光度法（塩酸抽出法）

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

② 試薬

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・カリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

試料２ｇを精密に量り（W g）、ポリエチレン瓶に入れ、塩酸（１→40）200 mL（V mL）を正確に加え、30 分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

④　測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（１→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：766.5 nm

⑤　計算

$$\text{試料中のカリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカリウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（３）　誘導結合プラズマ発光分析法

①　装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

②　試薬

・塩酸（１→４）、塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・カリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して、検量線作成用の 50、500 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③　試験溶液の調製

a.　灰化法

試料１～10 ｇを石英ビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１→４）５mL

を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（1→4）5mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で正確に 50 mL（V mL）とし、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

b. 塩酸抽出法

試料２g を精密に量り（W g）、ポリエチレン瓶に入れ、塩酸（1→40）200 mL（V mL）を正確に加え、30 分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。測定波長は 766.491 nm を用いる[注)]。

⑤ 計算

$$\text{試料中のカリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカリウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

必要に応じて他の波長を用いても良い。

11 カルシウム

（1） 過マンガン酸カリウム容量法

① 装置及び器具

・ビュレット：褐色、容量 25～50 mL、テフロンコック付き

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。
・メチルレッド指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液
・３　w/v%シュウ酸アンモニウム溶液：シュウ酸アンモニウム（特級）を水に溶解して用いる。
・尿素：特級
・アンモニア水（１+49）：アンモニア水１容に対し水 49 容を加え混和する。
・１/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液：過マンガン酸カリウム（特級）31.61 g に水 800 mL を加えて加温しながらかくはんし、溶解する。放冷後、水で１L に定容し、暗所に一夜放置する。ガラスフィルター（３G-４）でろ過したものを水で 50 倍に希釈し、褐色瓶に保存する。１/100 mol/L シュウ酸ナトリウム標準溶液により標定してファクターを求める。
・シュウ酸ナトリウム：標準試薬
・硫酸（１+25）：硫酸１容に対し水 25 容を加え混和する。

③　試験溶液の調製

試料１～10　g をビーカーに精密に量り（W　g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V_1 mL）、試験溶液とする。

④　測定

試験溶液からカルシウムとして３～８mg を含む一定量（V_2 mL）を 300 mL 容共栓付き三角フラスコに正確に分取し、メチルレッド指示薬数滴及び塩酸（１+１）を総量として３mL になるように加えた後、３w/v%シュウ酸アンモニウム溶液 10 mL 及び尿素約４g を加え、水で全量を約 100 mL とする。電熱器上で穏やかに加熱し、沸騰させ、溶液が赤色から黄色に変わったら加熱を止め、一夜放置する。生成したシュウ酸カルシウムの沈殿をガラスフィルター（３G-４）中に注ぎ、吸引ろ過する。アンモニア水（１+49）数 mL ずつで三角フラスコ及びガラスフィルターを数回洗う。ガラスフィルターを元の三角フラスコに付け、70～80 ℃に加温してある硫酸（１+25）をガラスフィルター中に注ぎ、沈殿を溶解し、吸引ろ過する。この操作を数回繰り返し、ガラスフィルター内の沈殿を完全に溶解して三角フラスコに集める。三角フラスコを 65～80 ℃に加温して１/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液で滴定する（T mL）。30 秒経っても赤紫色が消失しないところを終点とする。

⑤　計算

１/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液１mL は、カルシウム 0.4008

mg に相当し、このとき試料中のカルシウム含量は次式により求める。

$$\text{試料中のカルシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{T \times 0.4008 \times F}{W} \times \frac{V_1}{V_2} \times 100$$

T：滴定に要した１/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液の量（mL）
F：１/250 mol/L 過マンガン酸カリウム標準溶液のファクター
V_1：定容量（mL）
V_2：分取液量（mL）
W：試料採取量（g）

（２） 原子吸光光度法

① 装置及び器具

・原子吸光光度計
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

② 試薬

・塩化ストロンチウム溶液：塩化ストロンチウム・六水和物（原子吸光分析用）38.04 g を塩酸（１→40）に溶かして正確に 250 mL とする。この溶液は、ストロンチウムとして５ w/v%となる。
・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・カルシウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈し、ストロンチウムとして 0.5 w/v%になるように塩化ストロンチウム溶液を加える。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V_1 mL）、試験溶液とする[注)]。

④ 測定

試験溶液の適当量（V_2 mL）を全量フラスコに正確に分取し、塩化ストロンチウム溶液を、ストロンチウムとして 0.5 w/v%になるように加え、塩酸（１→40）で定容（V_3 mL）した後、原子吸光光度計を用いて、吸光度を測定し、

あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：亜酸化窒素 - アセチレン又は空気 - アセチレン

測定波長：422.7 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のカルシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたカルシウムの濃度（μg/mL）

V_1：試験溶液の定容量（mL）

V_2：分取液量（mL）

V_3：測定用試験溶液の定容量（mL）

W：試料採取量（g）

［注］

必要に応じて塩酸（１＋１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

（３） 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸（１＋１）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・カルシウム標準溶液：市販の原子吸光分析標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して、検量線作成用の 1.0，10.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１＋１）３ mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１＋１）２

mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL)、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

測定用試験溶液を、直接的に誘導結合プラズマ発光分析装置のネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して、393.366 nm における発光強度を測定する[注2)]。あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める[注3)]。

⑤ 計算

$$\text{試料中のカルシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたカルシウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１） 必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２） 必要に応じて他の波長を用いても良い。

３） 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理的干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

12 クロム

（１） キレート抽出-原子吸光光度法

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

・分液漏斗

・共栓試験管

② 試薬

・２w/v%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）溶液：DDTC（原子吸光用）２g を水に溶かして 100 mL とする。この溶液は用時調製する。

・10 w/v%ペルオキソ二硫酸アンモニウム溶液：ペルオキソ二硫酸アンモニウム（特級）10 g を水に溶かして 100 mL とする。

・酢酸緩衝液：１mol/L 酢酸 59 mL と１mol/L 酢酸ナトリウム（特級）141 mL を混合し pH5.0 に調整する。
・アンモニア水：アンモニア水（25.0～27.9 %）を水で２倍に希釈する。
・硝酸（１→10）：硝酸（60.0～61.0 %）を水で希釈して用いる。
・塩酸：塩酸（35.0～37.0 %）
・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・メチルイソブチルケトン（MIBK）：原子吸光分析用
・ブロムフェノールブルー指示薬：ブロムフェノールブルー0.1 g を乳鉢に入れ、少量の１/20 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて十分すり混ぜ、水に溶かして 250 mL とする。
・クロム標準溶液：原子吸光分析用金属溶液（JCSS 認定品）を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

乾式灰化法[注1)]

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、ホットプレート上[注2)]で予備灰化後 500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗いこむ操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。ろ紙上に黒色の炭素が残っている場合は、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。

塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④　測定[注3)]

試験溶液の適当量を正確に 100 mL ビーカーに分取する。硝酸（１→10）10 mL を加えた後、ペルオキソ二硫酸アンモニウム溶液５mL を加える。ブロムフェノールブルー指示薬を数滴加え、溶液の色が黄色からくすんだ黄緑色に変わるまでアンモニア水を滴下する（pH3.0～4.0）。時計皿でふたをして沸騰水浴上で 15 分加熱する。放冷後 100 mL の分液漏斗に移し水 45 mL を３回に分けビーカーを洗い、洗液を分液漏斗に合わせる。酢酸緩衝液５ml を加え振り混ぜる。DDTC 溶液５mL を加え、５分放置後、MIBK10 mL を正確に加え５分振とうする。静置後、MIBK 層を取り、原子吸光光度計を用いて吸光度[注4)]を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度(C μg/mL)を求め、試料中の含量を算出する。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：357.9 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のクロム含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めたクロムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１） 灰化が難しい試料の場合は、試験溶液の調製を湿式灰化法によることができる。なお、この他の試験溶液調製法として、凍結乾燥後、低温灰化装置等を使うこともできる（池辺克彦、西宗高弘、田中涼一：食品衛生学雑誌、382（1990））。

２） 赤外線ランプを併用すると炭化を早めることができる。

３） クロム含量が低い場合は、乾式灰化法で調製した試験溶液について、フレームレス原子吸光法によることができる。ただし、試験溶液は硝酸溶液とする。

４） クロムは金属や酸による干渉があるため、MIBK 抽出とした。

（２） 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸：塩酸（35～37 %）

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・クロム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して、検量線作成用の 0.1、1.0 ppm 濃度の標準溶液を作製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

乾式灰化法[注1)]

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、ホットプレート上[注2)]で予備灰化後 500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３ mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）

20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。ろ紙上に黒色の炭素が残っている場合は、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。

塩酸（１＋１） ２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注3）注4）]。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧[注5）]し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める[注6）]。測定波長 206.15 nm を用いる[注7）]。

⑤ 計算

$$\text{試料中のクロム含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めたクロムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１） 灰化が難しい試料の場合は、試験溶液の調製を湿式灰化法によることができる。なお、この他の試験溶液調製法として、凍結乾燥後、低温灰化装置等を使うこともできる（池辺克彦、西宗高弘、田中涼一：食品衛生学雑誌、382（1990））。

２） 赤外線ランプを併用すると炭化を早めることができる。

３） 引き続き（１）、④に準じて MIBK による抽出を行った場合には MIBK 溶媒がネブライザーを詰まらせる原因となるためホットプレート上で MIBK を揮散させてから１%硝酸に再溶解し測定用試験溶液とする。

４） 必要に応じて塩酸（１＋１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

５） 試料中のクロム含量が低い場合は、超音波ネブライザーを使用することができる。

６） 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理的干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

７） 必要に応じて他の波長を用いても良い。

（３） 誘導結合プラズマ質量分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP－MS）：四重極、コリジョンセルなど分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの。
・マイクロ波試料分解装置：最大試料１g 分解が可能な容器を処理でき、内部温度センサーや圧力センサー等を装備し、温度コントロールが可能なもの（Milestone 社製 ETHOS１同等品）

② 試薬
・塩酸
・硝酸：金属濃度 100 ppt 以下の超高純度試薬（関東化学株式会社 Ultrapur-100 超高純度試薬、同等以上のもの）
・酢酸
・過酸化水素
上記試薬については、同等以上のグレードのものを使用する。
・クロム標準溶液[注1)]：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈し、検量線作成用として 0.1～10 ng/mL の標準溶液を調製する[注2)]。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。試験溶液の調製法に合わせた希釈溶媒を選択する。
・ガリウム内標準溶液[注1)]：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、0.2 μg/mL の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製
試料 0.1～1g をあらかじめ硝酸（１→10）で洗浄したマイクロ波分解容器[注3)]に採り（W g）、硝酸５mL 及び過酸化水素１mL を加えて密封した後、次表の条件でマイクロ波分解を行う。放冷後、分解液に酢酸１mL を添加し、ろ紙を用いてろ過し、イオン交換水を加えて 50 mL に定容する（V mL）。

表 マイクロ波分解条件例

Stage	時間（分）	温度（℃）	強度（W）
1	0	0	0
2	2	70	1,000
3	5	50	0
4	20	200	1,000
5	30	200	1,000

ただし、最終溶液 50 mL 中に、内標準溶液（ガリウム 0.2μg/mL）を 500μL 含むように調製する。

④ 測定
クロム測定用標準溶液について、内標準物質とのイオンカウント比を ICP-MS を用い求め、標準溶液の濃度により検量線を作成する。同様に、試験溶液を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C ng/mL）を

求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、適当な濃度に希釈（希釈倍数：D）した後測定する。

＜ICP-MS 測定条件例＞

機種：Agilent7500ce（アジレント・テクノロジー（株））

導入速度：1.0 mL/分

プラズマ条件：

RF パワー：1.6 kW

プラズマガス：15 L/分（アルゴン）

キャリヤーガス：0.70 L/分（アルゴン）

メイクアップガス：0.29 L/分（アルゴン）

リアクションガス：ヘリウム

ネブライザー：Micro Mist ネブライザー

測定質量数：クロム 52（内標：ガリウム 71）

ガスモード：ヘリウムガスモード[注4)]

⑤ 計算

$$\text{試料中のクロム含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたクロムの濃度（ng/mL）

F：標準溶液のファクター

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

1） セレン、クロム及びモリブデンの混合標準液を用いて、一斉定量を行うこともできる。その際は、ガリウム、インジウム及びテルルの混合内標準溶液を用いる。

2） 下限値は、機器により適宜変更する。

3） マイクロ波分解容器にあらかじめ硝酸５mL を加え、表の条件でマイクロ波分解を行い洗浄しておくことで空試験値を低減することができる。

4） クロムの質量数はアルゴンと溶液中の窒素又は酸素が反応した質量数と重なるため、ヘリウムガスモードを用いて測定する。

［参考文献］

日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”， 17-3. 誘導結合プラズマ質量分析法（セレン、クロム及びモリブデンの一斉分析法），126-127（2023）

13 セレン

（１） 蛍光光度法

① 装置及び器具

・蛍光光度計
・分液漏斗
・共栓試験管

② 試薬

・塩酸
・アンモニア水
・過塩素酸
・硝酸
・シクロヘキサン：特級
・塩酸（１→40)、塩酸（１→４）、１mol/L 塩酸：塩酸を水で希釈して用いる。
・10 %アンモニア水：アンモニア水を水で希釈して用いる。
・0.1 mol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）溶液：EDTA（特級）37.22 g を水に溶かして１L とする。
・20 w/v%塩酸ヒドロキシルアミン溶液：塩酸ヒドロキシルアミン（特級）100 g を水に溶かして 500 mL とする。
・0.1 w/v%2,3-ジアミノナフタレン溶液：2,3-ジアミノナフタレン（特級）0.1 g を 0.1 mol/L 塩酸 100 mL に溶かした後、50 ℃で 30 分間加温する。放冷後、分液漏斗に移し、シクロヘキサン 10～20 mL を加え、５分間振とうする。この操作を繰り返し行い、水層をろ過した後使用する。この溶液は用時調製する。
・セレン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料約１g をケルダールフラスコに精密に量り (W g)、硝酸 10 mL を加え、穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、過塩素酸 10 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら直ちに硝酸２mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、過塩素酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、塩酸（１→４） ３ mL を加え、沸騰水浴中等で 100 ℃、30 分間加温する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量を正確に 100 mL 容トールビーカーに分取し、0.1 mol/L EDTA 溶液４ mL 及び 20 w/v%塩酸ヒドロキシルアミン溶液２mL を加え、塩酸（１→４）及び 10 %アンモニア水を用いて pH1.0～1.5 に調整する。0.1 w/v%2,3-ジアミノナフタレン溶液５mL を加え混合後、50 ℃の水浴中で 30 分間加温する。放冷後、200 mL 容分液漏斗に移し、シクロヘキサン 10 mL を加

え５分間振とうした後、シクロヘキサン層を共栓試験管にとり、蛍光強度を測定する。同様に操作して作成した検量線から、試験溶液中の濃度(C μg/mL)を求め、試料中の含量を算出する。

＜蛍光光度計測定条件例＞

励起波長：378 nm

蛍光波長：520 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のセレン含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めたセレンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（２） 水素化物－原子吸光光度法

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

・セレン化水素発生装置

② 試薬

・塩酸

・硝酸

・過塩素酸

・塩酸（１＋１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸 （１→40)、塩酸（１→４）：塩酸を水で希釈して用いる。

・水素化ホウ素ナトリウム溶液：水素化ホウ素ナトリウム（特級） ５g 及び水酸化ナトリウム 2.5 g を水に溶かして 500 mL とする。

・セレン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料約１g をケルダールフラスコに精密に量り (W g)、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、過塩素酸 10 mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら直ちに硝酸２mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、過塩素酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、塩酸（１→４） ３mL を加え、沸騰水浴中で 30 分間加温する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し (V mL)、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液（濃度により希釈、希釈倍数：D)、塩酸（１＋１）及び水素化ホウ

素ナトリウム溶液を連続的にセレン化水素発生装置に導入し、さらに、発生したセレン化水素を加熱セルに導入する。原子吸光光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から、試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

＜原子吸光測定条件例＞

加熱セル温度：1,000 ℃

測定波長：196.0 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のセレン含量 (μg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めたセレンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（３） 誘導結合プラズマ質量分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP－MS）：四重極、コリジョンセルなど分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの。

・マイクロ波試料分解装置：最大試料１g 分解が可能な容器を処理でき、内部温度センサーや圧力センサー等を装備し、温度コントロールが可能なもの（Milestone 社製 ETHOS 1 同等品）

② 試薬

・塩酸

・硝酸：金属濃度 100 ppt 以下の超高純度試薬
（関東化学株式会社 Ultrapur-100 超高純度試薬、同等以上のもの）

・酢酸

・過酸化水素

上記試薬については、同等以上のグレードのものを使用する。

・セレン標準溶液[注1)]：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈し、検量線作成用として 0.1～10 ng/mL の標準溶液を調製する[注2)]。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。試験溶液の調製法に合わせた希釈溶媒を選択する。

・テルル内標準溶液[注1)]：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、2000 ng/mL の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料 0.1～1 g をあらかじめ硝酸（１→10）で洗浄したマイクロ波分解容器

[注3)]に採り（W g)、硝酸５mL 及び過酸化水素１mL を加えて密封した後、次表の条件でマイクロ波分解を行う。放冷後、分解液に酢酸１mL を添加し、ろ紙を用いてろ過し、イオン交換水を加えて 50 mL に定容する（V mL)。

表　マイクロ波分解条件例

Stage	時間（分）	温度（℃）	強度（W）
1	0	0	0
2	2	70	1,000
3	5	50	0
4	20	200	1,000
5	30	200	1,000

ただし、最終溶液 50 mL 中に、内標準溶液（テルル２μg/mL）を 500 μL 含むように調製する。

④　測定

セレン測定用標準溶液について､内標準物質とのイオンカウント比を ICP-MS を用い求め、標準溶液の濃度により検量線を作成する。同様に、試験溶液を測定し､あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C ng/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、適当な濃度に希釈（希釈倍数：D）した後測定する。

＜ICP-MS 測定条件例＞

機種：Agilent7500ce（アジレント・テクノロジー（株))
導入速度：1.0 mL/分
プラズマ条件：
RF パワー：1.6 kW
プラズマガス：15 L/分（アルゴン）
キャリヤーガス：0.70 L/分（アルゴン）
メイクアップガス：0.29 L/分（アルゴン）
リアクションガス：ヘリウム
ネブライザー：Micro Mist ネブライザー
測定質量数：セレン 78（内標：テルル 128）[注4)]
ガスモード：ヘリウムガスモード[注4)]

⑤　計算

$$\text{試料中のセレン含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたセレンの濃度（ng/mL）

F：標準溶液のファクター
V：定容量（mL）
D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

［注］

１） セレン標準溶液に変えて、セレン、クロム及びモリブデンの混合標準液を用いて、一斉定量を行うこともできる。その際は、テルル内標準溶液に変えて、ガリウム、インジウム及びテルルの混合内標準溶液を用いる。

２） 下限値は、機器により適宜変更する。

３） マイクロ波分解容器にあらかじめ硝酸５mL を加え、表の条件でマイクロ波分解を行い洗浄しておくことで空試験値を低減することができる。

４） 食塩や海藻類は微量ながら臭素を含んでおり、ノンガスモードでは溶液中の臭素と水素と反応しセレンの質量数 82 と重なってしまう。そのため、ヘリウムガスモードを用いて質量数 78 で測定する。通常の食品においてはヘリウムガスモードよりもノンガスモードのイオンカウント数が多く、精度よく測定できる。ノンガスモードで測定する場合は、質量数 82 で測定する。

［参考文献］

日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，17-3. 誘導結合プラズマ質量分析法（セレン、クロム及びモリブデンの一斉分析法），126-127（2023）

14 鉄

（１） オルトフェナントロリン吸光光度法

① 装置及び器具

・分光光度計：510 nm の吸光度が測定できるもの。
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

② 試薬

・１w/v%アスコルビン酸溶液：アスコルビン酸（特級）１g を水に溶かして 100 mL としたものを用いる。
・0.5 w/v%o-フェナントロリン溶液：o-フェナントロリン（特級）１g を水に溶かして 200 mL としたものを用いる。
・25 w/v%クエン酸ナトリウム溶液：クエン酸ナトリウム（特級）50 g を水に溶かして 200 mL としたものを用いる。

・１/20 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム１g をエタノール 500 mL に溶解する。
・ブロムフェノールブルー指示薬：ブロムフェノールブルー0.1 g を乳鉢に入れ、少量の１/20 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて十分すり混ぜ、水に溶かして 250 mL としたものを用いる。
・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・鉄標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V_1 mL）、試験溶液とする。

④　測定

試験溶液から適当量（V_2 mL）を 25 mL 容全量フラスコ及び三角フラスコに正確に同量ずつ分取する。全量フラスコに１w/v%アスコルビン酸溶液１mL 及び 0.5 w/v%o-フェナントロリン溶液２mL を加える。三角フラスコにはブロムフェノールブルー指示薬を数滴加え、溶液の色が黄色からくすんだ黄緑色に変わるまで（pH3.5～4.0）25 w/v%クエン酸ナトリウム溶液を滴下する。この滴下量と同量の 25 w/v%クエン酸ナトリウム溶液を全量フラスコに加え、水で定容する（V_3 mL）。20 ℃以上で３時間放置後、波長 510 nm における吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度を求め、試料中の含量を算出する。

⑤　計算

$$\text{試料中の鉄含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めた鉄の濃度（μg/mL）
V_1：試験溶液の定容量（mL）
V_2：分取液量（mL）
V_3：測定用試験溶液の定容量（mL）
W：試料採取量（g）

（２）　原子吸光光度法

①　装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

②　試薬

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸（原子吸光分析用）を水で希釈して用いる。

・鉄標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

試料１～10 ｇをビーカーに精密に量り（W ｇ）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注)]。

④　測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（１→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：248.3 nm

⑤　計算

$$\text{試料中の鉄含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた鉄の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

（３） 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・鉄標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を用い、適宜希釈して、検量線作成用の 1.0、10.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、アルゴンプラズマに導入して、238.204 nm における発光強度を測定する[注2)]。あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める[注3)]。

⑤ 計算

$$\text{試料中の鉄含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた鉄の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

［注］

１）　必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２）　必要に応じて他の波長を用いても良い。

３）　試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

15　銅

（１）　原子吸光光度法

①　装置及び器具

・原子吸光光度計
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

②　試薬

・塩酸：特級
・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・銅標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉上で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先のフラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注)]。

④　測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（１→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：324.7 nm

⑤　計算

$$\text{試料中の銅含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた銅の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

（２）　キレート抽出-原子吸光光度法

①　装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

・分液漏斗

・共栓試験管

②　試薬

・25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液：クエン酸二アンモニウム（原子吸光分析用）25 g を水に溶かして 100 mL とする。

・３ w/v%ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム（APDC）溶液：APDC（原子吸光分析用）３g を水に溶かして 100 mL とする。この溶液は用時調製する。

・40 w/v%硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム（原子吸光分析用）40 g を水に溶かして 100 mL とする。

・チモールブルー指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液

・塩酸

・アンモニア水：原子吸光分析用

・硝酸

・硫酸

・過塩素酸

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・酢酸ブチル：特級

・銅標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

a.　乾式灰化法

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

b.　湿式灰化法

試料１～10 g をケルダールフラスコに精密に量り（W g）、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸５mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら硝酸２mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸２mL を加え、硫酸の白煙を生じるまで再び加熱する。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し（V　mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④　測定

試験溶液の適当量を正確に分液漏斗に取り、25　w/v%クエン酸二アンモニウム溶液 10 mL を加えた後、チモールブルー指示薬を用いてアンモニア水で中和し、40 w/v%硫酸アンモニウム溶液 10 mL 及び水を加えて約 100 mL とする。３w/v%APDC 溶液５mL を加え、５分間放置後、酢酸ブチル[注)] 10 mL を正確に加え５分間振とうする。静置後、酢酸ブチル層を共栓試験管に取り、原子吸光光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度（C　μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：324.7 nm

⑤　計算

$$\text{試料中の銅含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた銅の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

［注］

ジイソブチルケトン（DIBK、原子吸光分析用）を用いてもよい。

（３）　誘導結合プラズマ発光分析法

①　装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

②　試薬

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・銅標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して、検量線作成用の 0.1、1.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③　試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④　測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 324.754 nm における発光強度を測定する[注2)]。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める[注3)]。

⑤　計算

$$\text{試料中の銅含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた銅の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１）　必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２）　必要に応じて他の波長を用いても良い。

３）　試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

16　ナトリウム（食塩相当量）

食塩相当量は、ナトリウム量を定量し、以下のように計算する。

$$\text{食塩相当量 (g/100g)} = \text{食品中のナトリウム含量 (mg/100g)} \times \frac{2.54}{1{,}000}$$

（１）　原子吸光光度法（灰化法）

①　装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

②　試薬

・塩酸（１→４）、塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・ナトリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

試料１～10 g を石英ビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１→４）５mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→４）５mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で定容し（V mL）、試験溶液とする。

④　測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成し

た検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（１→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D)。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：589.0 nm

⑤　計算

$$\text{試料中のナトリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたナトリウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（２）　原子吸光光度法（塩酸抽出法）[注1）注2）]

①　装置及び器具

・原子吸光光度計

②　試薬

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・ナトリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

試料２g を精密に量り（W g)、ポリエチレン瓶に入れ、塩酸（１→40）200 mL（V mL）を正確に加え、30 分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

④　測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（１→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D)。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：589.0 nm

⑤　計算

$$\text{試料中のナトリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたナトリウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

1）　脂質含量の高い試料は灰化法が望ましい。

2）　塩酸抽出法については、ガラス器具はナトリウムの溶出があるので、一切用いない。

（3）　誘導結合プラズマ発光分析法

①　装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

②　試薬

・塩酸（1→4）、塩酸（1→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・ナトリウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（1→40）で希釈して、検量線作成用の 1.0、10.0　ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

③　試験溶液の調製

a.　灰化法

試料 1 ～10 g を石英ビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1→4）5 mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（1→4）5 mL を加え、時計皿で覆って 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて、50 mL 容ポリエチレン製全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを十分に洗浄した後、水で定容し（V mL）、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

b.　塩酸抽出法[注1）注2）]

試料 2 g を精密に量り（W g）、ポリエチレン瓶に入れ、塩酸（1→40）200 mL（V mL）を正確に加え、30 分間振とうした後ろ過し、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④　測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライ

ザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。測定波長は 588.995 nm を用いる[注3)]。

⑤ 計算

$$\text{試料中のナトリウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたナトリウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１） 脂質含量の高い試料は灰化法が望ましい。

２） 塩酸抽出法については、ガラス器具はナトリウムの溶出があるので、一切用いない。

３） 必要に応じて他の波長を用いても良い。

17 マグネシウム

（１） 原子吸光光度法

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・塩化ストロンチウム溶液：塩化ストロンチウム・六水和物（原子吸光分析用）38.04 g を塩酸（１→40）に溶かして正確に 250 mL とする。この溶液は、ストロンチウムとして５w/v%となる。

・マグネシウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈し、ストロンチウムとして 0.5 w/v%になるように塩化ストロンチウム溶液を加える。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した

後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（1+1）2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で 50 mL に定容し（V_1 mL）、試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量（V_2 mL）を全量フラスコに正確に分取し、塩化ストロンチウム溶液を、ストロンチウムとして 0.5 w/v%になるように加え、塩酸（1→40）で定容（V_3 mL）した後、原子吸光光度計を用いて、吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：285.2 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のマグネシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたマグネシウムの濃度（μg/mL）

V_1：試験溶液の定容量（mL）

V_2：分取液量（mL）

V_3：測定用試験溶液の定容量（mL）

W：試料採取量（g）

（2） 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸

・塩酸（1+1）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。

・塩酸（1→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・マグネシウム標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（1→40）で希釈して、検量線作成用の 1.0、10.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④ 測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める[注2)]。測定波長は 279.553 nm を用いる[注3)]。

⑤ 計算

$$\text{試料中のマグネシウム含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたマグネシウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１） 必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２） 試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

３） 必要に応じて他の波長を用いても良い。

18 マンガン

（１） 原子吸光光度法

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸

・塩酸（1＋1）：塩酸1容に対し水1容を加え混和する。

・塩酸（1→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・マンガン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（1→40）で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料1～10 gをビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（1＋1）3 mLを加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（1→40）20 mLを加え、時計皿で覆い30分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（1＋1）2 mL及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で50 mLに定容し（V mL）、試験溶液とする。

④ 測定

原子吸光光度計を用いて、試験溶液の吸光度を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、塩酸（1→40）を用いて、適当な濃度に希釈した後測定する（希釈倍数：D）。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：279.5 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のマンガン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたマンガンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（2） キレート抽出-原子吸光光度法

① 装置及び器具

・原子吸光光度計

・電気炉：熱電対温度計付きのもので500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴
・分液漏斗
・共栓試験管

② 試薬

・25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液：クエン酸二アンモニウム（原子吸光分析用）25 g を水に溶かして 100 mL とする。
・10 w/v%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）溶液：DDTC（原子吸光分析用）10 g を水に溶かして 100 mL とする。この溶液は用時調製する。
・40 w/v%硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウム（原子吸光分析用）40 g を水に溶かして 100 mL とする。
・ブロムチモールブルー指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液
・塩酸
・アンモニア水
・塩酸（１+１）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・メチルイソブチルケトン（MIBK）：特級
・マンガン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して用いる。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容（V mL）し、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量を正確に分液漏斗にとり、25 w/v%クエン酸二アンモニウム溶液 10 mL を加えた後、ブロムチモールブルー指示薬を用いてアンモニア水で中和し、40 w/v%硫酸アンモニウム溶液 10 mL 及び水を加えて約 100 mL とする。10 w/v%DDTC 溶液 10 mL を加え、５分間放置後、MIBK 10 mL を正確に加え５分間振とうする。静置後、MIBK 層を共栓試験管にとり原子吸光光度計を用いて吸光度を測定し、同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

＜原子吸光測定条件例＞

フレーム：空気 - アセチレン

測定波長：279.5 nm

⑤ 計算

$$\text{試料中のマンガン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたマンガンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（３） 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・塩酸

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・マンガン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して、検量線作成用の 0.1、1.0 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容（V mL）し、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④　測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 257.610 nm における発光強度を測定する[注2)]。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求める[注3)]。

⑤　計算

$$\text{試料中のマンガン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたマンガンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１）　必要に応じて塩酸（１＋１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２）　試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

３）　必要に応じて他の波長を用いても良い。

19　モリブデン

（１）　誘導結合プラズマ質量分析法

①　装置及び器具

・誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）：一般的な全ての誘導結合プラズマ質量分析装置を用いることができる。

・マイクロ波試料分解装置：最大試料１g 分解が可能な容器を処理でき、内部温度センサーや圧力センサー等を装備し、温度コントロールが可能なもの（Milestone 社製 ETHOS 1 同等品）

②　試薬

・塩酸

・硝酸：金属濃度 100 ppt 以下の超高純度試薬（関東化学株式会社 Ultrapur-100 超高純度試薬、同等以上のもの）

・酢酸

・過酸化水素

上記試薬については、同等以上のグレードのものを使用する。

・モリブデン標準溶液[注1)]：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈し、検量線作成用として 0.1～10 ng/mL の標準溶液を調製する[注2)]。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。試験溶液の調製法に合わせた希釈溶媒を選択する。

・インジウム内標準溶液[注1)]：市販の原子吸光分析用標準溶液を希釈して、

0.2 μg/mL の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

試験溶液の調製に当たっては、以下に記す方法のどちらかを用いて行う。

a. 乾式灰化法

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３ mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、硝酸溶液で定容し（V mL)、試験溶液とする。

b. マイクロ波分解法

試料 0.1～１g をあらかじめ硝酸（１→10）で洗浄したマイクロ波分解容器[注3)]に採り（W g)、硝酸５mL 及び過酸化水素１mL を加えて密封した後、次表の条件でマイクロ波分解を行う。放冷後、分解液に酢酸１mL を添加し、ろ紙を用いてろ過し、イオン交換水を加えて 50 mL に定容する（V mL)。

表　マイクロ波分解条件例

Stage	時間（分）	温度（℃）	強度（W）
1	0	0	0
2	2	70	1,000
3	5	50	0
4	20	200	1,000
5	30	200	1,000

ただし、最終溶液 50 mL 中に、内標準溶液（インジウム 0.2 μg/mL）を 500 μL 含むように調製する。

④ 測定

モリブデン測定用標準溶液について、内標準物質とのイオンカウント比を ICP-MS を用い求め、標準溶液の濃度により検量線を作成する。同様に、試験溶液を測定し、あらかじめ作成した検量線から試験溶液中の濃度（C ng/mL）を求める。このとき、濃度の高い試験溶液については、適当な濃度に希釈（希釈倍数：D）した後測定する。

＜ICP-MS 測定条件例＞

機種：Agilent7500ce（アジレント・テクノロジー（株））
導入速度：1.0 mL/分
プラズマ条件：
RF パワー：1.6 kW
プラズマガス：15 L/分（アルゴン）
キャリヤーガス：0.70 L/分（アルゴン）
メイクアップガス：0.29 L/分（アルゴン）
ネブライザー：Micro Mist ネブライザー
測定質量数：モリブデン 98（内標：インジウム 115）
ガスモード：ノンガスモード

⑤ 計算

$$\text{試料中のモリブデン含量 (μg/100 g)} = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたモリブデンの濃度（ng/mL）
F：標準溶液のファクター
V：定容量（mL）
D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

[注]

１） モリブデン標準溶液に変えて、セレン、クロム及びモリブデンの混合標準液を用いて、一斉定量を行うこともできる。その際は、インジウム内標準溶液に変えて、ガリウム、インジウム及びテルルの混合内標準溶液を用いる。

２） 下限値は、機器により適宜変更する。

３） マイクロ波分解容器にあらかじめ硝酸５mL を加え、表の条件でマイクロ波分解を行い洗浄しておくことで空試験値を低減することができる。

[参考文献]

日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”， 17-3. 誘導結合プラズマ質量分析法（セレン、クロム及びモリブデンの一斉分析法），126-127（2023）

（２） 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴
・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分

析装置を用いることができる。

・マイクロ波試料分解装置：最大試料１g 分解が可能な容器を処理でき、内部温度センサーや圧力センサー等を装備し、温度コントロールが可能なもの（Milestone 社製 ETHOS１同等品）

② 試薬

・塩酸

・塩酸（１+１）：塩酸１容に対し水１容を加え混和する。

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・硝酸：金属濃度 100 ppt 以下の超高純度試薬（関東化学株式会社 Ultrapur-100 超高純度試薬、同等以上のもの）

・酢酸

・過酸化水素

上記試薬については、同等以上のグレードのものを使用する。

・モリブデン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈し、検量線作成用として 10～2,000 ng/mL の標準溶液を調製する。ポリエチレンあるいはポリプロピレン瓶に保存する。測光方式の違いや感度により、標準溶液の濃度を適宜調整する。

③ 試験溶液の調製

試験溶液の調製に当たっては、以下に記す方法のどちらかを用いて行う。

a. 乾式灰化法

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化、蒸発乾固を行う。塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、塩酸（１→40）又は硝酸（１→10）で希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

b. マイクロ波分解法

試料 0.1～１g をあらかじめ硝酸（１→10）で洗浄したマイクロ波分解容器に採り（W g）、硝酸５mL 及び過酸化水素１mL を加えて密封した後、次表の条件でマイクロ波分解を行う。放冷後、分解液に酢酸１mL を添加し、ろ紙を用いてろ過し、イオン交換水を加えて 50 mL に定容する（V mL）。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、

塩酸（１→40）又は硝酸（１→10）で希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

表　マイクロ波分解条件例

Stage	時間（分）	温度（℃）	強度（W）
1	0	0	0
2	2	70	1,000
3	5	50	0
4	20	200	1,000
5	30	200	1,000

④　測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧し、試験溶液の発光強度を測定し、あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C ng/mL）を求める[注2)]。

＜ICP-AES 測定条件例＞

機種：iCAP 7400（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）
試料導入ポンプ回転数：50 回転/分
RF パワー：1150 W
プラズマガス：12 L/分（アルゴン）
補助ガス：0.5 L/分（アルゴン）
ネブライザーガス：0.5 L/分（アルゴン）
ネブライザー：標準ネブライザー
測光方式：同軸モード
測定波長：202.03 nm

⑤　計算

$$\text{試料中のモリブデン含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times F \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたモリブデンの濃度（ng/mL）
F：標準溶液のファクター
V：定容量（mL）
D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

[注]

１）　必要に応じて塩酸（１+１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２）　試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

20　ヨウ素

（１）　滴定法

①　装置及び器具

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・pH 計

②　試薬

・50 %水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）を水に溶かして用いる。

・フェノールフタレイン指示薬：１ w/v%エタノール溶液

・エタノール

・ヨウ化カリウム：特級

・１mol/L 次亜塩素酸ナトリウム溶液：過マンガン酸カリウム（特級）32 g を 200 mL 容三角フラスコに入れ、減圧下、塩酸 100 mL を徐々に滴下する。発生する塩素ガスを２w/v%過マンガン酸カリウム溶液で洗い、さらに水で洗った後、水酸化ナトリウム 44 g を水 200 mL に溶かした液に吸収させる（この溶液は約２mol/L である。）。0.05 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液で滴定し、１mol/L に調製したものを用いる。

・40 w/v%ギ酸ナトリウム溶液：ギ酸ナトリウム（特級）400 g に水を加えて１L とする。

・３mol/L 硫酸：水５容に対し硫酸１容を加え、混和する。

・0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液：市販の標準溶液を用いる。

・でんぷん指示薬：可溶性でんぷん１g を沸騰水約 60 mL に溶かし、放冷後、塩化ナトリウム（特級）20 g を加え、水で 100 mL とする。

③　試験溶液の調製

試料１～10 g をニッケルるつぼに精密に量り（W g）、50 %水酸化ナトリウム溶液２mL 及びエタノール５mL を加え、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で約３時間灰化する。放冷後、灰に水約 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて全量フラスコ中にろ過する。温水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びるつぼを十分に洗浄した後、水で 50 mL に定容し（V_1 mL）、試験溶液とする。

④　測定

試験溶液の適当量（V_2 mL）を正確に 200 mL 容コニカルビーカーに分取し、フェノールフタレイン指示薬を用いて硫酸（１→６）で中和後、水で約 70 mL とする。１mol/L 次亜塩素酸ナトリウム溶液１mL を加え、pH メーターを用いて硫酸（１→６）及び 50 %水酸化ナトリウム溶液で pH を 1.7～2.0 に調整後、５分間煮沸する。40 w/v%ギ酸ナトリウム溶液５mL を加え、さらに５分間煮沸し、放冷後、ヨウ化カリウム 0.5 g、硫酸（１→６）６mL を加え、５

分間放置後、でんぷん溶液数滴を加え、0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液で滴定する（T mL）。溶液が 30 秒間無色を保つ点を終点とする。

⑤ 計算

0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液１mL は、ヨウ素 0.2115 mg に相当し、このとき、試料中のヨウ素含量は次式により求める。

$$\text{試料中のヨウ素含量 (mg/100 g)} = \frac{T \times 0.2115 \times F}{W} \times \frac{V_1}{V_2} \times 100$$

T：滴定に要した 0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液の量（mL）

F：0.01 mol/L チオ硫酸ナトリウム標準溶液のファクター

V_1：定容量（mL）

V_2：分取液量（mL）

W：試料採取量（g）

（２） ガスクロマトグラフ法

① 適用される食品

ヨウ素をヨードケトン誘導体（３-モノヨード-２-ブタノン）とし、ＥＣＤ検出器付きガスクロマトグラフで測定する。ヨウ素含量の少ない場合に適用される。

② 装置及び器具

・ガスクロマトグラフ：ECD 検出器付き

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

③ 試薬

・硫酸（１+１）：水１容に対し硫酸（原子吸光分析用）１容を加え、混和する。

・水酸化ナトリウム

・エタノール

・メチルエチルケトン：特級

・50 %水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウムを水に溶かして用いる。

・n-ヘキサン

・200 ppm 亜硝酸ナトリウム溶液：亜硝酸ナトリウム（特級）を水で希釈して用いる。

・ヨウ素標準溶液：市販のイオンクロマトグラフ分析用等の標準溶液又はヨウ化カリウム（特級）130.8 mg を正確に量り、水に溶かして正確に 100 mL としたものを標準原液とし、水で希釈して用いる。標準原液１ mL 中にヨウ素１mg を含む。

④ 試験溶液の調製

試料１～10 g をニッケルるつぼに精密に量り（W g）、50 %水酸化ナトリウ

ム溶液２mL 及びエタノール５mL を加え、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で約３時間灰化する。放冷後、灰に水約 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上で加温した後、ろ紙を用いて全量フラスコ中にろ過する。温水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びるつぼを十分に洗浄した後、水で定容し（V mL)、試験溶液とする。

⑤　測定

試験溶液最大 10　mL を正確に共栓付き試験管に量り取り、硫酸（１+１）0.7 mL、メチルエチルケトン 0.5 mL 及び 200 ppm 亜硝酸ナトリウム溶液 0.5 mL を加え混和し、20 分間放置後、n-ヘキサン 20　mL を正確に加え、５分間振とうする。n-ヘキサン層２μL を ECD-ガスクロマトグラフに注入する。標準溶液について同様に操作して作成した検量線から、試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

＜ガスクロマトグラフ測定条件例＞

検出器：ECD

カラム：20 %DEGS+１%リン酸/Chromosorb WAW 60～80 mesh

ガラス管、３ mm×1.5 m

温度：試料注入口 250 ℃、カラム 120 ℃、検出器 250 ℃

⑥　計算

$$\text{試料中のヨウ素含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたヨウ素の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[参考文献]

山野辺秀男ら：東京衛研年報、31-１、137（1980）

（３）　誘導結合プラズマ質量分析法

①　装置及び器具

・遠心分離機[注)]：スイングローター使用

・誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）：四重極、コリジョンセルなどの分子イオン干渉を除去する機能が装備されたもの

・試料抽出容器：メタルフリープラスチック製容器（容量 50mL、SCP Science 製、DigiTUBES 同等品）

②　試薬

・テトラメチルアンモニウムヒドロキシド（TMAH）：超高純度分析用試薬（TAMAPURE-AA（25%）などヨウ素濃度が 1 ng/mL 以下のもの)。イオン交換水で希釈して用いる。

・テルル溶液：市販のテルル標準溶液 1000 μg/mL を 0.5 mL とり、イオン交

換水で 250 mL とする。

・ヨウ素標準溶液：市販のイオンクロマトグラフ分析用等の標準溶液を適宜希釈又はヨウ化カリウム（試薬特級）を 0.1308 g 量り取り、イオン交換水を用いて 100 mL に定容したものをヨウ素標準原液 1000μg/mL とする。ヨウ素標準原液1000μg/mLをイオン交換水で1μg/mLとしたものを10､25､50、250 及び 500μL とり、それぞれに 25 %TMAH1 mL を添加した後、容量 50 mL メタルフリープラスチック製容器に定容する。これらを 10mL 分取し 2μg/mL テルル溶液を 100 μL 加えたものをヨウ素標準溶液とする。

③ 試料溶液の調製

試料 0.5～3 (W) g を容量 50 mL メタルフリープラスチック製容器にとり、0.5 %TMAH 溶液 50 mL を加え、ふたをしてよく混和し、60 ℃で一夜放置する。放冷後、1972×g（ローター半径 19.6 cm の場合 3000 回転/分）で 10 分間遠心分離した後、上澄み液 10 mL をとり、２μg/mL テルル溶液を 100 μL 加えたものを試料溶液とする。

④ 測定

測定用標準溶液について ICP-MS を用い、それぞれ内標準物質とのイオンカウント比を求め、ヨウ素の濃度により検量線を作成する。同様に、試料溶液を測定し､あらかじめ作成した検量線から試料溶液中のヨウ素濃度 (A) を求める。

＜ICP-MS 測定条件例＞

機種：Agilent 7500ce（アジレント・テクノロジー（株））
導入速度：1.0 mL/分
プラズマ条件：
RF パワー：1.6 kW
プラズマガス：15 L/分（アルゴン）
キャリヤーガス：0.70 L/分（アルゴン）
メイクアップガス：0.29 L/分（アルゴン）
ネブライザー：Micro Mist ネブライザー
測定質量数：127（内標準：テルル 128）
ガスモード：ノンガスモード

⑤ 計算

$$\text{ヨウ素含量}(\mu g\ /\ 100g) = A \times\ f \times \frac{50}{W} \times \frac{1}{10}$$

A：試料溶液のヨウ素濃度(ng/mL)
f ：標準溶液のファクター
W：試料採取量（g）

[注]

コクサン H-80F 同等品

21　リン

（１）　バナドモリブデン酸吸光光度法

①　装置及び器具

・分光光度計：410 nm の吸光度が測定できるもの。
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

②　試薬

・発色試薬：メタバナジン酸アンモニウム（特級）1.12 g を水 200～300 mL に溶かし、硝酸（特級）250 mL を加える。この液にモリブデン酸アンモニウム（特級）27.0 g を水に溶かしたものをかくはんしながら加え、水で１L とする。褐色瓶に保存する。
・フェノールフタレイン指示薬：１w/v%エタノール溶液
・アンモニア水
・硝酸
・塩酸
・硫酸
・過塩素酸
・アンモニア水（１+49）、硝酸（１+９）、塩酸（１+１）：各試薬１容に対し、水 49 容、９容及び１容をそれぞれ加え、混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・リン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を水で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

a.　乾式灰化法

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する[注)]。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

b.　湿式灰化法

試料１～10 g をケルダールフラスコに精密に量り（W g）、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸５mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら硝酸２mL を加

える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸２mL を加え、硫酸の白煙を生じるまで再び加熱する。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し（V mL)、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液の適当量を正確に 100 mL 容全量フラスコに分取し、フェノールフタレイン指示薬を数滴加え、アンモニア水（１+49）を微紅色を呈するまで加えた後、硝酸（１+９）で中和する。水で全量を約 70 mL とし、発色試薬 20 mL を加え、水で 100 mL とする。混和し 30 分間放置した後、波長 410 nm における吸光度を測定する。同様に操作して作成した検量線から、試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

⑤ 計算

$$\text{試料中のリン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたリンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

リンは 500 ℃を超えると揮発するおそれがあるため、灰化に注意が必要である。

（２） モリブデンブルー吸光光度法

① 装置及び器具

・分光光度計：880 nm の吸光度が測定できるもの。

・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。

・ホットプレート

・水浴

② 試薬

・p-ニトロフェノール指示薬：0.1 w/v%エタノール溶液

・硫酸

・硫酸（２+１）:硫酸２容に対し水１容を加え混和する。

・発色試薬：モリブデン酸アンモニウム（特級）６g 及び酒石酸アンチモニルカリウム（特級）0.24 g を加え、これに硫酸（２+１）120 mL を加え、次いでスルファミン酸アンモニウム（特級）５g を溶かして水で 500 mL とする。

・１w/v%アスコルビン酸溶液：L-アスコルビン酸（特級）１g を水に溶かし

て 100 mL とする。

・アンモニア水

・塩酸

・硝酸

・過塩素酸

・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。

・アンモニア水（１+49)、塩酸（１+１）：各試薬１容に対し、水 49 容及び１容をそれぞれ加え、混和する。

・リン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を水で希釈して用いる。

③　試験溶液の調製

a.　乾式灰化法

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g)、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１）３mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40）20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１）２mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL)、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

b.　湿式灰化法

試料１～10 g をケルダールフラスコに精密に量り（W g)、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸５mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら硝酸２ mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸２mL を加え再び硫酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し（V mL)、必要に応じて水で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

④　測定

試験溶液の適当量を正確に 50 mL 容全量フラスコに分取し、p-ニトロフェノール指示薬を数滴加え、アンモニア水（１+49）をわずかに黄色を呈するまで加えた後、水で全量を約 40 mL とする。発色試薬５mL 及び１ w/v%アスコルビン酸溶液５ mL を加え、水で 50 mL とし、15 分間放置した後、波長 880 nm における吸光度を測定する。同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中の含量を算出する。

⑤　計算

$$\text{試料中のリン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたリンの濃度（μg/mL）
V：定容量（mL）
D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

（３） 誘導結合プラズマ発光分析法

① 装置及び器具

・誘導結合プラズマ発光分析装置：一般的な全ての誘導結合プラズマ発光分析装置を用いることができる。
・電気炉：熱電対温度計付きのもので 500±10 ℃に設定できるものを用いる。
・ホットプレート
・水浴

② 試薬

・硝酸
・硫酸
・過塩素酸
・塩酸（１+１）：塩酸 1 容に対し水 1 容を加え混和する。
・塩酸（１→40）：塩酸を水で希釈して用いる。
・リン標準溶液：市販の原子吸光分析用標準溶液を塩酸（１→40）で希釈して、検量線作成用の 10、100 ppm の濃度の標準溶液を調製する。ポリエチレン又はポリプロピレン瓶に保存する。

③ 試験溶液の調製

a. 乾式灰化法

試料１～10 g をビーカーに精密に量り（W g）、電熱器上で予備灰化した後、500 ℃の電気炉中で灰化する。放冷後、灰に塩酸（１+１） 3 mL を加え、水浴上又はホットプレート上で蒸発乾固する。さらに、塩酸（１→40） 20 mL を加え、時計皿で覆い 30 分間ホットプレート上（150～200 ℃）で加温した後、ろ紙を用いて、全量フラスコ中にろ過する。水で洗い込む操作を繰り返し、ろ紙及びビーカーを数回洗浄する。残渣があれば、ろ紙とともに元のビーカーに入れ、ホットプレート上で乾燥させ、同様に灰化し、塩酸（１+１） 2 mL 及び少量の水を加えて加温溶解した後、先の全量フラスコにろ過する。ろ液及び洗液を合わせ、水で定容し（V mL）、試験溶液とする[注1)]。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

b.　湿式灰化法

試料１～10 g をケルダールフラスコに精密に量り（W g)、硝酸 10 mL を加え穏やかに加熱する。激しい反応が終了したら、硝酸 10 mL 及び硫酸５mL を加え、再び加熱する。内容液が褐色～黒色となったら硝酸２mL を加える。内容液が無色～淡黄色となったら、過塩素酸２mL を加え、再び硫酸の白煙を生じるまで加熱を続ける。放冷後、ケルダールフラスコの内壁を水でよく洗い込み、硫酸の白煙が生じるまで再び加熱する。放冷後、溶液を全量フラスコに洗い流した後、水で定容し（V mL)、試験溶液とする。

試験溶液中の塩濃度が高い場合は、発光強度の低下が認められるので、希釈するか（希釈倍数：D）標準溶液の元素組成を試験溶液と近似させる必要がある。

④　測定

誘導結合プラズマ発光分析装置を用いて、測定用試験溶液を直接ネブライザーで吸入噴霧して、アルゴンプラズマに導入して 213.618　nm における発光強度を測定する[注2)]。あらかじめ作成した検量線から測定用試験溶液中の濃度（C　μg/mL）を求める[注3)]。

⑤　計算

$$\text{試料中のリン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたリンの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１）　必要に応じて塩酸（１＋１）の添加量を調整して標準溶液と塩酸濃度を近付ける。

２）　必要に応じて他の波長を用いても良い。

３）　試料溶液中の元素組成の影響などにより測定時に物理干渉を受ける場合は、内標元素を用いて補正を行っても良い。

22　ナイアシン（ナイアシン当量として）

ナイアシンはニコチン酸及びニコチン酸アミドを総称する名称である。なお、肝臓において質量比でトリプトファン 60 からナイアシン１を合成できるため、ニコチン酸とニコチン酸アミドの合計量に１/60 トリプトファン量を加えたものをナイアシン当量とする。

食品中のナイアシン含量 (mg/100 g)

= ニコチン酸 (mg/100 g) + ニコチン酸アミド (mg/100 g)
+ 1/60 トリプトファン (mg/100 g)
= 微生物学的定量法によるナイアシン (mg/100 g)
+ 1/60 トリプトファン (mg/100 g)

ア　ニコチン酸及びニコチン酸アミド

（１）　高速液体クロマトグラフ法

①　適用される食品

ニコチン酸又はニコチン酸アミドが高濃度で添加された錠剤、カプセル剤等食品に適用される。

②　装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：紫外分光光度計付き
・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）

③　試薬

・ニコチン酸標準溶液：日本薬局方標準品を水に溶かして、２、５、10 及び 20 μg/mL 溶液を調製する。
・ニコチン酸アミド標準溶液：日本薬局方標準品を水に溶かして、２、５、10 及び 20 μg/mL 溶液を調製する。
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

④　試験溶液の調製

試料の適量（W g）を水で振とう又はホモジナイズ抽出する。得られた抽出液をろ過し、一定容とし（V mL）、適宜水で希釈して（希釈倍数：D）、約 10 μg/mL 濃度の試験溶液とする。

⑤　測定

試験溶液の 20 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、ニコチン酸又はニコチン酸アミドのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の標準溶液を注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中のニコチン酸又はニコチン酸アミド含量を算出する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

１）　ニコチン酸

カラム：Inertsil ODS-２（ジーエルサイエンス製）又は同等品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製
移動相：３ mmol/L テトラブチルアンモニウムブロマイド含有５ mmol/L 酢酸ナトリウム（pH5.0）：メタノール（９：１）
測定波長：260 nm
流量：1.5 mL/分

２）　ニコチン酸アミド

カラム：Inertsil ODS-２（ジーエルサイエンス製）又は同等品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製。

移動相：10 mmol/L オクタンスルホン酸ナトリウム含有 20 mmol/L 酢酸ナトリウム（pH3.5）：メタノール（98:２）

測定波長：260 nm

流量：1.2 mL/分

⑥ 計算

$$\text{試料中のニコチン酸又はニコチン酸アミド含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたニコチン酸又はニコチン酸アミドの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（２） 微生物学的定量法

① 適用される食品

一般的な食品においては、ニコチン酸及びニコチン酸アミドを分別して定量する必要はなく、感度及び特異性に優れた微生物学的定量法が適用される。

② 装置及び器具

・分光光度計

③ 試薬

・0.5 mol/L 硫酸：水 35 容に対し硫酸１容を加え、混和する。

・５mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 20 g を水に溶かして 100 mL とする。

・ナイアシン標準溶液：ニコチン酸（日本薬局方標準品）100 mg を水に溶かし、希釈して正確に 100 mL とする。さらに、希釈して 50 ng/mL となるようにする。

・使用菌株：*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014（NBRC 3070）

・ナイアシン測定用培地（１L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	14 g
Ｌ-シスチン	400 mg
ＤＬ-トリプトファン	200 mg
アデニン硫酸塩	20 mg
グアニン塩酸塩	20 mg
ウラシル	20 mg
リボフラビン	400 μg
チアミン塩酸塩	200 μg
ビオチン	0.8 μg

p-アミノ安息香酸	200 μg
パントテン酸カルシウム	400 μg
ピリドキシン塩酸塩	800 μg
リン酸水素二カリウム	1g
リン酸二水素カリウム	1g
硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
酢酸ナトリウム	20 g
グルコース	40 g

・乳酸菌保存用培地（1L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸水素二カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10.0 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0 mg
粉末寒天	20.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている[注1)]。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

④　接種菌液の調製

Lactobacillus plantarum の保存菌株を前培養培地に接種し、35 ℃で 20 時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nm における透過率が 80～90 %になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

⑤　試験溶液の調製

試料２g を精密に量り（W g）、0.5 mol/L 硫酸 100 mL を加え、121 ℃で 30 分間オートクレーブ処理を行う。冷却後、５mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、水で 200 mL に定容し（V mL）、ろ過する。さらに、溶液１mL 中にナイアシンが 10～20 ng を含むように水で希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

⑥　測定

試験管２本ずつに試験溶液 0.5、１及び２mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量５mL とする。別に検量線作成のため、ニコチン酸標準溶液（０～75 ng 相当量）を試験管２本ずつに取り、そ

れぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５mL とする。121 ℃で５分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液１滴（約 30 μL）ずつを無菌的に接種し、37 ℃で 18 時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する[注2)]。標準溶液の濁度より検量線を作成し[注3)]、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のナイアシン量（ng/mL）を求め、試料中のナイアシン含量を算出する。

⑦ 計算

$$\text{試料中のナイアシン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10{,}000}$$

C：検量線から求めたナイアシンの濃度（ng/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１） ニコチン酸定量用基礎培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス

一般乳酸菌保存検出用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス

一般乳酸菌接種用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス（前培養培地に同じ）

２） マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

３） 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

１） 日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，27 ナイアシン，184-186（2023）

２） 食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

イ トリプトファン

（１） 高速液体クロマトグラフ法[注1)]

① 装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：蛍光検出器付き

・カラム：オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム

② 試薬

・標準溶液：トリプトファン（特級）50 mg を精秤する。0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に溶解後､100 mL に定容し､水で 50 倍希釈する(10 μg/mL)。
・0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 0.4 g を水に溶かして 100 mL とする。
・水酸化バリウム八水和物（特級）
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製

試料 0.1～１g（W g）及び水酸化バリウム八水和物 7.8 g を封管用試験管に精秤し、水 4.5 mL 及び 60 %チオジエチレングリコール 0.5 mL を加え、沸騰水浴中で水酸化バリウムを加熱溶解する[注2)]。溶解後、減圧下で脱気し、封管後、110 ℃（恒温乾燥機）で 12 時間加水分解する。冷却後、開管し、加水分解液を 50 mL 又は 100 mL 容全量フラスコ（１w/v%フェノールフタレイン溶液を数滴加えておく）に移した後、微アルカリに調整、定容し（V mL)、適宜水で希釈する（希釈倍数：D)。0.45 μm のフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

④ 測定

試験溶液 20 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、トリプトファンのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中のトリプトファン含量（C μg/mL）を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

カラム:Inertsil ODS-２(ジーエルサイエンス製)又は同等品､内径 4.6mm、長さ 250mm、ステンレス製
移動相：10 mmol/L 過塩素酸-メタノール（92:８）
検出器：蛍光分光光度計
測定波長：励起波長 285 nm、蛍光波長：348 nm
流量：1.0 mL/分
温度：50 ℃

⑤ 計算

$$\text{試料中のトリプトファン含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたトリプトファンの濃度（μg/mL）
V：定容量（mL）
D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

[注]

１） アミノ酸自動分析法でも測定できる。
２） トリプトファンは塩酸加水分解では破壊されるため、アルカリを用いた加水分解を行う。

23　パントテン酸

（１）　微生物学的定量法

①　装置及び器具

・分光光度計

②　試薬

・パントテン酸カルシウム標準溶液：D-パントテン酸カルシウム標準品[注1)] 100 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して 0.1 μg/mL となるようにする。

・ハト肝臓アミダーゼ溶液：ハト肝臓アセトンパウダー[注2)]（Sigma L8376 又は同等品）10 g に、氷冷した 0.02 mol/L 炭酸水素カリウム水溶液 50 mL を加え、氷冷しながらすり鉢等でつぶして懸濁液とする。この懸濁液を氷冷した 0.02 mol/L 炭酸水素カリウム水溶液 50 mL で遠心管に移し、冷却しながら遠心分離（3,000 回転/分、10 分間）する。上澄み液にイオン交換樹脂（Dowex １×８）５g を加え、約１時間氷冷しながらかくはんする。冷却遠心分離、イオン交換樹脂の添加及び氷冷撹枠の操作を３回繰り返す。さらに冷却遠心分離（3,000 回転/分、10 分間）を行って得られる上澄み液をハト肝臓アミダーゼ溶液とする。

・アルカリホスファターゼ溶液：アルカリホスファターゼ（Sigma P7640, TypeI-S 又は同等品）を水に溶かして２w/v%とする。

・トリス塩酸緩衝液：2-アミノ-2-（ヒドロキシメチル）-1,3-プロパンジオール（特級）24.2 g を水 200 mL に溶かし、30 %塩酸溶液で pH8.3 に調整する。

・炭酸水素ナトリウム溶液：炭酸水素ナトリウム（特級）850 mg を水に溶かして 100 mL とする。

・１mol/L 塩酸：塩酸１容に対し水 11 容を加え混和する。

・１mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム４g を水に溶かして 100mL とする。

・使用菌株：*Lactobacillus plantarum*[注3)] ATCC 8014（NBRC 3070）

・パントテン酸測定用培地（１L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	200 mg
硫酸アデニン	20 mg
塩酸グアニン	20 mg
ウラシル	20 mg
塩酸チアミン	200 μg
リボフラビン	400 μg
パラアミノ安息香酸	200 μg

ビオチン	0.8 μg
ニコチン酸	1 mg
塩酸ピリドキシン	800 μg
リン酸二水素カリウム	1 g
リン酸一水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
酢酸ナトリウム（無水）	20 g
グルコース	40 g

・乳酸菌保存用培地（1L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸一水素カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0 mg
粉末寒天	20.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている[注4)]。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　接種菌液の調製

Lactobacillus plantarum の保存菌株を前培養培地に接種し、35 ℃で 20 時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nm における透過率が 80～90 %になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④　試験溶液の調製[注5)]

試料２g（W g）を精秤してトリス塩酸緩衝液 10 mL と水 20 mL を加え、121 ℃で 15 分間加圧抽出する。冷却後、水を加えて全量を 50 mL とし（V_1 mL）、その５ mL(V_2 mL)を試験管に分取して炭酸水素ナトリウム溶液 0.1 mL、２w/v%アルカリホスファターゼ水溶液 0.4 mL、ハト肝臓アミダーゼ溶液 0.2 mL を加え、静かに混合する。トルエンを２～３滴加え、37 ℃で 15 時間反応させる。10 分間煮沸して反応を止め、冷却後、１ mol/L 塩酸で pH4.5 にした後、水を加えて全量を 20 mL とし（V_3 mL）、遠心分離（12,000 回転/分、10 分間）する。上澄み液 10mL（V_4 mL）を分取して１ mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、水を加えて全量を 25 mL とする（V_5 mL）。さらに溶液１ mL 中にパントテン酸が 20～40 ng 含まれるように水で希釈し（希釈

倍数：D)、試験溶液とする。

⑤　測定

試験管２本ずつに試験溶液 0.5、1.0 及び 2.0 mL を正確に加え、次に試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５ mL とする。別に検量線作成のため、パントテン酸カルシウム標準溶液（０～0.15 μｇ相当量）を試験管２本ずつに取り、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５ mL とする。121℃で５分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液１滴（約 30 μL）ずつを無菌的に接種し、37 ℃で 18 時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する[注6)]。標準溶液の濁度より検量線を作成し[注7)]、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のパントテン酸カルシウム濃度（C μg/mL）を求め、試料中のパントテン酸カルシウム含量を算出する。得られた値に係数 0.92 を掛けてパントテン酸量とする。

⑥　計算

$$\text{試料中のパントテン酸含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V_1 \times D \times V_3 \times V_5}{V_2 \times V_4 \times W \times 10} \times 0.92$$

C：検量線から求めたパントテン酸カルシウムの濃度（μg/mL）

V_1～V_5：定容量（mL）又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

0.92：パントテン酸の分子量（219.23×2）をパントテン酸カルシウムの分子量（476.53）で除した係数。

［注］

１）　日本薬局方標準品「パントテン酸カルシウム標準品」又は同等品を用いる。

２）　ハト肝臓アセトンパウダー中にはパントテン酸関連化合物が含まれているため、あらかじめイオン交換樹脂処理によりこれを除去しておく必要がある。

３）　旧名称は、*Lactobacillus arabinosus* である。この菌は遊離パントテン酸にしか応答しないので、CoA（コエンザイム A）関連化合物等の結合型パントテン酸はあらかじめハト肝臓アミダーゼとアルカリホスファターゼで分解処理して遊離型に誘導しておく必要がある。

４）　パントテン酸定量用基礎培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス

一般乳酸菌保存検出用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス

一般乳酸菌接種用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス（前培養培地に同じ）

５）　CoA 関連化合物等の結合型パントテン酸があまり多くない場合の試験溶液の調製は、パントテン酸の含量又は食品種に応じて以下の２種の簡易法のいずれかによってもよい。

①　パントテン酸含量が比較的少ない場合の簡易調製法

試料２g を精秤して水 50　mL を加え、１mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8～7.0 に調整し、121℃で 15 分間オートクレーブで加圧抽出する。冷却後、2.5 mol/L 酢酸ナトリウム溶液２mL、タカヂアスターゼ原末（第一三共 2500～5000 unit/g）又は同等品 100 mg 及びパパイン（富士フイルム和光純薬 Code No.164-00172、Activity:0.5 unit/g）100 mg を加え、１mol/L 塩酸で pH4.5 にした後、トルエンを２～３滴加え、37 ℃で 24 時間酵素分解を行う。反応後、10 分間煮沸して酵素反応を停止し、冷却後、10 %メタリン酸 0.3 mL を加えて 100 mL に定容し、ろ過する。ろ液 25 mL を分取して１ mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、水を加えて 50 mL に定容してろ過し、さらに溶液１ mL 中にパントテン酸が 20～40 ng 含まれるように水で希釈し、試験溶液とする。

②　パントテン酸含量が比較的多い場合の簡易調製法

パントテン酸カルシウム等が添加されていて液体等水分量の多い食品や、パントテン酸が高含量の場合には、単純に水で振とう抽出し、ろ過して得られるろ液を１ mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8 に調整し、試験溶液とする。

６）　マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

７）　直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

［参考文献］

１）　日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，31 パントテン酸，200-204（2023）

２）　食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

（２）　高速液体クロマトグラフ法

①　適用される食品

パントテン酸が高濃度で添加された錠剤、カプセル剤等食品に適用される。

②　装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：紫外分光光度計付き
・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）
・ホモジナイザー

・遠心分離機

③　試薬

・パントテン酸カルシウム標準溶液：D-パントテン酸カルシウム標準品[注1)] 100 mg を水に溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して 10、20、40、80、120 μg/mL となるようにする。

・硫酸亜鉛溶液：硫酸亜鉛 15 g を水に溶かして 100 mL とする。

・0.1 mol/L 塩酸：塩酸 1 容に対し水 120 容を加え混和する。

・アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用

・リン酸一カリウム溶液：リン酸一カリウム 2.72 g に水を加えて溶かして 1 L とし（0.02 mol/L)、塩酸で pH 3 に調整する。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

④　試験溶液の調製

試料の適量（W g）に水 60 mL 及びシリコーン樹脂 1 滴を加えて、5 分間ホモジナイズする[注2)]。これを遠心管に少量の水を用いて移し、0.1 mol/L 塩酸で pH4～5 に調整する。次に硫酸亜鉛溶液 10 mL を加えて良く混和し、遠心分離を行う。上澄液はろ紙でろ過し、ろ液は 100 mL の全量フラスコに受ける。遠心管の残留物は少量の水で先のろ紙に流し込み、少量の水で洗い、洗液は先の全量フラスコに合わせる。水を加えて正確に 100 mL とし（V mL)、適宜水で希釈して（希釈倍数：D)、HPLC 用試験溶液とする。

⑤　測定

試験溶液の 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、パントテン酸のピーク面積を測定し、あらかじめ同量の標準溶液を注入して得られた検量線を用いて試験溶液中のパントテン酸カルシウム濃度（C μg/mL）を求め、試料中のパントテン酸カルシウム含量を算出する。得られた値に係数 0.92 を掛けてパントテン酸量とする。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

カラム：Inertsil ODS-２（ジーエルサイエンス製）又は同等品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：アセトニトリル:リン酸一カリウム溶液（１：９）

測定波長：200 nm

流量：1.0 mL/分

⑥　計算

$$\text{試料中のパントテン酸含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10} \times 0.92$$

C：検量線から求めたパントテン酸カルシウムの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

0.92：パントテン酸の分子量（219.23×2）をパントテン酸カルシウムの分

子量（476.53）で除した係数。

［注］

１）　日本薬局方標準品「パントテン酸カルシウム標準品」又は同等品を用いる。

２）　粉砕と抽出を同時に行う。

［参考文献］

88　パントテン酸カルシウム及びパントテン酸ナトリウム、食品衛生検査指針 食品添加物編，444-446，450-452（2003）

24　ビオチン

（１）　微生物学的定量法

①　装置及び器具

・分光光度計

②　試薬

・ビオチン標準溶液：D-ビオチン標準品[注1)] 20 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 200 mL とする。さらに、水で希釈して 0.5 ng/mL となるようにする。

・２mol/L 硫酸：水８容に対し硫酸１容を加え、混和する。

・３mol/L 硫酸：水５容に対し硫酸１容を加え、混和する。

・５mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 20 g を水に溶かして 100 mL とする。

・1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム４g を水に溶かして 100 mL とする。

・使用菌株：*Lactobacillus plantarum*[注2)] ATCC 8014（NBRC 3070）

・ビオチン測定用培地（１L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	14 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	200 mg
硫酸アデニン	20 mg
塩酸グアニン	20 mg
ウラシル	20 mg
塩酸チアミン	200 μg
リボフラビン	400 μg
パラアミノ安息香酸	200 μg
パントテン酸カルシウム	400 μg
ニコチン酸	1 mg
塩酸ピリドキシン	800 μg
リン酸二水素カリウム	1 g
リン酸一水素カリウム	1 g

硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
酢酸ナトリウム（無水）	20 g
グルコース	40 g

・乳酸菌保存用培地（１L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g
ペプトン	12.5 g
ブドウ糖	11.0 g
リン酸一水素カリウム	0.25 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
リン酸二水素カリウム	0.25 g
酢酸ナトリウム（無水）	10 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
硫酸マンガン	5.0 mg
粉末寒天	20.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている[注3)]。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　接種菌液の調製

Lactobacillus plantarum の保存菌株を前培養培地に接種し、35 ℃で 20 時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、600 nm における透過率が 80～90 %になるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④　試験溶液の調製[注4)]

試料２g を精秤し（W g）、２mol/L 又は３mol/L 硫酸 25 mL を加え[注5)]、121℃で１時間オートクレーブで加圧分解する。冷却後、５mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH4.5 に調整後、水を加えて 100 mL に定容し（V_1 mL）、ろ過する。ろ液 25 mL を分取して（V_2 mL）、１mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整後、50 mL に定容し（V_3 mL）、さらに最終溶液中のビオチン濃度が検量線の範囲内に入るように水で希釈して（希釈倍数：D）、ろ過して試験溶液とする。

⑤　測定

試験管２本ずつに試験溶液 0.5、1.0 及び 2.0 mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５mL とする。別に検量線作成のため、ビオチン標準溶液（０～0.75 ng 相当量）を試験管２本ずつに取り、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５mL とする。121℃で５分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌溶液１滴（約 30 μL）ずつを無菌的に接種し、37℃で 18 時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する[注6)]。標準溶液の濁度より検量線を作成し[注7)]、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のビオチンの濃度（C ng/mL）を求め、試料中のビオチン含量を算出する。

⑥ 計算

$$\text{試料中のビオチン含量 (μg/100 g)} = \frac{C \times V_1 \times D \times V_3}{V_2 \times W \times 10}$$

C：検量線から求めたビオチンの濃度（ng/mL）

V_1～V_3：定容量（mL）又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１） 関東化学　特級、又は同等品を用いる。

２） 旧名称は、*Lactobacillus arabinosus* である。

３） ビオチン定量用基礎培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス

一般乳酸菌保存検出用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス

一般乳酸菌接種用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス（前培養培地に同じ）

４） ビオチン含量の高い食品又は主に遊離型のビオチンを含み、液体等水分の多い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を１mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH6.8 に調整し、試験溶液とすることもできる。また、この場合、ビオチンを紫外部吸収又は蛍光を有する誘導体に導いた後、勾配溶出液体クロマトグラフ法で定量する方法も適用できる（詳細は下記の文献に譲る）が、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。

