

技術レポート

3 加工食品残さを含む動物質性飼料中の牛由来たん白質の検出法の検討

橋本 仁康^{*}, 山多 利秋^{*}, 會田 紀雄^{*}

Study of Detection Test for Contamination of Bovine Protein in Animal By-product Feed Ingredients Containing Food Industrial Waste

Yoshiyasu HASHIMOTO^{*}, Toshiaki YAMATA^{*} and Norio AITA^{*}

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

1 緒 言

我が国では BSE 発生防止の観点から、動物由来たん白質の飼料への利用は原則禁止されている。しかし、適切な製造方法によって製造され、反すう動物由来たん白質の混入のおそれがないことを農林水産大臣が確認（以下「大臣確認」という。）したものについては、飼料への利用が認められている¹⁾。今般、「食品の製造工程において発生した残さ」のうち、牛等（牛、めん羊、山羊及びしか）に由来するたん白質を含む食品の製造工程とは完全に分離された製造工程で発生したものであることを農林水産大臣が確認したもの（以下「加工食品残さ」という。）について、豚、鶏、うずら及び養殖水産動物用の飼料原料とすることが可能となった²⁾。

現在、飼料分析基準³⁾に規定されている方法に用いる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」という。）については、開発当時、加工食品残さが飼料原料に使用されることが想定されなかったため、加工食品残さに対する反応性の検証がなされていなかった。このため、今回改めて市販の加工食品を加熱、乾燥したものを扱い、その特異性を確認することとした。

また、加工食品残さを構成する原材料は多種多様であることを考慮した場合、モリナガキットが抗原抗体反応を利用している以上、原材料の組み合わせ等により非特異的な反応をする可能性を否定できない。この観点から、株式会社森永生科学研究所は、加工食品残さを原料とする動物由来たん白質飼料を対象とした牛由来たん白質の混入確認の試験において、より非特異反応を起こしにくいと予想される試験法（以下「モリナガキット改良法」という。）を開発し、FAMIC ではこの方法について再現精度等を検討したので、その概要を報告する。

なお、このモリナガキット改良法は、加工食品残さを原料とする動物質性飼料中の牛由来たん白質の確認試験法として、既に平成 26 年 10 月 27 日付けで通知されている⁴⁾。

*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

2 実験方法

2.1 試薬

- 1) ELISA キット：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
- 2) 抽出溶媒：ELISA キットに付属の抽出溶媒濃縮液 A 液 100 mL, 抽出溶媒濃縮液 B 液 100 mL 及び抽出溶媒濃縮液 C 液 100 mL を混合し, 水を加えて 1000 mL とした.
- 3) 洗浄液：ELISA キットに付属の洗浄液 (20 倍濃縮液) 50 mL に水を加えて 1000 mL とした.
- 4) 検体希釈液：ELISA キットに付属の検体希釈液 (10 倍濃縮液) 5 mL に水を加えて 50 mL とした.
- 5) 検体希釈液 II：検体希釈液 1 mL に抽出溶媒 19 mL を加えた.
- 6) 高濃度陽性対照液, 低濃度陽性対照液, 動物由来陰性対照液, 植物由来陰性対照液, 抗体固相化モジュール, 酵素標識抗体溶液, 酵素基質溶液及び反応停止液は, ELISA キットに付属のものを用いた.

2.2 装置及び器具

- 1) 振とう機：VORTEX-GENIE2 Science Industries 製
- 2) マイクロプレートリーダー：Sunrise Rainbow Thermo TECAN 製

