

## 第 16 章 動物由来 DNA

### 第 1 節 試料の採取、保管及び調製法

#### 1 試料の採取法

採取方法は、微生物試験用試料の採取法に準じ、対象試料以外の物質の汚染がないように慎重に採取する。

採取時は、プラスチック製手袋をつけ、滅菌済みスコップ等を使用し、滅菌済み採取袋に採取する。

#### 2 試料の保管法

試料は冷蔵保管する。なお、微粉碎した分析用試料を長期間（1 週間以上）保管する場合には、冷凍庫（-20 °C 以下）で保管する。

#### 3 分析用試料の調製法

肉骨粉、魚粉については、原則として粉碎しない。魚荒かす等で粒度の大きい骨片等が含まれる場合には、目開き 1 mm の網ふるいを通したものをを用いる。

配合飼料については、目開き 1 mm の網ふるいを追加するまで粉碎する。その際、試料間の相互汚染を防止するため、試料ごとに粉碎機を洗浄又は交換する。

### 第 2 節 各条

本節において bp (base pair) とあるのは、DNA の塩基対数を表す。

また超純水とは、水を更に電気伝導率 5.6  $\mu\text{S}/\text{m}$  以下（比抵抗 18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  以上）に精製したものとす。なお、滅菌する場合は高压蒸気滅菌（121 °C、15 min 以上）又は同等と認められる方法で処理する。

試薬及び器具類は、必要に応じて滅菌したものをを用いる。

#### 1 ほ乳動物由来 DNA

##### 1.1 ほ乳動物由来 DNA<sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

##### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液<sup>注2</sup> エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 18.6 g 及び水酸化ナトリウム 2 g を超純水 60 mL に溶かし、水酸化ナトリウム溶液（5 mol/L）で pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に超純水を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高压蒸気滅菌する。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 トリスヒドロキシメチルアミノメタン 12.1 g（12.05~12.14 g）に超純水 60 mL を加え、更に塩酸 4.2 mL を加えて溶かし、塩酸で pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に超純水を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高压蒸気滅菌する。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液<sup>注3</sup> 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1 mL 及びスクロース 8.55 g を滅菌した超純水に溶かして 100 mL とする。
- 4) TE 緩衝液<sup>注4</sup> 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1 mL 及び 0.5 mol/L EDTA 溶液 0.2 mL に超純水を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高压蒸気滅菌する。
- 5) Tris-acetate, EDTA (TAE) 緩衝液<sup>注5</sup> トリスヒドロキシメチルアミノメタン 4.84 g、酢酸 1.14 mL 及び 0.5 mol/L EDTA 溶液 2 mL を水に溶かして 1,000 mL と

する。

- 6) Tris-borate, EDTA (TBE) 緩衝液 トリスヒドロキシメチルアミノメタン 10.8 g、ホウ酸 5.5 g 及び 0.5 mol/L EDTA 溶液 4 mL を水に溶かして 1,000 mL とする。
- 7) アガロースゲル 電気泳動用アガロース 2.5~3.0 g に TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液 100 mL を加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、50~60 °C に冷却した後、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル形成型に流し込み、コームを差し込み、水平に静置する。十分にゲルが固化した後コームを抜く。
- 8) 電気泳動用色素溶液<sup>注6</sup> DNA 分子量マーカー<sup>注7</sup> に添付されているもの又は以下により調製したものをを用いる。  
ブロモフェノールブルー 25 mg、キシレンシアノール FF 25 mg 及びグリセリン 3 g を水に溶かして 10 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。
- 9) ゲル染色液<sup>注8</sup> 臭化エチジウム 10 mg を滅菌した水 1,000 µL に溶かして臭化エチジウム原液を調製し、使用時にこの原液 50 µL に TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液 1,000 mL を加えてゲル染色液とする。
- 10) 陽性対照 市販の牛ミトコンドリア DNA<sup>注9</sup> 又は以下により調製したものをを用いる。  
ウシ（品種：黒毛和種）のミトコンドリア DNA を抽出<sup>注10</sup> し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg を含有する陽性対照を調製する。
- 11) プライマー溶液 ほ乳動物検出用プライマー対<sup>注11</sup> をそれぞれ滅菌した超純水に加えて、2 µmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。
- 12) PCR 反応液 滅菌した超純水 4.7 µL、10×PCR 緩衝液<sup>注12</sup> 2.0 µL、2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液<sup>注13</sup> 2.0 µL、25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液<sup>注14</sup> 1.2 µL、2 µmol/L 5'プライマー溶液 4.0 µL、2 µmol/L 3'プライマー溶液 4.0 µL 及び DNA ポリメラーゼ液<sup>注15</sup> 0.1 µL (0.5 単位相当量) を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とする。これらの試薬について、必要本数分の量をそれぞれマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に加えて PCR 反応液を調製する。

## B 検 出<sup>注16</sup>

DNA の抽出 分析試料 100 mg (100.0~104.4 mg) を量って 2 mL のプラスチック製ねじ口チューブに入れ、二酸化ジルコニウム製ビーズ<sup>注17</sup> (直径 1.5 mm) 1.5 g (1.45~1.54 g) を加え、更にホモジナイズ用緩衝液 1 mL を加えた後、チューブを細胞破砕機<sup>注18</sup> に入れ、2,000 rpm で 1 分間処理した後 1 分間静置する。これを再度 2,000 rpm で 1 分間処理し、氷冷後、4 °C、1,000×g で 2 分間遠心分離する。この上澄み液からミトコンドリア DNA を抽出<sup>注10</sup> し、減圧乾燥した後、TE 緩衝液 20 µL を加えて溶かし、この液の一部を滅菌した超純水で正確に 10 倍に希釈して DNA 試料液を調製する。

PCR 反応液 18 µL を PCR チューブ（容量 200 µL）に入れ、DNA 試料液 2.0 µL を加えて振り混ぜ、PCR 反応に供する試料溶液とする。

同時に、陽性対照 2.0 µL 及び滅菌した超純水 2.0 µL をあらかじめ PCR 反応液 18 µL を入れたそれぞれ別の PCR チューブに加えて同様に操作し、陽性対照液及び陰性対照液を調製する。

**PCR 反応** 試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ、PCR 反応を行う。

PCR 反応条件 例

DNA 増幅装置：Gene Amp System 9700（Applied Biosystems 製）

プライマー：ほ乳動物検出用プライマー対 [anicon5, anicon3]（増幅産物サイズ 176 bp）

反応温度条件：95 °C（9 min 保持）→ [92 °C（30 s 保持）→55 °C（30 s 保持）→72 °C（30 s 保持）]（45 サイクル）→72 °C（5 min 保持）

温度制御条件：9600 モード

**電気泳動** TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行う。PCR 反応の終了した試料溶液、陽性対照液、陰性対照液及び DNA 分子量マーカー<sup>注7</sup>各 5 µL に電気泳動用色素溶液 1 µL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でプロモフェノールブルーがウェルから 3~4 cm 移動するまで電気泳動を行う。

電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、DNA と結合した臭化エチジウムを励起する波長（例：302 nm、312 nm、365 nm 等）の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の有無を確認する。

**判定** 陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性の疑い有りとして判定し、第 4 節 1 により制限酵素による増幅産物確認法を行う。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。

また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。

同様に、試料が家畜由来副産物の場合には第 3 節 2 による鶏由来 DNA の検出を、試料が魚粉等（魚類を含むもの）又は魚粉を含む飼料の場合には第 3 節 3 による魚類由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。

**注 1** 本法は、ほ乳動物由来 DNA を検出する方法であり、本法による試験を法令上ほ乳動物由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行う場合、当該飼料への使用が認められているほ乳動物由来飼料原料である乳、乳製品、ゼラチン及びコラーゲンが含まれている場合には陽性反応を示すことがある。従って、本法により試験を行うに当たっては留意すること（付記

