

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7品目の表示を義務付けている。

えび、かに、小麦、そば、卵、乳、落花生

(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。

あわび、いか、いくら、オレンジ、カシューナッツ、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、ごま、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、まつたけ、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、「(〇〇を含む)」「(〇〇)」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、「(〇〇由来)」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：〇〇由来)」又は「用途名 (物質名 (〇〇由来))」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：〇〇・〇〇由来)」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つては、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つては、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、精製が完全な乳清等が挙げられるが、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、抗原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。ここでいう抗原性試験とは、食品添加物の審査に用いられている「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成8年3月22日衛化第29号厚生省生活衛生局長通知）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つては、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て用いるため、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 特定原材料等のうち、高価なもの（あわび、まつたけ等）が含まれる加工食品については、特定原材料等がごく微量しか含有されていないにもかかわらず、あたかも多く含まれるかのような表示が行われると消費者に誤認を生じさせるおそれがあることから、表示に当たっては、例えば「あわびエキス含有」など、含有量、形態等に着目した表示を行うこと。
- ⑥ 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7品目」又は「特定原材料に準ずる20品目を含む27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7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。
- ⑦ 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。
- ⑧ 対面販売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。
- ⑨ 特定原材料等の品目については、継続的に実態調査・科学研究を行っており、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		
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	
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	〃	〃	全黄液鶏卵
	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		

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
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		
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	
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
カシューナッツ	69	8594	穀果類	その他の穀果類	カシューナッツ
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	
くるみ	69	8591	穀果類	その他の穀果類	くるみ
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

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
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	
豚肉	70	121	豚肉及びいのしし肉	豚肉	
	70	123	〃	豚のくず肉	
まつたけ	69	762	きのこ類	まつたけ	
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

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
※分類番号が無いものの分類					
乳 分類は食品衛生法乳等省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
			〃	〃	アイスマルク
			〃	〃	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		
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)	
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	
	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	ソバ柄灰抽出物	植物灰抽出物	燃焼するのでアレルギーは含まないと考えられる。
		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)	

特定原材料の名称	区分	添加物名	特定原材料の表示	備考
		ルチン(抽出物)(ソバ全草抽出物)	ルチン(抽出物)(そば由来)	名称に「そば」があるため、特定原材料等の表示は不要
			ソバ全草抽出物	
			フラボノイド(そば由来) ルチン(そば由来)	
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)	
		焼成カルシウム(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	焼成カルシウム(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
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
カシューナッツ	—	—	—	—
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、アレルギー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、アレルギー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		
		シヨ糖脂肪酸エステル	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、アレルギー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、アレルギー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。
		胆汁末	胆汁末(牛由来) コール酸(牛由来) デオキシコール酸(牛由来) 乳化剤(牛由来)	ただし、豚の場合は(豚由来)と記載 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
		フェリチン	フェリチン(牛由来) 鉄たん白(牛由来) 鉄たん白質(牛由来)	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(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
		レンネット	酵素(牛由来)	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(牛由来)	
くるみ	—	—	—	—
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)	
		ゴマ柄灰抽出物	特定原材料等表示不要	燃焼するのでアレルゲンは含まないと考えられる。
		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
		d- γ -トコフェロール	d- α -トコフェロールに同じ	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- 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)
	高級脂肪酸		牛肉の項参照	牛肉の項参照

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
		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	
		ばい煎ダイズ抽出物	焙煎ダイズ抽出物	名称に「ダイズ」があるので、特定原材料等の表示不要
		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	—	—	—	—
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		

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	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)	
まつたけ	—	—	—	—
もも	—	—	—	—
やまいも	—	—	—	—
りんご	既存添加物	酵素分解りんご抽出物	りんご抽出物 りんごエキス	名称に「りんご」があるので、特定原材料等の表示不要
		ペクチン	ペクチン(りんご由来)	ただし、原料がりんごの場合のみ
		ペクチン分解物	ペクチン分解物(りんご由来)	

(注)

- 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。
- 加工助剤、キャリア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。
- 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:りんご由来)
- 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)
- 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なります。

