

(別紙)

食品表示基準について（新旧対照表）

改正後（新）	改正前（旧）
<p>食品表示基準について（平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号）</p> <p>（総則関係）～（附則）（略）</p> <p>別添 添加物 1－1～別添 栄養成分等の分析方法等（略）</p> <p>別添 アレルゲンを含む食品に関する表示</p> <p>第 1 アレルゲンを含む食品に関する表示の基準</p> <p>1（略）</p> <p>2 表示の対象</p> <p>（1） 特定原材料</p> <p>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 <u>8</u> 品目の表示を義務付けている。</p> <p>えび、かに、<u>くるみ</u>、小麦、そば、卵、乳、落花生（ピーナッツ）</p> <p>（2） 特定原材料に準ずるもの</p> <p>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 <u>20</u> 品目</p>	<p>食品表示基準について（平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号）</p> <p>（総則関係）～（附則）（略）</p> <p>別添 添加物 1－1～別添 栄養成分等の分析方法等（略）</p> <p>別添 アレルゲンを含む食品に関する表示</p> <p>第 1 アレルゲンを含む食品に関する表示の基準</p> <p>1（略）</p> <p>2 表示の対象</p> <p>（1） 特定原材料</p> <p>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 <u>7</u> 品目の表示を義務付けている。</p> <p>えび、かに、小麦、そば、卵、乳、落花生（ピーナッツ）</p> <p>（2） 特定原材料に準ずるもの</p> <p>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 <u>21</u> 品目</p>

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、カシューナッツ、キウイフルーツ、牛肉、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) (略)

3 表示の方法

(1)～(5) (略)

(6) その他留意事項

①～⑤ (略)

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8品目」又は「特定原材料に準ずる20品目を含む 28 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8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。

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、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) (略)

3 表示の方法

(1)～(5) (略)

(6) その他留意事項

①～⑤ (略)

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21品目を含む 28 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。

⑦～⑨ (略)

第2・第3 (略)

別表1 (略)

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	(略)			
<u>くるみ</u>	=	=	=	=
小麦	(略)			
(略)				

2 特定原材料に準ずるもの

特定原材料 の名称	区分	添加物名	特定原材料の 表示	備考
(略)				
牛肉	(略)			
<u>(削除)</u>				
ごま	(略)			
(略)				

⑦～⑨ (略)

第2・第3 (略)

別表1 (略)

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	(略)			
<u>(新設)</u>				
小麦	(略)			
(略)				

2 特定原材料に準ずるもの

特定原材料 の名称	区分	添加物名	特定原材料の 表示	備考
(略)				
牛肉	(略)			
<u>くるみ</u>	=	=	=	=
ごま	(略)			
(略)				

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	代替表記	拡大表記（表記例）
（食品表示基準で定められた品目）	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
（略）		
かに	（略）	
<u>くるみ</u>	<u>クルミ</u>	<u>くるみパン</u> <u>くるみケーキ</u>
小麦	（略）	
（略）		

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
（略）		
牛肉	（略）	
<u>（削除）</u>		
ごま	（略）	
（略）		

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	代替表記	拡大表記（表記例）
（食品表示基準で定められた品目）	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
（略）		
かに	（略）	
<u>（新設）</u>		
小麦	（略）	
（略）		

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
（略）		
牛肉	（略）	
<u>くるみ</u>	<u>クルミ</u>	<u>くるみパン</u> <u>くるみケーキ</u>
ごま	（略）	
（略）		

別添 アレルゲンを含む食品の検査方法

序文～1.1. (略)

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・② (略)

2. ～2.1.2. (略)

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 やPCR-核酸クロマト法がある。一般的に、卵、乳については、ウエスタンブロット法が用いられる。一方、えび、かには一般的にPCR法、小麦、そば、落花生については一般的にPCR法又はリアルタイムPCR法、くるみについては一般的にリアルタイムPCR法又はPCR-核酸クロマト法が用いられる。

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。

別添 アレルゲンを含む食品の検査方法

序文～1.1. (略)

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・② (略)

2. ～2.1.2. (略)

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、かには、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。

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. ～2.2.3.2.2. (略)