参照)。

- 2 0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0) (ニッポンジーン製) 又はこれと同等のものを用いてもよい。
- 3 注 10 のミトコンドリア DNA 抽出キットに付属のものを用いてもよい。
- 4 TE (pH8.0) (ニッポンジーン製) 又はこれと同等のものを用いてもよい。
- 5 50×TAE (ニッポンジーン製) を希釈したもの又はこれと同等のものを用いてもよい。
- 6 6×Loading Buffer (タカラバイオ製) 又はこれと同等のものを用いてもよい。
- 7 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ製) 又はこれと同等のもの
- 8 EtBr Dropper Bottle (Apex 製) を臭化エチジウム濃度が 0.5 µg/mL になるように希釈したもの又はこれと同等のものを用いてもよい。
- 9 牛ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) 又はこれと同等のもの
- 10 市販のミトコンドリア DNA 抽出キット (mtDNA エキストラクターCT キット (富士フィルム和光純薬製)) を用いた方法又はこれと同等の結果が得られる方法による。
- 11 ほ乳動物検出用プライマー対 [anicon5, anicon3] (BEX 製) 又はこれと同等の結果が得られるもの
- 12 10×PCR Gold buffer (Applied Biosystems 製) 又はこれらと同等のもの
- 13 dNTP Mix (Applied Biosystems 製) 又はこれと同等のもの
- 14 MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems 製) 又はこれと同等のもの
- 15 Ampli Taq Gold (Applied Biosystems 製) 又はこれと同等のもの
- 16 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。
- 17 YTZ ボール (ニッカトー製) 又はこれと同等のもの
- 18 2,000 rpm 程度の回転数があり、2 mL チューブに対応するもの

(付記) 法令上飼料への使用が認められている、脱脂粉乳、乾燥ホエー等の乳製品、全卵粉、卵白粉末等の卵製品並びにゼラチン及びコラーゲンが 10 %以下の量で配合されている飼料並びにこれらの混入の可能性がある飼料について、これらの影響を受けずに肉骨粉等の動物由来組織の混入の有無を検査する場合には、本項による処理を行う。

**比重分離** 分析試料 1.0 g (1.000~1.044 g) を量って、あらかじめ 2/3 の高さまでクロロホルムを入れた比重分離用漏斗に入れ、ガラス棒でかき混ぜた後、比重分離用漏斗の上端から 5 mm の高さまでクロロホルムを加えて 20 分間静置する。上澄み液を捨て、比重分離用漏斗の 2/3 の高さまでクロロホルムを加えてかき混ぜた後、比重分離用漏斗の上端から 5 mm の高さまでクロロホルムを加えて 10 分間静置する。上澄み液を捨て、同様に操作する。

**次亜塩素酸処理** 先の比重分離用漏斗内の上澄み液を捨て、残留物をろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ紙上の残留物を少量のエタノールで洗浄した後乾燥し、

スパーテルで 15 mL のプラスチック製遠心沈殿管に入れ、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 0.5 %）10 mL を加え、振り混ぜた後 10 分間静置する。

**酵素処理** 先の遠心沈殿管内の上澄み液を吸引除去し、残留物に水 10 mL を加えて振り混ぜた後 5 分間静置する。上澄み液を吸引除去し、同様に操作した後、上澄み液を吸引除去し、残留物にたん白質分解酵素液 10 mL を加え、37 °C で 18~48 時間静置する。これを 3,500×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を吸引除去する。残留物に水 10 mL を加えて混合し、3,500×g で 10 分間遠心分離した後、上澄み液を吸引除去し、残留物全量を DNA の抽出に供する。

**たん白質分解酵素液** たん白質分解酵素（Proteinase K（Sigma-Aldrich 製、製品番号 P6556、酵素活性 41 単位/mg）又はこれと同等のもの）100 mg（99.5~100.4 mg）を 0.5 mol/L EDTA 溶液 8 mL に溶かした液を調製し、使用に際して、この液 1 mL を 0.5 mol/L EDTA 溶液 49 mL に加えてたん白質分解酵素液を調製する。

（参考）検出下限及び特異性（ほ乳動物検出用プライマー対 [anicon5, anicon3] を使用した場合）

・検出下限

配合飼料中のほ乳動物由来 DNA：肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）

検出下限は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。

・特異性

検出することを確認済みの生物種：ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、シカ、ウサギ、クジラ

検出しないことを確認済みの生物種：ヒト、ニワトリ、ウズラ、スケトウダラ、サケ、マイワシ、カタクチイワシ、カニ、エビ、アサリ、植物

## 1.2 反すう動物由来 DNA<sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。
- 4) TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。
- 5) TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。
- 6) TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。
- 7) アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。
- 8) 電気泳動用色素溶液 1.1 の A の 8)による。
- 9) ゲル染色液 1.1 の A の 9)による。
- 10) 陽性対照 1.1 の A の 10)による。
- 11) プライマー溶液 反すう動物検出用プライマー対<sup>注2</sup>をそれぞれ滅菌した超純水を加えて、2 µmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。

12) PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。

### B 検 出<sup>注3</sup>

DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。

PCR 反応 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマー及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

プライマー：反すう動物検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] (増幅産物サイズ 201 bp)

反応温度条件：95 °C (9 min 保持) → [92 °C (30 s 保持) →55 °C (30 s 保持) →72 °C (30 s 保持)] (45 サイクル) →72 °C (5 min 保持)

電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。

判定 陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性の疑い有りとして判定し、第 4 節 2 により制限酵素による増幅産物確認法を行う。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。

また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。

同様に、試料が豚由来副産物の場合には第 3 節 2 による豚由来 DNA の検出を、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 3 による鶏由来 DNA の検出を、試料が魚粉等 (魚類を含むもの) 又は魚粉を含む飼料の場合には第 3 節 4 による魚類由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。

注 1 本法は、反すう動物由来 DNA を検出する方法であり、本法による試験を法令上ほ乳動物由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行う場合、当該飼料への使用が認められている反すう動物由来飼料原料である乳、乳製品、ゼラチン及びコラーゲンが含まれている場合には陽性となる可能性がある。従って、本法により試験を行うに当たっては留意すること (1.1 の付記参照)。

2 反すう動物検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] (BEX 製) 又はこれと同等の結果が得られるもの

3 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

(参考) 検出下限及び特異性 (反すう動物検出用プライマー対 [rumicon5D2, rumicon3D5] を使用した場合)

・ 検出下限

配合飼料中の反すう動物由来 DNA：肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）

検出下限は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。

・ 特異性

検出することを確認済みの生物種：ウシ、ヒツジ、ヤギ、シカ

検出しないことを確認済みの生物種：ブタ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、クジラ、ニワトリ、ウズラ、アイガモ、スケトウダラ、サケ、マイワシ、カタクチイワシ、カレイ、アジ、サバ、サンマ、ニジマス、カツオ、キハダマダロ、カニ、エビ、イカ、アサリ、植物

### 1.3 牛由来 DNA <sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

#### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。
- 4) TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。
- 5) TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。
- 6) TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。
- 7) アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。
- 8) 電気泳動用色素溶液 1.1 の A の 8)による。
- 9) ゲル染色液 1.1 の A の 9)による。
- 10) 陽性対照 1.1 の A の 10)による。
- 11) プライマー溶液 牛検出用プライマー対<sup>注2</sup>をそれぞれ滅菌した超純水に加えて、2 μmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。
- 12) PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。

#### B 検 出<sup>注3</sup>

DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。

PCR 反応 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマー及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