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	拡大表記 (表記例)
	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	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
かに	蟹 カニ	上海がに カニシューマイ マツバガニ
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	アイスマルク 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		拡大表記（表記例）	
	表記方法や言葉が違うが、特定原材料に準ずるものと同じであるということが理解できる表記		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	
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 スジコ	すじこ	いくら醤油漬	塩すじこ
オレンジ			オレンジソース	オレンジジュース
カシューナッツ				
キウイフルーツ	キウイ キーウィー キウイ	キウィー キーウィ	キウイジャム キーウィージャム	キウイソース キーウィーソース
牛肉	牛 ぎゅうにく 牛にく	ビーフ ぎゅう肉	牛すじ ビーフコロッケ	牛脂
くるみ	クルミ		くるみパン	くるみケーキ
ごま	ゴマ	胡麻	ごま油 すりゴマ ゴマペースト	練りごま 切り胡麻
さけ	鮭 サーモン シャケ	サケ しゃけ	鮭フレーク 紅しゃけ	スモークサーモン 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 大豆油	大豆たんぱく 脱脂大豆
鶏肉	とりにく 鳥肉 鳥 チキン	とり肉 鶏 とり	焼き鳥 鶏レバー チキンスープ	ローストチキン チキンブイヨン 鶏ガラスープ
バナナ	ばなな		バナナジュース	
豚肉	ぶたにく ぶた肉 ポーク	豚にく 豚	ポークウインナー 豚ミンチ	豚生姜焼
まつたけ	松茸	マツタケ	焼きまつたけ	まつたけ土瓶蒸し
もも	モモ ピーチ	桃	もも果汁 白桃	黄桃 ピーチペースト
やまいも	山芋 山いも	ヤマイモ	千切りやまいも	
りんご	リンゴ	アップル	アップルパイ 焼きりんご	リンゴ酢 りんご飴
ゼラチン			板ゼラチン	粉ゼラチン

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あるい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)及び同等の結果が得られるものを用いる。

注)

- ①インスタント食品(カップ麺、カップスープ等)には、スープ、かやく及び麺などに小分けされ包装されているものが含まれる。そのような包装形態を持つインスタント食品については全体を一包装単位として考え、小分け包装されたものの全てを

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 $\mu\text{g/g}$ 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 $\mu\text{g/g}$ 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「アレルギー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 1 g 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 $\mu\text{g/g}$ の範囲内にある場合には、再度、同じ調製試料から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やPCR法がある。一般に、卵、乳については、ウエスタンブロット法が用いられる。一方、小麦、そば、えび、かに、落花生については、一般にPCR法が用いられる。

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

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（1 μ g/mL）が検出されているかどうか確認する。標準液（1 μ g/mL）が検出されない場合は、検査が不適であると考え、再度試料の調製から行う。卵タンパク質測定の際は、卵白アルブミン又はオボムコイド、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

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

2.2.3.1. 試料調製法

1.1. 及び1.2. に従って、試料を調製する。

ただし、試料中、ミキサーミル等を用いた単純な粉砕により均質化が困難なも

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

2.2.3.2. DNA抽出精製法

界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) とフェノール/クロロホルム混合液を用いてDNAを抽出精製するCTAB法は、応用範囲が広い上、PCR阻害物質が残存しにくく、純度の高いDNAを得ることが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 M Ω /cmまで精製した超純水を121°C、20分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

2.2.3.2.1. 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°Cに温めておいたAP1緩衝液10 mLとRNase A 10 μ Lを加える。その後、試料塊が残らないようボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで15分間加温する。その間、数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。加温処理後、AP2緩衝液3,250 μ Lを加え室温で5分間静置し、その後、室温下、3,000 \times 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 \times 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 μ Lとし、得られた上清のうち3 mLを負荷し終えるまで数回繰り返す。最終的に得られた溶出液に、溶出液量の1.5倍量のAP3緩衝液・エタノール混液^{*3}を加え、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、溶解液を得る。得られた溶解液のうち500 μ Lをmini spin columnに負荷し、室温下、10,000 \times gの条件で1分間遠心し溶出液を捨てる。次いで残りの溶解液のうち、さらに500 μ Lを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に溶解液が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 μ Lを負荷し、室温下、10,000 \times 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、10,00

