

年の猶予期間を持って、えび、かにが追加された。これらの特定原材料はいずれも検査法が通知されているため、食品衛生法施行規則に基づき検査の精度の適正化および向上のため外部精度管理を実施することが望ましいと考えられる。

特定原材料の検査法は平成14年11月6日厚生労働省医薬局食品保健部長より通知（食安発第1106001号）された後、平成17年10月（食安発第1011002号）、平成18年3月（食安発第0324001号）、平成18年6月（食安発第0622003号）および平成21年1月（食安発第0122001号）にその一部が改正され現在に至っている。このうち、平成18年3月には標準品規格が追加され、平成18年6月にはそれまで指定されていた測定キットが全て通知からはずれ、代わって検査方法を評価するためのガイドラインのみが記載されるようになり、平成21年1月にはえび・かにの標準品規格が追加されたのとともバリデーションが完了した定量検査キットの一覧が示された。しかし、卵、乳、小麦、そば、落花生のバリデーション済みの定量検査キットは平成18年3月の通知（食安発第0324001号）で指定されたものと同一で、卵、牛乳の定性検査法もこの通知のものが、引き続き平成22年3月31日まで使用できる旨記載されている。このため、本年度も昨年度と同様に、平成18年3月の通知（食安発第0324001号）に基づく測定法に従って特定原材料タンパク質を測定し、調製試料の評価を行った。

一昨年までの検討で、卵および牛乳を含む試料の調製についてはELISA法によ

る定量、ウエスタンブロット法による確認試験の双方に対応可能な試料が試作レベルではあるが調製できた。昨年度は特定原材料のうち小麦、そば、落花生について精度管理試料の調製を試みた。しかし、小麦は小麦一次標準粉末が入手できず、代替品を検討したが、キット間の回収率の差が大きく、適当なものが見つからなかった。また、そば、落花生においては粉末を添加した試料の測定に、日本ハムのキットを用いた場合、保存期間が長くなるほど回収率が高くなる傾向が認められたほか、標準品規格による抽出液のタンパク質量が、ケルダール法から計算したタンパク質量と比べて低く測定され、標準品規格による抽出ではタンパク質が100%抽出されていない可能性も認められるなど、小麦、そば、落花生粉末を添加した精度管理試料の調製には問題点が残っている。

本年度は小麦、そば、落花生粉末を添加した精度管理試料の調製法を引き続き検討すると共に、少規模での試料調製については検討済みの卵について、実際の配布を想定したスケールでの試料調製を試みた。

B. 研究方法

1. 特定原材料タンパク質の定量

特定原材料タンパク質の定量はELISA法により実施した。すなわち小麦タンパク質の測定にはモリナガFASPEK小麦測定キット（㈱森永生科学研究所）、FASTKIT エライザ Ver. II小麦（日本ハム㈱）、そばタンパク質の測定にはモリナガFASPEKそば測定キット（㈱森永生科学

研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II そば (日本ハム㈱)、落花生タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 落花生 測定キット (㈱森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生 (日本ハム㈱)、卵タンパク質の測定にはモリナガ FASPEK 卵測定キット (㈱森永生科学研究所)、FASTKIT エライザ Ver. II 卵 (日本ハム㈱) を使用し、平成 18 年 3 月の通知法に従って操作した。次いで 450nm/630nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (EL 808IV、Bio-Tek Instruments, Inc.) により測定し、4-パラメーターにより作成した検量線から試料中の特定原材料タンパク質の濃度を求めた。

2. 総タンパク質の定量

小麦粉末、そば粉末、落花生粉末を平成 18 年 6 月 (食安発第 0622003 号) の標準品規格に従って抽出した抽出液のタンパク質濃度は 2-D Quant Kit (GE ヘルスケアバイオサイエンス㈱) を用いて定量した。

3. ウェスタンブロットニングによる確認試験

抽出液の電気泳動はゲルに SDS-PAGE mini (テフコ㈱) を使用し、電気泳動槽 STC-808 (テフコ㈱) により行った。ブロットニングは転写膜に Hybond-P (GE ヘルスケアバイオサイエンス㈱) を使用し、トランスブロット SD セル (BIO-RAD) を用いて実施した。免疫染色には卵ウエスタンブロットキット (卵白アルブミン)、卵ウエスタンブロットキット (オボムコイド) (以上㈱森永生科学研究所)、VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit、Alkaline Phosphatase Substrate kit IV

(以上 VECTOR) を使用し、平成 18 年 3 月の通知法に従って実施した。

4. PCR 法による確認試験

小麦、そば、落花生添加食材からの DNA 抽出は通知法に記載の CTAB 法、シリカゲル膜タイプキット法 (DNeasy Plant Mini kit、QIAGEN)、イオン交換樹脂タイプのキット (Genomic-Tip 20/G、QIAGEN) のそれぞれで実施した。いずれの抽出においても遠心分離には himac CF 16RX (日立工機㈱)、恒温槽には DryThermoUnit DTU-2B (TAITEC)、吸光度測定には Gene Quant pro (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を使用した。定性 PCR は通知に従って植物検出用 (CP03-5'、CP03-3')、小麦検出用 (Wtr01-5'、Wtr10-3')、そば検出用 (FAG19-5'、FAG22-3')、落花生検出用 (agg04-5'、agg05-3') (以上いずれも北海道システムサイエンス) の各プライマー対および AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) により実施した。定性 PCR 増幅物の電気泳動は ultraPURE Agarose-1000 (Invitrogen)、50×TAE (遺伝子工学研究用、ニッポンジーン) により作製した 2% アガロースゲルを用い、泳動槽に Mupidα (ADVANCE) を使用して実施した。なお、エチジウムブロミド染色は前染色により実施し、サイズマーカーには 20bp DNA Ladder (TAKARA)、画像解析にはプリントグラフ (ATTO) を使用した。