プライマー：牛検出用プライマー対 [cow52, cow31]（増幅産物サイズ 126 bp）

反応温度条件：95 °C（9 min 保持）→ [92 °C（30 s 保持）→55 °C（30 s 保持）→72 °C（30 s 保持）]（45 サイクル）→72 °C（5 min 保持）

電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。

判定 1.2 の B の判定の項による。ただし、陽性の疑いがある場合は、第 4 節 3 により制限酵素による増幅産物確認法を行うように読み替えるものとする。

注 1 本法は、牛由来 DNA を検出する方法であり、本法による試験を法令上ほ

乳動物由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行う場合、当該飼料への使用が認められている牛由来飼料原料である乳、乳製品、ゼラチン及びコラーゲンが含まれている場合には陽性となることがある。従って、本法により試験を行うに当たっては留意すること（1.1の付記参照）。

2 牛検出用プライマー対 [cow52, cow31]（BEX 製）又はこれと同等の結果が得られるもの

3 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

(参考) 検出下限及び特異性（牛検出用プライマー対 [cow52, cow31] を使用した場合）

・検出下限

配合飼料中の牛由来 DNA：肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）

検出下限は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。

・特異性

検出することを確認済みの生物種：ウシ

検出しないことを確認済みの生物種：ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、シカ、ウサギ、ヒト、クジラ、ニワトリ、スケトウダラ、サケ、マイワシ、カタクチイワシ、カニ、エビ、アサリ、植物

#### 1.4 豚由来 DNA<sup>注1</sup>

(適用範囲：油脂を除く飼料)

##### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。
- 4) TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。
- 5) TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。
- 6) TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。
- 7) アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。
- 8) 電気泳動用色素溶液 1.1 の A の 8)による。
- 9) ゲル染色液 1.1 の A の 9)による。
- 10) 陽性対照 市販の豚ミトコンドリア DNA<sup>注2</sup>又は以下により調製したものを  
用いる。  
豚のミトコンドリア DNA を抽出<sup>注3</sup>し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg を含有する陽性対照を調製する。
- 11) プライマー溶液 豚検出用プライマー対<sup>注4</sup>をそれぞれ滅菌した超純水に加えて、2 µmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。
- 12) PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。



## B 検 出<sup>注5</sup>

DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。

PCR 反応 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマー及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

プライマー：豚検出用プライマー対 [pig5-6, pig3-6] (増幅産物サイズ 83 bp)

反応温度条件：95 °C (9 min 保持) → [92 °C (30 s 保持) → 55 °C (30 s 保持) → 72 °C (30 s 保持)] (45 サイクル) → 72 °C (5 min 保持)

電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。

判定 陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性と判断する。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。

また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。

同様に、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 2 による鶏由来 DNA の検出を、試料が魚粉等（魚類を含むもの）又は魚粉を含む飼料の場合には第 3 節 3 による魚類由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。

注 1 本法は、豚由来 DNA を検出する方法であり、本法による試験を法令上ほ乳動物由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行う場合、当該飼料への使用が認められている豚由来飼料原料であるゼラチン及びコラーゲンが含まれている場合には陽性となることがある。従って、本法により試験を行うに当たっては留意すること。

2 豚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) 又はこれと同等のもの

3 市販のミトコンドリア DNA 抽出キット (mtDNA エキストラクターCT キット (富士フイルム和光純薬製)) を用いた方法又はこれと同等の結果が得られる方法による。

4 豚検出用プライマー対 [pig5-3, pig32-2] (BEX 製)、豚検出用プライマー対 [pig5-6, pig3-6] (BEX 製) 又はこれらと同等の結果が得られるもの

5 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

(参考) 検出下限及び特異性 (豚検出用プライマー対 [pig5-6, pig3-6] を使用した場合)

・ 検出下限

配合飼料中の豚由来 DNA：豚肉骨粉として 0.1~0.01 %（原物含量%）

検出下限は、原料動物の混入比率、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。

・ 特異性

検出することを確認済みの生物種：ブタ

検出しないことを確認済みの生物種：ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、シカ、ウサギ、マウス、ラット、ヒト、クジラ、ニワトリ、ウズラ、アイガモ、スケトウダラ、サケ、マイワシ、カタクチイワシ、アジ、キハダマグロ、カツオ、サンマ、カレイ、ニジマス、カニ、エビ、イカ、アサリ、植物

## 1.5 鹿由来 DNA

（適用範囲：動物質性飼料（魚介類に由来するものを除く。））

### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。
- 4) TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。
- 5) TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。
- 6) TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。
- 7) アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。
- 8) 電気泳動用色素溶液 1.1 の A の 8)による。
- 9) ゲル染色液 1.1 の A の 9)による。
- 10) 陽性対照 鹿（品種：ホンシュウジカ又はエゾシカ）のミトコンドリア DNA を抽出<sup>注1</sup>し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg を含有する陽性対照を調製する。
- 11) プライマー溶液 鹿検出用プライマー対<sup>注2</sup>をそれぞれ滅菌した超純水に加えて、2 µmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。
- 12) PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。

### B 検出<sup>注3</sup>

DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。

PCR 反応 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマー及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

プライマー：鹿検出用プライマー対 [deer54, deer33]（増幅産物サイズ 133 bp）

反応温度条件：95 °C（9 min 保持）→ [92 °C（30 s 保持）→55 °C（30 s 保持）→72 °C（30 s 保持）]（45 サイクル）→72 °C（5 min 保持）

電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。

判定 陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で

PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性と判断する。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。

また、試料が豚由来副産物の場合は、第 3 節 2 により豚由来 DNA の検出を行い、豚由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。

同様に、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 3 による鶏由来 DNA の検出を行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。

注 1 市販のミトコンドリア DNA 抽出キット (mtDNA エキストラクター CT キット (富士フイルム和光純薬製)) を用いた方法又はこれと同等の結果が得られる方法による。

2 鹿検出用プライマー対 [deer54, deer33] (北海道システム・サイエンス製) 又はこれと同等の結果が得られるもの

3 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

(参考) 検出下限及び特異性 (鹿検出用プライマー対 [deer54, deer33] を使用した場合)

・検出下限

原料混合肉骨粉中の鹿由来 DNA : 鹿肉粉として 0.05 % 程度 (原物含量%)

検出下限は、原料動物の混入比率、製造方法 (加熱処理条件) 及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。

・特異性

検出することを確認済みの生物種 : シカ

検出しないことを確認済みの生物種 : ウシ、ブタ、イノシシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、クマ、ヒト、クジラ、ニワトリ、ウズラ、アイガモ、サケ、カレイ、アジ、タラ、サバ、サンマ、ニジマス、カツオ、イワシ、マグロ、ケガニ、エビ、イカ、アサリ、トウモロコシ

## 2 家きん由来 DNA <sup>注1</sup>

(適用範囲 : 油脂を除く飼料)

### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。
- 4) TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。
- 5) TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。
- 6) TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。
- 7) アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。

- 8) 電気泳動用色素溶液 1.1 の A の 8)による。
- 9) ゲル染色液 1.1 の A の 9)による。
- 10) 陽性対照 市販の鶏ミトコンドリア DNA<sup>注2</sup>又は以下により調製したものを  
用いる。  
鶏のミトコンドリア DNA を抽出<sup>注3</sup>し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に  
DNA として 10 µg を含有する陽性対照を調製する。
- 11) プライマー溶液 鶏検出用プライマー対<sup>注4</sup>をそれぞれ滅菌した超純水に加え  
て、2 µmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。
- 12) PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。

## B 検 出<sup>注5</sup>

DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。

PCR 反応 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマ  
ー及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

プ ラ イ マ ー：鶏検出用プライマー対 [chick5-1, chick3-1] (増幅産物サイ  
ズ 133 bp)