0 × 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 2 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り採る^{*2}。同遠沈管にG2緩衝液^{*3} 7.5 mLを加えてボルテックスミキサーで激しく混合し、混合後さらにG2緩衝液7.5 mL、及びにα-アミラーゼ^{*4}（1 mg/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} 1 mLを用いて平衡化しておく。遠心操作終了後の上清を平衡化済みQIAGEN Genomic-Tip 20/Gに2 mLずつ数回に分けて負荷する。上清全量の負荷操作を終了した後、tipにQC緩衝液^{*3} 2 mLを負荷し、洗浄する。同様の洗浄操作を合計3回繰り返した後、tipを新しいポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移し変える。洗浄操作終了後のtipにあらかじめ50℃に温めておいたQF緩衝液^{*3} 1 mLを加えDNAを溶出する。同tipに対し、もう1度同様の溶出操作を行う。得られた計2 mLの溶出液に対し、0.7倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、低温下（4℃）、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 1 mL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°Cで30分間加温する。加温処理後、溶液を攪拌し、均質となった溶液 600 μ Lをマイクロ遠沈管(1.5 mL容)に量り採る。次いで量り採った溶液に対し 500 μ Lのフェノール/クロロホルム混合液^{*3}を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁後、7,500 \times g、室温条件下で15分間遠心し、分離した水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。この際、中間層にさわらないように注意する。分取した水層に対し、再び500 μ Lのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液^{*4}を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁後、7,500 \times 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 \times g、室温条件下で15分間遠心し、沈殿に留意しながらデカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、500 μ Lの70%エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 \times g、室温条件下で1分間遠心する。遠心後、沈殿に触わないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。遠沈管に残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて2~3分間の真空乾燥処理を行う。この時、完全に乾燥しないように注意する。50 μ LのTE緩衝液^{*5}を加えてよく混和し、その後、室温で15分間静置する。この間、数回転倒混和し、沈殿が完全に溶解することを促す。得られた溶解液にRNase A 5 μ Lを加え、37°Cで30分間加温する。加温処理後の溶液に200 μ LのCTAB緩衝液、次いで250 μ Lのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ボルテックスミキサーで軽く懸濁する。懸濁処理後、7,500 \times 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、中間層に触わないように分取する。分取した溶液に200 μ Lのイソプロピルアルコールを加え、転倒混和する。転倒混和後、7,500 \times g、室温条件下で10分間遠心し、沈殿に留意しながらデカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、200 μ Lの70 %エタノールを壁面から静かに加え、その後、7,500 \times g、室温条件下で1分間遠心する。遠心後、沈殿に触わないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。遠沈管に残った沈殿を乾燥させるため、アスピレーターを用いて2～3分間の真空乾燥処理を行う。この時、完全に乾燥しないよう注意する。50 μ Lの水を加えて混合した後、室温下に15分間静置する。この間、数回転倒混和する事で沈殿が溶解することを促す。完全に溶解したものをDNA試料原液とする。

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

*3 フェノール/クロロホルム混合液

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

*4 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液

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

*5 TE 緩衝液

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

2.2.3.2.4. DNAの精製度の確認と定量

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

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

い場合には、他の抽出法を用いて抽出操作を行う。

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

* O.D. 230値は糖、フェノール等の低分子化合物由来の吸光度であり、O.D. 260 / O.D. 230を計算する。この比が2.0を下回る場合には、上記夾雑物の影響によりPCR反応がうまく行われなかった場合がある。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出することが可能であり、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 M Ω /cmまで精製した超純水を121℃、20分以上の条件でオートクレーブ滅菌したものとする。

2.2.3.3.1. 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}または動物DNA検出用プライマー対^{*2*3}

を用いて行い、その結果を2.2.3.5.に記載のある判定例に照らして判じ、判定に準じた2度目のPCR増幅を各特定原材料検出用プライマー対を用いて行う。

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

植物DNA検出用プライマー対

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

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

増幅バンド長

124 bp

使用機器、反応液の調製法、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'-TGA CCG TGC GAA GGT AGC-3'

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

AN1-5' 及びAN2-5' を1:1の比率で混合して使用する。

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

増幅バンド長

370-470 bp

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

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あるいは動物DNAを検知することを目的として設計されている。そのため、標的遺伝子には植物界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、植物間あるいは動物間で塩基配列の挿入や欠失が認められるものがある。このため、検査対象検体によっては、得られる増幅バンド長に若干の違いが認められる場合があるので注意する。植物DNA検出用プライマー対あるいは動物DNA検出用プラ

