

写

30消安第5734号
平成31年3月12日

各植物防疫（事務）所長 殿

消費・安全局長

平成31年度の遺伝子組換え生物等に係る立入検査等の実施について

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号。以下「法」という。）に基づく承認を受けていない遺伝子組換え農作物について、我が国に輸入される農作物における混入実態を把握し、我が国への流入を防止するため、これまで当該遺伝子組換え農作物に関し法第31条第1項に基づく立入検査等を実施してきたところである。

今般、平成31年度の輸入時の立入検査等を適切に実施するため、別紙のとおり実施要領を定めるとともに、別添のとおり遺伝子組換え生物等の検査方法を定めたので、御了知の上、御対応方よろしく願います。

(別紙 1)

遺伝子組換え生物等に係る立入検査等の実施要領

目次

- 別紙 1-1 : 遺伝子組換えアマの種子に係る立入検査等実施要領
- 別紙 1-2 : 遺伝子組換えキャベツ及びカリフラワーの種子に係る立入検査等実施要領
- 別紙 1-3 : 遺伝子組換えクリーピングベントグラス、ケンタッキーブルーグラス及びトールフェスクの種子に係る立入検査等実施要領
- 別紙 1-4 : 遺伝子組換えコムギの種子に係る立入検査等実施要領
- 別紙 1-5 : 遺伝子組換えダイズの種子に係る立入検査等実施要領
- 別紙 1-6 : 遺伝子組換えナス及びピーマンの種子に係る立入検査等実施要領
- 別紙 1-7 : 遺伝子組換えパパイヤの種子及び苗に係る立入検査等実施要領
- 別紙 1-8 : 遺伝子組換えワタの種子に係る立入検査等実施要領

(別紙1-1)

遺伝子組換えアマの種子に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成 31 年4月1日から平成 32 年3月 31 日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

① 検査対象:栽培用アマ(*Linum usitatissimum*)種子(アマニ)

② 分析対象:スルフォニル系除草剤耐性アマ FP967

③ 収去対象:カナダから輸入された検査対象を含むロットのうち、500 g 以上のロット^{※1}。
なお、実施期間中に輸入されたロットから未承認遺伝子組換えアマが検知された場合、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入された全てのロットを収去対象とする。ただし、次の(ア)から(エ)までのいずれかに該当することが、外装や関係書類等から確認されたロットは除く。

(ア)カナダ以外の国・地域で生産された検査対象からなるロット

(イ)分析対象を含まないことを示す検査証明書^{※2}が付されたロット

(ウ)法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット^{※3}

(エ)漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置が執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット^{※3}

※1 500 g に満たないために収去対象外となるロットについては、輸入した種子の入手元、品種及び用途等について植物防疫課を経由して農産安全管理課に情報提供する。当該情報が不明な場合には、輸入者に対し、これらの情報を直接農産安全管理課に報告するよう依頼すること。

※2 原則として、カナダ政府又はカナダ穀物委員会 (Canadian Grain Commission、CGC)が実施した FP967 アマ検知技能試験に合格した検査機関が発行したものに限る。その他の機関が発行したものが付された場合、農産安全管理課において試験結果の科学的信頼性を確認する必要があるため、検査結果に関する詳細なデータを求める場合がある。

※3 収去対象から除外した(ウ)又は(エ)のロットについては、当該種子の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

概ね 100 件程度。

(備考)

- ・2の(1)の③のなお書きに該当するロットについては全て検査を実施すること。
- ・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、100 件を超えた又は超えることが予想される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

(3) 実施機関

- ① 検査機関: 横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(これらの支所及び出張所を含む。)
- ② 分析機関: 横浜植物防疫所

3. 検体の検査

(1) 検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査に使用する種子粒数は、収去対象とするロットの大きさにより異なる。収去対象とするロットに含まれる種子が 40,000 粒を越える場合には、再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、20,000 粒以上の種子を採取し、20,000 粒に満たない場合、同様に、ロットに含まれる種子の2分の1量以上の種子を採取すること。収去した種子粒数が 20,000 粒以上の場合は 10,000 粒、20,000 粒未満の場合は、収去した種子の2分の1量を分析検査に供すること。

(2) 荷口におけるロットの設定は次の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、収去の対象とするロットを設定すること。
- ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
- ③ 設定したロット全体又は抽出した梱から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上
65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

* 表の抽出数は、輸入種苗検疫要綱(昭和 53 年9月 30 日付け 53 農蚕第 6963 号農蚕園芸局長通達)第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

(3) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

- ① 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
- ② 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

(4) 検査職員は、立入検査等(以下「検査」という。)に当たっては、その内容等を取りまとめた別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させること。

(5) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。

(6) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること(検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること)。

(7) 分析検査に際しては、別添の「栽培用アマ種子における遺伝子組換えアマ(FP967)の検査方法」により、正確かつ迅速に実施すること。分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換え体を含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。

(8) その他

- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙2-1及び2-2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
- ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子は1年間、その他は最低3か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査等結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。
- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析検査結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査等結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入貨物及び携行品に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を経由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

(別紙1-2)

遺伝子組換えキャベツ及びカリフラワーの種子に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成 31 年 4 月 1 日から平成 32 年 3 月 31 日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

- ① 検査対象:栽培用キャベツ(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)及びカリフラワー(*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)種子
- ② 分析対象:遺伝子組換えキャベツ及びカリフラワー全般
- ③ 収去対象:中国で生産された検査対象を含むロットのうち、10kg 以上のロット。なお、実施期間中に輸入されたロットから未承認遺伝子組換えキャベツ等が検知された場合、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入された全てのロットを収去対象とする。ただし、次の(ア)又は(イ)のいずれかに該当することが、外装や関係書類等から確認されたロットは除く[※]。

(ア)法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット

(イ)漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置が執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット

※ 収去対象から除外した(ア)又は(イ)のロットについては、当該種子の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

キャベツ及びカリフラワー 各5件程度:各収去対象の1か月当たりの最大検査件数は3件(3ロット)^注。

(備考)

- ・2の(1)の③のなお書きに該当するロットについては全て検査を実施すること。
- ・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、各作物が5件を超えた又は超えることが予想される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

注 必要量を満たすロットを3ロット以上含む荷口が輸入された場合、その月は当該荷口由来の3ロットを検査する。

(3)実施機関

- ① 検査機関: 横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(これらの支所及び出張所を含む。)
- ② 分析機関: 横浜植物防疫所

3. 検体の検査

(1) 検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査に使用する種子粒数は、収去対象とするロットの大きさにより異なる。収去対象とするロットに含まれる種子が 2,000 粒を越える場合には、再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、1,000 粒以上の種子を採取し、2,000 粒に満たない場合、同様に、ロットに含まれる種子の2分の1量以上の種子を採取すること。収去した種子粒数が 1,000 粒以上の場合は 500 粒、1,000 粒未満の場合は、収去した種子の2分の1量を分析検査に供すること。

(2) 荷口におけるロットの設定は以下の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、検査の対象とするロットを設定すること。
- ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
- ③ 設定したロット全体又は抽出した梱から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上
65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

*表の抽出数は、輸入種苗検疫要綱(昭和53年9月30日付け53農蚕6963号農蚕園芸局長通達)第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

- (3) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。
- ① 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
 - ② 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。
- (4) 検査職員は、立入検査等(以下「検査」という。)に当たっては、その内容等を取りまとめた別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させること。
- (5) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。
- (6) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること(検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること。)
- (7) 分析検査に際しては、別添の「栽培用キャベツ及びカリフラワー種子における遺伝子組換え体の検査方法」により正確かつ迅速に実施すること。分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換え体を含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。
- (8) その他
- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙2-1及び2-2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
 - ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子は1年間、その他は最低3か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査等結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨

連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。

- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査等結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を經由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入貨物に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を經由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

(別紙1-3)

遺伝子組換えクリーピングベントグラス、ケンタッキーブルーグラス及びトールフェスクの
種子に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成 31 年4月1日から平成 32 年3月 31 日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

- ① 検査対象:栽培用クリーピングベントグラス(*Agrostis stolonifera* L.)種子、ケンタッキーブルーグラス(*Poa pratensis* L.)及びトールフェスク(*Festuca arundinacea* Schreb.)
- ② 分析対象:遺伝子組換えクリーピングベントグラス、ケンタッキーブルーグラス及びトールフェスク
- ③ 収去対象:米国で生産された検査対象を含む下記のいずれかのロット。

・クリーピングベントグラス	2,500 kg 以上のロット
・ケンタッキーブルーグラス	10,000 kg 以上のロット
・トールフェスク	10,000 kg 以上のロット