反 応 温 度 条 件：95 °C (9 min 保持) → [92 °C (30 s 保持) →55 °C (30 s 保  
持) →72 °C (30 s 保持)] (45 サイクル) →72 °C (5 min  
保持)

電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。

判 定 陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で  
PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一  
サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性と判断する。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物  
が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR  
反応以降の再試験を行う。

また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節  
1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、  
DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。

同様に、試料が豚由来副産物の場合には第 3 節 2 による豚由来 DNA の検出を、  
試料が魚粉等 (魚類を含むもの) 又は魚粉を含む飼料の場合には第 3 節 4 による魚  
類由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認  
する。

注 1 本法は、家きん由来 DNA を検出する方法であり、本法による試験を法令上  
家きん由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行う場合、  
当該飼料への使用が認められている家きん由来飼料原料である卵及び卵製品が  
含まれている場合には陽性となることがある。従って、本法により試験を行う  
に当たっては留意すること (1.1 の付記参照)。

2 鶏ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) 又はこれと同等  
のもの

3 市販のミトコンドリア DNA 抽出キット (mtDNA エキストラクターCT キ

ット（富士フィルム和光純薬製）を用いた方法又はこれと同等の結果が得られる方法による。

4 鶏検出用プライマー対 [chick5-1, chick3-1]（BEX 製）又はこれと同等の結果が得られるもの

5 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

（参考）検出下限及び特異性（鶏検出用プライマー対 [chick5-1, chick3-1] を使用した場合）

・検出下限

配合飼料中の家きん由来 DNA：チキンミールとして 0.1~0.01 %（原物含量%）

検出下限は、製造方法（加熱処理条件）及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。

・特異性

検出することを確認済みの生物種：ニワトリ、ウズラ

検出しないことを確認済みの生物種：ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、シカ、ウサギ、ヒト、クジラ、アジ、マイワシ、カタクチイワシ、カツオ、サケ、サバ、サンマ、スケトウダラ、ニジマス、キハダマグロ、カニ、エビ、アサリ、植物

### 3 魚介類由来 DNA<sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

#### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。
- 4) TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。
- 5) TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。
- 6) TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。
- 7) アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。
- 8) 電気泳動用色素溶液 1.1 の A の 8)による。
- 9) ゲル染色液 1.1 の A の 9)による。
- 10) 陽性対照 市販の魚ミトコンドリア DNA<sup>注2</sup>又は以下により調製したものを用いる。

キハダマグロのミトコンドリア DNA を抽出<sup>注3</sup>し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg を含有する陽性対照を調製する。

- 11) プライマー溶液 魚類検出用プライマー対<sup>注4</sup>をそれぞれ滅菌した超純水に加えて、2 µmol/L の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。
- 12) PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。

#### B 検出<sup>注5</sup>

DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。

PCR 反応 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマ

一及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

プライマー：魚類検出用プライマー対 [FM5, FM3] (増幅産物サイズ 78 bp)

反応温度条件：95 °C (9 min 保持) → [92 °C (30 s 保持) → 55 °C (30 s 保持) → 72 °C (30 s 保持)] (45 サイクル) → 72 °C (5 min 保持)

電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。

判定 陽性対照液で検出サイズの PCR 増幅産物が検出され、陰性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性対照液と同一サイズの PCR 増幅産物が検出された場合を陽性と判断する。

陽性対照液で PCR 増幅産物が検出されない場合及び陰性対照液で PCR 増幅産物が検出された場合には、PCR 反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。

また、試料が植物性飼料又は植物性飼料を含む牛用配混合飼料の場合は、第 3 節 1 により植物由来 DNA の検出を行い、植物由来 DNA が検出されない場合には、DNA の抽出が正常に行われていない可能性があるため、再度 DNA の抽出を行う。

同様に、試料が豚由来副産物の場合には第 3 節 2 による豚由来 DNA の検出を、試料が家きん由来副産物の場合には第 3 節 3 による鶏由来 DNA の検出をそれぞれ行い、DNA の抽出が正常に行われていることを確認する。

注 1 本法は、魚類由来 DNA を検出する方法であり、本法による試験は法令上魚介類由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行うほか、魚粉中のほ乳動物又は家きん由来 DNA を検出する際に、DNA の抽出確認のための陽性対照試験として実施する。

2 魚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製) 又はこれと同等のもの

3 市販のミトコンドリア DNA 抽出キット (mtDNA エキストラクター CT キット (富士フイルム和光純薬製)) を用いた方法又はこれと同等の結果が得られる方法による。

4 魚類検出用プライマー対 [FM5, FM3] (BEX 製) 又はこれと同等の結果が得られるもの

5 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

(参考) 検出下限及び特異性 (魚類検出用プライマー対 [FM5, FM3] を使用した場合)

・検出下限

配合飼料中の魚類由来 DNA：魚粉として 0.01~0.001 % (原物含量%)

検出下限は、原料魚介類の混入比率、製造方法 (加熱処理条件) 及び骨成分の含有比率等により異なる場合がある。

・特異性

検出することを確認済みの生物種：カタクチイワシ、カツオ、サケマス類 (サケ、ギンザケ、ベニザケ、カラフトマス、サクラマス、ニジマス、マスノスケ)、サ

バ（ゴマサバ、タイセイヨウサバ、マサバ）、サンマ、スズキ（スズキ、タイリクスズキ）、タイ（キダイ、チダイ、マダイ）、タラ（スケトウダラ、マダラ）、マイワシ、マグロ（クロマグロ、キハダ、ビンナガ、ミナミマグロ、メバチ）  
検出しないことを確認済みの生物種：ウナギ、ナイルパーチ、カニ（アブラガニ、イバラガニモドキ、ケガニ、タラバガニ、ハナサキガニ）、エビ、アサリ、シジミ、ウニ（アメリカオオタキムラサキウニ、エゾバフンウニ、キタムラサキウニ、チリウニ、ホクヨウオオバフンウニ）、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、シカ、ウサギ、ヒト、クジラ、ニワトリ、植物

### 第3節 DNA抽出確認試験法

本節において bp (base pair) とあるのは、DNA の塩基対数を表す。

超純水とは、水を更に電気伝導率 5.6  $\mu\text{S}/\text{m}$  以下（比抵抗 18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  以上）に精製したものとする。なお、滅菌する場合は高圧蒸気滅菌（121  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min 以上）又は同等と認められる方法で処理する。

#### 1 植物由来 DNA<sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

##### A 試薬等の調製

- 1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 第2節 1.1 の A の 1)による。
- 2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 第2節 1.1 の A の 2)による。
- 3) ホモジナイズ用緩衝液 第2節 1.1 の A の 3)による。
- 4) TE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 4)による。
- 5) TAE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 5)による。
- 6) TBE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 6)による。
- 7) アガロースゲル 第2節 1.1 の A の 7)による。
- 8) 電気泳動用色素溶液 第2節 1.1 の A の 8)による。
- 9) ゲル染色液 第2節 1.1 の A の 9)による。
- 10) 陽性対照 市販のとうもろこしミトコンドリア DNA<sup>注2</sup>又は以下により調製したものをを用いる。

とうもろこしのミトコンドリア DNA を抽出<sup>注3</sup>し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10  $\mu\text{g}$  程度を含有する陽性対照を調製する。

- 11) プライマー溶液 植物検出用プライマー対<sup>注4</sup>をそれぞれ滅菌した超純水に加えて、2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  の 5'プライマー溶液及び 3'プライマー溶液を調製する。
- 12) PCR 反応液 第2節 1.1 の A の 12)による。

##### B 検出<sup>注5</sup>

DNA の抽出 第2節 1.1 の B の DNA の抽出の項による。

PCR 反応 第2節 1.1 の B の PCR 反応の項による。ただし、PCR 反応条件例のプライマー及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

