

○飼料分析基準（平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知）一部改正 新旧対照表

（下線部は改正箇所）

改正後	現 行
目 次	目 次
<p>第 1 章～第 6 章 〔略〕 第 7 章 有害物質</p>	<p>第 1 章～第 6 章 〔略〕 第 7 章 有害物質</p>
<p>1～6 〔略〕 〔新設〕</p>	<p>1～6 〔略〕</p>
<p><u>7 メラミン</u></p>	
<p>第 8 章～第 15 章 〔略〕 第 16 章 動物由来 DNA</p>	<p>第 8 章～第 15 章 〔略〕 第 16 章 動物由来 DNA</p>
<p>第 1 節 試料の採取、保管及び調製法 〔略〕</p>	<p>第 1 節 <u>分析用</u>試料の採取、保管及び調製法 〔略〕</p>
<p>第 2 節 〔略〕</p>	<p>第 2 節 〔略〕</p>
<p>第 3 節 <u>DNA 抽出</u>確認試験法 〔略〕</p>	<p>第 3 節 <u>抽出 DNA</u> 確認試験法 〔略〕</p>
<p>〔新設〕</p>	
<p>第 4 節 <u>増幅産物</u>確認試験法</p>	
<p>1 <u>ほ乳動物由来 DNA</u></p>	
<p>2 <u>反すう動物由来 DNA</u></p>	
<p>3 <u>牛由来 DNA</u></p>	
<p>第 17 章 動物由来たん白質</p>	<p>第 17 章 動物由来たん白質</p>
<p>第 1 節 試料の採取、保管及び調製法</p>	<p>第 1 節 <u>分析用</u>試料の採取、保管及び調製法</p>
<p>第 2 節 〔略〕</p>	<p>第 2 節 〔略〕</p>
<p>〔以下略〕</p>	<p>〔以下略〕</p>

改 正 後	現 行
第 1 章 通 則	第 1 章 通 則
1~11 〔略〕	1~11 〔略〕
12 数値の丸め方 分析値は、有効数字最下位の次のけたまで算出し、 <u>JIS Z 8401 規則 B</u> の定めるところにより丸めるものとする。	12 数値の丸め方 分析値は、有効数字最下位の次のけたまで算出し、 <u>JIS Z 8401</u> の定めるところにより丸めるものとする。
13 〔略〕	13 〔略〕
第 2 章 〔略〕	第 2 章 〔略〕
第 3 章 一般成分及びデタージェント繊維	第 3 章 一般成分及びデタージェント繊維
1 〔略〕	1 〔略〕
2 粗たん白質	2 粗たん白質
2.1 ケルダール法	2.1 ケルダール法
A 試薬の調製	A 試薬の調製
〔略〕	〔略〕
B 試料溶液の調製	B 試料溶液の調製
〔略〕	〔略〕
C 定 量	C 定 量
1) 硫酸標準液に吸収させる方法 試料溶液の一定量をケルダールフラスコに正確に入れ、強アルカリ性とするのに十分な量の水酸化ナトリウム溶液（50 w/v%）を加える。これをあらかじめ 0.05 mol/L 硫酸標準液の一定量を正確に入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液量が約 120 mL に達するまで留出させる。 留出液にメチルレッド試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナト	1) 硫酸標準液に吸収させる方法 試料溶液の一定量をケルダールフラスコに正確に入れ、強アルカリ性とするのに十分な量の水酸化ナトリウム溶液（50 w/v%）を加える。これをあらかじめ 0.05 mol/L 硫酸標準液の一定量を正確に入れた受器を接続した水蒸気蒸留装置に連結し、留出液量が約 120 mL に達するまで留出させる。 留出液にメチルレッド試液数滴を加え、0.1 mol/L 水酸化ナト

改正後	現 行
<p>リウム標準液で滴定し、次式により窒素〔N〕量を算出する。 これに <u>6.25 (乳製品及び乳製品の配合割合が 50 %以上のほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料にあつては、6.38)</u> を乗じて試料中の粗たん白質量を算出する。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>2) ホウ酸溶液に吸収させる方法</p> <p>受器に 0.05 mol/L 硫酸標準液の代わりにホウ酸溶液 (4 w/v%) の一定量を入れ、1)と同様に蒸留操作を行う。</p> <p>留出液にプロモクレゾールグリーン-メチルレッド試液数滴を加え、0.05 mol/L 硫酸標準液で滴定し、次式により窒素〔N〕量を算出する。これに <u>6.25 (乳製品及び乳製品の配合割合が 50 %以上のほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料にあつては、6.38)</u> を乗じて試料中の粗たん白質量を算出する。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>2.2 燃焼法^{注1}</p> <p style="text-align: center;">定 量</p> <p>分析試料^{注2} 100~500 mg を量って、窒素 (たん白質) 分析装置^{注3} に入れ、分析装置を作動させ窒素ガスの検出器応答ピークを得る。</p> <p>同様に検量線作成用試薬^{注4} を正確に量って装置に入れ、窒素ガスの検出器応答ピークを得る。得られた応答ピークから面積を求めて検量線を作成し、試料中の窒素〔N〕量を算出し、窒素〔N〕量に <u>6.25 (乳製品及び乳製品の配合割合が 50 %以上のほ乳期子牛育成用代用乳用配合飼料にあつては、6.38)</u> を乗じて試料中の粗たん白質量とする。</p> <p>〔以下略〕</p>	<p>リウム標準液で滴定し、次式により窒素〔N〕量を算出する。 これに 6.25 を乗じて試料中の粗たん白質量を算出する。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>2) ホウ酸溶液に吸収させる方法</p> <p>受器に 0.05 mol/L 硫酸標準液の代わりにホウ酸溶液 (4 w/v%) の一定量を入れ、1)と同様に蒸留操作を行う。</p> <p>留出液にプロモクレゾールグリーン-メチルレッド試液数滴を加え、0.05 mol/L 硫酸標準液で滴定し、次式により窒素〔N〕量を算出する。これに 6.25 を乗じて試料中の粗たん白質量を算出する。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>2.2 燃焼法^{注1}</p> <p style="text-align: center;">定 量</p> <p>分析試料^{注2} 100~500 mg を量って、窒素 (たん白質) 分析装置^{注3} に入れ、分析装置を作動させ窒素ガスの検出器応答ピークを得る。</p> <p>同様に検量線作成用試薬^{注4} を正確に量って装置に入れ、窒素ガスの検出器応答ピークを得る。得られた応答ピークから面積を求めて検量線を作成し、試料中の窒素〔N〕量を算出し、窒素〔N〕量に 6.25 を乗じて試料中の粗たん白質量とする。</p> <p>〔以下略〕</p>

改正後

現行

第4章 無機成分（有機態金属化合物を含む）

第4章 無機成分（有機態金属化合物を含む）

第1節 各条
1~14 〔略〕

第1節 各条
1~14 〔略〕

15 水銀^{注1}

15 水銀^{注1}

A 試薬の調製

A 試薬の調製

〔略〕

〔略〕

B 試料溶液の調製

B 試料溶液の調製

〔略〕

〔略〕

C 定 量

C 定 量

〔略〕

〔略〕

（参考）分析法バリデーション

（参考）分析法バリデーション

〔中略〕

〔中略〕

・共同試験

・共同試験

試料の種類	試験室数	測定値 (mg/kg)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
魚粉	6	81.0	3.9	9.5	1.2

試料の種類	試験室数	測定値 (mg/kg)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
魚粉	6	81.0	3.9	9.5	1.2