なお、実施期間中に輸入されたロットから未承認遺伝子組換えケンタッキーブルーグラス等が検知された場合、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入された全てのロットを収去対象とする。ただし、次の(ア)又は(イ)のいずれかに該当することが、外装や関係書類等から確認されたロットは除く※。

(ア)法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット

(イ)漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置が執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット

※ 収去対象から除外した(ア)又は(イ)のロットについては、当該種子の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

- ・クリーニングベントグラス 10 件程度
- ・ケンタッキーブルーグラス 10 件程度
- ・トールフェスク 20 件程度

各収去対象の1か月当たりの最大検査件数は3件(3ロット)^注。

(備考)

- ・2の(1)の③のなお書きに該当するロットについては、農産安全管理課が別途指示する方法又は対象範囲にて全て検査を実施すること。
- ・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、各検査対象について上記の検査件数を超えた又は超えることが予想される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

注 必要量を満たすロットを3ロット以上含む荷口が輸入された場合、その月は当該荷口由来の3ロットを検査する。

(3) 実施機関

- ① 検査機関: 横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(これらの支所及び出張所を含む。)
- ② 分析機関: 横浜植物防疫所

3. 検体の検査

(1) 検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、各収去対象に該当するロットについて、

- ・クリーニングベントグラス 2 g 以上/ロット
- ・ケンタッキーブルーグラス 10 g 以上/ロット
- ・トールフェスク 4 g 以上/ロット

の種子を採取し、その2分の1量を分析検査に供すること。

(2) 荷口におけるロットの設定は以下の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、検査の対象とするロットを設定すること。
- ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
- ③ 設定したロット全体又は抽出した梱から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上
65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

*表の抽出数は、輸入種苗検疫要綱(昭和53年9月30日付け53農蚕6963号農蚕園芸局長通達)第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

(3) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

- ① 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
- ② 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

(4) 検査職員は、立入検査等(以下「検査」という。)に当たっては、その内容等を取りまとめた別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させること。

(5) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。

(6) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること(検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること。)

(7) 分析検査に際しては、別添の「栽培用クレーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体の検査方法」、「栽培用ケンタッキーブルーグラス種子における遺伝子組換え体の検査方法」又は「栽培用トールフェスク種子における遺伝子組換え体の検査方法」により正確かつ迅速に実施すること。分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換え体を含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。

(8) その他

- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙2-1及び2-2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
- ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子は1年間、その他は最低3か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査等結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。
- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査等結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入貨物に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を経由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

(別紙1-4)

遺伝子組換えコムギの種子に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成31年4月1日から平成32年3月31日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

- ① 検査対象：栽培用コムギ属 (*Triticum*) 種子
- ② 分析対象：除草剤グリホサート耐性コムギ MON71800
- ③ 収去対象：米国において生産された検査対象を含むロットのうち、220 g 以上のロット^{※1}。なお、実施期間中に輸入されたロットから遺伝子組換えコムギが検知された場合、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入された全てのロットを収去対象とする。ただし、次の(ア)又は(イ)のいずれかに該当することが、外装や関係書類等から確認されたロットは除く^{※2}。

(ア) 法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット

(イ) 漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置が執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット

※1 220g に満たないため収去対象外となるロットについては、輸入した種子の入手元、品種及び用途等について植物防疫課を経由して農産安全管理課に情報提供する。当該情報が不明な場合には、輸入者に対し、これらの情報を直接農産安全管理課に報告するよう依頼すること。

※2 収去対象から除外した(ア)又は(イ)のロットについては、当該種子の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

概ね 100 件程度。

(備考)

- ・2の(1)の③のなお書きに該当するロットについては全て検査を実施すること。
- ・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、100 件を超えた又は超えることが予想される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

(3) 実施機関

- ① 検査機関：横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所（これらの支所及び出張所を含む。）
- ② 分析機関：横浜植物防疫所

3. 検体の検査

(1) 検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査に使用する種子粒数は、収去対象とするロットの大きさにより異なる。収去対象とするロットに含まれる種子が4,000粒を越える場合には、再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、2,000粒以上の種子を採取し、4,000粒に満たない場合、同様に、ロットに含まれる種子の2分の1量以上の種子を採取すること。収去した種子粒数が2,000粒以上の場合は1,000粒、2,000粒未満の場合は、収去した種子の2分の1量を分析検査に供すること。

(2) 荷口におけるロットの設定は、以下の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、収去の対象とするロットを設定すること。
- ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い（抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。）、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
- ③ 設定したロット全体又は抽出した梱から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上
65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

*表の抽出数は、輸入種苗検疫要綱（昭和53年9月30日付け53農蚕6963号農蚕園芸局長通達）第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

(3) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

- ① 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
- ② 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

(4) 検査職員は、立入検査等（以下「検査」という。）に当たっては、その内容等を取りまとめた別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は被検査者の委任を受けた者その他の関係者（以下「立会人等」という。）に閲覧させること。

(5) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。

(6) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること（検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること。）。

(7) 分析検査は、最大1,000粒の種子を用い、「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について」（平成24年11月16日付け食安発1116第3号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）の別添「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法」の「コムギ（MON71200、MON71700、MON71800）の検査方法」に従い、正確かつ迅速に実施すること。なお、当該検査方法の「3. 結果の解析と判定」については、以下のとおり判定する。1検体から2反復分の種子粉碎物が得られない場合は、1検体から1点のDNA抽出液を調製する。また、種子粉碎物が1gに満たない場合は全量を用いてDNA抽出を行う。

MON71800 検知試験及びコムギ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認及びmulticomponent上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。まず、MON71800 検知試験において目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、MON71800 陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line(Th. line)として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

DNA 試料液 1 点につき、2 ウェル並行で実施したコムギ陽性対照試験及び MON71800 検知試験の結果、

- ①コムギ陽性対照試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、MON71800 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。
- ②コムギ陽性対照試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、MON71800 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- ③コムギ陽性対照試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、MON71800 検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. DNA 抽出精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- ④コムギ陽性対照試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. DNA 抽出精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換え体を含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。

(8) その他

- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙 2-1 及び 2-2 に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
- ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子は 1 年間、その他は最低 3 か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査等結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。
- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査等結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入貨物及び携行品に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を経由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

(別紙1-5)

遺伝子組換えダイズの種子に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成 31 年 4 月 1 日から平成 32 年 3 月 31 日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

- ① 検査対象: 栽培用ダイズ (*Glycine max*) 種子
- ② 分析対象: チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701
- ③ 収去対象: 中国及び米国で生産された検査対象を含むロットのうち、1 kg 以上のロット※¹。なお、実施期間中に輸入されたロットから遺伝子組換えダイズが検知された場合、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入された当該ロットと同じ国又は地域で生産された全てのロットを収去対象とする。ただし、次の(ア)又は(イ)のいずれかに該当することが、外装や関係書類等から確認されたロットは除く※²。

(ア) 法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット

(イ) 漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置を執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット

※¹ 1 kg に満たないため収去対象外となるロットについては、輸入した種子の入手元、品種及び用途等について植物防疫課を経由して農産安全管理課に情報提供する。当該情報が不明な場合には、輸入者に対し、これらの情報を直接農産安全管理課に報告するよう依頼すること。

※² 収去対象から除外した(ア)又は(イ)のロットについては、当該種子の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

概ね 100 件程度。

(備考)

- ・2の(1)の③のなお書きに該当するロットについては全て検査を実施すること。
- ・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、100 件を超えた又は超えることが予想

される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

(3)実施機関

- ① 検査機関: 横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(これらの支所及び出張所を含む。)
- ② 分析機関: 横浜植物防疫所

3. 検体の検査

(1) 検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査に使用する種子粒数は、収去対象とするロットの大きさにより異なる。収去対象とするロットに含まれる種子が2,000粒を越える場合には、再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、1,000粒以上の種子を採取し、2,000粒に満たない場合、同様に、ロットに含まれる種子の2分の1量以上の種子を採取すること。収去した種子粒数が1,000粒以上の場合は500粒、1,000粒未満の場合は、収去した種子の2分の1量を分析検査に供すること。

(2) 荷口におけるロットの設定は、以下の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、収去の対象とするロットを設定すること。
- ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
- ③ 設定したロット全体又は抽出した梱から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上
65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

*表の抽出数は、輸入種苗検疫要綱(昭和53年9月30日付け53農蚕6963号農蚕園芸局長通達)第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

- (3) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。
- ① 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
 - ② 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。
- (4) 検査職員は、立入検査等(以下「検査」という。)に当たっては、その内容等を取りまとめた別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させること。
- (5) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。
- (6) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること(検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること。)
- (7) 分析検査に際しては、別添の「栽培用ダイズ種子における遺伝子組換えダイズ(MON87701)の検査方法」により、正確かつ迅速に実施すること。分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換えダイズを含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。
- (8) その他
- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙2-1及び2-2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
 - ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子は1年間、その他は最低3か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査等結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。

- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査等結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を經由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入貨物及び携行品に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を經由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

(別紙1-6)

遺伝子組換えナス及びピーマンの種子に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成31年4月1日から平成32年3月31日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

- ① 検査対象: 栽培用ナス (*Solanum melongena* L.) 及びピーマン (トウガラシを含む。
Capsicum annuum L.) 種子
- ② 分析対象: 遺伝子組換えナス及びピーマン全般
- ③ 収去対象: 以下の国で生産された検査対象を含むロットのうち、10kg 以上のロット。なお、実施期間中に輸入されたロットから遺伝子組換えナス等が検知された場合、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入される、当該ロットと同じ国又は地域で生産された全てのロットを収去対象とする*。

・ナス: インド又はバングラデシュ産

・ピーマン: 中国産

ただし、次の(ア)又は(イ)のいずれかに該当することが、外装や関係書類等から確認されたロットは除く。

(ア) 法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット

(イ) 漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置が執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット

※ 収去対象から除外した(ア)又は(イ)のロットについては、当該種子の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

ナス及びピーマン 各20件程度: 各収去対象の1か月当たりの最大検査件数は3件(3ロット)^注。

(備考)

・2の(1)の③のなお書きに該当するロットについては全て検査を実施すること。

・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、各作物が 20 件を超えた又は超えることが予想される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

注 必要量を満たすロットを3ロット以上含む荷口が輸入された場合、その月は当該荷口由来の3ロットを検査する。

(3)実施機関

- ① 検査機関: 横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(これらの支所及び出張所を含む。)
- ② 分析機関: 横浜植物防疫所

3. 検体の検査

(1) 検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査に使用する種子粒数は、収去対象とするロットの大きさにより異なる。収去対象とするロットに含まれる種子が 2,000 粒を越える場合には、再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、1,000 粒以上の種子を採取し、2,000 粒に満たない場合、同様に、ロットに含まれる種子の2分の1量以上の種子を採取すること。収去した種子粒数が 1,000 粒以上の場合は 500 粒、1,000 粒未満の場合は、収去した種子の2分の1量を分析検査に供すること。

(2) 荷口におけるロットの設定は以下の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、検査の対象とするロットを設定すること。
- ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
- ③ 設定したロット全体又は抽出した梱から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上
65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

*表の抽出数は、輸入種苗検査要綱(昭和 53 年9月 30 日付け 53 農蚕 6963 号農蚕園芸局長通

達)第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

(3) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

- ① 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
- ② 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

(4) 検査職員は、立入検査等(以下「検査」という。)に当たっては、その内容等を取りまとめた別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させること。

(5) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。

(6) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること(検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること。)

(7) 分析検査に際しては、別添の「栽培用ナス及びピーマン種子における遺伝子組換え体の検査方法」により正確かつ迅速に実施すること。分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換え体を含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。

(8) その他

- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙2-1及び2-2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
- ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子は1年間、その他は最低3か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査等結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。
- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査等結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入貨物に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を経由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

(別紙1-7)

遺伝子組換えパパイヤの種子及び苗に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成 31 年4月1日から平成 32 年3月 31 日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

- ① 検査対象:栽培用パパイヤ(*Carica papaya*)種子及び苗
- ② 分析対象
 - ・タイ産:パパイヤリングスポットウイルス耐性パパイヤ PRSV-SC 及びカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター
 - ・中国及びベトナム産:パパイヤリングスポットウイルス耐性パパイヤ PRSV-HN 及びカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター
 - ・インド産:パパイヤリングスポットウイルス耐性パパイヤ PRSV-YK 及びカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター
 - ・その他:カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター
- ③ 収去対象:以下の(ア)から(ウ)までのいずれかに該当するロット及び細胞培養体を除く、全ての栽培用パパイヤ種子及び苗に係るロット^{※1、※2}。
 - (ア)法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット^{※3}
 - (イ)漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置が執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット^{※3}
 - (ウ)法第 16 条に基づき農林水産大臣が指定した国又は地域で生産されたロット

※1 農産安全管理課が収去対象として指定したロットを含む荷口から、やむを得ず収去できなかった場合には、農産安全管理課が後日改めて収去するので、植物防疫所にあつては、当該荷口から採取した試料についても輸入時に収去したものとして、「3. 検体の検査」に沿った検査を実施すること。

※2 葉が生えていない苗等、収去対象とすることが困難なロットについては、収去対象から除いた上で、輸入した種苗の入手元、品種及び用途等について植物防疫課を經由して農産安全管理課に情報提供する。当該情報が不明な場合には、輸入者に対し、これらの情報を直接農産安全管理課に報告するよう依頼すること。

※3 収去対象から除外した(ア)又は(イ)のロットについては、当該種苗の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

概ね 100 件程度

(備考)

- ・タイ、中国、ベトナム及びインド産のロットは、上記件数にかかわらず全て検査を実施すること。
- ・タイ、中国、ベトナム及びインド以外の国又は地域産のロットから未承認遺伝子組換えパピヤが検知された場合には、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入される、当該ロットと同じ国又は地域産のロットについても、全て検査を実施すること。
- ・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、タイ、中国、ベトナム又はインド産のロットも含めた総検査件数が 100 件を超えた又は超えることが予想される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

(3) 実施機関

- ① 検査機関：横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(これらの支所及び出張所を含む。)
- ② 分析機関：横浜植物防疫所

3. 検体の検査

(1) 種子の場合

検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査に使用する種子粒数は、収去対象とするロットの大きさにより異なる。収去対象とするロットに含まれる種子が 2,000 粒を越える場合には、再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、1,000 粒以上の種子を採取し、2,000 粒に満たない場合、同様に、ロットに含まれる種子の2分の1量以上の種子を採取すること。収去した種子粒数が 1,000 粒以上の場合は 500 粒、1,000 粒未満の場合は、収去した種子の2分の1量を分析検査に供すること。

なお、荷口におけるロット設定は、以下の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、検査の対象とするロットを設定すること。
- ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。

- ③ 設定したロット全体又は抽出した袋から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

なお、検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

- i) 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
- ii) 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

(2) 苗の場合

検査機関は、以下の手順により、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査では、コルクボーラーでくりぬいた葉の切片を、最大 100 枚使用する。収去対象とする荷口に含まれる苗が、100 本を超える場合には任意に選択した苗 100 本から、100 本未満の場合は全ての苗から、それぞれ最下部の葉を 1 枚ずつ採取すること。

また、切片は各葉より同数くりぬき、くりぬいた後に残った葉は、再検査等に供試できるよう、 -20°C 以下の温度条件にて保存すること。

なお、荷口におけるロット設定は、以下の点に留意すること。

- ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、検査の対象とするロットを設定すること。
- ② 少量ずつ小分けになっている荷口の場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
- ③ 設定したロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

なお、検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

- i) 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
- ii) 検体採取に際しては、他のロットの葉が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上

65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

* 表の抽出数は、輸入種苗検疫要綱(昭和53年9月30日付け53農蚕第6963号農蚕園芸局長通達)第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

- (3) 検査職員は、立入検査等(以下「検査」という。)に当たっては、その内容等を取りまとめた別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は当該被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させること。
- (4) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。
- (5) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること(検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること。)
- (6) 分析検査に際しては、種子については、別添の「栽培用パパイヤ種子における未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法」、葉については、別添の「パパイヤ葉における遺伝子組換えパパイヤの検査方法」により、正確かつ迅速に実施すること。なお、ハワイ産のパパイヤについては、農産安全管理課からの協議がない限り、別添の検査方法に加え、消費者庁の「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法」に記載されている遺伝子組換えパパイヤ(55-1)検知試験用プライマー対及びプローブより、法に基づき第一種使用規程の承認を受けた遺伝子組換えパパイヤ55-1か否かを確認すること。分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換え体を含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。
- (7) その他
- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙2-1及び2-2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
 - ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに分析検査の過程で得られた標本については疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子及び苗は1年間、その他は最低3か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。
- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析検査結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入品に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を経由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

(別紙1-8)

遺伝子組換えワタの種子に係る立入検査等実施要領

1. 実施期間

平成 31 年 4 月 1 日～から平成 32 年 3 月 31 日まで

2. 対象及び実施件数等

(1) 対象

- ① 検査対象: 栽培用ワタ属 (*Gossypium*) 種子
- ② 分析対象: 遺伝子組換えワタ全般
- ③ 収去対象: 輸入された検査対象を含むロットのうち、トルコ及び米国で生産されたロットについては全てのロット、その他のものについては、500 g 以上のロット^{※1、※2}。なお、実施期間中に、トルコ及び米国以外の国又は地域から輸入されたロットから未承認遺伝子組換えワタが検知された場合、農産安全管理課が別途指定する日以降に輸入された当該ロットと同じ国又は地域で生産された全てのロットを収去対象とする。ただし、次の(ア)から(ウ)までのいずれかに該当することが、外装や関係書類等から確認されたロットは除く。