プライマー：植物検出用プライマー対 [placon5, placon3]（増幅産物サイズ 140 bp）

反応温度条件：95 °C（9 min 保持）→ [92 °C（30 s 保持）→55 °C（30 s 保持）→72 °C（30 s 保持）]（45 サイクル）→72 °C（5 min 保持）

電気泳動 第2節 1.1 の B の電気泳動の項による。

判定 第2節 1.4 の B の判定の項による。

注 1 本法は、植物性飼料を原料とした牛用配混合飼料中のほ乳動物、家きん又は魚介類由来 DNA を検出する際に、DNA の抽出確認のための陽性対照試験として実施する。

2 とうもろこしミトコンドリア DNA ポジティブコントロール（BEX 製）又はこれと同等のもの

3 市販のミトコンドリア DNA 抽出キット（mtDNA エキストラクターCT キット（富士フイルム和光純薬製））を用いた方法又はこれと同等の結果が得られる方法による。

4 植物検出用プライマー対 [placon5, placon3]（BEX 製）又はこれと同等の結果が得られるもの

5 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

（参考）検出下限及び特異性（植物検出用プライマー対 [placon5, placon3] を使用した場合）

・検出下限

配合飼料中の植物由来 DNA：未確認

・特異性

検出することを確認済みの生物種：トウモロコシ、イネ、ダイズ、テンサイ、コムギ、オオムギ、ナタネ、イネ科牧草類

検出しないことを確認済みの生物種：ウシ、ブタ、ニワトリ、魚介類

## 2 豚由来 DNA

第2節 1.4 による。

## 3 鶏由来 DNA

第2節 2 による。

## 4 魚類由来 DNA

第2節 3 による。

## 第4節 増幅産物確認試験法

本節は、ほ乳動物、反すう動物及び牛を検出対象として行う各分析において、陽性を疑われるものが検出された際に行う確認試験法を規定している。

本節において bp（base pair）とあるのは、DNA の塩基対数を表す。

また超純水とは、水を更に電気伝導率 5.6  $\mu\text{S}/\text{m}$  以下（比抵抗 18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  以上）に精製



したものとする。なお、滅菌する場合は高圧蒸気滅菌（121 °C、15 min 以上）又は同等と認められる方法で処理する。

## 1 ほ乳動物由来 DNA<sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

### A 試薬等の調製

- 1) 制限酵素 *SmlI*<sup>注2</sup> 及び *MboI*<sup>注3</sup>
- 2) TAE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 5)による。
- 3) TBE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 6)による。
- 4) アガロースゲル 電気泳動用アガロース 5.0 g に TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液 100 mL を加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、50~60 °C に冷却した後、ゲルの厚さが 3~4 mm になるようゲル形成型に流し込み、コームを差し込み、水平に静置する。十分にゲルが固化した後コームを抜く。
- 5) 電気泳動用色素溶液 第2節 1.1 の A の 8)による。
- 6) ゲル染色液 第2節 1.1 の A の 9)による。
- 7) DNA 分子量マーカー 20 bp ラダー又は 50 bp ラダー等目的とする断片サイズを確認できるもの

### B 検 出<sup>注4</sup>

制限酵素反応 第2節 1.1 で陽性を疑われた PCR 反応の終了した試料溶液 9 µL を PCR チューブ（容量 200 µL）に入れ、制限酵素<sup>注5</sup> 1 µL を加えて穏やかに混合して制限酵素反応に供する試料溶液とする。同時に、PCR 反応の終了した陽性対照液 9 µL を入れた PCR チューブに制限酵素 1 µL を加えて穏やかに混合して、陽性対照反応液を調製する。

制限酵素：*SmlI*（消化断片サイズ ウシ、シカ、ヒツジ、ウマ、ブタ、マウス、ラット [142 bp、34 bp]、ヤギ：[139 bp、34 bp]、ウサギ [117 bp、59 bp]）

*MboI*（消化断片サイズ ウシ [148 bp、28 bp]）

反応温度条件：37 °C (*MboI*) 又は 55 °C (*SmlI*)（60~120 min 保持）

電気泳動 TAE 緩衝液又は TBE 緩衝液を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、100 V の定電圧で 10 分間予備泳動を行う。制限酵素反応の終了した試料溶液、陽性対照反応液、陽性対照液（制限酵素未処理の液）及び DNA 分子量マーカー各 5 µL に電気泳動用色素溶液 1 µL をそれぞれ加えて混合し、各液の全量を先のアガロースゲルのそれぞれ別のウェルに注入し、100 V の定電圧でブロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行う。

電気泳動の終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、DNA と結合した臭化エチジウムを励起する波長（例：302 nm、312 nm、365 nm 等）の紫外線を照射し、PCR 増幅産物の制限酵素による消化パターンを確認する。

判定 陽性対照反応液で制限酵素により消化されたサイズの断片が検出され、陽性対照液（制限酵素未処理）で未消化の増幅産物が検出された場合で、かつ、試料溶液において陽性対照反応液と同一サイズの断片が検出された場合を陽性と

判定する。

陽性対照反応液で制限酵素により消化されていない場合及び陽性対照液（制限酵素未処理）で制限酵素による消化断片が検出された場合には、制限酵素反応が正常に行われていない可能性があるため、PCR 反応以降の再試験を行う。

注 1 本法は、飼料中のほ乳動物由来 DNA を検出する際に、PCR 反応にて陽性の疑いのある増幅産物が認められた場合の確認試験として実施する。

2 *SmlI*（New England Biolabs 製）又はこれと同等の結果が得られるもの

3 *MboI*（タカラバイオ製）又はこれと同等の結果が得られるもの

4 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

5 制限酵素は、非常に熱に弱いので使用する直前まで冷凍庫に入れておく。

## 2 反すう動物由来 DNA<sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

### A 試薬等の調製

1) 制限酵素 *BlnI*<sup>注2</sup>

2) TAE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 5)による。

3) TBE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 6)による。

4) アガロースゲル 1 の A の 4)による

5) 電気泳動用色素溶液 第2節 1.1 の A の 8)による。

6) ゲル染色液 第2節 1.1 の A の 9)による。

7) DNA 分子量マーカー 1 の A の 7)による。

### B 検 出<sup>注3</sup>

制限酵素反応 1 の B の制限酵素反応の項による。ただし、試料溶液は第2節 1.2 で陽性を疑われた試料溶液と読み替え、制限酵素及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

制限酵素：*BlnI*（消化断片サイズ ウシ：[116 bp、85 bp]）

反応温度条件：37 °C（60~120 min 保持）

電気泳動 1 の B の電気泳動の項による。

判 定 1 の B の判定の項による。

注 1 本法は、飼料中の反すう動物由来 DNA を検出する際に、PCR 反応にて陽性の疑いのある増幅産物が認められた場合の確認試験として実施する。

2 *BlnI*（タカラバイオ製）又はこれと同等の結果が得られるもの

3 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

## 3 牛由来 DNA<sup>注1</sup>

（適用範囲：油脂を除く飼料）

### A 試薬等の調製

1) 制限酵素 *Hpy188III*<sup>注2</sup>

- 2) TAE 緩衝液 第 2 節 1.1 の A の 5)による。
- 3) TBE 緩衝液 第 2 節 1.1 の A の 6)による。
- 4) アガロースゲル 1 の A の 4)による
- 5) 電気泳動用色素溶液 第 2 節 1.1 の A の 8)による。
- 6) ゲル染色液 第 2 節 1.1 の A の 9)による。
- 7) DNA 分子量マーカー 1 の A の 7)による。