2.2.3.2.3. CTAB 法^{*1}

調製試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、同遠沈管に CTAB 緩衝液^{*2}15 mL を加え、ホモジナイザーを用いて混合する。遠沈管の縁ならびにホモジナイザーの先端部を洗浄するように CTAB 緩衝液 30 mL を加え、転倒混和後 55°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清を捨てる。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

2.2.2. ～2.2.3.2.2. (略)

2.2.3.2.3. CTAB 法^{*1}

調製試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、同遠沈管に CTAB 緩衝液^{*2}15 mL を加え、ホモジナイザーを用いて混合する。遠沈管の縁ならびにホモジナイザーの先端部を洗浄するように CTAB 緩衝液 30 mL を加え、転倒混和後 55°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。

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、中間層に触れ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清を捨てる。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、沈殿に触れ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～*5 (略)

2.2.3.2.4.・2.2.3.3. (略)

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、かきの 5 種である。その各につき PCR 増幅の条件が異なる。

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、中間層に触れ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、沈殿に触れ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～*5 (略)

2.2.3.2.4.・2.2.3.3. (略)

2.2.3.3.1. PCR 増幅 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、かきの 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・*2 (略)

*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. 落花生の検知を目標とした 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

2.2.3.3.2. から 2.2.3.3.6. ままでに記載する 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・*2 (略)

*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. 落花生の検知を目標とした 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 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、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 (略)

*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 (略)

*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. ・ 2.2.3.3.4. (略)

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 (略)

*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 (略)

*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. ・ 2.2.3.3.4. (略)

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 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由来するものか判断がつかない場合は、PCR 増幅産物を以下の制限酵素処理に供し判断する。

PCR 増幅反応液 17 μ L、制限酵素 10×M バッファー 2 μ L*、制限酵素 HaeIII 1 μ L* を混合し、37°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

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 μ L* 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 (略)

*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 (略)

*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

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 (略)

*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 (略)

*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、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 (略)

*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 (略)

*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

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、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 (略)

*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 (略)

*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

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. ～2.2.3.5.3. (略)

2.2.3.5.4. えび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、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。

* (略)

2.2.3.5.5. (略)

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。

ラーを使用する場合は 9600 Emulation Mode で行う。

2.2.3.4. ～2.2.3.5.3. (略)

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。

* (略)

2.2.3.5.5. (略)

(新設)

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

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であり、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. リアルタイム PCR 増幅

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、くるみの4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、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。

2.2.4.3.2. 落花生の検知を目的としたリアルタイム PCR 法

2.2.4.3.2.1. リアルタイム PCR 増幅

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 μ L、5' 及び 3' プライマー^{*2} (いずれも 50 μ M) それぞれ 0.2 μ L、プローブ^{*2} (10 μ M) 0.25 μ L、及び水 9.35 μ L 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/ μ L に調製した DNA 試料液^{*3} 2.5 μ L (DNA として 50 ng) を加え、全量を 25 μ L にする。DNA 試料液の代わりに基準プラスミド溶液^{*4} 2.5 μ L、又は高濃度プラスミド溶液^{*4} 2.5 μ L 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°C に 15 分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5 分間、68°C 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)

1 反応液当たり必要量

<u>試薬</u>	<u>(μL)</u>
<u>リアルタイム PCR 試薬*1</u>	<u>12.5</u>
<u>5' プライマー (50 μM) *2</u>	<u>0.2</u>
<u>3' プライマー (50 μM) *2</u>	<u>0.2</u>
<u>プローブ (10 μM) *2</u>	<u>0.25</u>
<u>水</u>	<u>9.35</u>
<u>合計</u>	<u>22.5</u>

*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/ 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。

*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。

2.2.4.3.2.2. リアルタイム PCR 増幅結果の解析

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 C_q 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。

2.2.4.3.3. そばの検知を目的としたリアルタイム PCR 法

2.2.4.3.3.1. リアルタイム PCR 増幅

2.2.4.3.2.1. 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'

2.2.4.3.3.2. リアルタイム PCR 増幅結果の解析

2.2.4.3.2.2. に従って行う。

2.2.4.3.4. 小麦の検知を目的としたリアルタイム PCR 法

2.2.4.3.4.1. リアルタイム PCR 増幅

2.2.4.3.2.1. 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。

2.2.4.3.4.2. リアルタイム PCR 増幅結果の解析

2.2.4.3.2.2. に従って行う。

2.2.4.3.5. くるみの検知を目的としたリアルタイム PCR-H 法

2.2.4.3.5.1. リアルタイム PCR 増幅

2.2.4.3.2.1. 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' -GTCGAGGAGCACCTCACA-3'
プローブ (JI2P) : 5' -FAM-ACACACGACGGTCACGAGG-MGB-3'