(ア) 法に基づき承認を受けた第一種使用規程に係る遺伝子組換え生物等を含むロット^{※3}

(イ) 漏出その他拡散しない構造で、取扱いに注意を要する旨が記載された容器に入れる等、法に規定する拡散防止措置が執られた上で法に規定する第二種使用等に供することとされているロット^{※3}

(ウ) 法第 16 条に基づき農林水産大臣が指定した国又は地域で生産されたロット

※1 農産安全管理課が収去対象として指定したロットを含む荷口から、やむを得ず収去できなかった場合には、農産安全管理課が後日改めて収去するので、植物防疫所においては、当該荷口から採取した試料についても輸入時に収去したものとして、「3. 検体の検査」に沿った検査を実施すること。

※2 500 g に満たないために収去対象外となるロットについては、輸入した種子の入手元、品種及び用途等について植物防疫課を経由して農産安全管理課に情報提供する。当該情報が不明な場合は、輸入者に対し、これらの情報を直接農産安全管理課に報告するよう依頼すること。

※3 収去対象から除外した(ア)又は(イ)のロットについても、当該種苗の入手元、品種等の情報を関係書類とともに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

(2) 検査件数

概ね 100 件程度

(備考)

- ・トルコ及び米国産のロットは、上記件数にかかわらず全て検査を実施すること。
- ・2の(1)の③のなお書きに該当するロットは全て検査を実施すること。
- ・収去対象に該当するロットの輸入件数の急増等により、トルコ及び米国産のロットも含めた総検査件数が 100 件を超えた又は超えることが予想される場合、農産安全管理課に連絡するとともに、今後の対応を協議すること。

(3) 実施機関

- ① 検査機関: 横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(これらの支所及び出張所を含む。)
- ② 分析機関: 横浜植物防疫所

3. 検体の検査

- (1) 検査機関は、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、1回の分析検査に使用する種子粒数は、収去対象とするロットの大きさにより異なる。収去対象とするロットに含まれる種子が 2,000 粒を越える場合には、再検査に使用する分及びきょう雑物の除去等により減量する分を見込み、1,000 粒以上の種子を採取し、2,000 粒に満たない場合、同様に、ロットに含まれる種子の2分の1量以上の種子を採取すること。収去した種子粒数が 1,000 粒以上の場合は 500 粒、1,000 粒未満の場合は、収去した種子の2分の1量を分析検査に供すること。
- (2) 荷口におけるロットの設定は、以下の点に留意すること。
 - ① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、収去の対象とするロットを設定すること。
 - ② 袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロットの大きさに応じ、以下の表に従い(抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う。)、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること。
 - ③ 設定したロット全体又は抽出した梱から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量を1検体として収去すること。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	開梱数
1 ~ 2	全数
3 ~ 27	3以上
28 ~ 64	4以上
65 ~ 125	5以上
126 ~ 216	6以上
217 ~	7以上

*表の抽出数は、輸入種苗検疫要綱(昭和53年9月30日付け53農蚕6963号農蚕園芸局長通達)第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

(3) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

- ① 遺伝子組換え生物等が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて検体採取を行うこと。
- ② 検体採取に際しては、他のロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

(4) 検査職員は、立入検査等(以下「検査」という。)に当たっては、その内容等を取りまとめ別紙3の様式第1による立入検査等記録書を作成し、検査に立ち会う被検査者又は被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させること。

(5) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別紙3の様式第2により見本採取票を発行することができる。

(6) 収去した検体は、検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること(検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること)。

(7) 分析検査に際しては、別添の「栽培用ワタ種子における遺伝子組換え体の検査方法」により、正確かつ迅速に実施すること。分析検査の結果、組換え遺伝子が検出され、遺伝子組換えワタを含むことが確認された検体については、農産安全管理課へ速やかに報告し、取扱いについて指示を受けることとする。また、別添の「リアルタイム PCR アレイ法分析プロトコル」により、混入が確認された遺伝子組換えワタが、我が国で栽培以外の用途で使用等された際の問題の有無を確認すること。なお、PCR アレイには、より効率的に広範な対象 DNA 配列の検知が可能となるよう、当該ワタ種子の生産国、生産地、品種等を考慮し、構造遺伝子等に特異的な DNA 配列や我が国において栽培を除く第一種使用が認められている遺伝子組換えワタ品種に特異的な DNA 配列等を検出可能なプライマー対・プローブを使用すること。

(8) その他

- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、本要領に定める事項のほか、別紙2-1及び2-2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の実施に当たっては、作業の細部について記載した作業書等を作成し、作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
- ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として分析検査の結果、遺伝子組換え生物等が検出された種子は1年間、その他は最低3か月間良好な条件の下で保管すること。

4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別紙3の様式第3による立入検査等結果連絡票を作成し、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。
- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別紙3の様式第4による分析結果連絡書を作成し、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別紙3の様式第5による分析検査結果通知書により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別紙3の様式第6による立入検査等結果報告書により、四半期ごとに当該四半期が終了した翌月末までに、植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

5. その他

- (1) 検査は、輸入品に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 検査は、あらかじめ被検査者に通告しないで行うものとする。ただし、円滑な検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な検査の実施に支障が生じない場合は、この限りでない。
- (3) 検体の収去、分析検査等において不測の問題が生じた場合、植物防疫課を経由して農産安全管理課と協議し、取扱いについて指示を受ける。

立入検査等に係る作業管理等要領

1 目的

この要領は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号。以下「法」という。)第31条第1項及び第32条第1項の規定に基づく立入検査等(以下「検査等」という。)を実施する機関における検査等に係る作業の管理等について細則を定め、検査等の信頼性を確保することを目的とする。

2 組織

- (1) 検査機関(支所及び出張所を含まない。以下同じ。)及び分析機関の長は、検査等に係る作業書の作成及び管理、検査等業務全般の管理を行う者(以下「検査責任者」という。)をあらかじめ指定し、当該業務を行わせること。
- (2) 検査機関及び分析機関の長は、検査責任者の業務が適切に遂行されているかを確認すること。

3 機械器具の管理

- (1) 検査責任者は、機械器具の管理に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全管理課長が定めるところにより、機械器具保守管理標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、機械器具保守管理標準作業書の作成又は改定については、別紙2-2の1及び2に留意すること。
- (2) 検査責任者は、機械器具保守管理標準作業書に従い、個別の機械器具について管理を担当する検査員を定め、次の事項の確認を行うこと。
 - ① 機械器具について、常時行うべき保守点検(計器にあつては、校正を含む。)及び定期的な保守点検を実施し、不備を発見した場合にあつては、必要な整備又は修理を行い、その記録を作成し保存すること。
 - ② 機械器具について、検査の方法に最も適したものを使用し、使用後は直ちに洗浄、消毒、滅菌、清掃等を行い、適切に乾燥、保管、廃棄等を行うこと。

4 試薬等の管理

- (1) 検査責任者は、試薬、試液、標準品、標準液等(以下「試薬等」という。)の管理に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全管理課長が定めるところにより、試薬等管理標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、試薬等管理標準作業書の作成及び改定については、別紙2-2の1及び3に留意すること。
- (2) 検査責任者は、試薬等管理標準作業書に従い、試薬等について管理を担当する検査員を定め、次の事項の確認を行うこと。
 - ① 試薬、試液及び標準液については、その容器に名称、純度又は濃度、保存方法、調製年月日、使用期限等を表示し、適切に保存すること。
また、変質したもの、使用期限を経過したものを使用しないこと。

- ② 標準品については、その容器に名称、純度又は濃度、保存方法、入手源、入手年月日、使用期限のほか、必要に応じ製造年月日等を表示すること。
また、変質を防止するために適切な条件下に保存し、適切なものを検査に使用すること。
- ③ 試薬等を調製した場合は、その記録を作成し保存すること。

5 有毒又は有害な物質及び危険物の管理

- (1) 検査責任者は、毒物、劇物、高圧ガスその他の有毒、有害物質及び危険物の保管、設置等について関係法令を遵守して適切に管理すること。
- (2) 検査責任者は、検体、試薬、試液等検査に用いられる全てのものに係る廃棄物について安全かつ衛生的に管理すること。