・定量下限 試料中 0.03 mg/kg

・検出下限 試料中 0.01 mg/kg

〔以下略〕

〔以下略〕

改正後	現 行
第5章.第6章 [略]	第5章.第6章 [略]
第7章 有害物質	第7章 有害物質
1~6 [略]	1~6 [略]
〔新設〕	
7 <u>メラミン</u>	
7.1 <u>液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による方法</u>	
<u>A 試薬の調製</u>	
1) <u>メラミン標準原液</u> <u>メラミン〔C₃H₆N₆〕10 mg を正確に量って100 mLの全量フラスコに入れ、アセトニトリル-水(1+1)を加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてメラミン標準原液を調製する(この液1 mLは、メラミンとして100 µgを含有する。)</u> 。	
2) <u>内標準液</u> <u>安定同位体元素標識メラミン(メラミン-¹³C₃¹⁵N₃)標準原液(濃度100 µg/mL)注¹1 mLを100 mLの全量フラスコに正確に入れ、標線までアセトニトリル-水(1+1)を加えて1 mL中にメラミン-¹³C₃¹⁵N₃として1 µgを含有する内標準液を調製する。</u>	
3) <u>検量線作成用標準液</u> <u>使用に際して、メラミン標準原液及び内標準液の一定量をアセトニトリル-ジエチルアミン(49+1)で正確に希釈し、1 mL中にメラミンとして1~200 ngを含有し、かつメラミン-¹³C₃¹⁵N₃として5 ngを含有する数点の検量線作成用標準液を調製する。</u>	
<u>B 定 量</u>	
<u>抽 出</u>	
1) <u>脱脂粉乳</u> <u>分析試料1 gを正確に量って50 mLの共栓遠心沈殿管に入れ、水10 mLを加えた後、15分間超音波処理す</u>	

改正後	現 行
<p>る。この遠心沈殿管にアセトニトリル 10 mL を加え、更に内標準液 500 μL を正確に加えた後、ホモジナイザー^{注2}で 1 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 1,600\timesg で 10 分間遠心分離し、上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れる。全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。</p> <p>2) その他の飼料 分析試料 1 g を正確に量って 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、アセトニトリル-水 (1+1) 20 mL を加える。更にこの遠心沈殿管に内標準液 500 μL を正確に加えた後、ホモジナイザー^{注2}で 1 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を 1,600\timesg で 10 分間遠心分離し、上澄み液 4 mL を 10 mL の全量フラスコに正確に入れる。全量フラスコの標線までアセトニトリル-水 (1+1) を加え、カラム処理に供する試料溶液とする。</p> <p>カラム処理 強酸性陽イオン交換体ミニカラム^{注3}をアセトニトリル 5 mL 及びぎ酸 (1+24) 5 mL で順次洗浄する。試料溶液 2 mL をあらかじめぎ酸 (1+24) 3 mL を入れたミニカラムに加え混和し、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。更にアセトニトリル 5 mL 及びアセトニトリル-ジエチルアミン (499+1) 5 mL を順次ミニカラムに加えて洗浄した後、圧注^{注4}して全量を流出させる。10 mL の共栓試験管をミニカラムの下に置き、アセトニトリル-ジエチルアミン (49+1) 4 mL をミニカラムに加えてメラミンを溶出させた後、圧注^{注4}して全量を溶出させ混合する。</p> <p>溶出液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とする。</p> <p>液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定 試料</p>	

改正後

現 行

表 各物質のモニターイオン条件

物質名	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	確認イオン (<i>m/z</i>)	フラグメンター 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
メラミン	127	68	85	100	33
メラミン- ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃	133	89		100	18

計 算 得られた選択反応検出クロマトグラムからメラミン及びメラミン-¹³C₃¹⁵N₃のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中のメラミン量を算出する。

注 1 Cambrige Isotope Laboratories Inc.製水溶液又はこれと同等のもの

2 HG-200 (Hsiangtai 製) 又はこれと同等のもの

3 Oasis MCX (Waters 製、リザーバー容量 6 mL) 又はこれと同等のもの

4 流速は 1~2 mL/min 程度とする。必要に応じて吸引マニホールドを使用する。

5 SeQuant ZIC-HILIC (MERCK 製、充填剤はシリカゲル基材にスルホベタイン基 (両性イオン型官能基) を化学結合したもの。本測定条件によるメラミンの保持時間は約 4 分) 又はこれと同等のもの

6 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies 製) による条件例

改正後

現 行

(参考) 分析法バリデーション

・ 添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (mg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%)
成鶏飼育用配合飼料	2.5	3	93.0	0.9
	0.2	3	115	1.1
肉豚肥育用配合飼料	2.5	3	95.6	3.1
	0.2	3	112	3.0
魚粉	2.5	3	99.5	1.4
	0.2	3	112	2.6
大豆油かす	2.5	3	98.0	0.6
	0.2	3	117	3.6
脱脂粉乳	2.5	3	96.3	2.9
	0.2	3	109	2.9

・ 共同試験

試料の種類	試験 室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
成鶏飼育用配合飼料	9	0.4	97.1	4.2	4.8	0.26
魚粉	9	1.0	97.8	3.9	4.8	0.30
脱脂粉乳	9	1.0	99.3	4.7	5.2	0.32

・ 定量下限 試料中 0.2 mg/kg

・ 検出下限 試料中 0.06 mg/kg

改正後	現 行
<p style="text-align: center;">第 8 章 合成抗菌物質</p> <p>第 1 節 各条 1~6 〔略〕</p> <p>7 クエン酸モランテル 7.1 定量試験法 7.1.1 液体クロマトグラフ法 (1) プレミックス^{注1} 〔略〕</p> <p>〔新設〕 (2) <u>配合飼料（その1）^{注1}</u> A 試薬の調製 1) <u>クエン酸モランテル標準液</u> クエン酸モランテル 〔C₁₈H₂₆N₂O₈S〕 25 mg を正確に量って 250 mL の褐色全 量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標 線まで同溶媒を加えてクエン酸モランテル標準原液を調 製する（この液 1 mL は、クエン酸モランテルとして 0.1 mg を含有する。）。 使用に際して、標準原液の一定量をメタノール-水 （17+3）で正確に希釈し、1 mL 中にクエン酸モランテル として 0.1~5 µg を含有する数点のクエン酸モランテル標 準液を調製する。 2) <u>塩基性アルミナ</u> カラムクロマトグラフ用塩基性ア ルミナ（粒径 63~200 µm（230~70 メッシュ））^{注2} を 130 °C で 2 時間乾燥する。 B 定 量 <u>抽 出</u> 1) <u>加熱試料^{注3}</u> 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の</p>	<p style="text-align: center;">第 8 章 合成抗菌物質</p> <p>第 1 節 各条 1~6 〔略〕</p> <p>7 クエン酸モランテル 7.1 定量試験法 7.1.1 液体クロマトグラフ法 (1) プレミックス^{注1} 〔略〕</p>

改正後	現 行
<p><u>褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (17+3) 100 mL を加えて密栓した後、40 °C で、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。</u></p> <p>2) <u>その他の試料 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、メタノール-水 (17+3) 100 mL を加え、30 分間かき混ぜて抽出する。抽出液を褐色共栓遠心沈殿管に入れ、1,600×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液をカラム処理に供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>カラム処理 塩基性アルミナ 5 g をカラム管 (内径 10 mm) に乾式充てんし、カラムを調製する。試料溶液をカラムに入れ、初めの流出液 5 mL を捨て、その後の流出液 5 mL のうち一定量を、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。</u></p> <p><u>液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各クエン酸モラントール標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。</u></p> <p><u>測定条件 例</u></p> <p><u>検 出 器：紫外吸光光度検出器 (測定波長 320 nm)</u></p> <p><u>カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒径 5 μm) ^{注4}</u></p> <p><u>溶 離 液：リン酸緩衝液^{注5}-アセトニトリル (4+1)</u></p>	

改正後	現 行
<p><u>流 速：1.0 mL/min</u></p> <p><u>カラム槽温度：40℃</u></p> <p><u>計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のクエン酸モランテル量を算出する。</u></p> <p><u>注 1 定量操作は暗室で行い、ガラス容器等はアルミ箔等で被覆する。</u></p> <p><u>2 Aluminiumoxid 90 aktiv basisch Art. 1076 (Merck 製) 又はこれと同等のもの</u></p> <p><u>3 加熱試料とは、配合飼料の製造時に蒸気と圧力を加えて加工を行ったものをいう。</u></p> <p><u>4 Shodex C18M4E (昭和電工製、本測定条件によるクエン酸モランテルの保持時間は約 10 分) 又はこれと同等のもの</u></p> <p><u>5 リン酸二水素カリウム 6.8 g を水に溶かして 1 L とし、リン酸 (1+10) で pH を 3.3 に調整する。</u></p>	