#### B 検 出<sup>注3</sup>

制限酵素反応 1 の B の制限酵素反応の項による。ただし、試料溶液は第 2 節 1.3 で陽性を疑われた試料溶液と読み替え、制限酵素及び反応温度条件を次のとおり読み替えるものとする。

制限酵素：*Hpy*188III（消化断片サイズ ウシ： [58 bp、47 bp、21 bp] ）

反応温度条件：37 °C（60~120 min 保持）

電気泳動 1 の B の電気泳動の項による。

判定 1 の B の判定の項による。

注 1 本法は、飼料中の牛由来 DNA を検出する際に、PCR 反応にて陽性の疑いのある増幅産物が認められた場合の確認試験として実施する。

2 *Hpy*188III（New England Biolabs 製）又はこれと同等の結果が得られるもの

3 試薬等及び器具類は必要に応じ冷却する。また、試験操作は必要に応じ冷却条件下で行うとともに、汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。

## 第 17 章 動物由来たん白質

### 第 1 節 試料の採取、保管及び調製法

第 16 章第 1 節 1 から 3 までの規定による。

### 第 2 節 各条

#### 1 ほ乳動物由来たん白質

水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものをを用いる。

#### 1.1 牛由来たん白質

##### (1) ELISA による方法 (その 1) <sup>注 1</sup>

(適用範囲：動物質性飼料)

#### A 試薬等の調製

- 1) 洗浄液 洗浄液 (10 倍濃縮液) <sup>注 2</sup> 100 mL に水を加えて 1,000 mL とする。
- 2) 基質 ABTS <sup>注 3</sup> 液 基質 ABTS 濃縮溶液 <sup>注 2</sup> 0.5 mL をペルオキシドクエン酸緩衝液 <sup>注 2</sup> 12 mL に混合したもの (調製は使用直前に行う。)

#### B 検 出

抽 出 分析試料 5.0 g (5.00~5.04 g) を量って 50 mL の遠心チューブに入れ、塩化ナトリウム溶液 (0.9 w/v%) 15 mL を加え、15 分間振り混ぜて抽出した後、1,000×g で 5 分間遠心分離する。上澄み液 1.5 mL をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) に入れ、5,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を ELISA 操作に供する試料溶液とする。

なお、本分析においては、分析試料ごとに併行分析を行う。

ELISA 操作 試料溶液、陽性対照液 <sup>注 4</sup>、陰性対照液 <sup>注 5</sup> 及び塩化ナトリウム溶液 (0.9 w/v%) 各 100  $\mu$ L を、抗体固相化モジュール <sup>注 2</sup> のそれぞれ別のウェル <sup>注 6</sup> に入れ、シーリングフィルム <sup>注 7</sup> でウェルを覆った後、室温で 1 時間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300  $\mu$ L を加えて 3 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルにビオチン化抗体液 <sup>注 2</sup> 25  $\mu$ L ずつを加え、シーリングフィルムでウェルを覆った後、室温で 1 時間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300  $\mu$ L ずつを加えて 3 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルにアビジン酵素複合体液 <sup>注 2</sup> 25  $\mu$ L ずつを加え、シーリングフィルムでウェルを覆った後、室温で 30 分間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300  $\mu$ L ずつを加えて 6 回繰り返し洗浄する。

各ウェルに基質 ABTS 液 50  $\mu$ L ずつを加え、遮光し室温で 30 分間静置する。更に各ウェルに反応停止液 <sup>注 2</sup> 50  $\mu$ L ずつを加え、発色を止める。15 分以内に各ウェルの 405 nm 及び 492 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、各ウェルの 405 nm の吸光度値から 492 nm の吸光度値を差し引いた値を測定値とする。

判 定 試料溶液の測定値の平均値が陽性判定基準値 <sup>注 8</sup> 以上であった場合を陽性と判定し、陽性判定基準値未満であった場合を陰性と判定する。試験成立条件 <sup>注 9</sup> を満たしていない場合には、再試験を行う。

注 1 ELISA-TEK 加工肉種判別キット（牛）（ELISA Technologies 製）による方法又はこれと同等の結果が得られる方法。

- 2 キットに付属しているものを使用する。
- 3 2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）
- 4 キットに付属している牛陽性コントロール液を用いる。
- 5 キットに付属している豚及び羊の陽性コントロール液並びに同加工肉種判別キット（家きん）に付属している鶏陽性コントロール液の 3 種類を、本法の陰性対照液として用いる。
- 6 各液はそれぞれ 2 ウェル以上に入れ、それぞれの測定値の平均値により判定を行う。
- 7 抗体固相化モジュールの上面に貼り付け、ウェル内容液の蒸発、揮散を防ぐ。
- 8 判定の基準となる閾値を意味する。ここでは、陰性対照液の測定値の平均値に 2.5 を乗じた値を陽性判定基準値とする。
- 9 試験成立条件は次のとおり。
  - ・測定した陽性対照液の測定値の平均値が、陰性対照液の測定値の平均値の 8 倍以上であること。
  - ・各試験試料について併行分析した吸光度の標準偏差の値が、陽性対照液の測定値の平均値の 10 %未満であること。

(参考) 検出下限及び特異性

・検出下限

魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 1 %程度（原物含量%）

肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 1 %程度（原物含量%）

チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 1 %程度（原物含量%）

検出下限は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

・特異性

検出することを確認済みの動物種：ウシ

検出しないことを確認済みの動物種：ブタ、ニワトリ

(2) ELISA による方法（その 2）<sup>注1</sup>

（適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料。ただし、豚及び鶏に由来するたん白質並びにこれを原料とする飼料<sup>注2</sup>を除く。）

A 試薬等の調製

- 1) 抽出溶媒 抽出溶媒濃縮液-I<sup>注3</sup> 50 mL 及び抽出溶媒濃縮液-II<sup>注3</sup> 2.5 mL に水を加え 1,000 mL とする。
- 2) 洗浄液 洗浄液（20 倍濃縮液）<sup>注3</sup> 50 mL に水を加え 1,000 mL とする。
- 3) 標準液 標準原液<sup>注3</sup>の一部を抽出液で正確に希釈し、2 倍、4 倍、8 倍及び 16 倍希釈の標準液を調製する。

## B 検 出

抽出 分析試料 4.0 g (4.00~4.04 g) を量ってホモジナイザー<sup>注4</sup>専用カップに入れ、抽出溶媒 36 mL を加え、ホモジナイザー<sup>注4</sup>で 30 秒間ずつ 3 回かき混ぜる。これを沸騰水浴中で 10 分間加熱し、放冷後、800~1,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をろ紙 (5 種 A) でろ過する。このろ液 1 mL をマイクロチューブ (容量 1.5 mL) に入れ、3,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を ELISA 操作に供する試料溶液とする。

ELISA 操作 試料溶液、各標準液、陽性対照液<sup>注3</sup>、陰性対照液<sup>注3</sup> 及び抽出溶媒 (空試験溶液とする。) 各 100 µL を、抗体固相化モジュール<sup>注3</sup> のそれぞれ別のウェル<sup>注5</sup> に入れ、モジュール用ふた<sup>注3</sup> をして軽く振り混ぜた後、室温で 2 時間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 µL を加えて 6 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルに酵素標識抗体溶液<sup>注3</sup> 100 µL ずつを加え、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、室温で 30 分間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 µL ずつを加えて 6 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルに酵素基質溶液<sup>注3</sup> 100 µL ずつを加え、モジュール用ふたをして軽く振り混ぜた後、室温で 10 分間静置する。更に各ウェルに反応停止液<sup>注3</sup> 50 µL ずつを加え、酵素反応を停止させる。30 分以内に各ウェルの 450 nm 及び 620 nm<sup>注6</sup> における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度値から 620 nm の吸光度値を差し引いた値を測定値とする。