イマー対の選択は検査対象検体の原材料の特性に応じて行う。

2.2.3.3.2. 落花生の検知を目的としたPCR増幅

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、1 x PCR緩衝液^{*1}、0.20 mM dNTP、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.2 μ M 5' 及び3' プライマー^{*2}、及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼ^{*3} を含む液に、20 ng/ μ L に調製したDNA試料液^{*4} 2.5 μ L (DNAとして50 ng) を加え、全量を25 μ Lにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置^{*5}にセットする。反応条件は次のとおりである。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5分間、60°C 0.5分間、72°C 0.5分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行う。次に終了反応として72°C で7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCR反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないもの及び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増幅に必要なとされる品質を備えたDNAが抽出されていることの確認を行う。次いで、2.2.3.5. に記載のある判定例に従い、落花生検出用プライマー対を用いたPCR増幅を行う。

*1 PCR緩衝液

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

*2 落花生検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

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

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

増幅バンド長

95 bp

*3 Taq DNAポリメラーゼ

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

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

*5 PCR増幅装置

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

2.2.3.3.3. そばの検知を目的としたPCR増幅

使用機器、反応液の調製法、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'-AAC GCC ATA ACC AGC CCG ATT-3'

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

増幅バンド長

127 bp

2.2.3.3.4. 小麦の検知を目的としたPCR増幅

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

* 小麦検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

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

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

増幅バンド長

141 bp

2.2.3.3.5. えびの検知を目的としたPCR増幅^{*1}

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

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

PCR増幅反応液17 μ L、制限酵素10×Mバッファー2 μ L*、制限酵素HaeIII 1

μL *を混合し、37°C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（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

*3 えび検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (ShH12-05') :

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

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

R-primer (ShH13-03') :

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

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

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

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

増幅バンド長

187 bp

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

*4 Taq DNAポリメラーゼ

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

*5 原則としてDNA試料液は20 ng/ 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（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。GeneAmp PCR System 9700、Veritiサーマルサイクラーを使用する場合は9600 Emulation Modeで行う。

2.2.3.3.6. かにの検知を目的としたPCR増幅

PCR用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、1 x PCR緩衝液^{*1}、0.20 mM dNTP、2.0 mM 塩化マグネシウム、0.2 μ M 5' 及び3' プライマー^{*2}、及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼ^{*3} を含む液に、20 ng/ μ L に調製したDNA試料液^{*4} 2.5 μ L (DNAとして50 ng) を加え、全量を25 μ Lにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置^{*5}にセットする。反応条件は次の通りである。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5分間、54°C 0.5分間、72°C 0.5分間を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅を行った後、4°Cで保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。PCR反応のブランク反応液として、必ずプライマー対を加えないもの及び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（アプライドバイオシステムズ社製）及び同等の結果が得られるものを用いる。

*2 かに検出用プライマー対及び増幅バンド長は以下のとおりである。

検出用プライマー対

F-primer (CrH16-05') :

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

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

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

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

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

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

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

増幅バンド長

62 bp

*3 Taq DNAポリメラーゼ

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

*4 原則としてDNA試料液は20 ng/ μ Lの濃度で調製することとするが、検査対

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

*5 PCR増幅装置

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

2.2.3.4. アガロースゲル電気泳動

PCR増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分析し、DNA増幅バンドを確認する。

2.2.3.4.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE緩衝液*¹を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に100 mL当たり5 μ Lのエチジウムブロミド溶液（10 mg/mL）*²を加え、ゲルが50°C前後まで冷えたらゲルメーカーにゲルを流し込み、十分に室温で冷やし固めてゲルを作製する*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ため、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、5 μ Lのエチジウムブロミド溶液（10 mg/mL）を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら20分程度染色する。その後、TAE緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、20分程度軽く振とうしながら脱染色を行う。