５） 酸分解不足の場合に３mol/L 硫酸を使用する。

６） マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

７） 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

１） Desbene, P.L., Coustal, S. and Frappier, F.：Anal. Biochem., 128, 359 (1983)

２） 金沢良昭、中野貴彦、田中英樹：日本化学会誌, 434 (1984)

３） Yoshida, T., Uetake, A., Nakai, C. Nimura, N. and Kinoshita, T.： J. Chromatogr., 456, 421 (1988)

４）　日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，32 ビオチン，205-208（2023）
５）　食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

25　ビタミンA（レチノール活性当量として）

ビタミンは生物効力に対する名称である。定量の対象としては、主にビタミンA効力を示すレチノール、α-カロテン及びβ-カロテンとし、その定量値はレチノール活性当量として表す。なお、レチノール１μgは、α-カロテン24 μg、β-カロテン12 μgにそれぞれ相当する[注1）注2）]。

試料中のビタミンA含量 (μg/100 g)

$$= \text{レチノール}\ (\mu g/100\ g) + \frac{1}{12}\text{総カロテン}\ (\mu g/100\ g)$$

$$= \text{レチノール}\ (\mu g/100\ g) + \frac{1}{24}\alpha\text{－カロテン}\ (\mu g/100\ g)$$

$$+ \frac{1}{12}\beta\text{－カロテン}\ (\mu g/100\ g)$$

［注］

１）　β-クリプトキサンチンのようにα-カロテン、β-カロテン以外の成分でビタミンA効力を有するものを多く含む食品にあっては、それらの成分も分離・測定してレチノール当量に合算する。β-クリプトキサンチンの高速液体クロマトグラフの条件は、イ　カロテンの定量（２）高速液体クロマトグラフ法：α-カロテン、β-カロテンに同じである。なお、β-クリプトキサンチンの生物効力については、24 μgがレチノール１μgに相当する。

２）　カプセル、錠剤等の食品として摂取するβ-カロテンは、ビタミンAとしての生体利用率が１／２程度なので、２μgがレチノール１μgに相当し、食品由来のβ-カロテンとは扱いが異なる。

ア　レチノール（ビタミンAアルコール）

（１）　高速液体クロマトグラフ法

①　装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ：紫外分光光度計付き
・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）
・分光光度計：紫外部の吸収が測定可能なもの。
・振とう機
・遠心分離機
・ロータリーエバポレーター

②　試薬

・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム 60 g を冷却しながら水を加えて溶解し、正確に 100 mL とする。
・標準レチノール：日本薬局方標準品「レチノールパルミチン酸エステル」又は同等品を次の試験法に従ってけん化抽出し、標準溶液の検定を行う。フリーのレチノールを使用する場合でもイソプロピルアルコールに溶解した後、標準溶液の検定を行う。
・ピロガロール：特級
・エタノール
・塩化ナトリウム
・石油エーテル：特級
・n-ヘキサン
・酢酸エチル
・エーテル：過酸化物を含まないもの。
・メタノール
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製

試料約 0.5 g[注1)] を 60 mL 容遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g)、これに１w/v%塩化ナトリウム溶液２mL を加えてかくはん後、３w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL と水酸化カリウム溶液１mL を加え、70 ℃水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら 30 分間加熱する。水冷後、１w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL を加えた後、n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL を加える。５分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上層を 100 mL 容なす形フラスコに移す。水層を n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL でさらに２回､同様に抽出する｡抽出液を合わせ 40℃で減圧濃縮する。

残留物をエタノールに溶解し（V mL)、レチノールとして約 0.3 μg/mL となるように希釈し（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

高速液体クロマトグラフによる測定において妨害成分の影響が出る場合は、残留物を石油エーテル（特級）５mL に溶解し、以下に示すアルミナカラムを用いた精製を行う[注2）注3)]。

④ 標準溶液の調製

10～20 mg 程度を精密に量り取り、試料と同様に、③、１）の方法に従ってけん化抽出した標準レチノールをイソプロピルアルコールに溶解し、１mL 中にレチノールとして２～３μg になるように希釈し、分光光度計で 325 nm の吸光度を測定する。次式により希釈した標準溶液のレチノール濃度を求める。

$$\text{レチノール}\ (\mu g/mL) = \frac{A}{100} \times 1830 \times 0.3$$

A：希釈した標準溶液の 325 nm における吸光度（対照：イソプロピルアルコール、１cm セル）

標準レチノールをエタノールで１mL 中 0.05、0.1、0.2 及び 0.5 μｇになるように希釈し、標準溶液とする。

⑤　測定

試験溶液の一定量を高速液体クロマトグラフに注入し、レチノールのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、これを用いて試料中のレチノール含量を算出する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注4)]＞

カラム：Cosmosil　5C_{18}-MS-Ⅱ（ナカライテスク製）あるいは相当品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：メタノール-水（92:８）

測定波長：325 nm[注5)]

流量：1.0 mL/分

温度：35 ℃

注入量:20 μL

⑥　計算

$$\text{試料中のレチノール含量 (μg/100 g)} = \frac{C \times V \times D \times 100}{W}$$

C：検量線から求めたレチノールの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１）　レチノール含量が低い試料の場合、試料採取量を１～２g にする。その場合、３　w/v%ピロガロール含有エタノール液 10　mL と水酸化カリウム溶液１　mL のほか、さらに粒状水酸化カリウム２g を加えてけん化する。

２）　アルミナカラムクロマトグラフィー

活性アルミナ（Merck Art. 101097（メルク社製）又は同等品）500 g に水 50 mL を滴下して加え、振り混ぜて均一にし、密栓、一夜放置し、弱活性アルミナとする。活性度を測定し、一定の活性度のものを使用する。活性度は水の量を加減して調整する。活性度の測定においては、Yellow OB （ FD&C Yellow No.4 、Colour IndexNo.11390）20 mg を石油エーテル 100 mL に溶解し、保存溶液とする。保存溶液 10 mL を石油エーテルで 100 mL とし試験溶液とする。弱活性アルミナを石油エーテルで懸濁し、カラム 10 cm の高さに詰める。試験溶液１　mL をカラムに通し、石油エーテル-エーテル混液（９：１） を流し、黄色がカラムから落ち切るまでの容量（mL）をもって活性度の指標とする。通常、約

12 mL で溶出する。クロマト管（内径 10 mm、高さ 250 mm、ガラスコック付き）にあらかじめ活性度を調整したアルミナ約７g を石油エーテルに懸濁させ、約７cm の高さに充塡する。受器に 100 mL 容なす形フラスコを置き、カラムの上に先の残留物の石油エーテル溶液を静かに流し入れ、流量１mL/分で流出する。カラム上部の液がなくなる直前に石油エーテル５mL を加え、さらに３回繰り返す。次に、受器を別の 100mL 容褐色なす形フラスコに替える。石油エーテル-エーテル混液（９：１）を約 30 mL 流す。得られた溶出液を、40 ℃で減圧濃縮する。残留物に一定量のエタノールを加え溶解する（V mL）。１mL 中レチノールを約 0.3μg 含むようにエタノールで希釈し（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

３）　アルミナカラムによる精製処理は、共存する妨害物の除去に効果的である反面、分析精度を低下させる。したがって、妨害物が少ない場合には、むしろこの処理を省略した方がよいこともある。

４）　レチノールには、多くの異性体が存在する。13-シス体は自然界に多く存在し、加熱処理によっても生じる。13-シス体は、all-トランス体に比べて生物効力は 75 %といわれている。13-シス体を分別定量する場合は、順相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフ条件が適当である。しかし、標準の 13-シス-レチノールは得るのが難しく、不安定なので注意を要する。

５）　レチノールの測定に蛍光検出器を用いた例も報告されている。ここで、紫外部吸収検出器を用いているのは、all-トランス体と 13-シス体は吸光係数が近似しており、13-シス体を含めたレチノール含量を求めるには都合がよいためである。

イ　カロテン

（１）　吸光光度法：総カロテン[注1)]

①　装置及び器具

・分光光度計：可視部の吸収が測定可能なもの。
・クロマト管：内径 10 mm、高さ 250 mm、ガラスコック付き
・振とう機
・遠心分離機
・ロータリーエバポレーター

②　試薬

・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム 60 g を冷却しながら水を加えて溶解し、正確に 100 mL とする。
・弱活性アルミナ：活性アルミナ[注2)] 500 g に水 50 mL を滴下して加え、振り混ぜて均一にし、密栓、一夜放置する。活性度を測定し、一定の活性度[注3)]のものを使用する。活性度は水の量を加減して調整する。
・ピロガロール：特級

・エタノール
・塩化ナトリウム
・石油エーテル：特級
・n-ヘキサン
・酢酸エチル
・エーテル：過酸化物を含まないもの。
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　試験溶液の調製

1）　けん化

試料約 0.5 g を 60 mL 容遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g)、これに１w/v%塩化ナトリウム溶液２mL を加えてかくはん後、３w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL と水酸化カリウム溶液１ mL を加え、70 ℃水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら 30 分間加熱する。水冷後、1 w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL を加えた後、n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL を加える。５分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上層を 100 mL 容なす形フラスコに移す。水層を n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL でさらに２回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 40℃で減圧濃縮する。

残留物を石油エーテル（特級）５mL に溶解し、以下に示すアルミナカラムに供する。

2）　アルミナカラムクロマトグラフィー

クロマト管にあらかじめ活性度を調整したアルミナ約７g を石油エーテルに懸濁させ、約７cm の高さに充填する。受器に 100 mL 容なす形フラスコを置き、カラムの上に先の残留物の石油エーテル溶液を静かに流し入れ、流量１mL/分で流出する。カラム上部の液がなくなる直前に石油エーテル５mL を加え、さらに３回繰り返す（カロテン画分)。

カロテン画分[注4)] を 40 ℃で減圧濃縮する。残留物を一定量の n-ヘキサンに溶解し（V mL)、１mL 中にカロテンを約１μg 含むように n-ヘキサンで希釈する（希釈倍数：D)。

④　測定

分光光度計により n-ヘキサンを対照にして、試験溶液の 453 nm の吸光度を測定する。

⑤　計算

β-カロテンの吸光係数$E_{1cm}^{1\%}$＝2592（溶媒、n-ヘキサン）を用いて次式により試料中の含量を求める。

$$\text{試料中の総カロテン含量}\ (\mu g/100\ g) = A \times \frac{1000000}{2592} \times \frac{V \times D}{W}$$

A：試験溶液の吸光度

V：定容量（mL）

D：希釈倍率

W：試料摂取量（g）

［注］

１）　トマト加工品等リコピンを多く含む食品は、アルミナカラムクロマトグラフィーでリコピンとカロテンを分離することは困難である。高速液体クロマトグラフ法により、α-カロテンと β-カロテンを分離・測定し、その合計を総カロテンとした方がよい。

２）　Merck Art.101097（メルク社製）又は同等品

３）　Yellow OB（FD&C Yellow No.4、Colour Index No.11390）20 mg を石油エーテル 100 mL に溶解し、保存溶液とする。保存溶液 10 mL を石油エーテルで 100 mL とし試験溶液とする。弱活性アルミナを石油エーテルで懸濁し、カラム 10 cm の高さに詰める。

試験溶液１mL をカラムに通し､石油エーテル - エーテル混液（９：１）を流し、黄色がカラムから落ち切るまでの容量（mL）をもって活性度の指標とする。通常、約 12 mL で溶出する。

４）　弱活性アルミナカラム処理では、カロテンの異性体（α、β、γ）は分離しないため、測定値は総カロテンとなる。

（２）　高速液体クロマトグラフ法：α-カロテン、β-カロテン[注1）注2）]

①　装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ：紫外可視分光光度計付き
・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）
・分光光度計：紫外部の吸収が測定可能なもの。
・振とう機
・遠心分離機
・ロータリーエバポレーター
・超音波発生装置

②　試薬

・水酸化カリウム溶液：粒状水酸化カリウム 60 g を冷却しながら水を加えて溶解し、正確に 100 mL とする。
・α-カロテン標準溶液：α-カロテン標準品[注3）]
・β-カロテン標準溶液：β-カロテン標準品[注3）]
・ピロガロール：特級
・エタノール
・塩化ナトリウム
・石油エーテル：特級
・シクロヘキサン：特級
・イソプロピルアルコール

・n-ヘキサン
・酢酸エチル
・メタノール
・クロロホルム
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　試験溶液の調製

１）　試料約 0.5 g を 60 mL 容遠心管（共栓付き）に精密に量り（W g)、これに１w/v%塩化ナトリウム溶液２mL を加えてかくはん後、３w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL と水酸化カリウム溶液１mL を加え、70 ℃水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら 30 分間加熱する。水冷後、１ w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL を加えた後、n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL を加える。５分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上層を 100 mL 容なす形フラスコに移す。水層を n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL でさらに２回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 40℃で減圧濃縮する。

残留物をエタノールに溶解し（V mL)、β-カロテンとして約２～４μg/mL となるように希釈し（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

２）　野菜、果物又は藻類等の場合は次の操作で試験溶液を得る。試料 0.5～８ g を容量 100 mL 全量フラスコに精密に量り（W g)、ピロガロール２ g、水５ mL、HAET（n-ヘキサン：アセトン：エタノール：トルエン=10:７：６：７）40 mL 及びエタノール 20 mL を加え、15 分間振とうする。エタノールで定容し（V_1 mL)、10 分間超音波槽で処理する。溶液の一部（10 mL、V_2 mL）を 60 mL 容の遠心管（共栓付き）に正確に量り、エタノール 10 mL 及び 60 %水酸化カリウム溶液２mL を加え、70℃の水浴中で 30 分間加熱する。水冷後、１w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL を加える。５分間振とうし、遠心分離後、駒込ピペットで上澄み液を 100 mL 容のなす形フラスコに移す。水層を n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL でさらに２回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 40 ℃で減圧濃縮する。残留物をエタノールに溶解し（V_3 mL)、必要に応じてエタノールで適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。ただし、ニンジンジュースのように β-カロテン含量の高い場合はけん化操作を省略する。

④　標準溶液の調製

α-カロテン標準品５mg を精密に量り、石油エーテルで 100 mL に定容し、標準溶液 A とする。標準溶液 A２mL を正確に量り、石油エーテルで 100 mL に定容し、444 nm の吸光度を測定する。α-カロテンの吸光係数を$E_{1cm}^{1\%}$＝2,800 として標準溶液 A 中の α-カロテン濃度を求める。標準溶液 A をエタノールで希釈し、α-カロテンを１mL 中に 0.5、1.0、2.0 及び 4.0 μg 含む溶液を調製し、α-カロテン標準溶液とする。

β-カロテン標準品 20 mg を精密に量り、シクロヘキサンで 100 mL に定容し、標準溶液 B とする。標準溶液 B 2 mL を正確に量り、シクロヘキサンで 200 mL に定容し、455 nm の吸光度を測定する。β-カロテンの吸光係数を$E_{1cm}^{1\%}$＝2,500 として標準溶液 B 中の β-カロテン濃度を求める。標準溶液 B をエタノールで希釈し、β-カロテンを 1 mL 中に 0.5、1.0、2.0 及び 4.0 μg 含む溶液を調製し、β-カロテン標準溶液とする。

⑤ 測定

試験溶液の一定量を高速液体クロマトグラフに注入し、α-カロテン及び β-カロテンのピーク面積をそれぞれ測定し、あらかじめ同量の標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試験溶液中の α-カロテン及び β-カロテン濃度（C μg/mL）を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注4)]＞

カラム：InertsilODS-4（ジーエルサイエンス製）あるいは相当品、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

移動相：アセトニトリル- メタノール- テトラヒドロフラン- 酢酸（55:40:5:0.1、0.05 g/L α-トコフェロール含有）[注5)]

流量：1.5 mL/分

測定波長：455 nm

温度：40 ℃

注入量:20 μL

⑥ 計算

試料中の α-カロテン（又は β-カロテン）含量（μg/100g）

$$= \frac{C \times V \times D}{W} \times 100$$

C：検量線から求めた試験溶液の α-カロテン（又は β-カロテン）の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

（野菜、果物又は藻類等の場合の計算式）

試料中の α-カロテン（又は β-カロテン）含量（μg/100g）

$$= \frac{C \times V_1 \times D \times V_3}{W \times V_2} \times 100$$

C：検量線から求めた試験溶液の α-カロテン（又は β-カロテン）濃度（μg/mL）

V_1～V_3：定容量又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

1） トマト加工品等リコピンを多く含む食品は、アルミナカラムクロマトグラフィーでリコピンとカロテンを分離することは困難である。高速液体クロマトグラフ法により、α-カロテンと β-カロテンを分離・測定し、その合計を総カロテンとした方がよい。

2） β-クリプトキサンチンは、フナコシ 0317S（EXTRASYTESE 社製）又は相当品を用いる。濃度は β-クリプトキサンチンを石油エーテルに溶解し、452 nm の吸光度を測定し、$E^{1\%}_{1cm}$＝2,386 を用いて検定する。検量線作成用の標準溶液は、検定に用いた標準溶液を分取し、溶媒留去後、エタノールの一定量に溶解し、β-クリプトキサンチンを１ mL 中に 0.5、1.0 及び 2.0 μg 含むように調製する。

3） α-カロテン標準品は、富士フイルム和光純薬 035-17981 又は相当品を、β-カロテン標準品には、Merck Art 2236（メルク社製）又は相当品を用いる。

4） α-カロテンと β-カロテンの分離とともに、β-カロテンのシス体も分離する。シス体の β-カロテンはニンジンや藻類の抽出物中に多量に存在しているため、ここでは 9-シス体と 13-シス体のピーク面積値を all-トランス体の面積値に合わせて β-カロテン値とする。

5） リコピンの含有量が少ない場合は、メタノール-クロロホルム（96:４）でも分析可能である。

[参考文献]

1） 大森正忠、武藤泰敏：“ビタミンハンドブック、③ビタミン分析法” 日本ビタミン学会編，1，化学同人（1989）

2） 勝井五一郎：“ビタミン学実験法[Ⅰ]”，日本ビタミン学会編，14，東京化学同人（1983）

3） Quakenbush，F.W.：J. Liq. Chrom.，10，643（1987）

4） 月田潔：ビタミン，58，185（1984）

5） 氏家隆、飯田栄子、小高要、新藤寛美、上野順士：ビタミン， 64，187（1990）

26 ビタミン B_1

ビタミン B_1 は遊離型及びリン酸エステルとして存在するチアミンを定量し、チアミン塩酸塩の量として表す[注)]。

[注]

食品添加物として許可されているビタミン B_1 類のうち、ジベンゾイルチアミン及びビスベンチアミンについては、以下に示す試験法では検出できない。これらの成分を定量する場合は、それぞれ異なる試験溶液の調製法が必要となる。ジベンゾイルチアミンを含む総ビタミン B_1 の定量法として、参考文献１） ２）の方法が報告されている。

また、ヒドロキシエチルチアミン（HET）のように生体内のピルビン酸

代謝の中間体で生体チアミンの一形態として存在するものもある。HETは総チアミンの概念に含まれ、フェリシアン化カリウムによるチオクローム蛍光法では、チアミンとの合計量で求めることができる。

［参考文献］

1） 吉田幹彦、菱山隆、五十嵐友二：日本食品科学工学会誌, 55, 421 (2008)

2） 86 チアミン誘導体、食品衛生検査指針 食品添加物編, 429-436 (2003)

（1） 高速液体クロマトグラフ法[注1)]

① 装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：蛍光検出器付き
・反応ポンプ
・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）
・ガラス器具は褐色のものを使用する。

② 試薬

・標準ビタミンB_1：日本薬局方標準品「チアミン塩化物塩酸塩標準品」
・1 mol/L 塩酸：塩酸1容に対し水11容を加え混和する。
・0.1 mol/L 塩酸：塩酸1容に対し水120容を加え混和する。
・酢酸緩衝液（pH4.5）：4 mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50 %酢酸溶液 20 mL を水2Lに溶解し、必要に応じ、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
・酵素溶液：酵素[注2)] 0.5 g を酢酸緩衝液（pH4.5）10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
・パームチット：活性ビタチェンジ（吸着剤）ビタミンB_1定量用
・0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム-0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウム混液（pH2.2）：リン酸二水素ナトリウム（無水、特級）2.4 g、過塩素酸ナトリウム（無水、特級）36.7 g を水を加えて溶かし2Lとする。pH メーターを用い、過塩素酸で pH2.2 に調整する。
・25 w/v%塩化カリウム-0.1 mol/L 塩酸溶液（脱着液）：濃塩酸 8.5 mL を 25 w/v %塩化カリウム溶液1Lに加える。
・0.01 %フェリシアン化カリウム-15 %水酸化ナトリウム溶液：フェリシアン化カリウム（特級）10 mg を 100 mL 容褐色全量フラスコに量り取り、15 %水酸化ナトリウム溶液を加えて 100 mL とする。用時ごとに調製する。
・メタノール：HPLC 用
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製

試料（1～10 g）を 100 mL 容抽出瓶[注3)]に精密に量り取る（W g）。これに

0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 ℃以下に冷却し、４mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0～4.5 とする。酵素溶液５mL を加え、37 ℃で一夜保温後、酢酸緩衝液(pH4.5)で全量を 100 mL とし（V_1 mL)、試験溶液とする。

水を用いて活性ビタチェンジ（1.5 g）を詰めたカラムに、試験溶液の適当量（V_2 mL、ビタミン B_1 ５μg 以内を含有）を正確に注ぎ、流量１mL/分で吸着させる。吸着管内壁を水５mL で洗い、次に沸騰水 30～60 mL でカラムを洗った後、沸騰した脱着液を１秒１滴（３ mL/分）で流し、溶出液約 25 mL を分取する。室温に戻し、脱着液で 25 mL 定容（V_3 mL）とし、適宜脱着液で希釈して（希釈倍数：D)、HPLC 用試験溶液とする[注4）注5)]。

④ 標準溶液の調製

１） 標準原液

標準ビタミン B_1 を 105 ℃で２時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、１L 容の褐色全量フラスコに 100 mg を精密に量り、１mol/L 塩酸 50 mL を加えて溶解した後、水で定容する（100 μg/mL、冷暗所で６か月は安定、６か月置きに調製する。)。

２） 標準溶液

標準原液５mL を 500 mL 容の褐色全量フラスコに正確に量り、0.1 mol/L 塩酸で定容する（１μg/mL、１か月おきに調製し直す。)。

３） HPLC 用標準溶液

標準溶液を加熱済み 25 %塩化カリウム-0.1 mol/L 塩酸溶液で希釈し、0.1、0.05 及び 0.02 μg/mL とする。

⑤ 測定

HPLC 用試験溶液の一定量を高速液体クロマトグラフに注入し[注6)]、ビタミン B_1 のピーク高さを測定し、あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、HPLC 用試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、これを用いて試料中のビタミン B_1 含量を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

カラム：L-Column ODS（財団法人化学物質評価研究機構）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：[0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム-0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウム混液（pH2.2）]-メタノール（９：１）

検出器：蛍光分光光度計[注7)]

測定波長：励起波長 375 nm、蛍光波長 440 nm

流量：0.8 mL/分

反応液：0.01 %フェリシアン化カリウム-15 %水酸化ナトリウム溶液 0.4 mL/分[注8)]

反応管：内径 0.8 mm、長さ 100 cm

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン}B_1\text{含量}\,(\text{mg}/100\,\text{g}) = \frac{C \times V_1 \times D}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたビタミンB_1の濃度（μg/mL）

V_1～V_3：定容量又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

1） 高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンB_1リン酸エステルのそれぞれに対応するチオクロームを生成させるポストカラム定量法がある。しかし、食品中のビタミンB_1リン酸エステルは全て遊離のビタミンB_1になってから吸収されるため、酵素分解で全て遊離のビタミン B_1とした後、ポストカラム法を用いて定量する。別の方法として、ブロムシアンないしフェリシアン化カリウムでチオクロームとし、溶媒抽出して高速液体クロマトグラフに注入し、この蛍光を測定するプレカラム法もある。反応ポンプを必要としない長所を持つが、試料により反応率に影響を受ける欠点がある。

2） 例えばビタミンB_1・B_2定量用酸性ホスファターゼ（富士フイルム和光純薬）又は同等品（フォスファターゼ活性を有するもの）。

3） 褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。

4） 精製には、ミニカラム（陽イオン交換樹脂）を用いてもよい。

メーカーの説明に従ってコンディショニングした BOND ELUTJr.SCX500 mg（アジレント・テクノロジー（株））又は同等品に、2～20 mL の試験溶液（チアミン 20 μg 以下）を通液し（V_2 mL）、5 mL の水で洗浄した後、10 mL のメタノール・脱着液（1：4）5 mL の水でメタノール・脱着液 （1：4） 溶出し、脱着液で定容 （V_3 mL）とし、適宜、メタノール・脱着液（1：9）で希釈して （希釈倍数：D)、HPLC 用試験溶液とする。

5） カラムスイッチング法を用いても良い。

6） ためし打ち等をして、標準溶液 0.1 μg/mL と同じくらいになるように希釈を考える。パームチットカラム負荷のときの吸着絶対量は約 10 μg なので、4 倍以上の希釈を必要とする場合はもう一度パームチットカラムからやり直して値を比較する。

7） 感度を向上させるためには検出器のセル容量の大きいものがよい（例えば 12 μL)。

8） 水酸化ナトリウムの濃度は、1～20 %の範囲では高いほどよいが、反応管内の詰まりを防ぐため 15 %にしている。フェリシアン化カリウム濃度は 0.001～0.01 %で高い感度を示す。試薬の安定性から 0.01 %にしている。反応温度は、30～50 ℃で差がない。反応管をカラムオーブ

ン内に入れ、カラムと同じ温度で行うと便利である。

分析終了後は必ず反応ポンプ、HPLC 側ポンプとも 30 分間以上水洗する。終了後、カラムをメタノール等で置換しておく。

［参考文献］

日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，25 チアミン（ビタミン B_1），170-179（2023）

（２） チオクローム法

① 装置及び器具

・蛍光光度計：励起波長 360 nm、蛍光波長 435 nm で測定可能なもの。

・ガラス器具は褐色のものを使用する。

② 試薬

・標準ビタミン B_1：日本薬局方標準品「塩酸チアミン標準品」

・0.1 mol/L 塩酸：塩酸１容に対し水 120 容を加え混和する。

・酢酸緩衝液（pH4.5）：４mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50 %酢酸溶液 20 mL を水２L に溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。

・酵素溶液：酵素[注1)] 0.5 g を酢酸緩衝液（pH4.5）10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。

・パームチット：活性ビタチェンジ（吸着剤）ビタミン B_1 定量用

・25 w/v%塩化カリウム-0.1 mol/L 塩酸溶液（脱着液）：濃塩酸 8.5 mL を 25 w/v %塩化カリウム溶液１L に加える。

・１w/v%フェリシアン化カリウム液：フェリシアン化カリウム（特級）100 mg を 10 mL 容褐色全量フラスコに量り取り、水を加えて 10 mL とする。用時ごとに調製する。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製

試料（１～10 g）を 100 mL 容抽出瓶[注2)]に精密に量り取る（W g）。これに 0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 ℃以下に冷却し、４mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0～4.5 とする。酵素溶液５ mL を加え、37 ℃で一夜保温後、酢酸緩衝液(pH4.5)で全量を 100 mL とし（V_1 mL）、試験溶液とする。

水を用いて活性ビタチェンジ（1.5 g）を詰めたカラムに、試験溶液の適当量（V_2 mL、ビタミン B_1 ５μg 以内を含有）を正確に注ぎ、流量１ mL/分で吸着させる。吸着管内壁を水５ mL で洗い、次に沸騰水 30～60 mL でカラムを洗った後、沸騰した脱着液を１秒１滴（３mL/分）で流し、溶出液約 25 mL を分取する。室温に戻し、脱着液で 25 mL 定容（V_3 mL）とし、適宜脱着液で希釈して（希釈倍数：D）[注3)]、測定用試験溶液とする[注4)]。

④ 標準溶液の調製

標準ビタミンB_1を 105 ℃で２時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、0.1 mol/L 塩酸で１μg/mL となるように調製する。

⑤　測定

試験溶液５mL を３本の試験管に取る(a、b、c)。a には標準溶液(１μg/mL)１mL を加え、b 及び c には水１mL を加える。a 及び b に１w/v%フェリシアン化カリウム液 0.3 mL を加え、c には水 0.3 mL を加える。次に、各試験管に 30 %水酸化ナトリウム溶液３mL を加え、よく振り混ぜる。次に、ベンゼン-ブタノール（75：25）15 mL を加え、１分間よく振り混ぜた後、分離した有機溶媒層を取る。これに無水硫酸ナトリウム約２g を加え、脱水後、有機溶媒層の蛍光を測定する。励起波長 360 nm、蛍光波長 435 nm で a の蛍光光度計の目盛りを 100 %とし、b 及び c を測定し、試料中のビタミンB_1含量を求める。

⑥　計算

$$\text{測定用試験溶液のビタミン}B_1\text{の濃度}\ (\mu g/mL) = \frac{b-c}{a-b} \times \frac{1}{5}$$

a、b 及び c ：a、b 及び c の蛍光光度計の目盛り

$$\text{試料中のビタミン}B_1\text{含量}\ (mg/100\ g) = \frac{C \times V_1 \times D}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：測定用試験溶液のビタミンB_1の濃度（μg/mL）

V_1～V_3：定容量又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１）　例えばビタミンB_1・B_2定量用酸性ホスファターゼ（富士フイルム和光純薬）又は同等品（フォスファターゼ活性を有するもの）。

２）　褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。

３）　約 0.2 μg/mL となるように希釈を考える。パームチットカラム負荷のときの吸着絶対量は約 10 μg なので、２倍以上の希釈を必要とする場合はもう一度パームチットカラムからやり直して値を比較する。

４）　精製には、ミニカラム（陽イオン交換樹脂）を用いてもよい。メーカーの説明に従ってコンディショニングした BOND ELUTJr.SCX500 mg（アジレント・テクノロジー（株））又は同等品に、２～20 mL の試験溶液（チアミン 20 μg 以下）を通液し（V_2 mL)、５mL の水で洗浄した後、10 mL のメタノール・脱着液（１：４）５mL の水でメタノール・脱着液（１：４）溶出し、脱着液で定容（V_3 mL）とし、適宜、メタノール・脱着液（１：９）で希釈して（希釈倍数：D)、HPLC 用試験溶液とする。

27　ビタミンB_2

ビタミンB_2は遊離型及びリン酸エステルとして存在するリボフラビンを定量し、遊離のリボフラビンの量として表す[注)]。

［注］

食品添加物として用いられるビタミン B_2酪酸エステルは、酸分解することで総ビタミンB_2として求めることができる。

［参考文献］

１） 92 リボフラビン及びその誘導体、食品衛生検査指針 食品添加物編, 478-485（2003）

２） （２） ビタミンB_2 、食品衛生検査指針 理化学編, 113-117（2015）

（１） 高速液体クロマトグラフ法[注１)]

① 装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：蛍光検出器付き

・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）

・ガラス器具は褐色のものを使用する。

② 試薬

・標準ビタミンB_2：日本薬局方標準品「リボフラビン標準品」を使用する。

・0.1 mol/L 塩酸：塩酸１容に対し水 120 容を加え混和する。

・酢酸緩衝液（pH4.5）：４mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50 %酢酸溶液 20 mL を水２ L に溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。

・酵素溶液：酵素[注２)] 0.5 g を酢酸緩衝液（pH4.5）10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。

・メタノール

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製[注３)]

試料（１～10 g）を 100 mL 容抽出瓶[注４)]に精密に量り取る（W g）。これに 0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 ℃以下に冷却し、４ mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0～4.5 とする。酵素溶液５mL を加え、37 ℃で一夜保温後、酢酸緩衝液(pH4.5)で全量を 100 mL とし（V mL）、適宜酢酸緩衝液（pH4.5）で希釈して（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

④ 標準溶液の調製

１） 標準原液

標準ビタミンB_2を 105 ℃で２時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、１L 容の褐色全量フラスコに 50 mg を精密に量り取る。酢酸４mL と温水約 700 mL を加え超音波にかけながら溶かす。冷却後、水で定容する

（50 μg/mL、冷暗所で６か月は安定、６か月ごとに調製する）。

２） 標準溶液

標準原液４mL を 200 mL 容の褐色全量フラスコに正確に量り、酢酸緩衝液（pH4.5）で定容する（1.0 μg/mL、用時ごとに調製する。）。

３） HPLC 用標準溶液

標準溶液を酢酸緩衝液（pH4.5）で希釈し、0.1、0.05 及び 0.02 μg/mL とする。

⑤ 測定

試験溶液の一定量を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンB_2のピーク高さを測定し、あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中のビタミンB_2含量を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注5)]＞

カラム：Cosmosil ５C_{18}-MS-Ⅱ（ナカライテスク製）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：酢酸緩衝液（pH4.5）-メタノール（65:35）

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長 445 nm、蛍光波長 530 nm

流量：1.0 mL/分

温度：35 ℃

注入量:：20 μL

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン}B_2\text{含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたビタミンB_2の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１） 酵素分解なしで高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミンB_2リン酸エステルを分別定量する方法もあるが、食品中のビタミン B_2リン酸エステルは、大部分が遊離のビタミンB_2になってから吸収されるため、ここでは酵素分解で全て遊離ビタミンB_2とした後定量する。

２） 例えばビタミンB_1・B_2定量用酸性ホスファターゼ（富士フイルム和光純薬）又は同等品（フォスファターゼ活性を有するもの）。

３） 酵素分解に使用する酵素の中にビタミンB_2が含まれている場合は、ロットごとに含量を求めて補正する必要がある。

４） 褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。

５）　感度を向上させるためには検出器のセル容量の大きいものがよい（例えば 12 μL）。

（２）　ルミフラビン法

①　装置及び器具

・蛍光光度計：励起波長 440 nm、蛍光波長 525 nm で測定可能なもの。
・ガラス器具は褐色のものを使用する。
・振とう機
・蛍光灯

②　試薬

・標準ビタミン B_2：日本薬局方標準品「リボフラビン標準品」を使用する。
・酢酸緩衝液（pH4.5）：４ mol/L 酢酸ナトリウム溶液 40 mL、50 %酢酸溶液 20 mL を水２L に溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
・酵素溶液：酵素[注1)] 0.5 g を酢酸緩衝液（pH4.5）10 mL に用時溶解し、ろ過又は遠心分離して、その上澄み液を使用する。
・0.1 mol/L 塩酸：塩酸１容に対し水 120 容を加え混和する。
・１mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム（特級）41.7 g を水で溶かし１L とする。
・４w/v%過マンガン酸カリウム溶液：褐色瓶に保存する。
・３v/v%過酸化水素水：過酸化水素水を水で希釈する。
・クロロホルム：蛍光のないもの。
・無水硫酸ナトリウム
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　試験溶液の調製

試料（１～10 g）を 100 mL 容抽出瓶[注2)] に精密に量り取る（W g）。これに 0.1 mol/L 塩酸 50 mL を加え、30 分間沸騰水浴中で加熱し、時々かくはんしながら抽出する。50 ℃以下に冷却し、４ mol/L 酢酸ナトリウム溶液で pH4.0～4.5 とする。酵素溶液５ mL を加え、37 ℃で一夜保温後、酢酸緩衝液(pH4.5)で全量を 100 mL とし（V mL）、適宜酢酸緩衝液（pH4.5）で希釈して（希釈倍数：D)、リボフラビン 0.1～0.3 μg/mL を含む試験溶液とする。

④　標準溶液の調製

標準ビタミン B_2 を 105 ℃で２時間乾燥し、30 分間デシケーター内で放冷後、15 mg を精密に量り取り、酢酸３mL に溶かし、水で 1,000 mL に定容する。この溶液を 0.3 %酢酸で希釈し、１μg/mL を調製する。

⑤　測定

試験溶液５mL を３本の試験管に取る（a、b、c）（c は褐色試験管)。a には標準溶液（１μg/mL）１ml を、b 及び c には水１mL を正確に加える。それぞれに１mol/L 水酸化ナトリウム溶液３mL を加え、a 及び b は蛍光灯（20 W×

２本、試験管までの距離 10 cm）で１時間照射し、c は暗所に静置する。１時間後 a、b 及び c に酢酸 0.5 mL を加える。次に a、b 及び c に４w/v%過マンガン酸カリウム溶液 0.5 mL を加え、混合後１分間放置する。次に３v/v%過酸化水素水 0.5 mL を加える。クロロホルムを正確に 10 mL 加え、５分間振とうする。上層を除き、クロロホルム層に無水硫酸ナトリウム約２g を加えて脱水する。a の蛍光光度計の目盛を 100 %とし、b 及び c を測定し、試料中のビタミン B_2 含量を求める。

⑥ 計算

$$\text{試験溶液のビタミン}B_2\text{の濃度}\ (\mu g/mL) = \frac{b-c}{a-b} \times \frac{1}{5}$$

a、b 及び c ：a、b 及び c の蛍光光度計の目盛り

$$\text{試料中のビタミン}B_2\text{含量} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：試験溶液のビタミン B_2 の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１） 例えばビタミン B_1・B_2 定量用酸性ホスファターゼ（富士フイルム和光純薬）又は同等品（フォスファターゼ活性を有するもの）。

２） 褐色ガラス製で、容量 100 mL に刻線の付いた共栓付き抽出瓶。ビーカーと全量フラスコを代わりに用いてもよい。

28 ビタミン B_6

（１） 微生物学的定量法

① 装置及び器具

・分光光度計

② 試薬

・ピリドキシン標準溶液：塩酸ピリドキシン（日本薬局方標準品）100 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して５ng/mL となるようにする。

・0.055 mol/L 塩酸：塩酸１容に対し水 210 容を加え混和する。

・0.5 mol/L 硫酸：硫酸１容に対し水 35 容を加え混和する。

・10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 40 g を水に溶かして 100 mL とする。

・使用菌株：*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080（NBRC 0565）

・ビタミン B_6 測定用培地（１L 中、pH5.0±0.1）

カザミノ酸	8g
イノシトール	50 mg
塩酸チアミン	500 μg
ニコチン酸	5mg
パントテン酸カルシウム	5mg
ビオチン	16 μg
塩化カリウム	850 mg
グルコース	100 g
塩化カルシウム	250 mg
硫酸マグネシウム	250 mg
硫酸マンガン	5mg
リン酸二水素カリウム	1.1 g
塩化第二鉄	5mg
クエン酸カリウム	10 g
クエン酸	2g

定量用培地は調製したものが市販されている[注1)]。

・菌保存用培地（1L 中、pH5.0±0.1）

ペプトン	5g
酵母エキス	3g
グルコース	10 g
粉末寒天	3g
麦芽エキス	3g

・前培養培地：菌保存用培地に同じ。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 接種菌液の調製

Saccharomyces cerevisiae の保存菌株を前培養培地に接種し、30 ℃で 20 時間程度培養する。培養後菌体を 1 白金耳とり、600 nm における透過率 80～90 %となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④ 試験溶液の調製

試料 2 g を精密に量り（W g)、0.055 mol/L 塩酸 180 mL を加え、121 ℃、4 時間又は 0.5 mol/L 硫酸 180 mL を加え、121℃、1 時間オートクレーブ処理を行う[注2)]。冷却後、10 mol/L 水酸化ナトリウムで pH5.0 に調整する。これを 250 mL 容の全量フラスコに移し、水で正確に 250 mL とし（V mL)、ろ過する。さらに溶液 1 mL 中にビタミン B_6 が 1～3 ng となるように水で希釈し（希釈倍数：D)、試験溶液とする[注3)]。

⑤ 測定

試験管 2 本ずつに試験溶液 0.5、1 及び 2 mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を 5 mL とする。別に検量線作成のため、ビタミン B_6 標準溶液（0～7.5 ng 相当量）を試験管 2 本ずつに取り、

それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５mL とする。100 ℃で 15 分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液１滴（約 30 μL）ずつを無菌的に接種し、30 ℃で 20 時間程度振とう培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する[注4)]。標準溶液の濁度より検量線を作成し[注5)]、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中の塩酸ピリドキシンの濃度（C ng/mL）を求め、試料中の塩酸ピリドキシン含量を算出する。得られた値に係数 0.8227 を掛けてビタミン B_6 量とする。

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン}B_6\text{含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10{,}000} \times 0.8227$$

C：検量線から求めた塩酸ピリドキシンの濃度（ng/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

0.8227：ピリドキシンの分子量（169.18）を塩酸ピリドキシンの分子量（205.64）で除した係数。

[注]

１） ビタミン B_6 定量用基礎培地「アキュディア」:島津ダイアグノスティクス

２） 通常、動物性食品は 0.055 mol/L 塩酸、植物性食品は 0.5 mol/L 硫酸を用いる。

３） ビタミン B_6 含量の高い食品については、0.055 mol/L 塩酸で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を試験溶液とすることもできる。４） マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

５） 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

１） 日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，28 ビタミン B_6（ピリドキシン，ピリドキサール，ピリドキサミンなど），187-190（2023）

２） 食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

（２） 高速液体クロマトグラフ法

① 適用される食品

ピリドキシンが高濃度で添加された錠剤、カプセル剤等食品に適用される。

② 装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：蛍光検出器付き
・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）

③　試薬

・ピリドキシン標準溶液：塩酸ピリドキシン（日本薬局方標準品）100 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して 0.5、2.0、5.0 ng/mL となるようにする。
・0.055 mol/L 塩酸：塩酸 1 容に対し水 210 容を加え混和する。
・0.5 mol/L 硫酸：硫酸 1 容に対し水 35 容を加え混和する。
・10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム 40 g を水に溶かして 100 mL とする。
・0.05 mol/L 過塩素酸水溶液：過塩素酸（60 %水溶液）5.5 mL に対し水 1 L を加え混和する。
・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

④　試験溶液の調製

試料２g を精密に量り（W g）、0.055 mol/L 塩酸 180 mL を加え、121 ℃、４時間又は 0.5 mol/L 硫酸 180 mL を加え、121℃、１時間オートクレーブ処理を行う[注1)]。冷却後、10 mol/L 水酸化ナトリウムで pH5.0 に調整する。これを 250 mL 容の全量フラスコに移し、水で正確に 250 mL とし（V mL）、ろ過する。さらに溶液１mL 中にビタミン B_6 が１～３ng となるように水で希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする[注2)]。

⑤　測定

試験溶液の 20 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、塩酸ピリドキシンのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の標準溶液を注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の濃度（C ng/mL）を求め、試料中の塩酸ピリドキシン含量を算出する。得られた値に係数 0.8227 を掛けてビタミン B_6 量とする。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

カラム：Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス製）又は同等品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製
移動相：0.05 mol/L 過塩素酸水溶液
測定波長：励起波長 295 nm、蛍光波長 405 nm
流量：1.2 mL/分

⑥　計算

$$\text{試料中のビタミン}B_6\text{含量}\ (\text{mg}/100\ \text{g}) = \frac{C \times V \times D}{W \times 10{,}000} \times 0.8227$$

C：検量線から求めた塩酸ピリドキシンの濃度（ng/mL）
V：定容量（mL）
D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

0.8227：ピリドキシンの分子量（169.18）を塩酸ピリドキシンの分子量（205.64）で除した係数。

［注］

１）　通常、動物性食品は0.055 mol/L塩酸、植物性食品は0.5 mol/L硫酸を用いる。

２）　ビタミンB_6含量の高い食品については、0.055 mol/L塩酸で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液を試験溶液とすることもできる。

29　ビタミンB_{12}

（１）　微生物学的定量法

①　装置及び器具

・分光光度計

②　試薬

・ビタミンB_{12}標準溶液：シアノコバラミン（日本薬局方標準品）10 mgを25 v/v%エタノール溶液に溶かし正確に100 mLとする。さらに、水で希釈して0.1 ng/mLとなるようにする。

・酢酸ナトリウム緩衝液：酢酸19.8 mL、酢酸ナトリウム三水和物38.56 gを水500 mLに溶解する（pH4.5）。

・シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム結晶を0.2 w/v%水酸化ナトリウム溶液に溶解し、0.5 mg/mLの溶液を調製する。

・使用菌株：*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*[注1)] ATCC 7830（NBRC 3376）

・ビタミンB_{12}測定用培地（１L中、pH6.0±0.1）

カザミノ酸	15 g
L-シスチン	400 mg
DL-トリプトファン	400 mg
硫酸アデニン	20 mg
塩酸グアニン	20 mg
ウラシル	20 mg
キサンチン	20 mg
塩酸チアミン	１mg
リボフラビン	１mg
ビオチン	10 μg
ニコチン酸	２mg
パラアミノ安息香酸	２mg
パントテン酸カルシウム	１mg
塩酸ピリドキシン	４mg
塩酸ピリドキサール	４mg

塩酸ピリドキサミン	800 μg
葉酸	200 μg
リン酸二水素カリウム	1g
リン酸一水素カリウム	1g
硫酸マグネシウム	400 mg
硫酸鉄	20 mg
硫酸マンガン	20 mg
塩化ナトリウム	20 mg
L-アスパラギン	200 mg
グルコース	40 g
酢酸ナトリウム	20 g
アスコルビン酸	4g
ポリソルベート 80	2g

・菌保存用培地（1L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	8.5 g
グルコース	11.0 g
トマトジュース粉	3.7 g
粉末寒天	15.0 g
ペプトン	8.5 g
リン酸二水素カリウム	2.0 g
ポリソルベート 80	1.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

なお各培地はそれぞれ調製したものが市販されている[注2)]。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　接種菌液の調製

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* の保存菌株を前培養培地に接種し、37 ℃で 20 時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で２回洗浄する。洗浄後、600 nm における透過率 80～90 %となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④　試験溶液の調製[注3）注4）]

試料２g を精密に量り（W g)、酢酸ナトリウム緩衝液 10 mL、水 40 mL 及びシアン化カリウム溶液 0.4 mL を加える。100 ℃で 30 分間加熱した後、冷却し、10 %メタリン酸 0.6 mL を加え、正確に 100 mL としたものをろ過する（V_1 mL)。ろ液の一定量（V_2 mL）を正確に取り pH6.0 に調整した後、水で正確に定容する（V_3 mL)。さらに溶液１ mL 中にビタミン B_{12} が 0.02～0.04 ng 含むよう水で希釈し（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

⑤　測定

試験管２本ずつに試験溶液 0.5、１及び２mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５mL とする。別に検量線作成の

ため、ビタミン B_{12} 標準溶液（０～0.15 ng 相当量）を試験管２本ずつにとり、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５mL とする。121 ℃で５分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液１滴（約 30 μL）ずつを無菌的に接種し、37 ℃で 22 時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、増殖度を 600 nm の濁度を用いて測定する[注5)]。標準溶液の濁度より検量線を作成し[注6)]、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中のシアノコバラミンの濃度（C ng/mL）を求め、試料中のビタミン B_{12} 含量を算出する。

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン}B_{12}\text{含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times V_1 \times D}{W \times 10} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたシアノコバラミンの濃度（ng/mL）

V_1～V_3：定容量（mL）又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１） 旧名称は、*Lactobacillus leichmannii* である。

２） ビタミン B_{12} 定量用基礎培地「ライヒマニ用アキュディア」：島津ダイアグノスティクス
ライヒマニ保存用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス
ライヒマニ接種用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス（前培養培地に同じ）

３） ヌクレオチドなどの含量が高く、サンプルブランクを測定するために熱アルカリ処理を必要とする場合には、試験溶液を 25 mL 分取し、そこへ 10 mol/Ｌの水酸化ナトリウム１ mL を加え、pH がアルカリ側にあることを確認した後にオートクレーブで 121℃、30 分間加熱処理を行う。

４） ビタミン B_{12} 含量の高い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液の pH を調整し、試験溶液とすることもできる。

５） マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

６） 直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

１） 日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，29 ビタミン B_{12} （コバラミン類），191-195（2023）

２）　食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

（２）　高速液体クロマトグラフ法

①　適用される食品

シアノコバラミンが高濃度で添加された錠剤、カプセル剤等食品に適用される。

②　装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：紫外分光光度計付き

・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）

③　試薬

・ビタミンB_{12}標準溶液：シアノコバラミン（日本薬局方標準品）10 mg を 25 v/v%エタノール溶液に溶かし正確に 100 mL とする。さらに、水で希釈して 0.3、1.0、3.0 μg/mL となるようにする。

・酢酸ナトリウム緩衝液：酢酸 19.8 mL、酢酸ナトリウム三水和物 38.56 g を水 500 mL に溶解する（pH4.5）。

・シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム結晶を 0.2 w/v%水酸化ナトリウム溶液に溶解し、0.5 mg/mL の溶液を調製する。

・アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用

・0.05 mol/L 酢酸アンモニウム水溶液：酢酸アンモニウム 3.85 g に水を加えて１Ｌとする。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

④　試験溶液の調製[注)]

試料２g を精密に量り（W g）、酢酸ナトリウム緩衝液 10 mL、水 40 mL 及びシアン化カリウム溶液 0.4 mL を加える。100 ℃で 30 分間加熱した後、冷却し、10 %メタリン酸 0.6 mL を加え、正確に 100 mL としたものをろ過する（V_1 mL）。ろ液の一定量（V_2 mL）を正確に取り pH6.0 に調整した後、水で正確に定容する（V_3 mL）。さらに溶液 1 mL 中にビタミンB_{12}が 1 μg 程度含まれるよう水で希釈し（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

⑤　測定

試験溶液の 20 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、シアノコバラミンのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の標準溶液を注入して得られた検量線を用いて試験溶液中のシアノコバラミンの濃度（C μg/mL）を求め、試料中のビタミンB_{12}含量を算出する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

カラム：Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス製）又は同等品、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：0.05 mol/L 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル（９：１）

測定波長：550 nm

流量：1.2 mL/分

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン}B_{12}\text{含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times V_1 \times D \times 100}{W} \times \frac{V_3}{V_2}$$

C：検量線から求めたシアノコバラミンの濃度（μg/mL）

V_1～V_3：定容量（mL）又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

ビタミンB_{12}含量の高い食品については、水で振とう抽出し、ろ過して得られたろ液の pH を調整し、試験溶液とすることもできる。

30 ビタミンC

ビタミンC は、L-アスコルビン酸（還元型ビタミンC）及びL-デヒドロアスコルビン酸（酸化型ビタミンC）を測定の対象とし、その測定値の合計とする。

（１） 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法

① 装置及び器具

・分光光度計：540 nm の吸光度が測定できるもの。

・遠心分離機

② 試薬

・標準ビタミンC：日本薬局方標準品「L-アスコルビン酸標準品」又は同等品を用いる。

・メタリン酸：特級

・２w/v%チオ尿素含有５%メタリン酸溶液：チオ尿素（特級）２g を５%メタリン酸で溶解し、100 mL とする。

・4.5 mol/L 硫酸：硫酸１容に対し水３容を加え混和する。

・ヒドラジン溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（特級）２g[注1)]を 4.5 mol/L 硫酸に溶解し、100 mL とする。冷暗所に保存し、２週間ごとに調製する。

・インドフェノール溶液：2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム二水和物 100 mg を温水に溶解し、50 mL とする。

・海砂：市販の海砂を蒸留水で洗い強熱する。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製

試料（１～５g）を精密に量り（W g）、５%メタリン酸溶液と海砂（必要に応じて加える。）を加え、乳鉢等で十分にすりつぶす[注2)]。５%メタリン酸溶液を加えてよく混和し 50 mL に定容する（V mL）。遠心分離（3,000 回転/分、10 分間程度）を行い、この上澄み液を必要に応じて５%メタリン酸溶液で適宜希釈して（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

④　標準溶液の調製

１）　標準原液

標準ビタミンＣ 100 mg を精密に量り、５%メタリン酸溶液に溶解し、100 mL に定容する（冷蔵保存、３週間ごとに調製する）。

２）　標準溶液

標準原液を５%メタリン酸溶液で希釈し、5.0、10 及び 20 μg/mL の溶液を調製する（用時ごとに調製する）。

⑤　測定

１）　試験溶液

試験溶液２mL を主検用と盲検用の２本の共栓付き試験管に正確に量り、インドフェノール溶液を滴下（ピンク色を１分間保つ量）する。次に、それぞれの試験管に２w/v%チオ尿素含有５%メタリン酸溶液２mL を加える。

主検用の試験管にヒドラジン溶液１mL を加え、混和後、50 ℃の恒温水槽中に１時間静置する。盲検用の試験管には、ヒドラジン溶液を加えず、同様に 50 ℃で１時間放置する。

反応後直ちに試験管を氷水中で冷却する。85 %硫酸をビュレットに入れ、試験管を氷水中で振りながら、その 85 %硫酸５mL を徐々に加える。盲検用の試験管にはヒドラジン溶液１mL を加えよく混和する。

30 分間室温に放置後、540 nm の吸光度を測定する。主検と盲検の吸光度の差と、２）により作成する検量線から、試験溶液中の総ビタミンＣ濃度（C μg/mL）を求める。

２）　標準溶液

各濃度の標準溶液２mL について１）と同様の操作を行い、540 nm の吸光度を測定し、主検と盲検の吸光度の差から検量線を作成する。

⑥　計算

$$\text{試料中の総ビタミン C 含量 (mg/100 g)} = \frac{C_{\square} \times V_{\square} \times D_{\square}}{W_{\square} \times 10}$$

C：検量線から求めた総ビタミンＣの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１）　2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの市販試薬は安定剤として水を約 50 %含んでいるので、４g 採取する必要がある。

２）　必要に応じて海砂を加える。その際は、遠心分離又はろ過により海砂を除いてから定容する。

（２）　インドフェノール・キシレン法

①　適用される食品

ぶどう、いちごのように赤色系の色素を含有する果汁のビタミンＣの定量に用いられる。

2,6-ジクロロフェノールインドフェノールと果汁中のアスコルビン酸の反応の結果残存する 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールをキシレンに転溶することにより果汁に固有の色素と分離し、一定量の試料による還元量をビタミンＣ標準溶液による還元量と比較定量する。

② 装置及び器具

・分光光度計：500 nm の吸光度を測定できるもの。

・30 mL 共栓試験管

③ 試薬

・６w/v%メタリン酸溶液：メタリン酸６g を水に溶解して 100 mL とする。

・ビタミンＣ標準溶液：結晶 L-アスコルビン酸（日本薬局方標準品又は同等品）２mg に２w/v%メタリン酸（６w/v%メタリン酸 100 mL に水を加えて 300 mL とする）を加えて 100 mL とする。

・色素溶液：2,6-ジクロロインドフェノールナトリウム 25 mg を水に溶解して 200 mL とする。

・酢酸緩衝液：無水酢酸ナトリウム（特級）30 g、水 70 mL 及び酢酸（特級）100 mL を混合する。

・キシレン：特級

④ 試験溶液の調製

試料 10 g（W g）に６w/v%メタリン酸溶液を加えて 100 mL とし（V mL)、必要があればろ過又は遠心分離し、上澄み液を試験溶液とする。溶液１mL 中にアスコルビン酸を 0.02 mg 程度含むように、６w/v%メタリン酸溶液で希釈する（希釈倍数：D)。

⑤ 測定

30 mL 共栓試験管３本を用意し、試験管 a に試験溶液５mL、b に６w/v%メタリン酸溶液５mL，c にビタミンＣ標準溶液５ mL を正確に取り、次にそれぞれの試験管に酢酸緩衝液２mL と色素溶液２mL ずつを手早く正確に加えて軽く振りまぜる。

直ちにそれぞれの試験管にキシレン 10 mL ずつを正確に加え、栓をして 30 秒間振りまぜた後静置してキシレン層を分離させる。

試験管 a、b、c から取ったキシレン層をセルに取り、分光光度計により 500 nm における吸光度を測定する[注)]。

⑥ 計算

試験管 a、b、c のキシレン層の吸光度をそれぞれ A、B、C とすれば試料中のビタミンＣは次式により計算される。

$$\text{試料中のビタミンC含量 (mg/100 g)} = \frac{B-A}{B-C} \times \frac{K \times V \times D}{W} \times 100$$

K：ビタミンＣ標準溶液１ mL 中のビタミンＣ mg 数（正確に調製された場

合は 0.02）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

キシレン可溶性色素が検液中に混在するときは、吸光度測定に妨害が起きるので、キシレン抽出液の吸光度をいったん測定後、半飽和ヒドロキノンアセトン溶液を２滴加え混合後再び測定し、その差をもってインドフェノール色素の吸光度とする。

（３）　高速液体クロマトグラフ法[注1)]

①　装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：紫外可視分光光度計付き

・カラム：順相型（シリカゲルを充てんしたカラム）

・遠心分離機

②　試薬

・標準ビタミンＣ：日本薬局方標準品「L-アスコルビン酸標準品」又は同等品を用いる。

・メタリン酸：特級

・２w/v%チオ尿素含有５%メタリン酸溶液：チオ尿素（特級）２ｇを５%メタリン酸で溶解し、100 mL とする。

・4.5 mol/L 硫酸：硫酸１容に対し水３容を加え混和する。

・ヒドラジン溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（特級）２ｇ[注2)]を 4.5 mol/L 硫酸に溶解し、100 mL とする。冷暗所に保存し、２週間ごとに調製する。

・インドフェノール溶液：2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム二水和物 100 mg を温水に溶解し、50 mL とする。

・海砂：市販の海砂を蒸留水で洗い強熱する。

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　試験溶液の調製

試料（１～５g）を精密に量り（W g）、５%メタリン酸溶液と海砂（必要に応じて加える。）を加え、乳鉢等で十分にすりつぶす[注3)]。５%メタリン酸溶液を加えてよく混和し 50 mL に定容する（V mL）。遠心分離（3,000 回転/分、10 分間程度）を行い、この上澄み液を必要に応じて５%メタリン酸溶液で適宜希釈して（希釈倍数：D）、試験溶液とする。

④　標準溶液の調製

１）　標準原液

標準ビタミンＣ 100 mg を 100 mL 容全量フラスコに精密に量り取り、５%メタリン酸溶液で溶解し 100 mL に定容する（冷蔵保存、３週間ごとに

調製する。)。

2） 標準溶液

標準原液５mL を 50 mL 容全量フラスコに正確に量り、５%メタリン酸溶液で定容する（100 μg/mL、用時ごとに調製する。)。

3） 測定用標準溶液

標準溶液を５%メタリン酸溶液で希釈し、2.0、5.0 及び 10 μg/mL とする（用時ごとに調製する。)。

⑤ オサゾンの生成

1） 試験溶液

試験溶液２mL を共栓付き試験管に正確に量り、インドフェノール溶液を滴下（ピンク色を１分間保つ量）する。２w/v%チオ尿素含有５%メタリン酸溶液２mL を正確に加えた後、ヒドラジン溶液 0.5 mL を加え、混和後、50 ℃の恒温水槽中に１時間静置する。反応後、直ちに試験管を室温まで冷却する。酢酸エチル（残留農薬分析用）２mL を加え、振とう機で１時間振とうし、生成したオサゾンを抽出する。静置後、上層を共栓付き小試験管に移し、無水硫酸ナトリウム約 0.5 g を加え、軽く振って脱水する。これを試験溶液とする。

2） 標準溶液

各濃度の測定用標準溶液２mL について１）と同様の操作を行い、HPLC 用標準溶液を得る。

⑥ 測定

試験溶液一定量を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン C のオサゾンのピーク面積を測定し、あらかじめ同量の HPLC 用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線を用いて試験溶液中の濃度を求め、試料中のビタミン C 含量を算出する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注4)]＞

カラム：Silica 2150-N（100）（センシュー科学）あるいは相当品、内径 6.0 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

移動相：酢酸エチル-n-ヘキサン-酢酸（５：４：１）

検出器：紫外可視分光光度計

測定波長：495 nm

流量：1.5 mL/分

温度：35 ℃

注入量:20 μL

⑦ 計算

$$\text{試料中の総ビタミン C 含量 (mg/100 g)} = \frac{C_{\square} \times V_{\square} \times D_{\square}}{W_{\square} \times 10}$$

C：検量線から求めた総ビタミン C の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数
W：試料採取量（g）

［注］

１）　適当な還元剤、例えばジチオスレイトール、2,3-ジメルカプト-１-プロピルアルコール、硫化水素などで酸化型ビタミンＣを還元して、強い紫外線吸収を示す還元型ビタミンＣにし、高速液体クロマトグラフを用いて測定することで総ビタミンＣを求める方法もある。また逆に、活性炭などで酸化後、1,2-フェニレンジアミンを加え、キノキサリン化合物に誘導体化して蛍光を測定する方法もある。

なお、アスコルビン酸脂肪酸エステルは、0.02 w/v%アスコルビン酸含有メタノールで抽出し高速液体クロマトグラフ法により測定できる。測定条件の例を次に示す。

カラム：Partisil ODS-３ ５ μm、内径 4.6 mm、長さ 250 mm
移動相:メタノール-0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウム溶液(pH2.0)（85:15)
流量：1.0 mL/分
測定波長：254 nm

２）　2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの市販試薬は安定剤として水を約 50 %含んでいるので、４g 採取する必要がある。

３）　必要に応じて海砂を加える。その際は、遠心分離又はろ過により海砂を除いてから定容する。

４）　本測定条件では、アスコルビン酸とエリソルビン酸の分別はできない。エリソルビン酸の分別定量をする場合の測定条件の例を次に示す。

移動相：n-ヘキサン-酢酸エチル-プロピルアルコール-酢酸（40:30:２:１）
保持時間：アスコルビン酸は約 10 分間、エリソルビン酸は約 10.5 分間

（４）　酸化還元滴定法

①　適用される食品

ビタミンＣ含量が著しく高く、かつビタミンＣ以外にヨウ素を還元する物質が含まれない食品に適用される。

②　装置及び器具

・ビュレット：テフロンコック付き、容量 50 mL 以下で 0.1 mL の刻線付きのもの（褐色)。

③　試薬

・メタリン酸：特級
・でんぷん（溶性)：特級

・でんぷん試液：でんぷん１ｇを量り、冷水 10 mL を加えてよくすり混ぜ、これを熱湯 200 mL 中にかき混ぜながら徐々に加え、液が半透明となるまで煮沸し、放冷し、静置した後、上澄み液を用いる。この溶液は用時調製する。
・ヨウ化カリウム：特級
・ヨウ素：特級
・0.05 mol/L ヨウ素溶液：1,000 mL 中ヨウ素（I、原子量 126.90）12.690 g を含む。ヨウ素 14 g を量り、ヨウ化カリウム溶液（９→25）100 mL を加えて溶かし、塩酸３滴及び水を加えて 1,000 mL とする。本液は、共栓瓶に保存し、度々標定し直す。標定は次のように行いファクターを求める。

標定：三酸化ヒ素（標準試薬）を粉末とし、100 ℃で恒量になるまで乾燥した後、その約 0.15 g を精密に量り、１mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加え、必要があれば加熱して溶かす。次に水約 40 mL 及びメチルオレンジ試液２滴を加え、さらに液の黄色が淡紅色となるまで塩酸（１→４）を加える。さらに炭酸水素ナトリウム２g、水約 50 mL 及びでんぷん試液３mL を加えた後、このヨウ素溶液で液が持続する青色を呈するまで滴定する。

0.05 mol/L ヨウ素溶液１mL＝4.946 mgAs_2O_3

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

④ 測定

試料のビタミン C 200～300 mg に相当する量を精密に量り（W g）、メタリン酸溶液（１→50）50 mL を加えて溶かし、0.05 mol/L ヨウ素溶液で滴定する（指示薬でんぷん試液）（T mL）。

⑤ 計算

0.05 mol/L ヨウ素溶液１mL はビタミン C（L-アスコルビン酸）8.806 mg に相当する。

$$\text{試料中のビタミン C 含量 (mg/100 g)} = 8.806 \times \frac{f \times T}{W} \times 100$$

T：滴定量（mL）

W：試料採取量（g）

f：0.05 mol/L ヨウ素溶液ファクター

（５） 逆相高速液体クロマトグラフ法

① 適用される食品

L-アスコルビン酸２-グルコシドを含む食品に適用される。

② 装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ：紫外部吸収検出器付き
・遠心分離機
・逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラ

ム)

③　試薬

・アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用

・リン酸二水素カリウム：特級

・テトラブチルアンモニウムヒドロキシド：特級、10 %水溶液

・リン酸溶液：20 %水溶液

④　試験溶液の調製

1）　液状食品（不溶物をほとんど含まないもの）

試料約 5.0 g を精密に量り（W g)、移動相[注1)]を加えて正確に 50 mL とする（V mL)。不溶物がある場合は遠心分離し、必要に応じて移動相で適宜希釈して（希釈倍数：D)、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過したものを試料液とする。

2）　粉体及び固体食品（半液状食品を含む）

試料を粉砕してその約 5.0 g を精密に量り（W g)、移動相 30 mL を加えて 10 分間かくはん又は振とうする。不溶物がある場合はろ過又は遠心分離し、ろ液又は上澄み液は 50 mL 容全量フラスコ等の受器に捕集する。ろ過残渣又は沈殿を少量の移動相で数回洗浄し、洗液も先の受器に合わせて捕集し、さらに移動相を加えて正確に 50 mL とする（V mL)。この液を必要に応じて移動相で適宜希釈して（希釈倍数：D)、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過したものを試料液とする。

⑤　標準溶液の調製

L-アスコルビン酸２-グルコシド約 0.10 g を精密に量り、移動相[注1)]を加えて溶かして正確に 100 mL とする。その 20 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 200 mL としたものを標準溶液とする（この液１mL は、L-アスコルビン酸２-グルコシド約 100 μg を含む)。標準溶液１～50 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 100 mL とし、検量線用標準溶液とする（この液１mL は、L-アスコルビン酸２-グルコシド約１～50 μg を含む)。

⑥　測定[注2)]

試験溶液一定量を、高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と、あらかじめ同量の標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線[注3)]を用いて試験溶液中の L-アスコルビン酸２-グルコシド濃度（C μg/mL)を求め、試料中の L-アスコルビン酸２-グルコシド含量(mg/100g)を計算する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注4)]＞

カラム：TSKgel ODS-80Ts QA（東ソー）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

カラム温度：40 ℃

移動相：水 800 mL にリン酸二水素カリウム 1.4 g とテトラブチルアンモニウムヒドロキシド 26 mL を加え、リン酸水溶液で pH5.2 に調整した

後、水で1,000 mLとする。この液900 mLとアセトニトリル100 mLを混和したもの。

流速：0.8 mL/分

測定波長：260 nm

注入量：10 μL

⑦ 計算

$$\text{試料中のL-アスコルビン酸2-グルコシド含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めたL-アスコルビン酸2-グルコシドの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

$$\text{試料中のビタミンC総含量 (mg/100 g)} = \text{ビタミンC含量 (mg/100 g)} + 0.5207 \times \text{L-アスコルビン酸2-グルコシド含量 (mg/100 g)}$$

0.5207：L-アスコルビン酸の分子量（176.12）をL-アスコルビン酸2-グルコシドの分子量（338.26）で除した係数。

［注］

1） L-アスコルビン酸2-グルコシドは、水、5%メタリン酸溶液に比べ、移動相に溶かしたときに最も安定である。

2） 本法のほかに、次の条件でも測定できる。

カラム充てん剤：アミノプロピル基を化学結合したシリカゲル、カラム管：内径4.6 mm長さ250 mm、移動相：アセトニトリル/リン酸二水素カリウム・0.5 v/v%リン酸溶液（5.44→1000）の混液（60:40）、流速：0.7 mL/分、そのほかの条件は本法と同じ。この条件で測定したときの検出下限は0.25 mg/100 gである。

3） 試料液の濃度が検量線の濃度範囲を超える場合、試料液を移動相で適宜希釈するか、試料採取量を減らして試験する。

4） 本法の検出下限は0.10 mg/100 gである。なお、清涼飲料水、飴及び錠菓における添加回収率は98.2～99.1 %である。

31 ビタミンD

本試験法は、エルゴカルシフェロール（ビタミンD_2）及びコレカルシフェロール（ビタミンD_3）を定量の対象とし、両者を一括してビタミンDとして定量する。

（1） 高速液体クロマトグラフ法

① 装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：分取用と測定用の2台あったほうがよ

い。紫外分光光度計付き（254nm の固定波長のもの、又は波長が可変のものは 265nm で使用する。）。含量の少ない試料の定量用検出器には、最高感度が 0.001 以上のものが必要である。

・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）及び順相型（シリカゲルを充てんしたカラム）の２本

・ガラス器具は褐色のものを用いる。

・遠心分離機

② 試薬

・標準ビタミン D：日本薬局方標準品「エルゴカルシフェロール」（ビタミン D_2）又は「コレカルシフェロール」（ビタミン D_3）[注1)] 又は同等品を用いる。植物性食品の分析にはビタミン D_2 を、動物性食品の場合にはビタミン D_3 を用いる。強化食品[注2)] に関しては、添加された製剤に応じて、ビタミン D_2 又はビタミン D_3 を用いる。なお、添加製剤が不明の場合はビタミン D_3 を用いる。

・ビタミン D 標準溶液：エタノールで 0.2 μg/mL になるように溶解する。

・n-ヘキサン

・酢酸エチル

・アセトニトリル

・エーテル

・１w/v%ピロガロール-エタノール溶液：ピロガロール１ｇにエタノール 100 mL を加え溶解する。この溶液は用時調製とする。

・60 w/v%水酸化カリウム溶液：水酸化カリウム 600 ｇに冷却しながら水を加えて溶解し、正確に１L とする。

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③ 試験溶液の調製[注3)]

１） けん化[注4)]

試料が油状の場合は 0.2～0.5 g、粉末の場合は１～２g、液体の場合は５～10 g を 60 mL 容共栓付き遠心管に精密に量る（W g）。粉末については１w/v%塩化ナトリウム溶液３～５mL を加え、70 ℃で３分間膨潤させる。

１ w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL、60 w/v%水酸化カリウム溶液２ mL、水酸化カリウム２ｇを加え、70 ℃水浴中でガラス棒で時々かき混ぜながら１時間加熱する。冷水中で速やかに室温まで冷却する。１w/v%塩化ナトリウム溶液を合計で 22 mL になるように加え（例えば、粉末の試料で、けん化の前に３mL 加えた場合は 19 mL を加える。また液体の試料 10 g を採取した場合は 12 mL を加える。）、酢酸エチル-n-ヘキサン混液（１：９）15 mL を加えて栓をし、５分間振とうする。遠心分離（1,500 回転/分、５分間）後、駒込ピペットで上層を 100 mL 容なす形フラスコに移す。水層を酢酸エチル-n-ヘキサン混液（１：９）15 mL でさらに２回、同様に抽出する。抽出液を合わせ 35 ℃で減圧濃縮する。残留物をジエチル

エーテルに溶解し、10 mL 容共栓付き試験管に移した後、窒素気流下で溶媒を留去する。残留物をメタノール-アセトニトリル（1：9）の適量（0.5 mL 以上）に正確に溶解し（V mL）、必要に応じてメタノール-アセトニトリル（1：9）で適宜希釈して（希釈倍数：D）試験溶液とする。

試料と同時にビタミン D 標準溶液１、２、４mL をそれぞれ正確に量り、けん化処理を行う。

２）　分取[注5)]

逆相型カラム（Nucleosil 5C 18（ナーゲル社製）、内径 7.5 mm、長さ 300 mm あるいは相当品）を付けた高速液体クロマトグラフに紫外部検出器、フラクションコレクター（ドロップカウンター）を連結する。高速液体クロマトグラフの条件は、移動相にメタノール-アセトニトリル（1：9）を用い、流量は 1.5 mL/分とする。あらかじめ、けん化していない標準ビタミン D を高速液体クロマトグラフに注入し、保持時間を確認しておく。

次に、１）で得られた試験溶液及びビタミン D 標準溶液 150 μL をそれぞれ高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン D を含む画分（保持時間の前後約 90 秒間）を分取する。減圧濃縮後、残留物を n-ヘキサン-イソプロピルアルコール（99.6:0.4）200 μL に溶解し、測定用試験溶液及び測定用標準溶液とする。