改正後

現行

(参考) 分析法バリデーション

・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (g/t)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD(%)
子豚育成用配合飼料1	15	3	98.6	3.6
	30	3	102	3.2
	45	3	90.3	2.9
子豚育成用配合飼料2	15	3	95.7	2.4
	30	3	95.7	0.5
	45	3	103	3.0
子豚育成用配合飼料3	15	3	96.6	4.6
	30	3	99.6	3.7
	45	3	101	0.3
ほ乳期子豚育成用配合飼料1(加熱試料)	30(表示量)	3	101(表示に対する割合)	1.6
ほ乳期子豚育成用配合飼料2(加熱試料)	30(表示量)	3	103(表示に対する割合)	1.8
ほ乳期子豚育成用配合飼料3(加熱試料)	30(表示量)	3	98.8(表示に対する割合)	0.6
ほ乳期子豚育成用配合飼料4(加熱試料)	30(表示量)	3	98.3(表示に対する割合)	1.4
ほ乳期子豚育成用配合飼料5(加熱試料)	30(表示量)	3	95.7(表示に対する割合)	0.3
ほ乳期子豚育成用配合飼料6(加熱試料)	30(表示量)	3	101(表示に対する割合)	2.4

・共同試験

試料の種類	試験室数	添加濃度 (mg/kg)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
子豚育成用配合飼料1 (非加熱試料)	9	30	102	3.5	3.0	0.31
子豚育成用配合飼料2 (非加熱試料)	9	30	102	2.8	3.5	0.37
ほ乳期子豚育成用 配合飼料(加熱試料)	8	30(表示量)	96.4(表示に対する割合)	1.0	2.3	0.24

(3) 配合飼料(その2)^{注1} [略]

(2) 配合飼料^{注1} [略]

[以下略]

[以下略]

改正後	現 行
<p data-bbox="481 225 815 253">第 9 章～第 15 章 〔略〕</p> <p data-bbox="470 311 781 339">第 16 章 動物由来 DNA</p> <p data-bbox="147 354 663 383">第 1 節 試料の採取、保管及び調製法</p> <p data-bbox="181 397 405 426">1 試料の採取法</p> <p data-bbox="210 440 1102 512">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。</p> <p data-bbox="210 526 1102 598">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、約 500 g を滅菌済み採取袋に採取する。</p> <p data-bbox="181 612 405 641">2 試料の保管法</p> <p data-bbox="210 655 1102 770">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。</p> <p data-bbox="181 785 300 813">3 〔略〕</p> <p data-bbox="147 871 329 900">第 2 節 各条</p> <p data-bbox="181 914 1102 986">本節において bp (<u>base pair</u>) とあるのは、DNA の塩基対数を表す。</p> <p data-bbox="181 1000 1102 1152">また、超純水とは、水を更に電気伝導率 5.6 $\mu\text{S/m}$ 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。</p> <p data-bbox="210 1166 992 1197">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。</p> <p data-bbox="181 1211 479 1240">1 ほ乳動物由来 DNA</p>	<p data-bbox="1462 225 1796 253">第 9 章～第 15 章 〔略〕</p> <p data-bbox="1451 311 1762 339">第 16 章 動物由来 DNA</p> <p data-bbox="1131 354 1736 383">第 1 節 <u>分析用試料</u>の採取、保管及び調製法</p> <p data-bbox="1164 397 1478 426">1 <u>分析用試料</u>の採取法</p> <p data-bbox="1193 440 2085 512">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。</p> <p data-bbox="1193 526 2085 598">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、約 500 g を滅菌済み採取袋に採取する。</p> <p data-bbox="1164 612 1478 641">2 <u>分析用試料</u>の保管法</p> <p data-bbox="1193 655 2085 770"><u>分析用試料</u>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。</p> <p data-bbox="1164 785 1283 813">3 〔略〕</p> <p data-bbox="1131 871 1312 900">第 2 節 各条</p> <p data-bbox="1193 914 1926 943">本節において bp とあるのは、DNA の塩基対数を表す。</p> <p data-bbox="1164 1211 1462 1240">1 ほ乳動物由来 DNA</p> <p data-bbox="1223 1254 2085 1406"><u>水は、滅菌した超純水（精製水を更に電気伝導率 5.9 $\mu\text{S/m}$ 以下（比抵抗 17 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上）に精製したもの。以下同じ。）を用い、試薬等並びに器具類は必要に応じて、滅菌したものをを用いる。</u></p>

改正後	現 行
<p>1.1 ほ乳動物由来 DNA^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 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<u>超純水</u> 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<u>超純水</u>を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。</p> <p>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 に<u>超純水</u> 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<u>超純水</u>を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。</p> <p>3) ホモジナイズ用緩衝液 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1 mL 及びスクロース 8.55 g を<u>滅菌した超純水</u>に溶かして 100 mL とする。</p> <p>4) TE 緩衝液 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<u>超純水</u>を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。</p> <p>5) <u>Tris-acetate, EDTA (TAE)</u> 緩衝液 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。</p> <p>6) <u>Tris-borate, EDTA (TBE)</u> 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。</p> <p>7) [略]</p> <p>8) <u>電気泳動用色素溶液</u> DNA 分子量マーカー^{注2}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</p>	<p>1.1 ほ乳動物由来 DNA^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 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<u>水</u> 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<u>水</u>を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。</p> <p>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 に<u>水</u> 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<u>水</u>を加えて 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。</p> <p>3) ホモジナイズ緩衝液 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1 mL 及びスクロース 8.55 g を<u>水</u>に溶かして 100 mL とする。</p> <p>4) TE 緩衝液 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 を<u>水</u>で希釈して 100 mL とし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。</p> <p>5) TAE 緩衝液 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。</p> <p>6) 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。</p> <p>7) [略]</p> <p>8) <u>ゲルローディング緩衝液</u> DNA 分子量マーカー^{注2}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</p>

改正後	現 行
<p>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。</p> <p>9) <u>ゲル染色液</u> 臭化エチジウム 10 mg を<u>滅菌した水</u> 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<u>ゲル染色液</u>とする。</p> <p>10) <u>陽性対照</u> 市販の牛ミトコンドリア DNA ^{注3} 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^{注4} 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<u>陽性対照</u>を調製する。</p> <p>11) プライマー溶液 ほ乳動物検出用プライマー対^{注5}をそれぞれ<u>滅菌した超純水</u>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。</p> <p>12) PCR 反応液 <u>滅菌した超純水</u> 4.7 µL、PCR 緩衝液^{注6} 2.0 µL、2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液^{注7} 2.0 µL、25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 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^{注8} 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。</p>	<p>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。</p> <p>9) 染色液 臭化エチジウム 10 mg を水 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 を加えて染色液とする。</p> <p>10) <u>陽性コントロール DNA</u> 市販の牛ミトコンドリア DNA ^{注3} 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^{注4} 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<u>陽性コントロール DNA</u>を調製する。</p> <p>11) プライマー溶液 ほ乳動物検出プライマー対^{注5}をそれぞれ<u>水</u>で希釈し、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。</p> <p>12) PCR 反応液 <u>水</u> 4.7 µL、PCR 緩衝液^{注6} 2.0 µL、2 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液^{注7} 2.0 µL、25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 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^{注8} 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。</p>
<p style="text-align: center;">B 検 出^{注9}</p> <p>DNA の抽出 分析試料 100 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^{注10} (直径 1.5 mm) 1.5 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^{注11}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</p>	<p style="text-align: center;">B 検 出^{注9}</p> <p>DNA の抽出 分析試料 100 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^{注10} (直径 1.5 mm) 1.5 g を加え、更にホモジナイズ緩衝液 1 mL を加えた後、チューブを細胞破砕機^{注11}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</p>

