

技術レポート**2 共通試料による飼料中の動物由来たん白質（牛）の検出法の共同試験**武田 然也^{*1}, 橋本 仁康^{*2}, 山本 貴之^{*3}**Collaborative Study on the Detection of Bovine Protein in Feed**Zenya TAKEDA^{*1}, Yoshiyasu HASHIMOTO^{*2} and Takayuki YAMAMOTO^{*3}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center (Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan), ^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department, ^{*3} Morinaga Institute of Biological Science, Inc.)

1 緒 言

我が国では、牛海綿状脳症（BSE）発生防止のために、飼料への牛由来たん白質の使用は禁止されている¹⁾。牛由来たん白質の飼料への混入や交差汚染の有無を確認する方法の1つとして、ELISA法が用いられており、飼料分析基準²⁾には数種の市販の動物種別たん白質検出キットが定められている。ただしこれらのキットは、反応性の違いから、検査の対象飼料の適用範囲が限られており、適用範囲の拡大が求められていた。キットの利便性を高めるために、森永生科学研究所では、「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」（以下「モリナガキット Ver.2」という。）を開発した。当該キットを用いた牛由来たん白質検出法は、各種飼料への適用が可能であることが示され³⁾、2011年に飼料分析基準に追加されたところである。

今回、モリナガキット Ver.2 を用いた飼料中の牛由来たん白質検出法の再現性を確認するための共同試験を実施したので、その概要を報告する。

2 実験方法**2.1 試 料**

肉用牛肥育用配合飼料、脱脂粉乳として20%相当量を混合した肉用牛肥育用配合飼料、魚粉、原料混合肉骨粉2種類及び豚肉骨粉に、それぞれ牛肉骨粉を0.05%及び0.1%添加した試料を調製し、共同試験に供した。調製に用いた各飼料原料及び配合飼料は、各々の国内製造業者製造のものを用いた。試料の調製にあたって、配合飼料はあらかじめ粒径1mm程度になるまで粉碎し、その他の試料は粉碎せずに用いた。更に、豚肉骨粉等は、反すう動物由来DNAが含まれていないこと、それ以外の試料は、牛由来DNAが含まれていないことを、PCR法により確認した。各試料はそれぞれ300g程度調製し、およそ50個に小分けした。小分けした試料については、ランダムに10点ずつ分析を行い、試料が均質であり、試験に使用することに問題が無いことを確認した。

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター、現 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*3} 株式会社森永生科学研究所

2.2 試薬

森永生科学研究所製「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」

2.3 装置及び器具

- 1) 粉砕器：岩谷産業製 IFM-300DG
- 2) 振とう機：Scientific Industries 製 VORTEX-GENIE2
- 3) 遠心分離器：BECKMAN 製 Allegra 6 centrifuge
- 4) マイクロプレートリーダー：TECAN 製 Sunrise Rainbow Thermo
- 5) プレートウォッシャー：ファスマック製 簡易型 96 穴プレート洗浄器
- 6) シングルチャンネルマイクロピペット：BIOHIT 製 m1000 (100~1000 μ L)
- 7) 8チャンネルマイクロピペット：Eppendorf 製 Research M (30~300 μ L)

2.4 試験方法

共同試験（その 1）においては飼料研究報告第 36 号技術レポート 2³⁾に記載の方法によった。
共同試験（その 2）においては飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1(3)²⁾に規定された方法によった。

2.5 結果の解析

各試験室の結果から、それぞれの試料についての偽陽性率及び偽陰性率を算出した。更に分析法の室間再現精度を推定するために、accordance, concordance 及び COR を求めた。

定性分析法の性能指標として accordance, concordance 及び COR (concordance odds ratio) がある⁴⁾。それらの指標は以下の式で定義される。

$$\text{accordance (\%)} = \frac{\text{同一試験室内で同じ結果 (++) または (--)} \text{を示したペア数の全試験室の合計}}{\text{全ペア数}} \times 100$$

$$\text{concordance (\%)} = \frac{\text{試験室間で同じ結果 (++) または (--)} \text{を示したペア数の全試験室の合計}}{\text{全ペア数}} \times 100$$

$$\text{COR} = \frac{\text{accordance (\%)} \times \{100 - \text{concordance (\%)}\}}{\text{concordance (\%)} \times \{100 - \text{accordance (\%)}\}}$$

Accordance 及び concordance は、それぞれ定量分析法の併行精度及び室間再現精度に対応する⁵⁾。COR が大きいほど、試験室間の結果の違いが大きいことを意味する。Accordance が 100 % のとき COR は無限大になるが、accordance と concordance が両方とも 100 % のときは試験室内も試験室間も同じ結果が得られる確率は等しいので COR は 1 とする。

3 参加試験室

3.1 共同試験（その 1）

一般団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，全国酪農業協同組合連合会分析センター，JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部分析センター，農林水産省動物検疫所精密検査部，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同仙台センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計 11 試験室）

3.2 共同試験（その2）

一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，全国酪農業協同組合連合会分析センター，JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部分分析センター，農林水産省動物検疫所精密検査部，株式会社森永生科学研究所，独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，同札幌センター，同名古屋センター，同神戸センター及び同福岡センター（計 11 試験室）

4 結果及び考察

4.1 共同試験（その1）

2.1 に示した試料を用い，3.1 に示した 11 試験室において，2.4 に従い共同試験（その1）を実施した．その結果は Table 1 のとおりである．なお，1 試験室については，全体的に吸光度が低く分析結果に疑義があったため，この試験室の結果は棄却することとし，残りの 10 試験室の結果を示した．牛肉骨粉無添加試料では，豚肉骨粉及び原料混合肉骨粉 2 について，偽陽性率がそれぞれ 30 %及び 10 %であった．牛肉骨粉 0.05 %添加試料では，偽陰性率が 25~65 %と高く，COR も 4.4 から無限大と高い値を示した．牛肉骨粉 0.1 %添加試料では，全ての試料において，偽陰性率は 0 %，accordance 及び concordance はそれぞれ 100 %，COR は 1 であった．