④　測定[注5)]

測定用試験溶液の一定量を順相型カラムを付けた高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン D のピーク高さを測定し、あらかじめ同量の測定用標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中のビタミン D 含量を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

カラム：Nucleosil 100-５（ナーゲル社製）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

移動相：n-ヘキサン-イソプロピルアルコール（99.6:0.4）

測定波長：254 nm 又は 265 nm

流量：1.6 mL/分

温度：室温

注入量:100 μL

⑤　計算

$$\text{試料中のビタミン D 含量 (μg/100 g)} = \frac{C \times V \times D \times 100}{W}$$

C：検量線から求めたビタミン D の濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１）　標準ビタミンＤは、エタノールに溶かしたときの 230 nm と 265 nm の吸光度比（A_{230}/A_{265}）が 0.60 以下のものを使用する。

また標準ビタミンＤは、窒素ガス又はアルゴンガスで空気を置換して -20 ℃に保存すれば、１～２年安定である。

２）　近年、加工食品のビタミンＤの強化にはビタミン D_3 が使用されることが多い。

３）　ここに示した試料採取量等によって得られる定量下限は、固体試料で 0.3～0.8 μg/100 g であり、液体試料で 0.2 μg/100 g 程度である。なお、試験溶液の調製の操作を２倍にスケールアップすることによって、定量下限を上記の１/２程度にすることは可能である。

４）　ビタミン D はけん化時に一部がプレビタミン D に熱異性化される。本法は標準ビタミンＤを試料と同条件でけん化することにより異性化される分を相殺し、定量するものである。

５）　③-２）分取の操作を順相高速液体クロマトグラフで行い、④測定の操作を逆相高速液体クロマトグラフで行うことで、ビタミン D_2 と D_3 のピークが分離し、それぞれの標準品を用いて分別定量することができる。

［参考文献］

１）　小林正、岡野登志夫：“ビタミン学実験法[Ｉ]”，日本ビタミン学会編，94，東京化学同人（1983）

２）　森田公平、福澤有紀子、小高要、氏家隆：ビタミン，68，６（1994）

３）　竹林純他：ビタミン，85，645（2011）

４）　日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版(八訂)分析マニュアル・解説”，22 カルシフェロール（ビタミン D），148-155 (2023)

32　ビタミンＥ

食品中のビタミンＥは、α-トコフェロールを定量の対象とする。

（１）　高速液体クロマトグラフ法

①　装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：蛍光検出器付き

・カラム：順相型（シリカゲルを充てんしたカラム）

②　試薬

・標準ビタミンＥ：日本薬局方標準品「α-トコフェロール」又は同等品を用いる。

・n-ヘキサン

・酢酸エチル

・その他の試薬は特に指定のない限り特級を用いる。

③　試験溶液の調製

１）　一般食品の場合

試料約 0.5 g を 60 mL 容の遠心管に精密に量り取る（W g)。これに１w/v%塩化ナトリウム溶液２mL を加えてかくはん後、３w/v%ピロガロール-エタノール溶液 10 mL 及び 60 w/v%水酸化カリウム溶液１mL を加え､70 ℃で 30 分間けん化する。速やかに冷却後、１w/v%塩化ナトリウム溶液を 20 mL 及び n-ヘキサン-酢酸エチル混液（９：１）15 mL を加え、栓をして５分間激しく振とうし､不けん化物を抽出する。2,000 回転/分で５分間遠心分離し、上層をなす形フラスコに移す。下層は n-ヘキサン-酢酸エチル混液 15 mL でさらに２回同様に抽出する。得られた上層を集め、減圧濃縮後、一定量の n-ヘキサンに溶解し（V mL)、必要に応じて n-ヘキサンで適宜希釈して（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

２）　油脂の場合

試料が油脂の場合は、１）のけん化操作を省き HPLC に直接注入することができる。この場合、油脂約１g を精密に量り取り（W g)、一定量の n-ヘキサンに溶解・定容（V mL）し、必要に応じて n-ヘキサンで適宜希釈して（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

④　標準溶液の調製

１）　標準原液

α-トコフェロール 20 mg を褐色全量フラスコに精密に量り、エタノールで溶解して正確に 50 mL とする。冷蔵保存し、６か月ごとに調製する。

２）　HPLC 用標準溶液

一定量の α-トコフェロール標準原液を褐色なす形フラスコ又は褐色全量フラスコに正確に量り、溶媒を濃縮乾固又は窒素気流下で留去した後、n-ヘキサンに溶解する。全量フラスコを用いて正確に希釈し､HPLC 用標準溶液とする。冷蔵保存し、１か月ごとに調製する。

⑤　測定

試験溶液の一定量（５～50 μL）を HPLC に注入し、試料中の α-トコフェロールのピーク面積を測定する。同様に HPLC 用標準溶液を HPLC に注入し、ピーク面積から α-トコフェロールの検量線を作成する。検量線から試験溶液中の濃度（C μg/mL）を求め、試料中のビタミン E 含量を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注)]＞

カラム：JASCO Finepak SIL５（日本分光製）又は相当品、内径 4.6 mm、長さ 250 mm、ステンレス製

移動相：酢酸-イソプロピルアルコール-n-ヘキサン（５：６:1000)

検出器：励起波長（Ex）298 nm

蛍光波長（Em）325 nm

流量：1.2 mL/分

温度：40 ℃

注入量：５～50 μL

⑥　計算

$$\text{試料中のビタミンE含量 (mg/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた α-トコフェロールの濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

その他のカラム充填剤と移動相の他の条件は文献１）、２）等を参照のこと。

［参考文献］

１）　日本ビタミン学会編：ビタミンハンドブック③（ビタミン分析法），p.27（1989），化学同人

２）　五十嵐脩編：ビタミンE―基礎と臨床―，p.14（1985），医歯薬出版

33　ビタミンK

食品中のビタミンKは、フィロキノン（ビタミンK_1）、メナキノン-４及びメナキノン-７（ビタミンK_2）を定量の対象とする。

メナキノン-７については、メナキノン-４相当量に換算し、ビタミンK総量を求める。

$$\text{メナキノン-４相当量 (μg/100 g)} = 0.6852 \times \text{メナキノン-７含量 (μg/100 g)}$$

0.6852：メナキノン-４の分子量（444.7）をメナキノン-７の分子量（649.0）で除した係数。

（１）　高速液体クロマトグラフ法

①　装置及び器具[注1)]

・高速液体クロマトグラフ：蛍光検出器付き

・カラム：逆相型（オクタデシルシリル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム）

・還元カラム：白金黒[注2)]

・遠心分離機

②　試薬

・メタノール、エタノール：高速液体クロマトグラフィー用

・ビタミンK_1（フィロキノン）、ビタミンK_2（メナキノン-4、メナキノン-7）標準品[注3)]

・その他の試薬は、特に指定のない限り特級を用いる。

③　試験溶液の調製[注4)]

あらかじめ均質化した試料 0.1～１g を遠沈管に精密に量り(W g)、50 v/v% 2-プロパノール水溶液及び n-ヘキサン各 10 mL を加え、室温にて 300 回/分で 10 分間振とう抽出する。室温にて 3,000 回転/分で５分間遠心分離した上層を分取する。残渣に n-ヘキサンのみを 10 mL 加え、計 3 回同様の振とう抽出、遠心操作を繰り返して上層を合わせ、溶媒を減圧濃縮する。残留物を２-プロパノールを用いて定容し（V mL)、必要に応じて２-プロパノールで適宜希釈して（希釈倍数：D)、試験溶液とする。高速液体クロマトグラフによる測定において妨害成分の影響が出る場合は、残留物を n-ヘキサン５ mL に溶解し、ミニカラムを用いた精製を行う[注5)]。

④ 標準溶液の調製

標準品 10 mg を精密に量り 2-プロパノールに溶かし、正確に 100 mL とする。さらに、2-プロパノールで 1、2.5、10、25 及び 100 ng/ mL となるように希釈する。

⑤ 測定

試験溶液の一定量を高速液体クロマトグラフに注入し、ビタミン K_1 及びビタミン K_2 のピーク面積を測定する。あらかじめ同量の標準溶液を高速液体クロマトグラフに注入して得られた検量線から、試料中のビタミン K_1 及びビタミン K_2 含量を求める。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

分析カラム：Inertsil ODS-3 (GL Sciences 製) 又は相当品、粒子径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 150 mm、ステンレス製

還元カラム：RC-10（大阪ソーダ）あるいは相当品、内径 4.6 mm、長さ 15 mm、ステンレス製

移動相 1：メタノール:エタノール（95:5、メナキノン-４及びフィロキノン分析用）

移動相 2：メタノール:エタノール（50:50、メナキノン-７分析用）

検出器：蛍光分光光度計

測定波長：励起波長（Ex）320 nm、蛍光波長（Em）430 nm[注6)]

流量：1.0 mL/分

温度：40 ℃

注入量：50 μL

⑥ 計算

$$\text{試料中のビタミン}K_1\text{又は}K_2\text{含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times V \times D}{W \times 10}$$

C：検量線から求めた試験溶液中のビタミン K_1 又はビタミン K_2 の濃度 (ng/mL)

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

1） ビタミンKは、光により分解することから、操作時遮光器具を用いる。

2） 内径4.6 mm、長さ15 mm。市販品がある（例、大阪ソーダ製)。分離カラムと検出器の間に接続する。カラムは、使用により劣化することから、標準品の使用をもって効力を確認する。

3） ビタミンK_1及びK_2は、高速液体クロマトグラフ用標準品（富士フイルム和光純薬）又はこれらの相当品を用いる。

4） 野菜類、肉類、藻類、納豆、みそ類等を主食材とする食品については、日本食品標準成分表2015 年版（七訂）分析マニュアル（24 フィロキノン及びメナキノン類（ビタミンK），131-137）に記載の抽出方法を用いることができる。

5） 極性成分を多く含み、測定対象物が定量できない場合、シリカゲル固相抽出カートリッジ（Sep-pak silica cartridge、waters等）を用いてきょう雑物を除去する。メーカーの説明に従ってコンディショニングしたSep-pak silica 690 mg（ウォーターズ、WAT020520）又は同等品に、試験溶液の全量を通液し、さらに30 mL のn-ヘキサン－ジエチルエーテル混液 (85:15) で数回に分けて容器を共洗いしながらカートリッジに通液する。全溶出液を回収し、減圧留去の後、2-プロパノールを用いて定容し（V mL)、必要に応じて2-プロパノールで適宜希釈して（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

6） 一部きょう雑物の影響により精確に測定できないものがある。その際は、Ex= 240 nm、Em= 430 nmを使用する。

［参考文献］

1） 佐藤孝義、八尋政利、下田幸三、浅居良輝、浜本典男：日本栄養・食糧学会誌，38，451（1985）

2） 小高要、氏家隆、上野順士、斎藤実：日本栄養・食糧学会誌，39，124（1986）

3） 坂野俊行、野津本茂、長岡忠義、森本厚、藤本恭子、増田佐智子、鈴木由希子、平内三政：ビタミン，62，393（1988）

4） Kamao et al.: J Nutr Sci Vitaminol, 53, 464 (2007)

5） Usui et al.: J Chromatogr A 935 (1-2) , 3, (2001)

34 葉酸

（1） 微生物学的定量法

① 装置及び器具

・分光光度計

② 試薬

・0.1 mol/L リン酸緩衝液：リン酸二水素カリウム13.61 g、水酸化ナトリ

ウム（特級）5.30 g、アスコルビン酸（特級）20 g を水１L に加えて pH6.1 に調整する。

・葉酸標準溶液：葉酸（日本薬局方標準品）100 mg を 0.01 mol/L 水酸化ナトリウム 25 v/v%エタノール溶液に溶かし、0.1 mol/L 塩酸で pH7.0～8.0 に調整後 25 v/v%エタノール溶液で 100 mL とする。さらに、0.1 mol/L リン酸緩衝液で希釈し２ng/ml の濃度に調製する。

・酵素溶液：トリ膵臓凍結乾燥粉末[注1)]に水 100 mL を加え、10 分間かくはん後、遠心分離する。その上澄み液に 10 g の Dowex １-X８（Cl^-）を加え冷所で１時間かくはんする。その後遠心分離した上澄み液を酵素溶液とする。

・使用菌株：*Lactobacillus rhamnosus*[注2)] ATCC 7469（NBRC 3425）

・葉酸測定用培地（１L 中、pH6.8±0.1）

カザミノ酸	10 g
ブドウ糖	40 g
L-アスパラギン	600 mg
塩酸ピリドキシン	４ mg
L-システイン塩酸塩	500 mg
硫酸アデニン	10 mg
リン酸一水素カリウム	１g
硫酸マグネシウム	400 mg
酢酸ナトリウム	40 g
硫酸第一鉄	20 mg
硫酸マンガン	15 mg
ポリソルベート 80	100 mg
ニコチン酸	800 μg
パラアミノ安息香酸	２mg
パントテン酸カルシウム	800 μg
グルタチオン	５mg
L-トリプトファン	200 mg
塩酸グアニン	10 mg
ウラシル	10 mg
キサンチン	20 mg
リボフラビン	１mg
塩酸チアミン	400 μg
ビオチン	20 μg
リン酸二水素カリウム	１g
塩化ナトリウム	20 mg

・乳酸菌保存用培地（１L 中、pH6.8±0.1）

酵母エキス	5.5 g

ブトウ糖	11.0 g
硫酸第一鉄	5.0 mg
酢酸ナトリウム	10.0 g
硫酸マンガン	5.0 mg
ペプトン	12.5 g
リン酸二水素カリウム	0.25 g
リン酸一水素カリウム	0.25 g
硫酸マグネシウム	0.1 g
粉末寒天	20.0 g

・前培養培地：上記培地より粉末寒天を除く。

各培地はそれぞれ調製されたものが市販されている。

③　接種菌液の調製

Lactobacillus rhamnosus 保存菌株を前培養培地に接種し、37 ℃で 20 時間程度培養する。この菌浮遊溶液を遠心分離し、滅菌生理食塩水で２回洗浄する。洗浄後、600 nm における透過率 80～90 %となるように滅菌生理食塩水で希釈し、接種菌液とする。

④　試験溶液の調製[注3)]

試料２g を精密に量り（W g)、0.1 mol/L リン酸緩衝液 50 mL を加え、121 ℃で 15 分間オートクレーブ処理を行う[注4)]。冷却後、0.1 mol/L リン酸緩衝液で 100 mL に定容し（V_1 mL)、遠心分離する。上澄み液 25 mL を正確に量り（V_2 mL)、酵素溶液５ml を加えて 37 ℃の恒温水槽で２時間酵素処理を行う。その後 121 ℃で 15 分間オートクレーブ処理を行い酵素反応を止める。冷却後、0.1 mol/L リン酸緩衝液で 50 mL に定容し、ろ過する（V_3 mL)。さらに溶液１ mL 中に葉酸を 0.5～1.0 ng 含むように 0.1 mol/L リン酸緩衝液で希釈し（希釈倍数：D)、試験溶液とする。

⑤　測定[注3)]

試験管２本ずつに試験溶液 0.5、１及び２mL を正確に加え、次に各試験管に測定用培地 2.5 mL 及び水を加えて全量を５mL とする。別に検量線作成のため、葉酸標準溶液（０～３ng 相当量）を試験管２本ずつに正確に取り、それぞれに測定用培地 2.5 mL 及び 0.1 mol/L リン酸緩衝液を加えて全量を５mL とする。121 ℃で５分間オートクレーブ処理を行い、冷却後、各試験管に接種菌液１滴（約 30 μL）ずつを無菌的に接種し、37 ℃で 19 時間程度恒温槽又は恒温水槽に入れて培養する。

培養後、600 nm の濁度を用いて測定する[注5)]。標準溶液の濁度より検量線を作成し[注6)]、これに試験溶液より得られた濁度を照合して、試験溶液中の葉酸の濃度（ng/mL）を求め、試料中の葉酸含量を算出する。

⑥　計算

$$\text{試料中の葉酸含量}\ (\mu g/100\ g) = \frac{C \times V_1 \times D \times V_3}{V_2 \times W \times 10}$$

C：検量線から求めた葉酸の濃度（ng/mL）

V_1～V_3：定容量（mL）又は分取量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

[注]

１）　酵素溶液には、Kidney acetone powder porcine、TypeⅡ（Sigma）を用いてもよい。

２）　旧名称は *Lactobacillus casei* である。

一般乳酸菌保存検出用培地「アキュディア」:島津ダイアグノスティクス

一般乳酸菌接種用培地「アキュディア」：島津ダイアグノスティクス

３）　葉酸含量の高い食品については、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で振とう抽出し、ろ過して得られたものを試験溶液とすることもできる。又は、紫外部検出器付き高速液体クロマトグラフで定量することもできるが、食品表示基準における分析方法は、微生物学的定量法とする。

高速液体クロマトグラフ操作条件例

測定波長	280 nm
カラム	TSK gel ODS-80 Ts (東ソー製)
移動相	0.003 mol/L テトラブチルアンモニウムブロマイド含有 0.005 mol/L 酢酸ナトリウム（pH6.5）:アセトニトリル（４：１）
流量	2.0 mL/分

４）　タンパク含量が多く葉酸と結合していると考えられる場合は，プロテアーゼ処理として以下の操作を行ってもよい。

「冷却後、プロテアーゼ溶液１ mL を加え 37 ℃で２ 時間保温し、オートクレーブで 100 ℃、10 分間加熱する。

５）　マイクロプレートを使用し、マイクロプレートリーダー（例えば、日本モレキュラーデバイス社製、スペクトラ MAX 型等）で濁度を測定することもできる。

６）　直線回帰、ロジスティック回帰等から適切なフィッティング法を選択し、検量線を作成する。

[参考文献]

１）　日本食品分析センター編：“日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル・解説”，30 葉酸，196-199（2023）

２）　食品衛生学雑誌，59，3，141-145（2018）

35　熱量

（１）　修正アトウォーター法

熱量の算出は、定量したたんぱく質、脂質及び炭水化物の量にそれぞれ次の係数を乗じたものの総和とする[注1)]。

①　たんぱく質　４kcal/g

②　脂質　９kcal/g

③　炭水化物　４kcal/g

また、糖質と食物繊維の含量を記載している場合にあっては、熱量の算出に当たっては、炭水化物の量は計算に含めず、糖質の量と食物繊維の量を計算に用いること。

糖質については③の係数を用いて計算すること。アルコール[注2)]については、７kcal/g を、有機酸[注3)]については、３kcal/g を、難消化性糖質については、適切なエネルギー換算係数[注4)]を用いること。また、食物繊維については２kcal/g 又は素材に応じた適切なエネルギー換算係数を用いて算出すること。

なお、難消化性糖質及び食物繊維のエネルギー換算係数として（６）及び（７）に掲げる表の係数を用いても差し支えない。

［注］

１）　きくいも、こんにゃく、藻類及びきのこ類の熱量の算出に当たっては、炭水化物の量を計算に用いる場合に限り、アトウォーター係数による総エネルギー値に 0.5 を乗じて算出すること。

２）　アルコールについては、浮ひょう法、振動式密度計法、ガスクロマトグラフ法又は酸化法により定量すること。

３）　有機酸については、高速液体クロマトグラフ法により定量すること。

４）　人を対象とした出納実験、呼気ガス試験その他学術的に認められた方法により設定されたもの。

（２）　アルコール[注1)]

酒類では一般に、浮ひょう法、振動式密度計法又はガスクロマトグラフ法を用い、アルコール分が２度以下の場合は振動式密度計法、ガスクロマトグラフ法又は酸化法を用いる。その他の加工食品ではガスクロマトグラフ法又は酸化法が用いられる[注2)]。

［注］

１）　酒税法ではアルコール分とは温度 15 ℃において原容量の 100 分中に含有するエチルアルコールの容量（体積百分率）をいう。

酒類のアルコール分の定量法は、国税庁所定分析法に詳細が厳密に規定されているので参考にすること。

なお、容量（体積百分率）から質量に換算する際は、得られるアルコール分を比重等により補正し、試料の体積当たり又は質量当たりのエチルアルコールの質量を求める。

２）　ここに示した浮ひょう法、振動式密度計法、ガスクロマトグラフ法及び酸化法の他に有用な方法として酵素法がある。これは、酵素反応系を用い、生成するアルデヒドや NADH の量を測定することでエタノールを特異的に定量するものである。

アルコール脱水素酵素は、四級以上の脂肪族アルコールにも作用するため、これらを含む食品への上記反応系の適用は避けねばならない。なお、エタノール定量用の酵素法をキット化した製品も市販されている。

１）　浮ひょう法

①　適用される食品

アルコール分が２度以上の酒類に適用される。

②　装置及び器具

・酒精度浮ひょう

・アルコール分定量用蒸留装置

③　測定

15 ℃で試料を 100 mL 容全量フラスコの画線まで取り、これを約 300～500 mL 容フラスコに移し、この全量フラスコを毎回 15 mL 内外の水で２回洗い洗液をフラスコ内に合併し、冷却器に連結し、その全量フラスコを受器とし蒸留する。留液が約 70 mL（所要時間は約 20 分）に達したとき蒸留を止め[注)]、水を加えて 15 ℃において画線まで満し、よくふり混ぜてシリンダーに移した後、15 ℃において酒精度浮ひょうを用いてその示度を読み、アルコール分の度数とする。

［注］

アルコール度数が高い試料は留液の採取量を以下を目安に多くする（アルコール度数 22 未満のときは 93 mL 以上、14 未満のときは 87 mL 以上）。

２）　振動式密度計法

①　適用される食品

酒類に適用される。

②　装置及び器具

・振動式密度計

・アルコール分定量用蒸留装置

③　測定

15 ℃で試料を 100 mL 容全量フラスコの画線まで取り、これを約 300～500 mL 容フラスコに移し、この全量フラスコを毎回 15 mL 内外の水で２回洗い洗液をフラスコ内に合併し、冷却器に連結し、その全量フラスコを受器とし蒸留する。留液が約 70 mL（所要時間は約 20 分）に達したとき蒸留を止め、水を加えて 15 ℃において画線まで満し、よくふり混ぜてシリンダーに移した後、振動式密度計を用いて 15 ℃における密度を測定し、アルコール分の

度数に換算する。

3）　ガスクロマトグラフ法[注)]

①　適用される食品

酒類及びその他の加工食品に適用される。

②　装置及び器具

・ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器付き

③　試薬

・エチルアルコール標準溶液：エチルアルコール（特級）を水で希釈し、20 v/v%溶液とする。

・アセトン溶液：アセトン（特級）を水で希釈し、１v/v 溶液とする。

④　測定及び計算

15 ℃において、エチルアルコール標準溶液 0.5 mL にアセトン溶液 10 mL を加えてよく混合し、この１～２μL をガスクロマトグラフに注入し、得られるアセトンとエチルアルコールのピーク面積から次式により補正係数（F）を算出する。

$$F = \frac{\text{アセトンのピーク面積}}{\text{エチルアルコールのピーク面積}}$$

次に、試料 0.5 mL にアセトン溶液 10 mL を加え同様に処理して得られるアセトンとエチルアルコールのピーク面積から、次式により試料中のアルコール分を求める。

$$\text{アルコール分}\,(\text{度}) = F \times \frac{\text{エチルアルコールのピーク面積}}{\text{アセトンのピーク面積}} \times 20$$

＜ガスクロマトグラフ操作条件例＞

カラム:内怪３㎜､長さ２m,固定相　ポリエチレングリコール 1000(10 %、60～80 メッシュ）

注入口温度：150～200 ℃

カラム温度：100 ℃

ガス流量：窒素、30～40 mL/分

［注］

加工食品の場合は、試料に水を加えて蒸留後ガスクロマトグラフ法を用いて定量することができる。その際、試料及び標準溶液用エチルアルコールを質量で量り取れば質量百分率の定量結果が得られる。

4）　酸化法１[注)]

①　適用される食品

アルコール分が２度以下の酒類に適用される。

② 装置及び器具

・アルコール分定量用蒸留装置

③ 試薬

・二クロム酸カリウム溶液：二クロム酸カリウム（特級）33.816 g を水に溶かして１L とする。

・濃硫酸

・85 %リン酸

・指示薬：ジフェニルアミンスルフォン酸バリウム 0.5 g に水を加えて 100 mL とし、上澄み液を使用する。

・硫酸第一鉄アンモニウム溶液：硫酸第一鉄アンモニウム［$(NH_4)_2SO_4 \cdot FeSO_4 \cdot 6H_2O$］135.1 g を濃硫酸 20 mL と水に溶かして１L とする。

④ 測定

試料を 100 mL 容全量フラスコの画線まで取り（V_1 mL）、これを約 300～500 mL 容フラスコに移し、この全量フラスコを毎回 15 mL 内外の水で２回洗い洗液をフラスコ内に合併し、冷却器に連結し蒸留する。留液が約 70 mL（所要時間は約 20 分）に達したとき蒸留を止め、水を加えてアルコール分が２度以下になるように留液を調製する（V_2 mL）。300 mL 容三角フラスコに二クロム酸カリウム溶液 10 mL、濃硫酸５ mL を入れ、これに調製した留液５ mL を正確に加え、静かに混合密栓して 15 分間放置する。次に水 165 mL、リン酸 18 mL、指示薬 0.5 mL を加え、硫酸第一鉄アンモニウム溶液で青紫色が緑色になるまで滴定し、その滴定値を n mL とする。

水５ml を同様に処理して得た滴定値を N mL とすれば、アルコール分は次式により求められる。

$$\text{アルコール分 (度)} = 2 \times \left(1 - \frac{n}{N}\right) \times \frac{V_2}{V_1}$$

［注］

本法の原理は硫酸酸性で過剰の一定濃度の二クロム酸カリウムを加えてエチルアルコールを酢酸に酸化し、残余の二クロム酸カリウムに一定濃度の硫酸第一鉄アンモニウム溶液を加えて還元し、消費した硫酸第一鉄アンモニウムの量から試料中のエチルアルコール含量を求めるものである。

クロムを含む試薬を使用するので、その取扱いには十分な注意が必要である。

５） 酸化法２[注1)]

① 適用される食品

酒類及びその他の加工食品に適用される。

② 装置及び器具

・水蒸気蒸留装置

③　試薬

・沈降炭酸カルシウム

・1/30 mol/L 二クロム酸カリウム溶液：二クロム酸カリウム（特級）を粉末とし、150 ℃で乾燥し、デシケーターに入れて冷却後、約 9.8 g を精密に量り、水に溶解して正確に１L とする。

1/30 mol/L 二クロム酸カリウムのファクターF は次式により計算する。

$$F = \frac{\text{二クロム酸カリウムの採取量 (g)}}{9.807}$$

・濃硫酸

・８w/v%ヨウ化カリウム溶液:ヨウ化カリウム 80g を水に溶かして１L とし、褐色瓶に貯える。これにチオ硫酸ナトリウム溶液１～２滴を加えておく。

・1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液：チオ硫酸ナトリウム 25 g を量り、水に溶かして１L とし、褐色瓶に貯える。

この溶液は保存中にファクターが変化するので、滴定の都度、次のようにファクターを検定する必要がある。

1/30 mol/L 二クロム酸カリウム溶液 10 mL を正確に量り、濃硫酸 10 mL を加え、静かに振りまぜる。

このとき発熱するから静かに取り扱う。１時間放置した後、水 100 mL と８ w/v%ヨウ化カリウム溶液 6.5 mL を加え、手早く 1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定する。終点に近くなると遊離するヨウ素の茶褐色が薄くなる。このようになってから指示薬として、１%でんぷん溶液を約１ml 加え、ヨウ素でんぷんの紫色が消滅するまで滴定する。

1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液のファクターF′は次式により計算する。

$$F' = \frac{10 \times 2 \times F}{\text{1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウムの滴定量 (mL)}}$$

F：1/30 mol/L 二クロム酸カリウム溶液のファクター

・指示薬：可溶性でんぷん１g を水 100 mL で加熱溶解し、ろ紙でろ過する。

④　測定

試料 10 mL を正確に量り（S mL)、炭酸カルシウム１g 及び水 100 mL を加えて水蒸気蒸留する。蒸留の速度は 15 分間で約 100 mL 程度の留液を得る。水を加えて 100 mL の定容とする。留液 10 mL を正確に量り（S’ mL)、1/30 mol/L 二クロム酸カリウム 10 mL を正確に加え（K mL)、さらに濃硫酸 10 mL を静かに加える[注2)]。１時間静置し、反応を完結させた後、栓をとり、水 100 mL を加える。これにヨウ化カリウム溶液 6.5 mL を添加し、遊離するヨウ素を速やかに 1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウムで滴定し（H mL)、次式により試料中のアルコール分を算出する。

1/30 mol/L 二クロム酸カリウム溶液１ml に対応するアルコールは 0.0023

g である。

$$\text{アルコール分 (g/100 mL)} = \frac{\left(\mathrm{K} \times \mathrm{F} - \frac{\mathrm{H}}{2} \times \mathrm{F}'\right) \times 0.0023}{\mathrm{S} \times \mathrm{S}'} \times 10000$$

K：1/30 mol/L 二クロム酸カリウム溶液の採取量（mL）
F：1/30 mol/L 二クロム酸カリウム溶液のファクター
H：1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定量（mL）
F'：1/10 mol/L チオ硫酸ナトリウム溶液のファクター
S：試料の採取量（mL）
S'：留液の採取量（mL）

［注］
１） 本法は、アルコール分を容量当たりの質量で求めている。操作の詳細は参考文献２）を参考にした。本法の原理をみそ等の加工食品に応用する場合は、試料の適量を質量で量って試験することにより、アルコール分の質量百分率を求めることができる。
２） このとき発熱するので注意しながら静かに混合し、軽く混合する。また、反応液が緑褐色にとどまればよいが、褐色味のない青緑色となるような場合は、留液の採取量を５mL とし（S’ mL）、1/30 mol/L 二クロム酸カリウム 10 mL、濃硫酸 10 mL を加える。

［参考文献］
１） 国税庁所定分析法（昭和 36 年国税庁訓令第 1 号）
２） 財団法人日本醤油研究所 しょうゆ試験法編集委員会：“しょうゆ試験法”、醤協通信社（1985）
３） 全国味噌技術会：“改訂 基準味噌分析法”昌平堂印刷（1975）

（３） 飽和脂肪酸の熱量

飽和脂肪酸の熱量を算定する必要のある場合として、飽和脂肪酸の「低い旨」の表示の妥当性を判断する場合、コレステロールの「含まない旨」、「低い旨」あるいは「低減された旨」の表示の妥当性を判断する場合等がある。

各飽和脂肪酸の量を合計し、係数 1.05 を乗じてトリグリセライド量に換算する。得られたトリグリセライド量（g）にエネルギー換算係数９kcal/g を乗じて飽和脂肪酸の熱量（kcal）とする。

（４） 有機酸[注１)]

１） 高速液体クロマトグラフ法[注２)]

① 装置及び器具

・高速液体クロマトグラフ：紫外分光光度計付き

・カラム：イオン排除、サイズ分離、分配・吸着の混合分離型・水

② 試薬

・クエン酸三ナトリウム二水和物：特級

・酢酸ナトリウム（無水）：特級

・60 %過塩素酸：特級

③ 試験溶液の調製

試料１～５g を全量フラスコに精密に量り（W g）、５%過塩素酸５mL を加え、水で 50 mL に定容する（V mL）。これを必要に応じて検量線の範囲内に入るように水で希釈したものを試験溶液とする（希釈倍数：D）。

④ 標準溶液の調製

酢酸ナトリウム（無水）0.2732 g とクエン酸三ナトリウム二水和物 0.3062 g を正確に量り、水で 200 mL 定容とする。この液５、10 及び 25 mL を正確に量り、水で 50 mL に定容する。これらの液は 100、200 及び 500 μg/mL 濃度に相当する（冷蔵保存、６か月ごとに調製する）。

⑤ 測定

試験溶液及び標準溶液各一定量（例えば 20 μL）を高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高さを測定する。検量線から得た回帰式に代入して濃度（C μg/mL）を求めた後、試料中含量を算出する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例[注3)]＞

カラム：内径 8.0 mm、長さ 500 mm、ステンレス製

移動相：３ mmol/L 過塩素酸

流量：1.0 mL/分

測定波長：220 nm

温度：40 ℃

⑥ 計算

$$\text{試料中の酢酸（クエン酸）含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W \times 10{,}000}$$

C：検量線から求めた試験溶液の酢酸（クエン酸）濃度（μg/mL）

V：定容量（mL）

D：希釈倍数

W：試料採取量（g）

［注］

１） ここでは高速液体クロマトグラフ法による酢酸及びクエン酸の定量法を解説する。

２） 油脂を多く含むドレッシング類には、以下の方法で高速液体クロマトグラフ用の試験溶液を調製することが勧められる。

すなわち、試料 20 g を共栓付き三角フラスコに量り、水分の全量が

100 mL となるように水を加えた後、よく振とう混合する。遠心分離（3,000 回転/分、10 分間）後、傾斜法ないし駒込ピペットを用いて水層を分液漏斗に移す。この水層部に n-ヘキサン（特級）50 mL を加えて静かに振とう後、静置して得た水層部を試験溶液とする。

＊適当な一定量の水を加え、別途求めた試料の水分含量値を用いて水層量を補正し、定容量としてもよい。

3） プレカラム RSpak KC-810P をセットにした Shodex RSpak KC-811（昭和電工㈱製）、又は同等品を用いる。恒温槽のサイズが小さい場合は、Shodex RSpak KC-811（内径 8.0 mm、長さ 300 mm）（昭和電工㈱製）がある。ピーク形状、分離程度を調べ、必要があればカラム温度を変えるか、異なるカラムを用いた分離条件等を設定する必要がある。

（5） 糖アルコール類

① 装置及び器具

・ロータリーエバポレーター
・高速液体クロマトグラフ（HPLC）：屈折率検出器付き[注1)]
・カラム[注2)]：アミノプロピル基を結合させたシリカゲルを充てんしたカラム又はスルホン化ポリスチレンゲル（鉛型又はカルシウム型）を充てんしたカラム

② 試薬

・標準品：水分を測定し[注3)]無水物に換算する。
・アセトニトリル：HPLC 用又は残留農薬用
・エタノール、石油エーテル、水酸化ナトリウム：特級
・50 v/v%エタノール：99.5 v/v%エタノール-水（1：1）
・10 w/v%水酸化ナトリウム溶液

③ 試料の調製

固体試料はコーヒーミル等で粉砕する。

④ 試験溶液の調製

1） 基本操作

50 mL 容ビーカーに試料の適当量（0.5～5 g）を精密に量り、約 30 mL の水を加え、液性が酸性の場合には 10 w/v%水酸化ナトリウム溶液で中和する。30 分間超音波抽出した後、水で全量を 50 mL 容全量フラスコに移して定容する。不溶物がある場合はろ紙[注4)]でろ過し、ろ液をメンブランフィルター（0.45 μm）でろ過して試験溶液とする。不溶物の量が多い場合は、定容する前にろ紙でろ過し、ビーカー及びろ紙を水で洗浄してからろ液を集めて定容する。試験溶液は目的成分の濃度によって適宜希釈又はロータリーエバポレーターで濃縮して HPLC 用試験溶液とする。

2） たんぱく質又は多糖類を多く含む食品の場合

水の代わりに 50 v/v%エタノールを用いて1）と同様の操作を行う。た

だし、配位子交換系カラムを使用する場合は、試験溶液の一定量を採取して一旦ロータリーエバポレーターで減圧乾固した後、残留物を一定量の水に溶かし、メンブランフィルター（0.45 μm）でろ過した液をHPLC用試験溶液とする[注5)]。

3） 塩類を多く含む食品の場合

1）又は2）により調製した試験溶液（水溶液にしたもの）5～10 mLを採取して電気透析装置を用いて脱塩し[注6)]、HPLC用試験溶液とする。

4） 脂質を多く含む食品の場合

50 mL容遠心管に試料の適当量（0.5～5g）を精密に量る。これに石油エーテル40 mLを加えて、時々かくはんしながら15分間放置した後、遠心分離（2,000回転/分、10分間）して上澄み液を傾斜法により除去する。この脱脂操作を再度繰り返した後、窒素気流中あるいは40 ℃の水浴中で残存する石油エーテル分を完全に蒸散させる。得られた残留物について、1）又は2）と同様の操作を行う。

⑤ 標準溶液の調製[注7)]

1） HPLC用試験溶液の溶媒が水の場合

糖アルコール標準品各100 mgを精密に量り、水に溶解して25 mLに定容する。この液から2、5及び10 mLを採取して、それぞれ水で20 mLに定容する[注8)]。

2） HPLC用試験溶液の溶媒が50 v/v%エタノールの場合

糖アルコール標準品各100 mgを精密に量り、50 v/v%エタノールに溶解して25 mLに定容する。この液から2、5及び10 mLを採取して、それぞれ50 v/v%エタノールで20 mLに定容する[注8)]。

⑥ 測定

HPLC用試験溶液の一定量をHPLCに注入し、各糖アルコールのピーク高さ[注9)]を測定する。同様に各標準溶液の同量をHPLCに注入して各糖アルコールのピーク高さを測定し、検量線を作成する。

＜高速液体クロマトグラフ操作条件例＞

1） カラム：Wakosil 5NH2（富士フイルム和光純薬）又は相当品[注10)]、
内径4.6 mm、長さ250 mm、ステンレス製
移動相：アセトニトリル - 水（75:25）[注11)]
検出器：屈折率検出器
流速：1.0 mL/分
温度：室温
注入量：20 μL

2） カラム：Aminex HPX-87P、Aminex HPX-87C（Bio-Rad）又は相当品[注12)]、
内径7.8～8.0 mm、長さ300 mm、ステンレス製
移動相：水
検出器：屈折率検出器

流速：0.6 mL/分
温度：カラム 85 ℃
注入量： 5μL

⑦ 計算

$$\text{試料中の各糖アルコール含量 (g/100 g)} = \frac{C \times V \times D}{W} \times \frac{100}{1000}$$

C：検量線より求めた各糖アルコール濃度（mg/mL）
V：定容量（mL）
D：希釈率
W：試料採取量（g）

［注］

1） 糖アルコールの検出には、屈折率検出器のほかにパルス電気化学検出器等も利用できる。

2） 測定する糖アルコールの種類や試料により種々のカラムが利用可能であるが、ここでは汎用性の高い代表的なもののみを示す。

3） 通常カールフィッシャー法により測定する。標準品の量が少ない場合は、減圧加熱乾燥法（例えば 60 ℃、5時間）で乾燥したものを用いる。

4） JIS 5種 B 又は同等品のろ紙を用いる。

5） 配位子交換系カラムを使用する場合には移動相として水を流すため、HPLC 用試験溶液の溶媒を水に置換しておく。

6） HPLC 用試験溶液中にナトリウムイオン等が多量に存在すると、妨害ピークを与えたり、カラムの劣化原因にもなるので、脱塩処理を行ったほうがよい。脱塩の方法は、電気透析装置のほか、8 食物繊維（2） 高速液体クロマトグラフ法（酵素-HPLC 法）等に記されたイオン交換樹脂によってもよい。

7） 溶媒の種類はピークの高さに影響するので、HPLC 用試験溶液と標準溶液の溶媒を統一する必要がある。試験溶液にエタノール等揮発成分を含む場合、試験溶液を減圧乾固した後、水に再溶解することで、水で調製した標準溶液を使用することができる。

8） 標準溶液の濃度は、使用する検出器の感度を考慮して設定する。

9） 完全分離しないようなきょう雑ピークが認められる場合、ピーク面積測定では誤差が大きくなるのでピーク高さ測定を採用する。

10） Shodex Asahipak NH2P-50（昭和電工）等のアミノポリマ系カラムも使用可能。

11） 適切な移動相の条件を調整すること。アミノシリカ系カラムは使用時間とともに徐々に溶出時間が短くなるので、溶出時間をほぼ一定に保つように混合比率を調整する。なお、アセトニトリルの割合を増やすと溶出は遅くなる。

12)　強陽イオン交換樹脂（スルホン化ポリスチレンゲル）を充てんしたカラムで、対イオンが鉛又はカルシウム型になっているもの。糖及び糖アルコールの水酸基が、鉛又はカルシウムイオンに配位する強さの差により分離される。

（６）　難消化性糖質のエネルギー換算係数

難消化性糖質	エネルギー換算係数 (kcal/g)
エリスリトール スクラロース 1,5-アンヒドログルシトール D-プシコース	0
ソルボース マンニトール ガラクトピラノシル（β1-3）グルコピラノース ガラクトピラノシル（β1-6）グルコピラノース ラクチュロース イソマルチトール パラチニット マルチトール ラクチトール ガラクトピラノシル（β1-6）ガラクトピラノシル（β1-4）グルコピラノース ガラクトピラノシル（β1-3）ガラクトピラノシル（β1-4）グルコピラノース ガラクトシルスクロース（別名　ラクトスクロース） ガラクトシルラクトース キシロトリオース ケストース ラフィノース マルトトリイトール キシロビオース ゲンチオトリオース ゲンチオビオース スタキオース ニストース ゲンチオテトラオース フラクトフラノシルニストース	2

α-サイクロデキストリン β-サイクロデキストリン マルトシル　β-サイクロデキストリン セロビオース	
ソルビトール テアンデオリゴ マルトテトライトール キシリトール	3

（7）　食物繊維のエネルギー換算係数

食物繊維素材名	エネルギー換算係数 (kcal/g)
寒天 キサンタンガム サイリウム種皮 ジェランガム セルロース 低分子アルギン酸ナトリウム ポリデキストロース 高架橋度リン酸架橋でん粉 難消化性グルカン ヒドロキシプロピルメチルセルロース メチルセルロース	0
アラビアガム 難消化性デキストリン ビートファイバー 還元難消化性デキストリン グルコマンナン	1
グァーガム（グァーフラワー、グァルガム） グァーガム酵素分解物 小麦胚芽 湿熱処理でんぷん（難消化性でんぷん） 水溶性大豆食物繊維（WSSF） タマリンドシードガム プルラン イヌリン	2

別添　アレルゲンを含む食品に関する表示

第１　アレルゲンを含む食品に関する表示の基準

１　表示の概要

（１）　食物アレルギー症状を引き起こすことが明らかになった食品のうち、特に発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高い食品（以下「特定原材料」という。）を食品表示基準別表第14に掲げ、これらを含む加工食品については、食品表示基準に定めるところにより当該特定原材料を含む旨を表示しなければならない。

（２）　特定原材料に由来する添加物については、「食品添加物」の文字及び当該特定原材料に由来する旨を表示しなければならない。

（３）　特定原材料に由来する添加物を含む食品については、食品表示基準の定めるところにより、当該添加物を含む旨及び当該食品に含まれる添加物が当該特定原材料に由来する旨を表示しなければならない。

（４）食品表示基準に定めるアレルゲンを含む食品に関する表示の基準は、消費者に直接販売されない食品の原材料も含め、食品流通の全ての段階において、表示が義務付けられるものである。

２　表示の対象

（１）　特定原材料

食物アレルギー症状を引き起こすことが明らかになった食品のうち、特に発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高いものを食品表示基準において特定原材料として定め、次の９品目の表示を義務付けている。

えび、カシューナッツ、かに、くるみ、小麦、そば、卵、乳、落花生（ピーナッツ）

（２）　特定原材料に準ずるもの

食物アレルギー症状を引き起こすことが明らかになった食品のうち、症例数や重篤な症状を呈する者の数が継続して相当数みられるが、特定原材料に比べると少ないものを特定原材料に準ずるものとして、次の20品目を原材料として含む加工食品については、当該食品を原材料として含む旨を可能な限り表示するよう努めることとする。

アーモンド、あわび、いか、いくら、オレンジ、キウイフルーツ、牛肉、ごま、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、ピスタチオ、豚肉、マカダミアナッツ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン

（３）　特定原材料等の範囲

特定原材料及び特定原材料に準ずるもの（以下「特定原材料等」という。）の

範囲は、原則として、別表１のとおり、日本標準商品分類の番号で指定されている範囲のものを指す。

３　表示の方法

（１）　特定原材料等の表示方法

特定原材料等の表示は、次のいずれかにより表示すること。

①　特定原材料等を原材料として含んでいる場合は、原則、原材料名の直後に括弧を付して特定原材料等を含む旨を表示すること。なお、この含む旨の表示は、「(○○を含む)」(「○○」には特定原材料等名を表示。以下同じ。）と表示することとし、特定原材料のうち「乳」については、「乳成分を含む」と表示すること。

②　特定原材料等に由来する添加物を含む食品の場合は、原則、当該添加物の物質名と、その直後に括弧を付して特定原材料等に由来する旨を表示すること。なお、この由来する旨の表示は、「(○○由来)」と表示することとし、特定原材料のうち「乳」については、「乳成分由来」ではなく、「乳由来」と表示すること。

ただし、食品表示基準別表第７の一括名により表示する場合は、一括名の直後に括弧を付して特定原材料等に由来する旨を表示すること。

また、食品表示基準別表第６の用途名を併記する場合は、次により表示すること。

ア　「用途名（物質名：○○由来)」又は「用途名（物質名（○○由来))」と表示すること。なお、見やすさの観点からは、二重括弧を使用するよりも、「：」を使用する方がより望ましい。

イ　２つ以上の特定原材料等から構成される添加物については、「用途名（物質名：○○・○○由来)」と表示すること。

なお、特定原材料等由来の添加物についての表示例は、別表２のとおり。

（２）　特定原材料等の省略

①　繰り返しになるアレルゲンの省略

表示をする最終食品に対し、２種類以上の原材料又は添加物を使用しているものであって、原材料又は添加物に同一の特定原材料等が含まれているものにあっては、そのうちのいずれかに特定原材料等を含む旨又は由来する旨を表示すれば、それ以外の原材料又は添加物については、特定原材料等を含む旨又は由来する旨を省略することができる。

ただし、その一方で、抗原性が認められないとまではいえないが、一般的にアレルゲンが含まれていても摂取可能といわれている食品がある。例えば、醤油の原材料に使用される小麦は、醤油を作る過程で小麦のタンパク質が分解されるため抗原性が低いといわれているが、現時点においては明確な科学的知見がないため特定原材料等の表示が必要である。このような食品につい

て、今後、国として調査研究を行い、科学的知見が得られた場合には、その食品が原材料として含まれる食品には、例えば、繰り返しになるアレルゲンの省略を不可とするなど、食物アレルギー患者の選択の判断に寄与する見直しを行うこととする。

② 代替表記等

特定原材料等と具体的な表示方法が異なるが、特定原材料等の表示と同一のものであると認められるものとして別表３に掲げる表示を行う場合にあっては、当該表示をもって特定原材料等の表示に代えることができる（以下「代替表記」という。）。例えば、「玉子」や「たまご」の表示をもって、「卵を含む」の表示を省略することができる。

また、原材料名又は添加物名に特定原材料等又は代替表記を含む場合は、特定原材料等を使った食品であることが理解できるものとして別表３に掲げる表示を行えば、当該表示をもって特定原材料等の表示に代えることができる（以下「拡大表記」という。）。なお、この拡大表記については、別表３に掲げる表示は表記例である。

（３） その他の表示方法

特定原材料等を表示するに当たっては、原則、個々の原材料又は添加物の表示の直後に特定原材料等を含む旨又は由来する旨を表示することとしたが、個別表示によりがたい場合や個別表示がなじまない場合などは、一括表示も可能とする。

一括表示をする場合は、特定原材料等そのものが原材料として表示されている場合や、代替表記等で表示されているものも含め、当該食品に含まれる全ての特定原材料等について、原材料欄の最後（原材料と添加物を事項欄を設けて区分している場合は、それぞれ原材料欄の最後と添加物欄の最後）に「(一部に○○・○○・…を含む)」と表示すること。

なお、個別表示と一括表示を組み合わせて使用することはできない。

（４） 表示が免除される場合

① 特定原材料を原材料として含む食品であっても、抗原性が認められないものにあっては、表示義務が免除される。ここでいう「抗原性が認められない」とは、アレルギー誘発性が認められないことであり、具体的には、精製が完全な乳糖等が挙げられるが、その他の食品についても、今後とも、知見を積み重ねていくものである。

② 特定原材料に由来する添加物であっても、アレルゲン性試験等により抗原性が認められないと判断できる場合には、表示義務が免除される。ここでいうアレルゲン性試験とは、添加物の食品健康影響評価に用いられている「添加物に関する食品健康影響評価指針」（令和３年９月食品安全委員会決定）に

基づくものである。

③　特定原材料に由来する香料に関しては、実際に食物アレルギーを引き起こしたという知見が乏しいため、現時点では特定原材料を含む旨の表示を義務付けてはいない。しかしながら、香気成分以外に特定原材料を原材料として製造された副剤を使用している場合等は、当該副剤については表示する必要がある。

④　特定原材料を原材料とするアルコール類については、その反応が特定原材料の抗原性によるものかアルコールの作用によるものかを判断することは極めて困難であり、現時点では特定原材料を含む旨の表示を義務付けてはいない。

（５）　コンタミネーション

原材料として特定原材料等を使用していない食品を製造等する場合であっても、製造工程上の問題等によりコンタミネーションが発生することが指摘されている。これが原因となりアレルギー疾患を有する者に健康危害が発生するおそれが懸念されている現状を踏まえ、他の製品の原材料中の特定原材料等が製造ライン上で混入しないよう当該製造ラインを十分に洗浄する、特定原材料等を含まない食品から順に製造する、又は可能な限り専用器具を使用するなど、製造者等がコンタミネーションを防止するための対策の実施を徹底すべきである。

また、これらのコンタミネーション防止対策の徹底を図ってもなおコンタミネーションの可能性が排除できない場合については、アレルギー疾患を有する者に対する注意喚起表記を推奨するものである。

（６）　その他留意事項

①　食物アレルギーは、ごく微量のアレルゲンによって引き起こされることがあるため、特定原材料を含む食品にあっては、原材料としての使用の意図にかかわらず、原則、当該特定原材料を含む旨を表示する必要がある。

②　特定原材料等に関して「入っているかもしれない」等の可能性表示は認められないこと。一括表示の外であっても、同様である。

③　「穀類（小麦、大豆）」又は「小麦、大豆」を単に「穀類」とのみ表示するように、大分類で表示することは認められない。ただし、網で無分別に捕獲したものをそのまま原材料とし用いるため、どの種類の魚介類が入っているか把握できないという製造工程上の理由から、「たんぱく加水分解物（魚介類）」、「魚醤（魚介類）」、「魚醤パウダー（魚介類）」、「魚肉すり身（魚介類）」、「魚油（魚介類）」、「魚介エキス（魚介類）」の６つに限り、例外的に認めることとする。

④　加工助剤及びキャリーオーバーなど、添加物の表示が免除されているものであっても、特定原材料については、表示する必要がある。特定原材料に準ずるものについても、可能な限り表示に努めること。

⑤　特定原材料に準ずるものについては、表示が義務付けられておらず、その表示を欠く場合、アレルギー疾患を有する者は当該食品が「特定原材料に準ずるものを使用していない」又は「特定原材料に準ずるものを使用しているが、表示がされていない」のいずれであるかを正確に判断することが困難となっている。このため、アレルゲンを含む食品の表示の対象が「特定原材料９品目」又は「特定原材料に準ずる20品目を含む29品目」のいずれであるかを一括表示の外へ表示するよう努めること。特に「特定原材料９品目」のみを表示対象としている場合は、ウェブサイト等の活用及び電話等による消費者からの問合せへの対応等、情報提供の充実を図られたい。

⑥　原材料表示のうち、特定原材料等に係る表示の視認性を高め、アレルギー疾患を有する者が適切に判断できるようにする方策として、優良誤認表示に当たらないよう配慮しつつ、製造者等がそれらの表示の文字の色や大きさ等を変えたり、一括表示の外に別途強調表示する等の任意的な取組を推奨する。

⑦　容器包装に入れないで販売する場合や外食産業に係る事業者によって販売される食品は、特定原材料の表示義務を課すものではないが、品書き、メニュー等を通じ、アレルギー疾患を有する者に対する情報提供を充実させるため、正しい知識・理解に基づく、事業者の規模・業態等に応じた、アレルゲン情報の自主的な情報提供の促進を進めることが望ましい。

⑧　特定原材料等の品目については、継続的に実態調査・科学的研究を行っており、新たな知見や報告により、再検討していく予定である。

第２　食品関連事業者等が留意すべき事項

１　製造記録等の保管に関する留意事項

（１）　特定原材料を原材料として含むか否かの検証は、書面により行うこととなるので、製造記録等を適切に保管する必要がある。

（２）　特定原材料については、加工助剤及びキャリーオーバーについても最終製品まで表示する必要があることから、製品に微量に含まれる特定原材料についても確認し、記録を保管する必要がある。

２　アレルゲンに関する情報提供について留意すべき事項

特定原材料等についてのみでなく、特定原材料等以外の原材料についても、以下に掲げる例により、電話等による問合せへの対応やウェブページ等による情報提供

を行うことが望ましい。

（１） 各食品に原材料の内容を出来る限り詳細に表示し、特定原材料については、特に別枠を設けるなどして、消費者に対し、次に掲げるような注意喚起を行うこと。

① 食品名欄には個別の分かりやすい表示を行い、販売している多くの類似商品のうち具体的にどの商品に関する原材料表示であるかが容易に判別できるようにすること。

② 表示可能面積の制約等により、繰り返しになるアレルゲンの省略規定を採用している場合は、別途の情報提供において、正確に全ての特定原材料の情報提供をすること。

③ 特定原材料等について、これが微量でも含まれる可能性のあるものも含めて可能な限り把握し、情報提供すること。

④ 情報提供をウェブサイト等において行う場合は、各ページの分かりやすい部分に、表示内容についての問合せに対応できる部署又は担当者の名前、住所、電話番号、Ｅメールアドレス等を記載すること。

⑤ 企業秘密に該当する場合であっても、特定原材料を含む旨は表示する必要があること。しかしながら、他の原材料の詳細について情報提供ができない場合は、表示を行っているほかにも原材料を用いている旨を記載し、アレルギーに関する問合せ先等を記載することにより、個別に情報提供に応じること。

（２） その他、消費者等から特定原材料等及びその他の製品に使用した原材料について問合せがあった際は、速やかに回答できるよう体制を整えるよう努めること。

第３　アレルゲンを含む食品の検査に関する事項

アレルゲンを含む食品の検査方法については、別添の「アレルゲンを含む食品の検査方法」に基づき実施すること。

なお、アレルゲンを含む食品の検査方法については、その検査技術の進歩に対応し、順次見直しを行っていくこととしているので、御留意願いたい。

別表１

特定原材料等の範囲

特定原材料等	分類番号(１)	分類番号(２)	大分類	中分類	小分類
えび	71	3311	えび類	くるまえび類	くるまえび
	71	3312	〃	〃	ふとみぞえび
	71	3313	〃	〃	くまえび
	71	3314	〃	〃	たいしょうえび
	71	3319	〃	〃	その他のくるまえび類
	71	3321	〃	しばえび類	よしえび
	71	3322	〃	〃	しばえび
	71	3323	〃	〃	あかえび
	71	3324	〃	〃	とらえび
	71	3329	〃	〃	その他のしばえび類
	71	3331	〃	さくらえび類	さくらえび
	71	3339	〃	〃	その他のさくらえび類
	71	3341	〃	てながえび類	てながえび
	71	3342	〃	〃	すじえび
	71	3349	〃	〃	その他のてながえび類
	71	3351	〃	小えび類	ほっかいえび
	71	3352	〃	〃	てっぽうえび
	71	3353	〃	〃	ほっこくあかえび
	71	3359	〃	〃	その他の小えび類
	71	339	〃	その他のえび類	
	71	3411	〃	いせえび類	いせえび
	71	3412	〃	〃	はこえび
	71	3419	〃	〃	その他のいせえび類
	71	342	〃	うちわえび類	
	71	343	〃	ざりがに類	
カシューナッツ	69	8594	殻果類	その他の殻果類	カシューナッツ
かに	71	3511	かに類	いばらがに類	たらばがに
	71	3512	〃	〃	はなさきがに
	71	3513	〃	〃	あぶらがに
	71	3521	〃	くもがに類	ずわいがに
	71	3522	〃	〃	たかあしがに
	71	3531	〃	わたりがに類	がざみ
	71	3532	〃	〃	いしがに
	71	3533	〃	〃	ひらつめがに
	71	3539	〃	〃	その他のわたりがに類
	71	3541	〃	くりがに類	おおくりがに（けがに）
	71	3542	〃	〃	くりがに
	71	359	〃	その他のかに類	
くるみ	69	8591	殻果類	その他の殻果類	くるみ
小麦	69	2311	小麦	国内産小麦	普通小麦
	69	2312	〃	〃	強力小麦
	69	2321	〃	外国産小麦	普通小麦
	69	2322	〃	〃	準強力小麦
	69	2323	〃	〃	強力小麦
	69	2324	〃	〃	デュラム小麦
	69	521	小麦粉	強力小麦粉	
	69	522	〃	準強力小麦粉	
	69	523	〃	薄力小麦粉	
	69	524	〃	普通小麦粉	
	69	525	〃	デュラムセモリナ	
	69	5291	〃	その他の小麦粉	特殊小麦粉
	69	5299	〃	〃	他に分類されない小麦粉
そば	69	532	そば粉		

特定原材料等	分類番号(1)	分類番号(2)	大分類	中分類	小分類
卵	70	31	食用鳥卵	鶏卵	
	70	32	〃	あひるの卵	
	70	33	〃	うずらの卵	
	70	39	〃	その他の食用鳥卵	
	73	3111	鶏卵の加工製品	液鶏卵	全液鶏卵
	73	3112	〃	〃	卵白液鶏卵
	73	3113	〃	〃	卵黄液鶏卵
	73	3121	〃	粉末鶏卵	全粉鶏卵
	73	3122	〃	〃	卵白粉鶏卵
	73	3124	〃	〃	卵黄粉鶏卵
	73	313	〃	鶏卵加工冷凍食品	
	73	319	〃	その他の鶏卵加工製品	
	73	391	その他の加工卵製品	あひるの卵の加工製品	
	73	392	〃	うずらの卵の加工製品	
	73	399	〃	他に分類されない加工卵製品	
乳 分類は食品衛生法乳等命令に準じる牛乳及びチーズを含む	−	−	乳	生乳	
	−	−	〃	牛乳	
	−	−	〃	特別牛乳	
	−	−	〃	成分調整牛乳	
	−	−	〃	低脂肪牛乳	
	−	−	〃	無脂肪牛乳	
	−	−	〃	加工乳	
	−	−	乳製品	クリーム	
	−	−	〃	バター	
	−	−	〃	バターオイル	
	−	−	〃	チーズ	ナチュラルチーズ
	−	−	〃	〃	プロセスチーズ
	−	−	〃	濃縮ホエイ	
	−	−	〃	アイスクリーム類	アイスクリーム
	−	−	〃	〃	アイスミルク
	−	−	〃	〃	ラクトアイス
	−	−	〃	濃縮乳	
	−	−	〃	脱脂濃縮乳	
	−	−	〃	無糖練乳	
	−	−	〃	無糖脱脂練乳	
	−	−	〃	加糖練乳	
	−	−	〃	加糖脱脂練乳	
	−	−	〃	全粉乳	
	−	−	〃	脱脂粉乳	
	−	−	〃	クリームパウダー	
	−	−	〃	ホエイパウダー	
	−	−	〃	たん白質濃縮ホエイパウダー	
	−	−	〃	バターミルクパウダー	
	−	−	〃	加糖粉乳	
	−	−	〃	調製粉乳	
	−	−	〃	調製液状乳	
	−	−	〃	発酵乳	
	−	−	〃	乳酸菌飲料	
	−	−	〃	乳飲料	
	−	−	乳又は乳製品を主原料とする食品		
落花生	69	4811	落花生	大粒落花生	大粒落花生さやみ
	69	4812	〃	〃	大粒落花生むきみ
	69	4821	〃	小粒落花生	小粒落花生さやみ
	69	4822	〃	〃	小粒落花生むきみ
	69	489	〃	その他の落花生	
アーモンド	69	8593	殻果類	その他の殻果類	アーモンド

特定原材料等	分類番号(1)	分類番号(2)	大分類	中分類	小分類
あわび	71	271	あわび類	あわび	
いか	71	311	いか類	ほたるいか類	
	71	312	〃	するめいか類	
	71	3131	〃	やりいか類	やりいか
	71	3132	〃	〃	けんさきいか
	71	3133	〃	〃	あおりいか
	71	3139	〃	〃	その他のやりいか類
	71	3141	〃	こういか類	はりいか
	71	3142	〃	〃	しりやけいか（まいか）
	71	3143	〃	〃	もんごういか
	71	3149	〃	〃	その他のこういか類
	71	3191	〃	その他のいか類	みみいか
	71	3192	〃	〃	ひめいか
	71	3193	〃	〃	つめいか
	71	3199	〃	〃	他に分類されないいか類
いくら	74	1496	塩蔵魚介類	その他の塩蔵魚介類	すじこ
	74	1497	〃	〃	いくら
オレンジ	69	8125	かんきつ類	中晩かん	ネーブルオレンジ
	69	8126	〃	〃	バレンシアオレンジ
キウイフルーツ	69	866	熱帯性及び亜熱帯性果実（別掲を除く。）	キウイフルーツ	
牛肉	70	111	牛肉	成牛肉	
	70	112	〃	子牛肉	
	70	113	〃	牛のくず肉	
ごま	03	22	油脂用種実、油脂用堅実及び油脂用種核	ごま	
さけ サケ科のサケ属、サルモ属に属するもので、陸封性を除く。	71	121	さく河性さけ・ます類	しろざけ	
	71	122	〃	べにざけ	
	71	123	〃	ぎんざけ	
	71	124	〃	ますのすけ	
	71	125	〃	さくらます	
	71	126	〃	からふとます	
	71	129	〃	その他のさく河性さけ・ます類	
さば	71	1441	かつお・まぐろ・さば類	さば類	まさば
	71	1442	〃	〃	ごまさば
大豆	69	4111	大豆	国内産普通大豆	大粒大豆
	69	4112	〃	〃	中粒大豆
	69	4113	〃	〃	小粒大豆
	69	4114	〃	〃	極小粒大豆
	69	4119	〃	〃	その他の国内産普通大豆
	69	4121	〃	外国産普通大豆	大粒大豆
	69	4122	〃	〃	中粒大豆
	69	4123	〃	〃	小粒大豆
	69	4124	〃	〃	極小粒大豆
	69	4129	〃	〃	その他の外国産普通大豆
	69	7316	果菜類	えだまめ	
	69	72351	葉茎菜類	もやし	大豆もやし
鶏肉	70	1711	家きん肉	鶏肉	成鶏肉
	70	1712	〃	〃	ブロイラー
バナナ	69	862	熱帯性及び亜熱帯性果実（別掲を除く。）	バナナ	
ピスタチオ	69	8595	殻果類	その他の殻果類	ピスタチオナット
豚肉	70	121	豚肉及びいのしし肉	豚肉	
	70	123	〃	豚のくず肉	
マカダミアナッツ	69	8599	殻果類	その他の殻果類	他に分類されない殻果類

特定原材料等	分類番号(1)	分類番号(2)	大分類	中分類	小分類
もも	69	8311	核果類	もも	砂子早生
	69	8312	〃	〃	倉方早生
	69	8313	〃	〃	大久保
	69	8314	〃	〃	白鳳
	69	8315	〃	〃	白桃
	69	8316	〃	〃	缶桃種
	69	8319	〃	〃	その他のもも
やまいも	69	71111	根菜類	やまのいも	ながいも
	69	71112	〃	〃	やまといも
	69	71119	〃	〃	その他のやまのいも
りんご	69	82101	仁果類（かんきつ類を除く。）	りんご	祝
	69	82102	〃	〃	つがる
	69	82103	〃	〃	王林
	69	82104	〃	〃	ゴールデンデリシャス
	69	82105	〃	〃	スターキングデリシャス
	69	82106	〃	〃	デリシャス
	69	82107	〃	〃	紅玉
	69	82108	〃	〃	国光
	69	82111	〃	〃	ジョナゴールド
	69	82112	〃	〃	ふじ
	69	82113	〃	〃	陸奥
	69	82114	〃	〃	世界一
	69	82199	〃	〃	その他のりんご
ゼラチン	−	−			

別表2

特定原材料等由来の添加物についての表示例

1 特定原材料

特定原材料の名称	区分	添加物名	特定原材料の表示	備考
えび かに	既存添加物	キチン	キチン(かに由来)	ただし、えびを原料とする場合は(えび由来)
		キトサン	キトサン(かに由来)	
		グルコサミン	グルコサミン(かに由来)	
カシューナッツ	—	—	—	—
くるみ	—	—	—	—
小麦	指定添加物	アセチル化アジピン酸架橋デンプン	アセチル化アジピン酸架橋デンプン(小麦由来)	ただし、原材料が小麦の場合 いずれも「加工デンプン(小麦由来)」も可
		アセチル化酸化デンプン	アセチル化酸化デンプン(小麦由来)	
		アセチル化リン酸架橋デンプン	アセチル化リン酸架橋デンプン(小麦由来)	
		オクテニルコハク酸デンプンナトリウム	オクテニルコハク酸デンプンナトリウム(小麦由来) オクテニルコハク酸デンプンNa(小麦由来)	
		酢酸デンプン	酢酸デンプン(小麦由来)	
		酸化デンプン	酸化デンプン(小麦由来)	
		デンプングリコール酸ナトリウム	デンプングリコール酸ナトリウム(小麦由来) デンプングリコール酸Na(小麦由来)	
		ヒドロキシプロピル化リン酸架橋デンプン	ヒドロキシプロピル化リン酸架橋デンプン(小麦由来)	
		ヒドロキシプロピルデンプン	ヒドロキシプロピルデンプン(小麦由来)	
		リン酸架橋デンプン	リン酸架橋デンプン(小麦由来)	
		リン酸化デンプン	リン酸化デンプン(小麦由来)	
		リン酸モノエステル化リン酸架橋デンプン	リン酸モノエステル化リン酸架橋デンプン(小麦由来)	
	既存添加物	β－アミラーゼ	酵素(小麦由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に小麦を含む」と表示
		カルボキシペプチダーゼ	酵素(小麦由来)	
		スフィンゴ脂質	スフィンゴ脂質(小麦由来)	ただし、原材料が小麦の場合
	一般飲食物添加物	グルテン	グルテン(小麦由来)	
		コムギ抽出物	コムギ抽出物	名称に「小麦」があるため、特定原材料等の表示は不要
そば	既存添加物	クエルセチン	クエルセチン(そば由来) ケルセチン(そば由来) ルチン分解物(そば由来)	ただし、原材料がそばの場合。(現在はエンジュを基原としたもののみが流通)
		酵素処理イソクエルシトリン	酵素処理イソクエルシトリン(そば由来) 糖転移イソクエルシトリン(そば由来) 酵素処理ルチン(そば由来)	
		酵素処理ルチン(抽出物)	酵素処理ルチン(抽出物)(そば由来) 糖転移ルチン(抽出物)(そば由来) 酵素処理ルチン(そば由来) 糖転移ルチン(そば由来)	
		ルチン(抽出物)	ルチン(抽出物)(そば由来)	
			ソバ全草抽出物	名称に「そば」があるため、特定原材料等の表示は不要
			フラボノイド(そば由来) ルチン(そば由来)	

特定原材料の名称	区分	添加物名	特定原材料の表示	備考
卵	既存添加物	酵素処理レシチン	酵素処理レシチン(卵由来) レシチン(卵由来) 乳化剤(卵由来)	
		酵素分解レシチン	酵素分解レシチン(卵由来) レシチン(卵由来) 乳化剤(卵由来)	
		卵殻焼成カルシウム	卵殻焼成カルシウム	焼成しており、アレルゲンは含まないと考えられる。
		分別レシチン	分別レシチン(卵由来) レシチン(卵由来) レシチン分別物(卵由来) 乳化剤(卵由来)	
		未焼成カルシウム(卵殻未焼成カルシウム)	卵殻未焼成カルシウム 卵殻Ca 卵殻カルシウム	名称に「卵」があるため、特定原材料等の表示は不要
			未焼成カルシウム(卵由来) 未焼成Ca(卵由来)	
		卵黄レシチン	レシチン(卵由来) 卵黄レシチン(卵由来) 乳化剤(卵由来)	
		リゾチーム	リゾチーム(卵由来) 卵白リゾチーム(卵由来) 酵素(卵由来)	
乳及び乳製品	指定添加物	カゼインナトリウム	カゼインNa(乳由来) カゼインナトリウム(乳由来)	
	既存添加物	乳清焼成カルシウム	乳清焼成カルシウム	焼成しており、アレルゲンは含まないと考えられる。
		ラクトパーオキシダーゼ	酵素(乳由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に乳成分を含む」と表示
		ラクトフェリン濃縮物	ラクトフェリン(乳由来)	
	一般飲食物添加物	カゼイン	カゼイン(乳由来)	
落花生	—	—	—	—

2 特定原材料に準ずるもの

特定原材料に準ずるものの名称	区分	添加物名	特定原材料に準ずるものの表示	備考
アーモンド	—	—	—	—
あわび	—	—	—	—
いか	既存添加物	タウリン(抽出物)	調味料(アミノ酸:いか由来)	
	一般飲食物添加物	イカスミ色素	イカスミ色素 イカ墨	名称に「イカ」があるので、特定原材料等の表示不要
いくら	—	—	—	—
オレンジ	指定添加物	メチルヘスペリジン	メチルヘスペリジン(オレンジ由来) 溶性ビタミンP(オレンジ由来) ヘスペリジン(オレンジ由来) ビタミンP(オレンジ由来) V.P(オレンジ由来)	ただし、オレンジ以外の柑橘を基原としたものは特定原材料等の表示不要
	既存添加物	酵素処理ヘスペリジン	糖転移ヘスペリジン(オレンジ由来) ヘスペリジン(オレンジ由来)	ただし、オレンジ以外の柑橘を基原としたものは特定原材料等の表示不要
		ヘスペリジン	ヘスペリジン(オレンジ由来) ビタミンP(オレンジ由来)	
		ペクチン	ペクチン(オレンジ由来)	
		ペクチン分解物	ペクチン分解物(オレンジ由来)	
	一般飲食物添加物	オレンジ果汁	オレンジ果汁 オレンジジュース	名称に「オレンジ」があるので、特定原材料等の表示不要
キウイフルーツ	既存添加物	アクチニジン	酵素(キウイ由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部にキウイを含む」等と表示
牛肉	指定添加物	L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル	特定原材料等の表示不要	ステアリン酸、パルミチン酸は蒸留・精製されているため、アレルゲンの存在はないと考えられる。
		L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル	特定原材料等の表示不要	
		ビタミンA脂肪酸エステル	特定原材料等の表示不要	脂肪酸(ステアリン酸、パルミチン酸)は蒸留・精製されているため、アレルゲンの存在はないと考えられる。 ビタミンA脂肪酸エステルは酢酸エステル又はパルミチン酸エステルが主体
		グリセリン	大豆の項参照	大豆の項参照
		グリセリン脂肪酸エステル		
		プロピレングリコール脂肪酸エステル		
		ショ糖脂肪酸エステル	特定原材料等の表示不要	ステアリン酸、パルミチン酸は蒸留・精製されているため、アレルゲンの存在はないと考えられる。
		ステアロイル乳酸カルシウム	特定原材料等の表示不要	ステアリン酸は上記のとおり 乳酸は特定原材料を使用しない。カルシウムは水酸化カルシウム又は酸化カルシウムを使用
		ソルビタン脂肪酸エステル	特定原材料等の表示不要	ステアリン酸、パルミチン酸は蒸留・精製されているため、アレルゲンの存在はないと考えられる。