5. 抽出および混合

小麦粉末、そば粉末、落花生粉末の標準品規格による抽出および特定原材料添加食材からのタンパク質の抽出には、振

とう機：RECIPRO SHAKER NR- I および Double Shaker R-30 mini (以上TAITEC) および遠心機：himac CF 16RX (日立工機(株))を使用した。

6. 添加に使用した特定原材料

小麦試料は神奈川県内の食品店で購入した小麦粉を使用した。そば試料は標準品規格に規定されているそばを製粉会社から購入し、通知に従って混合後、超遠心粉碎機 ZM200 (株)レッチェ) またはマイクロディスマンプレーター II (B. BRAUN) を用いて粉碎したものを使用した。また、落花生試料についても標準品規格に指定された千葉県産の落花生を農家より購入し、標準品規格に従って脱脂後、分析粉碎机 R-8 (日本理化学器械(株)) またはマイクロディスマンプレーターを用いて粉碎したものを使用した。卵試料は神奈川県内の食品店で購入した全卵を水で希釈して使用した。

7. 添加用基材

添加基材には原材料の欄に添加予定の特定原材料を使用した旨の表示が無い食材を選んで購入し、使用した。

8. 精度管理試料の調製

7. の添加用基材に 6. の特定原材料を直接加え、フードプロセッサー：MK-K58 (松下電器産業(株)) または BLIXER-5Plus (株)エフ・エム・アイ) で均一化して調製した。
(倫理面への配慮)

添加試料が食材であるため、誤って口に入ることが無いよう、試料の残余や廃棄物は速やかに焼却処分に付した。

C. D. 結果および考察

1. 粉碎方法とタンパク質抽出率の関連性の検討

昨年度、標準品規格による抽出液のタンパク質量が、ケルダール法から計算したタンパク質量と比べて低く測定されタンパク質が十分抽出されていない可能性を報告した。このため、小麦、そばについては昨年度使用した粉末をマイクロディスマンプレーター II でさらに細かく粉碎したもの、落花生試料については標準品規格の落花生粉を分析粉碎机 R-8 で粉碎したものおよびこれをマイクロディスマンプレーター II でさらに細かく粉碎したもののそれぞれを作製した。これらの粉末を標準品規格により抽出し、抽出液のタンパク質量をケルダール法のタンパク質量と比較した (表 1)。その結果、そばでは、1mm のスクリーンを使用して超遠心粉碎机で粉碎した粉末からのタンパク質の抽出率が 52.6% だったのに対し、マイクロディスマンプレーターにより粉碎した粉末では 90.9% と抽出率が大きく改善した。しかし、落花生、小麦では若干の改善に留まった。

2. そば試料作製の検討

粉碎方法の検討の結果、より細かく粉碎したそば粉末からのタンパク質の抽出率が高くなったのを受け、一次標準粉末をさらに粉碎したものを食材に添加し、回収率および安定性を検討した。すなわち標準品規格に従って調製した自家製そば一次標準粉末をさらに 0.2mm のスクリーンを使用して超遠心粉碎机で粉碎したものおよびこれをさらにマイクロディスマンプレーターで粉碎したものを 1% CMC 溶液に懸濁し、あずきあんおよびカボチ

ャペーストに加えてそば粉添加試料を作製した。そばの添加量はマイクロディスマンプレーターにより粉砕したそば粉末を標準品規格により抽出した抽出液のタンパク質量を基準とし、そばタンパク質として $6\mu\text{g/g}$ とした。そば添加試料のそばタンパク質を調製直後にモリナガ FASPEK そば 測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II そば で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた(表2)。その結果、モリナガ FASPEK そば 測定キットの回収率はマイクロディスマンプレーターで100%前後、0.2mmのスクリーンを使用して粉砕したもので約90%と、マイクロディスマンプレーターで粉砕したそば粉末の回収率が0.2mmのスクリーンよりも高かった。FASTKIT エライザ Ver. II そば でも回収率はかなり高めであったが、マイクロディスマンプレーターで粉砕したそば粉末のほうが0.2mmのスクリーンのものより回収率が高かった。調製試料は -20°C で保存し9、18週後にも保存前と同様に測定し、保存後の測定値を保存前の測定値で除して安定性を検討した。昨年度は、FASTKIT エライザ Ver. II そば では保存期間が長くなるほど回収率が高くなる傾向が認められ、試料の安定性に問題が残っていた。本年度の検討では安定性はいずれのキットでも100%前後で、細かく粉砕したそば粉末を使用したことにより、より安定性の高い試料が作製できたものと考えられた。