6 検体の取扱いの管理

- (1) 検査責任者は、検体の取扱いの管理に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全管理課長が定めるところにより、検体取扱標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、検体取扱標準作業書の作成及び改定については、別紙2-2の1及び4に留意すること。
- (2) 検体を採取する検査員は、次の事項を遵守すること。
 - ① 検査対象生物等を代表するよう採取すること。
 - ② ロットによる区分けが必要な場合は、ロットを混同しないよう採取すること。
 - ③ 他物の混入及び汚染がないよう採取すること。
 - ④ 採取量、採取目的、採取年月日、採取者等その他必要な事項の記録を保存すること。
 - ⑤ 検体を入れる容器は、検体の種類、形状及び検査の目的に適したものであって、搬送、洗浄及び滅菌が容易なものをを用いること。
- (3) 検体を搬送する者は、次の事項を遵守すること。
 - ① 他物の混入及び汚染がないよう搬送すること。
 - ② 検査に支障を及ぼさないように保存すること。
 - ③ 検体の搬送条件及び保存条件を適切な方法を用いて確認すること。
 - ④ 運搬業者等に検体の搬送を委託する場合は、上記①～③の条件に合う方法で搬送されることを確認するとともに、搬送中に開梱等が行われないように封印等を用いて梱包を行うこと。
- (4) 検体を受領する者は、次の事項を確認するとともに、その記録を作成し保存すること。
 - ① 検査記録書等の関連書類の記載事項と検体に同一性があること。
 - ② 検体の状態が検査の目的に適切であること。
 - ③ 検体の量が検査に十分な量であること。
 - ④ 検体の搬送が(3)の要件を満たす形で適正に行われていること。
- (5) 検査責任者は、検体の取扱いについて次の事項が遵守されていることを確認すること。
 - ① 検体の保管に当たっては、検体を保管する容器ごとに検体番号(検体の識別に用いる記号又は番号をいう。以下同じ。)等を表示するとともに、期限表示がされているものについてはその年月日、特定の保存条件が必要なものについてはその条件をそれぞれ表示

すること。

- ② 検体が温度、湿度、害虫等により変質しないように適切な設備に保存すること。
- ③ 検体の分割及び検査機関の事業所内の検体の移動に当たっては、汚染や品質低下のおそれがない方法で行い、検体番号等必要な表示を行うとともに、検体の分割又は移動の年月日その他必要な事項を検体ごとに記録し保存すること。
- ④ 検体の輸送、運搬及び保管に当たって、検体の取り違え、紛失等を防ぐため、必要に応じて関連書類との照合、関連書類の確認等を行うこと。

7 検査の操作等の管理

- (1) 検査の方法は、当該検査項目に関する関係通知等で定められた方法とすること。
- (2) 検査責任者は、検査の実施に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全管理課長が定めるところにより、検査実施標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、検査実施標準作業書の作成及び改定については、別紙2-2の1及び5に留意するとともに、具体的な操作の手順の設定に当たっては、最新の知見を踏まえて行うこと。
また、同一の検査項目であっても、検体の種類ごとに操作手順等が異なる場合には、当該検体の種類ごとに作成すること。

8 検査の結果の処理

- (1) 検査員は、検査終了後、その内容が検査の目的を十分に満たしたものであることを点検の上、必要な事項を検査結果表(以下「結果表」という。)に記入すること。
- (2) 検査員は、結果表にデータ、標本等を添えて、検査責任者に提出すること。
- (3) 検査責任者は、結果表等の提出を受け、次の事項を確認すること。
 - ① 検査員の氏名
 - ② 検査の実施の方法
 - ③ データ
 - ④ 結果を算出した根拠(結果を算出するための計算方法を含む。)
 - ⑤ 検出限界又は定量限界
 - ⑥ 標準作業書からの逸脱とその検査結果への影響
 - ⑦ 過去に実施された類似の検査結果との関係
 - ⑧ 検査中の予期し得なかった事項とその検査結果への影響
 - ⑨ その他の必要な事項
- (4) 検査責任者は、確認終了後、検査の結果に疑義がないと認める場合には、結果表に検査が完了した旨とともに検査終了年月日及び検査の結果を確認した旨を記入し、検査結果通知書を作成する者に回付すること。
- (5) 検査責任者は、確認終了後、検査の結果に疑義があると認める場合には、他の検査員に再検査を行わせる等必要な措置を講じること。この場合において、検査責任者は、その経過を詳細に記録し保存すること。
- (6) 検査責任者は、検査の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある事態について、その内容及び講じられた改善措置を記録し保存すること。
- (7) 検査責任者は、検査の過程で得られた標本を保存すること。

ただし、その状態を維持することが困難な場合には、この限りでない。

9 検査結果通知書

(1) 検査結果通知書は、別途定めている場合を除き、次の事項を記載し、検体ごとに作成すること。

- ① 検査年月日(検体を採取した日と分析試験を行った日が異なる場合はその両方を記載する。)
- ② 被検査者の氏名及び住所(法人にあっては、その氏名及び主たる事務所の所在地)
- ③ 検査命令書の発行年月日及び番号(法第17条第1項の生物検査の場合に限る。)
- ④ 検査対象生物等の名称並びに数量及び重量
- ⑤ 検査対象生物等の生産地
- ⑥ 検査対象生物等の輸入届出年月日(法第17条第1項の生物検査の場合に限る。)
- ⑦ 検査対象生物等の本邦への到着年月日(検査対象生物等が本邦へ輸入されるものである場合に限る。)
- ⑧ 検体の数量及び重量
- ⑨ 検査項目
- ⑩ 検査の方法(出典及び根拠を含む。)
- ⑪ 検査結果(検出限界又は定量下限の記載を含む。)
- ⑫ 検査結果通知書の作成又は発行年月日並びに番号
- ⑬ 検査実施施設の名称及び所在地
- ⑭ 本通知書に関する連絡担当者の氏名
- ⑮ その他

(2) 分析機関の長は、検査結果通知書が適正に作成されていることを確認し、発行について承認すること。

10 検体の保存

検査に用いた検体については、その一部を当該検査に係る検査結果通知書の発行後少なくとも3か月間(可能な場合は1年間)、適切な条件の下に保存すること。ただし、その状態を維持することが困難な場合にあってはこの限りでない。

11 内部点検

(1) 検査責任者は、検査の業務の管理に関する内部点検の方法を記載した文書に基づき内部点検を行い又はあらかじめ指定した者に行わせ、次の事項を含む記録を作成し保存すること。

- ① 点検を行った年月日
- ② 点検項目
- ③ 点検結果
- ④ 必要な改善措置又は指導の内容
- ⑤ 確認を行った改善措置又は指導の内容及びその年月日

12 精度管理

- (1) 検査責任者は、検査員の技能について、次の事項の評価を定期的に行うこと。
 - ① 通常の検体を用いて、定められた方法により検査結果の再現性を維持できる技能
 - ② 添加量が明らかな検体を用いて、定められた方法により検査する技能
 - ③ 真値を伏せた特別な検体を用いて、定められた方法により検査する技能
- (2) (1)を行うに当たって、検査責任者は、必要に応じ①から③までの評価に基づく改善措置を記録すること。
- (3) 分析機関の長は、精度管理が適切に行われているか確認するとともに、必要に応じて検査責任者に対し改善等を指示すること。

13 外部精度管理調査

- (1) 検査責任者は、外部精度管理調査について、外部機関が実施している精度管理プログラム等(GIPSA、Fera、ISTA等)を活用し、その定期的な参加計画を作成すること。
- (2) 検査責任者は、外部精度管理調査の結果を取りまとめ、改善措置が必要な場合には、その内容を記録し保存すること。
- (3) 分析機関の長は、外部精度管理調査が適切に行われているか確認するとともに、必要に応じて検査責任者に対し改善等を指示すること。

14 データの作成

- (1) 検査中に得られるデータの作成は、次により行うこと。
 - ① 読みやすく、かつ、容易に消すことのできない方法で作成すること。
 - ② 作成の年月日を記載し、検査員等の署名又は捺印を行うこと。
- (2) データの内容を変更する場合にあっては、変更前の内容を不明瞭にしない方法で行うとともに、変更の理由及び年月日を記入し、変更者の署名又は捺印を行うこと。
- (3) コンピュータ等により直接データの作成を行い、保存する場合にあっては、次の事項を確認すること。
 - ① 作成されたデータの保存、管理の方法が規定されていること。
 - ② データの処理、記録、伝送、保存等の完全性及び機密保持等に関して、データ保護のための手順が確立されていること。
 - ③ 使用するソフトウェアが十分な信頼性を有すること。
 - ④ コンピュータその他の設備が適切な方法で保守管理されていること。
 - ⑤ 電磁的記録のバックアップ及び保護の手順並びに記録への無許可のアクセス又は修正を防止する手順が確立されていること。
 - ⑥ データの内容を変更する場合にあっては、変更前のデータを残すとともに、変更者の氏名、年月日、変更理由を明確にすること。