特定原材料に準ずるものの名称	区分	添加物名	特定原材料に準ずるものの表示	備考
	既存添加物	高級脂肪酸	特定原材料等の表示不要	蒸留、精製されるので、アレルゲンは含まないと考えられる。
		ヘム鉄	ヘム鉄(牛由来)	
		リパーゼ	酵素(牛由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に牛肉を含む」と表示 ただし真皮層を含まない内臓由来のものは特定原材料等の表示不要
		レンネット	酵素(牛由来)	
	一般飲食物添加物	コラーゲン	コラーゲン(牛由来)	
ごま	既存添加物	ゴマ油不けん化物	ゴマ油不けん化物(ごま由来) ゴマ油抽出物(ごま由来)	
		d－α－トコフェロール	ビタミンE 抽出ビタミンE	分子蒸留したものはアレルゲンが除去されていると考えられるので特定原材料等の表示不要 ただし、大豆油等で希釈したものは添加物表示に(大豆由来)等の表示が必要
		d－γ－トコフェロール	d－α－トコフェロールに同じ	
		d－δ－トコフェロール	d－α－トコフェロールに同じ	
		ミックストコフェロール	分子蒸留したままのもの：特定原材料等の表示不要	
さけ	既存添加物	しらこたん白抽出物	しらこたん白(さけ由来) プロタミン(さけ由来)	ただし、原料がさけの場合のみ
さば	—	—	—	—
大豆	指定添加物	グリセリン	特定原材料等の表示不要	蒸留、精製されるので、アレルゲンは含まないと考えられる。
		グリセリン脂肪酸エステル	蒸留物：特定原材料等の表示不要 未蒸留物：グリセリン脂肪酸エステル(大豆由来) グリセリンエステル(大豆由来) 乳化剤(大豆由来)	蒸留物はアレルゲンは含まないと考えられる。
		プロピレングリコール脂肪酸エステル	特定原材料等の表示不要	反応に用いる「脂肪酸」は蒸留・精製されているので、アレルゲンは含まないと考えられる。
		ステアロイル乳酸カルシウム	特定原材料等の表示不要	
		ソルビタン脂肪酸エステル	特定原材料等の表示不要	
	既存添加物	β－アミラーゼ	酵素(大豆由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に大豆を含む」と表示
		高級脂肪酸	牛肉の項参照	牛肉の項参照
		酵素処理レシチン	酵素処理レシチン(大豆由来) レシチン(大豆由来) 乳化剤(大豆由来)	
		酵素分解レシチン	レシチン(大豆由来) 乳化剤(大豆由来)	
		植物性ステロール	植物性ステロール (大豆由来) ステロール(大豆由来) 乳化剤(大豆由来)	
		植物レシチン	植物レシチン(大豆由来) レシチン(大豆由来) 乳化剤(大豆由来)	
		ダイズサポニン	サポニン(大豆由来) ダイズサポニン	名称に「ダイズ」があるので、特定原材料等の表示不要
		d－α－トコフェロール	ビタミンE 抽出ビタミンE	分子蒸留したものはアレルゲンが除去されていると考えられるので特定原材料等の表示不要 ただし、大豆油等で希釈したものは添加物表示に(大豆由来)等の表示が必要
		d－γ－トコフェロール	d－α－トコフェロールに同じ	
		d－δ－トコフェロール	d－α－トコフェロールに同じ	

特定原材料に準ずるものの名称	区分	添加物名	特定原材料に準ずるものの表示	備考
		パーオキシダーゼ	酵素(大豆由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に大豆を含む」と表示
		分別レシチン	分別レシチン(大豆由来) レシチン分別物 (大豆由来) レシチン (大豆由来) 乳化剤 (大豆由来)	
		ホスホリパーゼ	酵素(大豆由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に大豆を含む」と表示
		ミックストコフェロール	分子蒸留したままのもの:特定原材料等の表示不要	分子蒸留したものはアレルゲンが除去されていると考えられるので特定原材料等の表示不要 ただし、大豆油等で希釈したものは添加物表示に(大豆由来)等の表示が必要
		リポキシゲナーゼ	酵素(大豆由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に大豆を含む」と表示
	一般飲食物添加物	ダイズ多糖類	ダイズ多糖類 ダイズヘミセルロース	名称に「ダイズ」があるので、特定原材料等の表示不要
鶏肉	既存添加物	ヒアルロン酸	ムコ多糖(鶏由来)	
バナナ	—	—	—	—
ピスタチオ	—	—	—	—
豚肉	指定添加物	グリセリン	牛肉の項参照	牛肉の項参照
		グリセリン脂肪酸エステル		
		プロピレングリコール脂肪酸エステル		
	既存添加物	カタラーゼ	酵素(豚由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に豚肉を含む」と表示 ただし真皮層を含まない内臓由来のものは特定原材料等の表示不要
		高級脂肪酸	牛肉の項参照	牛肉の項参照
		パンクレアチン	酵素(豚由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に豚肉を含む」と表示 ただし真皮層を含まない内臓由来のものは特定原材料等の表示不要
		ヘム鉄	ヘム鉄(豚由来)	牛の場合は(牛由来)と表示
		ホスホリパーゼ	酵素(豚由来)	失活している場合は物質名が表示されないため、「一部に豚肉を含む」と表示 ただし真皮層を含まない内臓由来のものは特定原材料等の表示不要
	一般飲食物添加物	コラーゲン	コラーゲン(豚由来)	

特定原材料に準ずるものの名称	区分	添加物名	特定原材料に準ずるものの表示	備考
マカダミアナッツ	—	—	—	—
もも	—	—	—	—
やまいも	—	—	—	—
りんご	既存添加物	酵素分解リンゴ抽出物	リンゴ抽出物 リンゴエキス	名称に「リンゴ」があるので、特定原材料等の表示不要 ただし、原料がりんごの場合のみ
		ペクチン	ペクチン(リンゴ由来)	
		ペクチン分解物	ペクチン分解物(リンゴ由来)	

(注)

1. 上記リストは代表的な添加物の表示事例としてまとめたものです。
2. 加工助剤、キャリーオーバーに該当する場合で添加物名を省略する場合であっても特定原材料等の表示は必要であるため、一括表示等を行う。
3. 用途名併記の場合の特定原材料等の表記は、物質名と特定原材料等の間を「:」で区切る。
   例)増粘剤(ペクチン:リンゴ由来)
4. 一括名併記の調味料の場合も、(　)内での特定原材料は「:」で区切る。例)調味料(アミノ酸:いか由来)
5. その他の特定原材料等を起源とした添加物に関しては、上記リストに準じて表記することにします。

別表３

特定原材料等の代替表記等方法リスト

１　特定原材料

特定原材料（食品表示基準で定められた品目）	代替表記 表記方法や言葉が違うが、特定原材料と同一であるということが理解できる表記	拡大表記（表記例） 特定原材料名又は代替表記を含んでいるため、これらを用いた食品であると理解できる表記例
えび	海老 エビ	えび天ぷら サクラエビ
カシューナッツ		
かに	蟹 カニ	上海がに　カニシューマイ マツバガニ
くるみ	クルミ	くるみパン　くるみケーキ
小麦	こむぎ コムギ	小麦粉 こむぎ胚芽
そば	ソバ	そばがき　そば粉
卵	玉子 たまご タマゴ エッグ 鶏卵 あひる卵 うずら卵	厚焼玉子 ハムエッグ
乳	ミルク バター バターオイル チーズ アイスクリーム	アイスミルク　生乳 ガーリックバター　牛乳 プロセスチーズ　濃縮乳 乳糖　加糖れん乳 乳たんぱく　調製粉乳
落花生	ピーナッツ	ピーナッツバター ピーナッツクリーム

※「卵」について、「卵白」及び「卵黄」については、特定原材料名（卵）を含んでいるが、事故防止の観点から、拡大表記として含む旨の表示を省略することは不可とする。

２　特定原材料に準ずるもの

通知で定められた品目	代替表記 表記方法や言葉が違うが、特定原材料に準ずるものと同一であるということが理解できる表記	拡大表記（表記例） 特定原材料に準ずるものの名称又は代替表記を含んでいるため、これらを用いた食品であると理解できる表記例
アーモンド		アーモンドオイル
あわび	アワビ	煮あわび
いか	イカ	いかフライ　イカ墨
いくら	イクラ　すじこ スジコ	いくら醤油漬け　塩すじこ
オレンジ		オレンジソース　オレンジジュース
キウイフルーツ	キウイ　キウィー キーウィー　キーウィ キウィ	キウイジャム　キウイソース キーウィージャム　キーウィーソース
牛肉	牛　ビーフ ぎゅうにく　ぎゅう肉 牛にく	牛すじ　牛脂 ビーフコロッケ
ごま	ゴマ　胡麻	ごま油　練りごま すりゴマ　切り胡麻 ゴマペースト
さけ	鮭　サケ サーモン　しゃけ シャケ	鮭フレーク　スモークサーモン 紅しゃけ　焼鮭
さば	鯖　サバ	さば節　さば寿司
大豆	だいず　ダイズ	大豆煮　大豆たんぱく 大豆油　脱脂大豆
鶏肉	とりにく　とり肉 鳥肉　鶏 鳥　とり チキン	焼き鳥　ローストチキン 鶏レバー　チキンブイヨン チキンスープ　鶏ガラスープ
バナナ	ばなな	バナナジュース
ピスタチオ	ピスタチオナッツ	
豚肉	ぶたにく　豚にく ぶた肉　豚 ポーク	ポークウインナー　豚生姜焼 豚ミンチ
マカダミアナッツ	マカデミアナッツ	
もも	モモ　桃 ピーチ	もも果汁　黄桃 白桃　ピーチペースト
やまいも	山芋　ヤマイモ 山いも	千切りやまいも
りんご	リンゴ　アップル	アップルパイ　リンゴ酢 焼きりんご　りんご飴
ゼラチン		板ゼラチン　粉ゼラチン

最終改正：2026 年４月１日

別添　アレルゲン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、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かかわらず、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。又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又はフードカッター等*で十分に破砕し、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）又は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全てを混合し、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全てを混合し、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当たって、別添４として添付した「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」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、この検査法と同等又は同等以上の性能をもっていること。

操作に当たっては、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 当たりの特定原材料等由来のタンパク質含量が 10 μg 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 μg/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改めて行い、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、ウエスタンブロット法、PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-核酸クロマト法や LC-MS/MS 法がある。一般的に、卵、乳についてはウエスタンブロット法、えび、かにについては PCR 法、小麦、そば、落花生については PCR 法又はリアルタイム PCR 法、くるみについてはリアルタイム PCR 法又は PCR-核酸クロマト法、カシューナッツについてはリアルタイム PCR 法、PCR-核酸クロマト法又は LC-MS/MS 法が用いられる。

なお、ウエスタンブロット法、PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-核酸クロマト法及び LC-MS/MS 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又は同等以上の性能を持っていること。

操作に当たっては、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. ウエスタンブロット法

ウエ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 における見掛け上の分子量：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又は乳の標準液（１μg/mL）が検出されているかどうか確認する。標準液（１μg/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、卵白アルブミン又はオボムコイド、乳タンパク質測定の際はカゼイン又は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 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、充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を得ることができ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限り全て逆浸透膜精製したRO水又は蒸留水を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。

2.2.3.2.1. シリカゲル膜タイプキット法[*1]

調製試料２ｇをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採り[*2]、同遠沈管にあらかじめ65℃に温めておいたAP1緩衝液10 mLとRNase A 10 μL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撹拌する。加温処理後、AP2緩衝液3,250 μLを加え室温で５分間静置し、その後、室温下、3,000 × 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 × 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回当たりの負荷量は500 μLとし、得られた上清のうち３mL 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撹拌し、溶解液を得る。得られた溶解液のうち 500 μL を mini spin columnに負荷し、室温下、10,000 × 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 μLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に溶解液が全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 μLを負荷し、室温下、

10,000 × 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 × 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、あらかじめ 65℃に温めておいた水 50 μL を加え、5 分間静置した後、室温下、10,000 × 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 μL）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、2.2.3.2.2.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２g 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、及びにα-アミラーゼ*4（１mg/mL）200 μL 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℃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 μL 及びに RNase A 20 μL を加えボルテックスミキサーで混合し、その後、50℃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℃）、3,000 × 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 １mL 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２mL 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 ２mL 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 にあらかじめ 50℃に温めておいた QF 緩衝液*3 １mL 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２mL 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℃）、10,000 × 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 １mL を加え、低温下（４℃）、10,000 × 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 μL を加え、65℃、５分間の条件での加温処理、及び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)、又は、同等の効力を持つものを用いる。

*5　QIAGEN 社製(Cat. No. 19133)、又は、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 ２g 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、溶液を撹拌し、均質となった溶液 600 μL 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 μL 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 × 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 μL 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 × 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 × 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清を捨てる。次いで、500 μL の 70 %エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 × g、室温条件下で１分間遠心する。遠心後、沈殿に触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 μL 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ことを促す。得られた溶解液に RNase A ５μL を加え、37℃で 30 分間加温する。加温処理後の溶液に 200 μL の CTAB 緩衝液、次いで 250 μL 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 × 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、中間層に触わらないように分取する。分取した溶液に 200 μL 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 × 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清を捨てる。次いで、200 μL の 70 %エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 × g 、室温条件下で 1 分間遠心する。遠心後、沈殿に触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 μL 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及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、８mL 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 を撹拌しながら加え、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）、１mM 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５μL を取り、TE 緩衝液 45 μL を加えて 50 μL とし、200-320nm 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/μL 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.に示すように、原則として DNA 試料液は 20 ng/μL 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/μL 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/μL 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。したがって、実際の実験操作、及びに日頃の実験環境の保全に当たり、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限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を 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.までに記載する 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 又は動物 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.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'-CGGACGAGAATAAAGATAGAGT-3'

R-primer（CP03-3'）：5'-TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA-3'

増幅バンド長

124 bp

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。

*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'-TGACCGTGCGAAGGTAGC-3'

AN2-5'：　5'-TAACTGTGCTAAGGTAGC-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'-CTTAATTCAACATCGAGGTC-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、0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ* 並びに 0.2 μM 5'及び 3'プライマーを含む液に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液* 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 25 μL 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℃に 10 分間保ち反応を開始させた後、95℃ 0.5 分間、50℃ 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及びに 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又は動物 DNA 検出用プライマー対は、広く植物 DNA 又は動物 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又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、植物間又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又は動物 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 μM 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/μL に調製した DNA 試料液*4 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 25 μL 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。反応条件は次のとおりである。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及び 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（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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’-CGAAGGAAACCCCGCAATAAAT-3’

R-primer（agg05-3’）：5’-CGACGCTATTTACCTTGTTGAG-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（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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 （サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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、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’-AACGCCATAACCAGCCCGATT-3’

R-primer (FAG22-3’) : 5’-CCTCCTGCCTCCCATTCTTC-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’-CATCACAATCAACTTATGGTGG-3’

R-primer (Wtr10-3’) : 5’-TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA-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、0.625 units Taq DNAポリメラーゼ[*4] 並びに0.3 μM 5’及び3’プライマー[*3]を含む液に、20 ng/μL に調製したDNA試料液[*5] 2.5 μL (DNAとして50 ng) を加え、全量を25 μL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℃に10分間保ち反応を開始させた後、95℃ 1分間、56℃ 1分間、72℃ 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℃ 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及び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又は動物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 μL、制限酵素 10×M バッファー2 μL*、制限酵素 HaeIII 1 μL*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）製のもの又は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

ただし、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（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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’-TTATATAAAGTCTRGCCTGCC-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’-GTCCCTCTAGAACATTTAAGCCTTTTC-3’

ShH13-03’-2: 5’-GTCCCTTTATACTATTTAAGCCTTTTC-3’

ShH13-03’-3: 5’-GTCCCCCCAAATTATTTAAGCCTTTTC-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（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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/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。

*6　PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9600、9700、Veriti サーマルサイクラー（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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 μM 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/μL に調製した DNA 試料液[*4] 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 25 μL 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、54℃ 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及び 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又は動物 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（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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’-GCGTTATTTTTTTTGAGAGTTCWTATCGTA-3’

CrH16-05’-2: 5’-GCGTAATTTTTTCTGAGAGTTCTTATCATA-3’

CrH16-05’-3: 5’-GCGTTATTTTTTTTAAGAGTACWTATCGTA-3’

CrH16-05’-4: 5’-GCGTTATTTCTTTTGAGAGCTCATATCGTA-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’-TTTAATTCAACATCGAGGTCGCAAAGT-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（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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、Veriti サーマルサイクラー（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）又は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 μL 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ので、泳動する目的産物のバンド長に合わせてゲル濃度（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、染色を行ってもよい。（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掛かりすぎると、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。

2.2.3.4.3. 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、５μL 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 PCR 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 124bp 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点の両方又は、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及び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 PCR 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、判定例及び注意事項は 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 PCR 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、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、判定例及び注意事項は 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 PCR 検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたレーンで 124 bp 又は 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。ただし、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。したがって、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、判定例及び注意事項は 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 PCR 検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたレーンで 124 bp 又は 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、判定例及び注意事項は 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。

2.2.4. リアルタイム PCR 法

食品からの PCR 法の 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リアルタイム 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、リアルタイム PCR 増幅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。

2.2.4.1. 試料調製法

PCR 法の試料調製法（2.2.3.1.）に従う。

2.2.4.2. DNA 抽出精製法

PCR 法の DNA 抽出精製法（2.2.3.2.）に従う。

2.2.4.3. 定性リアルタイム PCR 法

定性リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅をリアルタイムでモニターする方法として数種の手法があるが、ここではプローブ法を用いる。プローブ法では、5’末端を蛍光物質で、3’末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチド（プローブ）を PCR の反応系に加える。プローブは、アニーリングステップで標的とする DNA 配列に特異的にハイブリダイズし、伸長反応の際に分解されてクエンチャー物質による蛍光抑制が解除されることで、蛍光物質由来の蛍光を発する。この蛍光を専用の装置を用いて検出することにより PCR 増幅をリアルタイムでモニターし、その結果を解析する。留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.）と同様である。

2.2.4.3.1. PCR 増幅のリアルタイム測定

定性リアルタイム PCR 法により検知が可能な特定原材料は小麦、そば、落花生、くるみ、カシューナッツの５種である。その各につきリアルタイム PCR 増幅の条件が異なる。2.2.4.3.2. から 2.2.4.3.6. までに記載する方法のうち、検査対象とする特定原材料種に即した方法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 の各々を規定濃度に調製した後、リアルタイム PCR 法の鋳型 DNA として供する。まず、リアルタイム PCR の増幅曲線を植物 DNA 検出用リアルタイム PCR プライマー対とプローブ*1*3*4 又は動物 DNA 検出用リアルタイム PCR プライマー対とプローブ*2*3*5 を用いて取得する、あるいは 2.2.3.3.1.に従って植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR を行い、その結果を 2.2.3.5.に記載のある判定例に照らして判じ、判定に準じて検査対象である特定原材料のリアルタイム PCR 増幅を行う。

*1　植物 DNA 検出用のリアルタイム PCR プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

植物 DNA 検出用リアルタイム PCR プライマー対（増幅長 124 bp）

5’プライマー（CP03-5’）：5’-CGGACGAGAATAAAGATAGAGT-3’

3’プライマー（CP03-3’）：5’-TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA-3’

プローブ（CP03-probe）：5’-FAM-AGGAAAATCCGT-MGB-3’

*2　動物 DNA 検出用のリアルタイム PCR プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

動物 DNA 検出用プライマー対（増幅長 370-470 bp）
5’プライマー(AN-5’)：
AN1-5’： 5’-TGACCGTGCGAAGGTAGC-3’
AN2-5’： 5’-TAACTGTGCTAAGGTAGC-3’
AN1-5’及び AN2-5’を 1:1 の比率で混合して使用する。
3’プライマー（AN-3’）：5’-CTTAATTCAACATCGAGGTC-3’
プローブ（AN-probe）：5’- FAM-CGCTGTTATCCC-MGB-3’

*3　植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対の性質、及び留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.1.）と同様である。

*4　植物 DNA 検出用のリアルタイム PCR 反応条件は以下のとおりである。

反応液は、反応試料管にリアルタイム PCR 試薬*6 10 μL、5’及び 3’プライマー（いずれも 12.5 μM） それぞれ 0.8 μL、プローブ（10 μM） 0.4 μL、及び水 5.5 μL を含むマスターミックス（下記表参照）に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*7 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL にする。DNA 試料液の代わりに陽性コントロール溶液*8 2.5 μL を加えたものを調製し、結果の判定の際に基準とすることが望ましい。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。 次に、その反応試料管をリアルタイム PCR 増幅装置*9 にセットする。反応条件は次のとおりである。95℃に 15 分間保ち反応を開始させた後、95 15 秒、55℃ 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルのリアルタイム PCR 増幅を行う。Reporter、Quencher の入力が必要な装置の場合は、Reporter は FAM に、Quencher は NFQ-MGB（又は None）に設定する。

マスターミックス組成（植物）

試薬	1 反応液当たり必要量（μL）
リアルタイム PCR 試薬*6	10
5’プライマー（12.5 μM）	0.8
3’プライマー（12.5μM）	0.8
プローブ（10 μM）	0.4
水	5.5
合計	17.5

*5　動物 DNA 検出用のリアルタイム PCR 反応条件は以下のとおりである。

反応液は、反応試料管にリアルタイム PCR 試薬*6 10 μL、5’プライマーAN1 及び 2（12.5 μM）それぞれ 0.4 μL、3’プライマー（12.5 μM） 0.8 μL、プローブ（10 μM） 0.4 μL、及び水 5.5 μL を含むマスターミ

ックス（下記表参照）に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*7 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL にする。DNA 試料液の代わりに陽性コントロール溶液*8 2.5 μL を加えたものを調製し、結果の判定の際に基準とすることが望ましい。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。次に、その反応試料管をリアルタイム PCR 増幅装置*9 にセットする。反応条件は次のとおりである。95℃に 15 分間保ち反応を開始させた後、95℃ 15 秒、55℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルのリアルタイム PCR 増幅を行う。Reporter、Quencher の入力が必要な装置の場合は、Reporter は FAM に、Quencher は NFQ-MGB（又は None）に設定する。

マスターミックス組成（動物）

試薬	1 反応液当たり必要量（μL）
リアルタイム PCR 試薬*6	10
5’プライマーAN1-5’（12.5 μM）	0.4
5’プライマーAN2-5’（12.5 μM）	0.4
3’プライマー（12.5μM）	0.8
プローブ（10 μM）	0.4
水	5.5
合計	17.5

*6　リアルタイム PCR 試薬は、QuantiTect Probe PCR Master Mix（キアゲン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*7　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。

*8　陽性コントロール溶液は DNA 量として 0.25 fg(50 コピー相当)の「植物検出用陽性コントロールテンプレート」又は「動物検出用陽性コントロールテンプレート」（オリエンタル酵母工業社製）、あるいは同等の結果が得られるものを用いる。なお、陽性コントロール溶液の解析結果は、DNA 試料液中に植物由来 DNA 又は動物由来 DNA が含まれているかを確認する際、判定の基準となる規定値として用いることができる。

*9　リアルタイム PCR 増幅装置は、上記の温度条件が達成できる装置を使用すること。なお、新しく条件を設定する際には、蛍光データの取得が適切に設定されているかを確認すること。

2.2.4.3.2. 落花生の検知を目的としたPCR増幅のリアルタイム測定

リアルタイム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、リアルタイムPCR試薬*1 12.5 μL、5’及び3’プライマー*2（いずれも50 μM） それぞれ0.2 μL、プローブ*2（10 μM） 0.25 μL、及び水9.35 μLを含むマスターミックス（下記マスターミックス組成（落花生）参照）に、20 ng/μL に調製したDNA試料液*3 2.5 μL（DNAとして50 ng）を加え、全量を25 μLにする。DNA試料液の代わりに基準プラスミド溶液*4 2.5 μL、又は高濃度プラスミド溶液*4 2.5 μLを加えたものについてもそれぞれ２点並行測定分を同時に調製する。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。次に、その反応試料管をリアルタイムPCR増幅装置*5にセットする。反応条件は次のとおりである。95℃に15分間保ち反応を開始させた後、95℃ 0.5分間、68℃ １分間を１サイクルとして、機種に応じて38又は42サイクル*6のリアルタイムPCR増幅を行う。Reporter、Quencherの入力が必要な装置の場合は、ReporterはFAMに、QuencherはNFQ-MGB（又はNone）に設定する。

マスターミックス組成（落花生）

試薬	1反応液当たり必要量（μL）
リアルタイムPCR試薬*1	12.5
5’プライマー（50 μM）*2	0.2
3’プライマー（50 μM）*2	0.2
プローブ（10 μM）*2	0.25
水	9.35
合計	22.5

*1 リアルタイムPCR試薬は、QuantiTect Probe PCR Master Mix（キアゲン社製）又は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プローブは以下のとおりである。

5’プライマー（AI2-F）：5’-TTGGTTCAAAGAGACGGGCTC-3’

3’プライマー（AI2-R）：5’-CACGAGGGTTGTTCTCGACC-3’

プローブ（AI2-probe）：5’-FAM-ACCGCGGCAGATGG-MGB-3’

*3 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。

*4 プラスミド溶液は「定性リアルタイムPCR 小麦、そば、落花生、くるみ検出用プラスミドセット」（ファスマック社製）又は同等の結果が得られる

ものを用いる。なお、基準プラスミド溶液は試料の陽性／陰性を判定するため、高濃度プラスミド溶液は本法によるリアルタイム PCR が妥当に行われたかを確認するために用いる。

*5　リアルタイム PCR 増幅装置は、上記の温度条件が達成できる装置を使用すること。

*6　ABI 7900HT（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）と同様に、解析時に任意の Threshold Line を設定できる機種では 38 サイクル、その他の機種では 42 サイクルに設定する。

2.2.4.3.3. そばの検知を目的とした PCR 増幅のリアルタイム測定

2.2.4.3.2.に従って行う。ただし、5’プライマーと 3’プライマーの濃度はいずれも 25 μM である。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はそば検出用プライマー対及びプローブである。

*　そば検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

5’プライマー（Fago-453）：5’-CGCCAAGGACCACGAACAGAAG-3’

3’プライマー（Fago-261）：5’-CGTTGCCGAGAGTCGTTCTGTTT-3’

プローブ（Fago-probe）：5’-FAM-CGGGACGCGCTTC-MGB-3’

2.2.4.3.4. 小麦の検知を目的とした PCR 増幅のリアルタイム測定

2.2.4.3.2.に従って行う。5’プライマーと 3’プライマーの濃度はいずれも 50 μM である。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*は小麦検出用プライマー対及びプローブである。

*　小麦検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

5’プライマー（Tri-F）：5’-CATGGTGGGCGTCCTC-3’

3’プライマー（Tri-R）：

Tri-R1：5’-AAAGGCCATAATGCCAGCTG-3’

Tri-R2：5’-TGAGGCCGTCATGCCGGCTG-3’

Tri-R3：5’-TGAGGCCATAATGTCGGCTG -3’

Tri-R1、Tri-R2、Tri-R3 を 2:1:1 の比率で混合して使用する。

プローブ（Tri-probe）：5’-FAM-CGGATGCACTGCITTGATAAAG-MGB-3’

プローブ配列中の I はイノシンである。

2.2.4.3.5. くるみの検知を目的とした PCR 増幅のリアルタイム測定

2.2.4.3.5.1. くるみ-H 法

2.2.4.3.2.に従って行う。ただし、5’プライマーと 3’プライマーの濃度はいずれも 25 μM である。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はくるみ検出用プライマー対及びプローブである。

*　H 法のくるみ検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

5’プライマー（JI2F4）：5’-CCACGACAATCGGTGGTTGAG-3’

3’プライマー（JI2R2）：5’-GTCGAGGAGCACCTTCACA-3’

プローブ（JI2P）：5’-FAM-ACACACGACGGGTCACGAGG-MGB-3’

2.2.4.3.5.2. くるみ-N 法

リアルタイム 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、リアルタイム PCR 試薬*1 10 μL、5’及び 3’プライマー*2（いずれも 10 μM） それぞれ 0.8 μL、プローブ*2（10 μM） 0.4 μL、及び水 5.5 μL を含むマスターミックス（下記表参照）に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*3 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL にする。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。次に、その反応試料管をリアルタイム PCR 増幅装置*4 にセットする。反応条件は次のとおりである。95℃に 15 分間保ち反応を開始させた後、94℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとして、35 サイクルのリアルタイム PCR 増幅を行う。Reporter、Quencher の入力が必要な装置の場合は、Reporter は FAM に、Quencher は NFQ-MGB（又は None）に設定する。

マスターミックス組成（くるみ-N 法）

試薬	1 反応液当たり必要量（μL）
リアルタイム PCR 試薬*1	10
5’プライマー（10 μM）*2	0.8
3’プライマー（10 μM）*2	0.8
プローブ（10 μM）*2	0.4
水	5.5
合計	17.5

*1 リアルタイム PCR 試薬は、QuantiTect Probe PCR Master Mix（キアゲン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2 N 法のくるみ検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。
5’プライマー（JUGr-F）：5’-AAACGGTTGGGAGGGCACGT-3’
3’プライマー（JUGr-R）：5’-CGCCCGTGGTTACTCCTTGTTTA-3’
プローブ（JUGr-P）：5’-FAM-TTGGTCAATCTTCTCGTTCC-MGB-3’

*3 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。

*4 リアルタイム PCR 増幅装置は、上記の温度条件が達成できる装置を使用すること。

2.2.4.3.6. カシューナッツの検知を目的とした PCR 増幅のリアルタイム測定

2.2.4.3.6.1. カシューナッツ-H 法

2.2.4.3.2.に従って行う。ただし、5’プライマーと 3’プライマーの濃度はいずれも 25 μM である。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブである。

＊ H 法のカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

5’プライマー（AoI1F7）：5’- CTCCCGTCGCCCCGTG-3’
3’プライマー（AoI1R4）：5’- CTGACAATGAAAGGAGGCAACGCT-3’
プローブ（AoI1P）：5’-FAM- CGGTGCGCGTGCGGGA-MGB-3’

2.2.4.3.6.2. カシューナッツ-N 法

2.2.4.3.5.2.に従って行う。ただし、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブである。

＊ N 法のカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

5’プライマー（ANAr-F）：5’- GAGTCGCGCCAAGGAATCTTAC-3’
3’プライマー（ANAr-R）：5’- CGTTGCCGAGAGTCGTCACT-3’
プローブ（ANAr-P）：5’-FAM- CCGTGCTCGGTGCG-MGB-3’

2.2.4.4. 結果の解析

2.2.4.4.1. リアルタイム PCR 測定結果の解析

リアルタイム PCR 装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれの DNA 試料液についてリアルタイム PCR 増幅の有無を判断する。Threshold Line を用いる機種（ABI 7500 等）の場合は、Analysis Settings で Threshold Line、及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、全ての Cq 値を算出する。その他の機種（Roche LightCycler 96 等）の場合は、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対して Cq 値を算出する。

なお、高感度 ROX 装置等の使用により ROX のレベルが高い場合は、ノーマライザーとしての ROX チャネルの補正を解除し、Cq 値を算出する。

植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR の結果を 2.2.3.5 に記載のある判定例に照らして判ずるに当たり、まず、ブランク反応液で Cq 値が規定値* より大きいことを確認した後、DNA 試料液の測定結果を確認する。Cq 値が規定値以下の試料液は、標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断する。

＊ 規定値

植物 DNA を検出する場合：　36、あるいは、陽性コントロール溶液の解析結果（平均値）と比べ、いずれかのより小さい値を選択する。

動物 DNA を検出する場合：　38、あるいは、陽性コントロール溶液の解析結果

（平均値）と比べ、いずれかのより小さい値を選択する。

2.2.4.4.2. 落花生の検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析

リアルタイム PCR 装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれの DNA 試料液についてリアルタイム PCR 増幅の有無を判断する。解析時に任意の Threshold Line を設定できる機種（ABI 7900HT 等）の場合、高濃度プラスミド溶液をリアルタイム PCR 増幅した反応試料管のみで、Analysis Settings で Threshold Line 及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、Cq 値（Ct 値）を算出する。得られた Threshold Line の値を、小数点以下７桁目を四捨五入した下６桁まで記録する。次に、リアルタイム PCR 増幅した全ての反応試料管に対し、記録した Threshold Line の値を用いて Cq 値を算出する。上記の解析を実施できない場合、又はその他の機種の場合、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対して Cq 値を算出する。DNA 試料液において、算出された Cq 値が、２点並行で測定した基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかった場合、標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断する。なお、２点並行で測定した基準プラスミド溶液の平均 Cq 値から２点並行で測定した高濃度プラスミド溶液の平均 Cq 値を差し引いた値が 4.6～6.6 から外れた場合、本法によるリアルタイム PCR 増幅は妥当に行われなかったと判断し、リアルタイム PCR 増幅をやり直す。また、ブランク反応液で標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、実験環境からのコンタミネーションがあったと判断し、リアルタイム PCR 増幅をやり直す。

2.2.4.4.3. そばの検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析

2.2.4.4.2.に従って行う。

2.2.4.4.4. 小麦の検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析

2.2.4.4.2.に従って行う。

2.2.4.4.5. くるみの検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析

2.2.4.4.5.1. くるみ-H 法

2.2.4.4.2.に従って行う。

2.2.4.4.5.2. くるみ-N 法

リアルタイム PCR 装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれの DNA 試料液についてリアルタイム PCR 増幅の有無を判断する。Threshold Line を用いる機種 （ABI 7500 等）の場合は、Analysis Settings で Threshold Line 及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、全ての Cq 値を算

出する。その他の機種（Roche LightCycler 96 等）の場合は、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対して Cq 値を算出する。ブランク反応液で Cq 値が得られていないことを確認した後、DNA 試料液の測定結果を確認する。Cq 値が得られている試料液は、標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断する。

2.2.4.4.6. カシューナッツの検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析

2.2.4.4.6.1. カシューナッツ-H 法

2.2.4.4.2.に従って行う。

2.2.4.4.6.2. カシューナッツ-N 法

2.2.4.4.5.2.に従って行う。

2.2.4.5. 結果の判定

2.2.4.5.1. 落花生を対象としたリアルタイム PCR 検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR で、Cq 値が規定値以下であり指数関数的に DNA が増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出されており、落花生の検知を目的としたリアルタイム PCR 法において標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体は落花生陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 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。

2.2.4.5.2. そばを対象としたリアルタイム PCR 検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR で、Cq 値が規定値以下であり指数関数的に DNA が増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出されており、そばの検知を目的としたリアルタイム PCR 法において標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、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、判定例及び注意事項は 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。

2.2.4.5.3. 小麦を対象としたリアルタイム PCR 検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR で、Cq 値が規定値以下であり指数関数的に DNA が増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出されており、小麦の検知

を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、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、判定例及び注意事項は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。

2.2.4.5.4. くるみを対象としたリアルタイムPCR検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたリアルタイムPCRで、Cq値が規定値以下であり指数関数的にDNAが増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅反応液の電気泳動で124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出されており、くるみの検知を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はくるみ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は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。

2.2.4.5.5. カシューナッツを対象としたリアルタイムPCR検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたリアルタイムPCRで、Cq値が規定値以下であり指数関数的にDNAが増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅反応液の電気泳動で124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出されており、カシューナッツの検知を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は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。

2.2.5. PCR-核酸クロマト法

食品からのPCR法のDNA抽出精製法（2.2.3.2.）に従ってDNA抽出を行い、得られたDNA試料液を用いて以下に示すPCR-核酸クロマトを行う。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。

2.2.5.1. 試料調製法

PCR法の試料調製法（2.2.3.1.）に従う。

2.2.5.2. DNA抽出精製法

PCR法のDNA抽出精製法（2.2.3.2.）に従う。

2.2.5.3. 定性PCR-核酸クロマト法

PCR-核酸クロマト法は、タグのついたプライマーを用いてPCR増幅を行い、その

増幅産物を専用のストリップに展開させて（核酸クロマトグラフィー）、標的 DNA の有無をバンドの有無により目視で判定する方法である。留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.）と同様である。

2.2.5.3.1. 核酸クロマトグラフィーのための PCR 増幅

PCR-核酸クロマト法により検知が可能な特定原材料はくるみ及びカシューナッツの２種である。その各につき PCR 増幅の条件が異なる。2.2.5.3.2.から 2.2.5.3.3 に記載する方法のうち、検査対象とする特定原材料種に即した方法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 の各々を規定濃度に調製した後、核酸クロマトにおける PCR 増幅の鋳型 DNA として供する。まず、2.2.3.3.1.に従って植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR を行い、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、判定に準じて PCR-核酸クロマトを各特定原材料検出用プライマー対を用いて行う。

＊　2.2.4.3.1.に従って実施した植物 DNA 又は動物 DNA 検出リアルタイム PCR の結果に置き換え判断することもできる。

2.2.5.3.2. 核酸クロマトグラフィーによるくるみ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、PCR 試薬*1 10 μL、5’及び 3’プライマー*2（いずれも 10 μM） それぞれ 0.6 μL、及び水 6.3 μL に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*3 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL とする。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置*4 にセットする。反応条件は次のとおりである。95℃に５分間保ち反応を開始させた後、94℃ 30 秒、67℃ 30 秒、72℃ 30 秒を１サイクルとして、35 サイクルの PCR 増幅を行う。その後４℃で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

*1　PCR 試薬は、HotStarTaq Plus Master Mix（キアゲン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2　くるみ検出用プライマー対は以下のとおりである。なお、本検査は、くるみ検出用プライマー対（TBA 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

5’-primer（JUGc-F）：5’-[F-1]-AAACGGTTGGGAGGGCACGT-3’

3’-primer（JUGc-R）：5’-Biotin-CGCCCGTGGTTACTCCTTGTTTA-3’

*3　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。

*4　PCR 増幅装置は上記の温度条件が達成できる装置を使用すること。

2.2.5.3.3. 核酸クロマトグラフィーによるカシューナッツ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、PCR 試薬*1 5 μL、5’及び 3’プライマー*2（いずれも 10 μM） それぞれ 0.6 μL、及び水 11.3 μL に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*3 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL とする。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置*4 にセットする。反応条件は次のとおりである。95 ℃に２分間保ち反応を開始させた後、95℃ ５秒、67℃ 15 秒、72℃ 10 秒を１サイクルとして、35 サイクルの PCR 増幅を行う。その後４℃で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

*1　PCR 試薬は、AllTaq Master Mix（キアゲン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2　カシューナッツ検出用プライマー対は以下のとおりである。なお、本検査は、カシューナッツ検出用プライマー対（TBA 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

5’プライマー（STH_CS-F1）：5’-[F-1]- GAGTCGCGCCAAGGAATCTTAC -3’

3’プライマー（STH_CS-R1）：5’-Biotin- CGTTGCCGAGAGTCGTCACT -3’

*3　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。

*4　PCR 増幅装置は上記の温度条件が達成できる装置を使用すること。

2.2.5.4. 核酸クロマトグラフィー

2.2.5.4.1. くるみの検知を目的とした核酸クロマトグラフィー

1.5 mL チューブに、展開液(改)塩濃度 0 mM*1 10 μL、アビジンコート着色ラテックス液*1 1 μL、及び PCR 増幅反応液 10 μL を加え、よく混和する。テストストリップ（C-PAS（F4））*1 の吸収パッドを持ち、混和した溶液に挿入した後、室温で静置して展開させる*2。10～15 分後、着色ラインの有無を目視で確認する。テストストリップ最上段のポジションマーカーの上部にある橙色のラインが消えていれば、溶液が適切に展開されたと判断する。最下段のポジションマーカーの下部に青色の着色ラインが認められた試料液は標的とする配列が PCR 増幅されたと判断する。

*1　本検査は、試薬類及びテストストリップ（TBA 社製）又は同等の結果を得られるものを用いる。

*2　湿度 40%以上の環境で使用する。それよりも湿度が低い場合、非特異的な着色ラインが検出されやすくなるため注意する。

2.2.5.4.2. カシューナッツの検知を目的とした核酸クロマトグラフィー

2.2.5.4.1.に従って行う。

2.2.5.5. 結果の判定

2.2.5.5.1. くるみを対象としたPCR-核酸クロマト検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出* され、くるみの検知を目的とした PCR-核酸クロマト法において標的とする配列が PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はくるみ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、考え方及び判定例は 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。

＊ 2.2.4.4.1.と同じく、植物 DNA 又は動物 DNA 検出リアルタイム PCR の結果に置き換え判断することもできる。

2.2.5.5.2. カシューナッツを対象としたPCR-核酸クロマト検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出* され、カシューナッツの検知を目的とした PCR-核酸クロマト法において標的とする配列が PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、考え方及び判定例は 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。

＊ 2.2.4.4.1 と同じく、植物 DNA 又は動物 DNA 検出リアルタイム PCR の結果に置き換え判断することもできる。

2.2.6. LC-MS/MS 法

LC-MS/MS 法においては、食品から酵素消化したペプチドを調製し、得られたペプチド試料液を用いて分析する。なお、タンパク質抽出は調製１試料につき２点並行で行い、それ以降、標的ペプチド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。

2.2.6.1. 試料調製法

1.1.及び 1.2.に従って、試料を調製する。

2.2.6.2. 酵素消化ペプチド精製法

試料から酵素消化ペプチドを得るためには、まず均質化した試料からタンパク質を抽出し、酵素処理により消化を行う。次いで、得られたペプチド混合物を精製し、濃縮乾固して回収する。通常、酵素消化ペプチドは、夾雑物を除去したタンパク質抽出液にジチオスレイトール（DTT）及びヨードアセトアミド（IAA）を加えて還元・アルキル化処理した後、トリプシンまたはキモトリプシンなどのプロテアーゼにより限定分解し、固相抽出カラムなどを用いて精製することが一般的である。検査対象物となる酵素消化ペプチドは、配列により異なる特徴を有するため、各検査に適した方法にて精製を行う。本項では、pNH 法（陽イオン交換タイプ）、pNS 法（C18/陰イオン交換タイプ）、pHF 法（陽イオン/陰イオン交換タイプ）を用いた精製法を

記す。

なおタンパク質の抽出精製の際に用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製したRO水又は蒸留水をMilli-Q等で17 MΩ/cmまで精製した超純水とする。

2.2.6.2.1. pNH法（陽イオン交換タイプ）

調製試料２gをポリプロピレン製遠沈管(15 mL容) *1 に量り採り、同遠沈管に抽出用緩衝液（４M 尿素、１M チオ尿素、0.1M ジチオスレイトール含有0.2 M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.5））10 mLを加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合する。次いで、37℃に設定した恒温振とう水槽に遠沈管を振とう方向に対し水平に並べて１時間振とうする。その後、2,000 × gの条件で10分間遠心する。遠心した上清１mLを４mLの希釈用溶媒（50 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液）及び200 μLの500 mM ヨードアセトアミド溶液を予め分注した別の遠沈管(15 mL容)*1 に速やかに移し、ボルテックスミキサーで混合する。混和後、37℃に設定した恒温振とう水槽に遠沈管を垂直に立てて30分間振とうする。その後、遠沈管に１％トリプシン溶液*2 を200 μL加えてボルテックスミキサーで混合し、37℃に設定した恒温振とう水槽に遠沈管を振とう方向に対し水平並べて３時間振とうする。酵素消化処理後、遠沈管にギ酸を55 μL加え、ボルテックスミキサーで混合し、2,000 × gの条件で10分間遠心する。

遠心分離して得た上清を、陽イオン交換タイプの固相抽出カラム*3 に全量負荷する。次いで、溶出液を固相抽出カラムに通液し、10 μL程のプロピレングリコールを滴下したナシ型フラスコに全量回収する。フラスコ内の溶媒を留去*4 した後、0.5 mLの５％アセトニトリル0.1％ギ酸水溶液を加えて撹拌・混合し、ペプチドを再溶解する。溶解液はマイクロ遠沈管（0.5 mL容）*5 に移し、10,000 × gの条件で５分間遠心*6 する。遠心後、HPLC用バイアル*7 に分注したものをNH法のペプチド試料液とする。

*1　試料液の調製、採取は2.2.6.1.に記載の方法に従う。ポリプロピレン製遠沈管は、Protein Lo Bind Tubes 15 mL（Eppendorf社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2　トリプシンはウシ膵臓由来トリプシン（製品番号T1426、シグマアルドリッチ社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*3　陽イオン交換タイプ固相抽出カラムは、Oasis MCX 6 cc Vac Cartridge, 150 mg Sorbent per Cartridge, 60 μm（Waters社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、Oasis MCXを使用する場合、カラムは５mLの１％アンモニア含有メタノール、５mLのメタノール、そして５mLの超純水の順で通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷(自然落下)した後、カラムを５mLの１％ギ酸水溶液及び５mLの80％アセトニトリル１％ギ酸水溶液で順次洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、５mLの75％アセトニトリル５％トリフルオロ酢酸水溶液の通液（自然落下）を２回繰り返して溶出する。この際、溶出液は最後にシリン

ジを用いて全て押し出し回収する。

*4　ロータリーエバポレーターを用いて50℃に加温することを推奨する。この際、溶液が突沸しないよう注意する。

*5　マイクロ遠沈管はプロテオセーブSSマイクロチューブ0.5 mL（住友ベークライト社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*6　遠心ろ過フィルターに通すことで分析機器への負担を軽減できる場合がある。フィルターはTORAST-H Filter Device、0.2 μm、親水化PTFE（島津ジーエルシー社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*7　HPLC用バイアルはTORAST-H PP Vial（島津ジーエルシー社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.6.2.2. pNS法（C18/陰イオン交換タイプ）

調製試料１gをポリプロピレン製遠沈管(50 mL容）に量り採り*1 、同遠沈管に抽出用緩衝液*2 19 mLを加え、沸騰水浴中で10分間加熱する。この間、ボルテックスミキサーで計３回（加熱処理前、加熱処理中、加熱処理終了後）試料を攪拌する。次いで、低温下（４℃）、10,000 × gの条件で20分間遠心する。遠心分離して得た上清を２本のマイクロ遠沈管（２mL容）*3 に0.7 mLずつ移し、それぞれ70 μLの１M 炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液（pH 7.3-7.8）を加える。次いで、28 μLの１M ジチオトレイトールを加え、速やかにボルテックスミキサーで混合し、75℃に設定した恒温槽で15分間加温する。加温処理後、室温下に15分間静置し、用時調製した28 μLの１M ヨードアセトアミドを加え、速やかにボルテックスミキサーで混合する。室温下暗所で45分間静置した後、0.1%ギ酸水溶液で20 mg/mLに調製した10 μLのトリプシン*4 を加え、ボルテックスで混合し、37℃で１時間以上加温する。酵素消化処理後、10 μLのギ酸水溶液及び892 μLの酢酸エチルを加え、ボルテックスミキサーで混合する。次いで、低温下（４℃）、10,000 × gの条件で５分間遠心し、分離した上層をマイクロピペットで除いた後、水層（下層）のうち0.7 mLを新しいマイクロ遠沈管（1.5 mL容）*3 に移す。分取した水層に20 μLの10 mg/mLアミログルコシダーゼを加え、２本のチューブのうち片方にのみ、100 μLの内標準液*5 を加える。得られた溶液を濃縮装置*6 を用いて37℃で１時間濃縮する。濃縮した溶液に500 μLの0.1%ギ酸水溶液を加え、低温下（４℃）、10,000 × gの条件で３分間遠心する。

遠心分離して得た上清を、C18タイプの固相抽出カラム*7 に全量負荷する。次いで、溶出液を固相抽出カラムに通液し、マイクロ遠沈管（1.5 mL容）に全量を回収する。

得られた溶出液を陰イオン交換タイプのレジン*8 を量り採ったマイクロ遠沈管(1.5 mL容)*3 に加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合し、低温下(４℃)、10,000 × gの条件で３分間遠心する。遠心分離して得た上清を新しいマイクロ遠沈管に移す。次いで、沈殿したレジンに200 μLの60%アセトニトリル0.1%ギ酸水溶液を加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合する。懸濁後、低温下(４℃)、10,000 × gの条件で３分間遠心し、先に回収した同じ容器に上清を移す。混合

した上清は、濃縮装置を用いて40℃の加温下で溶媒を留去し、試料を完全乾固する。溶媒が残っていないことを確認した後、100 μLの５％アセトニトリル0.1%ギ酸水溶液を加え、ピペッティングによりペプチドを溶解させ、フィルター*9 でろ過したものを、NS法のペプチド試料液とする。

*1　試料液の調製、採取は2.2.6.1.に記載の方法に従う。

*2　抽出用緩衝液は、 APEX Reagents （ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*3　マイクロ遠沈管は、タンパク質低吸着チューブ（ワトソン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*4　トリプシンは、Worthington 社製(Cat. No. TRTPCK)又は同等の結果が得らえるものを用いる。

*5　内標準液は、2 種類の標的ペプチドの末端アルギニン残基を安定同位体標識したペプチド混合液であり、ペプチド①を 10 ppb、ペプチド②を 20 ppb 含有する。なお、内標準液を添加しない反応液には加えないように注意する。

*6　濃縮装置は、遠心エバポレーター又は同等の結果が得られるものを用いる。

*7　C18 タイプ固相抽出カラムは、MonoSpinC18 L 型（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、MonoSpinC18 L 型を使用する場合、カラムは１ mL のアセトニトリル及び１mL の 0.1%ギ酸水溶液を順次通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷（自然落下）した後、カラムを１mL の１％アセトニトリル 0.1%ギ酸水溶液で洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、0.4 mL の 30%アセトニトリル 0.1%ギ酸水溶液を通液して溶出する。なお、カラムに溶液を通液する際は、室温下、600 × g の条件で１分間遠心する。

*8　陰イオン交換タイプのレジンは、InertSep SAX（粒子径 45 μm）（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSep SAX を使用する場合、チューブ当たり 20 mg のレジンを用いる。

*9　フィルターはコスモスピンフィルターG 0.2 μm（ナカライテスク社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.6.2.3. pHF法（陽イオン/陰イオン交換タイプ）

調製試料１gをポリプロピレン製遠沈管(50 mL容）に量り採り*1 、同遠沈管に抽出用緩衝液*2 19 mLを加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合する。次いで振とう機に遠沈管を横向きに並べ、室温条件下で一晩振とうする。その後、室温下、3,000 × gの条件で20分間遠心し、上清をろ紙でろ過したものを試料抽出液とする。

１ mLの試料抽出液及び外標準溶液*3 に、50 μLのPVP水溶液、200 μLのHP-βCD水溶液、10 μLの安定同位体標識ペプチド（内標準）水溶液、及び50 μLのキモトリプシン水溶液*4 を加え、ボルテックスミキサーで混合し、37℃で1.5時間加温する。酵素消化処理後、20 μLのギ酸を加えてボルテックスミキサーで混合し、室温下、13,000 × g以上の条件で10分間遠心する。

遠心分離して得た上清を、陽イオン交換タイプの固相抽出カラム*5 に全量負荷する。次いで、溶出液を陽イオン交換固相抽出カラムに通液し、全量を回収する。得られた溶出液に等量の水を加えて混合し、陰イオン交換タイプの固相抽出カラム*6 に全量負荷する。その後、溶出液を陰イオン交換固相抽出カラムに通液して全量を回収し、濃縮装置*7 を用いて溶媒を留去する。試料が完全乾固したことを確認した後、200 μLの５％アセトニトリル0.1％ギ酸を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、マイクロ遠沈管（2 mL容）に移す。次いで、室温下、13,000 × g以上の条件で５分間遠心し、0.2 μm PTFEシリンジフィルターでろ過してHPLC用バイアル*8 に分取したものを、HF法のペプチド試料液とする。

*1　試料液の調製、採取は 2.2.6.1.に記載の方法に従う。

*2　抽出用緩衝液は、定量検査法（ELISA 法）の抽出用緩衝液である特定原材料抽出液 ExSta™ 液（森永生科学研究所製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*3　外標準溶液は、別添３の「標準品規格」に従って調製した標準液を抽出用緩衝液で希釈したものであり、特定原材料由来のタンパク質含有量が調製試料１ g 当たり 10 μg/g (ppm)相当含む。

*4　キモトリプシンは、ウシ膵臓由来α-キモトリプシン（MP バイオケミカル社製）又は同等の結果が得られるものを用いる

*5　陽イオン交換タイプ固相抽出カラムは、InertSep MCX 60 mg/3 mL カラム（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSep MCX を使用する場合、カラムは１ mL のメタノール及び１ mL の１％ギ酸を順次通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷した後、カラムを１ mL の１％ギ酸及び１ mL のメタノールで順次洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、0.5 mL の 80%メタノール 1%アンモニア及び 0.5 mL の 50%メタノール１％アンモニアを順次通液して同じ容器に回収する。カラムに溶液を通液する際は、室温下、200 × g の条件で１分間遠心してもよい。

*6　陰イオン交換タイプ固相抽出カラムは、InertSep MAX 60 mg/3 mL カラム（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSep MAX を使用する場合、カラムは１ mL のメタノール及び１ mL の水を順次通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷した後、カラムを１ mL の水及び１ mL のメタノールで順次洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、0.5 mL の 99%メタノール１％ギ酸及び0.5 mL の20%メタノール１％ギ酸を順次通液して同じ容器に回収する。カラムに溶液を通液する際は、室温下、200 × g の条件で１分間遠心してもよい。

*7　濃縮装置は、遠心エバポレーター又は同等の結果が得られるものを用い、加温する際には溶液が突沸しないよう注意すること。

*8　HPLC 用バイアルは材質が TPX 樹脂であるもの又は同等の結果が得られる

ものを用いる。

2.2.6.3. 酵素消化ペプチドの精製度の確認

ペプチド試料液について、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. 280値１を１ mg/mL相当のタンパク質としてペプチド濃度を算出する。BCA法による比色分析やアミノ酸分析等によりペプチド濃度を算出してもよい。試料液中のペプチド濃度が、2.2.6.4.2.1.から2.2.6.4.2.3.までに記載する上限濃度を超える場合、原則として、使用する機器の性能に照らして注入量の削減や希釈等を検討し、LC-MS/MS測定を行う。なお、ブランク溶液と比較して試料液中に相当量のペプチドが確認されない場合には、当該検査対象検体からのペプチド精製が困難である可能性を考慮し、定性LC-MS/MS法による検知の可否を含め、結果を総合的に判断する。

＊ ペプチド結合に起因する吸収波長であるO.D. 230と、芳香族アミノ酸の吸収波長であるO.D. 280の比を計算する。また核酸の特徴的な吸収であるO.D. 260とO.D. 280の比を計算する。O.D. 280/ O.D. 230比あるいはO.D. 260/ O.D. 280比がそれぞれ(0.2－0.6)あるいは(0.5－0.9)の範囲にあることが望ましい。本条件を満たすペプチド試料液の品質が確認されない場合には、夾雑成分の影響等により測定感度の低下を生じることがある。

2.2.6.4. 定性LC-MS/MS法

定性LC-MS/MS法においては、液体クロマトグラフィー（LC）を用いてペプチド試料液に含まれる成分を分離し、タンデム質量分析計(MS/MS)により特定のプリカーサーイオンを断片化させ生じるプロダクトイオンを検出する。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、標的ペプチドに特有のプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせを確認することによって、検査対象検体中における特定原材料の有無を判定する。

2.2.6.4.1. LC-MS/MS測定

定性 LC-MS/MS 法により検知が可能な特定原材料は、カシューナッツの１種である。本法では、カシューナッツに含まれるタンパク質に由来する特異的なペプチド配列を標的とし、2.2.6.4.2.に記載する方法を用いて検査を行う。検査は、１調製試料につき２点並行で抽出を行い、酵素消化後に精製したペプチド試料液を検液として用いる。これを各精製法に応じた規定手順に従ってLCに注入* し、MS/MS により測定を行う。

＊ 注入量を過度に増加させると、非揮発性成分などが試料中に残存した場合、イオン源の汚染やカラムの劣化を招き、感度の低下及びにピーク形状の悪化、並びに保持時間の変動を生じ得る。したがって、実際の実験操作及び日頃の実験環境の保全に当たり、事前に注入量を抑えた条件で感度等を確認し、使用する機器の性能に応じて段階的に注入量の増量を検討することが望ましい。

2.2.6.4.2. カシューナッツの検知を目的としたLC-MS/MS測定

2.2.6.4.2.1. カシューナッツ-NH法（内標準非添加・シグナルノイズ比判定）

分析対象は、2.2.6.2.1.に記載の pNH法で調製したペプチド試料液*1とする。

脱気した移動相A（0.2%酢酸水溶液）及びB（0.2%酢酸含有アセトニトリル溶液）をLCシステムのチューブに接続し、フローラインのエアパージを行った後、システムの平衡化を行う。次いで、標的ペプチド①、②の標準品をそれぞれLC-MS/MSシステムに注入し、MS分析条件の最適化を行う。分析条件の設定では、まずイオン化方式としてエレクトロスプレーイオン化法（ESI）の正イオンモードを選択する。次に、イオン化されるペプチドのうちMSで選別する特定の質量電荷比（m/z）を持ったプリカーサーイオンと、MSMS で分析するコリジョンセルで断片化されるプロダクトイオンを選択し、それぞれのイオンペアを測定するための多重反応モニタリング（MRM）における信号強度が最大になるようにパラメータ*2 の最適化を図る。最適化後、LCシステムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラム*3 を接続し、カラムオーブンを適正温度に設定の上、0.4 mL/minの流速にてカラムの平衡化を行う。次いで、標的ペプチド①、②の混合液をLCシステムに注入し標的ペプチドのカラム保持時間*4 を確定する。分析対象の確認後、最適化した分析条件に従って試料を測定する。まず、標的ペプチド①、②の混合液（10 ng/mL）を注入し、測定を３回繰り返し行い、保持時間に問題がないか確認する。標的ペプチド①②混合液の測定後、ブランク溶液の測定を３回繰り返し、pNH 法により調製した検液の測定を開始する。注入量*5 は使用する測定機器の感度に応じて設定する。なお、連続分析を実施する際は、10検体につき、１回のブランク溶液の測定を挟むこと。また、検液全ての測定終了後には再びブランク溶液を１回測定した後、標的ペプチド①、②の混合液を再測定し、保持時間及び分析機器の感度に変動が無いこと確認すること。

LCグラジエント条件*6

時間, 分	%B
0.00	5
3.00	5
15.00	40
16.00	95
20.00	95
20.01	5
25.00	5 (Stop run)

LC-MS/MSの接続部の配管径が0.1-0.18 mmの場合、流速は0.4 mL/分とする。また、オートサンプラーを使用する際の設定温度は10℃とする。

標的ペプチドの検出条件（MRMトランジション）

ペプチド	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)
標的ペプチド① ADIYTPEVGR	560.8	557.3
		658.4
		821.4
標的ペプチド② LTTLNSLNLPILK	720.4	298.2
		470.3
		1011.6

LC-MS/MS のデータ取得時間はペプチド標品の保持時間の前後１分程度とする*7。

*1　試料液のペプチド濃度が８　mg/mL を超える場合は、注入量の削減等を検討する。

*2　パラメータは、コリジョンエネルギー（CE）及びイオン化電圧、並びに使用する装置の特性に応じた項目とする。

*3　オクタデシルシリル化シリカゲルカラムは、Raptor Inert ARC-18 2.7 μm, 3.0 x 100 mm（Restek 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、Raptor Inert ARC-18 を用いる場合、カラムオーブンの設定温度は 50℃とする。

*4　Raptor Inert ARC-18 を用いる場合のカラム保持時間の目安を、標的ペプチド①は 7.7 分、標的ペプチド②は 11.7 分とするが、測定で使用する機器により前後する場合がある。

*5　注入量は標的ペプチドのカラム保持時間への影響や感度低下を考慮し 10 μL 以下に設定することが望ましい。

*6　使用する LC 機種によって、カラムの洗浄及び平衡化時間が不十分と考えられる場合は各時間を延長してもよい。基本的には、各溶媒の割合は変更しない。ただし、指定のグラジエント条件において標的ペプチドと夾雑成分の分離が不十分と判断される場合には、3-15min 5-40%B から 3-30min 5-30%B に変更することが望ましい。

*7　MS の汚染による感度低下を抑制するため、LC-MS のバルブ切り替え時間を設定し、MS 側に移動相を流す時間は標的ペプチド①の保持時間の 1.5 分程度前から、標的ペプチド②の保持時間の 1.5 分程度後までとすることが望ましい。

2.2.6.4.2.2. カシューナッツ-NS 法（２段階内標準相対比判定）

分析対象は、2.2.6.2.2.に記載の　pNS 法で調製したペプチド試料液*1 とする。

脱気した移動相 A（0.2%酢酸）及び B（0.2%酢酸-アセトニトリル）を LC システムのチューブに接続し、フローラインのエアパージを行った後、システムの

平衡化を行う。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の標準品をそれぞれ LC-MS/MS システムに注入し、MS 分析条件の最適化を行う。分析条件の設定では、まずイオン化方式としてエレクトロスプレーイオン化法（ESI）の正イオンモードを選択する。次に、MS で選別する特定の m/z を持つプリカーサーイオンと、MS/MS で分析するプロダクトイオンを選択し、MRM モードに関する信号強度が最大になるようにパラメータ*2 の最適化を図る。最適化後、LC システムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラム*3 を接続し、カラムオーブンを適正温度に設定の上、0.3 mL/分の流速にてカラムの平衡化を行う。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の混合液（①10 ppb、②20 ppb）を LC システムに注入し、移動相 B グラジエント条件下における標的ペプチドのカラム保持時間*4 を確定する。分析対象の確認後、最適化した分析条件に従って試料を測定する。まず、ブランク溶液を注入し、クロマトグラムのベースラインが安定しているかを確認する。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の混合液（①1 ppb、②2 ppb）を測定した後、pNS 法により調製した検液の測定を開始する。注入量*5 は、測定機器の感度に応じて設定し、まず内標準添加無しのペプチド検液を測定した後、内標準添加ありのペプチド検液を測定する。なお、連続分析を実施する際は、20 検体につき 1 回のブランク溶液の測定を挟むこと。また、検液全ての測定終了後、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の混合液（①1 ppb、②2 ppb）の検液を再測定し、保持時間及び分析機器の感度に変動が無いことを確認すること。

LC グラジエント条件

時間，分	%B
0	5
16	25
18	95
23	95
23.1	5
30	5 (Stop run)

LC-MS/MS の接続部の配管径が 0.1-0.18 mm の場合、流速は 0.3 mL/分とする。また、オートサンプラーを使用する際の設定温度は 18℃とする。

標的ペプチドの検出条件（MRM トランジション）

	標的ペプチド		安定同位体標識ペプチド（アルギニン）	
	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)
指標ペプチド① GQVQVVDNFGNR	666.8	920.5	671.8	930.5
		821.4		831.4
		722.3		732.3

	444.9	722.3	448.2	732.3
指標ペプチド②	510.2	657.8	513.6	662.8
DVFQQQQQHQSR		438.9		442.2

LC-MS/MS のデータ取得時間はペプチド標品の保持時間の前後 0.5 分以上とする。

*1　試料液のペプチド濃度が８　mg/mL を超える場合は、注入量の削減等を検討する。

*2　パラメータは、コリジョンエネルギー（CE）及びイオン化電圧、並びに使用する装置の特性に応じた項目とする。

*3　オクタデシルシリル化シリカゲルカラムは、カートリッジカラム 3 μm 2.1 x 10 mm をガードカラムとして連結した Triart C18 メタルフリー 3 μm、2.1 x 100 mm（YMC 製 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、Triart C18 メタルフリーを用いる場合、カラムオーブンの設定温度は 50℃とする。

*4　Triart C18 メタルフリーを用いる場合のカラム保持時間の目安を指標ペプチド①は 9.7 分、指標ペプチド②は 4.7 分とするが、測定で使用する機種により前後する場合がある。

*5　注入量は標的ペプチドのカラム保持時間への影響や感度低下を考慮し、２～10 μL 程度に設定することが望ましい。

2.2.6.4.2.3. カシューナッツ-HF 法（１段階内標準相対比判定）

分析対象は、2.2.6.2.3.に記載の　pHF 法で調製したペプチド試料液*1 とする。

脱気した移動相 A（0.1 %ギ酸）及び B（0.1 %ギ酸-アセトニトリル）を LC システムのチューブと接続し、フローラインのエアパージを行った後、システムの平衡化を行う。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の標準品をそれぞれ LC-MS/MS システムに注入し、MS 分析条件の最適化を行う。分析条件の設定では、まずイオン化方式としてエレクトロスプレーイオン化法（ESI）の正イオンモードを選択する。次に、MS で選別する特定の m/z を持つプリカーサーイオンと、MS/MS で分析するプロダクトイオンを選択し、MRM モードに関する信号強度が最大になるようにパラメータ*2　の最適化を図る。最適化後、LC システムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラム*3　を接続し、カラムオーブンを適正温度に設定の上、0.3 mL/分の流速にてカラムの平衡化を行う。次いで、ブランク溶液を LC システムに注入し、移動相 B のグラジエント条件下においてクロマトグラムのベースラインが安定しているかを確認する。その後、同条件で安定同位体標識したペプチド①、②の混合液を測定し、カラム保持時間*4 を確定する。分析対象の確認後、試料の測定を開始する。まず、外標準の検液の測定を行い、注入量*5 は使用する測定機器の感度に応じて設定する。次いで、ブランク溶液を測定し、キャリーオーバーが認められないことを確認した後、検液の測定を実施する。なお、検液全ての測定終了後、外標準の検液を

再度測定し、保持時間及び分析機器の感度に変動が無いことを確認すること。

LC グラジエント条件*6

時間，分	%B
0	5
20	25
20.1	95
25	95
25.1	5
30	5 (Stop run)

LC-MS/MS の接続部の配管径が 0.1-0.18 mm の場合、流速は 0.3 mL/分とする。

また、オートサンプラーを使用する際の設定温度は 10℃とする。

標的ペプチドの検出条件（MRM トランジション）*7

	標的ペプチド		安定同位体標識ペプチド	
	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)	プリカーサーイオン(m/z)	プロダクトイオン(m/z)
指標ペプチド① KGEEVEELY	548.2645	801.3625	552.2716	809.3767
		914.4478		922.4620
指標ペプチド② RGEEVEELY	562.2652	829.3679	567.2716	839.3762
		942.4527		952.4610

LC-MS/MS のデータ取得時間は指標ペプチドの保持時間の前後 2 分とする。*8

*1 試料液のペプチド濃度が 15 mg/mL を超える場合は、注入量の削減等を検討する。

*2 パラメータは、コリジョンエネルギー（CE）及びイオン化電圧、並びに使用する装置の特性に応じた項目とする。

*3 オクタデシルシリル化シリカゲルカラムは、InertSustain AX-C18 3 μm, 3.0 x 150 mm（ジーエルサイエンス 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSustain AX-C18 を用いる場合、カラムオーブンの設定温度は 50℃とする。

*4 InertSustain AX-C18 を用いる場合のカラム保持時間の目安を、指標ペプチド①は 9.2 分、指標ペプチド②は 9.5 分とするが、測定で使用する機種により前後する場合がある。

*5 注入量は標的ペプチドのカラム保持時間への影響や感度低下を考慮し、5～10 μL 程度に設定することが望ましい。なお、高感度の分析機器を使用する場合、外標準の感度に照らし注入量をさらに減じて 2 μL にしてもよい。

*6 基本的には、各溶媒の割合は変更しない。ただし、指定のグラジエント条

件において標的ペプチドと夾雑成分の分離が不十分と判断される場合には25%B に至るまでの所要時間を 20 分から 30 分に変更して分析することが望ましい。

*7　設定可能な m/z 値が小数点以下 1 桁までの装置は、下表の小数点以下 2 桁目を四捨五入した m/z 値を用いる。

*8　MS の汚染による感度低下を抑制するため、LC-MS/MS のバルブ切り替え時間を設定し、MS 側に移動相を流す時間はデータ取得時間に合わせて設定することが望ましい。

2.2.6.5. 結果の解析

LC-MS/MS 装置を用いて特定のカラム保持時間を示すペプチドのイオンシグナルを解析し、それぞれのペプチド試料液について特定原材料に由来するペプチドの有無を判断する。標的ペプチドの標準品と同じカラム保持時間において、特定のトランジッションが確認された試料液は、標的とするペプチドが検出されたと判断する。

2.2.6.5.1. カシューナッツを対象とした LC-MS/MS 測定結果の解析

2.2.6.5.1.1. カシューナッツ-NH 法（内標準非添加・シグナルノイズ比判定）

解析対象は、2.2.6.4.2.1.に記載のカシューナッツ-NH 法で測定された試料である。

まず、標的ペプチドの検出条件の表に従い、標的ペプチド①、②の混合液の測定結果から、各ペプチドのカラム保持時間と各 MRM トランジションのクロマトグラムを確認する*1。次いで、検体のクロマトグラムにおいて、各標的ペプチドの保持時間付近にピークが認められた場合、ノイズ範囲*2 を指定し、各ピークのシグナル対ノイズ（S/N）比を計算*3 する。

*1　各標的ペプチドのクロマトグラムは、それぞれ３種類の MRM トランジションのクロマトグラムを重ね合わせて確認することが望ましい。

*2　ノイズ範囲は、標的ペプチド①及び②のピーク前後の夾雑成分由来のピークが認められない 0.5 分間程度とする。

*3　S/N 比の算出方法が解析ソフトウェアで設定可能な場合、計算方法は二乗平均平方根（RMS）法とする。なお、四重極-飛行時間型質量分析計（Q-TOF-MS）や四重極-キングドントラップ型質量分析計（Orbitrap™）など高分解能型質量分析計で測定した場合、得られる測定ノイズがゼロのため S/N 比が算出できない場合がある。その場合、検出されたピークは S/N 比が 10 を満たすものとして考える。

2.2.6.5.1.2. カシューナッツ-NS 法（２段階内標準相対比判定）

解析対象は、2.2.6.4.2.2.に記載のカシューナッツ-NS 法で測定された試料である。

まず、標的ペプチドの検出条件の表に従い、内標準添加ありと内標準添加なしの結果を比較し、標的ペプチドのカラム保持時間を確定*1 する。次いで、

内標準添加ありの結果について、各トランジション*2 ごとに、標的ペプチドのシグナル面積から安定同位体標識ペプチドのシグナル面積*3 を除し、面積比を算出する。

*1 内標準添加ありの検液でしか認められないシグナルを安定同位体標識した標的ペプチド由来のピークとする。マトリックス効果等により、当該ピークが確認できなかった場合、または得られたシグナルが外標準以下の強度であった場合、不検出と判断する。なお、注入量が多い場合などでは、標的ペプチドのカラム保持時間が検体によって大きく変化する場合があるため、対象時間を広げて解析すること。

*2 各ペプチドのトランジションは、保持時間が全て±0.05min 以内で一致していることを確認する。

*3 安定同位体標識ペプチドのシグナル面積は、夾雑成分由来の妨害ピークによる影響を除外するため、内標準添加なしの解析データから求める夾雑成分由来シグナル面積を減じて算出する。なお、大きな妨害ピークが存在する場合、クロマトグラムの縦軸の強度に注意し、適宜拡大して確認すること。

2.2.6.5.1.3. カシューナッツ-HF 法（１段階内標準相対比判定）

解析対象は、2.2.6.4.2.3.に記載のカシューナッツ-HF 法で測定された試料である。

標的ペプチドの検出条件の表に従い、試料の測定結果から、各指標ペプチドのカラム保持時間におけるトランジションごとに、標的ペプチドのシグナル面積から安定同位体標識ペプチドのシグナル面積*1 を除し、面積比*2 を算出する。

*1 安定同位体標識した標的ペプチドのカラム保持時間±0.1 分以内に検出されたシグナルを標的ペプチド由来のトランジションと判断する。測定した外標準のいずれかのトランジションにおいてシグナルが確認できない場合は、酵素消化ペプチドの精製または使用する装置における MS 分析条件の最適化等をやり直す。