3. 落花生試料作製の検討

そばにおいては、より細かく粉砕した粉末を用いた場合、試料の安定性が改善

したのを受け、落花生についても一次標準粉末をさらに粉砕したものを食材に添加し、回収率および安定性を検討した。すなわち標準品規格に従って調製した自家製落花生一次標準粉末をさらにケミカル粉砕器で粉砕したものおよびマイクロディスマンプレーターで粉砕したものを1%CMCに懸濁後、あずきあん、カボチャペーストに加えて落花生添加試料を作製した。落花生の添加量はマイクロディスマンプレーターで粉砕した落花生粉末を標準品規格により抽出した抽出液のタンパク質量を基準とし、落花生タンパク質として $6\mu\text{g/g}$ とした。落花生添加試料の落花生タンパク質を調製直後にモリナガ FASPEK 落花生 測定キットおよび、ASTKIT エライザ Ver. II 落花生 で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた(表3)。その結果、モリナガ FASPEK 落花生 測定キット、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生 とも回収率はマイクロディスマンプレーターで粉砕した落花生粉末とケミカル粉砕器で粉砕した落花生粉末でほとんど差がなかった。調製試料は -20°C で保存し9、18週後にも保存前と同様に測定し、保存後の測定値を保存前の測定値で除して安定性を検討した。昨年度は、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生 では保存期間が長くなるほど回収率が高くなる傾向が認められたが、本年度はいずれのキットでも18週までおおむね90~110%の範囲に収まっており、落花生を細かく粉砕したことにより、より安定性の高い試料が作製できたものと考えられた。

4. 小麦試料作製の検討

4.1 小麦抽出液作製の検討

昨年度も報告したように、通知の標準品規格に指定された小麦粒を全種類入手することは事実上不可能なため、小麦一次標準粉末を使用して精度管理試料の調製を検討することはできなかった。小麦一次標準粉末に代わる抽出用および試料添加用の小麦を確保するため、引き続き入手可能な小麦粉について以下の検討を行った。なお、昨年度の電気泳動の結果から、検討対象は電気泳動像が小麦一次標準粉末と類似する全粒粉とした。2種の全粒粉について標準品規格による抽出液のタンパク質濃度を 2-D Quant Kit で測定した結果、Naturart 薄力粉が標準品規格 (4.0~6.0mg/mL) に適合し、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットと FASTKIT エライザ Ver. II 小麦 の測定値の差も小さかった (表 4)。このため Naturart 薄力粉を以下の検討に用いることとした。

4.2 食材への原材料添加による添加回収および安定性試験

Naturart 薄力粉を 1%CMC に懸濁後、ハンバーグまたはカボチャペーストに混合して小麦添加試料を作製した。小麦タンパク質の添加量は標準品規格による抽出液のタンパク質量を基準に $5\mu\text{g/g}$ とした。添加タンパク質量を基準にして求めた保存前の回収率はハンバーグ、カボチャペーストでそれぞれモリナガ FASPEK 小麦測定キットが 171.8%、167.6%、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦で 138.8%、153.6%と回収率は高いものの、昨年検討したハルユタカと比べキット間の測定値の乖離が少なくなった (表 5)。調製試料は -20°C で保存し、4 および 10 週間にも

保存前と同様に測定し、保存後の測定値を保存前の測定値で除して安定性を検討した。その結果安定性は、FASTKIT エライザ Ver. II 小麦 はいずれも 85%以上、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットでも 77%以上であった。

5. そば、落花生、小麦添加試料の定性検査法の検討

2. で調製したそば添加カボチャペーストおよびあずきあん、3. で調製した落花生添加カボチャペーストおよびあずきあん、4. で調製した小麦添加カボチャペーストおよびハンバーグ、さらに各基材 (ハンバーグ、カボチャペースト、あずきあん) について、PCR 法による特定原材料の検出の可否を検討した。DNA 抽出法は通知に記載の CTAB 法、シリカゲル膜タイプキット法 (DNeasy Plant Mini kit)、イオン交換樹脂タイプのキット (Genomic-Tip 20/G) のそれぞれとし、各試料につき 2 並行で実施した。表 6 に添加に用いた基材からの DNA 抽出結果を示した。DNA 収量は添加基材で比較した場合、ハンバーグ、カボチャペースト、あずきあんの順に、抽出法で比較した場合は Genomic-Tip 20/G、DNeasy Plant Mini kit、CTAB 法の順に多かった。あずきあんを基材とした試料は抽出される DNA 量が少なく、Genomic-Tip 20/G による抽出液のみ吸光度測定が可能であった。なお、吸光度測定が可能だった抽出液の OD260/OD280 の比はいずれも通知の基準 (1.2~2.5) の範囲内であったが、Genomic-Tip 20/G による各抽出液、DNeasy Plant Mini kit によるハンバーグの抽出液を除き、得られた DNA 濃度はいずれも $20\text{ng}/\mu\text{L}$ を下回