改正後	現行
<p>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^{注4}し、減圧乾燥した後、TE 緩衝液 20 μL を加えて溶かし、この液の一定量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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>PCR 反応条件 例</p> <p>DNA 増幅装置：Gene Amp System 9700（Applied Biosystems 製）</p> <p>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）</p> <p>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）</p> <p>温度制御条件：9600 モード</p> <p>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</p>	<p>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^{注4}し、減圧乾燥した後、TE 緩衝液 20 μL を加えて溶かし、この液の一定量を水で正確に 10 倍に希釈して DNA 試料液を調製する。</p> <p>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。</p> <p>同時に、陽性コントロール DNA 2.0 μL 及び水 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、陽性コントロール液及び陰性コントロール液を調製する。</p> <p>PCR 反応 試料溶液、陽性コントロール液及び陰性コントロール液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ、PCR 反応を行う。</p> <p>PCR 反応条件 例</p> <p>DNA 増幅装置：Gene Amp System 9700（Applied Biosystems 製）</p> <p>プライマー：ほ乳動物検出プライマー対 [anicon5, anicon3]（増幅産物サイズ 176 bp）</p> <p>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）</p> <p>温度制御条件：9600 モード</p> <p>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、陽性コントロール液、陰</p>

改正後	現行
<p>及び DNA 分子量マーカー^{注2}各 5 µL に<u>電気泳動用色素溶液</u> 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 3~4 cm 移動するまで電気泳動を行う。</p> <p>電気泳動の終了したアガロースゲルを<u>ゲル染色液</u>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、365 nm 又は 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅<u>産物</u>の有無を確認する。</p> <p>判定 陽性<u>対照液</u>で検出サイズの PCR 増幅<u>産物</u>が検出され、陰性<u>対照液</u>で PCR 増幅<u>産物</u>が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性<u>対照液</u>と同一サイズの PCR 増幅<u>産物</u>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<u>より制限酵素による増幅産物確認法</u>を行う。</p> <p>陽性<u>対照液</u>で PCR 増幅<u>産物</u>が検出されない場合及び陰性<u>対照液</u>で PCR 増幅<u>産物</u>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。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>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<u>反応を示す</u>ことがある。<u>従って</u>、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）。</p> <p>2 〔略〕</p>	<p>性<u>コントロール液</u>及び DNA 分子量マーカー^{注2}各 5 µL に<u>ゲルローディング緩衝液</u> 1 µL ずつ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 3~4 cm 移動するまで電気泳動を行う。</p> <p>電気泳動の終了したアガロースゲルを染色液に入れ、約 30 分間浸した後、UV トランスイルミネーターに載せ、365 nm 又は 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅<u>バンド</u>の有無を確認する。</p> <p>判定 陽性<u>コントロール液</u>で検出サイズの PCR 増幅<u>バンド</u>が検出され、陰性<u>コントロール液</u>で PCR 増幅<u>バンド</u>が検出されない場合で、かつ、試料溶液において陽性<u>コントロール液</u>と同一サイズの PCR 増幅<u>バンド</u>が検出された場合を陽性と判定する。</p> <p>陽性<u>コントロール液</u>で PCR 増幅<u>バンド</u>が検出されない場合及び陰性<u>コントロール液</u>で PCR 増幅<u>バンド</u>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。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>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<u>となる</u>ことがある。<u>したがって</u>、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）。</p> <p>2 〔略〕</p>

改正後	現 行
<p>3 牛ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製)</p> <p>4 [略]</p> <p>5 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</p> <p>6~8 [略]</p> <p>9 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、<u>汚染防止</u>のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</p> <p>10~11 [略]</p> <p>(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。</p> <p>比重分離 [略]</p> <p>次亜塩素酸処理 [略]</p> <p>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。</p>	<p>3 牛ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (<u>テキサスジェノミックスジャパン</u>製)</p> <p>4 [略]</p> <p>5 ほ乳動物検出用<u>合成 DNA</u> [anicon5, anicon3] (<u>テキサスジェノミックスジャパン</u>製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>6~8 [略]</p> <p>9 試薬等並びに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、<u>コンタミネーション</u>防止のため陽圧の<u>クリーンベンチ</u>内で行う。</p> <p>10~11 [略]</p> <p>(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。</p> <p>比重分離 [略]</p> <p>次亜塩素酸処理 [略]</p> <p>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<u>超純水</u> 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<u>超純水</u> 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</p>

改正後	現 行
<p>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)</p> <p>電気泳動 [略]。</p> <p>判 定 1.1 の B の判定の項による。<u>ただし、陽性の疑いがある場合は、第 4 節 2 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。</u></p> <p>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ことがある。<u>従って</u>、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)。</p> <p>2 反すう動物検出用<u>プライマー対</u> [rumicon5D2, rumicon3D5] (<u>BEX</u> 製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>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、<u>汚染防止</u>のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (反すう動物検出用<u>プライマー対</u> [rumicon5D2, rumicon3D5] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 [略] ・特異性 [略] 	<p>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)</p> <p>電気泳動 [略]</p> <p>判 定 1.1 の B の判定の項による。</p> <p>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ことがある。<u>したがって</u>、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)。</p> <p>2 反すう動物検出用<u>合成 DNA</u> [rumicon5D2, rumicon3D5] (<u>テキサスジェノミックスジャパン</u> 製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>3 試薬等並びに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、<u>コンタミネーション</u>防止のため陽圧の<u>クリーンベンチ</u>内で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (反すう動物検出用<u>プライマー対</u> [rumicon5D2, rumicon3D5] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 [略] ・特異性 [略]

改正後	現 行
<p>1.3 牛由来 DNA^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) 〔略〕</p> <p>3) <u>ホモジナイズ用緩衝液</u> 1.1のAの3)による。</p> <p>4)~7) 〔略〕</p> <p>8) <u>電気泳動用色素溶液</u> 1.1のAの8)による。</p> <p>9) <u>ゲル染色液</u> 1.1のAの9)による。</p> <p>10) <u>陽性対照</u> 1.1のAの10)による。</p> <p>11) <u>プライマー溶液</u> 牛検出用プライマー対^{注2}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。</p> <p>12) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検 出^{注3}</p> <p>DNAの抽出 〔略〕</p> <p>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。</p> <p style="padding-left: 40px;">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)</p> <p style="padding-left: 40px;">反応温度条件：95℃ (9 min 保持) → [92℃ (30 s 保持) → 55℃ (30 s 保持) → 72℃ (30 s 保持)] (45 サイクル) → 72℃ (5 min 保持)</p> <p>電気泳動 〔略〕</p> <p>判 定 <u>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</u></p>	<p>1.3 牛由来 DNA^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) 〔略〕</p> <p>3) <u>ホモジナイズ緩衝液</u> 1.1のAの3)による。</p> <p>4)~7) 〔略〕</p> <p>8) <u>ゲルローディング緩衝液</u> 1.1のAの8)による。</p> <p>9) <u>染色液</u> 1.1のAの9)による。</p> <p>10) <u>陽性コントロール DNA</u> 1.1のAの10)による。</p> <p>11) <u>プライマー溶液</u> 牛検出プライマー対^{注2}をそれぞれ水で希釈し、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。</p> <p>12) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検 出^{注3}</p> <p>DNAの抽出 〔略〕</p> <p>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。</p> <p style="padding-left: 40px;">プライマー：牛検出プライマー対 [cow52, cow31] (増幅産物サイズ 126 bp)</p> <p style="padding-left: 40px;">反応温度条件：95℃ (9 min 保持) → [92℃ (30 s 保持) → 55℃ (30 s 保持) → 72℃ (30 s 保持)] (45 サイクル) → 72℃ (5 min 保持)</p> <p>電気泳動 〔略〕</p> <p>判 定 <u>1.1のBの判定の項による。</u></p>