*2 標的ペプチド由来のトランジションにおいて、シグナルが確認できない場合は非検出とする。

2.2.6.6. 結果の判定

2.2.6.6.1. カシューナッツを対象とした LC-MS/MS 検査結果の判定

2.2.6.6.1.1. カシューナッツ-NH 法（内標準非添加・シグナルノイズ比判定）

判定対象は、2.2.6.5.1.1. カシューナッツ-NH 法で解析された検査結果である。

１調製試料より２点並行で抽出し、ペプチド試料液を調製した後、LC-MS/MS 法を実施する。その結果、各標的ペプチドにおいて、全ての MRM トランジションが S/N 比 10 以上を満たすピークとして検出された場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。

2.2.6.6.1.2. カシューナッツ-NS 法（２段階内標準相対比判定）

判定対象は、2.2.6.5.1.2. カシューナッツ-NS 法で解析された検査結果である。

１調製試料より２点並行で抽出し、ペプチド試料液を調製した後、LC-MS/MS 法を実施する。その結果、検出された各標的ペプチドの全てトランジションにおいて、試料中の標的ペプチドのシグナル面積値が安定同位体標識したペプチドのシグナル面積値の 10 分の１以上である場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。なお、安定同位体標識ペプチドのシグナルが検出できなかったトランジションは不検出として判定の対象外* とし、各指標ペプチドにつき１つのトランジションが検出されていれば判定の対象とすることができる。

＊　安定同位体標識した指標ペプチド由来のトランジションシグナルがいずれも非検出であった場合、当該検査対象の NS 法による定性分析は不可能であり、検知不能と判断する。

2.2.6.6.1.3. カシューナッツ-HF 法（１段階内標準相対比判定）

判定対象は、2.2.6.5.1.3. カシューナッツ-HF 法で解析された検査結果である。

１調製試料より２点並行で抽出し、ペプチド試料液を調製した後、LC-MS/MS 法を実施する。その結果、各標的ペプチドの全てのトランジションについて、試料で算出されたシグナル面積比が外標準で算出されたシグナル面積比の 10 分の１以上である場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。なお、安定同位体標識ペプチドのシグナルが検出できなかったトランジション* は不検出として判定の対象外とし、各安定同位体標識ペプチドにつき１つのトランジションが検出されていれば判定の対象とすることができる。

＊　安定同位体標識ペプチドのシグナル強度が外標準の安定同位体標識ペプチドのシグナル強度に比べ 1/4 以下となり、対応する標的ペプチド由来のトランジションを検出できなかった場合、当該検査対象の HF 法による定性分析は不可能であり、検知不能と判断する。

2.3. 「2.1. 定量検査法」に改良を加えた定量検査法

「2.1. 定量検査法」で示した検査方法（以下「従来法」という。）に改良を加えた定量検査法（改良検査法）については、（別添５）「アレルゲンを含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン」により性能を評価し、従来法と同等以上の性能を有することを示した場合には、従来法と同様にアレルゲンを含む食品の検査方法として使用することが認められるものとする。

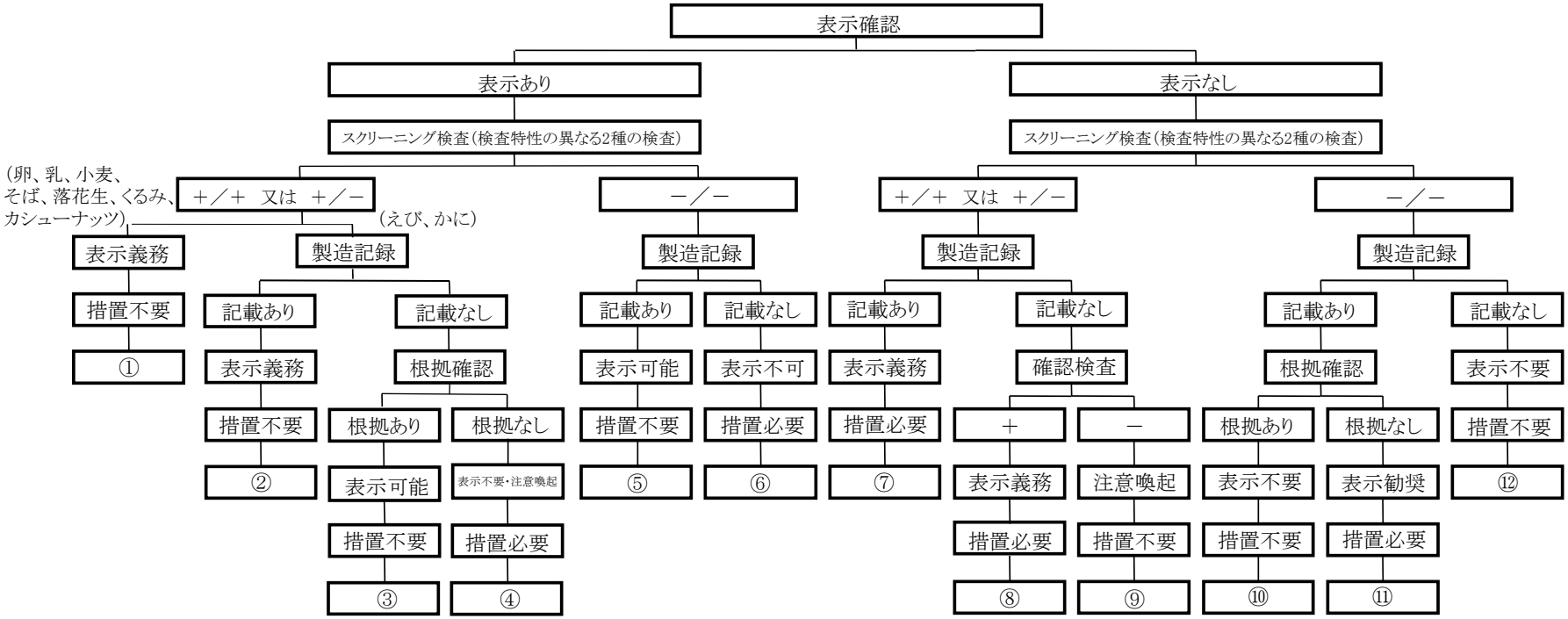
3. 留意点

食品中の特定原材料等に係る検査は、原則として別添１の「判断樹」に従って実施す

る。別添２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３に示すので、検査を行う場合の参考にされたい。

（別添1）

最終改正：2026年4月1日



最終改正：2026 年４月１日

（別添２）

判断樹について

１　基本的注意事項

（１）この判断樹は、健康被害防止の観点に立ち、現在の科学的知見に基づき、アレルギー症状を誘発する可能性のある食品の誤表示による危害をできる限り回避することを目的とし、構成されている。

（２）食品中の特定原材料の監視は、原則としてこの判断樹に基づいて行う。

（３）検査には偽陽性又は偽陰性を示す食品が存在するので、その判断には十分注意する。全ての検査において、偽陽性又は偽陰性の情報を参照して偽陽性又は偽陰性の確認を必ず行う。

（４）全ての検査において、製造記録の確認を必ず行う。（ただし、判断樹枝①の場合のみ省略可能。）

２　スクリーニング検査について

（１）スクリーニング検査は定量検査法を用いて行う。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、この検査法と同等又は同等以上の性能を持っていること。

（２）スクリーニング検査は、検査特性の異なる２種の検査を組み合わせて実施する。

（３）スクリーニング検査で陽性とは、食品採取重量１ｇ当たりの特定原材料由来のタンパク質含量が 10μｇ以上のものをいう※1。

（４）えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないことを留意する必要がある。

※１　平成 13 年 10 月 29 日に取りまとめられた厚生労働科学研究費補助金による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班アレルギー表示検討会中間報告書において、「数μg/ml 濃度レベル又は数μg/g 含有レベル以上の特定原材料等の総たんぱく質を含有する食品については表示が必要と考えられる。」とされたこと等による

３　製造記録の確認について

（１）ここでいう「製造記録」とは、製造レシピ（配合表を含む。）、作業手順書、作業日報、検査成績書、ガントチャート（ライン毎の製造予定表）、品質（成分）保証書、商品カルテ（成分情報を含む。）、特定原材料を含まない旨の証明書等をいう。

（２）製造記録に記載があるにもかかわらず、表示がないものについては、その根拠を必ず確認する。また、製造記録に記載がないにもかかわらず、表示があるものについては、その根拠を必ず確認する。

（３）ここでいう「根拠」とは、検査結果又は製造記録からの推計値をいう。

（４）製造記録が不明なものは、「記載なし」と同様に扱う。

4　確認検査について

（1）確認検査は定性検査法を用いて行う。なお、ウエスタンブロット法、PCR 法、リアルタイム PCR 法、PCR-核酸クロマト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又は同等以上の性能をもっていること。

（2）卵、乳の確認検査は、一般的にウエスタンブロット法が使用されている。この場合、使用する抗体は、卵はオボアルブミン抗体及びオボムコイド抗体、乳はα－カゼイン抗体及びβ－ラクトグロブリン抗体を使用する。

（3）小麦、そば、落花生の確認検査は、一般的に PCR 法又はリアルタイム PCR 法が使用されている。PCR 法では特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。リアルタイム PCR 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。えび、かにの確認検査は、一般的に PCR 法が使用されている。PCR 法で特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。くるみの確認検査は、一般的にリアルタイム PCR 法又は PCR-核酸クロマト法が使用されている。リアルタイム PCR くるみ-H 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。くるみ-N 法では Cq 値が得られたものを陽性とする。PCR-核酸クロマト法ではテストストリップの所定の位置に着色ラインが認められたものを陽性とする。カシューナッツの確認検査は、一般的にリアルタイム PCR 法、PCR-核酸クロマト法又は LC-MS/MS 法が使用されている。リアルタイム PCR カシューナッツ-H 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。カシューナッツ-N 法では Cq 値が得られたものを陽性とする。PCR-核酸クロマト法ではテストストリップの所定の位置に着色ラインが認められたものを陽性とする。LC-MS/MS カシューナッツ-NH 法では、S/N 比が 10 を超えたものを陽性とする。カシューナッツ-NS 法およびカシューナッツ-HF 法では、安定同位体標識ペプチドに対するピーク面積比が基準以上であったものを陽性とする

（4）確認検査の際には、スクリーニング検査で用いたものと同じ調製試料から採取して用いる。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。

5　違反発見時の措置

（1）特定原材料が含まれる食品に係る表示が訂正されるまでの間（判断樹枝⑪においては、製造記録に「表示なし」の根拠の記載がされるまでの間）は、当該食品等の販売を行わないよう指導する。

（2）さらに、必要に応じて食品衛生法第 59 条又は第 60 条の規定に基づく措置等を検討する。

6　枝①から⑫までの考え方

(卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ、カシューナッツの監視のみ)

①	特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ、カシューナッツ）の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも１つが「＋（プラス）」の場合

- この場合でも製造記録の確認を行うことは望ましく、この判断樹がこれを妨げるものではないが、省略は可能。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考えられ、行政措置は不要。

(えび、かにの監視のみ)

②	特定原材料（えび、かに）の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも１つが「＋（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考えられ、行政措置は不要。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

（えび、かにの監視のみ）

③	特定原材料（えび、かに）の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも１つが「＋（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、表示した根拠がある場合

- 製造記録の確認は必須。
- 製造記録に記載がないにもかかわらず表示した根拠の確認が必要。
- 確認検査は不要。
- 表示することは可能であり、行政措置は不要。
- 製造記録に記載がないにもかかわらず、表示した根拠があれば、今後、その根拠を製造記録に記載するように指導する。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

（えび、かにの監視のみ）

④	特定原材料（えび、かに）の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも１つが「＋（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、表示した根拠がない場合

- 製造記録の確認は必須。
- 原材料欄の外に注意喚起をすることは可能である。

- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。
- 必要があれば確認検査を実施

⑤	特定原材料の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果がどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 表示することは可能であり、行政措置は不要。
- 食品中に含まれる特定原材料等の総たんぱく量が、数μg/ml 濃度レベル又は数μg/g 含有レベルに満たない場合は、表示の必要性はないが、この場合に表示をするかしないかの判断は、製造者又は販売者によるものである。
- スクリーニング検査結果の「－（マイナス）」が、特定原材料の総タンパク量が０（ゼロ）を意味しないことに御留意願いたい。

⑥	特定原材料の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果がどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 表示してはならず、表示を訂正させる。
- 製造記録に記載がないにもかかわらず、表示した根拠があれば、今後、その根拠を製造記録に記載するように指導する。

⑦	特定原材料の表示がなく、２種の検査によるスクリーニング検査のうち少なくともどちらか１つが「＋（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がある場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 表示は必要であり、表示を訂正させる。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

⑧	特定原材料の表示がなく、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか１つが「＋（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「＋（プラス）」の場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は必須。

- 確認検査結果によってスクリーニング検査結果が偽陽性でないことを確認できており、表示が必要であり、表示を訂正させる。
- ただし、通常、原材料として扱われないものによるコンタミネーションが考えられる場合（例：「ソバをゆでた湯でうどんをゆでた場合のゆで湯」、「天ぷらやカツなどの揚げ油」等）は、欄外記載による注意喚起が望ましい。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

⑨	特定原材料の表示がなく、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくともどちらか１つが「＋（プラス）」で、製造記録に特定原材料の記載がなく、確認検査結果が「－（マイナス）」の場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は必須。
- 確認検査結果によってスクリーニング検査結果が偽陽性でないことを確認できておらず、表示を訂正させることはしない。
- しかし、確認検査結果が「－（マイナス）」がスクリーニング検査結果の「＋（プラス）」を完全に否定するものではないことに留意する必要がある。
- 原材料欄の外に注意喚起をすることは可能である。
- えび及びかにの監視におけるスクリーニング検査では、えびとかにが区別できないこと、えび及びかに以外の甲殻類の一部も検知することに留意する必要がある。

⑩	特定原材料の表示がなく、２種の検査によるスクリーニング検査結果のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がある場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠の確認が必要。
- 表示する義務はなく、適正表示である。

⑪	特定原材料の表示がなく、２種の検査によるスクリーニング検査結果のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載があり、表示しなかった根拠がない場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 製造記録に記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠の確認が必要。
- 表示することが望ましい。スクリーニング検査結果でどちらも「－（マイナス）」であるため、表示を訂正させることはしないが、表示を勧奨する。
- しかし、製造記録に特定原材料の記載があるにもかかわらず、表示しなかった根拠については製造記録等へ必ず記載するように指導する。なお、スクリーニング検査

の検査結果をもって表示しない根拠とする場合でも、自主的な検査結果は根拠として認めるが、行政検査における結果は表示をしない根拠として認めない。

⑫	特定原材料の表示がなく、２種の検査によるスクリーニング検査結果のどちらも「－（マイナス）」で、製造記録に特定原材料の記載がない場合

- 製造記録の確認は必須。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考え、表示がなくても問題ない。

最終改正：2026 年４月１日

（別添３）

標準品規格

1. 卵検知用標準液

1.1. 調製法

以下に示す方法に従い、卵一次標準粉末、卵標準品原液、卵一次希釈液及び卵高濃度標準液を調製する。卵標準品原液から卵高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

卵一次標準粉末調製方法

白色レグホン種（産卵鶏）の新鮮卵 1 kg の卵殻を外し、均一にホモジナイズした後に凍結乾燥する。乾燥物を微粉砕し、卵一次標準粉末とする。

卵標準品原液調製方法

卵一次標準粉末 0.2 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、卵標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置き、振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

＊　抽出用緩衝液　0.6 % SDS 及び 0.1M 亜硫酸ナトリウムを含有する PBS（pH 7.4）。

卵一次希釈液調製方法

卵標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、卵一次希釈液とする。

卵高濃度標準液調製方法

卵一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、卵高濃度標準液とする。卵標準品原液から卵高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

1.2. 規格

卵標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、200, 130, 75, 40 kDa 付近にそれぞれ明瞭なバンドを認める。

たんぱく量

2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 4.1～6.2 mg/mL である。

参考　以下に示す値は参考値とする。

卵一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は卵標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。卵標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。

2. 牛乳検知用標準液

2.1. 調製法

以下に示す方法に従い、牛乳一次標準粉末、牛乳標準品原液、牛乳一次希釈液及び牛乳高濃度標準液を調製する。牛乳標準品原液から牛乳高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

牛乳一次標準粉末調製方法

ホルスタイン種（乳用牛）の新鮮乳１ L を氷で冷却しながら撹拌し、乳脂肪が凝固して生じる乳脂塊を脱脂綿で濾過する。この操作を 3 回繰り返し脂肪を除去した後、濾液を凍結乾燥し、乾燥物を微粉砕して牛乳一次標準粉末とする。

牛乳標準品原液調製方法

牛乳一次標準粉末 0.2 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よくふり混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、牛乳標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

＊　抽出用緩衝液　0.6 % SDS 及び 0.1M 亜硫酸ナトリウムを含有する PBS（pH 7.4）。

牛乳一次希釈液調製方法

牛乳標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、牛乳一次希釈液とする。

牛乳高濃度標準液調製方法

牛乳一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、牛乳高濃度標準液とする。牛乳標準品原液から牛乳高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

2.2. 規格

牛乳標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、40～25 kDa の範囲に 3 本、16 kDa 付近に 1 本の明瞭なバンドを認める。

たんぱく量

2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 2.1～3.2 mg/mL である。

参考　以下に示す値は参考値とする。

牛乳一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は牛乳標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。牛乳標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。

3. 小麦検知用標準液

3.1. 調製法

以下に示す方法に従い、小麦一次標準粉末、小麦標準品原液、小麦一次希釈液及び小麦高濃度標準液を調製する。小麦標準品原液から小麦高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

小麦一次標準粉末調製方法

以下に示す 14 銘柄の小麦混合物を粉砕し、14 メッシュのふるい(aperture=1.18 mm)を通過したものを、小麦一次標準粉末とする。

混合物に含まれる銘柄

No.1 Canada Western Red Spring	7.14 %
US No.2 or better (Dark) Northen Spring	7.14 %
US Hard Red Winter - High Protein	7.14 %
US Hard Red Winter - Semi Hard	7.14 %
Canada Western Amber Durum - Triticum durum	7.14 %
US Western White (White Club + Soft White)	7.14 % (Club 1.6 %)
Australian Premium White for Japan	7.14 %
Australian Prime Hard	7.14 %
ホクシン	7.14 %
ハルユタカ	7.14 %
農林 61 号	7.14 %
チクゴイズミ	7.14 %
バンドウワセ	7.14 %
シロガネ	7.14 %

小麦標準品原液調製方法

小麦一次標準粉末１ g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よく振り混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、小麦標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.6 % SDS 及び 0.1M 亜硫酸ナトリウムを含有する 0.1M Tris-HCl（pH 8.6）

小麦一次希釈液調製方法

小麦標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、小麦一次希釈液とする。

小麦高濃度標準液調製方法

小麦一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、小麦高濃度標準液とする。小麦標準品原液から小麦高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

3.2. 規格

小麦標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、32 kDa～120 kDa の範囲に 4 本以上のバンドを認める。

たんぱく量

2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 4.0～6.0mg/mL である。

参考 以下に示す値は参考値とする。

小麦一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は小麦標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。小麦標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9. に示すような泳動像が得られる。

4. そば検知用標準液

4.1. 調製法

以下に示す方法に従い、そば一次標準粉末、そば標準品原液、そば一次希釈液、

そば高濃度標準液を調製する。そば標準品原液からそば高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

そば一次標準粉末調製方法

茨城県産及び中国産(中国北方)産のそばを等量混合した後粉砕し、14 メッシュのふるい(aperture=1.18 mm)を通過したものを、そば一次標準粉末とする。

そば標準品原液調製方法

そば一次標準粉末 1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よく振り混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、そば標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.6 % SDS、 0.1M 亜硫酸ナトリウム及び 0.5 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

そば一次希釈液調製方法

そば標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、そば一次希釈液とする。

そば高濃度標準液調製方法

そば一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、そば高濃度標準液とする。そば標準品原液からそば高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

4.2. 規格

そば標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、22 kDa 付近に 1 本の明瞭なバンドと 32 kDa～83 kDa の範囲に 4 本以上のバンドを認める。

たんぱく量

2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 2.7～4.0 mg/mL である。

参考　以下に示す値は参考値とする。

そば一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はそば標準品原液

のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。そば標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。

5. 落花生検知用標準液

5.1. 調製法

以下に示す方法に従い、落花生一次標準粉末、落花生標準品原液、落花生一次希釈液、落花生高濃度標準液を調製する。落花生標準品原液から落花生高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

落花生一次標準粉末調製方法

千葉県産バージニア種落花生を乳鉢で粉砕しペースト状としたもの 1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、アセトン 10 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて 1 分間撹拌した後、10,000×g で 30 分間遠心分離し、上清を除く。この操作を３回繰り返す。チューブを 45℃のアルミバス上に置き、約７時間乾燥し、落花生一次標準粉末とする。

落花生標準品原液調製方法

落花生一次標準粉末 0.4 g に抽出用緩衝液* 20 mL を加え、よく振り混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、落花生標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム及び 0.5 M 塩化ナトリウムを含有する 20 mM Tris-HCl (pH7.5)

落花生一次希釈液調製方法

落花生標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、落花生一次希釈液とする。

落花生高濃度標準液調製方法

落花生一次希釈液を 0.2 % BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、落花生高濃度標準液とする。落花生品標準原液から落花生高濃度標準液調製までの操作は、１日の内に行う。

5.2. 規格

落花生標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、70 kDa 付近に 1 本の明瞭なバンドと 15

kDa～30 kDa の範囲に 3～4 本の明瞭なバンドを認める。

たんぱく量

2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 3.2～4.8 mg/mL である。

参考　以下に示す値は参考値とする。

落花生一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は落花生標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。落花生標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。

6. 甲殻類検知用標準液*

＊ えび、かにのスクリーニングに使用する ELISA キットはえびとかにを区別せずに検出するため、本標準液の名称は甲殻類検知用標準液とする。

6.1. 調製法

以下に示す方法に従い、甲殻類一次標準粉末、甲殻類標準品原液、甲殻類一次希釈液及び甲殻類高濃度標準液を調製する。甲殻類標準品原液から甲殻類高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

甲殻類一次標準粉末調製法

ウシエビ（ブラックタイガー）（養殖エビ）の尾部筋肉を採取し、氷冷しながら均一にホモジナイズした後に凍結乾燥する。乾燥物を微粉砕し、甲殻類一次標準粉末とする。

甲殻類標準品原液調製法

甲殻類一次標準粉末 0.1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液*20 mL を加え、よく振り混ぜて混合し、固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過する。ろ過した液を、100℃で 10 分間加熱し、甲殻類標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置き、振とう幅は３ cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

＊ 抽出用緩衝液　0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、１% Inhibitor Cocktail 及び５ mM EDTA（Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit（Thermo Fisher Scientific 社製））を含有する PBS（pH 7.4）

甲殻類一次希釈液調製法

甲殻類標準品原液を pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、甲殻類一次希釈液とする。

甲殻類高濃度標準液調製法

甲殻類一次希釈液を 0.2% BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、甲殻類高濃度標準液とする。甲殻類標準品原液から甲殻類高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

6.2. 規格

甲殻類標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、160、41、37kDa 付近にそれぞれ 1 本、20～16kDa の範囲に 4 本の明瞭なバンドを認める。

たんぱく量

2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 2.7～4.1mg/mL である。

参考　以下に示す値は参考値とする。

甲殻類一次希釈液調製のタンパク質を 2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は甲殻類標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。甲殻類標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。

7. くるみ検知用標準液

7.1. 調製法

以下に示す方法に従い、くるみ一次標準粉末、くるみ標準品原液、くるみ一次希釈液、くるみ高濃度標準液を調製する。くるみ標準品原液からくるみ高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

くるみ一次標準粉末調製法

チャンドラー種くるみを乳鉢で粉砕したもの 3 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、アセトン 30 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて 1 分間撹拌した後、10,000×g で 30 分間遠心分離し、上清を除く。この操作を 3 回繰り返す。チューブを 45℃のアルミバス上に置き、約 7 時間乾燥した後、目開き 500 μm のふるいを通過したものをくるみ一次標準粉末とする。

くるみ標準品原液調製法

くるみ一次標準粉末 0.1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液*20 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて 1 分間攪拌して固形物を分散させた後、振とう機

（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、くるみ標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

＊　抽出用緩衝液　0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.05% Tween20 を含有する 120mM Tris-HCl (pH7.5)

くるみ一次希釈液調製法

くるみ標準品原液を、0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウムを含む pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、くるみ一次希釈液とする。

くるみ高濃度標準液調製法

くるみ一次希釈液を、0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.2% BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、くるみ高濃度標準液とする。くるみ標準品原液からくるみ高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

7.2. 規格

くるみ標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、10Da 付近に 1 本、23 kDa～18 kDa 及び 35 kDa～30 kDa の範囲にそれぞれ 2 本以上の明瞭なバンドを認める。

たんぱく量

2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 1.9～2.9 mg/mL である。

参考　以下に示す値は参考値とする。

くるみ一次希釈液調製のたんぱく質を 2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はくるみ標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。くるみ標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。

8. カシューナッツ検知用標準液

8.1. 調製法

以下に示す方法に従い、カシューナッツ一次標準粉末、カシューナッツ標準品原液、カシューナッツ一次希釈液、カシューナッツ高濃度標準液を調製する。カシューナッツ標準品原液からカシューナッツ高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

カシューナッツ一次標準粉末調製法

ベトナム産カシューナッツを乳鉢で粉砕したもの 3 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、アセトン 30 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて１分間撹拌した後、10,000×g で 30 分間遠心分離し、上清を除く。この操作を３回繰り返す。チューブを 45 ℃のアルミバス上に置き、約７時間乾燥した後、目開き 500 μm のふるいを通過したものをカシューナッツ一次標準粉末とする。

カシューナッツ標準品原液調製法

カシューナッツ一次標準粉末 0.1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて 1 分間攪拌して固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、カシューナッツ標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブ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サンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.05 % Tween20 を含有する 120 mM Tris-HCl (pH7.5)

カシューナッツ一次希釈液調製法

カシューナッツ標準品原液を、0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウムを含む pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、カシューナッツ一次希釈液とする。

カシューナッツ高濃度標準液調製法

カシューナッツ一次希釈液を、0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.2% BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、カシューナッツ高濃度標準液とする。カシューナッツ標準品原液からカシューナッツ高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

8.2. 規格

カシューナッツ標準品原液規格

電気泳動像

SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、10kDa、19 kDa、26 kDa 及び 35 kDa 付近にそれぞれ 1 本の明瞭なバンドを認める。

たんぱく量

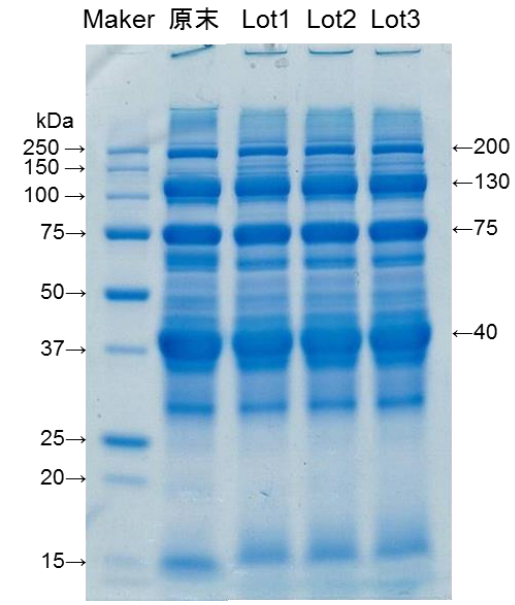
2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 1.5～2.1 mg/mL である。

参考　以下に示す値は参考値とする。

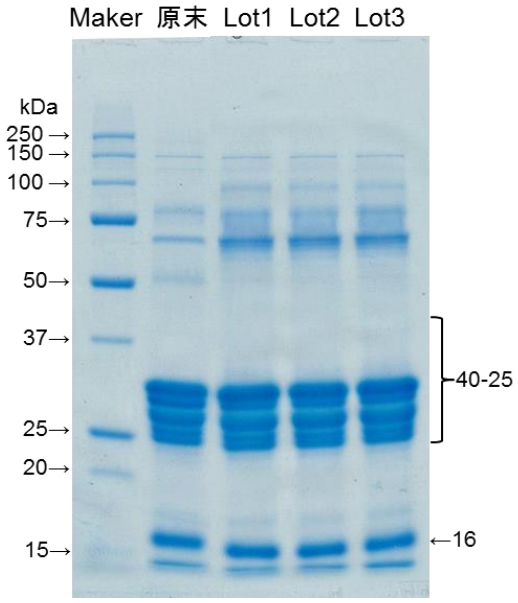
カシューナッツ一次希釈液調製のたんぱく質を 2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はカシューナッツ標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。カシューナッツ標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9. に示すような泳動像が得られる。

9. 各標準品原液の SDS-PAGE 電気泳動像

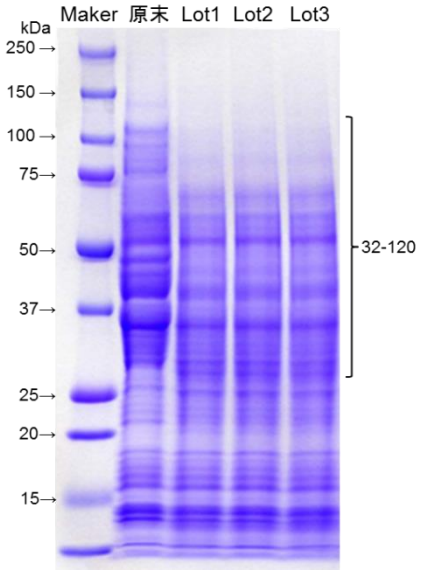
卵



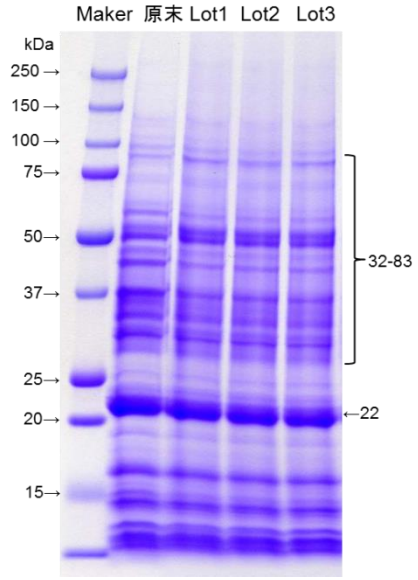
牛乳



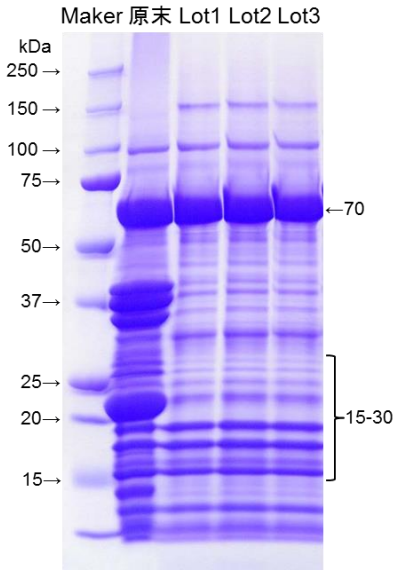
小麦



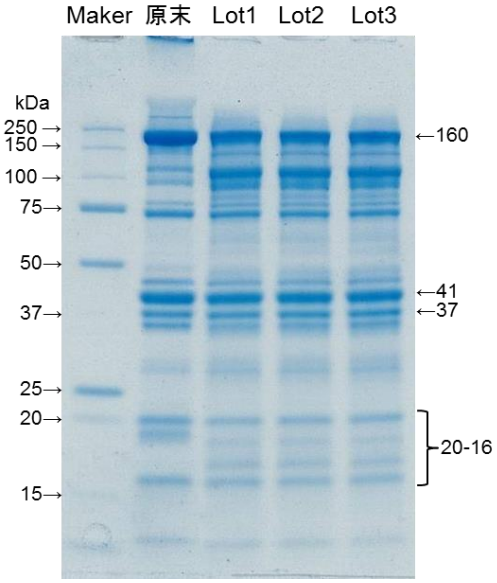
そば



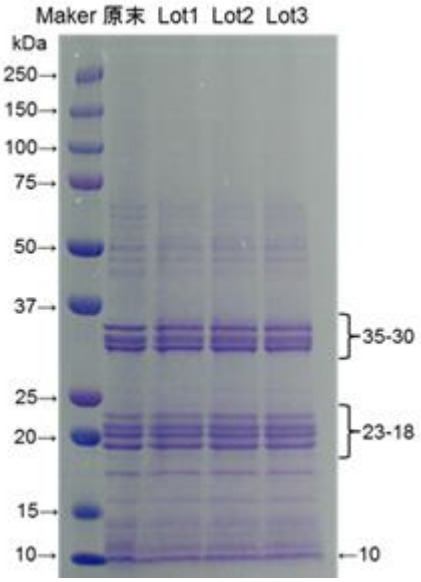
落花生



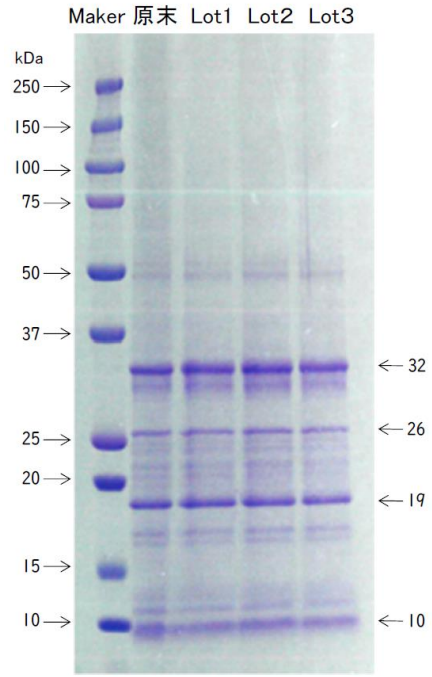
甲殻類



くるみ



カシューナッツ



原末：卵・牛乳・小麦・そば・落花生・甲殻類・くるみ・カシューナッツ標準粉末
Lot1-3：ロット番号

（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

はじめに

近年、食品が原因となるアレルギーが増加しており、重篤な症状を引き起こす場合も多い。このことから、平成13年４月からアレルギー誘発物質（アレルゲン）を含む食品に関する表示制度が創設された。

本表示制度が適切に実践されていることの検証のためには、特定原材料を含む食品の検査方法が必要である。平成14年11月に、「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」が通知され、特定原材料５品目の検査方法が定められた。さらに平成17年11月には検査方法の追加が通知された。しかし、その後の研究による技術の向上や新たなアレルゲンの発見等に伴い、常に検査法を見直して適切な消費者保護に努める必要がある。不適切な検査方法による健康危害を起こさないためにも、検査技術の評価も行わなくてはならない。検査技術の評価方法として、分析法バリデーションが多くの分野で確立されているが、食品中のアレルゲン検査という特性から、従来の分析法の評価方法のみでは、適切な評価が難しいと考えられるため、ガイドラインを作成しアレルギー表示の検証に使用するに適正な検査方法の評価法を定めることとなった。本ガイドラインでは、アレルギー食品の検査方法の評価法、表示制度の検証のための検査方法に求められる特性、検査法実施者が行うべき信頼性確保について指針を示す。

1. 食品中の特定原材料の検査方法

1.1. 定量検査法 （ELISA法）

抗原で動物を免疫して抗体を作り、その抗体への結合量から試料中の抗原量を定量する方法である。現在開発されている方法として、対象食品に含まれる多くのたんぱく質に対する抗体を用いる方法と、特定のたんぱく質に対する抗体を用いる方法がある。さらに、後者ではポリクローナル抗体とモノクローナル抗体のいずれかを用いる方法が考えられる。このような抗体の選択により、選択性、交差反応性、検出下限、食品への適用性などが変わる。特定のたんぱく質に親和性の高い抗体を用いれば特異性は向上するが、食品の加工により対象としたたんぱく質が変性すると検知できなくなる可能性がある。さらに、原材料の一部のみを使った場合に、その部分に対象となるたんぱく質が含まれていない場合には検知できないために、偽陰性が増加する。一方、多くのたんぱく質に結合する抗体を用いれば、上の様な問題を回避できるが、対象としている食品以外の食品に由来するたんぱく質への結合が多くなり、偽陽性結果を生じる確率が高くなる。

1.2. 定性検査法 （ウエスタンブロット法、PCR法）

ウエスタンブロット法では、たんぱく質を電気泳動で分離し、その後抗原抗体反応で検出する方法である。特定のたんぱく質に対する抗体を用いると共に、バンドの場所による分子量の情報も得られるために、ELISA法よりも特異性が高く偽陽性が現れに

くい。現行の通知では、この特性から卵と乳の確認検査法として位置付けられている。ウエスタンブロット法では目視でバンドを確認するために、定量検査法とはならず、定性検査法としてのバリデーションが必要である。

PCR法は、抗原性を示す食品に特異的なDNA領域を、PCRで増幅し検出する方法である。適切な領域を設定すれば特異性が高く、現行の通知では小麦、そば、落花生の確認検査法とされている。一方、鶏肉と卵ではDNAは同一でありPCRで区別する事は困難である。

以上の特性から、現行のアレルゲンを含む食品の検査方法では、スクリーニング法として定量検査法を用い、確認に定性検査法を用いている。

2. 検査方法評価

2.1. 定量検査法の評価基準

定量法の評価の基準となる性能パラメータは、Codex又は日本薬局方等で示されている。ISO、Codex、局方等それぞれ、定義が少しずつ異なっているが、表 1に示すような量を使って、性能が評価される。対象とする検査法の使用目的によって、適切なパラメータを選択して評価する。一般に真度（回収率)、精度（併行・室内再現精度）はどのような目的の検査法であっても、必ず確認しなくてはならない。残留レベルの検査では定量下限、検出下限が重要であり、対象物質の予想される濃度が大きく変化する場合には、検査を適用できる範囲が重要なパラメータとなる。

これらのパラメータはバリデーションにより決定される。多くの場合、実験計画法に基づいたくり返し試験により統計的に推定されるので、バリデーションに参加する機関の数、用いる試料の数等により、得られたパラメータの信頼性が変化する。

表1　性能パラメータ

真度	精度（併行精度、室内再現精度、室間再現精度）
特異性	検出限界
直線性	定量限界
範囲	頑健性

2.2. 定性検査法の評価基準

定性法では、定量のように数値で示される結果は得られないので、定量法のパラメータをそのまま適用することはできない。真度と精度を合わせた概念としては、正答率、偽陽性率、偽陰性率等が考えられる。また、濃度が低くなれば判定が不正確になるので、正しく判定できる限界濃度も重要な性能パラメータである。

2.3. 試験室間バリデーション

試験室間バリデーションは、多数の試験室が共通の試料を分析し、その結果を統計

的に解析することにより、真度、併行精度、室間精度を評価する。Codexにおいても、試験室間バリデーションで性能が確認され公表されている方法が採用される。AOAC INTERNATIONALの OMA(Official method of analysis)は、試験室間バリデーションで評価された分析法である。AOACでは、試験室間のバリデーションをcollaborative studyとよび、プロトコルが定められている。ISO5725（JIS Z8402）にも、ほぼ同じプロトコルが示されている。

Collaborative studyでは、真度（回収率)、併行精度、室間精度が評価される。また、多数の試験室で実施するので、頑健性も保証される。定量法のCollaborative studyの実施要件は以下の通りである。

試料数５、試験室数８、繰り返し数　１又は２

Collaborative studyの前に、１試験室で頑健性を含めた以下の性能の評価を行う。

・検量線　分析法が使用できる濃度範囲を決定する。直線である必要はない。
・特異性　存在が予想される物質の妨害の程度。
・偏り（真度）　添加回収率から系統誤差を推定する。
・機器の性能、分析系の安定性の特定。
・精度　併行精度、室内精度、頑健性。
・既存の方法との比較。

試験室内の性能評価が許容できる場合のみ、Collaborative studyを実施する。

2.4. ピアレビュー

あらかじめ開発者が性能評価を行った後、第三者機関によりその性能を確認する方法が、ピアレビューと呼ばれている。試験室間バリデーションとは異なり、室間精度は求められない。ピアレビューを行うためには、あらかじめ以下のような分析性能を評価しておく。

・検量線

定量検査法では最低５濃度（０を含まない。)。直線である必要はない。標準溶液とマトリクス中の両方を示す。

定性検査法では、ネガティブコントロールを含む試料で定性範囲を確認する。それぞれの濃度で5～10の繰り返しを行う。濃度に対して陽性率をプロットする。

・適用できるマトリクス

適用可能なマトリクスを明示的に示す。

・真度

定量法では、適切な範囲の濃度を添加した試料からの回収率を、真度の指標とする。６試料でそれぞれ３濃度における回収率を示す。

定性法では既存の方法と比較する。

・精度

定量法では、異なる日間、分析者間、検量線間、試薬間、マトリクス間のRSDを示す。定性法では、数種類の濃度での正答率・偽陽性・偽陰性率で表す。

・既存の方法との比較

可能ならば既存の方法（バリデートされた方法が望ましい。）との比較を行うことが、強く推奨される。

・交差反応性
類似物質、代謝物、マトリクス中に存在する可能性のある成分への反応性。

・安定性
時間、温度、凍結・融解サイクルに対する、キットの各部の頑健さを評価する。

・検出限界
定量検査法では、マトリクスブランクの平均値＋３標準偏差を、分析対象の濃度に変換する。

・定量限界
マトリクス毎に、少なくとも６個の添加サンプルを実際に分析して決定する。

・偽陽性・偽陰性率
定性検査法に適用される。

・頑健性
試験環境で起こり得るわずかな変化による試験系の変動の程度の試験。

2.5. 単一試験室におけるバリデーション(single laboratory validation)

試験室間試験の前に分析法の実行可能性を確認する。コラボラティブデータが得られない、又は正式なコラボラティブトライアルの実施が現実的ではない場合に、分析法の信頼性の証拠を提供する。既にバリデートされた方法が正しく使用されていることを保証する等の目的のために、１試験室におけるバリデーションが行われる。このバリデーションについては、IUPACの技術報告が調和ガイドラインを提供している。その中の勧告では、

・可能及び現実的ならば、国際的プロトコルに適合したコラボラティブトライアルで性能を評価された分析法を使用する。
・そのような分析法がない場合には、顧客に分析データを提供する前に試験室内で分析法をバリデートする。
・単一試験室バリデーションでは、以下の中から適切な性能を選んで評価する：適用性、特異性、真度、精度、範囲、定量下限、検出下限、感度、頑健性。どの性能を選ぶかは、顧客の要求を考慮して決定する。
・これらの性能が評価された証拠は、顧客から要求された場合には利用できるようにしておく。

とされている。

2.6. 特定原材料検知方法評価における問題点

特定原材料たんぱく質の検知法として多く用いられる、抗体を用いた酵素免疫測定法（ELISA法）又はウエスタンブロット法では、他の機器分析とは異なった問題がある。多くの理化学・微生物検査においては、分析対象物の物性・構造は明らかである。この物性・構造の情報に基づいて適切な手法を選択し、分析法が作成される。一方、食品のアレルゲン検知法においては、対象物が一意に定まらない。例えば、卵を検知す

る場合、表示は卵全体を含むか含まないかを示すが、検知する対象としては、卵の全てのたんぱく質、卵に特異的なある特定のたんぱく質、抗原性をもつ卵のタンパク質、卵（鶏）の遺伝子等が考えられる。全てのたんぱく質を対象とした場合、その本質は明らかではない。特定のたんぱく質を対象とした場合には、物性は明らかであるが、表示の対象である卵全体、又は抗原性を持っているたんぱく質との量的関係は明らかにする必要がある。結果の判定を行うためには、少なくとも、検量線に用いる標準のたんぱく質の性質を明らかにすべきである。表示が特定原材料のタンパク質全体を対象としていることから、この標準たんぱく質は特定のたんぱく質や抗原性を持つたんぱく質ではなく、なるべく全てのたんぱく質を含んでいることが望ましい。

加熱のような加工処理による、タンパク質の変性も重要な問題となる。表示制度の対象となるのは、全ての加工食品であり、それに含まれる特定原材料たんぱく質は、加工過程で種種の程度の変性を受けている。この結果、使用されている抗体との結合が変化する。また、DNAを検知する方法では、増幅部位の切断が変動の原因となる。このため、キットに用いる抗体が異なれば、同一検体においても異なる結果が得られることは当然である。表示の確認のための検査法としては、高い真度を目指すよりも、広い範囲の食品で容認できる程度の真度を持つことが重要である。変性、妨害により真度が100％を大きく上回ったり、非常に小さくなったりする場合があることはやむを得ないが、検査の信頼性を高めるために、できる限りこのような情報を公表するべきである。

真度を評価するためには、標準品が必要である。別添３に示された標準品規格に適合した標準品を使用する。他の標準を用いる場合には、その作成法、性質を明らかにし、試験結果の解釈を正しく行うために、また現行の標準との差を明確にしておく必要がある。

3. 試験室における信頼性保証

高い性能が保証された検査法が採用されたとしても、試験室における実施方法の不備から、検査結果が不正確になる要因がいくつか考えられる。これについては、他の食品分析と同じく、各検査機関の信頼性確保システムで対応すべきである。

3.1. 試験導入時のバリデーション

試験室で新たに、食品中のアレルゲン検査を開始する際には、性能が評価され、公表されている検査法を導入すべきである。また、導入の際には単一試験室におけるバリデーションを行って、公表されている検査法（キット）の性能を達成できる能力があることを確認する。最低限、精度（併行精度、室内精度)、バイアスを確認する。公表データと差が大きい場合には、3. 3に示す手技の管理を参考として手順を見直す必要がある。

3.2. 内部精度管理

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は、日常的に検査の技能を評価するために精度管理（内部精度管理）

を行うことが定められている。導入時のバイアス、室内精度等の能力が保持されていることの証拠を示すためにも、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。

3.3. 手技の管理

サンプリング

加工食品には、極度に不均一なものが多く、サンプリング及び試料調製段階に、大きな変動の原因が存在する可能性があるので、標準的なサンプリング手順の確立が必要である。

分析機器

多くの場合、濃度－測定値の関係に３次曲線又は４係数ロジスティック曲線等を当てはめて、検量線が作成される。４係数ロジスティック曲線は非線型であるため、初期値や収束の判定基準が不適切であると、正しい検量線関数が得られない。このような場合には、分析値に大きな誤差が生じることがある。

プレートリーダーにおける位置による吸光度の偏り、ピペットによる注入量のばらつきは、併行精度に大きく影響するので、使用する機器の日常的な点検も重要である。

精度の構造

アレルゲン検査で使用されているサンドイッチELISA法において、妨害のない状況で達成できる併行精度（ウェル間のばらつき）は、マイクロピペットによる液体の注入誤差、プレートウェル間の吸光度のばらつき等から、次式により計算できる。

$$\rho_T^2 = \rho_X^2 + \rho_S^2 + \left(\frac{\sigma_W}{f(X)}\right)^2$$

ρ_T：測定値のRSD

ρ_X：分析対象物質の注入量のRSD（ピペットのばらつき）

ρ_S：反応基質溶液量のばらつきが吸光度測定値のばらつきに与える影響

ρ_S =（ピペットによる注入量のRSD)・(2/3)

σ_W：ウェル自体の吸光度のSD（ウェル間の吸光度のSD)

f（X)：吸光度を表す検量線（X は、分析対象物質の濃度）

典型的な値として、ρ_X =0.6 %、ρ_S = 0.4 %、σ_W =0.004 Abs　とすると、ELISAキットで定量を行う吸光度範囲0.2～1.5におけるRSDは1～5%程度である。実際の検査において、標準液又は同一試験溶液をくり返し測定した場合に、吸光度１付近のRSDが5 %を大きく超えるような場合には、ピペット注入精度、プレートの洗浄操作、プレートリーダーの位置調整等に異常があると考えられるので、原因を究明し精度の向上を図るべきである。

4. 特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言

ELISA法、ウェスタンブロット法、PCR法等の特定原材料検査方法を開発する際には、その性能が、以下の範囲にあることを、試験室間バリデーションにより示すべきである。

定量法の試験室間バリデーション

試験室数　８以上、試料数　５以上とする。

試料に含まれる特定原材料たんぱく質濃度レベルの１つは、微量の定義である10 μg/gを含める。試料は原材料に特定原材料を添加し、加熱等の製造方法で作成したモデル加工食品を含めるべきである。

ELISA法のような免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なる、つまり真度が異なることは予想されるが、アレルギー患者の健康保持という観点から、50%以上、150%以下の回収率であること。また、室間精度は25%以下であること。

定性法の試験室間バリデーション

試験室数　６以上、試料数　５以上とする。

試料に含まれる特定原材料たんぱく質濃度レベルには、ブランクと微量の定義である10 μg/gを含める。試料は原材料に特定原材料を添加し、加熱等の製造方法で作成したモデル加工食品を含めるべきである。

同一の試料・濃度のサンプルを各試験室毎に２サンプルずつ以上を送付して判定率を評価する。特定原材料たんぱく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。なお、いずれも95%以上であることが望ましい。

検査法は多くの種類の加工食品に適用されることから、バリデーションで評価する試料は、動物性の食品、植物性の食品、加工度の高いもの（長時間の加熱、高圧調理)、酸性を示すもの等の特性を持つ食品から選択することが望ましい。

試験室間バリデーションに先立って、開発者の試験室において単一試験室のバリデーションを実施すべきである。ここで、代表的なモデル加工試料について、添加濃度10 μg/gにおける真度、室内精度を確認すると共に、種々の食品の抽出液に抗原を添加した試料を用いて広い範囲のマトリックスの影響、及び多くの抗原の偽陽性、偽陰性データを採集しその情報を公開するべきである。PCR法及びウェスタンブロット法のような定性検査法については、少なくとも20種類以上の性質・加工程度の異なるマトリクス中での、誤判定率を確認すべきである。低濃度では当然、誤判定率が高くなる。誤判定率が50%以上となると推定される濃度を判定限界として示す事が望ましい。

検量線用の標準液調製、真度確認のためには、別添３に示された標準品規格に適合した標準品を使用することが望ましい。使用できない場合には、用いている標準液、標準品との濃度の関係を明らかにし、検知法間の結果の解釈ができるような情報を提供すべきである。

5. 特定原材料検査者の信頼性確保システムに関する提言

ELISA法、ウェスタンブロット法、PCR法等の特定原材料検査実施する施設は、３試験室における信頼性保証に示した、導入時バリデーション、内部精度管理、手技の管理を

実施して、検査結果の信頼性を保証すべきである。

参考1　定量検査法の試験室間バリデーション例

（架空のデータを用い分析法バリデーション結果を公表する書式を示した。キット等に添付する資料作成の参考とされたい。）

バリデーション対象

卵検知用　Ｘキット

試　　料

ソーセージ、牛肉レトルトパウチ、ビスケット、オレンジジュース、ジャム。各試料には、卵一次標準粉末をタンパク濃度が10 μg/gとなるように添加した。

参加機関

１０機関

・A社○○研究所
・B研究所
・C協会ＸＸ研究所
・D社△△研究所
・E研究所
・F社○Ｘセンター
・G社○○部
・H研究センター
・Ｉ分析センター
・Ｊ社○○研究所

手　　順

抽出方法・キット操作方法・報告様式に関する文書、試料（５種類）、キットをそれぞれの参加機関に送付した。参加機関は各試料毎に２回の抽出・測定を行った。それぞれの抽出液の測定は３ウェルを用い、同一プレート上で８濃度（ブランクを含む。）の検量線の測定を行い、得られた結果をコーディネータに返送した。

コーディネータは参加機関から送付されたデータを、AOAC INTERNATIONAL又はJIS Z 8402-2の手順に従い、外れ値を除外するためにCochran検定及びGrubbsの検定（両者とも有意水準2.5%）を行った後、平均値、併行再現性及び室間再現性を求めた。

バリデーション結果

表 A-1に、それぞれのキットのバリデーションから得られた、回収率、併行精度(RSD$_r$）及び室間精度(RSD$_R$）を示す。回収率及び室間精度(RSD$_R$)いずれも、別添アレルゲンを含む食品の検査方法に示された基準を満たしている。

表A-1卵検知用Ｘキットバリデーション結果

試料	計算に含めた機関数	回収率	併行精度(RSD%)	室間精度(RSD%)
ソーセージ	10	67.2	4.1	14.5
牛肉レトルト	10	76.3	2.2	9.6
ビスケット	9	66.1	4.7	10.8

ｵﾚﾝｼﾞｼﾞｭｰｽ	10	97.7	2.4	6.6
ジャム	10	95.3	2.7	5.9

参考２　定性検査法の試験室間バリデーション例
（架空のデータを用い分析法バリデーション結果を公表する書式を示した。キット等に添付する資料作成の参考とされたい）

バリデーション対象
PCR法による落花生の検査方法

試　料
ビスケット、チョコレート、カレーペースト、シリアル、ミートペースト。脱脂した落花生粉末をタンパク濃度が０、２、10 μg/gとなるように添加した。

参加機関
６機関
・A社○○研究所
・B研究所
・C協会ＸＸ研究所
・D社△△研究所
・E研究所
・F社○Ｘセンター

手　順
試料30個（５試料×３濃度×２、ランダムにコードを付与）、プライマー２種類、実験プロトコルをそれぞれの参加機関に送付した。参加機関は２週間以内に、各試料を測定し結果を送付した。

バリデーション結果を表 A-２に示す。全ての試料で、植物DNA検出プライマーでの結果は陽性を示した。落花生濃度０ μg/gのブランク試料では、全ての加工試料で落花生特異的プライマーによる結果は陰性であり、10 μg/gの落花生を含む試料では全ての結果が陽性となった。以上より，ブランク試料の陰性率、２ mg/kg及び10 mg/kg添加試料における陽性率は90％以上であり、別添アレルゲンを含む食品の検査方法の基準を満たしている。

表A-２

落花生濃度（mg/kg）	試料	植物DNA検出プライマー 陽性率	落花生特異的プライマー 陽性率
０	ビスケット	12/12	0/12
	ﾁｮｺﾚｰﾄ	12/12	0/12
	ｶﾚｰﾍﾟｰｽﾄ	12/12	0/12
	シリアル	12/12	0/12
	ミートペースト	12/12	0/12
２	ビスケット	12/12	12/12
	ﾁｮｺﾚｰﾄ	12/12	12/12
	ｶﾚｰﾍﾟｰｽﾄ	12/12	11/12

	シリアル	12/12	12/12
	ミートペースト	12/12	12/12
10	ビスケット	12/12	12/12
	ﾁｮｺﾚｰﾄ	12/12	12/12
	ｶﾚｰﾍﾟｰｽﾄ	12/12	12/12
	シリアル	12/12	12/12
	ミートペースト	12/12	12/12

参考３　定量検査用ELISAキットの精度

3.3.手技の管理　精度の構造　で述べたように、アレルゲン検知で使用されているサンドイッチELISA法において、妨害のない状況で達成できる併行精度（ウェル間のばらつき）は、マイクロピペットによる液体の注入誤差、プレートウェル間の吸光度のばらつき等から求められる。ここでは、実際に標準液を６ウェルに分注して得られた吸光度の併行精度と、計算式から求めた精度（精度プロファイル）を示す。

使用キット

A. 森永生科学研究所製 FASPEK　特定原材料測定キット（卵白アルブミン）

B. 日本ハム社製 FASTKITエライザVer. Ⅱシリーズ（小麦）

精度プロファイルの計算

次式に従い各濃度の精度を計算した。

$$\rho_T^{\,2} = \rho_X^{\,2} + \rho_S^{\,2} + \left(\frac{\sigma_W}{f(X)}\right)^2$$

ρ_T：測定値のRSD

ρ_X：分析対象物質の注入量のRSD（ピペットのばらつき）

ρ_S：反応基質溶液量のばらつきが吸光度測定値のばらつきに与える影響

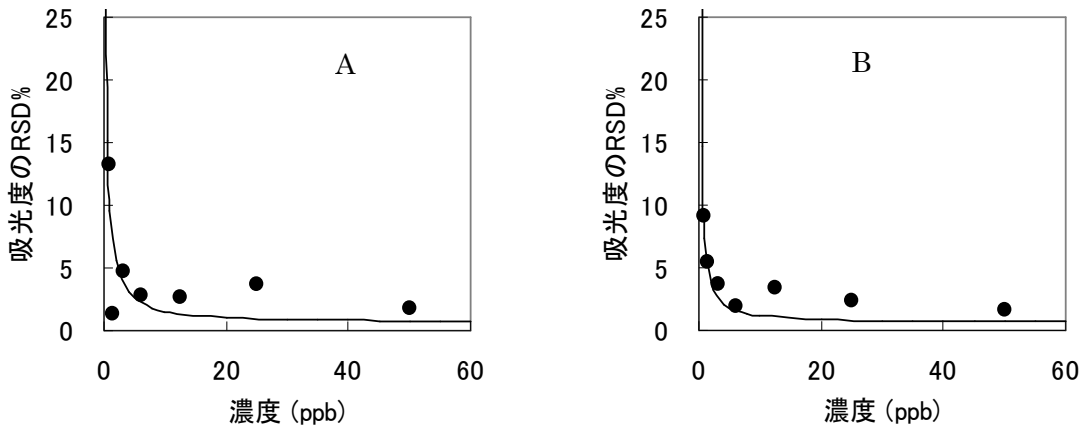
ρ_S =（ピペットによる注入量のRSD)・(2/3)

σ_W：ウェル自体の吸光度のSD（ウェル間の吸光度のSD)

f（X)：吸光度を表す検量線（Xは、分析対象物質の濃度)

ρ_X = 0.6%, σ_W = 0.004　として得られた精度プロファイル及び実測の精度を図 A-1　に示す。

同一溶液から得られる吸光度のばらつきは、吸光度が小さい低濃度範囲を除いて、概ねRSD%として5%以下である。



図A-１　　特定原材料検出キットの精度プロファイル

A. 森永生科学研究所製 FASPEK　特定原材料測定キット（卵白アルブミン）

B. 日本ハム社製 FASTKITエライザVer. Ⅱシリーズ（小麦）

●　各濃度の標準液の併行精度(n=６）　　実線　式A1より求めた精度

（別添５）

アレルゲンを含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン

試験室間バリデーションによりその性能が評価され､別添アレルゲンを含む食品の検査方法に示す基準を満たすことが示されている定量検査法又はこれと同等以上の性能を有すると既に認められている方法（以下「従来法」という。）に改良を加えた定量検査法（以下「改良検査法」という。）については、単一試験室での検討において以下のような性能を評価し、従来法と同等以上の性能を有することを示した場合には、従来法と同様にアレルゲンを含む食品の検査方法とみなすこととする。

１　検量線

改良検査法の検量線の濃度範囲及び定量性が、従来法と同等であることを示す。

２　従来法との相関

複数の試料について、従来法と改良検査法を用いて定量し、改良検査法が従来法と同等であることを示す。

具体的には、X軸に従来法による定量値、Y軸に改良検査法による定量値をとり、その相関をプロットする。このプロットについて、Y切片をゼロとする近似直線（Y=aX）を算出し、その傾きが0.75-1.25の範囲であること、相関係数が0.9以上であることを示す。

検査方法1種類につき､定量値が数μg/gから10,000 μg/gまで程度の範囲に偏ることなく分布する試料（ただし、対象濃度範囲における試料確保が困難な場合には10,000μg/gを超える試料を含んでもよいものとする。）について10種以上の検討を行い、従来法と改良検査法との相関をプロットするものとする。

また、上記の検討に加え、特に数μg/gから数10μg/gまでの範囲については、偏ることなく分布する10種以上の試料の定量値を改めて別にプロットし（ただし、対象濃度範囲における試料確保が困難な場合には高濃度試料を希釈して測定した際の測定値を使用してよいものとする。）、上記基準を満たす相関がみられることを確認する。

試料としては、

・市販加工食品

・食品材料に特定原材料たんぱく質を添加して調製したモデル加工食品
・特定原材料を含有する加工食品と特定原材料を含有しない同様の加工食品を混合し、特定原材料たんぱく質濃度を調製したもの
・特定原材料を含有しない加工食品に特定原材料たんぱく質を添加したもの等を使用する。また、動物性の食品、植物性の食品、加工度の高いもの、酸性を示す食品等、種々の特性を持つ食品を試料として使用することが望ましい。

上記の近似直線の傾きが0.8以下又は1.2以上の場合は、上記検討に加えて、３種類以上の試料（ただし、試料に含まれる特定原材料たんぱく質濃度レベルには10 μg/g程度を含むものとする。）を用いて回収率を検討し、50%以上150%以下の回収率となることを示すことが望ましい。

試料としては、上記と同様の加工食品で、特定原材料たんぱく質濃度が既知のものを使用する。

3　精度

1-20 μg/g程度の特定原材料たんぱく質を含有する試料（試料数2-3程度）を使用し、併行精度（試行回数は５回以上）及び日差変動（3-5日間程度）について検討する。

Ｆ検定を行い、従来法と改良検査法との間でこれらの精度及び変動が同等であること、また、同等でない場合には改良検査法の方の精度が高いことを示す。

また、その他、日内変動、分析者間変動、機器間変動等についても検討することが望ましい。

4　検出限界、定量限界

これらの値が従来法と同等又はより小さい値であることを示す。

5　特異性

偽陽性、偽陰性を示す食品について検討し、従来法との一致点及び相違点を明確に示す。

別添　機能性表示食品

機能性表示食品については、食品表示基準のほか、以下の告示及び通知を参照すること。

- 機能性表示食品のうち天然抽出物等を原材料とする錠剤、カプセル剤等食品の製造又は加工の基準（令和６年内閣府告示第 108 号）
- 食品表示基準第２条第１項第 10 号イの別表第 26 の１の項から６の項までの規定に基づき、内閣総理大臣が告示で定める届出並びに同号ロの別表第 27 の２の項第８号の規定及び４の項の規定に基づき内閣総理大臣が告示で定める遵守すべき事項その他の必要な事項及び報告の方法を定める告示（令和７年内閣府告示第 35 号）
- 機能性表示食品の届出等に関する手引き（令和７年３月 25 日付け消食表第 273 号食品表示課長通知）

別添

バルク輸送される北米産の非遺伝子組換え大豆及びデント種の非遺伝子組換えとうもろこしの分別生産流通管理の指針

１．農家の生産段階及びカントリーエレベーターの流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 種子の播種

種子証明書または種子名（番号）によるチェック

② 収穫

非遺伝子組換えのみを他のものと混じらないよう収穫

③ 農器具・機器

播種機、収穫機等の農機具・機器は非遺伝子組換え専用化、併用の場合クリーニング

④ 出荷又は集荷輸送のための車両等

車両等については非遺伝子組換え専用利用が望ましいが、専用利用されない車両等はあらかじめクリーニング

⑤ 保管施設及び搬出入施設

サイロ等の保管施設及び搬出入施設については非遺伝子組換え専用利用。時期をずらして使用する等専用利用されない保管施設及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

農家又は農家を管理すべき立場にあるカントリーエレベーター等の集荷業者

(3) 記録

種子名（番号)、出荷数量、出荷年月日、集荷（搬入農産物の種子名［番号]、購入農家、数量、年月日)、保管（品名、専用の場合を除きビン番号、数量、年月日)、入出庫（品名、専用の場合を除きビン番号、数量、年月日)、非遺伝子組換え専用利用されない場合クリーニング実施確認

(4) 確認主体

集荷業者は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

２．リバーエレベーターの流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 集荷輸送のためのトラック、貨車及びはしけ（バージ）

トラックについては非遺伝子組換え専用利用が望ましいが、専用利用されないトラック及び貨車、はしけはあらかじめクリーニング

② 保管施設及び搬出入施設

保管施設及び搬出入施設については非遺伝子組換え専用利用。専用利用されない保管施設及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体
リバーエレベーター
(3) 記録
集荷（搬入農産物の種子名[番号]、購入農家、数量、年月日)、保管（品名、専用の場合を除きビン番号)、入出庫（品名、専用の場合を除きビン番号、数量、年月日)、クリーニング実施確認
(4) 確認主体
集荷業者または輸入業者等は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

3．エクスポートエレベーター及び日本までの輸送段階
(1) チェックポイント及び管理方法
① 保管施設及び本船への積み込み施設
非遺伝子組換え専用利用されない保管施設及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング
② 船艙への積み込み
一つの船艙内に異なる品種（商品）を区分して搬入する場合には充分注意し、他との混入がないようにする。
③ 本船から内航船、はしけへの積み替え
非遺伝子組換え専用利用されないはしけ及び搬出入施設についてはあらかじめクリーニング
(2) 管理主体
エクスポートエレベーター及び港湾サイロの管理者もしくは管理受託者
(3) 記録
入荷、入出庫、輸出入（品名、数量、本船名、ハッチ番号、年月日、搬出入港)、クリーニング実施確認
(4) 確認主体
輸入業者は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

4．港湾サイロの日本国内流通段階
(1) チェックポイント及び管理方法
① サイロビン、バケットエレベーター、計量器、コンベア等サイロへの搬出入非遺伝子組換え専用利用されない港湾サイロ及び機器についてはあらかじめクリーニング
② 選別作業（バケットエレベーター、原料タンク、製品タンク、石抜き機、真比重選別機等）
非遺伝子組換え専用利用されない選別機器についてはあらかじめクリーニング
(2) 管理主体
倉庫業者及び選別業者等

(3) 記録

入荷、入出庫、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

荷主（卸売業者、製造業者及び輸入業者等）は、管理主体が上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

5．卸売業者（主として大豆）の流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① サイロへの搬出入

② バルク輸送の場合の輸送

③ 選別作業（バケットエレベーター、グラビティ・セパレーター、粗選別機、石抜き機、真比重選別機、選別機器、袋詰め等）

非遺伝子組換え専用利用されない保管施設、輸送車、選別作業、機器等についてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

卸売業者

(3) 記録

原料購入、原料保管、保管箇所ごとの入出庫、製品販売、袋詰め作業（品名、数量、荷姿、年月日)、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

卸売業者は、上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

6．加工業者（グリッツ・スターチ工場）の流通段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 原料搬入

搬入機器を使用する前に空運転して残留物がないことを確認すること。

② 選別施設

選別機器を使用する前に空運転して残留物がないことを確認すること。

③ グリッツ・スターチの製造ライン

従前の使用原料が不分別原料であった場合、製造施設に残留物がないことを確認するとともに微粉状あるいは液状の残留が懸念されるときは当該施設のクリーニングを行うこと。

④ グリッツ・スターチの保管・出荷

製品倉庫では不分別原料と保管場所を別にすること。

(2) 管理主体

グリッツ・スターチ製造業者

(3) 記録

原料購入、原料受払、製造、保管場所、製品入出庫、受渡、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

グリッツ・スターチ製造業者は、上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

７．食品製造業者の製造段階

(1) チェックポイント及び管理方法

① 原料搬入

証明書による非遺伝子組換え農産物の確認

② 原料分別保管

不分別原料との明確な区分保管

③ 製造ライン

非遺伝子組換え専用利用されない製造ラインについてはあらかじめクリーニング

(2) 管理主体

食品製造業者

(3) 記録

原材料購入（購入先、数量、製造、） 保管、出荷、クリーニング実施確認

(4) 確認主体

食品製造業者は、上記の管理方法で適正に管理したことを記録等により確認する。

８．証明書の発行及び保存

流通の各段階において確認が行われた旨の証明書を取引の相手方に発行し、かつ、当該証明書を受け取った者は、これを２年以上保存する。

別添

安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

最終改正

2026 年 4 月 1 日

-

目次

1. 検体採取方法 9

1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取 9

1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取 9

1.1.1.1. 袋積みの場合 9

1.1.1.2. ばら積みの場合 10

1.1.1.2.1. サイロ搬入時 10

1.1.1.2.2. はしけ搬入時 10

1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取 10

1.1.2. ダイズ及びトウモロコシの加工食品の検体採取 10

1.1.3. パパイヤの検体採取 11

1.1.3.1. 生鮮パパイヤの検体採取 11

1.1.3.2. パパイヤ加工品の検体採取 11

2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法 12

2.1. ダイズ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） 12

2.1.1. 定量 PCR 法 12

2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR 14

2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 14

2.1.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 16

2.1.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 16

2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 16

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR 17

2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 17

2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well） 17

2.1.1.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384 well） 19

2.1.1.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 19

2.1.1.2.5. 検量線の作成（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 19

2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR 20

2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000） 20

2.1.1.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000） 20

2.1.1.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000） 21

2.1.1.3.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7000） 21
2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR 21
2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 21
2.1.1.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 21
2.1.1.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 23
2.1.1.4.4. 検量線の作成（Applied Biosystems® 7500） 23
2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR 23
2.1.1.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System） 23
2.1.1.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System） 25
2.1.1.5.3. PCR（Roche LightCycler System） 25
2.1.1.5.4. 検量線の作成（Roche LightCycler System） 26
2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR 26
2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 26
2.1.1.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 26
2.1.1.6.3. PCR（QuantStudio 5） 27
2.1.1.6.4. 検量線の作成（QuantStudio 5） 27
2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR 28
2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 28
2.1.1.7.2.プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 28
2.1.1.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 29
2.1.1.7.4. 検量線の作成（QuantStudio 12K Flex） 29
2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR 29
2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 29
2.1.1.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 29
2.1.1.8.3. PCR（LightCycler® 96） 30
2.1.1.8.4. 検量線の作成（LightCycler® 96） 30
2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR 30
2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 30
2.1.1.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 31
2.1.1.9.3. PCR（LightCycler® 480） 31
2.1.1.9.4. 検量線の作成（LightCycler® 480） 31
2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算 32
2.1.3. 結果の判定 32
2.1.4. Liberty Link Soybean（Event A2704-12）定量法（参考検査法） 32
2.1.5. ELISA 法（参考検査法） 33

2.2. ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） 35
2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 35
2.2.1.1. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 35

2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 35
2.2.1.1.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 37
2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 38
2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 39
2.2.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 39
2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 39
2.2.1.2.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 39
2.2.1.2.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 40
2.2.1.2.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 40
2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR 40
2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 40
2.2.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 40
2.2.1.3.3. PCR（QuantStudio 5） 41
2.2.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 41
2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 41
2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 41
2.2.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 41
2.2.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 42
2.2.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 42
2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR 42
2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 42
2.2.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 42
2.2.1.5.3. PCR（LightCycler® 96） 42
2.2.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 43
2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 43
2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 43
2.2.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 43
2.2.1.6.3. PCR（LightCycler® 480） 43
2.2.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 44
2.2.2. 結果の判定 44

2.3. トウモロコシ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） 50
2.3.1. 定量 PCR 法 50
2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量 51
2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量 52
2.3.1.3. 結果の判定 52
2.3.2. マルチプレックス PCR 法 52
2.3.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング 53
2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 53

2.3.2.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 56
2.3.2.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 56
2.3.2.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 56
2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング 56
2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 56
2.3.2.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 57
2.3.2.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 57
2.3.2.2.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 57
2.3.2.3. 結果の判定（図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム） 58
2.3.3. 粒単位検査法 60
2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法 60
2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製 60
2.3.3.1.2. プレート情報の設定 61
2.3.3.1.3. PCR 61
2.3.3.1.4. PCR 結果の解析 61
2.3.3.2. 結果の判定 61
2.3.4. グループ検査法 61
2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法 62
2.3.4.1.1. 反応液の調製 62
2.3.4.1.2. プレート情報の設定 64
2.3.4.1.3. PCR 64
2.3.4.1.4. PCR 結果の解析 65
2.3.4.1.5 結果の判定（図 5 グループ検査法試験結果の判定スキーム） 66
2.3.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法） 69
2.3.4.2.1. リアルタイム PCR 69
2.3.4.2.2. プレート情報の設定 71
2.3.4.2.3. PCR 71
2.3.4.2.4. 結果の判定 72