判定 試料溶液の測定値の平均値が陽性判定基準値<sup>注7</sup> 以上であった場合を陽性と判定し、陽性判定基準値未満であった場合を陰性と判定する。試験成立条件<sup>注8</sup> を満たしていない場合には、再試験を行う。

注 1 モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット (森永生科学研究所製 (販売終了)) による方法又はこれと同等の結果が得られる方法。

このキットによる試験を法令上は乳動物由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行う場合、当該飼料への使用が認められている牛由来飼料原料である乳及び乳製品、ゼラチン及びコラーゲンが含まれていれば陽性反応を示すことがある。従って、使用に当たっては留意すること。

2 本法による試験を豚に由来するたん白質 (肉骨粉、加水分解たん白、蒸製骨粉、血粉、血しょうたん白等) 及びこれらを原料とする飼料を対象に行うと、誤検出される恐れがあるため、適用除外としている。これらの飼料については、1.2 の方法により試験を行うこと。

3 キットに付属しているものを使用する。

4 ミルサー IFN-700G (岩谷産業製 (販売終了))、ラボミルサー LM-2 (大阪ケミカル製 (販売終了)) 又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。

5 各液はそれぞれ 2 ウェル以上に入れ、それぞれの測定値の平均値により

判定を行う。

- 6 波長 610~650 nm の範囲内の単波長であればよい。
- 7 陰性対照液の平均測定値に 2 を乗じた値を陽性判定基準値とする。
- 8 試験成立条件は次のとおり。
  - ・測定した陽性対照液の測定値の平均値が、標準原液の 8 倍希釈液の測定値の平均値以上であり、かつ標準原液の 2 倍希釈液の測定値の平均値以下であること。
  - ・測定した陰性対照液の測定値の平均値が 0.1 以下であり、かつ空試験溶液の測定値の 2 倍未満であること
  - ・各試験試料について併行分析した吸光度の変動係数の値が 20 %以下であること。

(参考) 検出下限及び特異性

・検出下限

配合飼料中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.1 %程度（原物含量%）

魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.1 %程度（原物含量%）

チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.1 %程度（原物含量%）

検出下限は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

・特異性

検出することを確認済みの動物種：ウシ

検出しないことを確認済みの動物種：ニワトリ

非特異反応により偽陽性を示すもの：オオムギ及びその加工品、ナタネ及びその加工品、麦芽、麦芽根、ビールかす

(3) ELISA による方法（その 3）<sup>注1</sup>

（適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料）

**A 試薬等の調製**

- 1) 抽出溶媒 抽出溶媒濃縮液 A 液<sup>注2</sup> 100 mL、抽出溶媒濃縮液 B 液<sup>注2</sup> 100 mL 及び抽出溶媒濃縮液 C 液<sup>注2</sup> 100 mL を混合し、水を加えて 1,000 mL とする。
- 2) 洗浄液 洗浄液（20 倍濃縮液）<sup>注2</sup> 50 mL に水を加えて 1,000 mL とする。
- 3) 検体希釈液 検体希釈液（10 倍濃縮液）<sup>注2</sup> 5 mL に水を加えて 50 mL とする。

**B 検 出**

抽 出 分析試料 1.0 g（1.00~1.04 g）を量って 50 mL のポリエチレン製チューブに入れ、抽出溶媒 19 mL を加え、ボルテックスミキサー<sup>注3</sup>で 30 秒間ずつ 3 回かき混ぜる。これを沸騰水浴中で 10 分間加熱し、放冷後、3,000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過する。このろ液 50 μL をマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に入れ、検体希釈液 950 μL を加え、ELISA 操作に供する試料溶液とする。

ELISA 操作 試料溶液、高濃度及び低濃度陽性対照液<sup>注4</sup>、動物由来及び植物由来陰性対照液<sup>注5</sup>及び検体希釈液（空試験溶液とする。）各 100 µL を、抗体固相化モジュール<sup>注2</sup>のそれぞれ別のウェル<sup>注6</sup>に入れ、シール<sup>注2</sup>をして密閉し軽く振り混ぜた後、25 °C で 1 時間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 µL を加えて 6 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルに酵素標識抗体溶液<sup>注2</sup> 100 µL を加え、シールをして密閉し軽く振り混ぜた後、25 °C で 1 時間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300 µL を加えて 6 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルに酵素基質溶液<sup>注2</sup> 100 µL を加え、モジュール用<sup>注2</sup>ふたをして軽く振り混ぜた後、25 °C で 20 分間遮光して静置する。更に各ウェルに反応停止液<sup>注2</sup> 100 µL を加え、酵素反応を停止させる。30 分以内に各ウェルの 450 nm 及び 620 nm <sup>注7</sup>における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、各ウェルの 450 nm の吸光度値から 620 nm の吸光度値を差し引いた値を測定値とする。

判定 試料溶液の測定値の平均値が陽性判定基準値<sup>注8</sup>以上であった場合を陽性と判定し、陽性判定基準値未満であった場合を陰性と判定する。試験成立条件<sup>注9</sup>を満たしていない場合には、再試験を行う。

注 1 モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2（森永生科学研究所製）による方法又はこれと同等の結果が得られる方法。

2 キットに付属しているものを使用する。

3 VORTEX-GENIE2（Scientific Industries）、又はこれらと同等の結果が得られるものを用いる。

4 陽性対照はキットに付属しているものを用いる。なお、高濃度陽性対照液は、高濃度標準品（特定動物種の筋肉組織対照液（牛モモ肉 50 µg/mL 相当））、低濃度陽性対照液は、低濃度標準品（特定動物種の筋肉組織対照液（牛モモ肉 3 µg/mL 相当））を用いる。

5 陰性対照はキットに付属しているものを用いる。なお、動物由来陰性対照液は、陰性対照溶液 I（特定動物種の筋肉組織対照液（豚モモ肉 5 mg/mL 相当））、植物由来陰性対照液は、陰性対照溶液 II（植物配合飼料（5 mg/mL 相当））を用いる。

6 各液はそれぞれ 2 ウェル以上に入れ、それぞれの測定値の平均値により判定を行う。

7 波長 610~650 nm の範囲内の単波長であればよい。

8 低濃度陽性対照液の平均測定値を陽性判定基準値とする。

9 試験成立条件は次のとおり。

- ・測定した空試験溶液の測定値の平均値が 0.08 以下であり、高濃度陽性対照液の測定値の平均値が 0.6 以上 1.6 以下であること。
- ・測定した動物由来及び植物由来陰性対照液の測定値の平均値がそれぞれ 0.08 以下であること。



(参考) 検出下限及び特異性

・検出下限

配合飼料中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.1 % 程度（原物含量%）

魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.1 % 程度（原物含量%）

豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.1 % 程度（原物含量%）

検出下限は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

・特異性

検出することを確認済みの動物種：ウシ、シカ

検出しないことを確認済みの動物種：ブタ、ニワトリ、イノシシ、クマ、ウマ

## 1.2 反すう動物由来たん白質<sup>注1</sup>

（適用範囲：動物質性飼料（魚介類に由来するものを除く。））

### A 試薬等の調製

- 1) 抽出溶媒 抽出溶媒用緩衝塩<sup>注2</sup> 1 包を水に溶かして 1,800 mL とする。
- 2) 洗浄液 洗浄液（10 倍濃縮液）<sup>注2</sup> 100 mL を水で希釈し 1,000 mL とする。
- 3) 1 %陽性コントロール液 陽性コントロール液<sup>注3</sup> 100  $\mu$ L を抽出液で希釈し 1 mL とする。
- 4) 0.05 %陽性コントロール液 1 %陽性コントロール液 50  $\mu$ L を陰性コントロール液<sup>注4</sup> で希釈し 1 mL とする。