15 検体、データ等の保存

- (1) 検体及びデータ、記録、報告書の控え等(以下「データ等」という。)は、適切な設備に保存すること。

なお、検体、データ等を別々の施設に保存する場合は、データ等を保存する施設におい

て、検体、データ等の保存場所を確認可能とすること。

(2) 検査責任者は、データ等の保存に際し担当者を定め、索引を付ける等、検索に便利な方法で整理するとともに、データ等の損傷又は品質の変化を最小限にとどめるよう適切に措置すること。

(3) データ等の保存期間は、次表のとおりとすること。

事項	保存期間
洗浄剤、害虫駆除及び消毒剤の使用に関する記録 機械器具の保守管理に関する記録 試薬等の管理に関する記録 検体の管理に関する記録 検査に関する記録 検査結果表 検査結果に疑義のある場合に講じられた措置の記録 検査の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある事態の内容とその改善措置に関する記録 内部点検の内容、結果及び指導とそれに対して講じられた改善措置に関する記録 精度管理の内容及び結果並びにこれに基づく改善措置に関する記録 外部精度管理調査の内容及び結果並びにこれに基づく改善措置に関する記録	3年間

別表

作成すべき標準作業書の種類	記載すべき事項
機械器具保守管理標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> 1 機械器具の名称 2 常時行うべき保守点検(計器にあつては、校正を含む。)の方法 3 定期的な保守点検に関する計画 4 故障が起こった場合の対応(測定中に故障が起こった場合にあつては、検体の取扱いを含む。)の方法 5 機械器具の保守管理に関する記録の作成要領 6 作成及び改定年月日
試薬等管理標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> 1 試薬、試液、標準品及び標準液(以下「試薬等」という。)の容器にすべき表示の方法 2 試薬等の管理に関する注意事項 3 試薬等の管理に関する記録の作成要領 4 作成及び改定年月日
検体取扱標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> 1 検体の採取、搬送及び受領に当たつての注意事項 2 検体の管理の方法 3 検体の管理に関する記録の作成要領 4 作成及び改定年月日
検査実施標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> 1 検体の種類 2 検査の実施の方法(検査法の名称、検査の具体的な手順等) 3 試薬等の選択及び調製の方法 4 試料の調製の方法 5 検査に用いる機械器具の操作の方法(機械器具の選択又は使用に関する注意事項、機械器具の洗浄の方法を含む。) 6 検査に当たつての注意事項(試料等の処理又は反応条件、試料採取後の検体又は試料溶液残部の保存方法等) 7 検査によって得られた値の処理の方法 8 検査に関する記録の作成要領 9 作成及び改定年月日

(別紙2-2)

標準作業書の作成又は改定に当たり留意する事項

1 一般的事項

- (1) 標準作業書の作成に当たっては、それが実行可能であることを確認し、その記録を保存すること。
- (2) 標準作業書は、使用者に周知され、いつでも使用できるようそれぞれ適切な場所に備え付けられていること。
- (3) 検査に対しての継続的な適切さと適合性を確実にするため、標準作業書の定期的な見直しを行い、必要に応じて改定すること。
- (4) 標準作業書の作成及び改定ごとにその年月日及び理由を明記すること。また、これを管理するためのリスト(改廃履歴)を作成すること。
- (5) 標準作業書の改定が行われた場合には、旧文書の誤使用を防止するため、旧文書を速やかに撤去する等の措置を講ずること。

2 機械器具保守管理標準作業書の作成に当たっては、次の点に留意すること。

- (1) 「常時行うべき保守点検(計器にあつては、校正を含む。)の方法」として、次の事項が含まれていること。
 - ① 計器の校正方法、校正頻度及び校正項目
 - ② 機械器具の使用開始時及び使用時の保守点検の方法
 - ③ 機械器具の使用終了後の保守点検(洗浄、乾燥、滅菌、保管、廃棄等)の方法
- (2) 「定期的な保守点検に関する計画」として、各機器ごとに保守点検の日時、保守点検を行う者の氏名等を記載した計画表が作成されていること。
- (3) 「故障が起こった場合の対応(測定中に故障が起こった場合にあつては、検体の取扱いを含む。)の方法」として、次の事項が含まれていること。
 - ① 機械器具に故障が起こった場合の修理の方法及び修理業者の連絡先
 - ② 故障時において検査していた検体の取扱いの方法
- (4) 「機械器具の保守管理に関する記録の作成要領」として、帳簿への次の記載事項が含まれていること。
 - ① 機械器具の名称
 - ② 保守点検の日時
 - ③ 保守点検を行った者(修理を行う業者等を含む。)の氏名
 - ④ 保守点検の結果
 - ⑤ 整備、修理等の日時、実施者及びその内容

3 試薬等管理標準作業書の作成に当たっては、次に留意すること。

- (1) 「試薬、試液、標準品及び標準液(以下「試薬等」という。)の容器にすべき表示の方法」として、次の事項を適切に表示できる方法が含まれていること。
 - ① 入手年月日、調製年月日又は開封年月日

- ② 入手源
 - ③ 調製を行った者の氏名
 - ④ 名称
 - ⑤ ロット番号(ロットを構成しない試薬等については、製造番号)
 - ⑥ 純度又は濃度
 - ⑦ 保存方法(常温、冷蔵及び冷凍の別等)
 - ⑧ 使用期限
- (2) 「試薬等の管理に関する注意事項」として、試薬等の保存の方法その他試薬等の管理を行う上で注意すべき具体的事項が含まれていること。
- (3) 「試薬等の管理に関する記録の作成要領」には、次の帳簿への記載事項のうち必要なものが含まれていること。
- ① 入手年月日及び調製年月日
 - ② 入手源
 - ③ 名称
 - ④ ロット番号
 - ⑤ 純度又は濃度
 - ⑥ 保存方法
 - ⑦ 試薬等の調製の記録
 - ⑧ 試薬等を使用した量、年月日、検査員の氏名

4 検体取扱標準作業書の作成に当たっては、次の事項に留意すること。

- (1) 「検体の採取、搬送及び受領に当たっての注意事項」として、次の事項が含まれていること。
- ① 検体の採取に際し輸入届出書等に基づき確認すべき事項
 - ア 検査対象生物等の名称
 - イ 検査対象生物等の数量及びロット
 - ウ 検体の採取、保存及び搬送の方法について必要な事項
 - エ 検体の採取量
 - オ 検体の採取日又は予定日
 - カ 検査の目的
 - キ 検査方法
 - ク 被検査者の名称、所在地等
 - ケ その他検査の実施に必要な事項
 - ② 検体の採取に際し留意すべき事項
 - ③ 検体の容器の条件について必要な事項
 - ④ 検体の搬送に際し留意すべき事項
 - ⑤ 検体の受領に際し確認すべき事項
 - ア 輸入生物等に関する記載事項と検体の同一性があること。
 - イ 検体の状態が検査の目的に適う状態であること。
 - ウ 検体の量が検査に十分な量であること。

エ 検体の搬送が上記④の事項について適正に取り扱われていること。

(2) 「検体の管理の方法」としては、次の事項が含まれていること。

- ① 受領した検体の表示の方法
- ② 検体の保存の方法及び期間
- ③ 検体の分割の方法
- ④ 検査機関又は施設内における検体の移動及び確認の方法

(3) 「検体の管理に関する記録の作成要領」には、次の帳簿への記載事項が含まれていること。

① 検体の採取の記録

- ア 採取量
- イ 採取年月日
- ウ 採取を行った者の氏名
- エ 検体の外観における異常の有無
- オ 検体の包装における表示事項
- カ 採取の方法
- キ 検体の保存の状態

② 検体の受領の記録

- ア 輸入届出書等の記載事項と検体が合致している旨の確認
- イ 検体の状態が検査の目的に適う状態である旨の確認
- ウ 検体の量が検査に十分なものである旨の確認
- エ 上記アからウまでに定めるほか、検体の採取及び搬送に際し留意すべき事項が遵守されている旨の確認
- オ 受領年月日及び検体番号

③ その他の検体の管理の記録

- ア 検体の保存の記録
- イ 検体の分割の記録
- ウ 検査機関又は施設内における移動の記録

5 検査実施標準作業書の作成に当たっては、次に留意すること。

(1) 次の事項に関する記載が含まれていること。

- ① 検体の種類
- ② 検査の実施の方法(検査法の名称、検査の具体的な手順等)
- ③ 試薬等の選択及び調製の方法
 - ア 試薬及び試液の調製の方法
 - イ 標準品の選択及び標準液の調製の方法
 - ウ その他試薬等の選択又は使用に関する注意事項
- ④ 試料の調製の方法
 - ア 試料採取の方法(採取量を含む。)
 - イ 前処理の方法
 - ウ 試料溶液の調製の方法