2.4. トウモロコシ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） 72
2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 72
2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 73
2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 73
2.4.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 75
2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 75
2.4.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 75
2.4.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 76
2.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 76
2.4.1.2.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 76

2.4.1.2.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 77
2.4.1.2.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 77
2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR 77
2.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 77
2.4.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 77
2.4.1.3.3. PCR（QuantStudio 5） 78
2.4.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 78
2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 78
2.4.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 78
2.4.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 78
2.4.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 79
2.4.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 79
2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR 79
2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 79
2.4.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 80
2.4.1.5.3. PCR（LightCycler® 96） 80
2.4.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 80
2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 80
2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 80
2.4.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 81
2.4.1.6.3. PCR（LightCycler® 480） 81
2.4.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 81
2.4.2. 結果の判定 81

2.5. ダイズ加工食品の検査法 87
2.5.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR 87
2.5.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 87
2.5.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 88
2.5.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 88
2.5.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 88
2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR 89
2.5.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 89
2.5.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well） 89
2.5.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 90
2.5.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 90
2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 91
2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR 91
2.5.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000） 91
2.5.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000） 92

2.5.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000） 92
2.5.3.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7000） 92
2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 92
2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 92
2.5.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 93
2.5.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 93
2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 94
2.5.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR 94
2.5.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System） 94
2.5.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System） 95
2.5.5.3. PCR（Roche LightCycler System） 95
2.5.5.4. 測定結果の解析（Roche LightCycler System） 95
2.5.6. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR 95
2.5.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 95
2.5.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 96
2.5.6.3. PCR（QuantStudio 5） 96
2.5.6.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 96
2.5.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 96
2.5.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 96
2.5.7.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 97
2.5.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 97
2.5.7.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 97
2.5.8. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR 97
2.5.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 97
2.5.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 98
2.5.8.3. PCR（LightCycler® 96） 98
2.5.8.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 98
2.5.9. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 98
2.5.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 98
2.5.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 99
2.5.9.3. PCR（LightCycler® 480） 99
2.5.9.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 99
2.5.10. 測定結果の判定 100

2.6. トウモロコシ加工食品の検査法 103
2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 103
2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 103
2.6.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 105
2.6.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 105

2.6.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 105
2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 106
2.6.2.1. PCR 用反応液の調製*1（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 106
2.6.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 107
2.6.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 108
2.6.2.4. 測定結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 108
2.6.3. 測定結果の判定 108

2.7. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法 112
2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法 112
2.7.1.1. CTAB 法 112
2.7.1.2. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit:トウモロコシに適用） 114
2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用） 115
2.7.1.4. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用） 116
2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用） 117
2.7.1.6. シリカベースレジンタイプキット法（Promega Wizard DNA Clean-up System） 118
2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法 119
2.7.2.1. 検体前処理 120
2.7.2.1.1. ダイズ加工食品 120
2.7.2.1.2. トウモロコシ加工食品 123
2.7.2.2. DNA の抽出精製 124
2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用） 124
2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用） 126
2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出 127
2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用） 128
2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用） 129
2.7.2.2.6. CTAB を用いた DNA の抽出 130
2.7.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存 131
2.7.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製 131
2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製 132
2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製（NIPPON GENE GM quicker） 133

2.8. パパイヤ検査法（55-1 系統） 134
2.8.1. 検査原則及び試料調製法 134
2.8.2. GUS 試験法 134
2.8.2.1. 実験操作 134
2.8.2.2. 結果の判定 136
2.8.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 136
2.8.3.1. 試料前処理 137

2.8.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製 138
2.8.3.2.1. DNA の抽出精製*1 138
2.8.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存 140
2.8.3.3. リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500） 140
2.8.3.3.1. PCR 用反応液の調製 141
2.8.3.3.2. プレート情報の設定 141
2.8.3.3.3. PCR 142
2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定 142

（別紙 1）内標比 145

（別紙 2） トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順 152

（参考） 154

検査方法の同等性確認方法 156

別添　安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

1. 検体採取方法

1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取

1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取

遺伝子組換え農産物が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な一定量*を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。

* ダイズ及びトウモロコシの穀粒に関しては、1 検体（検体採取量 1 kg）のうち、500g を粉砕し検査に用い、残りの 500 g は穀粒の状態で保管する。トウモロコシ穀粒の粒単位検査法又はグループ検査法の際には、その残りの 500 g の穀粒から採取する。

1.1.1.1. 袋積みの場合

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量 (kg)	検体数
≦ 15	2	1	1
16 ～ 25	3	1	1
26 ～ 90	5	1	1
91 ～ 150	8	1	1
151 ～ 280	13	1	1
281 ～ 500	20	1	1
501 ～ 1,200	32	1	1
1,201 ～ 3,200	50	1	1
3,201 ～ 10,000	80	1	1
10,001 ～ 35,000	125	1	1
35,001 ～ 150,000	200	1	1
150,001 ～ 500,000	315	1	1
≧ 500,001	500	1	1

1.1.1.2. ばら積みの場合

1.1.1.2.1. サイロ搬入時

サイロに搬入する際に 1 サイロを 1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって 15 回、計 10 kg 以上を検体採取したものを縮分してサイロ毎に 1 検体（1kg 以上）とする。

既にサイロに搬入したものについては、他のサイロに移動させる時点で同様に検体採取を行う。

1.1.1.2.2. はしけ搬入時

はしけ（内航船を含む。）に搬入する際に 1 はしけを 1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって 15 回、計 10 kg 以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に 1 検体（1 kg 以上）とする。

1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取

既にはしけに搬入したものについて検体採取を行う場合、1 はしけを 1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるよう上層、中層、下層毎に各 5 カ所、計 15 カ所から、計 10 kg 以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に 1 検体（1 kg 以上）とする。

1.1.2. ダイズ及びトウモロコシの加工食品の検体採取

遺伝子組換え食品が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさに応じて、以下の表に従い検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの加工食品が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

ただし、ダイズ及びトウモロコシの粉砕加工品（コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、穀粒を粉砕したもの。）の検体採取については、1.1.1.1. 袋積みの場合に従う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量 (g)	検体数
≦ 15	2	120	1
16 ～ 50	3	120	1
51 ～ 150	5	120	1
151 ～ 500	8	120	1
501 ～ 3,200	13	120	1

3,201 ～ 35,000	20	120	1
35,001 ～ 500,000	32	120	1
≧ 500,001	50	120	1

1.1.3. パパイヤの検体採取

遺伝子組換え食品が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの果実が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

1.1.3.1. 生鮮パパイヤの検体採取

生鮮パパイヤの検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行うこと。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量(個)
≦ 50	2	2
51 ～ 500	3	3
501 ～ 35,000	5	5
≧ 35,001	8	8

1.1.3.2. パパイヤ加工品の検体採取

パパイヤ加工食品の検体採取については､対象となるロットの大きさに応じて 1.1.2. ダイズ及びトウモロコシの加工食品の検体採取の表に従い検体採取を行うこと。なお、果汁・飲料製品、氷菓等製品については、検体採取量を 480 g とする。また、パパイヤの含有量が少ない加工品について実施する場合は、製品分類ごとに複数回の前処理試行が可能となるよう適宜検体採取量を増やして採取する。

2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法

分別生産流通管理を実施したにもかかわらず、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入がある場合において、適切に分別生産流通管理を実施したとみなせる混入許容値は、ダイズ及びトウモロコシについては 5%となっている。混入許容値を超えているかどうかの判定は、ダイズ穀粒に関しては定量 PCR にて行う。また、トウモロコシ穀粒に関しては、まず、定量 PCR 又はマルチプレックスリアルタイム PCR を用いたスクリーニング検査を実施し、混入許容値を超えている可能性があると判定された場合、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

一方、分別生産流通管理を実施した非遺伝子組換えダイズ穀粒及びトウモロコシ穀粒について、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入があるかどうかの判定は、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR を実施する。

ダイズ及びトウモロコシの加工食品に関しては、遺伝子によって加工過程での DNA 分解率が一定でないため、定量 PCR 及びマルチプレックスリアルタイム PCR を用いたスクリーニング検査によって、加工食品の原材料であるダイズ又はトウモロコシについて、遺伝子組換え農産物の意図せざる混入が許容値を超えているかどうかの正確な判定はできない。そのため、ダイズ及びトウモロコシの加工食品においては、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。

パパイヤに関しては、生鮮食品及び加工食品共にリアルタイム PCR を用いた定性 PCR を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。

2.1. ダイズ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法）

遺伝子組換えダイズに関しては、国内に流通する Roundup Ready Soybean（40-3-2）（以下「RRS」という。）、Roundup Ready 2 Yield（Event MON89788）（以下「RRS2」という。）及び *Streptomyces viridochromogenes* 由来の phosphinothricin-N-acetyltransferase（以下「PAT」という。）を持つ系統を対象とする。PAT を持つ遺伝子組換えダイズとしては、A2704-12、A5547-127、DAS44406、DAS68416、DAS81419、SYHT0H2 等がある。

2.1.1. 定量 PCR 法

TaqMan Chemistry を応用した定量 PCR 法を行う。同法では、プライマー対及び蛍光オリゴヌクレオチドプローブを使用する。当プローブはプライマー対により増幅される塩基配列中に相補鎖を形成するよう設計されている。また、同プローブにはレポーター、クエンチャー両色素が結合しており、DNA ポリメラーゼによる増幅産物の伸長反応に伴い加水分解を受けると、蛍光を放射する。蛍光強度は、PCR サイクル数に対し指数関数的に増強し、また一定の蛍光強度に達するまでのサイクル数は、鋳型 DNA 量に依存する。したがって、一定の蛍光強度に達した PCR サイクル数を比較することで、鋳型 DNA 量が求められる。

遺伝子組換え農産物の定量は、非組換え体、組換え体を問わず普遍的に存在する遺伝子（内在性遺伝子）を内標として用い、内在性遺伝子のコピー数に対する組換え遺伝子のコピー数を求めることで行う。本法においては、標準物質として標準プラスミド DNA 溶液*1 を使用する。標準プラスミド DNA 溶液に含まれる DNA の量はコピー数として規定されており、そのため、定量 PCR の結果はコピー数として求められる。

ダイズを対象とした定量 PCR 法においては、ダイズに普遍的に存在するレクチン遺伝子（以下「Le1」という。）を内在性遺伝子としている。検査の際には、まず Le1 を標的とするプライマー対（Le1-n02）とプローブ（Le1-Taq）*2 を使用し定量 PCR を行い、DNA 試料液中の Le1 のコピー数を求める。また、同時に、同一 DNA 試料液について、組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ*3 を使用し別に定量 PCR を行い、組換え遺伝子のコピー数を求める。組換え遺伝子のコピー数を Le1 のコピー数で除し、その値をあらかじめ求められている係数（内標比*4）でさらに除して得られた値に 100 を乗じたものが、試料中に含まれる遺伝子組換え作物の含有率（重量パーセント）となる。

以下に定量 PCR 法の実際を述べる。定量 PCR は、RRS 検知法は ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT（96 well 及び 384 well）、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。RRS2 検知法及び PAT 検知法は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。また、使用する機種により、試薬、反応液組成、反応条件、手技及び解析手法が異なるため、検査に際しては、以下機種ごとに記載された各項に従い、必ず使用する機種に適した方法を用いること。なお、PCR 法で用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ･cm まで精製した超純水とする。

*1 標準プラスミド DNA 溶液

標準プラスミド DNA（内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とした特異的プライマー対により増幅された増幅産物をプラスミド上に連結したもの）を、ColE1/TE 溶液（5 ng/μL）で規定のコピー数となるように希釈した溶液。本分析法においては 20、125、1,500、20,000、250,000 コピーの 5 段階希釈液に加え、標準プラスミド DNA の含まれていない ColE1/TE 溶液（5 ng/μL）をブランク試料液（NTC : no template control）とした、計 6 点について検量線を作成する。なお、ColE1/TE 溶液とは、大腸菌由来の配列確認のされているプラスミド（ColE1 プラスミド）を TE 緩衝液で 5 ng/μL の濃度に調製した溶液である。ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

RRS 検知：GM ダイズ（RRS）陽性コントロールプラスミド

RRS2 検知：GM ダイズ（RRS2）陽性コントロールプラスミド

PAT 検知：GM ダイズ（PAT）陽性コントロールプラスミド

*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ

Le1n 02-5’（5’-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3’）、

Le1n 02-3’（5’-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3’）及び

Le1-Taq（5’-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA -3’）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

RRS 検知：RRS 01-5’（5’-CCTTTAGGATTTCAGCATCAGTGG-3’）、

RRS 01-3’（5’-GACTTGTCGCCGGGAATG-3’）及び

RRS-Taq（5’-FAM-CGCAACCGCCCGCAAATCC-TAMRA-3’）

RRS2 検知：MON89788-F（5’-TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT-3’）、

MON89788-R（5’-TCGAGCAGGACCTGCAGAA-3’）及び

MON89788-P（5’-FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-TAMRA-3’）

PAT 検知：PAT-120F（5’-AGATACCCTTGGTTGGTTGCTG-3’）、

PAT-120R（5’-ATGTGACACGTAAACAGTACTCTCA-3’）及び

PAT-1-Taq（5’-FAM-TGCTTACGCTGGGCCCTGGAAG-TAMRA-3’）

*4 内標比

純粋な遺伝子組換え体の種子を対象に定量 PCR を実施し、得られる組換え遺伝子のコピー数と内在性遺伝子（ダイズの場合 Le1）のコピー数との比を求めたもの。この内標比は各組換え作物系統に固有であり、常に一定の値を示すと考えられる。各プライマー対及びプローブを用いて測定を行った組換え作物系統ごとの内標比は別紙 1 に規定する。PAT を用いた際の内標比は DAS44406 を対象として算出されたものを用いる。同系統は組換え遺伝子中に PAT 配列が 1 コピーしか存在しないことから、遺伝子組換えダイズの含有率を過小評価する可能性は低い。なお、内標比は定量 PCR 法に使用する機種によって異なるため、混入率の算出時には必ず使用した機種につき規定されている内標比を用いること。また、使用する試薬によっても影響を受ける可能性が考えられるため、最終頁の（参考）にも記載のある機種に適した試薬類を確認の上、使用すること。

2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR

2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 12.5 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μM）0.5 μL、対象プローブ溶液（10 μM）0.5 μL、水 9 μL 及び 20 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL（50 ng）、検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2.5 μL 又は 5 ng/μL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液：NTC）2.5μL。試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する*2。

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ TaqMan® Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*3 を先に調製しておき、これと TaqMan® Universal PCR Master Mix を 1 : 1.25 の比率で混合させるとよい。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA 試料液（3 ウェル分）当たり 81 µL が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*4 の微量遠沈管に 78.75 µL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 8.75 µL 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 µL/well として 96 ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からプレートの蓋*5 をする。このとき、片側にゆがみがたまらないよう両側のウェルから交互に閉める。次いで専用ローラーを用いて完全にウェルを密閉する。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。なお、TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに FastGene™ QPCR Probe Mastermix（日本ジェネティクス社）等を用いることもできる。

*2 定量 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*3 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が 1.25 µM、対象プローブ濃度が 0.5 µM となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

*4 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液（5 点）及びブランク試料液（1 点）、この計 6 点に DNA 試料液の数を加えた数。

*5 96 ウェルプレート及びプレートの蓋

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical 8-Cap Strips（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。

2.1.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「STND」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液*1、「NTC」: ブランク試料液、「UNKN」: DNA 試料液）の設定を行う。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを Replicate として指定する*2。またプローブ特性に関しては、「STND」、「NTC」、「UNKN」のそれぞれについて Reporter が「FAM」、Reference が「ROX」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する。

*1 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

*2 Replicate としての指定

同一の溶液を分注したウェルに付けた名称（name 欄に入力）と同一の名称を、replicate 欄に入力する。

2.1.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

装置にプレートをセットし、装置の蓋の温度（Cover temperature）が 105°C 付近になったことを確認した後、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量（ΔRn）をプロットした増幅曲線（Amplification Plot）上で、検量線用標準プラスミド DNA 溶液及び DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している ΔRn 部を選択し、Threshold line（Th）を引く。この際、ブランク試料液（NTC）で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と検量線用標準プラスミド DNA 溶液の蛍光シグナルが交差した点を Threshold cycle（Cq）値*1 とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数値（x 軸）に対する Cq 値（y 軸）をプロットし、各 Cq 値に対して得られた近似直線を検量線とする*2。

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5 及び QuantStudio 12K Flex では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本法では表記を Cq 値に統一する。

*2 実際は Th を引いた後、「Amplification Plot」ウインドウ上にある、「Update Calculations」ボタンを押すことで、検量線は自動作成される。この検量線は「Analysis」タブから「Standard Curve」を選択することで表示させる。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR

2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*1。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well）

PCR 用反応液は 20 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 10 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μM）0.4 μL、対象プローブ溶液（10 μM）0.4 μL、水 7.2 μL 及び 20 ng/μL DNA 試料液 2 μL（40 ng）、検量線用標準プラスミド DNA 溶液 2 μL*2 又は 5 ng/μL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液 : NTC）2 μL。

試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する*3。

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ TaqMan® Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*4 を先に調製しておき、これと TaqMan® Universal PCR Master Mix を 1：1.25 の比率で混合させるとよい。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1DNA 試料液（3 ウェル分）当たり 66 μL が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*5 の微量遠沈管に 63 μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 7 μL 加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 20 μL/well として 384 ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。この時、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*6。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix
本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注するときは、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液
ABI PRISM® 7900HT 384 well を用いた試験においては、反応液に添加する検量線用標準プラスミド DNA 溶液の液量を 2 μL としている。このため、対応するコピー数は、16、100、1,200、16,000、200,000 となる。コピー数の設定を誤ると、正確な測定が行えないため、注意する。

*3 定量 PCR 用反応液の調製
冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*4 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
対象プライマー対濃度が 1.25 μM、対象プローブ濃度が 0.5 μM となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

*5 分注必要数
検量線用標準プラスミド溶液（5 点）及びブランク試料液（1 点）、この計 6 点に DNA 試料液の数を加えた数。

*6 384 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.1.1.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384 well）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*1。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

*1 Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well）に記載したように、96 ウェルを使用する場合と、384 ウェルを使用する場合では、液量の違いから、コピー数が異なるため注意する。

2.1.1.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。また、96 ウェルと 384 ウェルでは反応液量が異なることから、それぞれにあった液量での設定を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.1.1.2.5. 検量線の作成（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり*。

* 実際は Th を引いた時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR

2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*1。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.1.1.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*1。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

*1 Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

2.1.1.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.1.1.3.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7000）

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり*。

* 実際は Th を引き、「Analyze」ボタンを押した時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR

2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.1.1.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を

行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*1。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Standard」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「NTC」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

*1 Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

なお、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、トップ画面で「Advanced Setup」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する*3。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「AssignTargets and Samples」画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「S」：検量線用標準プラスミド DNA 溶液*4、「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*3 Target の設定

Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

*4 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

2.1.1.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合は、反応条件の設定において RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。なお下降部分は 100%のままで使用する。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.4.4. 検量線の作成（Applied Biosystems® 7500）

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり*。

* 実際は Th を引き、「Analyze」ボタンを押した時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR

2.1.1.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System）

PCR 用反応液は 20 μL/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes*1 2 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー，25 μM）0.4 μL、対象プローブ（10 μM）0.4 μL、水 9.8 μL、$MgCl_2$ 溶液（25 mM）2.4 μL 及び 10 ng/μL DNA 試料液 5 μL（50 ng）、検量線用標準プラスミド DNA 溶液 5 μL*2 又は 5 ng/μL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液：NTC）5 μL。試験は、検量線用標準プラスミド DNA 溶液、及び NTC に対し 1 キャピラリー、1 DNA 試料液に対し 2 キャピラリー併行で行うものとし、DNA 試料液に対する PCR 用反応液は 2 キャピラリー分を同時に調製する*3。

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ LC-FastStart DNA Master Hybridization

Probes に $MgCl_2$ 溶液、水、対象プライマー対及び対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。この際、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*4 を先に調製しておき、これと LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes、$MgCl_2$ 溶液、水の混合液を 8：7 の比率で混合させるとよい。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 キャピラリー当たり 19.8 μL が適当である。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*5 の微量遠沈管に分注する。分注の液量は検量線用標準プラスミド溶液及び NTC に対し 18 μL、DNA 試料液に対し 36 μL とする。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 溶液を 6 μL （検量線用標準プラスミド溶液及び NTC）又は 12 μL（DNA 試料液）加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 20 μL/キャピラリーとして分注する。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作*6 を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。

*1 LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe（Roche Diagnostics 社）に内包されている LC-FastStart Enzyme（1a red cap）と LC-FastStart Reaction Mix HybProbe（1b colorless cap）とを混合し、調製する。調製した LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes は、4°C で一週間の保存が可能である。また、本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液
Roche LightCycler System を用いた試験においては、反応液に添加する検量線標準プラスミド DNA 溶液の液量を 5 μL としている。このため、対応するコピー数は、40、250、3,000、40,000、500,000 となる。コピー数の設定を誤ると、正確な測定が行えないため、注意する。

*3 定量 PCR 用反応液の調製
冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。また、Roche LightCycler System を用いた定量 PCR においては、試験を検量線用標準プラスミド DNA 溶液、及び NTC に対し 1 キャピラリー、1DNA 試料液当たり 2 キャピラリー併行で行う。装置にかけられるキャピラリーの総数、及び 1 度の反応につき内在性遺伝子並びに組換え遺伝子の両方を測定することから、1 回の測定当たり測定可能な DNA 試料液の最大数は 5 となる。

*4 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液
対象プライマー対濃度が 1.25 μM、対象プローブ濃度が 0.5 μM となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

*5 分注必要数

検量線用標準プラスミド溶液（5 点）及びブランク試料液（1 点）、この計 6 点に DNA 試料液の数を加えた数。

*6 遠心操作

遠心操作は、キャピラリーの破損を避けるため、専用のカローセル遠心機を使用し行うか、又は汎用の遠心機を使用する場合には 700×g 以下、フラッシュの条件で行う。なお、遠心操作の如何に関わらず、装置本体にセットする前にはキャピラリーをカローセルに装填する。この際も、キャピラリーの破損に十分注意しつつ、しっかりとセットすること。

2.1.1.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System）

反応に際しては、キャピラリー情報の設定を行わなければならない。具体的にはサンプルリスト作成画面上で、調製したキャピラリーの配置（カローセル上の配置）に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液*1、「Negative」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Type 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 キャピラリーについては Replicate であることを指定する*2。また、Seek Temperature を 30°C と設定し、Maximum Position にはカローセルに装填したキャピラリーの最大位置番号を入力する。

*1 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。各検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したキャピラリーに対し、Concentration 欄にコピー数を入力する。対応するコピー数は、40、250、3,000、40,000、500,000 である。

*2 Replicate の指定

例えば、キャピラリー位置番号の 7 と 8 に同一の溶液を分注した場合、まず番号 7 に関する情報を設定し、その後、番号 8 は番号 7 の Replicate であることを指示する。具体的には番号 8 の Replicate 欄において「7」を入力することで指示を行う。

2.1.1.5.3. PCR（Roche LightCycler System）

装置にカローセルをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。95°C、10 分間の条件で加温したホットスタート法により反応を開始した後、95°C 15 秒、59°C 30 秒（1°C /秒）*1 を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行う。増幅反応終了後、40°C 30 秒の条件で保つ。データの取り込みは、増幅反応の各サイクル終了時に行わせるよう設定する*2。

*1 加温、冷却速度

ここに示している以外、加温、冷却の速度は 20°C /秒とする。

*2 データの取り込み設定

データの取り込み設定の実際は、サイクルプログラムデータ画面において、59°C 30 秒と設定したカラムについて「Acquisition Mode」を「Single」と設定する。

2.1.1.5.4. 検量線の作成（Roche LightCycler System）

反応が終了していることを確認した後に、解析を行う。解析は「Fit Point 法」を用いて行う。内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。Base Line は Proportional とし、Number of Points は 2 とする。解析する検体のみを選択した状態にし、Noise Band を 0.1 に設定する。上記条件にて検量線を作成させ、Error 値*が 0.2 以下であった場合には、その際に得られた数値を解析値とする。

* 検量線の Error 値が 0.2 以上になる場合には以下の検討を行う。Crossing Line の調整幅（Crossing Line を移動させる範囲）を 0.1 から 0.2 の間とし、手動で Crossing Line を移動させる。移動させながら検量線の Error 値が最小となるような Crossing Line を設定し、その時点で得られる数値を解析値とする。上記解析を行ってなお検量線の Error 値が 0.2 以上になる場合には、検量線から大きく外れている検量線用標準 DNA 溶液 1 点を解析対象から外し、同様の解析を行う。以上の解析を行っても Error 値が 0.2 以上になる場合にはその解析条件下での最小 Error 値を示した時点の数値を解析値とする。

2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR

2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおりである。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.1.1.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェ

ア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「S」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

*1 Target の設定
Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定
検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

2.1.1.6.3. PCR（QuantStudio 5）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.6.4. 検量線の作成（QuantStudio 5）

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり*。

* 実際は Th を引き、「Analyze」ボタンを押した時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR

2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおりである。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.1.1.7.2.プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する*1。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「S」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液*2、「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

*1 Target の設定

Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

*2 検量線用標準プラスミド DNA 溶液の設定

検体の種類の設定に加えて、コピー数を設定する。同一の検量線用標準プラスミド DNA 溶液を分注したウェルを選択した状態で、Quantity 欄にコピー数を入力する。

2.1.1.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.1.1.7.4. 検量線の作成（QuantStudio 12K Flex）

検量線の作成は、2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり*。

* 実際は Th を引き、「Analyze」ボタンを押した時点で検量線は自動作成される。検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.990 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR

2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、シーリング用アプリケーターを用いて行う*。最後に、プレート遠心機で 1500×g、2 分間スピンダウンする。

* 96 ウェルプレート及びシール

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.1.1.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96）

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し{Gene}に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子

の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液、「Negative control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Type において指定する。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、Name に名称を入力しておく。また Standard では Concentration の欄にコピー数を入力する。

2.1.1.8.3. PCR（LightCycler® 96）

本体の［Eject］をタッチしてブロックを引き出し、96 ウェルプレートを切欠き部を右下にしてサーマルブロック上に載せ、セットして閉じる。Detection Format で［FAM］を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で以下の反応条件を設定する。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応とする。［Start］をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.1.1.8.4. 検量線の作成（LightCycler® 96）

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル（Cq）値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルの Cq 値を算出する*1。
次に、各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の常用対数値（x 軸）に対する Cq 値（y 軸）をプロットした線形回帰直線を検量線とする*2。

*1 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット（色素）に依存する。

*2 実際は［Analysis］で Add Analysis から Abs Quant を選択した時点で検量線は自動作成される。Negative control から増幅がないこと、検量線においては「Corr.」の値を確認し、0.99 以上であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR

2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成及び実際の調製のウェルプレートへの分注までは 2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおり。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェル

を密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、シーリング用アプリケーターを用いて行う*。最後に、プレート遠心機で 1500×g、2 分間スピンダウンする。

* 96 ウェルプレート及びシール
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.1.1.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480）

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、（+）ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類（「Standard」: 検量線用標準プラスミド DNA 溶液、「Negative Control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を選択する。また、Standard では Concentration の欄にコピー数を入力する。

2.1.1.9.3. PCR（LightCycler® 480）

本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出しプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.1.1.9.4. 検量線の作成（LightCycler® 480）

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cp（Cross point）値とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数値（x 軸）に対する Cp 値（y 軸）をプロットし線形又は非線形（多項式）回帰線として自動的に表示し、検量線とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cp 値が表示される。Negative Control が増幅していない（Cp 値を算出していない）ことを確認の後、検量線においては「Error.」の値を確認し、0.2 未満であった場合に以降のコピー数の算出を行う。

2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算

未知 DNA 試料液につき検量線作成で用いた Th を使用して Cq 値を求め、内標遺伝子及び組換え遺伝子につき、それぞれの検量線から各 3 ウェル*とも内在性遺伝子のコピー数を内挿し、それにより得られる値の平均を内在性遺伝子のコピー数及び組換え遺伝子のコピー数とする。次に、次式に従って、対象遺伝子組換え農産物含有率を求める。

対象遺伝子組換え農産物含有率（%）=

［組換え遺伝子のコピー数／（内在性遺伝子のコピー数×内標比）］×100

* Roche LightCycler System を用いた場合には、1 DNA 試料液当たり各 3 ウェルではなく、2 キャピラリーで実施するので、2.1.1.5.4.項で得られた 2 キャピラリー分のデータの平均値を内在性遺伝子のコピー数及び組換え遺伝子のコピー数とする。

2.1.3. 結果の判定

1 検体の粉砕試料（500 g）につき DNA を 3 併行抽出し、DNA 試料を得る（3DNA 試料/1 検体）。各 DNA 試料について、定量 PCR 法により得られた RRS の含有率に RRS2 の含有率と PAT の含有率を加え、3 併行抽出した DNA 試料の平均値を算出する。その値が 5%を超えた試料については、不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

2.1.4. Liberty Link Soybean（Event A2704-12）定量法（参考検査法）

参考検査法として、遺伝子組換えダイズ Liberty Link Soybean（Event A2704-12）（以下「LLS」という。）に特異的なリアルタイム PCR 法を用いることができる。同法では検体中の LLS の混入率の定量が可能である（注意：LLS は PAT を持つため、検体に LLS が混入している場合、PAT と LLS を二重に定量することになり、2.1.3.で算出された平均値に同法で算出された LLS の含有率を加えた平均値で分別生産流通管理の判定はできない。）。LLS の混入率は 2.1.1. 定量 PCR 法[*1,2,3]を用いて、Le1 のコピー数に対する LLS のコピー数を求めることで算出する。定量 PCR は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、

LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。操作方法については、2.1.1.2.、2.1.1.4.、2.1.1.6.～2.1.1.9.及び 2.1.2.と同様に行う。

*1 標準プラスミド DNA 溶液
　LLS 検知：GM ダイズ（LLS）陽性コントロールプラスミド
*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ
　Le1n 02-5’（5’-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3’）、
　Le1n 02-3’（5’-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3’）及び
　Le1-Taq（5’-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA -3’）
*3 LLS を標的とするプライマー対とプローブ
　KVM175（5’-GCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT-3’）、
　SMO001（5’-ATTCAGGCTGCGCAACTGTT-3’）及び
　TM031（5’-FAM-CGGTCCTCCGATCGCCCTTCC-TAMRA-3’）

2.1.5. ELISA 法（参考検査法）

参考検査法として、試料中の CP4EPSPS タンパク質を検知する ELISA 法を用いることができる。CP4EPSPS タンパク質は Roundup Ready 組換え体において発現しており、同法では検体中の Roundup Ready 組換え体の混入率の定量が可能である（注意：本法では RRS2 及び LLS の混入率は定量できないため、分別生産流通管理の判定はできない。なお、RRS2 が交差反応性を示すことは確認されている。）。

1）Romer Labs Inc.社製 AgraQuant® RUR ELISA Soya Grain GMO Chek™ による方法

100 mesh（編み目の一目の長さ 150 μm）のふるいを通過した粉末試料 0.5 g を用いて、Romer Labs Inc.社製 AgraQuant® RUR ELISA Soya Grain GMO Chek™ の説明書に記載された手法に従って試験する。以下に方法について記述する。

試料又は標準試料*0.5 g をポリプロピレン製遠沈管（15 mL 容）に正確に量り採り、Soya Extraction 緩衝液 4.5 mL を加え、ボルテックスミキサーを用い 10 秒間混合した後、2,500×g で 15 分間遠心し、上清を抽出液とする。Soya Assay 緩衝液 280μL に抽出液 20 μL を加え撹拌し希釈液とする。さらに、Soya Assay 緩衝液 380 μL に希釈液 20 μL を加え撹拌し、試料液とする。このキットで作成できる検量線の範囲は 0～2.5%であるので、未知検体の抽出液について検量線の範囲内で定量値が内挿できるよう、別に 10 倍希釈した試料液も準備しておく。ウェルに試料液を 100 μL ずつ加え、37°C で 1 時間保温する。その後、希釈済洗浄バッファーで 3 回洗浄し、希釈済 RUR 大豆複合体液 100 μL を加え、37°C で 1 時間保温する。さらに、希釈済洗浄バッファーで 3 回洗浄する。次に、発色液 100 μL を加え、室温で 10 分間放置した後、反応停止液 100 μL を加えて反応を停止する。反応停止後、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の波長でウェルの吸光度を測定し、別途購入した標準試

料を用い作成した検量線より組換え体の含有量を求める。なお、同一の実験を 2 ウェルで行い、得られた値を平均する。

2） EnviroLogix Inc.社製 QualiPlate™ Kit for Roundup Ready® による方法

40 mesh（編み目の一目の長さ 425 μm）のふるいを通過した粉末試料 20～50 g を用いて、EnviroLogix Inc.社製 QualiPlate™ Kit for Roundup Ready®の説明書(Rev.11-03-15)末尾 Testing Roundup Ready Soy Bulk Grain or Flour に記載された手法に従って試験する。以下に方法について記述する。

所定の濃度に調製した標準試料*1.0 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に正確に量り採り、蒸留水（あるいは脱イオン水）50 mL を加え、ボルテックスミキサーを用い 30 秒間混合した後、1 時間静置する。振とうした後、5,500×g で 5 分間遠心し、上清を標準ストック液とする。0.25 mL ずつマイクロチューブに分注し、霜取り機能なしの冷凍庫で－20°C 保管することで 6 か月間安定的である。

試料 20～50 g を容器に正確に量り採り、蒸留水（あるいは脱イオン水）1 g 当たり 5 mL を加え（試料 20 g の場合 100 mL）、ボルテックスミキサーを用い 20～30 秒間混合した後、1 時間静置する。振とうした後、5,500×g で 5 分間遠心し、浮遊の油脂層を除いた水層上清を抽出液とする。抽出液 20 μL と洗浄バッファー液 980 μL を混合撹拌し 50 倍希釈し、試料液とする。抽出・希釈は試験当日に行う。

各標準ストック液を解凍して 100 μL を分取し､洗浄バッファー液 400 μL を加え、5 倍希釈し、参照標準液とする。解凍した標準液は 48 時間以内に使用する。使用する全ウェルに Enzyme Conjugate 液を 50 μL ずつ加える。次いで、適宜のウェルに試料液、参照標準液、及びブランクとして洗浄バッファー液を 50 μL 加え、20～30 秒間プレートを回転させ内容液を混合する。プレートにパラフィルムをかぶせ、室温（18～27°C）で 45 分間保温する（可能なら 200 rpm で回転振とうさせておく。）。その後、洗浄バッファー緩衝液 1 ウェル当たり 300 μL で 4 回洗浄する。次に、Substrate 100 μL を加え、20～30 秒間プレートを回転させ内容液を混合する。プレートに新しいパラフィルムをかぶせ、室温で 15 分間保温する。（可能なら回転振とう）Stop Solution 100 μL を加えて反応を停止する。反応停止後、マイクロプレートリーダーを用い､450 nm の波長でウェルの吸光度を測定し(副波長 600～650 nm)、標準試料を用い作成した検量線より組換え体の含有量を求める。なお、同一の実験を 2 ウェルで行い、得られた値を平均する。

* 標準試料は、別売されている標準大豆を使用してもよい。European Commission Joint Research Centre の提供するカタログ番号 ERM-BF410ap～ERM-BF410ep を購入して使用してもよい。また、RRS2 を基準として測定する場合には、The American Oil Chemists' Society (AOCS)の提供するカタログ番号 AOCS 0906-A～AOCS 0906-B を購入して使用してもよい。

2.2. ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）

本検査法により検体陽性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性があるもの、検体陰性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性がないものとして取扱うこととする。

2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

本法では、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、ダイズに普遍的に存在する内在性遺伝子として Le1、RRS 等に共通して存在する組換え配列として *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter（以下「P35S」という。）、DAS44406 等に共通して存在する組換え配列として PAT、並びに RRS2 を検知する 4 試験を行う。PCR 装置は、P35S 及び RRS2 試験については、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行うことができる。PAT 試験については、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行うことができる。

また、本法は、標準試料液を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、DNA 試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における Cq 値と各標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差［ΔΔCq = ΔCq(DNA 試料液) – ΔCq(標準試料液)］を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液*を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。

* 標準プラスミド DNA 溶液

本法においては、Le1 検知試験用：100,000 コピー/mL、P35S 検知試験用：50 コピー/mL、PAT 検知試験用：50 コピー/μL 及び RRS2 検知試験用：50 コピー/mL を使用する。GM ダイズ混入判定用プラスミドセットとして、ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

2.2.1.1. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。

TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）[*1] 12.5 μL、対象プライマー対溶液[*2,3]（各プライマー、25 μM）0.5 μL、対象プローブ溶液[*2,3]（10 μM）0.5 μL、水 6.5 μL 及び 10 ng/μL DNA 試料液 5 μL（50 ng）、標準プラスミド DNA 溶液 5 μL 又は 5 ng/μL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液：NTC）5μL[*4]。DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液はいずれも検知試験ご

と、かつ、2 ウェル併行で行う。また、PCR 用反応液は 2 ウェル分を同時に調製する。

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、検知試験ごとに以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ TaqMan® Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 検体の場合は 1 検知試験当たり 208 μL が適当である（下記表参照）。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*5 の微量遠沈管に 46.4 μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液又はブランク試料液を 11.6 μL 加え、十分に撹拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 μL/well として 96 ウェルプレート上のウェルに分注する。このとき、DNA 試料液については、ΔCq 値を算出する際の各検知試験のウェルの組合せを決めること*6。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*7。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて（又はプレート用の遠心機が使用できる場合は、遠心して）気泡を抜いておく。

マスターミックス	**必要量 1 ウェル当たり (μL)**	**1 検知試験当たり (μL)**
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12.5	130.0
対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μM）	0.5	5.2
対象プローブ溶液（10 μM）	0.5	5.2
水	6.5	67.6
合計	20.0	208.0

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ

Le1n 02-5’（5’-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3’）、

Le1n 02-3’（5’-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3’）及び

Le1-Taq（5’-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA -3’）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

P35S 検知：

P35S 1-5’（5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’）、

P35S 1-3’（5’- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3’）及び

P35S-Taq（5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3’）

PAT 検知：

PAT-120F（5’-AGATACCCTTGGTTGGTTGCTG-3’）、

PAT-120R（5’-ATGTGACACGTAAACAGTACTCTCA-3’）及び

PAT-1-Taq（5’-FAM- TGCTTACGCTGGGCCCTGGAAG-TAMRA-3’）

RRS2 検知：

MON89788-F（5’-TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT-3’）、

MON89788-R（5’-TCGAGCAGGACCTGCAGAA-3’）及び

MON89788-P（5’-FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-TAMRA-3’）

*4 定性 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*5 分注必要数

標準プラスミド DNA 溶液（1 点）及びブランク試料液（1 点）の計 2 点に DNA 試料液の数を加えた数。

*6 DNA 試料液における各検知試験のウェルの組合せ

標準プラスミド DNA 溶液は、2 ウェル併行の平均 Cq 値から ΔCq 値を算出するが、DNA 試料液については、1 ウェルごとの Cq 値から ΔCq 値を算出する。このため、各検知試験の 2 ウェル併行から 1 ウェルずつ選択し、ΔCq 値を算出するウェルの組合せを決めることが必要となる。なお、P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験は、異なるウェルプレート上で行うことも可能だが、その場合はそれぞれのウェルプレート上で Le1 検知試験を行うことに留意する。

*7 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.2.1.1.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まずプローブ特性の設定を行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前[*1] の場合は、プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する[*2]。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置及び種類

を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

*1 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合
まず、トップ画面で「Advanced Setup」を選択し、新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する標準プラスミド DNA 溶液、DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「Assign Targets and Samples」画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。
*2 Detector の設定
Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）
装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合、反応条件の設定において RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。なお、下降部分

は 100%のままで使用する。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）

サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量（ΔRn）をプロットした増幅曲線（Amplification Plot）上で、DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している ΔRn 部を選択し、Threshold line（Th）を引く*。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と DNA 試料液由来の蛍光シグナルが交差した点を Cq 値とする。

* 通常、Th 値は 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。

2.2.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad* を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.2.1.2.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

* Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.2.1.2.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。なお、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.2.1.2.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.2.1.3.3. PCR（QuantStudio 5）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.2.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR

2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。ただし、96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、以下の注釈を参照すること*。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.2.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96）

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し{Gene}に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Type において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、Name に名称を入力しておく。

2.2.1.5.3. PCR（LightCycler® 96）

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、96 ウェルプレートを切欠き部を右下にしてサーマルブロック上に載せ、セットして閉じる。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 μL と設定する。Profile で反応条件を設定す

る。反応条件は 2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。[Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.2.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96）

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル（Cq）値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルの Cq 値を算出する*。

* 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット（色素）に依存する。

2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。ただし、96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、以下の注釈を参照すること*。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.2.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480）

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、（+）ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類（「Negative Control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を選択する。

2.2.1.6.3. PCR（LightCycler® 480）

本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出しプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は 2.2.1.1.3. PCR

（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。 RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.2.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）

2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cq 値とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.2.2. 結果の判定

DNA 試料液における Le1 検知試験及び標準プラスミド DNA 溶液における全ての検知試験で Cq 値が得られていること、かつ、ブランク試料液における全ての検知試験で Cq 値が得られていないことを確認した後、2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム（図 1→図 2→図 3）に従って判定する。

（図 1）リアルタイム PCR 試験結果の各ウェルの判定スキーム（ダイズ）

DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液における P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験ごとに ΔCq 値を算出する。算出に当たって各検知試験の Cq 値は、DNA 試料液であれば 1 ウェルごとの値*［ΔCq (DNA 試料液) = Cq(P35S、PAT 又は RRS2) – Cq(Le1)］、標準プラスミド DNA 溶液であれば 2 ウェル併行の平均値［ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液) = Cq(P35S、PAT 又は RRS2) – Cq(Le1)］とする。次に、得られた ΔCq 値から DNA 試料液における P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験 1 ウェルごとの ΔΔCq 値［ΔΔCq =ΔCq (DNA 試料液)－ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液)］を算出し、以下の判定を行う。

(1) 得られた ΔΔCq 値が 0 以下の場合［ΔΔCq ≦ 0］、そのウェルは「＋」と判定する。

(2) 得られた ΔΔCq 値が 0 より大きい場合［ΔΔCq > 0］又は DNA 試料液における P35S 検知試験、PAT 検知試験若しくは RRS2 検知試験において Cq 値が得られず ΔCq 値が算出できない場合、そのウェルは「－」と判定する。

* ΔCq 値を算出するに当たっての各検知試験（Le1、P35S、PAT 及び RRS2）のウェルの組合せは、PCR 用反応液をプレートに分注する際に決めた組合せとする。

（図 2）リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）

DNA 試料液における P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。

(1) 2 ウェル共に「＋」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陽性と判定する。

(2) 2 ウェル共に「－」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記(1)以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

* 該当する検知試験に加え、Le1 検知試験も再度実施する必要があることに留意する。

（図 3）2 併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）

得られた結果から以下の判定を行う。

(1) P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験のうち 1 試験以上で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陽性と判定された場合、当該検体を検体陽性と判定する。

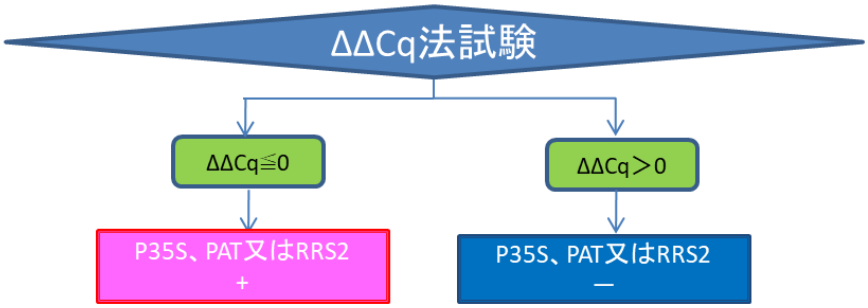
(2) P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験の全てで、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体から抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を実施し*、得られた結果が上記(1)以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

* P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験のいずれかで、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合、再抽出した DNA 試料液による当該検知試験は不要とする。なお、いずれの場合も Le1 検知試験は実施する必要があることに留意する。

図1　リアルタイムPCR試験結果の各ウェルの判定スキーム（ダイズ）

ΔCq＝Cq*（P35S、PAT又はRRS2）－Cq*（Le1）
ΔΔCq＝ΔCq（DNA試料液）－ ΔCq（標準プラスミドDNA溶液）



*DNA試料液のCq値は1ウェルごとの値、
標準プラスミドDNA溶液のCq値は2ウェルの平均値を用いる

図2　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）

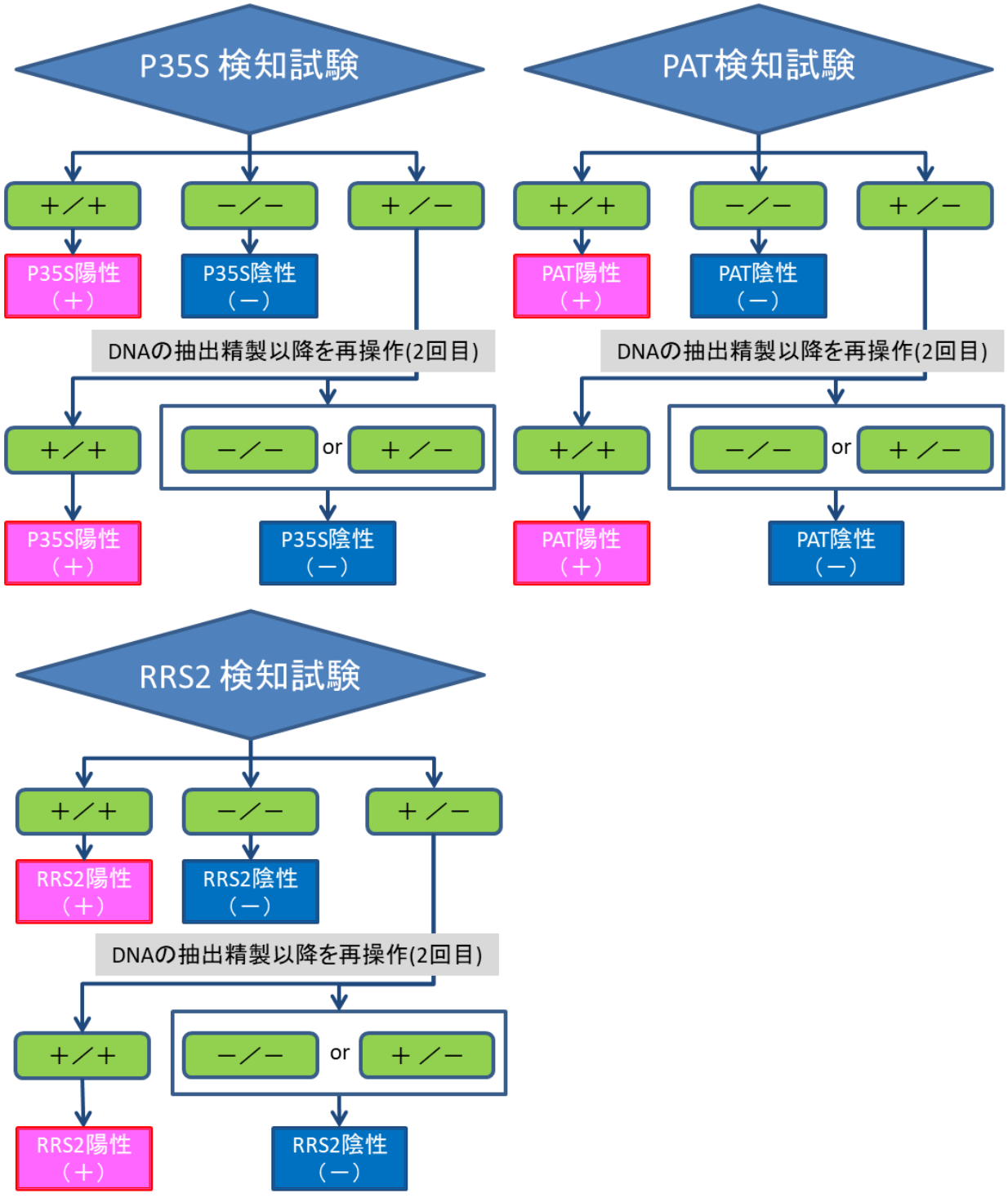


図3-1　2併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ						検知結果
	P35S		PAT		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	DNAの抽出精製以降を再操作※
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

*試料液1及び2共に試料液陰性の検知試験については、DNAの抽出精製以降の操作を不要とする

図3-2　2併行抽出試験結果の判定スキーム（DNA再抽出時）（ダイズ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ						検知結果
	P35S		PAT		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	検体陰性
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	

2.3. トウモロコシ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法）

トウモロコシでは、異なった発現タンパク質を持つ組換え系統が存在する上、同一の発現タンパク質が発現する組換え系統であっても、組換え系統毎にタンパク質の発現量が異なるため、多種の遺伝子組換えトウモロコシが混入している穀粒では、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める目的で ELISA 法を用いることはできない。したがって、リアルタイム PCR 法が有効な分析手法となる。また、今般、トウモロコシ穀粒の一粒中に複数系統の組換え DNA 配列が存在するスタック品種が多種開発されていることから、トウモロコシ穀粒を一粒単位、又はグループ単位で検査する必要がある。

上述のように、トウモロコシでは分析対象が複数系統存在するため、まず 2.3.1.項の定量 PCR 又は 2.3.2.項のマルチプレックスリアルタイム PCR 法を用いたスクリーニング検査を実施する。スタック品種が混入した場合、スクリーニング検査では実際よりも混入率が高く見積もられてしまうため、分別生産流通管理を行っている非遺伝子組換えトウモロコシにおいて混入率が 5%を超える可能性がある場合は、2.3.3.項の粒単位検査法又は 2.3.4 項のグループ検査法を実施する。

なお、本法により混入率が 5%以下である結果が判明した場合、当該トウモロコシは分別生産流通管理が適切に実施されたものとして取り扱うこととする。

2.3.1. 定量 PCR 法

検体の粉砕試料（500 g）につき DNA を 3 併行抽出し、DNA 試料を得る（3DNA 試料/1 検体）。上述のように、トウモロコシでは分析対象系統数が多数存在する。このため、多くの系統が共通して持つ *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S とそれを持たない系統に特異的な反応を用いてスクリーニングを実施し、結果の判定を行う。なお、ゲノム内に P35S が複数導入されている系統については、混入率が過大に算出される。トウモロコシの場合、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、starch synthase IIb（以下「SSIIb」という。）遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq を使用して得られた同遺伝子のコピー数と、分析対象となる組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブを使用して得られた対象遺伝子のコピー数をダイズの場合（2.1.2.項参照）と同様に算出し、2.1.2.項で示した式に基づき対象遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める。P35S が組み込まれた組換え系統及び GA21 については、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT（96 well 及び 384 well）、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。MIR604 及び MIR162 については、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。

2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量

組換えトウモロコシ系統 Event176、Bt11、T25、NK603、MON863、TC1507、MON810、DAS-59122-7、MON88017 及び MON89034 には、共通して P35S 配列が組み込まれているため、同配列含量を指標として、これらの系統の混合物については、大まかな含量を推定することが可能である。分析方法は、用いるプライマー対、プローブを除きダイズの定量 PCR 法で示された方法と同一であるが、PCR 用反応液の調製における TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに用いることができる試薬については、「FastGene™ QPCR Probe Mastermix（日本ジェネティクス社）」を「FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche Diagnostics 社）」*1 に読み替えること。内在性遺伝子として、SSIIb 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq*2 を使用する。また、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシプラスミドセットを使用する。対象遺伝子のプライマー対とプローブは P35S-1 と P35S-Taq*3 であり、別紙 1 に規定された内標比を用いて、最終的に P35S 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率を算出する。

*1 FastStart Universal Probe Master (Rox)

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい撹拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 SSIIb 遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

SSIIb 3-5’（5’-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3’）、
SSIIb 3-3’（5’-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3’）及び
SSIIb-Taq（5’-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3’）

*3 P35S を標的とするプライマー対とプローブ

P35S 1-5’（5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’）、
P35S 1-3’（5’- CCTCTCCAAA TGAAATGAACTTCCT-3’）及び
P35S-Taq（5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3’）

P35S を用いた際の内標比は MON810 を対象として算出されたものを用いる。同系統は組換え遺伝子中に P35S 配列が 1 コピーしか存在しないことから、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を過小評価する可能性は低い。なお、P35S-Taq は、他のプローブの半分の濃度（終濃度 : 0.1 μM）で使用するため、反応液の調製の際には留意する（定量機器に Roche LightCycler System を用いる場合には、これに当たらず、他のプローブと同濃度で使用する）。

2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量

組換え系統 GA21、MIR604、MIR162 は、P35S 配列が組み込まれていない。したがって、本系統の含有率を確認するため、P35S 配列を分析するものと同一の DNA 試料液について、別に GA21 に特異的な反応、MIR604 に特異的な反応、MIR162 に特異的な反応を用い、2.3.1.1.項と同様の方法で各系統の含有率を求める。GA21 の分析にはプライマー対 GA21-3 とプローブ GA21-Taq*を、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシプラスミドセットを用いる。MIR604 の分析には、プライマー対 MIR604-1 とプローブ MIR604-Taq*を、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシ（MIR604）プラスミドセットを用いる。MIR162 の分析には、プライマー対 MIR162-1 とプローブ MIR162-Taq*を、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシ（MIR162）プラスミドセットを用いる。なお、MIR604 の分析を行う際には、MIR604 特異的反応及び SSIIb 特異的反応の両方でリアルタイム PCR の反応温度条件を以下のとおりとする。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。

* 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

GA21 検知：GA21-3-5’（5’-GAAGCCTCGGCAACGTCA-3’）、
GA21-3-3’（5’- ATCCGGTTGGAAAGCGACTT-3’）及び
GA21-Taq（5’-FAM-AAGGATCCGGTGCATGGCCG-TAMRA- 3’）
MIR604 検知：MIR604 primer F（5’-GCGCACGCAATTCAACAG-3’）、
MIR604 primer R（5’-GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3’）及び
MIR604 probe（5’-FAM- AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-TAMRA- 3’）
MIR162 検知：MIR162-f1（5’-GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG-3’）、
MIR162-r1（5’-TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA-3’）及び
MIR162-p1（5’-FAM- TCTAGACAATTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA-TAMRA- 3’）

2.3.1.3. 結果の判定

各 DNA 試料（3DNA 試料/1 検体）について定量 PCR を行った結果、P35S 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率に GA21、MIR604、MIR162 の含有率を加え、3 併行抽出した DNA 試料の平均値を算出する。その値が 4.5%を超えた場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

2.3.2. マルチプレックス PCR 法

2.3.1 項の定量 PCR 法の代わりに、より簡便なマルチプレックス PCR 法にて混入率が 5%を超える可能性があるかを判定するスクリーニングが可能である。本法は、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として SSIIb 遺伝子、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として、P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens*

由来の nopaline synthase 遺伝子の terminator（以下「TNOS」という。）を同時に検出するマルチプレックスリアルタイム PCR 法にて行う。本法は、複数セットのプライマー対とプローブを PCR 液に添加することで、複数の標的遺伝子を同時に検出することができ、通常のシングルプレックスリアルタイム PCR 法に比べて一度に多検体を処理できる。なお、本スクリーニング検査では SSIIb を検出するプローブは VIC で標識されているが、P35S と TNOS を検出するプローブはどちらも FAM で標識されているため、これらの遺伝子量の合計（P35S+TNOS）に相当する蛍光値が得られる。混入率が 5%を超える可能性があるかどうかの判定は、標準試料を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は､分析試料及び判定基準となる標準試料それぞれの内在性遺伝子における Cq 値と標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる分析試料の ΔCq 値と標準試料の ΔCq 値の差［ΔΔCq = ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料)］を用いて判定を行う。ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があり､混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる｡得られた分析試料の ΔCq 値が、判定基準となる標準試料の ΔCq 値以上である場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%以下であると判定し､分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%を超える可能性があると判定する。標準試料としては、4%(w/w) MON810 粉末試料*から抽出した DNA 試料液（20 ng/μL）を用い、分析試料と同時に測定する。

* 4%(w/w) MON810 粉末試料

Maize GMO Standard ERM-BF413gk（10% MON810）（IRMM/ERM、Sigma-Aldrich 社から購入可能）0.4 g と Maize GMO Standard ERM-BF413ak (Blank MON810)（IRMM/ERM、Sigma-Aldrich 社から購入可能）0.6 g を混合し、分析試料と同様の方法で DNA 抽出精製を行う。

2.3.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング

2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 用反応液は 10 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche Diagnostics 社）*1 、対象プライマーとして SSIIb 3-5’（50μM）*2、SSIIb 3-3’（50 μM）*2、P35S 1-5’（50 μM）*3、P35S 1-3’（50 μM）*3、NOS ter 3-5’（50 μM）*4、NOS ter 2-3’（50 μM）*4、対象プローブとして SSIIb-TaqV（10 μM）*5、P35S-Taq（10 μM）*6、NOS-Taq（10 μM）*7、水及び 20 ng/μL DNA 試料液又は水（ブランク試料液：NTC）を下記の表のとおりに混合する。試験は、1 DNA 試料液当たり 3 ウェル併行で行うものとし、PCR 用反応液は 3 ウェル分を同時に調製する*8。

混合溶液用	必要量 1 ウェル当たり (μL)	1DNA 試料 当たり (μL)
FastStart Universal PM (ROX)	5	17
50 μM SSIIb 3-5'	0.016	0.05
50 μM SSIIb 3-3'	0.016	0.05
10 μM SSIIb-TaqV	0.08	0.27
50 μM P35S 1-5'	0.05	0.17
50 μM P35S 1-3'	0.05	0.17
10 μM P35S-Taq	0.1	0.34
50 μM NOS ter 3-5'	0.06	0.20
50 μM NOS ter 2-3'	0.06	0.20
10 μM NOS-Taq	0.12	0.41
水	3.448	11.74
20 ng/μL　DNA 試料液	1	3.4
合計	10.0	34.0

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ FastStart Universal Probe Master (Rox)に対象プライマー、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA 試料液（3 ウェル分）当たり 34 μL が適当である（上記表参照)。混合時にはピペッティングで十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*9 の微量遠沈管に 30.6μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 試料液を 3.4 μL 加え、ピペッティングで十分に撹拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 10 μL/well として 96 ウェルプレート上のウェルに分注する。分注操作終了後、真上からシール*10 し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする*11。

*1 FastStart Universal Probe Master (Rox)

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい撹拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから

使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 SSIIb 3-5'及び SSIIb 3-3'

配列は以下のとおりである。

SSIIb 3-5'： 5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3'

SSIIb 3-3'： 5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'

代わりに対象プライマー対として SSIIb-3（25 μM）0.032 μL を用いてもよい。

*3 P35S 1-5' 及び P35S 1-3'

配列は以下のとおりである。

P35S 1-5'： 5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'

P35S 1-3'： 5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

代わりに対象プライマー対として P35S-1（25 μM）0.1 μL を用いてもよい。

*4 NOS ter 3-5'及び NOS ter 2-3'

配列は以下のとおりである。

NOS ter 3-5'： 5'-GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3'

NOS ter 2-3'： 5'-CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT-3'

*5 SSIIb-TaqV

蛍光色素として VIC で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

*6 P35S-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA-3'

*7 NOS-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3'

*8 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*9 分注必要数

標準試料液（1 点）及びブランク試料液（1 点）の計 2 点に DNA 試料液の数を加えた数。

*10 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため避けること。

2.3.2.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液）の設定を行う。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。またプローブ特性に関しては、SSIIb は、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」、P35S+TNOS は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」、となるように設定する*。なお、Passive Reference を「ROX」と設定する。

* 蛍光色素の Detector を登録する際に、「SSIIb」は「VIC」、「P35S+TNOS」は「FAM」に設定する。

2.3.2.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。なお反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.3.2.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量（ΔRn）をプロットした増幅曲線（Amplification Plot）上で、DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している ΔRn 部を選択し、Threshold line（Th）を引く*。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と DNA 試料液由来の蛍光シグナルが交差した点を Cq 値とする。各々の DNA 試料液における SSIIb 及び P35S+TNOS の平均 Cq 値（3 ウェル分）を算出し，SSIIb における平均 Cq 値と P35S における平均 Cq 値の差［ΔCq = Cq(P35S+TNOS) – Cq(SSIIb)］を算出する。

* 通常、Th 値は 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。

2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング

2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケー

ター及び MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること*1,2。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.3.2.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液）の設定を行う。この際、同一の溶液が分注された 3 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また、プローブ特性に関しては、VIC には SSIIb、FAM には P35S+TNOSを割り当てる*。

* あらかじめ Detection Format にて VIC と FAM を選択しておく。

2.3.2.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。

2.3.2.2.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

解析は PCR 装置付属のソフトウェアで行う*。各々の DNA 試料液における SSIIb 及び P35S+TNOS の平均 Cq 値（3 ウェル分）を算出し，SSIIb における平均 Cq 値と P35S における平均 Cq 値の差［ΔCq = Cq(P35S+TNOS) – Cq(SSIIb)］を算出する。

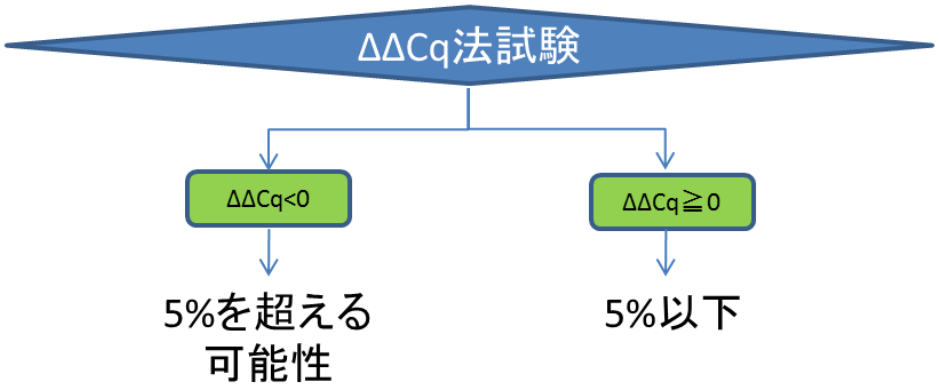
* LightCycler® 96 においては、SSIIb 及び P35S+TNOS の Minimal EPF を 0.1 に設定する。

2.3.2.3. 結果の判定（図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム）

混入率が 5%を超える可能性があるかどうかの判定は、分析試料と標準試料の ΔCq 値を比較して行う。すなわち、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値以上である場合［ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料) ≧ 0］、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合［ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料) < 0］、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%を超える可能性があると判定する。混入率が 5%を超える可能性があると判定された場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

図4　マルチプレックスPCR法 試験結果の判定スキーム

ΔCq＝Cq*（P35S+TNOS）－Cq*（SSIIb）
ΔΔCq＝ΔCq（分析試料）－ ΔCq（4%標準試料）



*Cq値は3ウェルの平均値を用いる

2.3.3. 粒単位検査法

トウモロコシ穀粒試料から 92 粒をランダムサンプリングし、以下の手順に従って遺伝子組換え穀粒を検知する。試験有効粒数 90 粒におけるその粒数を定量し、遺伝子組換え穀粒の混入率を求める。

なお、遺伝子組換え穀粒の粒数が 92 粒（試験有効粒数 90 粒）中に 3 以上 9 以下の場合はさらに 2 回目の 92 粒の粒単位検査法を行い、1 回目と 2 回目の総和 184 粒（試験有効粒数 180 粒）における遺伝子組換え穀粒の粒数を定量し、混入率を求める。

本法の適用機種は LightCycler® 96 である*。

* その他のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM® 7900HT、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられるが、使用する機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液を用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブは 2.3.2.2.項と同様である。

各粒由来 DNA 試料液につき 1 ウェル（92 試料、92 ウェル）、また PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものを 2 ウェル分、GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液として 2 ウェル分、の合計 96 ウェルで分析を行う。

2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液組成及び調製方法は 2.3.2.1.1.項及び 2.3.2.2.1.項と同様である。ただし、PCR 用マスターミックスとして、2×DirectAce qPCR Mix No ROX（ニッポンジーン社）*を 1 反応液（全量 10 μL）当たり 5 μL 用いる。

* DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前に転倒混和及びタッピングによって混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。ABI PRISM® 7900HT、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000 などの ROX が必要なリアルタイム PCR 機器を使用する場合は、本試薬に添付されている ROX を添付のマニュアルに従い適量を添加する。

2.3.3.1.2. プレート情報の設定

2.3.2.2.2.項と同様に行う。

2.3.3.1.3. PCR

2.3.2.2.3.項と同様に行う。

2.3.3.1.4. PCR 結果の解析

解析は PCR 装置付属のソフトウェアで行い、LightCycler® 96 においては、SSIIb 及び P35S+TNOS の Minimal EPF を 0.1 に設定する。SSIIb 検知試験及び P35S+TNOS 検知試験の両方において 38 未満の Cq 値が得られた DNA 試料液は、遺伝子組換え穀粒（由来）と判定する。一方、SSIIb 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られ、P35S+TNOS 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られなかった DNA 試料液は、非遺伝子組換え穀粒（由来）と判定する。また、SSIIb 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られなかった場合は、当該 DNA 試料液に対してマルチプレックスリアルタイム PCR を用いた粒単位の定性検知法以降の操作を再度行い、それでも同様の結果の場合には、その DNA 試料液での結果を無効とする。SSIIb 検知試験において 38 未満の Cq 値が得られた DNA 試料液における試験は有効と判断され、92 粒の DNA 試料液中で 90 粒以上の DNA 試料液で有効とされた場合は、本試験は成立する。その後、有効とされた DNA 試料液の結果から遺伝子組換え穀粒と非遺伝子組換え穀粒の数を測定する。89 粒以下の DNA 試料液で有効とされた場合は、本試験は不成立として、改めて 92 粒のランダムサンプリングを行い、2.7.4. 項のトウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製から試験を再度実施する。

2.3.3.2. 結果の判定

2.3.3.1.4. PCR 結果の解析で得られた結果において、92 粒（試験有効粒数 90 粒）中における遺伝子組換え穀粒の粒数が 2 以下であれば、適切に分別生産流通管理が行われたと判断する。

遺伝子組換え穀粒の粒数が 3 以上 9 以下で、2 回目を行った場合は、1 回目と 2 回目の総和 184 粒（試験有効粒数 180 粒）中における遺伝子組換え穀粒の粒数が 9 以下であれば適切に分別生産流通管理が行われたものとして取り扱うこととする。

1 回目の結果における遺伝子組換え穀粒の粒数が 10 以上の試料、又は 1 回目と 2 回目の総和 184 粒（試験有効粒数 180 粒）中における遺伝子組換え穀粒の粒数が 10 以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

2.3.4. グループ検査法

トウモロコシ穀粒試料からランダムサンプリングを行い、穀粒 20 粒からなるグループを 10 グループ用意する。2.7.5 項に記載の方法で各グループから DNA 試料液を調製し、各グループに遺伝子組換え穀粒が含まれているか否かをリアルタイム PCR で判定

する。遺伝子組換え穀粒を含むグループの数から、遺伝子組換え穀粒の混入率を評価する。10 グループ中遺伝子組換え穀粒を含むグループが 7 以上の場合は、さらに 2 回目の 10 グループの分析を行い、1 回目と 2 回目の総和である 20 グループ中で遺伝子組換え穀粒を含むグループの数を決定し、混入率を評価する。本法の適用機種は ABI PRISM® 7900HT、Applied Biosystems® 7500 である。

2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

P35S 及び TNOS を標的とするマルチプレックスリアルタイム PCR を用いて遺伝子組換え穀粒を検出する。これを遺伝子組換え検出反応とする。また、各 DNA 試料から PCR を行うことができることを確認するため、トウモロコシ内在性遺伝子 SSIIb 遺伝子の検出と人為的に添加した微量のプラスミドの検出（Internal Positive Control、IPC）を、マルチプレックスリアルタイム PCR で行う。これを対照反応とする。遺伝子組換え検出反応、対照反応ともに、各 DNA 試料液につき 1 ウェル、また陽性コントロールとして GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えるものを 1 ウェル、陰性コントロールとして水を加えるものを 1 ウェル、合計 12 ウェルで分析を行う。

2.3.4.1.1. 反応液の調製

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合は、以下のとおり、反応液を調製する。

遺伝子組換え検出反応： 1 ウェル当たり 2×DirectAce qPCR Mix No ROX [*1] 12.5μL、対象プライマー対として P35S-1[*2]（25 μM）0.5 μL、NOS ter-2[*2]（25 μM）0.5 μL、対象プローブとして P35S-TaqFB[*3]（10 μM）0.25 μL、NOS-TaqFB[*3]（10μM）0.25 μL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 μL を混合し、水で 22.5 μL にする。この組成で必要ウェル分を一度に調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 μL ずつ添加し、全量で 25 μL にする[*4]。

対照反応：1 ウェル当たり DirectAce qPCR Mix No ROX[*1] 12.5 μL、対象プライマー対として IPC-1[*2]（25 μM）0.5 μL、SSIIb-3[*2]（25 μM）0.5 μL、対象プローブとして IPC-TaqFB[*3]（10 μM）0.25 μL、SSIIb-TaqHB[*3]（10 μM）0.25 μL、IPC 用プラスミド溶液[*5] 1 μL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 μL を混合し、水で 22.5 μL にする。この組成で必要ウェル分を調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 μL ずつ添加し、全量で 25 μL にする[*4]。

Applied Biosystems® 7500 を使用する場合は、50×ROX Passive Reference 溶液の添加量を 0.05 μL にする。分注操作終了後、真上からシールし[*6]、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく[*7]。

*1 DirectAce qPCR Mix No ROX の混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には転倒混和及びタッピングによって混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

*2 対象プライマー対の配列は、以下のとおりとする。

対象プライマー対	プライマー名	塩基配列　5'―3'
P35S-1	P35S 1-5'	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT
	P35S 1-3'	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT
NOS ter-2	NOS ter 2-5'	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG
	NOS ter 2-3'	CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT
IPC-1	IPC 1-5'	CCGAGCTTACAAGGCAGGTT
	IPC 1-3'	TGGCTCGTACACCAGCATACTAG
SSIIb-3	SSIIb 3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC
	SSIIb 3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGGA

*3 対象プローブの塩基配列は以下のとおりとする。P35S-TaqFB、TNOS-TaqFB、IPC-TaqFB は、5'側を FAM、3'側を Black hole quencher1 で標識することとする。SSIIb-TaqHB は、5'側を HEX、3'側を Black hole quencher1 で標識することとする。

対象プローブ	塩基配列　5'―3'
P35S-TaqFB	CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT
NOS-TaqFB	AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA
IPC-TaqFB	TAGCTTCAAGCATCTGGCTGTCGGC
SSIIb-TaqHB	AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA

*4 DNA 試料液を添加する際は、ピペッティングによる混合を入念に行う。

*5 IPC 用プラスミド溶液は、ニッポンジーン社から購入可能である(Cat No. 315-08241)。

*6 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*7 ABI PRISM® 7900HT の場合は、プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.3.4.1.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行う。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前[*1] の場合は、Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの、及び Reporter が「HEX」[*2]、Quencher が「Non Fluorescent」のものの 2 つを設定する。設定した Detector を Set up タブ（ABI PRISM® 7900HT）又は Well Inspector（Applied Biosystems® 7500）に登録した後、測定を行うウェル全てを指定する。遺伝子組換え検出反応については、P35S 及び TNOS を検出するため、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。対照反応については、IPC 検出のために Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを、SSIIb 検出のために Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。Passive Reference は「ROX」と設定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類は Task 欄に「Unknown」を指定する。