### B 検 出

抽 出 分析試料 5.0 g（5.00～5.04 g）を量って 100 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 50 mL を加え、20 分間振り混ぜて抽出した後、これを沸騰水浴中で 15 分間加熱し、放冷後、ろ紙（5 種 A）でろ過する<sup>注5</sup>。このろ液 1 mL をマイクロチューブ（容量 1.5 mL）に入れ、5,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を ELISA 操作に供する試料溶液とする。

ELISA 操作 試料溶液、1 %陽性コントロール液、0.05 %陽性コントロール液、陰性コントロール液及び抽出溶媒（空試験溶液とする。）各 100  $\mu$ L を、抗体固相化モジュール<sup>注2</sup>のそれぞれ別のウェル<sup>注6</sup>に入れ、シーリングフィルム<sup>注7</sup>でウェルを覆い軽く振り混ぜた後、室温で 20 分間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300  $\mu$ L を加えて 3 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルにビオチン化抗体液<sup>注2</sup> 50  $\mu$ L ずつを加え、シーリングフィルムでウェルを覆い軽く振り混ぜた後、室温で 20 分間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300  $\mu$ L ずつを加えて 3 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルにアビジン酵素複合体液<sup>注2</sup> 50  $\mu$ L ずつを加え、シーリングフィルムでウェルを覆い軽く振り混ぜた後、室温で 20 分間静置する。各ウェル内の液を完全に除去し、各ウェルに洗浄液 300  $\mu$ L ずつを加えて 6 回繰り返し洗浄する。

次に、各ウェルに基質 TMB<sup>注8</sup>液<sup>注2</sup> 50  $\mu$ L ずつを加え、遮光し室温で 20 分間

静置する。更に各ウェルに反応停止液<sup>注2</sup> 50 µLずつを加え、発色を止める。15分以内に各ウェルの 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、各ウェルの吸光度値から空試験溶液の吸光度値を差し引いた値を測定値とする。

判定 試料溶液の測定値の平均値がカットオフ値<sup>注9</sup> 以上であり、かつ、陰性コントロール液の測定値の 2 倍の値以上であった場合を陽性と判定し、カットオフ値未満又は陰性コントロール液の測定値の 2 倍の値未満であった場合を陰性と判定する。試験成立条件<sup>注10</sup> を満たしていない場合には、再試験を行う。

注 1 MELISA-TEK RUMINANT KIT for MEAT & BONE MEALS and ANIMAL FEEDS (ELISA Technologies 製) による方法又はこれと同等の結果が得られる方法。

2 キットに付属しているものを使用する。

3 キットに付属している 10 % 牛陽性コントロール液を用いる。

4 キットに付属している 10 % 豚陽性コントロール液を用いる。

5 油脂分の凝固等によりろ過が困難な場合は、ろ過の前に 1,000×g で 5 分間遠心分離する。

6 各液はそれぞれ 2 ウェル以上に入れ、それぞれの測定値の平均値により判定を行う。

7 抗体固相化モジュールの上面に貼り付け、ウェル内容液の蒸発、揮散を防ぐ。

8 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン

9 判定の基準となる閾値を意味する。ここでは、測定値として 0.100 をカットオフ値とする。

10 試験成立条件は次のとおり。

- ・ 1 % 陽性コントロール液の測定値の平均値が 1.000 以上であり、陰性コントロール液の測定値の平均値が 0.100 未満であり、かつ 0.05 % 陽性コントロール液の測定値の標準偏差の値が 0.100 以下であること。

(参考) 検出下限及び特異性

・ 検出下限

豚由来肉骨粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.1 % 程度 (原物含量%)

チキンミール中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉として 0.2 % 程度 (原物含量%)

検出下限は、検査材料 (原料) の加熱処理温度条件 (製造方法) 及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

・ 特異性

検出することを確認済みの動物種：ウシ、スイギュウ、ヒツジ

検出しないことを確認済みの動物種：ブタ、ウマ、シカ、ウサギ、ニワトリ

本抗体は、動物組織のうち筋肉を特異的に検出し、乳及び血液は検出しない。

### 1.3 豚由来たん白質<sup>注1</sup>

(適用範囲：動物質性飼料)

1.1 の(1)による。ただし、注 1、4 及び 5 を次のとおり読み替えるものとする。

注 1 ELISA-TEK 加工肉種判別キット（豚）（ELISA Technologies 製）による方法又はこれと同等の結果が得られる方法。

4 キットに付属している豚陽性コントロール液を用いる。

5 キットに付属している牛及び鶏陽性コントロール液を用いる。

(参考) 検出下限及び特異性

・検出下限

魚粉中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉として 1 %程度（原物含量%）

肉骨粉中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉として 1 %程度（原物含量%）

チキンミール中の豚由来たん白質：豚由来肉骨粉として 1 %程度（原物含量%）

検出下限は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

・特異性

検出することを確認済みの動物種：ブタ

検出しないことを確認済みの動物種：ウシ、ニワトリ、ヒツジ

#### 1.4 鹿由来たん白質

（適用範囲：動物質性飼料（魚介類に由来するものを除く。））

1.1 の(3)による。

(参考) 検出下限及び特異性

・検出下限

原料混合肉骨粉中の鹿由来たん白質：鹿由来肉粉として 0.05 %程度（原物含量%）

検出下限は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

・特異性

1.1 の(3)を参照のこと。

## 2 家きん由来たん白質

水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものをを用いる。

(1) ELISA による方法（その 1）<sup>注1</sup>

（適用範囲：動物質性飼料）

1.1 の(1)による。ただし、注 1、4 及び 5 を次のとおり読み替えるものとする。

注 1 ELISA-TEK 加工肉種判別キット（鶏）（ELISA Technologies 製）による方法又はこれと同等の結果が得られる方法。

4 キットに付属している鶏陽性コントロール液を用いる。

5 キットに付属している牛及び豚陽性コントロール液を用いる。

(参考) 検出下限及び特異性

・検出下限

魚粉中の鶏由来たん白質：チキンミールとして 1 %程度（原物含量%）

肉骨粉中の鶏由来たん白質：チキンミールとして 1 %程度（原物含量%）

検出下限は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

- ・ 特異性

検出することを確認済みの動物種：ニワトリ

検出しないことを確認済みの動物種：ウシ、ブタ

(2) ELISA による方法（その2）<sup>注1</sup>

（適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料。ただし、動物質性飼料にあつては、豚に由来するたん白質又はこれを原料とする飼料<sup>注2</sup>を除く。）

1.1 の(2)による。ただし、注1を次のとおり読み替えるものとする。

注1 モリナガ加熱処理鶏由来タンパク質検出キット（森永生科学研究所製）による方法又はこれと同等の結果が得られる方法による。

本法による試験を法令上家きん由来たん白質の使用又は混入が禁止されている飼料を対象に行う場合、当該飼料への使用が認められている家きん由来飼料原料である卵及び卵製品が含まれている場合には陽性となることがある。従って、本法により試験を行うに当たっては留意すること。

（参考）検出下限及び特異性

- ・ 検出下限

配合飼料中の家きん由来たん白質：チキンミールとして 0.1 %程度（原物含量%）

魚粉中の家きん由来たん白質：チキンミールとして 0.1 %程度（原物含量%）

検出下限は、検査材料（原料）の加熱処理温度条件（製造方法）及び成分の含有条件等により異なるので注意が必要である。

- ・ 特異性

検出することを確認済みの動物種：ニワトリ、アイガモ、ウズラ

検出しないことを確認済みの動物種：ウシ、ブタ

非特異反応による偽陽性を示すもの：魚卵（確認済みの魚種：サケ、タラ、ニシン）