った。なお、データは示さなかったが、そば、落花生、小麦を添加した各試料の DNA 抽出結果はそれぞれの基材からの抽出結果と同様の傾向だった。得られた抽出液は $20\text{ng}/\mu\text{L}$ 以下のものはそのまま、 $20\text{ng}/\mu\text{L}$ を超えるものは $20\text{ng}/\mu\text{L}$ に希釈し、定性 PCR に供した。定性 PCR はそれぞれの抽出液につき、植物プライマーおよび添加した特定原材料検出用プライマーによる PCR を 1 抽出につき $n=2$ で実施した。基材のみから抽出した DNA 試料について植物プライマーによる PCR を実施した結果、ハンバーグの DNeasy Plant Mini kit による抽出液で予定長の増幅物が確認できないものがあったが、これ以外はすべて検出され、今回用いた基材には元々植物成分が含まれていることが分かった。なお確認のため実施した小麦、落花生、そばのプライマーを用いた PCR で予定長の増幅物が確認された基材はなかった(図 1-1)。小麦を添加した試料では、カボチャペーストの CTAB 法の抽出液で、植物、小麦プライマーとも増幅物を確認できないものもあったが、カボチャペーストの CTAB 法以外による抽出液、およびハンバーグの全抽出液で、植物、小麦プライマーによる予定長の増幅物を確認できた(図 1-2)。落花生を添加した試料では、あずきあんの CTAB 法による抽出液で、落花生プライマーによる増幅物を確認できなかったが、これ以外はあずきあん、かぼちゃペーストとも植物、落花生プライマーによる予定長の増幅物を確認できた(図 1-3)。そばを添加した試料では、カボチャペーストの DNeasy Plant Mini kit および CTAB 法による抽出液で、植物

プライマーまたはそばプライマーによる予定長の増幅物を確認できないもの、あずきあんの CTAB 法の抽出液で、植物プライマーによる予定長の増幅物を確認できないものがあった(図 1-4)。以上小麦、落花生、そばの各特定原材料を添加した試料について定性 PCR による確認試験を行った結果を表 7 にまとめて示した。PCR 結果を DNA 抽出法ごとに見た場合、いずれの試料も Genomic-Tip 20/G を用いた抽出液では添加した特定原材料、植物に由来する増幅物を 100% 確認できた。また DNeasy Plant Mini kit でもそばの植物プライマーの 1 つを除いて特定原材料、植物に由来する増幅物を確認できた。一方、CTAB 法では、小麦を添加したカボチャペースト、落花生を添加したあずきあんなどで、検出率が低かった。

5. 卵試料作製の検討

卵試料は過去に調製量 200g 程度の試作レベルで添加試料を作製し、回収率、安定性等の検討を実施した。しかし、精度管理の実施を想定した場合、配布量および参加機関数にもよるが、さらに多くの試料が必要なことは明らかである。このため本年は新たに混合用のミキサーとして BLIXER-5Plus を導入し、これを使用して約 3kg のスケールで試料を調製した。添加基材としてはカボチャペーストおよびハンバーグを用い、それぞれに全卵を水でうすめたものを加えて均一になるように混合し、試料を作製した。調製した試料を 10 個に分割し、それぞれから $n=2$ でサンプリングして得た抽出液の卵タンパク質をモリナガ FASPEK 卵測定キットおよび、FASTKIT エライザ Ver. II 卵で

測定した。両キットの測定結果についてそれぞれ、一元配置による分散分析を行った結果、カボチャペースト、ハンバーグのいずれも均一と判定された(表8)。またこの試料を-20℃で18週間保存後の測定結果を保存前の測定値と比較した結果を表9に示したが、良好な安定性を示した。さらに、18週間保存後の試料についてウエスタンブロットによる確認試験を実施した。図2-1には試料を通知通り卵ウエスタンブロットキット検体希釈液により抽出し卵白アルブミン、オボムコイド抗体により検出した結果を、図2-2には試料をELISAキットの検体抽出液により抽出し卵白アルブミン、オボムコイド抗体により検出した結果を示した。ELISAキットの検体抽出液では抽出液に含まれるBSAのバンドが余分に検出されているが、どちらの抽出法でも卵白アルブミン、オボムコイドのバンドを全抽出液について検出できた。以上の結果から、外部精度管理実施に向けて、均一かつ確認試験にも対応した試料を大量に作製することができたものとする。

E. 結論

1. そば試料作製の検討

自家製一次標準粉末をマイクロディスメンブレーターでさらに粉砕して標準品規格による抽出を行った結果、タンパク質の抽出量がケルダール法によるタンパク質量に近づいた。この粉末をあずきあんおよびカボチャペーストに添加し、ELISAキットでそばタンパク質を測定し、回収率および安定性を検討した。FASTKIT エライザ Ver. II そば では昨年と同様回

収率が添加量を上回ったが、昨年と比べ安定性が改善した。これらの試料についてPCR法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/GによるDNA抽出液では、全例でそばプライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

2. 落花生試料作製の検討

自家製一次標準粉末をマイクロディスメンブレーターでさらに粉砕して標準品規格による抽出を行った。そばとは異なり、さらに粉砕した粉末を使用しても、抽出液のタンパク質含量はケルダール法に比べて低かった。この粉末をあずきあんおよびカボチャペーストに添加し、ELISAキットで落花生タンパク質を測定し、回収率および安定性を検討した。作製時の回収率は昨年度と変わらなかったが、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生 で安定性がやや改善した。これらの試料についてPCR法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/GによるDNA抽出液では、全例で落花生プライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