Table 1 Collaborative study (part1) results of Morinaga Ver.2 assay

(+/- : Detected/Not detected)

Lab. No.	Contamination level of bovine MBM								
	Formula feed			Formula feed containing 20 % dried skim milk			Fish meal		
	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)
1	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
2	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
3	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
4	-,-	+,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
5	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
6	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
7	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
8	-,-	+,+	+,+	-,-	+,-	+,+	-,-	+,+	+,+
9	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
10	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
False positive rate (%)	0	—	—	0	—	—	0	—	—
False negative rate (%)	—	35	0	—	65	0	—	60	0
Accordance (%)	100	90	100	100	90	100	100	100	100
Concordance (%)	100	50	100	100	50	100	100	47	100
COR	1.0	9.0	1.0	1.0	9.0	1.0	1.0	∞	1.0

Lab. No.	Contamination level of bovine MBM								
	Porcine and chicken MBM 1			Porcine and chicken MBM 2			Porcine MBM		
	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)
1	-,-	+,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
2	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	+,+	+,+	+,+
3	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	+,-	+,+	+,+
4	-,-	+,+	+,+	-,-	+,-	+,+	-,-	+,+	+,+
5	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
6	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
7	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	+,-	+,+	+,+
8	-,-	+,+	+,+	+,+	+,+	+,+	+,+	+,+	+,+
9	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
10	-,-	+,+	+,+	-,-	+,-	+,+	-,-	+,+	+,+
False positive rate (%)	0	—	—	10	—	—	30	—	—
False negative rate (%)	—	25	0	—	40	0	—	30	0
Accordance (%)	100	90	100	100	80	100	80	100	100
Concordance (%)	100	59	100	80	48	100	54	53	100
COR	1.0	6.3	1.0	∞	4.4	1.0	3.3	∞	1.0

4.2 共同試験（その2）

共同試験（その1）により、配合飼料や魚粉では良好な結果が得られたが、豚肉骨粉については偽陽性が多数検出されたため、分析法の改良が必要とされた。そこで、ELISA 反応時に外気による反応液への影響を防ぐため、プレートをシールで密封し、25 °C で反応を行うことを

ELISA 操作に加えた方法により、共同試験（その 2）を実施した。試料は、共同試験（その 1）で偽陽性の認められた豚鶏混合肉骨粉 2 及び豚肉骨粉、並びに対照として共同試験（その 1）で良好な結果が得られている肉用牛肥育用配合飼料を用いた。

共同試験（その 2）は、3.2 に示した 11 試験室において、2.4 に従い実施した。その結果は Table 2 のとおりである。牛肉骨粉無添加試料及び牛肉骨粉 0.1 % 添加試料では、全ての試料において偽陰性率及び偽陽性率はそれぞれ 0 %，accordance 及び concordance はそれぞれ 100 %，COR は 1 であった。牛肉骨粉 0.05 % 添加試料では、偽陰性率が 18~32 %，COR は 1.3~9.0 であった。

以上より、共同試験（その 2）では、良好な結果が得られ、全試験室において偽陽性がなく、また、0.1 % 添加された牛肉骨粉を検出可能であった。

Table 2 Collaborative study (part2) results of Morinaga Ver.2 assay

(+/- : Detected/Not detected)

Lab. No.	Contamination level of bovine MBM								
	Formula feed			Porcine and chicken MBM 2			Porcine MBM		
	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)	0 (%)	0.05 (%)	0.1 (%)
1	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
2	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+
3	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
4	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
5	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
6	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
7	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+
8	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+
9	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+
10	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
11	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
False positive rate (%)	0	—	—	0	—	—	0	—	—
False negative rate (%)	—	18	0	—	32	0	—	27	0
Accordance (%)	100	82	100	100	91	100	100	64	100
Concordance (%)	100	68	100	100	53	100	100	58	100
COR	1.0	2.1	1.0	1.0	9.0	1.0	1.0	1.3	1.0

5 まとめ

飼料中の動物由来たん白質（牛）の検出法について共同試験を行い、以下の結果を得た。

- 1) 共同試験（その 1）では、豚肉骨粉等で一部偽陽性を認めたが、ELISA 反応時にプレートをシールで密閉し 25 °C で保温することにより、良好な結果が得られた。
- 2) モリナガキット Ver.2 は、飼料中に 0.1 % 以上混入した牛肉骨粉を検出可能であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、全国酪農業協同組合連合会分析センター、JA 東日本くみあい飼料株式会社品質安全部分析センター、農林水産省動物検疫所精密検査部、株式会社森永生科学

研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

また、本検討に際して試料の提供をいただいた明治飼糧株式会社鹿島工場，北海道道南畜産事業協同組合，株式会社群馬県化成産業，富士化学株式会社の関係各位にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について，平成 17 年 3 月 11 日，16 消安第 9573 号 (2005).
- 2) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料分析基準の制定について，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 3) 武田 然也，橋本 仁康，山本 貴之：飼料中の牛由来たん白質検出法における「モリナガ加熱処理牛由来タンパク質検出キット Ver.2」の検討，飼料研究報告，**36**，91-100 (2011).
- 4) Langton S.D., et al., Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. *Int J. Food Microbiol.*, **79**, 175-181 (2002)
- 5) 安井明美ら：食品分析法の妥当性確認ハンドブック，サイエンスフォーラム，95-97 (2010).