2.3 試料

- 1) モリナガキットの加工食品残さに対する特異性確認試験に用いた試料
 - i) 牛肉骨粉：平成 13 年に輸入されたオーストラリア産肉骨粉を 1 mm のふるいを通過するまで粉碎したものをを用いた.
 - ii) 偽陽性確認試験用試料：市販の加工食品及び調味料類でその加工残さが動物由来たん白質飼料原料として用いられる可能性があり, 反すう動物由来原料が原材料表示に記載されていないもの, あわせて 34 品目を加工食品残さの代替として用いた (表 1). なお, 偽陽性確認用試料は動物由来たん白質飼料の製造工程を擬似的に再現する必要があるため, 固形状のものは細断後, 121 °C で 20 分間オートクレーブ処理し, 目視で乾燥したと判断出来るまで 105 °C で乾燥した後, ミルサーで粉碎して調製した. また, 液状のものは, 121 °C で 20 分間オートクレーブ処理して調製した.
 - iii) 偽陰性確認試験用試料：表 1 に示した試料約 0.4 g をポリエチレン製チューブに採取後, 牛肉骨粉を 0.5 %及び 1 %相当量になるように各チューブに直接添加したものをを用いた.
- 2) モリナガキット改良法の共同試験に用いた試料
 - i) 牛肉骨粉：2.3 の 1)の i)と同じものをを用いた.
 - ii) 陰性確認用試料：豚肉骨粉, ポークチキンミール, チキンミール, フェザーミール及び魚粉は, 国内製造のものをを用い, 1 mm のふるいを通過するまで粉碎し, 飼料分析基準収載法による ELISA 分析で陰性を確認したものをを用いた.
 - iii) 牛肉骨粉添加試料：各陰性確認用試料に牛肉骨粉を 0.5 %又は 1 %相当量になるように添加 (100 g 程度調製) し, 約 1 g ずつ分取して各 50 個の牛肉骨粉添加試料とした.

2.4 試験方法

- 1) 飼料分析基準収載法
飼料分析基準第 17 章第 2 節 1.1 の(3)によった.

2) モリナガキット改良法

i) 抽出

分析試料 0.4 g を量ってポリエチレン製チューブに入れ、抽出溶媒 19.6 mL を加え、振とう機で 30 秒間ずつ 3 回振り混ぜた。これを沸騰水浴中で 10 分間加熱し、放冷後、3000×g で 10 分間遠心分離し、上澄み液をろ紙（5 種 A）でろ過した。このろ液 50 μL に検体希釈液 950 μL を加え混合した。この液 100 μL に検体希釈液 II 300 μL を加え混合したものを ELISA 操作に供する試料溶液とした。

ii) ELISA 操作

試料溶液、高濃度及び低濃度陽性対照液、動物由来及び植物由来陰性対照液並びに検体希釈液（空試験溶液とした。）各 100 μL を、抗体固相化モジュールのそれぞれ別のウェルに入れ、シールをして密閉し軽く振り混ぜた後、25 °C で 1 時間静置した。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 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルに酵素標識抗体溶液 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 時間静置した。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 回繰り返し洗浄した。

次に、各ウェルにキット添付の酵素基質溶液 100 μL を加え、ふたをして軽く振り混ぜた後、25 °C で 20 分間遮光して静置した。更に各ウェルにキット添付の反応停止液 100 μL を加え、酵素反応を停止させた。30 分以内に各ウェルの 450 nm 及び 620 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 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した。なお、各試料溶液は、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った。

iii) 判定

試料溶液の測定値の平均値が低濃度陽性対照液の平均測定値以上であった場合を陽性と判定した。ただし、モリナガキットの試験成立条件（空試験溶液、動物由来及び植物由来陰性対照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）を満たさない場合は、試験を不成立とした。

3 結果及び考察

3.1 モリナガキットの加工食品残さに対する特異性確認試験

モリナガキットについては、配混合飼料及び飼料原料として使用される穀類、油かす類、動物由来たん白質飼料等に対する特異性を既に確認しているが⁵⁾、加工食品残さに対する特異性は確認していない。そこで、偽陽性を示すことがないかを確認するため、表 1 に示した試料を用い、飼料分析基準収載法により各試料につき 2 点併行で分析を実施した。その結果、表 1 のとおり、偽陽性を示すものはなかった。

次に、加工食品残さが偽陰性を示すことがないかを確認するため、2.3 の 1) の iii) の偽陰性確認用試料を用い、モリナガキット改良法により各試料につき 2 点併行で分析を実施した。その結果、表 1 のとおり、牛肉骨粉を 1 %相当量添加したものではすべて陽性が確認され、偽陰性を示したものはなかった。