改正後	現 行
<p><u>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、陽性の疑い有り」と判定し、第 4 節 3 により制限酵素による増幅産物確認法を行う。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p>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。<u>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）。</u></p> <p>2 牛検出用<u>プライマー対</u> [cow52, cow31]（<u>BEX</u> 製）又はこれと同等の結果が得られるもの</p>	<p>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。<u>したがって、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）。</u></p> <p>2 牛検出用<u>合成 DNA</u> [cow52, cow31]（<u>テキサスジェノミックスジャパン</u>製）、牛検出用合成 DNA [L8129, H8357]（参考文献：Marco Tartaglia ら；J. Food Prot., 61 (5), 513 (1998)）又はこれらと同等の結果が得られるもの</p>

改正後	現 行
<p>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、<u>汚染防止</u>のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (牛検出用プライマー対 [cow52, cow31] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 [略] ・特異性 [略] <p>1.4 豚由来 DNA^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) [略]</p> <p>3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1のAの3)による。</p> <p>4)~7) [略]</p> <p>8) <u>電気泳動用色素溶液</u> 1.1のAの8)による。</p> <p>9) <u>ゲル染色液</u> 1.1のAの9)による。</p> <p>10) <u>陽性対照</u> 市販の豚ミトコンドリア DNA^{注2}又は以下により調製したものをを用いる。 豚のミトコンドリア DNA を抽出^{注3}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。</p> <p>11) プライマー溶液 豚検出用プライマー対^{注4}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。</p> <p>12) [略]</p>	<p>3 試薬等並びに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、<u>コンタミネーション防止</u>のため陽圧のクリーンベンチ内で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (牛検出プライマー対 [cow52, cow31] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 [略] ・特異性 [略] <p>1.4 豚由来 DNA^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) [略]</p> <p>3) ホモジナイズ緩衝液 1.1のAの3)による。</p> <p>4)~7) [略]</p> <p>8) <u>ゲルローディング緩衝液</u> 1.1のAの8)による。</p> <p>9) 染色液 1.1のAの9)による。</p> <p>10) <u>陽性コントロール DNA</u> 市販の豚ミトコンドリア DNA^{注2}又は以下により調製したものをを用いる。 豚のミトコンドリア DNA を抽出^{注3}し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg を含有する陽性コントロール DNA を調製する。</p> <p>11) プライマー溶液 豚検出プライマー対^{注4}をそれぞれ水で希釈し、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。</p> <p>12) [略]</p>

改正後	現 行
<p style="text-align: center;">B 検 出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 〔略〕</p> <p>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。</p> <p style="padding-left: 40px;">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）</p> <p style="padding-left: 40px;">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）</p> <p>電気泳動 〔略〕</p> <p>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。</p> <p style="padding-left: 40px;">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。</p> <p style="padding-left: 40px;">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。</p> <p style="padding-left: 40px;">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</p>	<p style="text-align: center;">B 検 出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 〔略〕</p> <p>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。</p> <p style="padding-left: 40px;">プライマー：豚検出プライマー対 [pig5-6, pig3-6]（増幅産物サイズ 83 bp）</p> <p style="padding-left: 40px;">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）</p> <p>電気泳動 〔略〕</p> <p>判 定 1.1 の B の判定の項による。</p>

改正後	現 行
<p><u>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。</u></p> <p>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。<u>従って</u>、本法により試験を行うに当たっては留意すること。</p> <p>2 豚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (BEX 製)</p> <p>3 [略]</p> <p>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</p> <p>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、<u>汚染防止</u>のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (豚検出用プライマー対 [pig5-6, pig3-6] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 [略] ・特異性 [略] <p>2 家きん由来 DNA ^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p>	<p>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。<u>したがって</u>、本法により試験を行うに当たっては留意すること。</p> <p>2 豚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール (<u>テキサスジェノミックスジャパン製</u>)</p> <p>3 [略]</p> <p>4 豚検出用合成 DNA [pig5-3, pig32-2] (<u>テキサスジェノミックスジャパン製</u>)、豚検出用合成 DNA [pig5-6, pig3-6] (<u>テキサスジェノミックスジャパン製</u>) 又はこれらと同等の結果が得られるもの</p> <p>5 試薬等並びに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、<u>コンタミネーション防止のため陽圧のクリーンベンチ内</u>で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (豚検出用プライマー対 [pig5-6, pig3-6] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 [略] ・特異性 [略] <p>2 家きん由来 DNA ^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料) <u>水は滅菌した超純水を用い、試薬等並びに器具類は必要に応</u></p>

改正後	現 行
<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) 〔略〕</p> <p>3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。</p> <p>4)~7) 〔略〕</p> <p>8) <u>電気泳動用色素溶液</u> 1.1 の A の 8)による。</p> <p>9) <u>ゲル染色液</u> 1.1 の A の 9)による。</p> <p>10) <u>陽性対照</u> 市販の鶏ミトコンドリア DNA ^{注2} 又は以下により調製したものをを用いる。 鶏のミトコンドリア DNA を抽出^{注3}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。</p> <p>11) プライマー溶液 鶏検出用プライマー対^{注4}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。</p> <p>12) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検 出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 〔略〕</p> <p>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)</p> <p>電気泳動 〔略〕</p>	<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) 〔略〕</p> <p>3) ホモジナイズ緩衝液 1.1 の A の 3)による。</p> <p>4)~7) 〔略〕</p> <p>8) <u>ゲルローディング緩衝液</u> 1.1 の A の 8)による。</p> <p>9) 染色液 1.1 の A の 9)による。</p> <p>10) <u>陽性コントロール DNA</u> 市販の鶏ミトコンドリア DNA ^{注2} 又は以下により調製したものをを用いる。 鶏のミトコンドリア DNA を抽出^{注3}し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg を含有する陽性コントロール DNA を調製する。</p> <p>11) プライマー溶液 鶏検出プライマー対^{注4}をそれぞれ水で希釈し、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。</p> <p>12) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検 出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 〔略〕</p> <p>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)</p> <p>電気泳動 〔略〕</p>

改正後	現 行
<p>判 定 1.4のBの判定の項による。</p> <p>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。<u>従って</u>、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）。</p> <p>2 鶏ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール（<u>BEX</u>製）</p> <p>3 〔略〕</p> <p>4 鶏検出用<u>プライマー対</u> [chick5-1, chick3-1]（<u>BEX</u>製）又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>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、<u>汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</u></p> <p>（参考）検出感度及び特異性（鶏検出用<u>プライマー対</u> [chick5-1, chick3-1] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 〔略〕 ・特異性 〔略〕 <p>3 魚介類由来 DNA ^{注1}</p> <p>（適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) 〔略〕</p>	<p>判 定 1.1のBの判定の項による。</p> <p>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。<u>したがって</u>、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）。</p> <p>2 鶏ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール（<u>テキサスジェノミックスジャパン製</u>）</p> <p>3 〔略〕</p> <p>4 鶏検出用合成 DNA [chick5-1, chick3-1]（<u>テキサスジェノミックスジャパン製</u>）又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>5 試薬等並びに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、<u>コンタミネーション防止のため陽圧のクリーンベンチ内で行う。</u></p> <p>（参考）検出感度及び特異性（鶏検出用<u>プライマー対</u> [chick5-1, chick3-1] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 〔略〕 ・特異性 〔略〕 <p>3 魚介類由来 DNA ^{注1}</p> <p><u>水は滅菌した超純水を用い、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。</u></p> <p>（適用範囲：油脂を除く飼料）</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~2) 〔略〕</p>

改正後	現行
<p>3) ホモジナイズ用緩衝液 1.1 の A の 3)による。 4)~7) 〔略〕 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^{注2} 又は以下により調製したものをを用いる。 キハダマグロのミトコンドリア DNA を抽出^{注3}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^{注4}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) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 〔略〕 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：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)</p> <p>電気泳動 〔略〕 判定 1.4 の B の判定の項による。 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</p>	<p>3) ホモジナイズ緩衝液 1.1 の A の 3)による。 4)~7) 〔略〕 8) ゲルローディング緩衝液 1.1 の A の 8)による。 9) 染色液 1.1 の A の 9)による。 10) 陽性コントロール DNA 市販の魚ミトコンドリア DNA^{注2} 又は以下により調製したものをを用いる。 キハダマグロのミトコンドリア DNA を抽出^{注3}し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg を含有する陽性コントロール DNA を調製する。 11) プライマー溶液 魚類検出プライマー対^{注4}をそれぞれ水で希釈し、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) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 〔略〕 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：魚類検出プライマー対 [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)</p> <p>電気泳動 〔略〕 判定 1.1 の B の判定の項による。 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</p>