3. 小麦試料作製の検討

小麦一次標準粉末の代替品を見つけるべく、新たに全粒粉2種について検討を行なった。これらの全粒粉の標準品規格による抽出液の2-D Quant Kitによるタンパク質量はELISA法によるタンパク質量とは差があったが、ELISAキット間の測定値の乖離はハルユタカに比べて小さかった。またこのうち1つを食材に添加したものでELISAキット間の測定値は類似していた。この小麦添加試料について

PCR 法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/G による DNA 抽出液では、全例で小麦プライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

4. 卵試料作製の検討

混合用のミキサーとして BLIXER-5Plus を導入し、これを使用して約 3kg のスケールで卵添加試料を調製した。調製した試料の均一性を一元配置による分散分析により検討した結果、調製した試料はいずれも測定キットにかかわらず、均一と判定された。これらの試料は -20℃で 18 週間保存後の ELISA 法の測定およびウェスタンブロットによる確認試験においても良好な結果を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

謝辞

本研究に対しご助言頂いた国立医薬品食品衛生研究所、代謝生化学部第 2 室長 亀山浩先生に深謝致します。

表1 粉碎方法とタンパク質抽出率の関連性の検討

試料	粉末の タンパク質量(%) ^a (A)	粉碎法	標準品規格による抽出液	
			タンパク質量(%) ^b (B)	抽出率 ^c (%)
そば	12.1	超遠心粉碎機 (1mmスクリーン)	6.36	52.6
		マイクロディス メンブレーター	11.0	90.9
落花生	45.3	ケミカル粉碎器	18.3	40.4
		マイクロディス メンブレーター	21.0	46.4
コムギ (農林61号・チクゴイズミ)	9.46	超遠心粉碎機 (1mmスクリーン)	7.40	78.2
		マイクロディス メンブレーター	8.18	86.5

a ケルダール法で測定

b 2-D Quantnt Kit の測定値から計算した粉末のタンパク質量

c (B)/(A)×100

表2 そば添加試料の添加回収および安定性試験

測定キット	粉砕法	添加基材	タンパク質				保存前				-20°C 9週間保存後				-20°C 18週間保存後			
			添加量 ^a (μg/g)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	安定性 ^c (%)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	安定性 ^c (%)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	安定性 ^c (%)
モリナガ	マイクロディス	CMC懸濁液	6	5.78	96.3	0.9	5.93	98.8	1.4	102.6	6.22	103.7	2.8	107.6	6.22	103.7	2.8	107.6
	メグレーター	あずきあん	6	6.22	103.7	2.5	6.08	101.3	1.9	97.7	6.42	107.0	5.1	103.2	6.42	107.0	5.1	103.2
	FASPEK	カボチャペースト	6	6.12	102.0	4.9	6.06	101.0	3.3	99.0	5.67	94.5	1.7	92.6	5.67	94.5	1.7	92.6
測定キット	そば	超遠心粉砕機 (0.2mmスクリーン)	6	5.36	89.3	0.0	5.41	90.2	0.3	100.9	5.70	95.0	3.4	106.3	5.70	95.0	3.4	106.3
	そば	あずきあん	6	5.42	90.3	5.6	5.58	93.0	8.4	103.0	5.26	87.7	6.3	97.0	5.26	87.7	6.3	97.0
	FASTKIT	マイクロディス	6	9.39	156.5	3.7	9.22	153.7	0.9	98.2	9.02	150.3	6.3	96.1	9.02	150.3	6.3	96.1
エライザ	メグレーター	あずきあん	6	11.62	193.7	0.9	12.47	207.8	1.3	107.3	12.97	216.2	1.0	111.6	12.97	216.2	1.0	111.6
	Ver. II	カボチャペースト	6	11.85	197.5	4.1	12.23	203.8	2.3	103.2	12.01	200.2	5.0	101.4	12.01	200.2	5.0	101.4
	そば	超遠心粉砕機 (0.2mmスクリーン)	6	8.67	144.5	3.6	8.48	141.3	3.6	97.8	8.35	139.2	4.6	96.3	8.35	139.2	4.6	96.3
測定キット	そば	あずきあん	6	10.48	174.7	6.1	10.73	178.8	9.2	102.4	11.50	191.7	5.5	109.7	11.50	191.7	5.5	109.7