2.2.3.4.4. ゲルイメージ解析

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

* 食品包装用ラップ

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

2.2.3.5. 結果の判定

2.2.3.5.1. 落花生を対象とした検査結果の判定

1 調製試料より2点並行で抽出したDNAを規定濃度に調製した後、鋳型DNAとして用い、PCR法を実施する。まず1度目のPCR増幅は植物DNA検出用プライマー対を用いて実施し、その結果、DNA試料液2点のいずれを用いた場合も共に124 bpのPCR増幅バンドが検出された場合には（下記植物DNA検出用プライマー対判定例試料番号1）、両試料液においてPCR増幅に必要な品質を有するDNAが抽出されたと判断し、次いで、落花生検出用プライマー対を用いたPCR増幅を各試料液に対し実施する。落花生検出用プライマー対を用いた2度目のPCR増幅の結果、DNA試料液2点の両方又は、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、D

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

植物DNA検出用プライマー対判定例

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

+ : 増幅バンド検出、- : 増幅バンド非検出

事例 1 : 検出用プライマー対を用いたPCR増幅をDNA試料液 2 点に対し行う。

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

事例 3 : 本法によるDNA抽出は困難であると判断し、DNA抽出法の最適化を図る。

3 種のDNA抽出法を試みてなお、同じ結果のみ得られる場合には、当該検査対象検体からのDNA抽出は不可能であり、PCR法による検知不能と判断する。

検出用プライマー対判定例

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

+ : 増幅バンド検出、- : 増幅バンド非検出

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

2.2.3.5.2. そばを対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpのPCR増幅バンドが検出され、そば検出用プライマー対を用いたレーンで127 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はそば陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.3.5.3. 小麦を対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bp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. えびを対象とした検査結果の判定

植物または動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpまたは370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、えび検出用プライマー対を用いたレーンで187 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はえび陽性と判定する。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、ならびに注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

* 偽陽性を示すかきの種類

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。

2.3. 「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 $10\mu\text{g}$ 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。

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、ウェスタンブロット法、PCR法以外の定性検査法を用いることは妨げないが、この場合には、これらの検査法と同等あるいは同等以上の性能をもっていること。
- (2) 卵、乳の確認検査は、一般的にウェ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、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。
- (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⑩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54条又は第55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、落花生の監視のみ)

①	特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生）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 μ g/ml濃度レベル又は数 μ g/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。

	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
--	--------------------------------

⑦	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。

7 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 μ g/ml濃度レベル又は数 μ g/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。

(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。乾燥物を微粉碎し、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、上澄液を孔径0.8 μmのマイ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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)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、7. 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1Lを氷で冷却しながら攪拌し、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0.2gを50mL PP製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20mL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(90~110rpm)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、上澄液を孔径0.8µmのマイ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3cm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、40~25kDaの範囲に3本、16kDa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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 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、7. 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メッシュの篩(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) Northern 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) で一晚抽出する。抽出液を10,000×gで30分間遠心分離した後、上澄液を孔径0.8 μmのマイクロ

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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 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、7. 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碎し、14 メッシュの篩 (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、上澄液を孔径0.8 μmのマイ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む 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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) 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、7. 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碎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分間攪拌した後、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°Cのアルミバス上に置き、約7 h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、上澄液を孔径0.8 μmのマイ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、0.1 M 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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)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 (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)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、7.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。乾燥物を微粉碎し、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、上澄液を孔径0.8 μmのマイ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

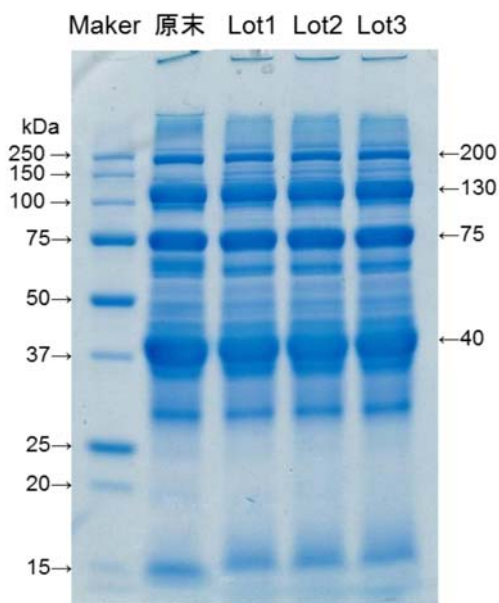
2-D Quant kit (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は2.7～4.1mg/mLである。