2.2.4.3.5.2. リアルタイム PCR 増幅結果の解析

2.2.4.3.2.2. に従って行う。

2.2.4.3.6. くるみの検知を目的としたリアルタイム PCR-N 法

2.2.4.3.6.1. リアルタイム PCR 増幅

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 μ L、5' 及び 3' プライマー^{*2} (いずれも 10 μ M) それぞれ 0.8 μ L、プローブ^{*2} (10 μ M) 0.4 μ L、及び水 5.5 μ L を含むマスターミックス (下記表参照) に、20 ng/ μ L に調製した DNA 試料液^{*3} 2.5 μ L (DNA として 50 ng) を加え、全量を 20 μ L 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°C に 15 分間保ち反応を開始させた後、94°C 15 秒、60°C 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)

1 反応液当たり必要量

<u>試薬</u>	<u>(μL)</u>
<u>リアルタイム PCR 試薬^{*1}</u>	<u>10</u>
<u>5' プライマー (10 μM) ^{*2}</u>	<u>0.8</u>
<u>3' プライマー (10 μM) ^{*2}</u>	<u>0.8</u>

<u>プローブ (10 μM) *2</u>	<u>0.4</u>
<u>水</u>	<u>5.5</u>
<u>合計</u>	<u>17.5</u>

*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' -CGCCCGTGGTTACTCCTGTGTTA-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/ 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。

*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。

2.2.4.3.6.2. リアルタイム PCR 増幅結果の解析

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

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. 結果の判定

2.2.4.4.1. 落花生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、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。

2.2.4.4.2. そば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、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。

2.2.4.4.3. 小麦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、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. 4. 4. くるみ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、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. 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。

(新設)

2.2.5.3. 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）、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。

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である。

2.2.5.3.1. に記載する方法を用いて検査を行う。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、判定に準じて核酸クロマトを行う。

2.2.5.3.1. くるみの検知を目的とした PCR-核酸クロマト法

2.2.5.3.1.1. 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 μ L、5' 及び 3' プライマー*²（いずれも 10 μ M）それぞれ 0.6 μ L、及び水 6.3 μ L に、20 ng/ μ L に調製した DNA 試料液*³ 2.5 μ L（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μ L 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°C に 5 分間保ち反応を開始させた後、94°C 30 秒、67°C 30 秒、72°C 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°C 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-CGCCCCGTGGTTACTCCTTGTTA-3'

*3 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。

*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。

2.2.5.3.1.2. 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 μ L、アビジンコート着色ラテックス液^{*1} 1 μ L、及び PCR 増幅反応液 10 μ L 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. 結果の判定

2.2.5.4.1. くるみ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、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、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。

2.3.・3. (略)

(別添 1)



2.3.・3. (略)

(別添 1)



(別添2)

判断樹について

1～3 (略)

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、かきの確認検査は、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-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。リアルタイムPCR-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

(別添2)

判断樹について

1～3 (略)

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、えび、かきの確認検査は、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。

る。

(4) (略)

5 違反発見時の措置

(1) (略)

(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、くるみの監視のみ)

①	特定原材料 (卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ) 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) ②～⑫ (略)

7 (略)

(別添 3)

標準品規格

1. 卵検知用標準液

(4) (略)

5 違反発見時の措置

(1) (略)

(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) ②～⑫ (略)

7 (略)

(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 (略)

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。

* (略)

卵一次希釈液調製方法・卵高濃度標準液調製方法 (略)

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。

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 (略)

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。

* (略)

卵一次希釈液調製方法・卵高濃度標準液調製方法 (略)

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、8.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 (略)

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のマイクロフィルターでろ過し、牛乳標準品原液とする。

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 (略)

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、上澄液を孔径0.8 µm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。

* (略)

牛乳一次希釈液調製方法・牛乳高濃度標準液調製方法 (略)

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、8.に示すような泳動像が得られる。

3. 小麦検知用標準液

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。

* (略)