a 標準品規格による抽出液の2-D Quant Kit による測定値から計算

b 測定値/タンパク質添加量 × 100

c 保存前の測定値/保存後の測定値 × 100

表3 落花生添加試料の添加回収および安定性試験

測定キット	粉碎法	添加基材	タンパク質				保存前				-20°C 9週間保存後				-20°C 18週間保存後			
			添加量 ^a (μg/g)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 ^c (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	安定性 ^c (%)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	安定性 ^c (%)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	安定性 ^c (%)
モリナガ	マイクロテイス	CMC懸濁液	6	5.97	99.5	0.8	6.07	101.2	1.7	5.46	91.0	1.7	91.5	5.46	91.0	1.7	91.5	
	メンブレーター	あずきあん	6	7.41	123.5	1.5	7.21	120.2	1.8	6.70	111.7	0.8	90.4	6.70	111.7	0.8	90.4	
	FASPEK	カボチャペースト	6	6.61	110.2	0.6	6.59	109.8	0.8	5.79	96.5	2.2	87.6	5.79	96.5	2.2	87.6	
落花生	ケミカル	CMC懸濁液	6	5.84	97.3	0.8	5.86	97.7	1.2	5.39	89.8	2.0	92.3	5.39	89.8	2.0	92.3	
	粉碎器	あずきあん	6	6.66	111.0	0.6	6.57	109.5	2.2	5.93	98.8	5.9	89.0	5.93	98.8	5.9	89.0	
	測定キット	あずきあん	6	6.66	111.0	0.6	6.57	109.5	2.2	5.93	98.8	5.9	89.0	5.93	98.8	5.9	89.0	
FASTKIT	マイクロテイス	CMC懸濁液	6	4.28	71.3	2.5	4.72	78.7	3.5	4.46	74.3	2.9	104.2	4.46	74.3	2.9	104.2	
	メンブレーター	あずきあん	6	7.76	129.3	1.8	8.44	140.7	7.5	6.97	116.2	3.9	89.8	6.97	116.2	3.9	89.8	
	エライザ	カボチャペースト	6	5.58	93.0	2.2	5.81	96.8	4.8	5.27	87.8	1.1	94.4	5.27	87.8	1.1	94.4	
落花生	Ver. II	ケミカル	6	4.28	71.3	2.2	4.69	78.2	0.5	4.25	70.8	3.1	99.3	4.25	70.8	3.1	99.3	
	粉碎器	あずきあん	6	6.79	113.2	3.3	7.51	125.2	1.6	6.16	102.7	4.4	90.7	6.16	102.7	4.4	90.7	
	測定キット	あずきあん	6	6.79	113.2	3.3	7.51	125.2	1.6	6.16	102.7	4.4	90.7	6.16	102.7	4.4	90.7	

a 標準品規格による抽出液の2-D Quant Kit による測定値から計算

b 測定値/タンパク質添加量 × 100

c 保存前の測定値/保存後の測定値 × 100

表4 標準品規格による小麦抽出液のタンパク質濃度

試料	タンパク質測定法				
	2-D Quant kit	モリナガFASPEK 小麦測定キット		FASTKITエライザ Ver. II 小麦	
	タンパク質濃度 (mg/mL)	タンパク質濃度 (mg/mL)	回収率 (%)	タンパク質濃度 (mg/mL)	回収率 (%)
Naturart強力粉	6.34	10.71	169.0	8.26	130.3
Naturart薄力粉	4.11	5.81	141.3	5.33	129.7

表5 小麦(Naturart薄力粉)添加試料の添加回収および安定性試験

測定キット	添加基材	タンパク質				保存前				-20℃ 4週間保存後				-20℃ 10週間保存後						
		添加量 ^a (μg/g)	測定値 (μg/g)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/g)	RSD (%)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/g)	RSD (%)	回収率 ^b (%)	RSD (%)	測定値 (μg/g)	RSD (%)	回収率 ^b (%)	安定性 ^c (%)			
モリナガFASPEK 小麦測定キット	CMC懸濁液	5	7.28	145.6	4.9	6.63	132.6	4.5	6.27	125.4	2.6	86.1	6.63	146.8	5.8	77.2	6.27	125.4	2.6	86.1
	ハンバーグ	5	8.59	171.8	2.3	7.34	146.8	5.8	6.63	132.6	4.5	86.1	7.34	146.8	5.8	77.2	6.63	132.6	4.0	77.2
	カホチャペースト	5	8.38	167.6	2.7	7.57	151.4	3.2	7.14	142.8	4.8	85.2	7.57	151.4	3.2	90.3	7.14	142.8	4.8	85.2
FASTKITエライザ Ver. II 小麦	CMC懸濁液	5	6.30	126.0	4.2	6.01	120.2	4.2	6.06	121.2	4.6	96.2	6.01	120.2	4.2	95.4	6.06	121.2	4.6	96.2
	ハンバーグ	5	6.94	138.8	3.8	6.77	135.4	4.6	6.11	122.2	0.8	88.0	6.77	135.4	4.6	97.6	6.11	122.2	0.8	88.0
	カホチャペースト	5	7.68	153.6	4.0	6.85	137.0	1.5	7.36	147.2	1.6	95.8	6.85	137.0	1.5	89.2	7.36	147.2	1.6	95.8

a 標準品規格による抽出液の2-D Quant Kit による測定値から計算

b 測定値/タンパク質添加量 × 100

c 保存前の測定値/保存後の測定値 × 100

表6 各抽出法による基材からのDNA抽出量

DNA 抽出法		添加基材					
		ハンバーグ		カボチャペースト		あずきあん	
		DNA収量 (ng/ μ L)	OD260/OD280	DNA収量 (ng/ μ L)	OD260/OD280	DNA収量 (ng/ μ L)	OD260/OD280
DNeasy	抽出 1	142	1.72	10.5	1.91	ND	-
Plant Mini kit	抽出 2	135	1.73	15.5	1.94	ND	-
Genomic-Tip 20/G	抽出 1	1000	1.79	135	1.76	46.5	1.75
	抽出 2	1030	1.78	125	1.77	49.5	1.77
CTAB法	抽出 1	9.5	1.90	10.5	2.33	ND	-
	抽出 2	10.5	1.91	11.0	2.44	ND	-