*1 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合

まず、Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの、及び Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のものの 2 つを設定する。設定した Target を登録した後、「AssignTargets and Samples」画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。遺伝子組換え検出反応については、P35S 及び TNOS を検出するため、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。対照反応については、IPC 検出のために Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを、SSIIb 検出のために Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。Select the dye to use as the Passive Reference は「ROX」と設定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類は Task 欄に「U」を指定する。

*2 HEX 検出を行うためには、あらかじめ市販の HEX-キャリブレーションプローブを用いて使用するリアルタイム PCR 装置に HEX dye 登録を行う。登録操作は、リアルタイム PCR 装置の取り扱い説明書に従う。HEX キャリブレーションプローブは、ニッポンジーン社から購入可能である（Cat No. 318-06771）

2.3.4.1.3. PCR

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。95°C で 10 分間加温した後、95°C 15 秒間、65°C 1 分間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合は、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合は、RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully 」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。なお、下降部分は 100%のままで使用する。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.3.4.1.4. PCR 結果の解析

Threshold line の設定は、P35S、TNOS、IPC については 0.256、SSIIb については 0.064 とする。Baseline については、Manual baseline mode で 3－15 サイクルと設定する。いずれの標的についても、目視で Amplification plot 上で 15 サイクル以降に指数関数的な増幅曲線があり、増幅曲線が Threshold line と交わる Cq 値が 40 以下の場合に陽性と判定する。

まず、対照反応における IPC 及び SSIIb の検出を判定する。鋳型 DNA として GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えた反応で IPC、SSIIb ともに陽性であること、水を加えた反応で IPC が陽性、SSIIb が陰性であることを確認する。異なる結果が得られた場合には、PCR がうまく実施されていない可能性があるため、PCR 以降の実験を再度行うこととする。穀粒グループ由来の各 DNA 試料について、IPC と SSIIb のいずれかが陰性の場合には、DNA の溶出がうまくいっていない可能性があるため、別の 20 粒を再度サンプリングして、DNA の溶出及び PCR 分析を行う。IPC と SSIIb の両方が陽性の DNA 試料について、P35S、TNOS の検出について陽性か陰性かを判定し、陽性の場合にはグループ（20 粒）の中に遺伝子組換えの穀粒が含まれると判定する。

なお、マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法では、ABI PRISM® 7900HT 及び Applied Biosystems® 7500 以外のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、LightCycler® 96、LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられる。使用するリアルタイム PCR 機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

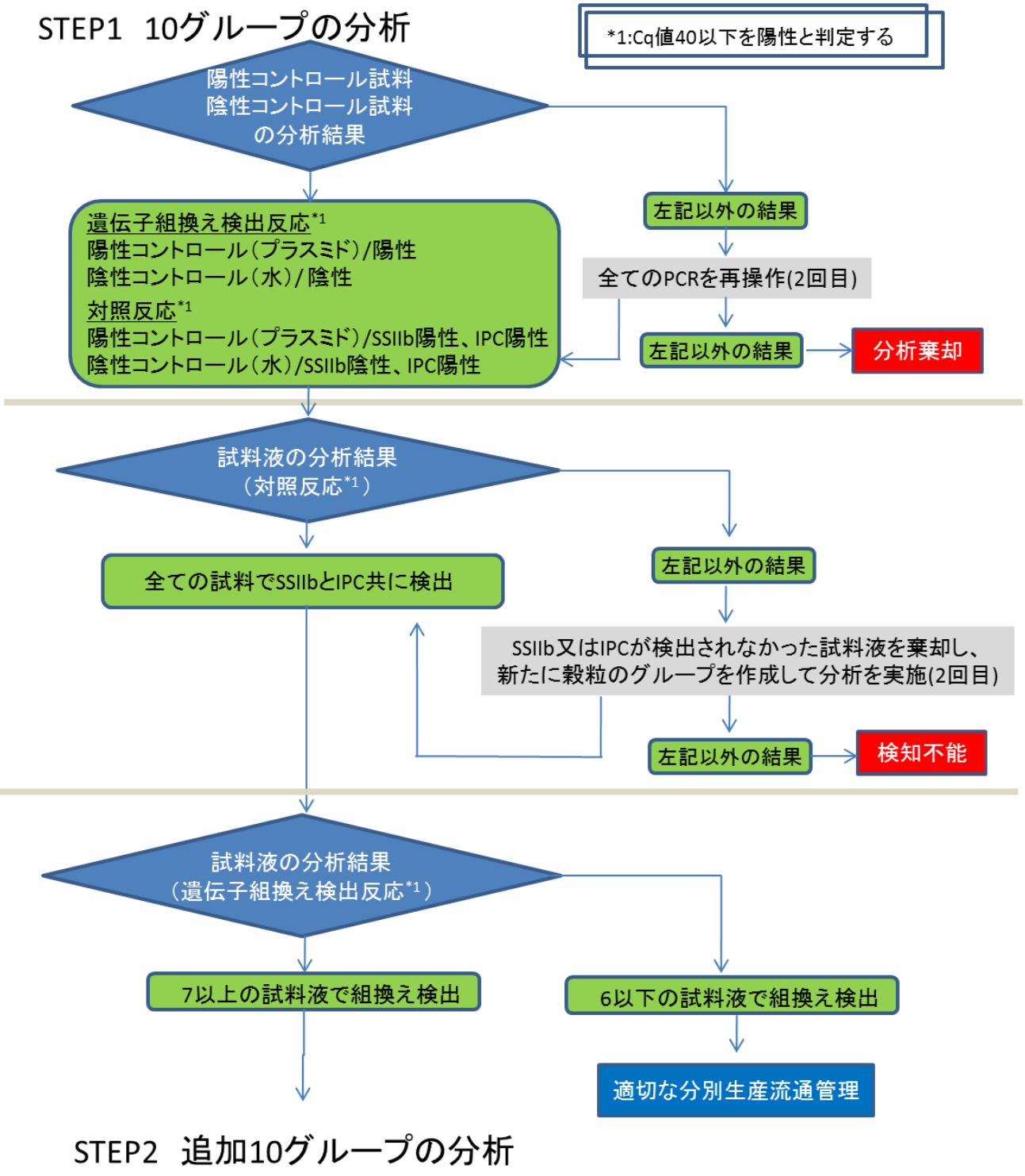
2.3.4.1.5 結果の判定（図 5 グループ検査法試験結果の判定スキーム）

2.3.4.1.4. PCR 結果の解析で得られた結果において、10 グループ中における遺伝子組換え穀粒を含むグループが 6 以下であれば、適切に分別生産流通管理が行われたと判断する。

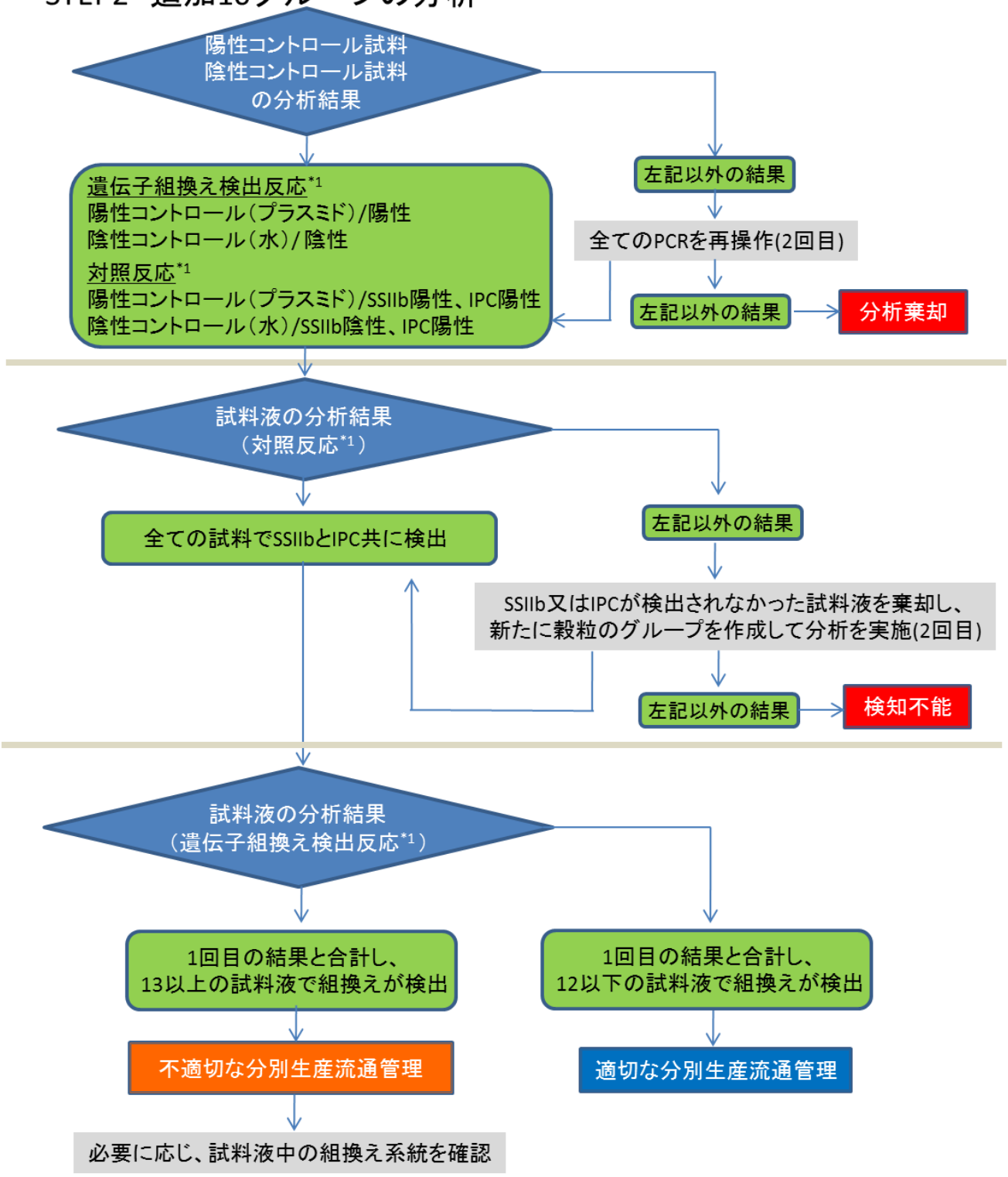
遺伝子組換え穀粒を含むグループが 7 グループ以上で、2 回目を行った場合は、1 回目と 2 回目の総和 20 グループにおける遺伝子組換えの検出が 12 以下であれば適切に分別生産流通管理が行われたものとして取り扱うこととする。

1 回目と 2 回目の総和 20 グループ中における遺伝子組換え穀粒を含むグループが 13 以上の試料については不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。

図5　グループ検査法試験結果の判定スキーム



STEP2　追加10グループの分析



2.3.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法）

グループ検査において遺伝子組換え穀粒を含むと判定されたグループについて、最終的に組換え系統を確定する方法を参考検査法として示す。 2.7.5.項で生じる粗抽出液から 2.7.6 項に記載の方法で DNA を精製し、リアルタイム PCR で分析する。

2.3.4.2.1. リアルタイム PCR

反応液は 1 ウェル当たり 10 μL/well とし、96 ウェルプレートに調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 5 μL、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*2（各プライマー2.5 μM、プローブ 1 μM）2 μL、水 2 μL、20 ng/μL DNA 試料液、陽性コントロール DNA 試料液*3、又は 5 ng/μL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液）1 μL を混合する*4。分注操作終了後、プレートに真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*5。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*6 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。プレートを PCR 増幅装置*7 にセットする。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前に転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

対象プライマー対濃度が 2.5 μM、対象プローブ濃度が 1 μM となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

各プライマー対の塩基配列は以下のとおりとする。

標的	プライマー名	塩基配列　5'—3'
Bt11系統	Bt11 3-5'	AAAAGACCACAACAAGCCGC
	Bt11 3-3'	CAATGCGTTCTCCACCAAGTACT
Event176系統	E176 2-5'	TGTTCACCAGCAGCAACCAG
	E176 2-3'	ACTCCACTTTGTGCAGAACAGATCT
GA21系統	GA21 3-5'	GAAGCCTCGGCAACGTCA
	GA21 3-3'	ATCCGGTTGGAAAGCGACTT
MON810系統	M810 2-5'	GATGCCTTCTCCCTAGTGTTGA
	M810 2-3'	GGATGCACTCGTTGATGTTTG
MON863系統	M863 1-5'	TGACCCTACTTGTTCGGATGG
	M863 1-3'	GCATTTGTAGGTGCCACCTTC
NK603系統	NK603 1-5'	GGCCAGCAAGCCTTGTAGC
	NK603 1-3'	ATCCCGACTCTCTTCTCAAGCATA
T25系統	PM1	TCAATTGCCCTTTGGTCTTCTGA
	revPM1	TACGACATGATACTCCTTCCAC
TC1507系統	TC1507 1-5'	TGAGTTGATTCCAGTTACTGCCA
	TC1507 1-3'	ATGTTAGTCGCAACGAAACCG
MIR604系統	MIR604 primer F	GCGCACGCAATTCAACAG
	MIR604 primer R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT
MON88017系統	M88017 1-5'	ATCGTGTGACAACGCTAGCA
	M88017 1-3'	CATATTGACCATCATACTCATTGCT
DAS-59122-7系統	DAS59122-7-rb1f	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC
	DAS59122-7-rb1r	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG
MON89034系統	MON89034 primer1	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT
	MON89034 primer2	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA
MIR162系統	MIR162-f1	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
	MIR162-r1	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA
トウモロコシSSIIb	SSIIb 3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC
	SSIIb 3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGGA

各プローブの塩基配列は以下のとおりとする。MON89034 検出用を除き、5'側が FAM、3'側が TAMRA で標識されたものを使用する。MON89034 検出用については、5'側が FAM、3'側が Non Fluorescent Quencher 及び Minor Groove Binder で標識されたもの（Thermo Fisher Scientific 社製）を使用する。

標的	プローブ名	塩基配列　5'—3'
Bt11系統	Bt11-2-Taq	CGACCATGGACAACAACCCAAACATCA
Event176系統	E176-Taq	CCGACGTGACCGACTACCACATCGA
GA21系統	GA21-2-Taq	AAGGATCCGGTGCATGGCCG
MON810系統	M810-Taq	AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAA
MON863系統	MON863-Taq	CACCCCAAAGTGTACCAAGCTTTCCGA
NK603系統	NK603-Taq	ATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAACGCGGC
T25系統	FBP3	TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTCG
TC1507系統	TC1507-Taq	ACTCGAGTAAGGATCCGTCGACCTGCAG
MIR604系統	MIR604 probe	AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG
MON88017系統	M88017-1-Taq	TGCCGGAGTATGACGGTGACGATATATTCA
DAS-59122-7系統	DAS59122-7-rb1s probe	TTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAA
MON89034系統	MON89034 probe	ATCCCCGGAAATTATGTT
MIR162系統	MIR162-p1	TCTAGACAATTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA
トウモロコシSSIIb	SSIIb-Taq	AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA

*3 陽性コントロール DNA 試料

Bt11、Event176、GA21、MON810、SSIIb については、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを使用する。それ以外の反応については、Institute for Reference Materials and Measurements 又は American Oil Chemists' Society で製造されている遺伝子組換え農産物の標準物質から DNA を調製して使用する。

*4 反応液の調製

対象プライマー対と対象プローブの混合溶液を 96 ウェルプレートの各ウェルにあらかじめ添加したものを作製・保管しておき、そこに DNA 試料液、TaqMan® Universal PCR Master Mix、水の混合液を連続分注ピペットで添加する方法で調製してもよい。この場合、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液を含む 96 ウェルプレートは、FastGene 圧着シール（FastGene 社 FG-DM100HC）又は同等のもので密封し、冷凍庫で保管する。分析の直前にこのプレートを冷凍庫から取り出し、常温に戻して、軽く遠心を行ってから反応液の調製に使用する。

*5 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*6 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。Applied Biosystems® 7500 の場合は不要である。20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

*7 本法の適用機種は ABI PRISM® 7900HT、Applied Biosystems® 7500 である。

2.3.4.2.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行う。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類を「Unknown」と指定する。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

2.3.4.2.3. PCR

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 15 秒、60°C 1 分を 1 サイクルと

して、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.3.4.2.4. 結果の判定

Threshold line の設定は 0.256、Baseline については、Manual baseline mode で 3－10 サイクルと設定する。いずれの標的についても、目視で Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線があり、増幅曲線が Threshold line と交差する場合に、陽性と判定する。各種組換え系統を検出する反応の結果から、トウモロコシ穀粒グループに含まれていた系統を特定する。内在性遺伝子 SSIIb が陰性の場合は、リアルタイム PCR をやり直す。

2.4. トウモロコシ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）

本検査法により検体陽性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性があるもの、検体陰性と判定された場合は、当該検体は遺伝子組換え農産物混入の可能性がないものとして取扱うこととする。

2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

本法では、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として SSIIb、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として P35S 及び TNOS を検知する検知試験 3 試験を行う。PCR 装置は、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。

また、本法は、標準試料液を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、DNA 試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における Cq 値と各標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差［ΔΔCq = ΔCq(DNA 試料液) – ΔCq(標準試料液)］を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液*を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。

* 標準プラスミド DNA 溶液

本法においては、SSIIb 検知試験用：200,000 コピー/mL、P35S 検知試験用：100 コピー/mL 及び TNOS 検知試験用：100 コピー/mL を使用する。GM トウモロコシ混入判定用プラスミドセットとして、ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche Diagnostics 社）[*1] 12.5 μL、対象プライマー対溶液[*2,3]（各プライマー、25 μM）0.8 μL、対象プローブ溶液[*2,3]（10μM）0.25 μL、水 6.45 μL 及び 10 ng/μL DNA 試料液 5 μL（50 ng）、標準プラスミド DNA 溶液 5 μL 又は 5 ng/μL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液 : NTC）5 μL[*4]。DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液はいずれも検知試験ごと、かつ、2 ウェル併行で行う。また、PCR 用反応液は 2 ウェル分を同時に調製する。

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、検知試験ごとに以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ FastStart Universal Probe Master (Rox)に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 検体の場合は 1 検知試験当たり 208 μL が適当である（下記表参照）。混合時には転倒混和等により十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数[*5] の微量遠沈管に 46.4 μL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液又はブランク試料液を 11.6 μL 加え、十分に撹拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 μL/well として 96 ウェルプレート上のウェルに分注する。このとき、DNA 試料液については、ΔCq 値を算出する際の各検知試験のウェルの組合せを決めること[*6]。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う[*7]。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて（又はプレート用の遠心機が使用できる場合は、遠心して）気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad[*8] を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

マスターミックス	必要量 1 ウェル当たり (μL)	1 検知試験 当たり (μL)
FastStart Universal Probe Master (Rox)	12.5	130.0
対象プライマー対溶液 （各プライマー、25 μM）	0.8	8.32
対象プローブ溶液（10 μM）	0.25	2.6
水	6.45	67.08
合計	20.0	208.0

*1 FastStart Universal Probe Master (Rox)

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい撹拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 SSIIb を標的とするプライマー対とプローブ

SSIIb 3-5'（5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3'）、

SSIIb 3-3'（5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'）及び

SSIIb-Taq（5'-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

P35S 検知：

P35S 1-5'（5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'）、

P35S 1-3'（5'- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'）及び

P35S-Taq（5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3'）

TNOS 検知：

NOS ter 3-5'（5'-GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3'）、

NOS ter 2-3'（5'-CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT-3'）及び

NOS -Taq（5'-FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3'）

*4 定性 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*5 分注必要数

標準プラスミド DNA 溶液（1 点）及びブランク試料液（1 点）の計 2 点に DNA 試料液の数を加えた数。

*6 DNA 試料液における各検知試験のウェルの組合せ

標準プラスミド DNA 溶液は、2 ウェル併行の平均 Cq 値から ΔCq 値を算出するが、DNA 試料液については、1 ウェルごとの Cq 値から ΔCq 値を算出する。このため、各検知試験の 2 ウェル併行から 1 ウェルずつ選択し、ΔCq 値を算出するウェルの組合せを決めることが必要となる。なお、P35S 検知試験、TNOS 検知試験は、異なるウェルプレート上で行うことも可能だが、その場合はそれぞれのウェルプレート上で SSIIb 検知試験を行うことに留意する。

*7 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.4.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まずプローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

* Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.4.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量（ΔRn）をプロットした増幅曲線（Amplification Plot）上で、DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している ΔRn 部を選択し、Threshold line（Th）を引く*。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と DNA 試料液由来の蛍光シグナルが交差した点を Cq 値とする。

* 通常、Th 値は 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。

2.4.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.4.1.2.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*1 の場合は、プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*2。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

*1 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合

まず、トップ画面で「Advanced Setup」を選択し、新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する標準プラスミド DNA 溶液、DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「Assign Targets and Samples」画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*2 Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.4.1.2.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は 2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。なお、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合、反応条件の設定において RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。なお下降部分は 100%のままで使用する。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.2.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。

2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5）

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.4.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液の Samples を作成し名称を入力する。設定した

Target を登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定
Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.4.1.3.3. PCR（QuantStudio 5）
装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5）
PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。

2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR
2.4.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex）
PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.4.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex）
反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher

が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定
Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.4.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）
装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex）
PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。

2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR
2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）
PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター及び MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること*1,2。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。
*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.4.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96）

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し{Gene}に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Type において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、Name に名称を入力しておく。

2.4.1.5.3. PCR（LightCycler® 96）

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、96 ウェルプレートを切欠き部を右下にしてサーマルブロック上に載せ、セットして閉じる。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で反応条件を設定する。反応条件は 2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。[Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.4.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96）

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル（Cq）値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルの Cq 値を算出する*。

* 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット（色素）に依存する。

2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター及び MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること*1,2。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、

LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.4.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480）

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、（+）ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類（「Negative Control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を選択する。

2.4.1.6.3. PCR（LightCycler® 480）

本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出しプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は 2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。 RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.4.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）

2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cq 値とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.4.2. 結果の判定

DNA 試料液における SSIIb 検知試験及び標準プラスミド DNA 溶液における全ての検知試験で Cq 値が得られていること、かつ、ブランク試料液における全ての検知試験で Cq 値が得られていないことを確認した後、2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム（図 6→図 7→図 8）に従って判定する。

（図 6）リアルタイム PCR 試験結果の各ウェルの判定スキーム（トウモロコシ）

DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験ごとに ΔCq 値を算出する。算出に当たって各検知試験の Cq 値は、DNA 試料液であれば 1 ウェルごとの値*［ΔCq (DNA 試料液) = Cq(P35S 又は TNOS) – Cq(SSIIb)］、標準プラスミド DNA 溶液であれば 2 ウェル併行の平均値［ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液) = Cq(P35S 又は TNOS) – Cq(SSIIb)］とする。次に、得られた ΔCq 値から DNA 試料液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験 1 ウェルごとの ΔΔCq 値［ΔΔCq =ΔCq (DNA 試料液)－ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液)］を算出し、以下の判定を行う。

(1) 得られた ΔΔCq 値が 0 以下の場合［ΔΔCq ≦ 0］、そのウェルは「＋」と判定する。

(2) 得られた ΔΔCq 値が 0 より大きい場合［ΔΔCq > 0］又は DNA 試料液における P35S 検知試験若しくは TNOS 検知試験において Cq 値が得られず ΔCq 値が算出できない場合、そのウェルは「－」と判定する。

* ΔCq 値を算出するに当たっての各検知試験（SSIIb、P35S 及び TNOS）のウェルの組合せは、PCR 用反応液をプレートに分注する際に決めた組合せとする。

（図 7）リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）

DNA 試料液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。

(1) 2 ウェル共に「＋」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陽性と判定する。

(2) 2 ウェル共に「－」と判定された場合、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記(1)以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

* 該当する検知試験に加え、SSIIb 検知試験も再度実施する必要があることに留意する。

（図 8）2 併行抽出試験結果の判定スキーム（トウモロコシ）

得られた結果から以下の判定を行う。

(1) P35S 検知試験及び TNOS 検知試験のいずれか又は両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陽性と判定された場合、当該検体を検体陽性と判定する。

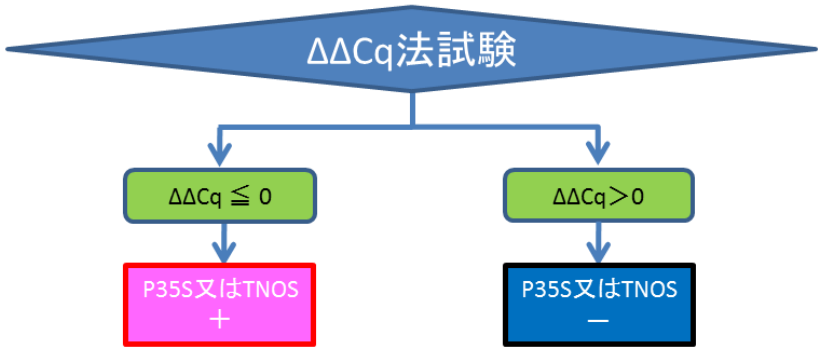
(2) P35S 検知試験及び TNOS 検知試験の両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体から抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を実施し*、得られた結果が上記(1)以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

* P35S 検知試験又は TNOS 検知試験で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合、再抽出した DNA 試料液による当該検知試験は不要とする。なお、いずれの場合も SSIIb 検知試験は実施する必要があることに留意する。

図6　リアルタイムPCR試験結果の各ウェルの判定スキーム（トウモロコシ）

ΔCq＝Cq＊（P35S又はTNOS）－Cq＊（SSIIb）
ΔΔCq＝ΔCq（DNA試料液）－ ΔCq（標準プラスミドDNA溶液）



＊DNA試料液のCq値は1ウェルごとの値、標準プラスミドDNA溶液のCq値は2ウェルの平均値を用いる

図7　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）

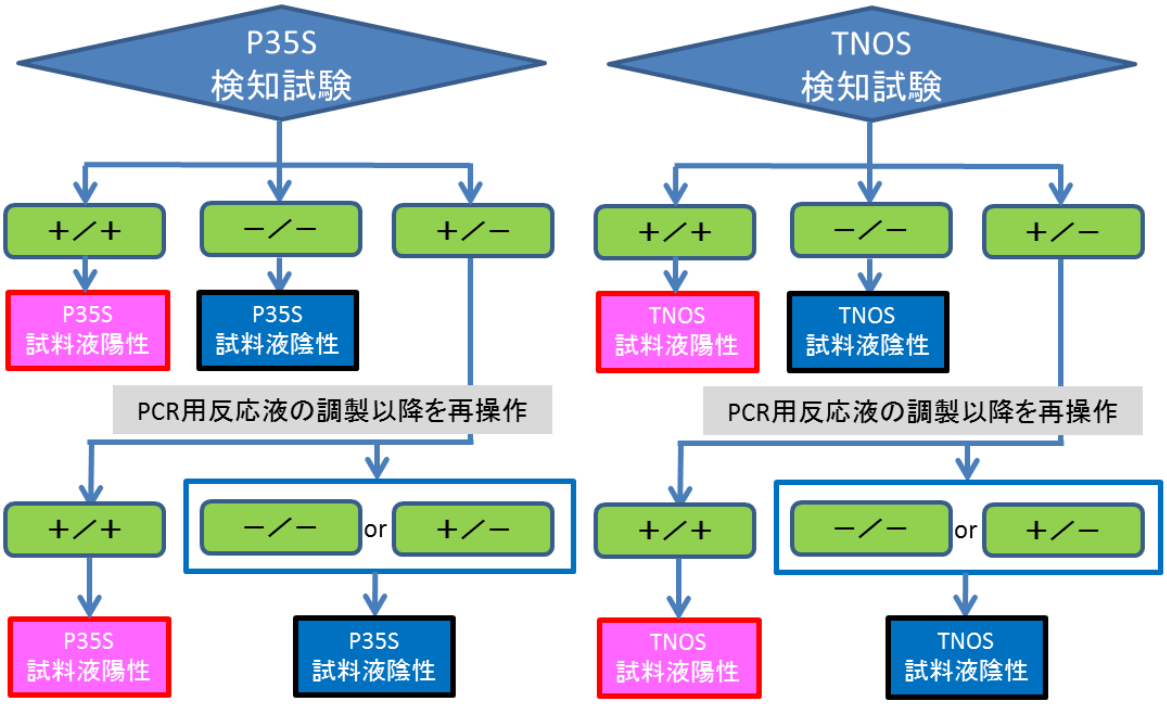


図8-1　2併行抽出試験結果の判定スキーム（トウモロコシ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ				検知結果
	P35S		TNOS		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	DNAの抽出精製以降を再操作※
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

※試料液1及び2共に試料液陰性の検知試験については、
DNAの抽出精製以降の再操作は不要とする

図8-2　2併行抽出試験結果の判定スキーム（DNA再抽出時）（トウモロコシ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ				検知結果
	P35S		TNOS		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	検体陰性
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

2.5. ダイズ加工食品の検査法

ダイズ加工食品においては、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、内在性遺伝子 Le1 を検知するダイズ陽性対照試験、並びに P35S、PAT 及び RRS2 を検知する遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験を行う*1。ただし、加工食品では遺伝子によって加工過程での DNA 分解率が一定でないため、定量 PCR による正確な判定はできない。そのため、ダイズ加工食品においては、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述する。なお、PAT 検知試験については、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K、LightCycler 96、LightCycler 480 を使用できる。ただし、最終頁に記載した同等性確認方法*2 にのっとって、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 P35S 検知試験により RRS 等が、PAT 検知試験により DAS44406 等が、及び RRS2 検知試験により RRS2 が検出可能である。内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブは以下のとおりである。
Le1 検知：Le1n 02-5’（5’-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3’）、
Le1n 02-3’（5’-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3’）及び
Le1-Taq（5’-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3’）
P35S 検知：P35S 1-5’（5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’）、
P35S 1-3’（5’- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3’）及び
P35S-Taq（5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3’）
PAT 検知：PAT-120F（5’-AGATACCCTTGGTTGGTTGCTG-3’）、
PAT-120R（5’-ATGTGACACGTAAACAGTACTCTCA-3’）及び
PAT-1-Taq（5’-FAM- TGCTTACGCTGGGCCCTGGAAG-TAMRA-3）
RRS2 検知：MON89788-F（5’-TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT-3’）、
MON89788-R（5’-TCGAGCAGGACCTGCAGAA-3’）及び
MON89788-P（5’-FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-TAMRA-3’）

*2 最終頁に掲載した「検査方法の同等性確認方法」にのっとって、同等性が確認された DNA 抽出キット、リアルタイム PCR 装置、マスターミックスを使用してもよい。

2.5.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR

2.5.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 12.5 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μM）0.5 μL、対象プローブ溶液（10 μM）0.5 μL、水 9 μL 及び 20 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL（50 ng）*2 又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 μL*3。分注操作終了後、真上からプレートの蓋*4 をする。このとき、片側にゆがみがたまらないよう両側のウェルから交互に閉める。次いで、専用ロ

ーラーを用いて完全にウェルを密閉する。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix
本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前に転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。
*2 DNA 試料液の濃度が 20 ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。
*3 定性 PCR 用反応液の調製
冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。
*4 96 ウェルプレート及びプレートの蓋
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical 8-Cap Strips（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。

2.5.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）
反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「UNKN」: DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「NTC」、「UNKN」のそれぞれについて Reporter が「FAM」、Reference が「ROX」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する。

2.5.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）
装置にプレートをセットし、装置の蓋の温度（cover temperature）が 105°C 付近になったことを確認した後、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.5.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）
遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線及び Cq 値の確認、並びに multicomponent 上での対象蛍光色素由来

の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。まず、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line（Th）として 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR

2.5.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成は 2.5.1.1 PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおりである。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*1。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 4 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad
MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.5.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well）

PCR 用反応液は 20 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 10 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μM）0.4 μL、対象プローブ溶液（10 μM）0.4 μL、水 6.7 μL 及び 20 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL（50 ng）*2 又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 μL*3。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。この時、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*4。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を

軽く叩いて気泡を抜いておく。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 4 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix
本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前に転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注するときは、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。
*2 DNA 試料液の濃度が 20 ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。
*3 定性 PCR 用反応液の調製
冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。
*4 384 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター
MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.5.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）
反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。

* Detector の設定
Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.5.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）
装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。また、96 ウェルと 384 ウェルでは反応液量が異なる

ことから、それぞれにあった液量での設定を行う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）

遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線及び Cq 値の確認、並びに multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。まず、遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line（Th）として 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR

2.5.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成は 2.5.1.1 PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおりである。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*1。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*2 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad
MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.5.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

* Detector の設定

Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.5.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.5.3.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7000）

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は 2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）の記載のとおりとする。

2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 12.5 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μM）0.5 μL、対象プローブ溶液（10 μM）0.5 μL、水 9 μL 及び 20 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL（50 ng）*2 又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 μL*3。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う*4。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試

験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 4 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1 TaqMan® Universal PCR Master Mix
本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前に転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。
*2 DNA 試料液の濃度が 20 ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。
*3 定性 PCR 用反応液の調製
冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。
*4 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

2.5.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500）
反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。

* Detector の設定
Detector は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.5.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）
装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において、RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。なお、ソフトウェア

バージョン 2.0 以降は、2.1.1.4.2　プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500）を参照し設定する。

2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500）

遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線及び Cq 値の確認、並びに multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。まず、遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line（Th）として 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.5.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR

2.5.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System）

PCR 用反応液は 20 μL/キャピラリーとして調製する。その組成は以下のとおりである。LC- FastStart DNA Master Hybridization Probes*1 2 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー，25 μM）0.4 μL、対象プローブ（10 μM）0.4 μL、水 12.3 μL、$MgCl_2$ 溶液（25 mM）2.4 μL 及び 20 ng/μL DNA 試料液 2.5 μL（50 ng）*2 又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 μL*3。分注操作終了後、真上から蓋をし、完全にキャピラリーを密閉する。最後に遠心操作*4 を行い、混合液をキャピラリーにしっかり充填する。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 キャピラリー併行して行うものとする。

*1 LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes

LC-FastStart Enzyme（1a red cap）と LC-FastStart Reaction Mix Hybridization Probes（1b colorless cap）とを混合し、調製する。調製した LC-FastStart DNA Master Hybridization Probes は、4°C で一週間の保存が可能である。また、本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。

*2 DNA 試料液の濃度が 20 ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。

*3 定性 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*4 遠心操作

遠心操作は、キャピラリーの破損を避けるため、専用のカローセル遠心機を使用し行うか、又は汎用の遠心機を使用する場合には 700×g 以下、フラッシュの条件で行う。なお、遠心操作のいかんに関わらず、装置本体にセットする前にはキャピラリーをカローセルに装填する。この際も、キャピラリーの破損に十分注意しつつ、しっかりとセットすること。

2.5.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System）

反応に際しては、キャピラリー情報の設定を行わなければならない。具体的にはサンプルリスト作成画面上で、調製したキャピラリーの配置（カローセル上の配置）に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Type 欄において指定する。また、Seek Temperature を 30°C と設定し、Maximum Position にはカローセルに装填したキャピラリーの最大位置番号を入力する。

2.5.5.3. PCR（Roche LightCycler System）

装置にカローセルをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。95°C、10 分間の条件で加温したホットスタート法により反応を開始した後、95°C 15 秒、59°C 30 秒（1°C /秒）*1 を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。増幅反応終了後、40°C 30 秒の条件で保つ。データの取り込みは、増幅反応の各サイクル終了時に行わせるよう設定する*2。

*1 加温、冷却速度

ここに示している以外、加温、冷却の速度は 20°C /秒とする。

*2 データの取り込み設定

データの取り込み設定の実際は、サイクルプログラムデータ画面において、59°C 30 秒と設定したカラムについて「Acquisition Mode」を「Single」と設定する。

2.5.5.4. 測定結果の解析（Roche LightCycler System）

反応が終了していることを確認した後に、「Fit Points 法」を用いて解析を行う。

2.5.6. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.5.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5）

PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.5.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.5.6.3. PCR（QuantStudio 5）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.5.6.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5）

PCR 結果の解析は、2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。

2.5.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.5.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex）

PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。

2.5.7.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。

* Target の設定

Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。

2.5.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.5.7.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex）

PCR 結果の解析は、2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。

2.5.8. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR

2.5.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）

PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。ただし、96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、以下の注釈を参照すること*。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.5.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96）

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し、{Gene}に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Type において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、Name に名称を入力しておく。

2.5.8.3. PCR（LightCycler® 96）

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、96 ウェルプレートを切欠き部を右下にしてサーマルブロック上に載せ、セットして閉じる。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で反応条件を設定する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。 [Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.5.8.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96）

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル（Cq）値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルの Cq 値を算出する*。

* 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット（色素）に依存する。

2.5.9. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.5.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。ただし、96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、以下の注釈を参照すること*。

* 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーターについては、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.5.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480）

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、（+）ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類（「Negative Control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液）を選択する。

2.5.9.3. PCR（LightCycler® 480）

本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダーを出しプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、48 サイクルの増幅反応を行う。 RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.5.9.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）

2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cq 値とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.5.10. 測定結果の判定

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム（図 9→図 10）に従って判定する。

（図 9）リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

ダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）について以下の(1)～(3)の判定を行う。ダイズ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度検体から抽出した DNA 試料液でダイズ陽性対照試験(Le1)を行う。再抽出した DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

(1) 遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。

(2) 遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られることを確認した後、(1)と(2)以外と判定された遺伝子組換えダイズ検知試験を実施し、上記(1)以外の場合は、陰性と判定する。

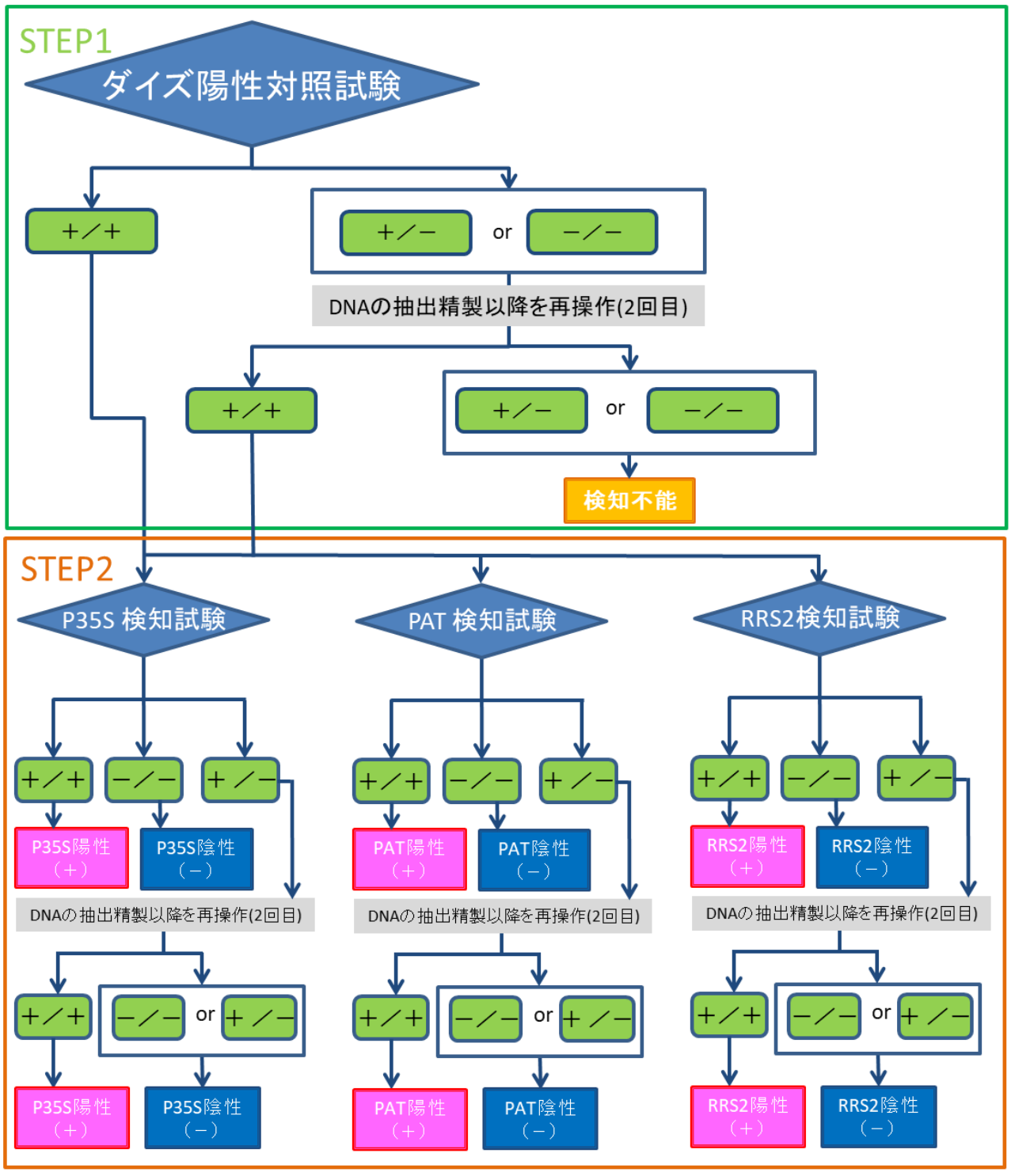
（図 10）2 併行抽出試験結果の判定スキーム

(1)遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）のうち 1 試験以上で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において陽性と判定された場合は、当該検体を検体陽性と判定する。

(2)遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）の全てで、2 併行抽出した両方の DNA 試料液のうち少なくとも一方において陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。

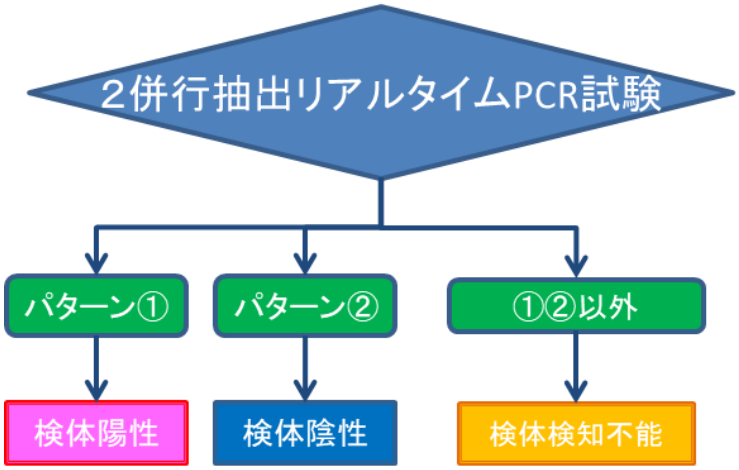
(3)一方の DNA 試料液で検知不能と判定された場合、又は両方の DNA 試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

図9　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに各系統の判定を行う。最終的な判定は図10に従い行う。

図10　2併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ					
	P35S		PAT		RRS2	
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2
①	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	−
	+	+	+	+	−	+
	+	+	+	+	−	−
	+	+	+	−	+	+
	+	+	+	−	+	−
	+	+	+	−	−	+
	+	+	+	−	−	−
	+	+	−	+	+	+
	+	+	−	+	+	−
	+	+	−	+	−	+
	+	+	−	+	−	−
	+	+	−	−	+	+
	+	+	−	−	+	−
	+	+	−	−	−	+
	+	+	−	−	−	−
	+	−	+	+	+	+
	+	−	+	+	+	−
	+	−	+	+	−	+
	+	−	+	+	−	−
	+	−	+	−	+	+
	+	−	−	+	+	+
	+	−	−	−	+	+
	−	+	+	+	+	+
	−	+	+	+	+	−
	−	+	+	+	−	+
	−	+	+	+	−	−
	−	+	+	−	+	+
	−	+	−	+	+	+
	−	+	−	−	+	+
	−	−	+	+	+	+
	−	−	+	+	+	−
	−	−	+	+	−	+
	−	−	+	+	−	−
	−	−	+	−	+	+
	−	−	−	+	+	+
	−	−	−	−	+	+
	−	−	−	−	−	−
②	+	−	+	−	+	−
	+	−	+	−	−	+
	+	−	+	−	−	−
	+	−	−	+	+	−
	+	−	−	+	−	+
	+	−	−	+	−	−
	+	−	−	−	+	−
	+	−	−	−	−	+
	+	−	−	−	−	−
	−	+	+	−	+	−
	−	+	+	−	−	+
	−	+	+	−	−	−
	−	+	−	+	+	−
	−	+	−	+	−	+
	−	+	−	+	−	−
	−	+	−	−	+	−
	−	+	−	−	−	+
	−	+	−	−	−	−
	−	−	+	−	+	−
	−	−	+	−	−	+
	−	−	+	−	−	−
	−	−	−	+	+	−
	−	−	−	+	−	+
	−	−	−	+	−	−
	−	−	−	−	+	−
	−	−	−	−	−	+

＊一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.6. トウモロコシ加工食品の検査法

トウモロコシ加工食品においては、2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、トウモロコシ穀粒と同様に内在性遺伝子である SSIIb 遺伝子（トウモロコシ陽性対照試験）、並びに遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列である *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の TNOS（遺伝子組換えトウモロコシ検知試験*1）を同時に検出するマルチプレックスリアルタイム PCR を行う。ただし、加工食品では遺伝子によって加工過程での DNA 分解率が一定でないため、正確な判定はできない。そのため、トウモロコシ加工食品においては、マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性 PCR*2 を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法にのっとって、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 本検査では SSIIb を検出するプローブは VIC で標識されているが、P35S と TNOS を検出するプローブはどちらも FAM で標識されているため，これらの遺伝子量の合計（P35S+TNOS）に相当する蛍光値が得られる。

*2 最終頁に掲載した「検査方法の同等性確認方法」にのっとって、同等性が確認された DNA 抽出キット、リアルタイム PCR 装置、マスターミックスを使用してもよい。

2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 用反応液は 10 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche Diagnostics 社）*1 5 µL、対象プライマーとして SSIIb 3-5’（50 µM）0.016 µL*2、SSIIb 3-3’（50 µM）0.016 µL*2、P35S 1-5’（50 µM）0.05 µL*3、P35S 1-3’（50 µM）0.05 µL*3、NOS ter 3-5’（50 µM）0.06µL*4、NOS ter 2-3’（50 µM）0.06 µL*4、対象プローブとして SSIIb-TaqV（10 µM） 0.08µL*5、P35S-Taq（10 µM） 0.1 µL*6、NOS-Taq（10 µM） 0.12 µL*7、水 1.948 µL 及び 20ng/µL DNA 試料液 2.5 µL*8 又は蒸留水（ブランク試料液：NTC）2.5 µL *9。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併行で行うものとする。調製の際に、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*10 を先に調製しておき、これと FastStart Universal Probe Master (Rox)及び DNA 試料液を上記の組成で混合し、プレートに分注する。分注操作終了後、真上からシール*11 し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*12 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 FastStart Universal Probe Master (Rox)

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい撹拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 SSIIb 3-5'及び SSIIb 3-3'

配列は以下のとおりである。

SSIIb 3-5'： 5'-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3'

SSIIb 3-3'： 5'-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3'

代わりに対象プライマー対として SSIIb-3（25 μM）0.032 μL を用いてもよい。

*3 P35S 1-5' 及び P35S 1-3'

配列は以下のとおりである。

P35S 1-5'： 5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'

P35S 1-3'： 5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

代わりに対象プライマー対として P35S-1（25 μM）0.1 μL を用いてもよい。

*4 NOS ter 3-5'及び NOS ter 2-3'

配列は以下のとおりである。

NOS ter 3-5'： 5'-GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3'

NOS ter 2-3'： 5'-CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT-3'

*5 SSIIb-TaqV

蛍光色素として VIC で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'

*6 P35S-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA-3'

*7 NOS-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5'-FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3'

*8 DNA 試料液の濃度が 20 ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。

*9 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*10 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

SSIIb 3-5' 0.32 μM、SSIIb 3-3' 0.32 μM、P35S 1-5' 1 μM、P35S 1-3' 1 μM、NOS ter 3-5' 1.2 μM、NOS ter 2-3' 1.2 μM、SSIIb-TaqV 0.32 μM、P35S-Taq 0.4 μM、NOS-Taq 0.48 μM となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に

混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

*11 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*12 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.6.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、SSIIb は、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」、P35S+TNOS は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」、となるように設定する*。なお、Passive Reference を「ROX」と設定する。

* 蛍光色素の Detector を登録する際に、「SSIIb」は「VIC」、「P35S+TNOS」は「FAM」に設定する。

2.6.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

2.6.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

遺伝子組換えトウモロコシ検知試験及びトウモロコシ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線及び Cq 値の確認、並びに multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM 又は VIC）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。まず、遺伝子組換えトウモロコシ（P35S+TNOS）検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えトウモロコシ陽性を疑う。次いで、ベース

ラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line（Th）として 0.2 に設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.6.2.1. PCR 用反応液の調製*1（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

PCR 用反応液は 10 μL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche Diagnostics 社）*2 5 μL、対象プライマーとして SSIIb 3-5’（50 μM）0.016 μL*3、SSIIb 3-3’（50 μM）0.016 μL*3、P35S 1-5’（50 μM）0.05 μL*4、P35S 1-3’（50 μM）0.05 μL*4、NOS ter 3-5’（50 μM）0.06μL*5、NOS ter 2-3’（50 μM）0.06 μL*5、対象プローブとして SSIIb-TaqV（10 μM）0.08μL*6、P35S-Taq（10 μM）0.1 μL*7、NOS-Taq（10 μM）0.12 μL*8、水 1.948 μL 及び 20ng/μL DNA 試料液 2.5 μL*9 又は蒸留水（ブランク試料液：NTC）2.5 μL。試験は、1 DNA 試料液当たり 2 ウェル併行で行うものとする。調製の際に、対象プライマー対と対象プローブの混合溶液*10 を先に調製しておき、これと FastStart Universal Probe Master (Rox)及び DNA 試料液を上記の組成で混合し、プレートに分注する。分注操作終了後、真上からシール*11 し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 定性 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*2 FastStart Universal Probe Master (Rox)

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。ただし、本試薬はボルテックス等による激しい撹拌が禁止されているため、使う直前には必ず転倒混和等で混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*3 SSIIb 3-5’及び SSIIb 3-3’

配列は以下のとおりである。

SSIIb 3-5’： 5’-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3’

SSIIb 3-3’： 5’-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3’

代わりに対象プライマー対として SSIIb-3（25 μM）0.032 μL を用いてもよい。

*4 P35S 1-5’ 及び P35S 1-3’

配列は以下のとおりである。

P35S 1-5’： 5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’

P35S 1-3’： 5’-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3’

代わりに対象プライマー対として P35S-1（25 μM）0.1 μL を用いてもよい。

*5 NOS ter 3-5’及び NOS ter 2-3’

配列は以下のとおりである。

NOS ter 3-5’： 5’-GCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGAC-3’

NOS ter 2-3’： 5’-CGCTATATTTTGTTTTCTATCGCGT-3’

*6 SSIIb-TaqV

蛍光色素として VIC で標識している。配列は以下のとおりである。

5’-VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3’

*7 P35S-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA-3’

*8 NOS-Taq

蛍光色素として FAM で標識している。配列は以下のとおりである。

5’-FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA-3’

*9 DNA 試料液の濃度が 20 ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。

*10 対象プライマー対と対象プローブの混合溶液

SSIIb 3-5’ 0.32 μM、SSIIb 3-3’ 0.32 μM、P35S 1-5’ 1 μM、P35S 1-3’ 1 μM、NOS ter 3-5’ 1.2 μM、NOS ter 2-3’ 1.2 μM、SSIIb-TaqV 0.32 μM、P35S-Taq 0.4 μM、NOS-Taq 0.48 μM となるよう水で希釈し、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、調製する。また、本混合液は凍結保存が可能であるが、凍結融解を繰り返すことは避ける。

*11 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.6.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置及び種類並びにプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「Negative control」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液）の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、VIC には SSIIb、FAM には P35S+TNOS を割り当てる*。

* あらかじめ Detection Format にて VIC と FAM を選択しておく。

2.6.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクル*の増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。

* LightCycler® 480 の場合、サイクル数は 43 に設定する。

2.6.2.4. 測定結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

解析は PCR 装置付属のソフトウェアで行う。LightCycler® 96 においては、SSIIb 及び P35S+TNOS の Minimal EPF を 0.1 に設定する。遺伝子組換えトウモロコシ（P35S+TNOS）検知試験及びトウモロコシ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は Amplification curves 上での指数関数的な増幅曲線及び Cq 値の確認をもって行う。

2.6.3. 測定結果の判定

2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液を 2 ウェル併行で測定した結果について、以下の判定スキーム（図 11→図 12）に従って判定する。

（図 11）リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

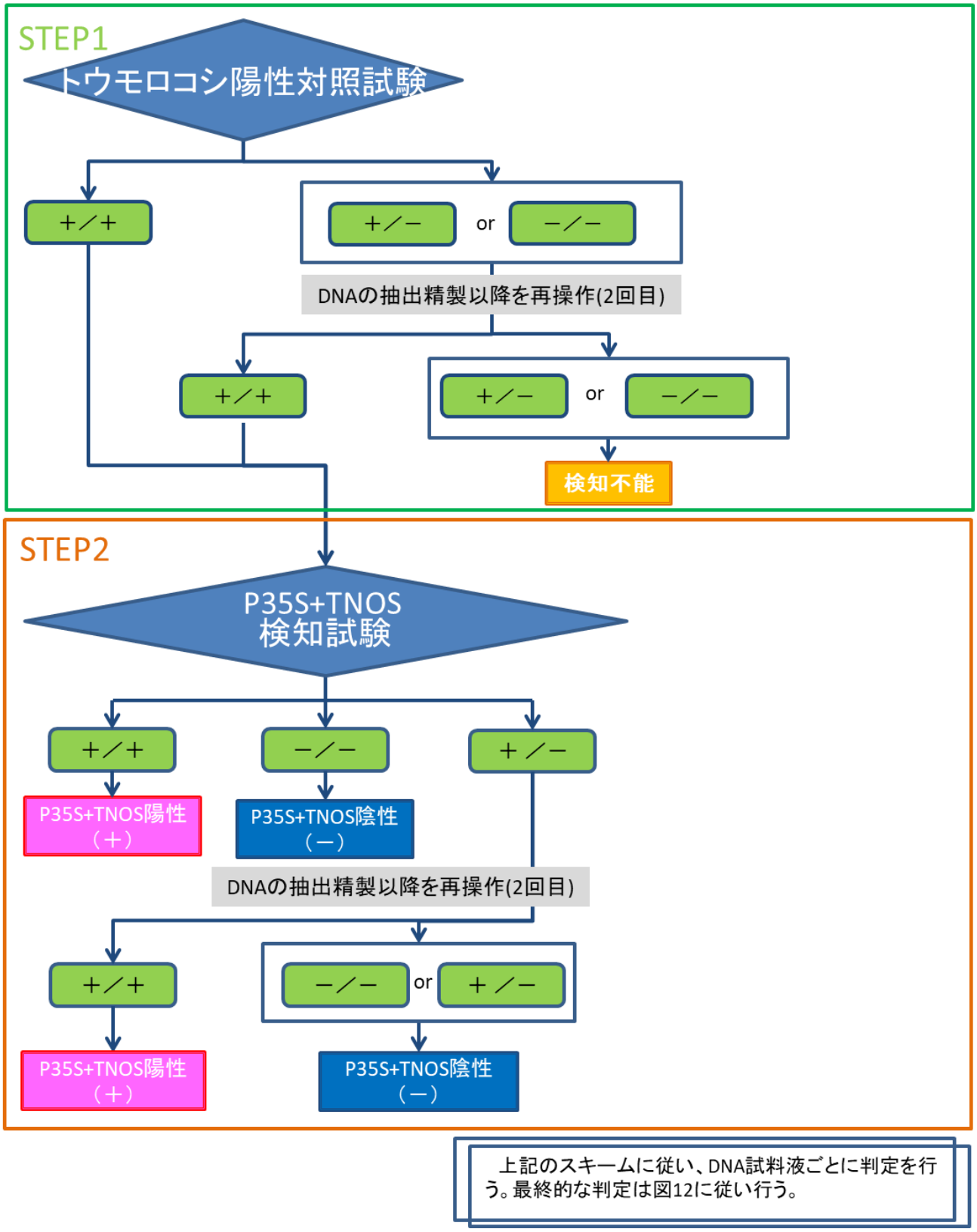
トウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験について以下の(1)～(3)の判定を行う。トウモロコシ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 38 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でトウモロコシ陽性対照試験(SSIIb)を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 38 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

(1) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
(2) 遺伝子組換えトウモロコシ検知試験で 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体から抽出した DNA 試料液を用いてトウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験を実施し、上記(1)以外の場合は、陰性と判定する。

（図 12）2 併行抽出試験結果の判定スキーム

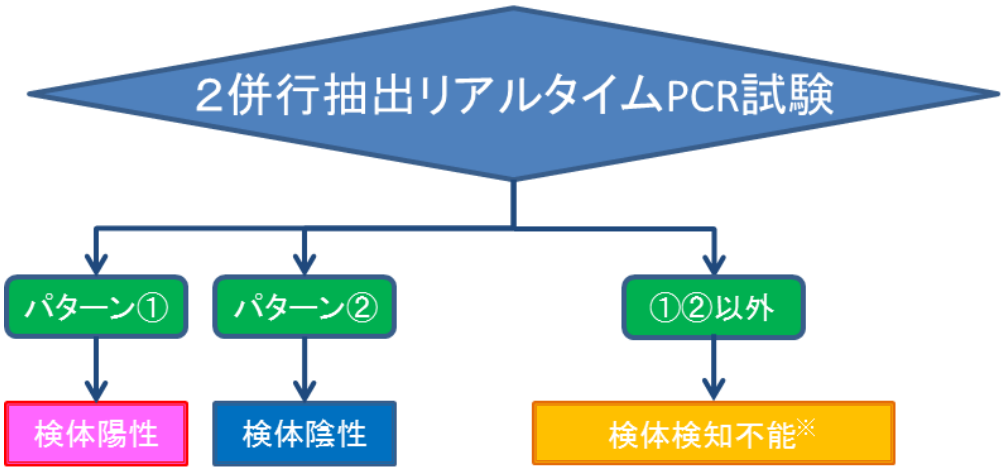
遺伝子組換えトウモロコシ検知試験について、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において陽性と判定された検体を検体陽性と判断し、少なくとも一方の DNA 試料液において陰性と判定された検体を検体陰性と判断する。また、一方の DNA 試料液で検知不能と判定された場合、又は両方の DNA 試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

図11　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに判定を行う。最終的な判定は図12に従い行う。

図12　2併行抽出試験結果の判定スキーム（トウモロコシ）



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ	
	P35S+TNOS	
	試料液1	試料液2
①	＋	＋
②	＋	－
	－	＋
	－	－

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方の DNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.7. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」では代表的な DNA 抽出精製法を示している。現在、DNA 抽出精製キットとして様々な製品が市販されている。検査を実施する機関により扱う検体は異なり、試料中のマトリックスも大きく異なる場合がある。そのため、実施する試験や検体の種類に適した方法を用いることができる（DNA 抽出精製方法の同等性確認方法は、最終頁に示したとおりである）。ただし、各検査法において DNA の抽出精製以降を再操作する場合は、同じ DNA 抽出精製法を用いて、その方法で検知不能になるかを判定する。

DNA の抽出精製の際用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ･cm まで精製した超純水など、DNA、DNase 等がコンタミネーションしていないものを用いること。

2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの 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 を得ることができる非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルムという有害試薬を用いること及び煩雑な精製操作が必要という欠点がある。市販の DNA 抽出キットを用いるとこれらの欠点を解消することができる。市販の DNA 抽出キットには、シリカゲル膜タイプのもの、シリカベースのレジンタイプのもの、イオン交換樹脂タイプのもの、マグネット吸着ビーズタイプのものがあるが、いずれの方法を利用しても、トウモロコシ、ダイズ等の穀粒から PCR に利用可能な DNA を抽出精製することができる。以上の点を考慮して、本項では、CTAB 法とシリカゲル膜タイプキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 並びに NIPPON GENE GM quicker）を用いた方法、シリカベースのレジンタイプのキット（Promega Wizard DNA Clean-up System）を用いた方法を記す。なお、シリカゲル膜タイプキット法は、使用するキット及び適用する試料によって操作方法が異なるため注意する。

2.7.1.1. CTAB 法

均質に粉砕された試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、CTAB 緩衝液*1 15 mL を入れ、ホモジナイザーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の縁とホモジナイザーの先を洗浄するように CTAB 緩衝液 30 mL を加え、転倒混和後 55°C で 30 分間放置する*2。次いで放置液を撹拌し、均質化した溶液 600 µL をマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に量り採る。次いで 500 µL のフェノール/クロロホルム混合液*3 を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×g で 15 分間室温遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。このとき、中間層に触れないように注意する。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液*4 500 µL を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×g で 15 分間室温で遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロパノール（室温）を加え、転倒混和後 7,500

×g で 10 分間室温遠心し、デカンテーションで上清を捨てる。500 µL の 70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500×g で 1 分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2～3 分間真空乾燥する。このとき、完全に乾燥しないように注意する。50 µL の TE 緩衝液*5 を加えてよく混和後、室温に 15 分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5 µL を加え、37°C で 30 分間放置する。200 µL の CTAB 緩衝液を加えた後、250 µL のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×g で 15 分間室温遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。このとき、中間層に触れないように採取する。200 µL のイソプロパノールを加え、転倒混和してから、7,500×g で 10 分間、室温で遠心し、デカンテーションで上清を捨てる。次いで、200µL の 70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500×g で 1 分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2～3 分間真空乾燥する。このとき、完全に乾燥しないよう注意する。50 µL の水を加えて混合した後、15 分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものを DNA 試料原液*6 とする。

*1 CTAB 緩衝液
ビーカーに、0.5 M EDTA（pH8.0）8 mL、1 M Tris-HCl（pH8.0）20 mL、5 M 食塩水 56 mL を入れ、約 150 mL となるように水を加え、撹拌しながら CTAB 4g を加えて完全に溶解する。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。

*2 ホモジナイザーを使用しない場合には、ボルテックスミキサーを用いて試料塊がないように激しく混合する。その際には、まず 15 mL の CTAB 緩衝液を加え十分に混合した後、さらに CTAB 緩衝液 30 mL を加え混合する。混合後は、加温処理以降の操作に従う。

*3 フェノール/クロロホルム混合液
1 M Tris-HCl（pH8.0）飽和フェノールとクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を 1：1（v/v）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）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-HCl（pH8.0）、1 mM EDTA（pH8.0）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。

*6 定量 PCR に供する際は、DNA 試料液は TE 緩衝液を用いて DNA を溶解し、濃度を調製したものとする。そのため、定量 PCR 法を実施することを目的として DNA 抽出を行う場合には、真空乾燥させた沈殿に 50 µL の TE 緩衝液を加えて混合した後、4°C で一晩保存することで完全に溶解し、DNA 試料原液とする。

2.7.1.2. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit:トウモロコシに適用）

均質に粉砕した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液*1 10 mL と RNase A 20 μL を加え、試料塊がないように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 2、3 回、遠沈管を反転させて試料を撹拌する。P3 緩衝液*2 3,250 μL を加え、氷上に 10 分間静置した後、4,000×g 以上、4°C の条件で 20 分間遠心する*3。次いで、その上清 500 μL を QIAshredder spin column に負荷し、10,000×g 以上で 4 分間遠心後、溶出液を遠沈管（15 mL 容）に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の 1.5 倍量の AW1 緩衝液*4 を加える。その混合液 500 μL を mini spin column に負荷し、10,000×g 以上で 1 分間*5 遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 μL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW2 緩衝液*6 500 μL を負荷し、10,000×g 以上で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計 3 回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000×g 以上で 20 分間遠心する。mini spin column を新しい 2 mL 遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた水 70 μL を加え、5 分間静置した後、10,000×g 以上で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液*7 とする。

*1 AP1 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*2 P3 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清
上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AW1 緩衝液
使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW1 緩衝液とする。

*5 遠心時間
mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。全ての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

*6 AW2 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW2 緩衝液とする。

*7 定量 PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。

「mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた TE 緩衝液 70 µL を加え、5 分間静置した後、10,000×g 以上で 1 分間遠心し、DNA を溶出する。もう一度 TE 緩衝液を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。」

2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用）

均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液*1 10 mL と RNase A 20 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°C で 1 時間加温する。その間 5、6 回、遠沈管を反転させて試料を撹拌する。スイング式遠心分離機を使用し、3,000×g、室温の条件で 10 分間遠心後、その上清 7 mL を、ポリプロピレン製遠沈管（15 mL 容）に移す。P3 緩衝液*2 2,500 µL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間激しく撹拌する。氷上に 15 分間静置後、スイング式遠心機で 3,000×g 以上、室温の条件で 35 分間遠心する*3。得られた上清のうち 8 mL を新しい 15 mL チューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて撹拌した後、500 µL を QIAshredder spin column に負荷し、10,000×g 以上で 4 分間遠心後、溶出液を遠沈管（15 mL 容）に移す。その溶出液の 1.5 倍量の AW1 緩衝液*4 を加える。混合液 500 µL を mini spin column に負荷し、10,000×g 以上で 1 分間*5 遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 µL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW2 緩衝液*6 500 µL を負荷し、10,000×g 以上で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計 3 回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000×g 以上で 20 分間遠心する。mini spin column を新しい 2 mL 遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた水 70 µL を加え、5 分間静置した後、10,000×g 以上で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液*7 とする。

*1 AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*2 P3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AW1 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW1 緩衝液とする。

*5 遠心時間

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。全ての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜、調整する。

*6 AW2 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW2 緩衝液とする。

*7 定量 PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。

「mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた TE 緩衝液 70 µL を加え、5 分間静置した後、10,000×g 以上で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度 TE 緩衝液を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。」

2.7.1.4. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用）

均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、GE1 緩衝液*1 6 mL と RNase A 20 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後*2、室温で 10 分間静置する。GE2 緩衝液*3 750 µL を加え、10～12 回転倒混和し*4、氷上に 10 分間静置する。5,000×g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心*5 する。次いでその上清*6 400 µL を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 50µL 及びエタノール（100%）200 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する*7。混合液 650µL（全量）を spin column に負荷した後、13,000×g 以上、4°C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 µL を負荷し、13,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を乾燥させるため、13,000×g 以上、4°C の条件で 3 分間遠心する。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、水 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000×g 以上で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液*8 とする。

*1 GE1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*2 撹拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。ボルテックスに対して 50 mL 容チューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと撹拌する。撹拌が不十分な場合はさらに 30～60 秒間撹拌する。

*3 GE2 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*4 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2 緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加した GE2 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

*5 使用するローター及び 50 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

*6 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。また、上清は 4 mL 程分取することが可能であり、4°C の条件であれば、数日は安定である。その後の試験にあわせ、DNA の再抽出・精製が必要となった場合には、本上清を用い、それ以降の操作を実施する。

*7 GB3 緩衝液を添加し、続いてエタノール（100%）を添加した後に、撹拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

*8 定量 PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。
「spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000×g 以上で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。」

2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用）

均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、GE1 緩衝液*1 12 mL と RNase A 40 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後*2、室温で 10 分間静置する。GE2 緩衝液*3 1,500 µL を加え、10～12 回転倒混和し*4、氷上に 10 分間静置する。5,000×g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心する*5。次いでその上清*6 700 µL を 2.0 mL チューブに移し、GE3 緩衝液 250 µL 及びイソプロパノール（100%）250 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する*7。混合液 600 µL を spin column に負荷し、13,000×g 以上、4°C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。残りの混合液全量を同じ spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 µL を負荷し、13,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、水 50 µL を加え、3 分間室温で静置した後、13,000×g 以上で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液*8 とする。

*1 GE1 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。
*2 撹拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。ボルテックスに対して 50 mL 容チューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと撹拌する。撹拌が不十分な場合はさらに 30～60 秒間撹拌する。
*3 GE2 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。
*4 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2 緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加した GE2 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。
*5 使用するローター及び 50 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。
*6 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。また、上清は 8 mL 程分取することが可能であり、4°C の条件であれば、数日は安定である。その後の試験にあわせ、DNA の再抽出・精製が必要となった場合には、本上清を用い、それ以降の操作を実施する。
*7 GB3 緩衝液を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、撹拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。
*8 定量 PCR に供する際は、spin column の乾燥以降の操作を下記のとおり変更し行う。
「spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000×g 以上で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。」

2.7.1.6. シリカベースレジンタイプキット法（Promega Wizard DNA Clean-up System）

均質に粉砕した試料 2 g を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*1 17.2 mL、5 M グアニジン-塩酸 2 mL 及び 20 mg/mL Proteinase K を 0.8mL 加え、激しくボルテックスミキサーで撹拌後、55～60°C で振とうしながら 3 時間保温する。次いで、室温まで温度を下げ、3,000×g で 10 分間遠心する。上清が濁っている場合、上清の一部をマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に移し、さらに 14,000 ×g で 10 分間遠心する。得られた澄明な上清 500 µL と、DNA Clean-up Resin 1 mL をマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に採り、転倒混和し、混合液とする。次に mini column の上部に注射筒を付け、マニホールド（吸引装置）に装着する。マニホールドのコックを閉じ、吸引装置内部が十分に減圧になっていることを確認した後、混合液を注射筒から mini column に負荷する。直ちにコックを開け、最速で減圧吸引して溶液を完

全に除去し、次いで 2 mL の 80%イソプロパノールを注射筒から加えカラムを洗浄する。注射筒を外した mini column をマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に装着し、室温下 10,000×g で 2 分間遠心し、カラムを乾燥する。次に mini column を新しいマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に移し、あらかじめ 65～70°C に温めておいた水 100 µL を滴下する*2。1 分間放置後、室温下 10,000×g 以上で 1 分間遠心し、DNA を溶出し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 抽出用緩衝液
150 mM NaCl、2 mM EDTA 及び 1% SDS を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）

*2 定量 PCR 法に供する際は、水の代わりにあらかじめ 65～70°C に温めておいた TE 緩衝液 100 µL を滴下する。

2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法

食品表示基準第 3 条第 2 項に規定する別表第 17 下欄のダイズ及びトウモロコシ加工食品からの DNA の抽出精製は、以下の手法で行う。

検体の粉砕に用いる粉砕器には、水分を含む検体に適した粉砕器と、乾燥検体に適した粉砕器があるので、検体の性状に合わせて選択する。また、粉砕器には、刃が回転するもの、粉砕ボールを利用するボールミル、遠心力と高速回転のローターにより粉砕する超遠心粉砕器等があるが、コンタミネーション防止のために、粉砕容器、カッター等が分解でき、洗浄が十分行えるものを用いる。更に望ましいのは、滅菌できるものである。粉砕容器、カッター等は洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。なお、超音波ホモジナイザーは DNA を分解するので使用してはならない。

2.7.2.1. 検体前処理に記載する方法により前処理をした後、2.7.2.2.に記載する方法により DNA を抽出精製する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、適量（例えば 1 g）を採取し、ダイズ加工食品においては「2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）」、トウモロコシ加工食品においては「2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用）」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、適量（例えば 2 g）を採取し、「2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。GM quicker 4 を使用する場合は、「2.7.2.1. 検体前処理」後に乾燥した状態の検体においては「2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用）」、「2.7.2.1. 検体前処理」後に水分を多く含む検体においては「2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用）」に従う。CTAB を用いる方法の場合は、各項目に示した試料量を採取し、「2.7.2.2.6. CTAB を用いた DNA の抽出」に従う。なお、DNA 抽出は 1 試料当たり 2 併行で行う。

加工食品においては、その加工工程で DNA の分解が進んでいることから、ここに示した方法で分析可能な DNA が必ずしも抽出されるわけではないことに留意する必要がある。