表 1 特異性試験に使用した試料並びにその偽陽性及び偽陰性試験結果

(+:陽性, -:陰性)

試料	原材料	偽陽性試験結果*	偽陰性試験結果**	
			0.5%牛MBM添加	1%牛MBM添加
ロースハム	豚ロース肉, 糖類(水あめ, 砂糖), 卵たん白, 植物性たん白, 食塩, 乳たん白, ポークエキス, 調味料(有機酸等), リン酸塩(Na), 増粘多糖類, カゼインNa, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), コチニール色素, 香辛料, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
ペッパーボンレスハム	豚もも肉, 食塩, 砂糖, 香辛料, ブラックペッパー, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(硝酸K, 亜硝酸Na)	-, -	+, -	+, +
ベーコン	豚ばら肉, 糖類(水あめ, 砂糖), 乳たん白, 食塩, 植物性たん白, 卵たん白, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), くん液, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), コチニール色素, 香辛料, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, -	+, +
ベーコン(糖質ゼロ)	豚ばら肉, 卵たん白, 食塩, 乳たん白, 大豆たん白, 豚コラーゲン, 酵母エキス, 調味料(有機酸等), リン酸塩(Na), カゼインNa, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), コチニール色素, 甘味料(アセスルファムK, スクラロース, ネオテーム), 香辛料	-, -	+, -	+, +
焼豚	豚肉, 糖類(砂糖, 水あめ), 植物性たん白, 食塩, しょうゆ, 卵たん白, みりん, カゼインNa, 着色料(野菜色素, カラメル, コチニール), 調味料(アミノ酸等), リン酸塩(Na), 増粘多糖類, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), (原材料の一部に乳成分, 小麦を含む)	-, -	+, -	+, +
豚角煮	豚ばら肉, 砂糖, 水あめ, 発酵調味料, しょうゆ, でん粉, 異性化液糖, たん白加水分解物, みりん風調味料, 食塩, 香辛料, 卵たん白, ポークエキス, オリゴ糖, こんぶエキス, かつお節エキス, 調味料(アミノ酸等), カラメル色素, 増粘多糖類, 酸味料, (原材料の一部に小麦を含む) ※乳, 卵, 小麦, えびやかにを含む原料を使用した設備で生産	-, -	+, +	+, +
粗挽きポークウインナー	豚肉, 豚脂肪, 糖類(水あめ, ぶどう糖, 砂糖), 食塩, 香辛料, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na)	-, -	+, -	+, +
ウインナーソーセージ	豚肉, 鶏肉, 結着材料(ポーク粗ゼラチン, 大豆たん白), 豚脂肪, 還元水あめ, 食塩, ポークエキス, 水あめ, 香辛料, 加工デンプン, 未焼成Ca, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), pH調整剤, 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na), 香辛料抽出物	-, -	-, -	+, +
魚肉ソーセージ	魚肉(たら, たちうお, ほっけ, その他), 結着材料(でん粉, ベース状小麦たん白, 粉末状大豆たん白) 植物油, 砂糖, 食塩, 醸造酢, 香味食用油, オニオンエキス, 香辛料, かつおエキス, 酵母エキス, 加工でん粉, 炭酸Ca, 調味料(アミノ酸等), 骨Ca, 着色料(クチナシ, トマトリコピン), 香辛料抽出物, 香料, (原材料の一部にかに, さけを含む)	-, -	+, +	+, +
ソーセージステーキ	豚肉, 豚脂肪, でん粉, 水あめ, 食塩, 砂糖, ぶどう糖, 香辛料, リン酸塩(Na), 調味料(アミノ酸), 酸化防止剤(ビタミンC), 発色剤(亜硝酸Na)	-, -	+, +	+, +
チルドハンバーグ(チキン)	鶏肉, たまねぎ, パン粉(小麦を含む), ウスターソース, 砂糖, しょうゆ(大豆・小麦を含む), 水あめ, 食塩, 香辛料, 醸造酢(小麦を含む), 揚げ油(なたね油), ソース[ウスターソース, 砂糖, トマトペースト, たまねぎ, しょうゆ(大豆, 小麦を含む), 醸造酢(小麦を含む), でん粉, りんごペースト, 食塩, 香辛料]	-, -	+, +	+, +
甘酢あん肉だんご	鶏肉, たまねぎ, つなぎ(パン粉, でん粉), 粒状大豆たん白, 砂糖, おろししょうが, 食塩, りんご酢, たれ(砂糖, しょうゆ, みりん, 醸造酢, ごま, ごま油, カツオブシエキス, おろししょうが, 香辛料), 増粘剤(加工でん粉), 着色料(カラメル, 紅麹, ラクト), (原材料の一部に小麦, 乳を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍鶏の唐揚げ	鶏肉, 植物油, 砂糖, しょうゆ, 粉末状植物性たん白, 食塩, 鶏油, チャツネ, 粉末卵白, 香辛料, しょうゆ加工品, こんにやく粉, 衣(コーンフラワー, デンプン, 粉末状植物性たん白, 食塩, 粉末しょうゆ, トマトパウダー, 大豆粉, 香辛料, 粉末卵白, 紅茶エキスパウダー), 揚げ油(大豆油), 加工でん粉, 酢, トレハロース, 増粘多糖類, リン酸塩(Na), アセロラ濃縮果汁, 甘味料(ソーマチン), 膨張剤, 乳化剤, (原材料の一部に小麦, 乳成分, りんごを含む)	-, -	+, +	+, +
チキンスターキ	鶏肉, 糖類(水あめ, 砂糖), 食塩, 植物性たん白, 香辛料, 卵白, でん粉, レモンパウダー, チキンコンソメ, 調味料(有機酸等), pH調整剤, 加工でん粉, カラメル色素, 増粘剤(加工でん粉), グリシン, リン酸塩(Na), 香料, (原材料の一部に乳成分, 小麦, 大豆, ゼラチンを含む) ※乳, 卵, 小麦, えびやかにを含む原料を使用した設備で生産	-, -	+, +	+, +
冷凍餃子	野菜(キャベツ, たまねぎ, にら, にんにく), 食肉(豚肉, 鶏肉), 豚脂, 粒状大豆たん白, 卵白, ごま油, 食塩, 清酒, 砂糖, ゼラチン(豚), オイスターソース, 香辛料, 皮(小麦粉, なたね油, 米粉, 食塩, でん粉, 大豆粉, しょうゆ), 調味料(アミノ酸等), 増粘剤(キサンタン), 乳化剤, カゼインNa, (その他 乳成分由来原材料を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍焼売	豚肉, 玉ねぎ, 豚脂肪, 砂糖, 小麦たん白, しょうゆ, 食塩, オイスターソース, 香辛料, 皮(小麦粉, 卵黄, 砂糖, 大豆粉, 食塩), 加工デンプン, 調味料(アミノ酸等), カラメル色素	-, -	+, +	+, +