改正後	現 行
<p>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<u>対照試験</u>として実施する。</p> <p>2 魚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール（<u>BEX 製</u>）</p> <p>3 <u>〔略〕</u></p> <p>4 魚類検出用<u>プライマー対</u> [FM5, FM3]（<u>BEX 製</u>）又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>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、<u>汚染防止のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</u></p> <p>（参考）検出感度及び特異性（魚類用<u>プライマー対</u> [FM5, FM3] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 <u>〔略〕</u> ・特異性 <u>〔略〕</u> <p>第3節 DNA <u>抽出</u>確認試験法</p> <p><u>本節において bp (base pair) とあるのは、DNA の塩基対数を表す。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p>1 植物由来 DNA ^{注1} （適用範囲：油脂を除く飼料）</p>	<p>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<u>コントロール試験</u>として実施する。</p> <p>2 魚ミトコンドリア DNA ポジティブコントロール（<u>テキサスジェノミックスジャパン製</u>）</p> <p>3 <u>〔略〕</u></p> <p>4 魚類検出用<u>合成 DNA</u> [FM5, FM3]（<u>テキサスジェノミックスジャパン製</u>）又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>5 試薬等並びに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、<u>コンタミネーション防止のため陽圧のクリーンベンチ内で行う。</u></p> <p>（参考）検出感度及び特異性（魚類<u>プライマー対</u> [FM5, FM3] を使用した場合）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 <u>〔略〕</u> ・特異性 <u>〔略〕</u> <p>第3節 <u>抽出</u> DNA 確認試験法</p> <p>1 植物由来 DNA ^{注1} （適用範囲：油脂を除く飼料） <u>水は滅菌した超純水を用い、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。</u></p>

改正後	現 行
<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 第2節 1.1 の A の 1)による。</p> <p>2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 第2節 1.1 の A の 2)による。</p> <p>3) ホモジナイズ用緩衝液 第2節 1.1 の A の 3)による。</p> <p>4) TE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 4)による。</p> <p>5) TAE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 5)による。</p> <p>6) TBE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 6)による。</p> <p>7) アガロースゲル 第2節 1.1 の A の 7)による。</p> <p>8) 電気泳動用色素溶液 第2節 1.1 の A の 8)による。</p> <p>9) <u>ゲル染色液</u> 第2節 1.1 の A の 9)による。</p> <p>10) <u>陽性対照</u> 市販のとうもろこしミトコンドリア DNA^{注2}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^{注3}し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg 程度を含有する陽性対照を調製する。</p> <p>11) プライマー溶液 植物検出用プライマー対^{注4}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。</p> <p>12) PCR 反応液 第2節 1.1 の A の 12)による。</p> <p style="text-align: center;">B 検 出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 第2節 1.1 の B の DNA の抽出の項による。</p> <p>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)]</p>	<p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 0.5 mol/L EDTA 溶液 1.1 の A の 1)による。</p> <p>2) 1 mol/L トリス塩酸緩衝液 1.1 の A の 2)による。</p> <p>3) ホモジナイズ緩衝液 1.1 の A の 3)による。</p> <p>4) TE 緩衝液 1.1 の A の 4)による。</p> <p>5) TAE 緩衝液 1.1 の A の 5)による。</p> <p>6) TBE 緩衝液 1.1 の A の 6)による。</p> <p>7) アガロースゲル 1.1 の A の 7)による。</p> <p>8) <u>ゲルローディング緩衝液</u> 1.1 の A の 8)による。</p> <p>9) 染色液 1.1 の A の 9)による。</p> <p>10) <u>陽性コントロール DNA</u> 市販のとうもろこしミトコンドリア DNA^{注2}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^{注3}し、TE 緩衝液を加えて溶かし、1 mL 中に DNA として 10 µg 程度を含有する陽性コントロール DNA を調製する。</p> <p>11) プライマー溶液 植物検出用プライマー対^{注4}をそれぞれ水で希釈し、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。</p> <p>12) PCR 反応液 1.1 の A の 12)による。</p> <p style="text-align: center;">B 検 出^{注5}</p> <p>DNA の抽出 1.1 の B の DNA の抽出の項による。</p> <p>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：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)]</p>

改正後	現 行
<p>(45 サイクル) →72 °C (5 min 保持)</p> <p>電気泳動 <u>第2節</u> 1.1 の B の電気泳動の項による。</p> <p>判 定 <u>第2節</u> 1.4 の B の判定の項による。</p> <p>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<u>対照</u>試験として実施する。</p> <p>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 (<u>BEX</u> 製)</p> <p>3 <u>〔略〕</u></p> <p>4 植物検出用<u>プライマー対</u> [placon5, placon3] (<u>BEX</u> 製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>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、<u>汚染防止</u>のため陽圧クリーンベンチ内で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (植物検出用<u>プライマー対</u> [placon5, placon3] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 <u>〔略〕</u> ・特異性 <u>〔略〕</u> <p>2~4 <u>〔略〕</u></p> <p><u>〔新設〕</u></p> <p><u>第4節 増幅産物確認試験法</u></p> <p><u>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。</u></p>	<p>(45 サイクル) →72 °C (5 min 保持)</p> <p>電気泳動 1.1 の B の電気泳動の項による。</p> <p>判 定 <u>1.1</u> の B の判定の項による。</p> <p>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<u>コントロール</u>試験として実施する。</p> <p>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 (<u>テキサスジェノミックスジャパン</u>製)</p> <p>3 <u>〔略〕</u></p> <p>4 植物検出用<u>合成 DNA</u> [placon5, placon3] (<u>テキサスジェノミックスジャパン</u>製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>5 試薬等並びに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、<u>コンタミネーション防止</u>のため陽圧の<u>クリーンベンチ</u>内で行う。</p> <p>(参考) 検出感度及び特異性 (植物検出<u>プライマー対</u> [placon5, placon3] を使用した場合)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・検出感度 <u>〔略〕</u> ・特異性 <u>〔略〕</u> <p>2~4 <u>〔略〕</u></p>

改正後	現 行
<p><u>本節において bp (base pair) とあるのは、DNA の塩基対数を表す。</u></p> <p><u>また超純水とは、水を更に電気伝導率 5.6 μS/m 以下（比抵抗 18 MΩ·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 $^{\circ}$C、15 min 以上）又は同等と認められる方法で処理する。</u></p> <p><u>1 ほ乳動物由来 DNA ^{注1}</u> <u>（適用範囲：油脂を除く飼料）</u></p> <p style="text-align: center;"><u>A 試薬等の調製</u></p> <p><u>1) 制限酵素 SmlI ^{注2} 及び MboI ^{注3}</u></p> <p><u>2) TAE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 5)による。</u></p> <p><u>3) TBE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 6)による。</u></p> <p><u>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 $^{\circ}$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。</u></p> <p><u>5) 電気泳動用色素溶液 第2節 1.1 の A の 8)による。</u></p> <p><u>6) ゲル染色液 第2節 1.1 の A の 9)による。</u></p> <p><u>7) DNA 分子量マーカー 20 bp ラダー又は 50 bp ラダーなど目的とする断片サイズを確認できるもの</u></p> <p style="text-align: center;"><u>B 検 出 ^{注4}</u></p> <p><u>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 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</u></p>	

改正後	現 行
<p><u>に混合して、陽性対照反応液を調製する。</u></p> <p><u>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]）</u></p> <p><u>MboI（消化断片サイズ ウシ [148 bp、28 bp]）</u></p> <p><u>反応温度条件：37 °C（MboI）又は 55 °C（SmlI）（60~120 min 保持）</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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、365 nm 又は 312 nm 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。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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</u></p>	