- ⑤ 検査に用いる機械器具の操作の方法(機械器具の選択又は使用に関する注意事項、機械器具の洗浄の方法等を含む。)
- ⑥ 検査に当たっての注意事項(試料等の処理又は反応条件、試料採取後の試験品又は試料溶液残部の保存方法等)
- ⑦ 検査によって得られた値の処理の方法
 - ア 結果を算出するための計算方法(回収率を算出するための計算方法を含む。)
 - イ 結果の評価方法(検出限界又は定量限界等の設定、空試験又は対照試験との関係を含む。)

(2) 「検査に関する記録の作成要領」には、次の帳簿への記載事項が含まれていること。

ただし、⑧から⑰までの事項については、帳簿とは別にデータ等としてその記録を保存する場合には内容を確認した旨の記載で差し支えないこと。

- ① 検査を受けた者の氏名及び住所(法人の場合は、その名称及び所在地)
- ② 検査を行った年月日
- ③ 検査を行った生物等の名称
- ④ 検査を行った検体の数量
- ⑤ 検査を実施した検査員の氏名
- ⑥ 検体番号
- ⑦ 検査の方法の名称、具体的な手順等
- ⑧ 試薬等の選択又は使用の記録
- ⑨ 標準品の選択及び標準液の調製の記録
- ⑩ 試料採取の記録
- ⑪ 前処理の記録
- ⑫ 試料溶液の調製の記録
- ⑬ 機械器具の選択、使用、洗浄等の記録
- ⑭ 結果を算出するための計算の記録
- ⑮ 結果の評価の記録
- ⑯ 検査実施中の異常及びその対応に関する記録(データの記録及び保管を含む。)
- ⑰ 検査の結果

整理番号	
立入検査等記録書	
<p>遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第31条第1項の規定に基づき、本職は下記のとおり、遺伝子組換え生物等の使用等をしている者、又はした者、遺伝子組換え生物等を譲渡し、又は提供した者、国内管理人、遺伝子組換え生物等を輸出した者その他の関係者に対する立入検査等を実施し、立入検査等記録書を作成した。</p> <p>この立入検査等記録書を当該立入検査等に立ち会う被検査者又は当該被検査者の委任を受けた者その他の関係者(以下「立会人等」という。)に閲覧させたところ、記載内容が事実と相違ない旨の申し出があったので、共に記名押印(氏名を自署する場合にあっては押印を省略できるものとする。)した。</p>	
年 月 日	
検査職員	
検査機関名及び役職	
検査職員氏名	印
立会人等	
所属及び役職	
氏 名	印
被検査者の氏名 (法人の場合は法人の名称 及び代表者の氏名)	
被検査者の住所 (法人の場合は主たる事務 所の所在地)	
被検査者の連絡先 (担当者の電話番号等)	
立入検査等を行った日	年 月 日
立入検査等を行った場所	

備考

「被検査者の氏名」については、被検査者と立会人が同一の場合は記載を省略できる。

検 査 検 体 等 の 情 報	
1. 種類の名称及び用途	
2. 生産、輸出入及び流通の状況 (輸入日、生産日、輸入者、輸出者、生産者、原産国、生産地、集荷地、輸出港、品種名、ロット番号、その他インボイスまたは船荷証券番号等当該ロットを特定することができる情報を記載)	
3. 荷姿・包装形態・対象植物の入庫量・陸揚げ後のロットの保管場所等(荷姿は外装の画像も添付)	
4. 収去した場合	
4-1. 収去した量及び収去の対象としたロットの量	
4-2. 収去方法	
5. 備考	
業務に関する帳簿書類その他の検査	
その他検査に関し参考となる事項	

様式第2(日本工業規格A4)

整理番号

年 月 日

見 本 採 取 票

殿

所属官署

(機関)

氏 名

印

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第31条第1項の規定に基づき、検査のため収去したので通知する。

収去した貨物	品 名 ・ 銘 柄	数 量
積載船(機)名		入港年月日
蔵置場所		収去年月日
B/L No.		申告番号
採取職員所属氏名	印	
見本処理区分	<input type="checkbox"/> 返 却 <input type="checkbox"/> 保 存 <input type="checkbox"/> 分 析	
返 却 欄	申告者受取印	受取年月日
備 考		

- (注) 1. 太線枠内は、税関以外の公務員が見本採取したときは記入を要しない。
 2. 本様式は、3片を1組とし、第1片を原本、第2片を通知用、第3片を倉主等用とする。

様式第3(日本工業規格A4)

整理番号	
立入検査等結果連絡票	
収去した生物等の種類の名称	
収去した生物等の用途	
品種、ロット番号	
収去した生物の輸出国又は地域(生産地)	
ロット数量	
輸入(生産)年月日	
輸出者	
被検査者の氏名及び住所	
収去日	
収去場所	
分析検査の結果	
分析検査日	
分析者	
<p>年 月 日、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第31条第1項の規定に基づき収去した上記の生物等について、同法に基づく使用等の承認を受けていない遺伝子組換え生物等の混入が認められましたので連絡します。</p> <p>年 月 日</p> <p>分析検査実施機関名</p>	

備考

1. 被検査者の氏名及び住所の欄には、担当者の電話番号等を併せて記入すること。
2. 以下の書類の写しを添付すること。
 - ① 当該立入検査等に係る記録書
 - ② 当該分析試験に係る実験記録、データ等(再試験等も含めたもの)

整理番号

分析検査結果連絡書

年 月 日

検査機関の長 殿

分析機関の長

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第31条第1項の規定に基づき収去した生物等について、分析検査の結果を次のとおりお知らせします。

収去した生物の種類の名	
収去した生物の用途	
品種、ロット番号	
収去した生物の輸出国又は地域(生産地)	
輸出者	
被検査者の氏名及び住所	
収去日	
収去場所	
分析検査の結果	
分析検査日	
分析者	

整理番号

分析検査結果通知書

年 月 日

被検査者 殿

検査機関の長 印

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第31条第1項の規定に基づき収去した生物等について、検査の結果を次のとおりお知らせします。

収去した生物の種類の名称	
収去した生物の用途	
品種、ロット番号	
収去した生物の輸出国又は地域(生産地)	
輸出者	
収去日	
収去場所	
分析検査の結果	

立入検査等結果報告書

年 月 日

農林水産省消費・安全局長 殿

分析機関の長

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第31条第1項の規定に基づき立入検査等を実施したので、その結果を別添のとおり報告します。

年 月 ~	年 月	検査実施分
立入検査等実施件数 (うち未承認遺伝子 組換え体検出件数)		件(件)

備考

別添として、様式第6-2により月別の一覧を添付すること。

様式第6-2(日本工業規格A4)

年 月分 (分析機関名:)

整理 番号	収去した生 物等の種類 の名称及び 用途	検査 日	検査 場所	輸出国又は 地域(生産 地)	輸出者	被検査者 (輸入者)	品 種 名、 ロット 番 号	荷 姿、形 包 装、形 態	収去対象 としたロ ットの 量、収去 量	分析検査 の項目	分析検査の 結果	備考

備考

- 1 収去した検体ごとに一覧を作成すること。
- 2 輸出国と生産国が異なる場合は両方記載すること。
- 3 「分析検査の項目」の欄には、分析の対象とした遺伝子組換え生物等の名称を記載すること。
- 4 「分析検査の結果」の欄には、分析の対象とした遺伝子組換え生物等の検出の有無または定量結果を記載すること。

(別添)

遺伝子組換え農作物の種子及び苗の検査方法

目次

栽培用アマ種子における遺伝子組換えアマ (FP967) の検査方法.....	1
栽培用キャベツ及びカリフラワー種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	7
栽培用クリーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体の検査法.....	12
栽培用ケンタッキーブルーグラス種子における遺伝子組換え体の検査法.....	17
栽培用ダイズ種子における遺伝子組換えダイズ(MON87701)の検査方法.....	22
栽培用トールフェスク種子における遺伝子組換え体の検査法.....	26
栽培用トウモロコシ種子における遺伝子組換えトウモロコシ (Bt10) の検査方法.....	31
栽培用トウモロコシ種子における遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) の検査方法.....	38
栽培用トウモロコシ種子における遺伝子組換えトウモロコシ (DAS59132) の検査方法.....	51
栽培用ナス及びピーマン種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	58
栽培用パパイヤ種子における未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法 (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN)	63
パパイヤ葉における遺伝子組換えパパイヤの検査方法.....	70
ばれいしょ生塊茎の検査方法.....	73
栽培用ワタ種子における遺伝子組換え体の検査方法.....	80
リアルタイム PCR アレイ法 分析プロトコル.....	85