*: 飼料分析基準収載法にて分析

**: モリナガキット改良法にて分析

表 1 特異性試験に使用した試料並びにその偽陽性及び偽陰性試験結果 (続き)

(+:陽性, -:陰性)

試料	原材料	偽陽性試験結果*	偽陰性試験結果**	
			0.5%牛MBM添加	1%牛MBM添加
さつま揚げ	魚肉(ニシン, タラ, アジ, グチ, その他), 大豆たん白, 馬鈴薯でん粉, ぶどう糖, 魚介エキス, 食塩, 発酵調味料, 砂糖, 植物油	-, -	+, +	+, +
つみれ	魚肉, 植物性たん白, でん粉, 卵白, 砂糖, 食塩, 魚醤, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), 酸化防止剤(チャ抽出物), (原材料の一部に小麦, 大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
すじ	魚肉, コラーゲン, 食塩, 植物性たん白, しょうゆ, 砂糖, 卵白, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), 酒精, (原材料の一部に小麦, ゼラチンを含む)	-, -	+, +	+, +
とり肉だんご	鶏肉(鹿児島県産), 液体調味料(砂糖, 米発酵調味料, 水あめ, おろし生姜, たん白加水分解物, 食塩, 醤油, かつおエキス, ポークエキス, 濃縮デーツ果汁, 酵母エキス, こしょう末), 鶏軟骨, たまねぎ, パン粉, 植物性油脂, 甘しょでん粉, 鶏皮, 青ネギ, にんじん, 砂糖, 酸味料, 調味料(アミノ酸等), 増粘多糖類, (原材料の一部に小麦, さば, 大豆, 鶏肉, 豚肉を含む)	-, -	+, -	+, +
はんぺん	魚肉, 卵白, でん粉, 砂糖, 食塩, 発酵調味液, やまいも, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), セルロース, pH調整剤, 増粘多糖類, (原材料の一部に小麦, 大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
ちくわ	魚肉, 卵白, でん粉, 砂糖, 発酵調味液, 食塩(天日結晶塩77%, 藻塩23%), ぶどう糖, 植物油, 調味料(アミノ酸等), 加工でん粉, 貝Ca, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
蒲鉾	魚肉(たら, ぐち, たい), 食塩(天日結晶塩94%, 藻塩6%), 砂糖, 発酵調味液, 魚介エキス, 卵白, でん粉, 植物油, 酵母エキス, 調味料(アミノ酸等), 加工でん粉, 貝Ca, 着色料(コチニール), (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	-, -	+, +
カニかま	魚肉, 卵白, でん粉, 砂糖, 食塩, 発酵調味液, 魚介エキス, コラーゲン, 大豆たん白, 植物油, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), セルロース, 香料, 着色料(パプリカ色素, トマト色素), 貝Ca, (原材料の一部に小麦, えび, かに, ゼラチンを含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍焼きめし	うるち米(国内産), 野菜(ねぎ, にんじん, たまねぎ), 全卵, 植物油, 豚肉, しょうゆ, かまぼこ, 食塩, 卵黄, 砂糖, チキンエキス, 魚醤, 粉末状植物性たん白, 大豆多糖類, ぶどう糖, でん粉分解物, チャーシューペースト, 香辛料, 香味油脂, 卵白粉, 乳たん白, でん粉, 小麦粉, 大豆粉, 加工デンプン, 調味料(アミノ酸等), トレハロース, 酸味料, リン酸塩(Na), 香料, 着色料(カロチノイド, コチニール), 貝Ca, [原材料の一部に乳成分, 魚醤(魚介類)を含む]	-, -	+, -	+, +