改正後	現 行
<p>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。</p> <p>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。</p> <p>2 <i>SmlI</i> (New England Biolabs 製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>3 <i>MboI</i> (タカラバイオ製) 又はこれと同等の結果が得られるもの</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>2 反すう動物由来 DNA ^{注1} (適用範囲：油脂を除く飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 制限酵素 <i>BlnI</i> ^{注2}</p> <p>2) TAE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 5)による。</p> <p>3) TBE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 6)による。</p> <p>4) アガロースゲル 1 の A の 4)による</p> <p>5) 電気泳動用色素溶液 第2節 1.1 の A の 8)による。</p> <p>6) ゲル染色液 第2節 1.1 の A の 9)による。</p> <p>7) DNA 分子量マーカー 1 の A の 7)による。</p> <p style="text-align: center;">B 検 出^{注3}</p> <p>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</p>	

改正後	現 行
<p><u>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。</u></p> <p><u>制限酵素：BlnI（消化断片サイズ ウシ： [116 bp、85 bp]）</u></p> <p><u>反応温度条件：37 °C（60~120 min 保持）</u></p> <p><u>電気泳動 1 の B の電気泳動の項による。</u></p> <p><u>判定 1 の B の判定の項による。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>4 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。</u></p> <p><u>3 牛由来 DNA ^{注1}</u> <u>（適用範囲：油脂を除く飼料）</u></p> <p><u>A 試薬等の調製</u></p> <p><u>1) 制限酵素 Hpy188III ^{注2}</u></p> <p><u>2) TAE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 5)による。</u></p> <p><u>3) TBE 緩衝液 第2節 1.1 の A の 6)による。</u></p> <p><u>4) アガロースゲル 1 の A の 4)による</u></p> <p><u>5) 電気泳動用色素溶液 第2節 1.1 の A の 8)による。</u></p> <p><u>6) ゲル染色液 第2節 1.1 の A の 9)による。</u></p> <p><u>7) DNA 分子量マーカー 1 の A の 7)による。</u></p>	

改正後	現 行
<p style="text-align: center;"><u>B 検 出^{注3}</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>制限酵素：Hpy188III（消化断片サイズ ウシ： [58 bp、47 bp、21 bp]）</u></p> <p><u>反応温度条件：37 °C（60~120 min 保持）</u></p> <p><u>電気泳動 1 の B の電気泳動の項による。</u></p> <p><u>判定 1 の B の判定の項による。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>2 Hpy188III（New England Biolabs 製）又はこれと同等の結果が得られるもの</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>4 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。</u></p>	

改正後	現 行
<p style="text-align: center;">第 17 章 動物由来たん白質</p> <p>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。</p> <p>第 2 節 各条</p> <p>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。</p> <p>1.1 牛由来たん白質 (1) ELISA による方法 (その 1) ^{注1} (適用範囲：動物質性飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 洗浄液 洗浄液 (10 倍濃縮液) ^{注2} 100 mL <u>に水を加えて 1,000 mL とする。</u></p> <p>2) 基質 ABTS ^{注3} 液 基質 ABTS 濃縮溶液 ^{注2} 0.5 mL をペルオキシドクエン酸緩衝液 ^{注2} 12 mL <u>に混合したもの</u> (調製は使用直前に行う。)</p> <p style="text-align: center;">B 検 出</p> <p>抽 出 〔略〕</p> <p>ELISA 操作 試料溶液、陽性対照液 ^{注4}、陰性対照液 ^{注5} 及び塩化ナトリウム溶液 (0.9 w/v%) 各 100 μL を、抗体固相化モジュール ^{注2} のそれぞれ別のウェル ^{注6} に入れ、シーリングフィルム ^{注7} 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 μL を加えて 3 回繰り返し洗浄する。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>判 定 試料溶液の測定値の平均値が陽性判定基準値 ^{注8} 以上であった場合を陽性と判定し、<u>陽性判定基準値未滿</u>で</p>	<p style="text-align: center;">第 17 章 動物由来たん白質</p> <p>第 1 節 <u>分析用</u>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。</p> <p>第 2 節 各条</p> <p>1 ほ乳動物由来たん白質 水は、<u>滅菌した精製水</u>を用い、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。</p> <p>1.1 牛由来たん白質 (1) ELISA による方法 (その 1) ^{注1} (適用範囲：動物質性飼料)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 洗浄液 洗浄液 (10 倍濃縮液) ^{注2} 100 mL <u>を水で希釈し 1,000 mL とする。</u></p> <p>2) 基質 ABTS ^{注3} 液 基質 ABTS 濃縮溶液 ^{注2} 0.5 mL をペルオキシドクエン酸緩衝液 ^{注2} 12 mL <u>で希釈したもの</u> (調製は使用直前に行う。)</p> <p style="text-align: center;">B 検 出</p> <p>抽 出 〔略〕</p> <p>ELISA 操作 試料溶液、陽性<u>コントロール</u>液 ^{注4}、陰性<u>コントロール</u>液 ^{注5} 及び塩化ナトリウム溶液 (0.9 w/v%) 各 100 μL を、抗体固相化モジュール ^{注2} のそれぞれ別のウェル ^{注6} に入れ、シーリングフィルム ^{注7} 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 μL ずつを加えて 3 回繰り返し洗浄する。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>判 定 試料溶液の測定値の平均値が<u>カットオフ</u>値 ^{注8} 以上であった場合を陽性と判定し、<u>カットオフ</u>値未滿であつ</p>

改正後	現 行
<p>あった場合を陰性と判定する。試験成立条件^{注9}を満たしていない場合には、再試験を行う。</p> <p>注 1~4 [略]</p> <p>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<u>対照液</u>として用いる。</p> <p>6~7 [略]。</p> <p>8 判定の基準となる閾値を意味する。ここでは、陰性<u>対照液</u>の測定値の平均値に 2.5 を乗じた値を<u>陽性判定基準値</u>とする。</p> <p>9 試験成立条件は次のとおり。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・測定した陽性<u>対照液</u>の測定値の平均値が、陰性<u>対照液</u>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<u>対照液</u>の測定値の平均値の 10 %未満であること。 <p>(参考) 検出感度及び特異性 [略]</p> <p>(2) ELISA による方法 (その 2) ^{注1} (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^{注2}を除く。)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 抽出溶媒 抽出溶媒濃縮液-I ^{注3} 50 mL 及び抽出溶媒濃縮液-II ^{注3} 2.5 mL <u>に水を加え 1,000 mL とする。</u></p> <p>2) 洗浄液 洗浄液 (20 倍濃縮液) ^{注3} 50 mL <u>に水を加え</u></p>	<p>た場合を陰性と判定する。試験成立条件^{注9}を満たしていない場合には、再試験を行う。</p> <p>注 1~4 [略]</p> <p>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<u>コントロール液</u>として用いる。</p> <p>6~7 [略]</p> <p>8 判定の基準となる閾値を意味する。ここでは、陰性<u>コントロール液</u>の測定値の平均値に 2.5 を乗じた値を<u>カットオフ値</u>とする。</p> <p>9 試験成立条件は次のとおり。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・測定した陽性<u>コントロール液</u>の測定値の平均値が、陰性<u>コントロール液</u>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<u>コントロール液</u>の測定値の平均値の 10 %未満であること。 <p>(参考) 検出感度及び特異性 [略]</p> <p>(2) ELISA による方法 (その 2) ^{注1} (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^{注2}を除く。)</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) 抽出溶媒 抽出溶媒濃縮液-I ^{注3} 50 mL 及び抽出溶媒濃縮液-II ^{注3} 2.5 mL <u>を水に溶かして 1,000 mL とする。</u></p> <p>2) 洗浄液 洗浄液 (20 倍濃縮液) ^{注3} 50 mL <u>を水で希釈し</u></p>