参考 以下に示す値は参考値とする。

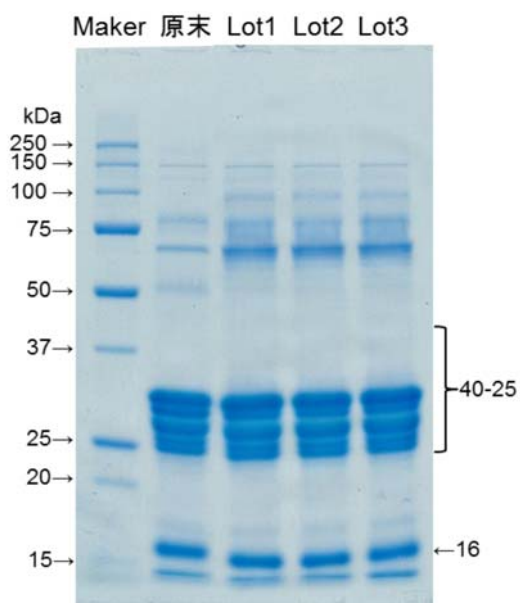
甲殻類一次希釈液調製のタンパク質を2-D Quant kit (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) により定量するとき、その濃度は甲殻類標準品原液のタンパク質濃度の0.08倍～0.12倍である。甲殻類標準品原液についてSDS-PAGEを行うとき、7.に示すような泳動像が得られる。