2.7.2.1. 検体前処理

2.7.2.1.1. ダイズ加工食品

遺伝子組換えダイズの検査（P35S、PAT 及び RRS2）を行うための前処理を示す。

① 豆腐・油揚げ類

①-1 豆腐

検体 1 パックの固形部位（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、120 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

①-2 油揚げ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。厚揚げの場合、中の柔らかい部分のみを豆腐と同様に処理しても良い。

② 凍り豆腐、おから及びゆば

②-1 凍り豆腐

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）に検体重量の 10 倍量の滅菌水を加え、10 分後に水分を含む検体に適した粉砕器に移し粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

②-2 おから

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）分を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む検体についてはそのまま粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

②-3 ゆば

乾燥品の場合、検体に検体重量の 5 倍量の滅菌水を加え、20 分後に水分を含む検体に適した粉砕器に移し粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、150 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

水分を含むゆばの場合、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水

を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、120 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

③ 納豆

ざる*に 1 パックを開け、流水（水道水）で 15 分間洗浄して、表面のぬめりを除く。滅菌水で十分にすすいだ後、重量を測定し水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

* 台所用品の水切りネットを使い捨てにして使用するとよい。

④ 豆乳類

検体をよく振って混合したものを直接、抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、50 μL を採取する。石英砂を加える必要はない。

⑤ みそ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑥ 大豆煮豆

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を水分を含む検体に適した粉砕器に採り粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑦ 大豆缶詰及び大豆瓶詰

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑧ きなこ

検体をそのまま抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg 採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑨ 大豆いり豆

検体 1 パックを乾燥検体に適した粉砕器に採り粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑩　①から⑨までに掲げるものを主な原材料とするもの

⑩-1 液体

「④ 豆乳類」に従う。

⑩-2 液体以外

ダイズのみ（又はダイズ以外）分離が可能なものについては分離し、原材料に従い①から⑨までの各項目を参照する。

分離が困難なものについてはそのまま、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む検体についてはそのまま粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑪ 調理用の大豆を主な原材料とするもの

ダイズのみ（又はダイズ以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのまま、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加えて、十分水分を含む検体についてはそのまま粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑫ 大豆粉を主な原材料とするもの

⑪に同じ。

⑬ 大豆たんぱくを主な原材料とするもの

⑬-1 魚肉ソーセージ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、250 mg を採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑬-2 その他

⑪に同じ

⑭ 枝豆を主な原材料とするもの

⑪に同じ。

ただし、CTAB を用いる方法による場合は、分離可能なものについては、50 mg 採取し、分離が困難なものについては、100 mg 採取し、Proteinase K 処理を行う。

⑮ 大豆もやしを主な原材料とするもの

⑪に同じ。

なお、CTAB を用いる方法による場合は、分離可能なものについては、200 mg 採取し、分離が困難なものについては、100 mg 採取し、Proteinase K 処理を行う。

2.7.2.1.2. トウモロコシ加工食品

遺伝子組換えトウモロコシの定性スクリーニング検査を行うための前処理を示す。

① コーンスナック菓子

①-1 コーンチップス

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体の 2 倍の重さの滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、300mg を採取する。

① -2 コーンパフ

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体の 2 倍の重さの滅菌水を加え粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、400mg を採取する。

② コーンスターチ

検体をそのまま抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

③ ポップコーン

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体の 3 倍の重さの滅菌水を加えて粉砕する。均質な状態になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、300 mg を採取する。

④ 冷凍とうもろこし

検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

⑤ とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰

缶詰に含まれる水分を切った後、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、検体重量と等重量の滅菌水を加えて粉砕する。均質になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、100 mg を採取する。

⑥ コーンフラワーを主な原材料とするもの

コーンフラワーのみ（又はコーンフラワー以外）分離が可能なものについては分離したもの、分離が困難なものについてはそのままの、検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む検体についてはそのまま粉砕する。均質になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取する。

⑦ コーングリッツを主な原材料とするもの（コーンフレークを除く。）

⑥に同じ。

⑧ 調理用のとうもろこしを主な原材料とするもの

⑥に同じ。

⑨ ①から⑤までに掲げるものを主な原材料とするもの

⑥に同じ。検体 1 パック（又は水分を含む検体に適した粉砕器に入る量）を、水分を含む検体に適した粉砕器に採り、乾燥した検体では適宜滅菌水を加え、十分水分を含む検体についてはそのまま粉砕する。均質になったものを抽出に供する。なお、CTAB を用いる方法による場合は、200 mg を採取する。

2.7.2.2. DNA の抽出精製

2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）

均質に粉砕した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液[*1] 10 mL と RNase A 20 μL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°C で 1 時間加温する。その間 15 分ごとに 3 回、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g 、室温で 10 分間遠心分離する。マ

イクロピペットを用いて沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を7mL 採取し、新しい 15 mL（又は 50 mL）容チューブに移す。チューブに、P3 緩衝液*2 2.5 mL を添加後、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌後、氷水中に 15 分間静置する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g 、室温で 35 分間遠心分離する。マイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 8 mL 採取し、QIA shredder spin column （lilac）に負荷する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g 、室温で 5 分間遠心分離する。底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、マイクロピペットを用いて上清を7.5mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌した後、マイクロピペットを用いて 6.8 mL を採取し、新しい 50 mL チューブに移す。AW1 緩衝液*3 10.2 mL を添加し、ボルテックスミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌した後、デカンテーションにより溶液全量を DNeasy spin column（colorless）に負荷する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g 、室温で 15 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。カラムに AW2 緩衝液*4 12 mL を加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 15 分間遠心分離する。カラムを新しい 50 mL チューブに移し、あらかじめ 65°C に温めておいた水 1 mL を加える。5 分間室温で静置後、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 10 分間遠心分離する。マイクロピペットを用いて溶出液の液量を測り、2 mL のサンプルチューブに移す。溶出液と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。遠心分離器を使用し、12,000×g で 4°C、15 分間遠心分離後、上清を廃棄する。70%エタノール 500 µL を添加し、沈殿物がチューブの底からはがれるまでチューブの底を指先ではじく。遠心分離器を使用し、12,000×g で 4°C、3 分間遠心分離後、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。乾燥後、水 50 µL を加え、沈殿物を溶解させる。指先でチューブをはじき、遠心分離して器壁から液滴を回収するという操作を繰り返し、最後に一晩（12-24 時間）冷蔵庫に静置する。目視で不溶物がないことを確認し、これを DNA 抽出溶液とする。24 時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×g で 4°C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 試料原液とする。なお、沈殿も－20°C 以下で保存すること。

*1 AP1 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*2 P3 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*3 AW1 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW1 緩衝液とする。

*4 AW2 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW2 緩衝液とする。

2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用）

均質に粉砕した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液*1 5 mL と RNase A 10 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°C で 1 時間加温する。その間 15 分ごとに 3 回、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌する。チューブに、P3 緩衝液*2 1.8 mL を添加後、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌後、氷水中に 15 分間静置する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g 、室温で 15 分間遠心分離する。マイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を 4.2 mL 採取し、QIA shredder spin column（lilac）に負荷する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g 、室温で 5 分間遠心分離する。底に溜まった沈殿物を吸わないように注意して、マイクロピペットを用いて上清を 4 mL 採取し、上清を新しい 50 mL チューブに移す。ボルテックスミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌した後、マイクロピペットを用いて 3.4 mL を採取し、新しい 50 mL チューブに移す。AW1 緩衝液*3 5.1 mL を添加し、ボルテックスミキサーを用いて最高速で 10 秒間撹拌した後、デカンテーションにより溶液全量を DNeasy spin column（colorless）に負荷する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g 、室温で 5 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。カラムに AW2 緩衝液*4 12 mL を加え、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 15 分間遠心分離する。カラムを新しい 50 mL チューブに移し、あらかじめ 65°C に温めておいた水 1 mL を加える。5 分間室温で静置後、スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、室温で 10 分間遠心分離する。マイクロピペットを用いて溶出液の液量を測り、2 mL のサンプルチューブに移す。溶出液と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。遠心分離器を使用し、12,000×g で 4°C、15 分間遠心分離後、上清を廃棄する。70%エタノール 500 µL を添加し、沈殿物がチューブの底からはがれるまでチューブの底を指先ではじく。遠心分離器を使用し、12,000×g で 4°C、3 分間遠心分離後、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。乾燥後、水 50 µL を加え、沈殿物を溶解させる。指先でチューブをはじき、遠心分離して器壁から液滴を回収するという操作を繰り返し、最後に一晩（12-24 時間）冷蔵庫に静置する。目視で不溶物がないことを確認し、これを DNA 抽出溶液とする。24 時間かけても不溶物が認められる場合は、

12,000×g で 4°C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 試料原液とする。なお、沈殿も－20°C 以下で保存すること。

*1 AP1 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。
*2 P3 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。
*3 AW1 緩衝液
使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW1 緩衝液とする。
*4 AW2 緩衝液
使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール（96-100%）を混合したものを AW2 緩衝液とする。

2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出

均質に粉砕した試料適量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、G2 緩衝液*1 7.5 mL を加え、試験管ミキサーで激しく混合する。さらにチューブに、G2 緩衝液 7.5 mL、Proteinase K 200 µL、及び RNase A 20 µL を加え、サンプルがチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、ボルテックスミキサーを用いて撹拌する。50°C の恒温水槽中で 1 時間保温する。その間 15 分ごとに 3 回、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間最高速で撹拌する。スイング式遠心分離器を使用し、3,000×g、4°C で 15 分間遠心分離する。15 mL 容チューブ又は 50 mL 容チューブに、マイクロピペットを用いて、沈殿物や上層の膜状のものを取らないようにして上清を全量採取する。チューブをフラッシュ遠心する。QIAGEN Genomic-tip 20/G に、QBT 緩衝液*2 1 mL を負荷し平衡化する。上清を 2 mL ずつ QIAGEN Genomic-tip 20/G に負荷し、全量を自然流下させる。QIAGEN Genomic-tip 20/G に、QC 緩衝液*3 2 mL を負荷し、自然流下を行うことによりカラムを洗浄する。このカラムの洗浄操作を、更に 2 回行う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を 1.5 mL 容チューブに移し、あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液*4 750 µL を加え、DNA を溶出する（溶出 1）。QIAGEN Genomic-tip 20/G を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液 750 µL を加え、DNA を溶出する（溶出 2）。溶出 1 及び溶出 2 の液量を量り、それぞれに等量のイソプロパノールをそれぞれ添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。12,000×g で 4°C、15 分間遠心分離後、上清を廃棄する。70%エタノール 1 mL を添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和する。12,000×g で 4°C、3 分間遠心分離し、上清を完全に廃棄し、沈殿物を乾燥させる。溶出 2 のチューブに水 50 µL を加え、沈殿物を

65°C で 15 分間振とう溶解させる。次いで、溶出 2 のチューブの液を全量、溶出 1 のチューブに入れ、DNA を 65°C で 15 分間振とう溶解する。指先でチューブをはじき、12-24 時間冷蔵庫に静置する。目視で不溶物がないことを確認し、これを DNA 抽出溶液とする。24 時間かけても不溶物が認められる場合は、12,000×g で 4°C、3 分間遠心分離して得られた上清を新しいチューブに移し、これを DNA 試料原液とする。なお、沈殿も－20°C 以下で保存すること。

*1 G2 緩衝液
QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。
*2 QBT 緩衝液
QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。
*3 QC 緩衝液
QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。
*4 QF 緩衝液
QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用）
均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、GE1 緩衝液*1 4 mL、RNase A 10 µL、Proteinase K 20 µL、α-Amylase 2 µL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間以上混合した後*2、65℃で 30 分間加温する。この間、10 分間ごとに試験管ミキサーにて 10 秒間攪拌する。GE2-M 緩衝液*3 400 µL を加え、試験管ミキサーにて良く攪拌する。4,000×g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心する*4。その上清*5 800 µL を 2 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 600 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する。10,000×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心し、上清*6 を可能な限り、2 mL チューブに回収する。回収した上清 700 µL を spin column に負荷した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。残りの上清全量を spin column に負荷し、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 µL を負荷し、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 GE1 緩衝液

ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*2 撹拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。試験管ミキサーに対してチューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと撹拌する。撹拌が不十分な場合はさらに 30～60 秒間撹拌する。

*3 GE2-M 緩衝液

ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のものを用いる。

*4 使用するローター及びチューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

*5 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。

*6 沈殿や浮遊物等がある場合は、可能な限り取らないように上清を回収する。

2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用）

均質に粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、GE1 緩衝液*1 1 mL、RNase A 10 μL、Proteinase K 20 μL、α-Amylase 2 μL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間以上混合した後*2、65℃で 30 分間加温する。この間、10 分間ごとに試験管ミキサーにて 10 秒間攪拌する。GE2-M 緩衝液*3 200 μL を加え、試験管ミキサーにて良く攪拌する。4,000×g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心する*4。その上清*5 800 μL を 2 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 600 μL を添加した後、10～12 回転倒混和する。10,000×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心し、上清*6 を可能な限り、2 mL チューブに回収する。回収した上清 700 μL を spin column に負荷した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。残りの上清全量を spin column に負荷し、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 μL を負荷し、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、TE 緩衝液 50 μL を加え 3 分間室温で静置した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 GE1 緩衝液

ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*2 撹拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。試験管ミキサーに対してチューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと撹拌する。撹拌が不十分な場合はさらに 30～60 秒間撹拌する。

*3 GE2-M 緩衝液

ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のものを用いる。

*4 使用するローター及びチューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

*5 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。
*6 沈殿や浮遊物等がある場合は、可能な限り取らないように上清を回収する。

2.7.2.2.6. CTAB を用いた DNA の抽出

試料適量を乳鉢に採取し*1,2、石英砂少々、CTAB 抽出液*3 2 mL を加え、磨砕して、1.5 mL チューブへ移す*4。60°C、30 分間インキュベートした後、16,000×g、3 分間遠心分離する*5。上清約 700 µL を採取して、新しいチューブへ移す。等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール 25:24:1 を加え、2 分間激しく振り、16,000×g、15 分間遠心分離する。上層を新しいチューブに採取する*6。試料溶液に等量のクロロホルム:イソアミルアルコール 24:1（CIA）を加え、2 分間激しく振り*7、16,000×g、3 分間遠心分離する。上層を新しいチューブに採取する。試料溶液と等量のイソプロパノールを加え*8、30 秒間チューブを転倒混和した後、13,000×g、3 分間遠心分離し、上清を捨てる。70%エタノール 800 µL を加え、転倒混和し、3 分間静置した後、13,000×g、3 分間遠心分離する。上清を捨て*9、5 分間真空乾燥*10 する。TE 100 µL、RNase A（10 mg/mL）2 µL を加え、DNA を溶解する。室温又は 37°C で 30 分間静置した後、CTAB 抽出液 400 µL を加える。CIA 500 µL を加えて軽く混和する。13,000×g、15 分間遠心分離し、上層を新しいチューブに採取する。試料溶液と等量のイソプロパノールを加え*8、30 秒間チューブを緩やかに転倒混和した後、13,000×g、3 分間遠心分離する。上清を捨て*9、5 分間減圧乾燥*10 する。水 100 µL を加え、DNA を溶解する。溶液は小分けして−20°C 以下で凍結保存する*11,12。

*1 試料は秤量採取するが、あまり多すぎるとフェノール除タンパク処理の時に中間層が多くなり、後の操作が困難になる。
*2 薬包紙の代わりに滅菌した乳鉢を包んでいたアルミ箔を使うと良い。試料を採取するときは、滅菌した薬さじを使用する。素手で触らない。
*3 CTAB 抽出液：100 mM Tris-HCl、20 mM EDTA、1.4 M NaCl、2% CTAB、1% ポリビニルピロリドン K30、0.2% 2-メルカプトエタノール。メルカプトエタノールはオートクレーブ滅菌の後、十分に冷めたら加える。
*4 Proteinase K 処理：あらかじめタンパク質が多く PCI 処理で中間層が多くなることが予想される試料については、Proteinase K（20 mg/mL）溶液を各チューブ当たり 20 µL 程度加えると中間層を減らすことができる。
*5 通常は最大遠心でよい。
*6 このとき、チューブの様子をノートに記録すること。ピペット操作は、中間層を吸い込まないように気をつける。また、処理がうまくいかないときは遠心分離をやり直すか、もう一度 PCI 除タンパク処理をする。遠心分離は全て室温で行う。低温で行うと、CTAB が沈殿して失敗する。
*7 水層からフェノールを除くための操作。

*8 DNA を沈殿させる。ただし、試料溶液の塩濃度や糖類の量によって条件が変わることもある。

*9 上清を採取してから、フラッシュ遠心（5,000～12,000 rpm、数秒）をかけて、再度上清を採取すると、きれいに液を除くことができる。このとき沈殿がゲル状の場合には、アルコール洗浄を繰り返すと、ある程度改善される。

*10 遠心濃縮機又は小型のデシケータを使う。乾燥の具合は目視で確認する。

*11 DNA の溶解には TE を用いてもよいが、TE に含まれる EDTA が PCR バッファー中のマグネシウムイオンを捕捉して PCR 反応に影響を与える可能性があるため、ここでは滅菌水を用いる。

*12 凍結・融解を繰り返さないよう小分けして保存し、使い捨てとするのがよい。

2.7.3. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

DNA 試料原液の適当量を取り、水又は TE 緩衝液を用いて適宜希釈し*1、200～320nm の範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260 nm 及び 280 nm の吸光度（A_{260} 及び A_{280}*2) を記録する。次いで A_{260} の値 1 を 50 ng/μL DNA として DNA 濃度を算出する。また A_{260}/ A_{280} を計算する。この比が 1.7～2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈して*3DNA 試料液とし、20 μL ごとにマイクロ試料管に分注し、－20°C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

*1 試験の目的により、DNA 試料原液は水又は TE 緩衝液で調製されている。希釈する場合には、DNA 試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、適宜とする。

*2 A_{260} が DNA 由来の吸光度、A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

*3 定量 PCR 法に供する際は、TE 緩衝液を用いて希釈する。

2.7.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製

トウモロコシ穀粒 500 g から 92 粒をランダムサンプリングし、適当な大きさの容器に入れる。次いで 1% sodium dodecyl sulfate（SDS）水溶液で 1 分間洗浄することで、各粒の表面に付着している他の穀粒由来の破片を洗浄する。その後、蒸留水による洗浄を数回行う。洗浄後の穀粒を蒸留水中に浸し、室温（20～25°C）で 1 時間浸漬する*1。浸漬後の穀粒に対し市販のダルマピンで 3 ヵ所穴をあけ*2, 1 ウェル当たり 1 粒を 48 ウェルプレート*3 に入れる。各ウェルに組織溶解液*4 0.5 mL を添加する。75 mm 幅のビニールテープ*5 にて蓋をし、恒温槽にて 60°C で 1 時間保温する。その際、15 分ごとにビニールテープに液体が付かない程度に軽く振盪させる。保温後、スイング式遠心分離

器にて遠心分離し（1,000×g，室温，10 分間）、上清を 0.3 mL 採取し、DNA 試料液とする*6。

*1 浸漬中に穀粒が割れないように静置して行う。浸漬処理によって穀粒に穴を開けやすくする。
*2 ゴム手袋を着用して行う。実験台に紙のタオルなどを敷き、その上で作業を行う。穀粒に穴をあける際には、粒の白い部分にダルマピンを刺す。完全にダルマピンを貫通させると穀粒が割れて、指先に刺さる恐れがあるため、ピン先が 3〜4 mm 程度刺さる程度に行う。ダルマピンは 1 粒当たり 1 個を使用し、使い捨てとする。詳細は別紙 2 を参照のこと。
*3 48 ウェルユニプレート（GE ヘルスケア）又は同等品を用いる。
*4 組織溶解液の組成は 20 mM Tris-HCl（pH8.0）、5 mM EDTA、400 mM NaCl、0.3% SDS とする。長期間室温で保存することができるが、SDS が析出した場合は、温めて溶解してから使用する。
*5 75 mm 幅のビニールテープの代わりに、LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）、MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）及びこれらの同等品を使用してもよい。
*6 スイング式遠心分離器がない場合は、破片などの不溶物をなるべく吸い込まないようにして上清を回収する。

2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製

岩谷産業社製ミルサーIMF-800DG 又は同等のフードミル*1 を用いて穀粒の粉砕と DNA の溶出を行う。まず、IMF-800DG 付属のガラス製容器（製品番号 IFM-Y7-P）を 10 個用意する。トウモロコシ穀粒 500 g から 20 粒ずつランダムサンプリングして、各ガラス製容器に入れる*2。穀粒に付着した穀粒の破片等を洗い落とすため、ガラス製容器に 20 mL 程度の水を注ぎ、軽く撹拌した後、捨てる*3。各ガラス製容器に組織溶解液*4 を 20 mL 添加し、カッター部部品をはめ、密封する。これらをフードミル本体に順次装着し、20 秒間粉砕する。10 分以上静置した後、手で激しく撹拌する。さらに、10 分以上静置した後、カッター部部品を静かに取り外す。上清 50 µL を 1.5 mL 容プラスチックチューブに採取し、水で 2 倍に希釈する。ボルテックスミキサーで混合後、1,000 ×g 以上で*5 1 分間遠心する。上清を DNA 試料液としてマルチプレックスリアルタイム PCR に使用する。

*1 トウモロコシ穀粒 20 粒と組織溶解液 20 mL を密封した状態で粉砕・混合できるものを使用する。
*2 株式会社藤原製作所製穀粒計数板（100 粒ダイズ用）の一部をアルミ箔等で覆ったものを使用することで、効率的にランダムサンプリングを行うことができる。
*3 乾燥させる必要はない。

*4 組織溶解液の組成は 20 mM Tris-HCl（pH8.0）、5 mM EDTA、400 mM NaCl、0.3% SDS とする。長期間室温で保存することができるが、SDS が析出した場合は、温めて溶解してから使用する。
*5 一般的なスピンダウン用卓上遠心機を使用することができる。

2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製（NIPPON GENE GM quicker）

2.7.5.項における DNA 試料液調製の過程で、トウモロコシ粉砕物と組織溶解液の混合物がガラス容器中に残存する。この上清から、以下のように精製 DNA 試料液を調製する。上清 600 µL を 2 mL 容プラスチックチューブに採取し、RNase A 4 µL を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後*1、室温で 5 分間静置する。GE2 緩衝液*2 75 µL を加え、10～12 回転倒混和し*3、氷上に 5 分間静置する。13,000×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心*4 する。次いで、その上清*5 400 µL を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 50 µL 及びエタノール（100%）200 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する*6。混合液 650 µL（全量）を spin column に負荷した後、13,000×g 以上、4°C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 µL を負荷し、13,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を乾燥させるため、13,000×g 以上、4°C の条件で 3 分間遠心する。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、水 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000×g 以上で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。分光光度計を用いて DNA 濃度を測定し、20 ng/µL になるよう滅菌水で希釈する。

*1 撹拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。ボルテックスにチューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと撹拌する。撹拌が不十分な場合は更に 30～60 秒間撹拌する。
*2 GE2 緩衝液
シリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの、又は別途購入したものを用いる。
*3 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2 緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加した GE2 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。
*4 使用するローター及びチューブの特性を考慮したうえで、「×g」が最大となるように遠心条件を設定する。
*5 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。
*6 GB3 緩衝液を添加し、続いてエタノール（100%）を添加した後に、撹拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

2.8. パパイヤ検査法（55-1 系統）

2.8.1. 検査原則及び試料調製法

当検査は、生鮮パパイヤ及び種々の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、一検体数を一単位とする。
- 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。生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分を試料とする。
- 試料中の成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に試料全量を粉砕器等*で十分に粉砕し、均質混和して調製試料とする。
- 検査に供する調製試料は固体や液体の性状にかかわらず、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区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐよう実施する。
- 微量測定のため、フードプロセッサー等*、容器、秤量用器具、凍結乾燥瓶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。または、超音波洗浄器を用い、30 分間の超音波処理を行う。

* レッチェ GM200（レッチェ社製）、Millser（岩谷産業社製）、磁製乳鉢・乳棒及び同等の結果が得られるものを用いる。

2.8.2. GUS 試験法

遺伝子組換え体作出の際、組換え体の指標とするため β-glucuronidase（GUS）遺伝子が目的とする外来遺伝子に加えて導入される場合がある。この手法を用いて作出された遺伝子組換え体は、外来遺伝子に加え GUS 遺伝子も同時に発現するため、GUS 活性を検出することにより遺伝子組換え体であることの判定を行うことが可能となる。GUS は 5-bromo-4-chloro-3- indolyl-β-D-glucuronide（X-Gluc）を基質とする。当該基質は GUS 活性により糖部分が加水分解され、インドキシル誘導体モノマーを生じる。生じたモノマーは空気により酸化されることで重合し、青色の水不溶性インジゴチン色素を生成する。遺伝子組換えパパイヤ（55-1）においても GUS 遺伝子が導入されているため、上記原理に従い、青色を呈することを指標にその活性を検出し、遺伝子組換えパパイヤ（55-1）であることの判定を行うことが可能である。なお、本試験法における試料検体は、呈色反応の識別しやすいことを考慮し、胚を対象とする。

2.8.2.1. 実験操作

あらかじめ、200 mM リン酸緩衝液（pH7.0）*1 を 1 ウェル当たり 50 μL ずつ 96 ウェルプレートのうち必要数のウェルに分注しておく。試験には、パパイヤ 1 個体につき 12 個の胚を用いるため、必要となるウェル数は（パパイヤの個体数×12）である。

生鮮パパイヤ果実を縦半分に切り、種子を無作為に 12 粒選出する。12 粒それぞれについて、以下の手順に従い胚を取り出す。まず、ガラス板上で、粘性のある外皮をピンセット又はメスの先端を利用し取り除く。次に、メスで種子の縦中央に切れ目を入れる*2。深く突き刺さないよう留意しながら切れ目にメスの先端を入れ、種皮を完全に取り除き、淡白色の胚珠を採取する。次に、胚珠の縦中央に観察される白線に沿ってメスを入れ、胚珠を縦半分に切断する*3。切断後、切断面に露出する胚をピンセットで注意深く取り出し*4、あらかじめ 96 ウェルプレートに分注しておいた 200 mM リン酸緩衝液（pH7.0）に速やかに浸す。胚を採取する過程において、種皮が白色の種子や胚珠が含まれない種子が観察される場合があるが、それらは試験に用いない。ウェルに検査に用いる全ての胚を採取し終えた後、各ウェルよりリン酸緩衝液を除去する。続いて、基質溶液*5 を 1 ウェル当たり 50 μL ずつ加える。基質溶液を添加した後、その浸透を促すためアスピレーターを用いて 15 分間の脱気処理を行う。脱気処理後、96 ウェルプレート全体をパラフィルムで密封し、37°C、10～15 時間*6 の条件で保温する。保温後、各ウェルに 70%エタノールを 50 μL ずつ加え反応を停止する。それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数え、GUS 発現率*8 を算出する。

*1 200 mM リン酸緩衝液（pH7.0）
200 mM NaH_2PO_4 と 200 mM Na_2HPO_4 を 3.3：6.7（v/v）の割合で混合した溶液を 200 mM リン酸緩衝液（pH7.0）とする。調製時には、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、混合後、必ず pH が 7.0 であることを確認する。なお、当緩衝液は、必ず試験を開始する直前に作製し、一試験ごとに使い切ること（用時調製）。

*2 パパイヤの種子は縦方向に長く、これに比して横方向に短い。このことを基準に、種子を実験者に対して横向きになるよう配置させ、メスを左端に入れ、右端に向かって横方向に切り進めることで切れ目を入れるとよい。メスを深く差し込むと胚を切断してしまうこともあるので注意する。

*3 胚珠はその中心部に位置する胚とその周りを覆う胚乳で構成されている。また、全体としては胚乳の示す淡白色をしている。しかし、胚珠表面を注意深く観察することで、淡白色とは明らかに異なる白色の線が中央部を上端から下端にかけて走っていることが観察される。この白色の線は胚によって示されるものである。胚珠を切断する際には、刃がこの線に対して平行となるようにメスを入れ、胚を傷つけないよう注意しながら二分する。

*4 胚が露出しなかった場合、切断面において胚を覆っている胚乳をメスで削り取り、胚を露出させる。その後、ピンセットを用いて注意深く取り出す。この際、胚を傷つけないよう充分注意しながら操作を進める。傷のついた胚は非特異的に青色を呈する場合がある。

*5 基質溶液
X-Gluc 溶液*7 が最終濃度 1 mM となるように、200 mM リン酸緩衝液（pH7.0）で調製した溶液を基質溶液とする。基質溶液調製時には、ボルテックスミキサーを

用いて十分に混合し、均一な溶液として調製する。なお、基質溶液は、必ず試験に供する胚全てを採取し終えた後に調製し、一試験ごとに使い切るものとする。

*6 恒温器を使用して保温する。また、15 時間を超えて保温した場合、非遺伝子組換えパパイヤの胚が非特異的に染色される可能性が考えられる。この場合、正確な判定を下すことができなくなるため、保温時間については記載された時間を厳守すること。

*7 X-Gluc 溶液

X-Gluc 粉末 20 mg をマイクロ遠沈管（1.5 mL）に量り取り、1 mL のジメチルホルムアミドを加え溶解したものを X-Gluc 溶液とする。－20°C で保存すること。

*8 GUS 発現率（%）=〔(青色を呈した胚の数）/（試験した胚の数 12)〕×100

2.8.2.2. 結果の判定

検体が遺伝子組換えパパイヤ（55-1）の場合、理論的にはヘテロ品種同士を掛け合わせた組換え体の場合 75%（9 胚/12 胚)、ホモ品種同士を掛け合わせた組換え体の場合 100%の割合で胚が青色を呈する。しかし、当該試験法においては、試験に供する胚を無作為に選出するため、必ずしも上記理論値には合致しない。一方、非遺伝子組換えパパイヤでは、青色を呈する胚は観察されない。したがって、GUS 発現率が 30%以上（青色を呈した胚の数が 4 以上）の場合を陽性と判定し、GUS 発現率が 30%未満（青色を呈した胚の数が 4 未満）の場合を陰性と判定する。

判定例：陰性対照は、12 個の胚のうち青色を呈した胚はみられない（GUS 発現率 0%)。試料 1 は、試験に供した 12 個の胚のうち青色を呈した胚はみられない（GUS 発現率 0%）ため、陰性と判定される。試料 2 は、12 個の胚のうち、9 個が青色を呈した（GUS 発現率 75%）ため、陽性と判定される。試料 3 は、12 個の胚のうち、4 個が青色を呈した（GUS 発現率 33%）ため、陽性と判定される。

試料番号	1	2	3	陰性対照
調査した胚の数	12	12	12	12
青色を示した胚の数	0	9	4	0
GUS 発現率(%)	0	75	33	0
判定	陰性	陽性	陽性	陰性

2.8.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

本法では生鮮パパイヤ及びパパイヤ加工食品を検査対象とし、DNA 抽出精製には、以下の陰イオン交換樹脂タイプカラム（QIAGEN Genomic-tip 100/G）を使用した DNA 抽出精製キットの改変法を用いる。1 検体から 2 併行で DNA を抽出し、各抽出 DNA 試料液を用いてリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を実施する。生鮮パパイヤ及

びパパイヤ加工食品は以下の 7 種類の製品に細分類し、「2.8.3.1. 試料前処理」に示したそれぞれの試料前処理プロトコルに従って DNA 抽出精製前の試料調製を行う。

① 生鮮及び調味漬け製品（生鮮パパイヤ、缶詰、漬物など乾固されていないある程度パパイヤの原型を保持している試料）
② 乾物製品 （乾燥パパイヤ）
③ 砂糖漬け乾燥製品 （ドライフルーツ）
④ 乾燥製品（健康食品、お茶など）
⑤ 果肉含有ゲル状製品 （ジャム、ピューレなど）
⑥ 果汁・飲料製品 （フルーツミックスジュース、ドリンク剤など）
⑦ 氷菓等製品 （アイス、シャーベットなど）

2.8.3.1. 試料前処理

① 生鮮及び調味漬け製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し（生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分）、その重量の 2 倍以上の滅菌蒸留水で 3 回洗浄した後、よく水分をきり、フードプロセッサー等で粉砕する（生鮮パパイヤに関しては果肉を洗浄せず粉砕する）。粉砕した試料 10 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

② 乾物製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、フードプロセッサー等で粉砕する。粉砕した試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

③ 砂糖漬け乾燥製品

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し、その重量の 2 倍以上の滅菌蒸留水で 3 回洗浄した後、等重量分の滅菌蒸留水を加え、フードプロセッサー等で粉砕する。粉砕した試料 10 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

④ 乾燥製品

フードプロセッサー等で粉砕し均質にした試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

⑤ 果肉含有ゲル状製品

フードプロセッサー等で粉砕し均質にした試料 10 g をポリプロピレン製遠沈管（50mL）に量り採り、G2 緩衝液*1 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にする。

⑥　果汁・飲料製品

開封前によく転倒混和して均質にした製品 100 mL をメスシリンダーで量り採り、凍結乾燥用容器（500 mL）に移し、傾けた状態で－80°C 冷凍庫中で 2 時間凍結させる。その後、凍結乾燥機にセットし、24 時間乾燥後、試料*2 30 g を乳鉢に量りとり G2 緩衝液*1 20 mL に乳棒を用いて懸濁させる。次いで、全量をポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たに G2 緩衝液*1 10 mL を追加し遠沈管に洗いいれ、よく転倒混和して均質にする。

⑦　氷菓等製品

試料 100 g を凍結乾燥用容器に量り採り、24 時間凍結乾燥する。その後、試料*2 10g を先に G2 緩衝液*1 30 mL を入れたポリプロピレン製遠沈管（50 mL）に少しずつ加えながら懸濁させ、よく転倒混和して均質にする。

*1 G2 緩衝液は QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*2 凍結乾燥後、提示量に満たない場合は採取できる量からスタートし、その後に使用する試薬の量は変更しない。

2.8.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製

2.8.3.2.1. DNA の抽出精製*1

「2.8.3.1.試料前処理」を行った試料に、RNase A*2 20 µL、cellulase*3 500 µL を加えて（なお⑤果肉含有ゲル状製品のジャム製品に限り、α-Amylase*4 20 µL も同時に加える）、転倒混和して均質にした後、50°C で 1 時間放置する。その間 2～3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、Proteinase K*5 200 µL を加え 50°C で 1 時間放置する。その間も 2～3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。酵素処理終了後、その遠沈管を 3,000×g、低温下（4°C）、20 分間遠心する*6。その間、あらかじめポリプロピレン製遠沈管（50 mL）上に QIAGEN Genomic-tip 100/G をセットし QBT 緩衝液*7 4 mL を通して平衡化させておく。遠心終了後、得られた上清（約 25 mL～35 mL）を、平衡化した QIAGEN Genomic-tip 100/G に負荷する*8。このときの溶出液は捨てる。次に、QIAGEN Genomic-tip 100/G を QC 緩衝液*7 で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後*8、あらかじめ 50°C に温めておいた QF 緩衝液*7 1 mL を負荷し、溶出液は捨てる。QIAGEN Genomic-tip 100/G を新しいポリプロピレン製遠沈管（50 mL）上にセットし、再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液*7 2 mL を負荷し、DNA を溶出する。DNA 溶出液にイソプロパノール 2 mL を加えよく混合する。マイクロ遠沈管（1.5 mL）1 本当たり 1 mL 程度ずつ、混合した溶液を移し、10,000×g 以上で、低温下（4°C）15 分間遠心する。上清を捨て

る。この際、上清を極力除去する*9。次いで、各遠沈管当たり 70%エタノールを 1mL ずつゆっくり加え、さらに 10,000×g 以上で、低温下（4°C）5 分間遠心する。上清を捨て*9、残った沈殿を風乾させる。マイクロ遠沈管（1.5 mL）4 本分の沈殿を、あらかじめ 50°C に温めた滅菌蒸留水 50 µL に溶解し、DNA 試料原液とする*10。

*1 実験を通して、液体を分注するピペットやチップをサンプルごとに交換したりするなど、サンプルへのコンタミネーションが起こらないように十分注意する。

*2 ニッポンジーン社（Cat. no. 318-06391）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*3 Sigma-Aldrich 社（Cat. no. C2730-50ML）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*4 ニッポンジーン社（Cat. no. 316-04751）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*5 QIAGEN 社（Cat. no. 19133）のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*6 遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。可能であれば、使用するローター及びチューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

*7 QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液は、QIAGEN 社 Genomic DNA Buffer Set（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*8 液体の流速が著しく減少した場合には、カラム上方から 10 mL テルモシリンジ（コード番号: SS-10SZ）のプランジャーなどを用いて穏やかに加圧させ、流速を増加させる。プランジャーを利用する場合には、プランジャーをカラムに 1 cm 程度挿し込んでは抜く操作を繰り返す。この際、プランジャーを挿し込む操作は、プランジャー先端のゴム部分とカラム内壁を密着させ、空気が漏れないように行う。一方、プランジャーを抜く操作は、逆流を防ぐために、プランジャーを斜めにしてプランジャー先端のゴム部分とカラム内壁との間に隙間を空け、カラム内へ空気を入れながら行う。

*9 沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を完全に除去する。

*10 溶解操作の際には、まず 1 本のマイクロ遠沈管に 50 µL の滅菌蒸留水を入れ、沈殿した DNA を溶解する。次いでその DNA 溶液を次のマイクロ遠沈管に入れ、沈殿した DNA を溶解する。この操作を繰り返し、最終的に各検体から得られる DNA 溶液を 50 µL となるようにする。

2.8.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

DNA 試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈*1 し、200～320 nm の範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し*2、260 nm 及び 280 nm の吸光度*3（A_{260} 及び A_{280}）を記録する。次いで A_{260} の値 1.0 を 50 ng/μL DNA と換算し、DNA 濃度を算出する。また A_{260}/A_{280} を計算する。この比が 1.7～2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す*4。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 10 ng/μL に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 50 μL ごとにマイクロ遠沈管に分注後、－20°C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が 10 ng/μL に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

*1 希釈倍率は、使用する吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、適宜とする。
*2 紫外部吸収スペクトルを測定する機器がない場合には、260 nm 及び 280 nm の吸光度の 2 点を測定する。
*3 A_{260} が DNA 由来の吸光度、A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。
*4 A_{260}/A_{280} の比が 1.7～2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.8.3.3. リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500）

遺伝子組換えパパイヤ（55-1）の検出は、遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験用のプライマー、プローブを用いたリアルタイム PCR とパパイヤ陽性対照試験用のプライマー、プローブを用いたリアルタイム PCR の 2 試験を行う。遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験用として、パパイヤゲノム配列と Papaya Ringspot Virus coat protein（PRSV-cp）遺伝子発現用プラスミド・ベクターの境界領域を検知するプライマー、プローブを用いる。また、パパイヤ陽性対照試験用として、Chymopapain（Chy）遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。各プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解する。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験用プライマー対及びプローブ
PRSV-cp F: 5’-CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA-3’
PRSV-cp R: 5’-TCCGCCTCCATCCAGTCTATT-3’
PRSV-cp P: 5’-FAM-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-TAMRA-3’

パパイヤ陽性対照試験用プライマー対及びプローブ
Q-Chy-1F2: 5’-CCATGCGATCCTCCCA-3’
Q-Chy-2R: 5’-CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA-3’
Q-Chy-P(new): 5’-FAM-TTCCCTTCATCCATTCCCACTCTTGAGA-TAMRA-3’

2.8.3.3.1. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μL/well として調製する。組成は以下のとおりである。TaqMan® Gene Expression Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 12.5 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μM）各 0.4 μL、対象プローブ溶液（10μM）0.25 μL を混合し、DNA 試料液 5 μL を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μL に調製する。DNA 試料液当たり遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験用リアルタイム PCR とパパイヤ陽性対照試験用リアルタイム PCR をそれぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。Non-Template Control（NTC）として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する*2。分注操作終了後、真上からシール*3 し、完全にウェルを密閉する。密封する際、専用のシーリングアプリケーターを用いて、ウェル上の MicroAmp® Optical Adhesive Film にしわが寄らないよう注意する。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて（又はプレート用の遠心機が使用できる場合は、遠心操作にて）気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*4 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 TaqMan® Gene Expression Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作及び採取を行う際には注意が必要である。混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く撹拌後、遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後撹拌、遠心が困難な場合は、ウェルの底に確実に入れる。遠心が可能な場合は、シールした後に遠心操作を行う。

*2 Non-Template Control（NTC）

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水を 5 μL 添加する。

*3 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーター

MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate （Thermo Fisher Scientific 社）及び MicroAmp® Optical Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。Applied Biosystems® 7500 では使用しない。

2.8.3.3.2. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合は、新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」: Non-Template Control、「Unknown」: DNA 試料液）の設定を行う。

またプローブ特性に関しては、PRSV-cp P、Q-Chy-P(new)共に Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。また、Passive Reference は「ROX」に設定する。なお、ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。Sample Volume は 25 μL に設定する。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「N」: Non-Template Control、「U」: DNA 試料液）を Task 欄において指定する。またプローブ特性に関しては、PRSV-cp P、Q-Chy-P(new)共に Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。また、「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」に設定する。なお、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。下降部分は 100%のままとする。Sample Volume は 25 μL に設定する。

2.8.3.3.3. PCR

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2 分間の条件で保持した後、95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 15 秒間、60°C 1 分間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行う。ABI PRISM® 7900HT を使用する場合は、Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前の場合は、RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。Applied Biosystems® 7500 を使用し、ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定

遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験とパパイヤ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線及び Cq 値の確認並びに multicomponent 上での対象色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験でまず目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えパパイヤ（55-1）陽性を

疑う。次いで、ベースライン（3 サイクルから 15 サイクル）の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line（Th）を選択する*1。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2 併行抽出より得られた DNA 試料液（1 抽出当たり 2 ウェル併行で測定）の合計 4 ウェル全てを用いて判定する。

パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られた場合は、当該試料を遺伝子組換えパパイヤ（55-1）陽性と判定する。パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られない場合は、当該試料を遺伝子組換えパパイヤ（55-1）陰性と判定する（図 13 参照）。

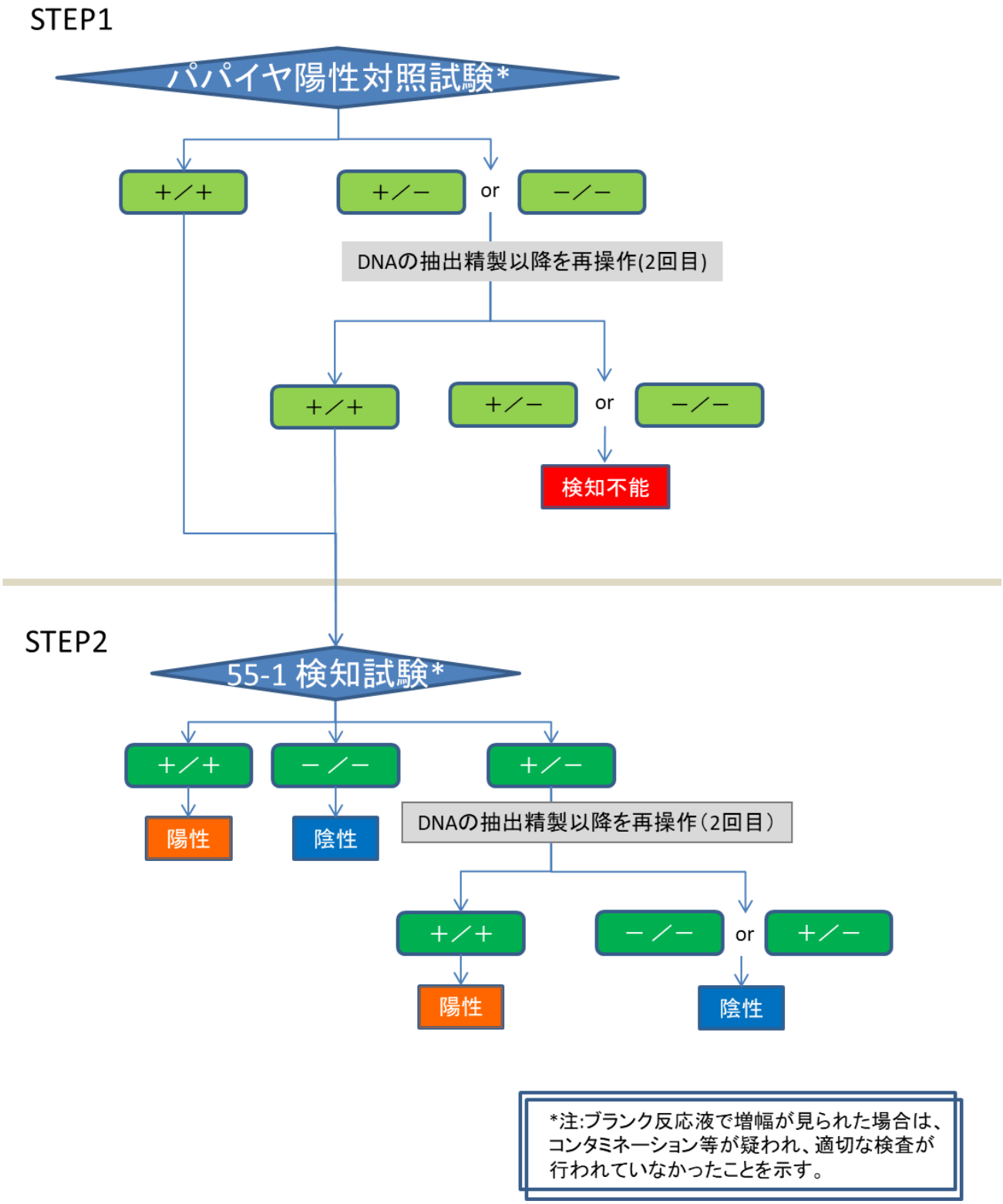
パパイヤ陽性対照用試験の全てのウェルにおいて 48 未満の Cq 値が得られ、かつ遺伝子組換えパパイヤ（55-1）検知試験のどちらか一方だけで 48 未満の Cq 値が得られた場合は、粉砕・均質後の当該試料から改めて 2 回目*2 の DNA 抽出精製を行い、さらに「2.8.3.3. リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500）」以降の操作を実施して、判定を行う。2 回目の DNA 試料液を用いた場合でも陽性又は陰性の判定が得られない場合は、当該試料を遺伝子組換えパパイヤ（55-1）陰性と判定する（図 13 参照）。なお、上記により陽性と判定された結果について multicomponent を解析し、目視で FAM の蛍光強度の明確な下降や FAM の蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。

また、パパイヤ陽性対照試験の全てのウェルで 48 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度、粉砕・均質後の当該試料から改めて 2 回目*2 の DNA 抽出精製を行い、さらに「2.8.3.3.リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500）」以降の操作を行い、それでもパパイヤ陽性対照試験の全てのウェルで 48 未満の Cq 値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする（図 13 参照）。

*1 個々の機種の状態によって Amplification plot 上の ΔRn が変動することから、普遍的な Th の設定の数値を示すことが困難である。従って Amplification plot 上でベースライン（3 サイクルから 15 サイクル）の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th を設定する。本実験法の場合は、Th = 0.2 と設定する。ただし、Th がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th を適宜設定する。

*2 DNA 抽出精製を行うために必要な試料量が不足している場合には、「2.8.3.1.試料前処理」から実施する。

図13　結果の判定スキーム



（別紙 1）内標比

ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず（スクリーニング）	0.39	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.01	SSIIb_3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用

ABI PRISM® 7900HT 96 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.04	Le1n_02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	0.98	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	1.32	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず（スクリーニング）	1.09	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず（スクリーニング）	0.38	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	1.99	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	MIR604	0.44	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604 probe を使用
トウモロコシ	MIR162	0.70	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-p1 を使用

ABI PRISM® 7900HT 384 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.00	Le1n_02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.39	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.06	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用

ABI PRISM® 7000

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.95	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.35	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	1.83	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用

Applied Biosystems® 7500

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.02	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	0.98	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	1.33	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず(スクリーニング)	1.28	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.46	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3'と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.13	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	MIR604	0.44	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604 probe を使用
トウモロコシ	MIR162	0.64	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-p1 を使用

Roche LightCycler® System

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.01	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.53	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.63	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用

QuantStudio 5

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.97	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	1.08	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	1.51	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず(スクリーニング)	1.16	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.43	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	1.55	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	MIR604	0.44	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604 probe を使用
トウモロコシ	MIR162	0.71	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-p1 を使用

QuantStudio 12K Flex

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	1.00	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	1.10	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	1.51	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず(スクリーニング)	1.15	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.40	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	1.61	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	MIR604	0.44	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604 probe を使用
トウモロコシ	MIR162	0.66	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-p1 を使用

LightCycler® 96

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.90	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	1.11	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	1.29	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず(スクリーニング)	1.06	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.41	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.17	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	MIR604	0.43	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604 probe を使用
トウモロコシ	MIR162	0.59	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-p1 を使用

LightCycler® 480 96 well

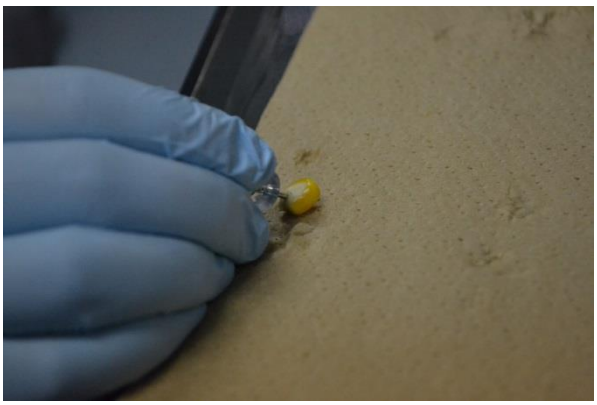
農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.96	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	1.07	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	1.30	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず(スクリーニング)	0.98	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用
トウモロコシ	特定せず(スクリーニング)	0.41	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	GA21	2.19	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	MIR604	0.44	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604 probe を使用
トウモロコシ	MIR162	0.56	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-p1 を使用

（別紙 2）　トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順

①ゴム手袋を着用して行う。実験台に紙のタオルなどを敷き、その上で作業を行う。穀粒に穴をあける前に、あらかじめ洗浄、浸漬を行う。



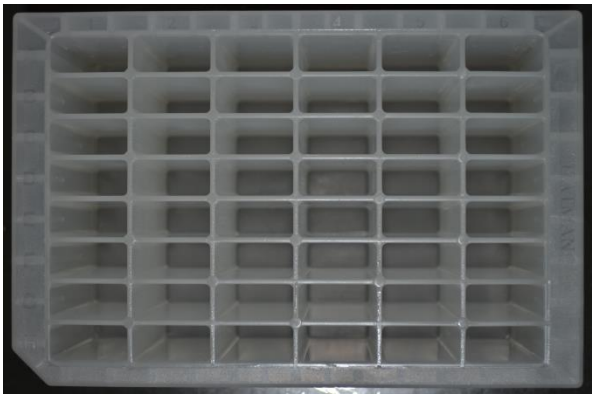
②穀粒に穴をあける際には、粒の白い部分にダルマピンを刺す。完全にダルマピンを貫通させると穀粒が割れて、指先に刺さる恐れがあるため、ピン先が 3～4 mm 程度刺さる程度に行う。

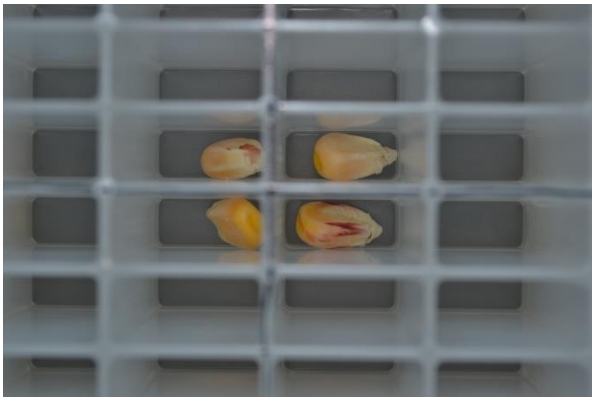


③ダルマピンで 3 ヵ所穴をあける。ダルマピンは 1 粒当たり 1 個を使用し、使い捨てとする。



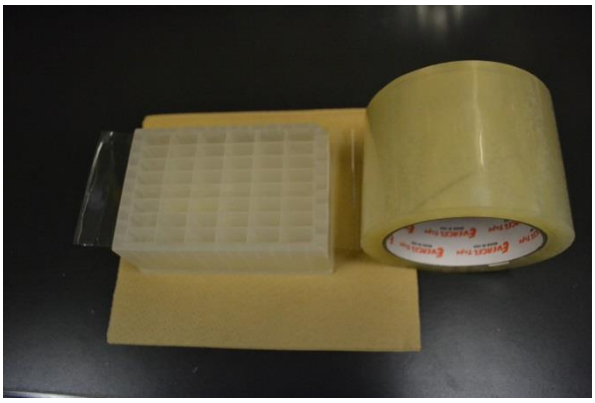
④1 ウェル当たり 1 粒を 48 ウェルプレートに入れる。





⑤各ウェルに組織溶解液 0.5 mL を添加する。

⑥75 mm 幅のビニールテープにて蓋をし、恒温槽にて 60°C で 1 時間保温する。その際、15 分ごとにビニールテープに液体が付かない程度に軽く振盪させる。



⑦保温後、スイング式遠心分離器にて遠心分離し（1,000×g, 室温, 10 分間）、上清を 0.3 mL 採取し、DNA 試料液とする。

（参考）

(1) 2.7.1.2. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: トウモロコシに適用）、2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用）、2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）及び 2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用）の記述のシリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 及び QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit）に用いられる AP1 及び P3 緩衝液及び RNase A は、キットに含まれるものとは別に QIAGEN 社（〒104-0054　東京都中央区勝どき 3-13-1 Forefront Tower II.　Tel. 03-5547-0811　Fax. 03-5547-0818）から購入可能である。

(2) 2.7.1.4. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用）、2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用）、2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製（NIPPON GENE GM quicker）に記述のシリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker）及び 2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用）と 2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用）に記述のシリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 4）に用いられる GE1 及び RNase A は、キットに含まれるものとは別にニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 2-7-18. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547。以下同じ。）から購入可能である。同シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker）に用いられる GE2 緩衝液は、キットに含まれるものとは別にニッポンジーン社から購入可能である。

(3) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ（RRS）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（RRS）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM ダイズ（RRS2）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（RRS2）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM ダイズ（PAT）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（PAT）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）、2.1.4. Liberty Link Soybean（Event A2704-12）定量法に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ（LLS）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（LLS）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-））、2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM トウモロコシプラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）、2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM トウモロコシプラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM トウモロコシ（MIR604）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize（MIR604）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）、GM トウモロコシ（MIR162）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize（MIR162）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）は、ニッポンジーン社、ファスマック社（〒243-0041　厚木

市緑ヶ丘 5-1-3.　Tel. 046-295-8787　Fax. 046-294-3738。以下同じ。）から購入可能である。

(4) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算、2.1.4. Liberty Link Soybean（Event A2704-12）定量法、2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量、及び 2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブは、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。

(5) 2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法及び 2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）に記載の標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ混入判定用プラスミドセット、GM ダイズ（PAT）混入判定用プラスミドセット及び GM トウモロコシ混入判定用プラスミドセット）は、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。

(6) 2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）、2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）、2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製、2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）及び 2.6.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブ（SSIIb-TaqV 以外）は、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。また、SSIIb-TaqV は、Thermo Fisher Scientific 社（〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町三丁目 9 番地）から合成依頼による購入が可能である。

(7) 2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法（粒単位検査法）に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液は、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。

(8) パパイヤ 55-1 系統のプライマー・プローブ及び標準プラスミドは, ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。

検査方法の同等性確認方法

1. DNA抽出精製方法について

DNA抽出精製法においては、再現性よく検査に必要な純度と量が得られることが必要である。例えば、新たに用いるDNA抽出精製法を、6併行で異なる3日間行って、既存の方法と比べて最終的にリアルタイムPCRまでを実施した結果が同じであることを確認する。内在性遺伝子の検出（陽性対照試験）の結果を確認して、既存の方法を比較してCq値に差がないか確認する（少なくともCq値が1以上大きくならない。）。

2. 定性用リアルタイム PCR 装置について

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」中で用いられている装置のほかにも同等の性能を有する機種を用いることができる。同等の性能の確認は、感度、繰り返し再現性、ウェル間差及び増幅効率などを考慮して行う。例えば、市販陽性対照プラスミド（ダイズ、トウモロコシ用等）を用意し、現行機種を用いて検出限界より少し高い濃度（10 回中 10 回全て検出される最低濃度）の希釈溶液を作製する。その溶液を用いて、確認したい機種で同様の試験を行い、また、日を変えて 3 回以上行った結果、全て検出されること。96 ウェル間で差がないことを確認する（Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。）。

3. マスターミックスについて

「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」記載のもの又は同等性が確認されたリアルタイム PCR 装置を用いて、検知対象作物試料（作物試料が入手可能な場合はそれを用い、入手できない場合は加工度が高くない加工製品等でもよい。）を用いて内在性遺伝子検知法試験を繰り返し 3 回以上実施する。その結果、Cq 値やエンドポイントにおいて「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」記載のものと大きな差がないことを確認する。また、遺伝子組換え検知法部分については、市販の陽性プラスミドを希釈せずに用いて、3 回以上測定を行った結果、Cq 値やエンドポイント差が大きな差ないことを確認する（Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。）。

別添

輸入される生食用かきの採取水域区分(名称)の例示(注1)

輸出国	採取水域の英語表記		採取水域の名称
米国	オレゴン州	Coos Bay	米国　クース湾海域
		Yaquina Bay	米国　ヤキイナ湾海域
		Tillamook Bay	米国　ティラモック湾海域
	ワシントン州	Willapa Bay	米国　ウィラパ湾海域
		Totten Inlet	米国　トッテン入江海域
		Miford	米国　ミルフォード海域
	コネチカット州	West Port	米国　ウエストポート海域
豪州(注2)	タスマニア州	Apollo/Roberts/Sykes	豪州　アポロ／ロバート／サイクス海域 TAS
		Big Bay	豪州　ビック湾海域 TAS
	南オーストラリア州	Denial Bay	豪州　デニアル湾海域 SA
		Mt.Dutton Bay	豪州　マウントダットン湾海域 SA
		Smoky Bay	豪州　スモーキィ湾海域 SA
ニュージーランド	Whangaroa Harbour		ニュージーランド　ワンガロアハーバ海域
	Kerikeri Inlet/Te Puna Inlet		ニュージーランド　ケリケリ／テ・プナ入江海域
韓国			韓国　第一号海域
			韓国　第二号海域
			韓国　第三号海域
			韓国　第四号海域

（注１）上記の採取水域名は採取水域の一部を例示したもので、輸入される生食用かきを生産する全ての承認水域を網羅したものではない。

（注２）豪州の州名を表す略号は次のとおりとする。

- タスマニア州　TAS
- 南オーストラリア州　SA
- 西オーストラリア州　WA
- クイーンズランド州　QLD

Shellfish Growing Areas* Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products (Regulated Control Scheme – Bivalve Molluscan Shellfish) Regulations 2006 as at 1 November 2013

Permits, registrations or marine farm site numbers under the Fisheries Act 1996, Resource Management Act 1991, or any other relevant Act

Growing Area Number	**Growing Area Name**	**Lease/Licence/Permit** ***Authorisation Number***
NORTHLAND Shellfish Quality Assurance Programme Delivery Centre (SQAPDC)		
201	Parengarenga Harbour	Le 177, Le 181, Le 225, Le 227, Le 357, Le 359, MF 27, MF 48, MF116, MF 139, MF148, MF 242, MF 238, MF 362, MF 363
202	Whangaroa Harbour	Le 3, Le 14, Le 57, Le 79, Le 100, Le 204, Le 238, Le 239, Le 333, Le 344
203	Waitiki Channel, Parengarenga Harbour	Le142, Le144
202A	Touwai Bay	Le77
204A	Te Puna/Te Tii	Le 28, Le 85, MF 707
204B	Opete Creek	Le 78, Le 242
204C	Rangitane	Le 17, Le 18
204D	Hauparua	Le 67, Le 73, Le 81, Le 139, Le 183
205	Orongo Bay	Le 12, Le 15, Le 16, Le 41, Le 44, Le 55, Le 153, Le 154, Le 180, Le 222, Le 223, Le 319, Le 320, Le 321, Le 322, Le 323, Le 324, Le 325, Le 337, Le 338, Le 339, Le 350, Le 351
206	Upper Waikare	Le 160, Le 161, Le 162, Le 163
206A	Waikare East	Pe 0016376
206B	Middle Waikare	Le 23, Le 53, Le 119, Le 124, Le 137, Le 152, Le 159, Le 165, Le 170, Le 171, Le 175, Le 345, Le 348, Le 349

206C	Lower Waikare	Le 69, Le 130, Le 138, Le 140, Le 158, Le 298
207	Parua Bay	Le 91
208	Kaipara Harbour	Le 62, Le 94, Le 111, Le 117, Le 147, Le 185, Le 326, Le 352, Li 277, ND 927549
210	Opua Marina	8385
212	Mair Bank	Pe8610002, Pe8620085, Pe9310028, Pe9791342, Pe9701926
212A	Snake Bank	Pe8610002, Pe8620085, Pe9310028, Pe 9791342
214	Houhora Bay	MF76, MF 118, MF 302, MF 398
215	Houhora Harbour	Le 311, Le 315, Le 316, Le 317, Le 318, MF 28, MF 29, MF 44, MF 46, MF 50
217	Kaipara Harbour Mouth	PE16467
218	Rangaunu	Le 327, Le 330, Le 331, Le 356, MF083
220	Kauanga Inlet	MF 103, MF190
221	Paroa Bay	Le 47

AUCKLAND SQAPDC		
209	South Kaipara	CP39149
301	Mahurangi Harbour	32898, Le 2, Le 6, Le 21, Le 31, Le 46, Le 50, Le 58, Le 63, Le 65, Le 68, Le 71, Le 74, Le 84, Le 86, Le 88, Le 89, Le 93, Le 102, Le 104, Le 106, Le 108, Le 109, Le 127, Le 136, Le 157, Le 212, Le 253, Le 255, Le 298, Le 299, Le 334, Le 335, Le 336, Le 340, Le 341, Le 342, Le 353, Le 354
411	Waiheke Is - Awakiriapa Bay	Li 11
412	Waiheke Is - Te Matuku Bay	Le 9, Le 164, Le 343

413	Waiheke Is - Awaaroa Bay	Le 87, Le 128
414	Putaki Bay	Le 7
421	Great Barrier - Katherine Bay	CPT 10696, MFP 269, Li 276
422	Great Barrier Is - Port Fitzroy	Li 262, Li 492, Li 493, Li 494, Li 495, Pe 123
502	Kauri Bay	Le 148
503	Waimangu Point	Li 384, Li 385, Li 386, Li 387, Li 389, Li 390, Li 437, Li 471, Li 478
COROMANDEL SQAPDC		
602	Whitianga	Le 208
611	Tiki Road	Le 26, Le 141, Le 310
612	Te Kouma Harbour	Le 20, Le 101
613	Moturua Island	Li 361, Li 373, Li 396
615	Motukopake Island	Li 292, Li 293, Li 294, Li 295, Li 333, Li 349, Li 350
618	Kirita Bay	Li 344
6101	McGregor Bay	Le 49, Le 70, Le 118, Le 224
6102	Preeces Point	Le 4, Le 59
6141	Motukakarikitahi Island Hautapu Channel	Li 296, Li 343, Li 383 Li 310 W, Li 327, Li 336, Li 345, Li 346, Li 347
6142	Koputauaki Bay	Li 310 E, Li 326
6161	MAF (Nursery) Area	Pe 364
6162	Whanganui Island, Te Kouma Head	Li 291, Li 362, Li 380
6171	Solomons Point	Li 308, Li 365, Li 402
6172	Te Kouma South, Manaia Harbour, Wekarau Island	Li 357, Li 363, Li 376, Li 377, Li 378, Li 379
6191	Firth of Thames - Outer	Li 521, Li 522, Li 523, Li 524, Li 525, Li 526, Li 527, Li 528, Li 529, Li 550, Pe 93,

		Pe 95, Pe 97, Pe 99, Pe 157, Pe 158, Pe 159, Pe 160, Pe 161, Pe 162, Pe 632, Pe 666, Pe 667, Pe 668, Pe 669, Pe 671, Pe 672, Pe 673, Pe 674, Pe 675, Pe 676, Pe 677, Pe 678, Pe 679, Pe 680, Pe 681
BAY OF PLENTY SQAPDC		
701	Ohiwa Harbour	Le 25, Le 43, CPT 040136
MARLBOROUGH SQAPDC		
1509	Cloudy Bay	Pe 9790916
1519	Clifford Bay	Pe 9790916
MARLBOROUGH SOUNDS SQAPDC		
1501	Hikapu	8354, 8355, 8356, 8357, 8358, 8359, 8360, 8361, 8362, 8363, 8364, 8365, 8366, 8367, 8368, 8369, 8370, 8371, 8372, 8373, 8374, 8375, 8376, 8377, 8378, 8379, 8380, 8381, 8382, 8383, 8384, 8385, 8386, 8387, 8388, 8389, 8391, 8392, 8393, 8394, 8395, 8457, 8458, 8459, 8460, 8461, 8462, 8463, 8464, 8465, 8466, 8467, 8468, 8469, 8470, 8471, 8472, 8473, 8474, 8475, 8476, 8570
1502	Eastern Pelorous	8249, 8250, 8251, 8252, 8253, 8254, 8255, 8256, 8257, 8258,8259, 8260, 8261, 8262, 8263, 8265, 8527, 8528, 8530, 8531, 8532, 8533, 8534, 8535, 8536, 8537, 8538, 8539, 8540, 8541, 8542, 8543, 8544, 8545, 8546, 8548, 8549, 8550, 8551, 8552, 8555, 8556, 8557, 8558, 8560
1503	Hallam	8177, 8178, 8179, 8180, 8181, 8182, 8183, 8184, 8186, 8187, 8188, 8189,

		8337, 8338, 8339, 8340, 8341, 8342, 8343, 8344, 8345, 8346, 8347, 8348, 8349, 8350, 8351, 8352, 8353, 8600
1512	West Crail	8511, 8512, 8513, 8514, 8515, 8516, 8517, 8518, 8519, 8520, 8521, 8522, 8523, 8524, 8525, 8526, 8528
1513	Waitata	8058, 8059, 8060, 8062, 8063, 8064, 8065, 8066, 8067, 8069, 8070, 8071, 8073, 8074, 8075, 8076, 8077, 8078, 8079, 8080, 8082, 8084, 8086, 8087, 8088, 8090, 8091, 8092, 8093, 8094, 8095, 8096, 8097, 8098, 8099, 8100, 8101, 8102, 8497, 8499, 8617
1514	Guards	8145, 8146, 8147, 8148, 8151, 8152, 8153, 8155, 8156, 8157, 8158, 8159, 8160, 8163
1515	Port Gore	8165, 8166, 8167, 8168, 8169, 8170, 8171, 8172, 8173, 8174, 8175, 8176, 8501, 8503, 8591, 8598, 8599
1516	French Pass	8002, 8003, 8004, 8005, 8006, 8007, 8008, 8009, 8010, 8011, 8012, 8014, 8015, 8016, 8017, 8018, 8019, 8020, 8021, 8022, 8023, 8024, 8025, 8026, 8027, 8028, 8029, 8030, 8031, 8032, 8033, 8034, 8035, 8036, 8037, 8038, 8039, 8040, 8041, 8042, 8043, 8044, 8048, 8045, 8046, 8047, 8049, 8050, 8051, 8052, 8053, 8054, 8055, 8057, 8058, 8496
1517	Port Hardy	8013
1518	Tawhitinui	8301, 8302, 8303, 8304,

		8305, 8306, 8307, 8308, 8309, 8310, 8311, 8312, 8313, 8314, 8315, 8316, 8317, 8318, 8319, 8320, 8506, 8507, 8508, 8595
1520	Arapawa Island	8397, 8398, 8399, 8400, 8401, 8402, 8403, 8404, 8509, 8510
1521	Oyster Bay	8411, 8412, 8413, 8414
1521A	Tory Channel	8405, 8406
1566	Wairangi Bay	8272, 8273, 8275, 8276, 8277, 8279, 8280, 8281, 8504
NELSON SQAPDC		
1507	Pakawau	Pe 8760278,
1522	Collingwood	Li 427, Li 428, Li 429, Li 434, Li 448, Li 449, Li 450, Li 451, Li 452, Li 453, Li 457, Li 459, Pe 17, Pe 18, Pe 53, Pe 54, Pe 68, Pe 69, Pe 86, Pe 87, Pe 224, Pe 655, Pe 840, Pe 841, Pe 842, Pe 843, Pe 844, Pe 845, Pe 846, Pe 847, Pe 848, Pe 849, PZL1
1527	Ferry Point	Pe 8462926
1532	Motueka Offshore	Li 116, Li 2038, Li 2449, Li 4049, Li 4358, Li 5867, Li 5873, Li 5984, Li 5996, Li 6002, Li 62128, Li 6835, Li 7420, Li 7497, Li 8256, Li 9118, Li 9179, Li 9243, Li 9271, Li 9279, Li 9280, Li 9729, Li 62038, Li 62129, Li 62437, Li 62621, Li 62736, Li 62755, Li 70593, Li 70873, Li 92649, Li 900538, RM050005, RM050101
1534	Takaka	Li 116, Li 2038, Li 2449, Li 4049, Li 4358, Li 5867, Li 5873, Li 5984, Li 5996, Li 6002, Li 62128, Li 6835, Li 7420, Li 7497, Li 8256, Li

		9118, Li 9179, Li 9243, Li 9271, Li 9279, Li 9280, Li 9729, Li 62038, Li 62129, Li 62437, Li 62621, Li 62736, Li 62755, Li 70593, Li 70873, Li 92649, Li 900538, PZL1, RM050102, RM070990
CANTERBURY SQAPDC		
1601	Pigeon Bay	Pe 383, Pe 384, Pe 689, Pe 730, Pe 731
1602	Menzies Bay	Li 352, Pe 740
1603	Pegasus Bay	Pe 9790916
1604	Port Levy	Pe 877, Pe 878, Pe 885, Pe 886, Pe 887
1605	Akaroa Harbour	Pe 78, Pe 79
DUNEDIN SQAPDC		
1801	Papanui Inlet	Pe 63626, Pe 7952, Pe 64011
1802	Blueskin Bay	Pe 90063
1803	Continental Shelf	Pe 8480986, Pe 8481189, Pe 8482012, Pe 8490681
1804	Otago Harbour North	PE 900972
1805	Otago Harbour South	PE 900972
SOUTHLAND SQAPDC		
1901	Big Glory Bay	Li 149A, Li 315, Li 316, Li 317, Li 318, Li 319, Li 320, Li 321, Li 322, Li 323, Li 324, Li 325, Li 337, Li 338, Li 339, Li 340, Li 342, Li 366, Li 418, Li 461, Li 474, Li 475, Pe 244, Pe 245, Pe 246, Pe 247, Pe 248, Pe 249, Pe 250, Pe 271, Pe 272, Pe 273, Pe 274, Pe 275, Pe 326, Pe 365
1902	Foveaux Strait	Pe 8106, Pe 8107, Pe 8200, Pe 8201, Pe 8229, Pe 8252, Pe 8263, Pe 8264, Pe 8326, Pe 9002, Pe 90745

1903	Bluff Harbour	Li426, MF367
KAWHIA SQAPDC		
608	Kawhia Harbour	Le 422
CHATHAM ISLANDS SQAPDC		
802	Chatham Island	9470001