改正後	現 行
<p>1,000 mL とする。</p> <p>3) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検 出</p> <p>抽 出 〔略〕</p> <p>ELISA 操作 試料溶液、各標準液、陽性<u>対照液</u>^{注3}、陰性<u>対照液</u>^{注3} 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^{注3}のそれぞれ別のウェル^{注5}に入れ、モジュール用ふた^{注3}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。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>判 定 試料溶液の測定値の平均値が<u>陽性判定基準値</u>^{注7}以上であった場合を陽性と判定し、<u>陽性判定基準値未満</u>であった場合を陰性と判定する。試験成立条件^{注8}を満たしていない場合には、再試験を行う。</p> <p>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。</p> <p>このキット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及び乳製品、ゼラチン及びコラーゲンが含まれていれば<u>陽性反応を示すことがある</u>。したがって、使用に当たっては留意すること。</p> <p>2~6 〔略〕</p> <p>7 陰性<u>対照液</u>の平均測定値に 2 を乗じた値を<u>陽性判定基準値</u>とする。</p>	<p>1,000 mL とする。</p> <p>3) 〔略〕</p> <p style="text-align: center;">B 検 出</p> <p>抽 出 〔略〕</p> <p>ELISA 操作 試料溶液、各標準液、陽性<u>コントロール液</u>^{注3}、陰性<u>コントロール液</u>^{注3} 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^{注3}のそれぞれ別のウェル^{注5}に入れ、モジュール用ふた^{注3}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。</p> <p>〔以下略〕</p> <p>判 定 試料溶液の測定値の平均値が<u>カットオフ値</u>^{注7}以上であった場合を陽性と判定し、<u>カットオフ値未満</u>であった場合を陰性と判定する。試験成立条件^{注8}を満たしていない場合には、再試験を行う。</p> <p>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。</p> <p>このキット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及び乳製品、ゼラチン及びコラーゲンが含まれていれば<u>陽性となる</u>。したがって、使用に当たっては留意すること。</p> <p>2~6 〔略〕</p> <p>7 陰性<u>コントロール液</u>の平均測定値に 2 を乗じた値を<u>カットオフ値</u>とする。</p>

改正後	現 行
<p>8 試験成立条件は次のとおり。</p> <ul style="list-style-type: none"> 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。 <p>(参考) 検出感度及び特異性 【略】</p> <p>〔新設〕</p> <p>(3) <u>ELISA による方法 (その 3)</u> ^{注1} <u>(適用範囲：配合飼料及び動物質性飼料)</u></p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1) <u>抽出溶媒 抽出溶媒濃縮液 A 液^{注2} 100 mL、抽出溶媒濃縮液 B 液^{注2} 100 mL 及び抽出溶媒濃縮液 C 液^{注2} 100 mL を混合し、水を加えて 1,000 mL とする。</u></p> <p>2) <u>洗浄液 洗浄液 (20 倍濃縮液) ^{注2} 50 mL に水を加えて 1,000 mL とする。</u></p> <p>3) <u>検体希釈液 検体希釈液 (10 倍濃縮液) ^{注2} 5 mL に水を加えて 50 mL とする。</u></p> <p style="text-align: center;">B 検 出</p> <p><u>抽 出 分析試料 1.0 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、振とう機^{注3}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</u></p>	<p>8 試験成立条件は次のとおり。</p> <ul style="list-style-type: none"> 測定した陽性コントロール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。 測定した陰性コントロール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。 <p>(参考) 検出感度及び特異性 【略】</p>

改正後	現 行
<p><u>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。</u></p> <p><u>ELISA 操作 試料溶液、高濃度及び低濃度陽性対照液^{注4}、動物由来及び植物由来陰性対照液^{注5} 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^{注2}のそれぞれ別のウェル^{注6}に入れ、シール^{注2}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回繰り返し返し洗浄する。</u></p> <p><u>次に、各ウェルに酵素標識抗体溶液^{注2} 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回繰り返し返し洗浄する。</u></p> <p><u>次に、各ウェルに酵素基質溶液^{注2} 100 μL を加え、モジュール用^{注2}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^{注2} 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 ^{注7}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。</u></p> <p><u>判定 試料溶液の測定値の平均値が陽性判定基準値^{注8}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^{注9}を満たしていない場合には、再試験を行う。</u></p> <p><u>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。</u></p>	

改正後	現 行
<p><u>2 キットに付属しているものを使用する。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>7 波長 610~650 nm の範囲内の単波長であればよい。</u></p> <p><u>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。</u></p> <p><u>9 試験成立条件は次のとおり。</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <u>・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。</u> <u>・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。</u> <p><u>(参考) 検出感度及び特異性</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <u>・検出感度</u> <u>配合飼料中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉（原物換算）として 0.1 %程度</u> 	

改正後	現 行
<p><u>魚粉中の牛由来たん白質：牛由来肉骨粉（原物換算）として0.1%程度</u></p> <p><u>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（原物換算）として0.1%程度</u></p> <p><u>検出感度は、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。</u></p> <p>・<u>特異性</u></p> <p><u>検出することを確認済みの動物種：ウシ</u></p> <p><u>検出しないことを確認済みの動物種：ブタ、ニワトリ</u></p>	

改正後	現行
<p style="text-align: center;">第 18 章 病原微生物</p> <p>1 サルモネラ 水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。 培地等で pH の調整を要する場合は、塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) を用いる。</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~5) 〔略〕</p> <p>6) ラパポート・バシリアデイス培地^{注 3} パパイン消化大豆 5 g、塩化ナトリウム 8 g、リン酸二水素カリウム 1.6 g、塩化マグネシウム六水和物 40 g 及びマラカイトグリーンシュウ酸塩 40 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 5.1~5.3 に調整する。<u>これを 200 mL の培養瓶に 100 mL 分注する。</u></p> <p>〔以下略〕</p> <p style="text-align: center;">第 19 章.第 20 章 〔略〕</p>	<p style="text-align: center;">第 18 章 病原微生物</p> <p>1 サルモネラ 水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。 培地等で pH の調整を要する場合は、塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) を用いる。</p> <p style="text-align: center;">A 試薬等の調製</p> <p>1)~5) 〔略〕</p> <p>6) ラパポート・バシリアデイス培地^{注 3} パパイン消化大豆 5 g、塩化ナトリウム 8 g、リン酸二水素カリウム 1.6 g、塩化マグネシウム六水和物 40 g 及びマラカイトグリーンシュウ酸塩 40 mg を水 1,000 mL に加え、沸騰水浴中で加熱して溶かし、pH を 5.1~5.3 に調製する。</p> <p>〔以下略〕</p> <p style="text-align: center;">第 19 章.第 20 章 〔略〕</p>

改正後	現 行
<p>別表 1</p> <p>試薬で特級とあるのは、工業標準化法（昭和 24 年法律第 185 号）に基づく日本工業規格の一般試薬の特級の規格に該当するものを、また、日局とあるのは、薬事法（昭和 35 年法律第 145 号）に基づく日本薬局方の規格に該当するものを示す。</p> <p>また、CAS とあるのは、アメリカ化学会発行の <i>Chemical Abstracts</i> 誌で使用される化合物登録番号を示す。</p> <p>〔中略〕</p> <p>メビンホス $C_7H_{13}O_6P$ (CAS : 7786-34-7)</p> <p><u>メラミン $C_3H_6N_6$ (CAS : 108-78-1)</u></p> <p>2-メルカプトエタノール C_2H_6OS (CAS : 60-24-2) 無色液体 水、エタノール及びエーテルに可溶</p> <p>〔以下略〕</p>	<p>別表 1</p> <p>試薬で特級とあるのは、工業標準化法（昭和 24 年法律第 185 号）に基づく日本工業規格の一般試薬の特級の規格に該当するものを、また、日局とあるのは、薬事法（昭和 35 年法律第 145 号）に基づく日本薬局方の規格に該当するものを示す。</p> <p>また、CAS とあるのは、アメリカ化学会発行の <i>Chemical Abstracts</i> 誌で使用される化合物登録番号を示す。</p> <p>〔中略〕</p> <p>メビンホス $C_7H_{13}O_6P$ (CAS : 7786-34-7)</p> <p>2-メルカプトエタノール C_2H_6OS (CAS : 60-24-2) 無色液体 水、エタノール及びエーテルに可溶</p> <p>〔以下略〕</p>