ND 10倍希釈液の吸光度が 0.01 以下

表7 定性PCR法による確認試験結果まとめ

添加した 特定原材料	添加基材											
	ハンバーグ				カボチャペースト				あずきあん			
	DNeasy Plant Mini kit	Genomic -Tip 20/G	CTAB法	DNeasy Plant Mini kit	Genomic -Tip 20/G	CTAB法	DNeasy Plant Mini kit	Genomic -Tip 20/G	CTAB法	DNeasy Plant Mini kit	Genomic -Tip 20/G	CTAB法
なし	植物	2/4 ^a	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	小麦	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	-	-	-
	落花生	-	-	-	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	そば	-	-	-	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
小麦	植物	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	-	-	-
	小麦	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	-	-	-
落花生	植物	-	-	-	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	落花生	-	-	-	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4
そば	植物	-	-	-	3/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	2/4
	そば	-	-	-	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4

- 試料なし
a 検出数/PCR実施数

表8 卵添加試料の均一性試験

測定キット	添加基材	分注数	1容器からの		測定値		一元配置による分散分析		
			サンプル数	リング数	平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	分散比	F境界値	判定
モリナガFASPEK 卵測定キット	ハンバーグ	10	2	2	9.05	5.6	0.258	3.02	均一
	カボチャペースト	10	2	2	9.01	3.0	0.463	3.02	均一
FASTKITエライザ Ver. II 卵	ハンバーグ	10	2	2	7.65	6.2	0.722	3.02	均一
	カボチャペースト	10	2	2	9.11	5.1	0.450	3.02	均一

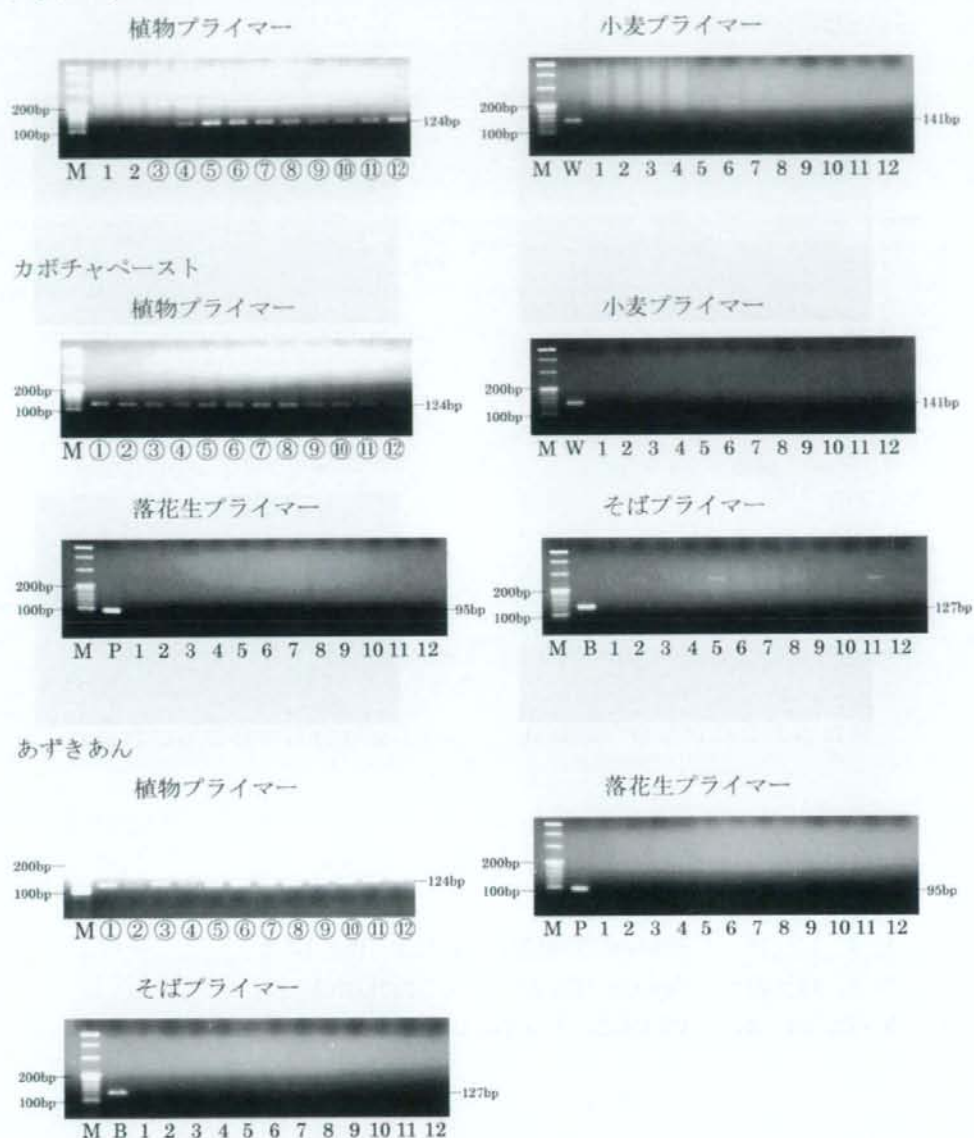
注) 添加に用いた卵液の2-D Quant Kit による測定は実施しなかった。