7. 各標準品原液のSDS-PAGE電気泳動像

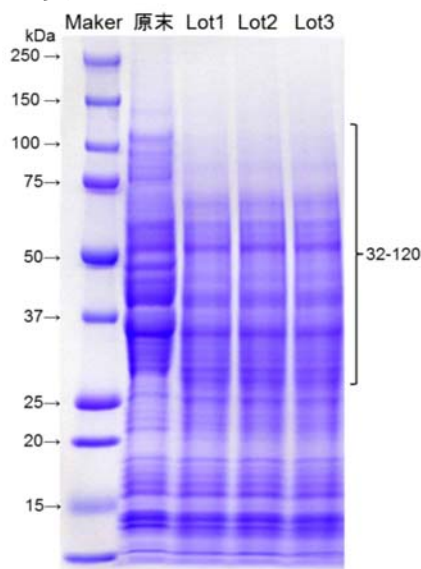
卵



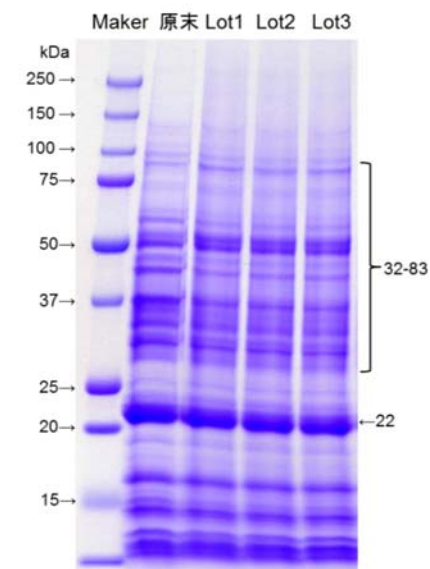
牛乳



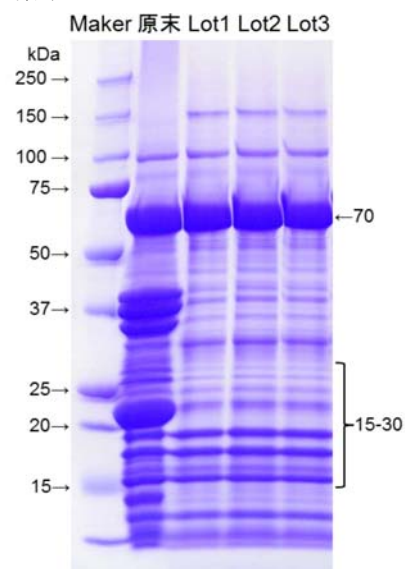
小麦



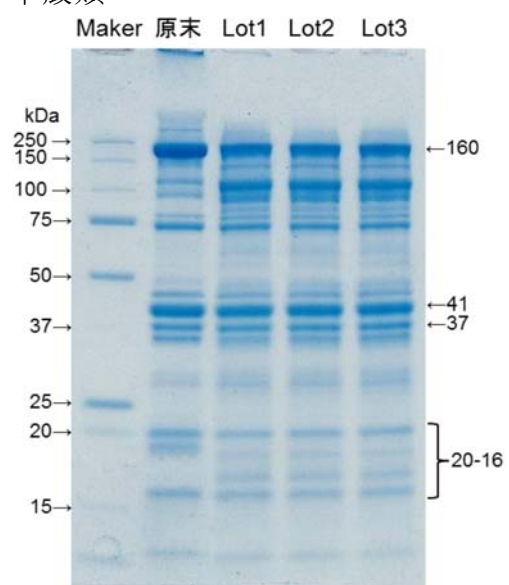
そば



落花生



甲殻類



原末：卵・牛乳・小麦・そば・落花生・甲殻類標準粉末

Lot1-3：ロット番号

(別添4)

アレルギーを含む食品の検査方法を評価するガイドライン

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（アレルギー）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ギーの発見等に伴い、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ささないためにも、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、食品中のアレルギー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（ウェスタンブロット法、PCR法）

ウェ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。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。ウェ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、アレルゲン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）又はウェ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、アレルゲン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、あるいはアレルゲン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アレルゲン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、加工過程で種々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可能性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ため、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

$$\rho_S = (\text{ピペットによる注入量のRSD}) \cdot (2/3)$$

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、 $\rho_X = 0.6\%$ 、 $\rho_S = 0.4\%$ 、 $\sigma_W = 0.004 \text{ Abs}$ 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、標準液あるい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ックス中での、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例

(架空のデータを用い分析法バリデーショ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社〇〇研究所
- ・ C協会 X X研究所
- ・ E研究所
- ・ G社〇〇部
- ・ I 分析センター
- ・ B研究所
- ・ D社△△研究所
- ・ F社〇 Xセンター
- ・ H研究センター
- ・ J 社〇〇研究所

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。

バリデーショ結果

表 A-1に、それぞれのキットのバリデーショから得られた、回収率、併行精度(RSD_D)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

オレンジジュース	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社〇〇研究所
- ・B研究所
- ・C協会X X研究所
- ・D社△△研究所
- ・E研究所
- ・F社〇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
	カレーペースト	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
	カレーペースト	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
	カレーペースト	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、アレルギー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

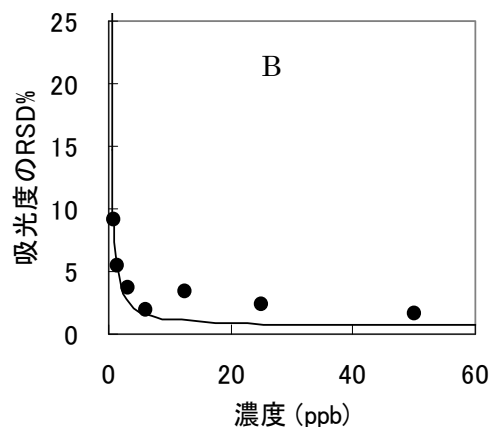
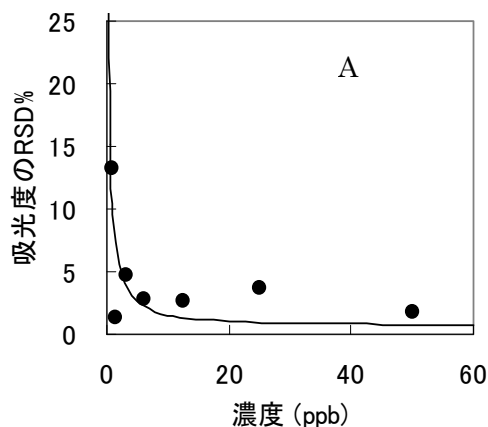
$\rho_S = (\text{ピペットによる注入量のRSD}) \cdot (2/3)$

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）

$\rho_X = 0.6\%$ 、 $\sigma_w = 0.004$ 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)

アレルギー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、別添アレルギー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ギー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 $\mu\text{g/g}$ から10,000 $\mu\text{g/g}$ 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10,000 $\mu\text{g/g}$ 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 $\mu\text{g/g}$ から数10 $\mu\text{g/g}$ 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 $\mu\text{g/g}$ 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 $\mu\text{g/g}$ 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。