冷凍たこ焼き	野菜(キャベツ, ねぎ), たこ, 小麦粉, 全卵, 植物油, 揚げ玉, やまいも, 米粉, 砂糖, でん粉, ねぎ, 紅しょうが, 食塩, かつお節粉末, こんぶエキス, デキストリン, 乳たん白, こんぶ粉末, かつおエキス, たん白加水分解物, 加工でん粉, 調味料(アミノ酸等), ベーキングパウダー, 紅麴色素, 炭酸Na, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍エビフライ	衣(パン粉, 鶏卵粉, 小麦粉, 砂糖, パーム油, 食塩, でん粉, 粉末状植物性たん白, こしょう), えび, 加工でん粉, リン酸塩(Na), pH調整剤, 焼成Ca, 調味料(アミノ酸), ベーキングパウダー, アナトー色素, 増粘剤(ゲアー), 乳化剤, 香辛料抽出物, (原材料の一部に大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍トンカツ	豚肉, 豚脂, つなぎ(粉末状植物性たん白, パン粉, でん粉), ポークブイヨン, 粉末卵白, しょうゆ, 食塩, 砂糖, 鶏卵, 植物油, 卵殻粉, 香辛料, 衣(パン粉, 植物油, でん粉, 粉末卵白, コーンフラワー, 食塩), 揚げ油(なたね油), 加工でん粉, 酢, 増粘剤(キサンタンガム), ゲル化剤(増粘多糖類), アセロラ濃縮果汁, (原材料の一部に乳製品を含む)	-, -	+, +	+, +
冷凍カキフライ	カキ(広島産), 衣(パン粉, 小麦粉, でん粉, ぶどう糖, 植物性たん白), 加工でん粉, 増粘剤(ゲアーガム), アナトー色素(原材料の一部に乳, 大豆の成分を含む)	-, -	+, +	+, +
鰻の蒲焼き	うなぎ(愛知県), タレ[しょうゆ, ぶどう糖果糖液糖, 発酵調味料, みりん, 砂糖, 水あめ, 着色料(カラメル, アナトー), 増粘剤(加工澱粉, 増粘多糖類), 調味料(アミノ酸等)]	-, -	-, -	+, +
焼肉のタレ	果実類(りんご, 桃, 梅), 醤油, 砂糖, アミノ酸液, 野菜類(にんにく, 玉ねぎ), 蜂蜜, 還元水あめ, 食塩, 発酵調味料, りんご酢, 白ごま, 蛋白加水分解物, オニオンエキス, ごま油, 香辛料, ポークエキス, カラメル色素(原材料の一部に小麦, 大豆を含む)	-, -	+, +	+, +
中華スープの素	食塩, 肉エキス(ポーク, チキン), 野菜エキス, 動植物油脂, 砂糖, 乳糖, 小麦粉, 香辛料, 調味料(アミノ酸等)	-, -	+, -	+, +
チキンコンソメ	乳糖, 食塩, 鶏肉, 食用油脂, チキンエキス, 酵母エキス, デキストリン, チキンファット, たまねぎ, しょうゆ, 香辛料, 調味料(アミノ酸等), カラメル色素, 酸味料, (小麦を原材料の一部に含む)	-, -	+, -	+, +
鶏ガラスープの素	食塩, 乳糖, チキンエキス, 砂糖, 酵母エキス, ポークエキス, 野菜エキス, 香辛料, 加工でん粉	-, -	+, -	+, +