表9 卵添加試料の安定性試験

測定キット	添加基材	保存前(n=20)		-20°C 18週間保存後(n=10)		
		平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	測定値 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	安定性 ^a (%)
モリナガFASPEK 卵測定キット	ハンバーグ	9.05	5.6	9.20	5.2	101.7
	カホ'チャベ'ースト	9.01	3.0	9.01	4.1	100.0
FASTKITエライザ Ver. II 卵	ハンバーグ	7.65	6.2	8.08	3.4	105.6
	カホ'チャベ'ースト	9.11	5.1	8.79	4.4	96.5

a 保存前の測定値/保存後の測定値 × 100

図 1-1 添加基材の各プライマー対を用いた確認試験結果
ハンバーグ



番号を○で囲んだものは予定長のバンドが確認できたもの

W: 小麦陽性対照, P: 落花生陽性対照, B: そば陽性対照, M: 20bp DNA Ladder

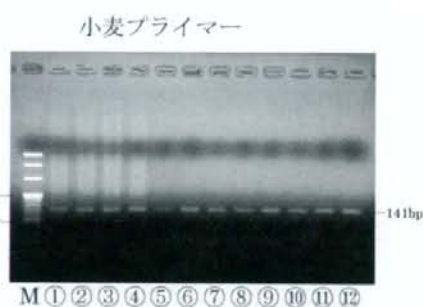
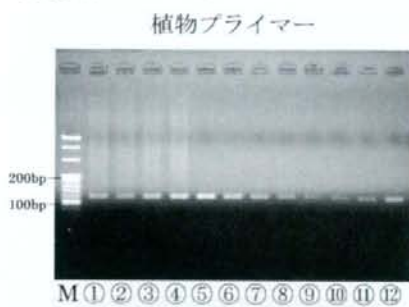
1~4: DNeasy Plant Mini kit による抽出 DNA

5~8: Genomic-Tip 20/G による抽出 DNA

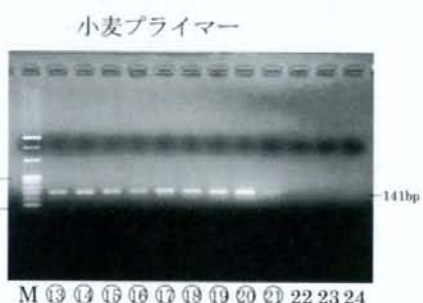
9~12: CTAB 法による抽出 DNA

図 1-2 小麦添加試料の確認試験結果

小麦添加ハンバーグ



小麦添加カボチャペースト



番号を○で囲んだものは予定長のバンドが確認できたもの

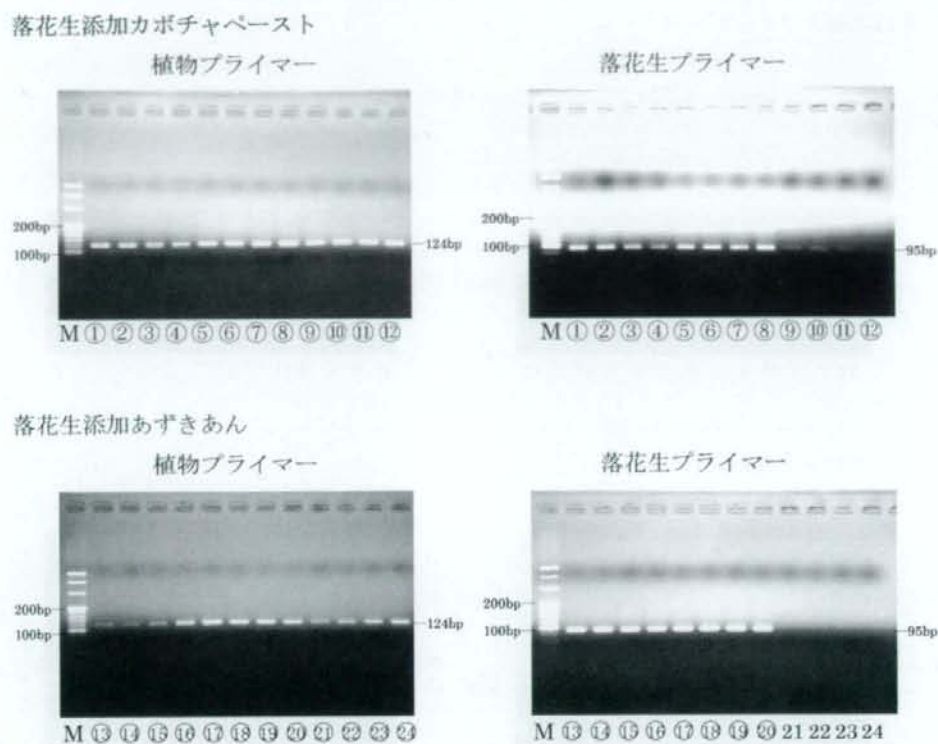
M : 20bp DNA Ladder

1~4, 13~16 : DNeasy Plant Mini kit による抽出 DNA

5~8, 17~20 : Genomic-Tip 20/G による抽出 DNA

9~12, 21~24 : CTAB 法による抽出 DNA

図 1-3 落花生添加試料の確認試験結果



番号を○で囲んだものは予定長のバンドが確認できたもの

M : 20bp DNA Ladder

1~4, 13~16 : DNeasy Plant Mini kit による抽出 DNA

5~8, 17~20 : Genomic Tip 20/G による抽出 DNA

9~12, 21~24 : CTAB 法による抽出 DNA