牛乳一次希釈液調製方法・牛乳高濃度標準液調製方法 (略)

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 (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) 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*

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。

* (略)

小麦一次希釈液調製方法・小麦高濃度標準液調製方法 (略)

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

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、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。

* (略)

小麦一次希釈液調製方法・小麦高濃度標準液調製方法 (略)

3.2. 規格 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たん

麦標準品原液のたんぱく質濃度の 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、8. 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。

* (略)

ぱく質濃度の 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。

* (略)

そば一次希釈液調製方法・そば高濃度標準液調製方法 (略)

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、8. 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

そば一次希釈液調製方法・そば高濃度標準液調製方法 (略)

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℃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。

* (略)

落花生一次希釈液調製方法・落花生高濃度標準液調製方法 (略)

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)

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℃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。

* (略)

落花生一次希釈液調製方法・落花生高濃度標準液調製方法 (略)

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

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、8.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 (略)

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のマイクロフィルターでろ過する。ろ過した液

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 (略)

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

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。

* (略)

甲殻類一次希釈液調製法・甲殻類高濃度標準液調製法 (略)

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、その濃度は甲殻類標準品原液のたんぱく質濃度の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、8.に示すような泳動像が得られる。

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。

* (略)

甲殻類一次希釈液調製法・甲殻類高濃度標準液調製法 (略)

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、その濃度は甲殻類標準品原液のたんぱく質濃度の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. 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碎したもの 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回くり返す。チューブを 45°C 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 のマイ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)

(新設)

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。

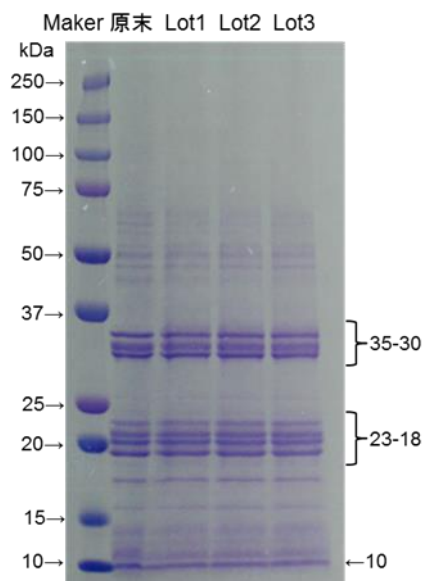
くるみ一次希釈液調製のたんぱく質を 2-D Quant kit (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製) により定量するとき、その濃度はくるみ標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍~0.12 倍である。くるみ標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8. に示すような泳動像が得

られる。

8. 各標準品原液の SDS-PAGE 電気泳動像

卵～甲殻類 (略)

くるみ



原末：卵・牛乳・小麦・そば・落花生・甲殻類・くるみ標準粉末

Lot1-3：ロット番号

(別添4)

7. 各標準品原液の SDS-PAGE 電気泳動像

卵～甲殻類 (略)

(新設)

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～1.1. (略)

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、現行のアレルギー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. ～2.5. (略)

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

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～1.1. (略)

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、現行のアレルギー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. ～2.5. (略)

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った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

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、あるい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った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

<p>の差を明確にしておく必要がある。</p> <p>3. ～3.2. (略)</p> <p>3.3. 手技の管理</p> <p>サンプリング・分析機器 (略)</p> <p>精度の構造</p> <p>(略)</p> <p>典型的な値として、$\rho_x = 0.6 \%$、$\rho_s = 0.4 \%$、$\rho_w = 0.004 \text{ Abs}$ 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。</p> <p>4.・5. (略)</p> <p>参考 1～参考 3 (略)</p> <p>(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～別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products (略)</p>	<p>の差を明確にしておく必要がある。</p> <p>3. ～3.2. (略)</p> <p>3.3. 手技の管理</p> <p>サンプリング・分析機器 (略)</p> <p>精度の構造</p> <p>(略)</p> <p>典型的な値として、$\rho_x = 0.6 \%$、$\rho_s = 0.4 \%$、$\rho_w = 0.004 \text{ Abs}$ 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。</p> <p>4.・5. (略)</p> <p>参考 1～参考 3 (略)</p> <p>(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～別添 Shellfish Growing Areas Classified for Harvest for Human Consumption in Accordance with Regulation 48 of the Animal Products (略)</p>
--	--