*: 飼料分析基準記載法にて分析

**: モリナガキット改良法にて分析

原材料は商品表示に準じた。

3.2 共同試験に用いた試料の均質性確認

2.3 の 2)で調製した試料からランダムに各 10 本を選び、株式会社森永科学研究所にて新たに開発された 2.4 の 2)の試験法を用いて 1 分析あたり 2 点併行分析を行った。

その結果は表 2 のとおりであり、牛肉骨粉を 1 %相当量添加したものでは、すべて陽性となった。しかし、牛肉骨粉を 0.5 %相当量添加したものでは、飼料の種類により 5~80 %と感度が異なる結果が得られた。これは、今回試験に用いた魚粉などに牛肉骨粉を 0.5 %相当量添加したものでは陽性と判断できる十分な感度が得られていないと考えられ、調製した試料の均質性には問題ないものと判断し、共同試験に用いることとした。

表 2 共同試験に用いた試料の均質性試験結果

試料番号		(+:陽性, -:陰性)													
		魚粉1		魚粉2		チキンミール1		チキンミール2		豚鶏混合肉骨粉1		豚鶏混合肉骨粉2		豚肉骨粉	
		0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*	0.5%*	1.0%*
1	1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
2	1	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
	2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
3	1	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	1	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	1	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
6	1	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
7	1	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
9	1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10	1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	2	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
陽性数		6	20	1	20	16	20	10	20	15	20	10	20	15	20
感度 (%)		30	100	5	100	80	100	50	100	75	100	50	100	75	100

※ 牛肉骨粉の添加濃度

3.3 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、2.3 の 2)の陰性確認用試料及び同牛肉骨粉添加試料（魚粉 2 点、チキンミール 2 点、ポークチキンミール 2 点及び豚肉骨粉 1 点）を用いて共同試験を実施した。参加試験室は、株式会社森永科学研究所、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 7 試験室）であった。各試験室においては、計 21 種類の試料について非明示の 2 回繰返し分析、かつ 1 分析につき 2 点併行分析を行った。結果については、併行分析の 2 点がともに陽性の場合のみ陽性、その他のものを陰性とした。

また、各試験室の結果から、それぞれの試料について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、定性分析法の性能の指標である⁶⁾ accordance, concordance 及び COR (concordance odds ratio)を以下の式により求めた結果を表 3 に示した。

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

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

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

牛肉骨粉を添加しないもの及び牛肉骨粉を 1 % 添加したものでは、すべての試料において偽陰性率及び偽陽性率は 0 %，accordance 及び concordance はそれぞれ 100 %，COR は 1 であった。牛肉骨粉を 0.5 % 添加したものでは、偽陰性率が 14.3～71.4 %，accordance が 71.4～100 %，concordance が 52.4～73.8 % であった。

以上の結果より、共同試験でも偽陽性を示すものはなく、牛肉骨粉を添加しないもの及び牛肉骨粉を 1 % 添加したものにおいては十分な室間再現精度が得られた。

なお、accordance 及び concordance は、それぞれの定量分析法の併行精度及び室間再現精度に対応する。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⁷⁾し、accordance が 100 % の場合に COR は無限大になるが、accordance と concordance が両方とも 100 % の場合に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 となる。

表 3 共同試験結果

(+ : 陽性, - : 陰性)

試験室番号	牛肉骨粉添加量											
	魚粉 1			魚粉 2			チキンミール 1			チキンミール 2		
	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %
1	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
2	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
3	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
4	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
5	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
6	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
7	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
偽陽性率 (%)	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
偽陰性率 (%)	-	28.6	0	-	71.4	0	-	14.3	0	-	28.6	0
Accordance (%)	100	100	100	100	71.4	100	100	100	100	100	71.4	100
Concordance (%)	100	52.4	100	100	54.8	100	100	71.4	100	100	54.8	100
COR	1.0	∞	1.0	1.0	2.1	1.0	1.0	∞	1.0	1.0	2.1	1.0

試験室番号	牛肉骨粉添加量								
	鶏豚混合肉骨粉 1			鶏豚混合肉骨粉 2			豚肉骨粉		
	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %	0 %	0.5 %	1 %
1	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
2	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
3	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
4	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
5	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
6	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+	-,-	+,+	+,+
7	-,-	+,+	+,+	-,-	-,-	+,+	-,-	-,-	+,+
偽陽性率 (%)	0	-	-	0	-	-	0	-	-
偽陰性率 (%)	-	14.3	0	-	28.6	0	-	21.4	0
Accordance (%)	100	71.4	100	100	71.4	100	100	85.7	100
Concordance (%)	100	73.8	100	100	54.8	100	100	61.9	100
COR	1.0	0.9	1.0	1.0	2.1	1.0	1.0	3.7	1.0

・各試験は2点併行分析で行っており、2点とも陽性判定のものを陽性とした。

・試料毎に2回試験を行った結果を列記した。

4 まとめ

加工食品残さを含む動物質性飼料中の牛由来たん白質の検出法の検討を行い、次の結果を得た。

- 1) 市販の加工食品、調味料及びエキス類 34 点についてモリナガキットの特異性を確認したところ、偽陽性及び偽陰性を示すものはなかった。
- 2) モリナガキットの改良法について共同試験を行った結果、良好な再現精度が得られた。

謝 辞

本検討にあたり、多大なるご協力を頂きました株式会社森永生科学研究所に感謝の意を表します。

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) 農林水産省告示：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づき農林水産大臣が指定するものを指定する件，平成 26 年 5 月 13 日，農林水産省告示第 649 号 (2014).
- 3) 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).
- 4) 農林水産省消費・安全局畜水産安全課長通知：加工食品残さを原料とする動物質性飼料中の牛由来たん白質の確認試験法について，平成 26 年 10 月 27 日，26 消安第 3691 号 (2014).
- 5) 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).
- 6) S. D. Langton, R. Chevennement, N. Nagelkerke and B. Lombard, Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance, *Int. J. Food Microbiol.*, **79**, 175-181 (2002).
- 7) 内藤 成弘：第 3 章第 2 節 データの統計的取扱い，最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック，安井 明美，五十君 静信，後藤 哲久，丹野 憲二，湯川 剛一郎編，サイエンスフォーラム，95-97 (2010) (ISBN: 978-4-905098-00-3).