栽培用アマ種子における遺伝子組換えアマ（FP967）の検査方法

本検査法は栽培用アマ種子(アマニ)を対象とする。Genomic-tip 20/G (QIAGEN 社) を用い、1検体から2反復*でDNAを抽出・精製する。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及びスルフォニル系除草剤耐性アマFP967(以下「FP967アマ」という。)の組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイムPCRに供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の有無により、FP967アマの混入の有無を判定する。

* 1検体から2反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

1. 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

検査に用いるアマ種子は、破砕粒や他の混入物を取り除いた完全粒とし、表面に他の付着物がないことを確認すること。当該アマ種子から無作為に必要な粒数を採取し、フードミル(ミルサー700G(イワタニ社)又はその同等品)等を用いて粉碎する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉碎できない場合には、複数回に分けて粉碎する。粉碎物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター(現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター)作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル(改訂第3版)コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 アマ種子からのDNAの抽出・精製

分析試料0.5g^{*1}を遠沈管(50mL容)に量り採り、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出・精製キット(Genomic-tip 20/G, QIAGEN社)を用い次のようにDNAを抽出・精製する。

試料に、G2緩衝液^{*2}7.5mLと α -amylase^{*3}20 μ Lを加えて、ボルテックスミキサー等で激しく混合し、37 $^{\circ}$ Cで1時間保温する。さらにG2緩衝液7.5mL、Proteinase K^{*4}200 μ L及びRNaseA^{*5}20 μ Lを加え、サンプルが遠沈管の底に残らなくなるまで攪拌し、50 $^{\circ}$ Cで1時間保温する。その間2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、5,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離し、得られた上清を2mLずつ、2mL容チューブ5本(計10mL)に移し^{*6}、20,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離する。あらかじめQBT緩衝液^{*2}1mLで平衡化したQIAGEN Genomic-tip 20/Gに、各2mL容チューブから上清を1mLずつ採取し^{*6} 負荷する(計5mL)。次いで、チップをQC緩衝液^{*2}で2mLずつ3回洗浄した後、チップを新しい遠沈管に移し、あらかじめ50 $^{\circ}$ Cに加熱したQF緩衝液^{*2}500 μ Lを負荷し、DNAを溶出する(溶出1)。チップを新しい遠沈管に移し、さらにQF緩

衝液^{*2} 500 μ L で DNA を溶出する（溶出 2）。次いで、溶出液と等量のイソプロパノールを溶出 1 と溶出 2 にそれぞれ添加し、ゆっくり 10 回転倒混和した後、5 分間室温で静置する。12,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心し、上清を廃棄した後 70%エタノール 500 μ L を添加し、10 回転倒混和する。12,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心した後、上清を破棄し、残った沈殿を適度に乾燥させる。溶出 2 の遠沈管にあらかじめ 60 $^{\circ}$ C に加温した滅菌蒸留水 50 μ L を加えて沈殿物を溶解させ、その溶解液全量を溶出 1 の遠沈管に移し入れ、よく混合し^{*7}、抽出 DNA 試料液とする。抽出 DNA 試料液は分光光度計を用いて DNA 濃度測定を行う。

^{*1} 種子粉碎物が 0.5 g に満たない場合は全量。

^{*2} G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

^{*3} α -amylase（高濃度品）は Nippon Gene 社製のもの又は同等の活性を持つものを用いる。

^{*4} Proteinase K は QIAGEN 社製（20 mg/mL）又は同等の効力を持つものを用いる。

^{*5} RNaseA は QIAGEN 社製（100 mg/mL）又は同等の効力を持つものを用いる。

^{*6} 沈殿物や上層の膜状の部位を取らないように注意する。

^{*7} 沈殿物（DNA）が溶解しない場合は、65 $^{\circ}$ C で 15 分間振とう溶解する。それでも完全に溶解できず、不溶物が認められる場合は、12,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心して得られた上清を新しい遠沈管に移し、これを抽出 DNA 試料液とする。

2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

2.1 DNA 試料原液中の DNA の純度の確認

DNA 試料原液の適量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1} し、200~320 nm の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm 及び 280 nm の吸光度を記録する。次いで 260 nm の吸光度 1.0 を 50 ng/ μ L DNA として、DNA 濃度を算出する。また 260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比を計算する（A 260/A280）。この比が 1.7~2.0 の場合、DNA が十分に精製されていることを示すが、1.7~2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA 試料液の調整及び保存

純度を確認した DNA 試料原液を滅菌蒸留水で希釈して 50 ng/ μ L に調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 20 μ L ごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が 50ng/ μ l に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

^{*1} 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA 試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用として、NOS ターミネーターとスペクチノマイシン耐性遺伝子の境界領域を検知するプライマー対・プローブを用いる。また、内在性遺伝子検知用として *stearoyl-acyl carrier protein desaturase 2* (SAD) 遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

組換え遺伝子検知用プライマー対・プローブ

NOST-Spec F: 5'- AGC GCG CAA ACT AGG ATAAA-3'

NOST-Spec R: 5'- ACC TTC CGG CTC GAT GTC TA-3'

NOST-Spec probe: 5'-FAM- CGC GCG CGG TGT CAT CTA TG-BHQ1-3'

内在性遺伝子検知用プライマー対・プローブ

SAD F: 5'- GCT CAA CCC AGT CAC CAC CT -3'

SAD R: 5'- TGC GAG GAG ATC TGG AGG AG -3'

SAD probe: 5'-FAM- TGT TGA GGG AGC GTG TTG AAG GGA-BHQ1-3'

3.1 リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 (ABI PRISM™ 7900*1)

3.1.1 PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。組成は次のとおりである。Universal PCR Master Mix*2 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各 0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.25 µL を混合し、滅菌蒸留水で全量 22.5 µL に調製後、50 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL (125 ng) を添加する。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する*3。分注操作終了後、真上からシール*4 し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャーを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad*5 を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 ABI PRISM™ 7900 と同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

*2 Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 3 秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*3 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加する。

*⁴ 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリアケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*⁵ ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems 社) を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため避けること。QuantStudio 5 では使用しない。

3.1.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置、種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、「Reporter」については NOST-Spec、SAD とともに「FAM」に設定する。「Quencher」については「Non Fluorescent」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.1.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は、次のとおりである。50 $^{\circ}$ C、2 分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 $^{\circ}$ C 15 秒間、60 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行い、最後に、Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

3.2 リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法(ABI PRISM™ 7500*¹)

3.2.1 PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製する。組成は次のとおりである。Universal PCR Master Mix*² 12.5 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L)各 0.4 μ L、対象プローブ溶液(10 μ mol/L) 0.25 μ L を混合し、滅菌蒸留水で全量 22.5 μ L に調製後、50 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (125 ng) を添加する。PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する*³。分注操作終了後、真上からシール*⁴ し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリアケーターを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 ABI PRISM™ 7500 と同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

*2 Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて3秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*3 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加する。

*4 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリアケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び ABI PRISMOptical Adhesive Cover (Applied Biosystems 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

3.2.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。また、プローブ特性に関しては、「Reporter」については NOST-Spec、SAD とともに「FAM」に設定する。「Quencher」については「Non Fluorescent」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。

3.2.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。50 °C、2分間の条件で保持した後、95 °Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始し、その後、95 °C15 秒間、60°C 1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。最後に、Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知用試験及び内在性遺伝子検知用試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認及び multicomponent 上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

まず、目視で Amplification plot 上に NOST-Spec の指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースライン (3サイクルから 15サイク

ル)の ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line(Th. line)を選択する*。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた全 DNA 試料液 1点につき2ウェル並行で実施した内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

* 個々の機種の状態によって Amplification plot 上の ΔR_n が変動することから、普遍的な Th. line の設定の数値を示すことが困難である。したがって Amplification plot 上でベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) の ΔR_n のノイズ幅の最大値をより上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th. line を選択する。参考として ABI PRISM™ 7900 及び ABI PRISM™ 7500 とともに 0.2-0.5 の範囲であると考えられる。

栽培用キャベツ及びカリフラワー種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査法は栽培用のキャベツ及びカリフラワーの種子を対象とする。DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用い、種子粉碎物 1 点につき 2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 種子粉碎物 1 点から 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来 DNA の抽出精製

1.1 種子の粉碎

収去したキャベツ又はカリフラワー種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要な粒数採取する。表面に種子コーティング及び薬剤処理が施されている場合は、1% SDS 溶液で 10 回洗浄後、滅菌蒸留水で 3 回リンスし、65℃で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに 65℃で乾燥させる。その後、1~200 粒の場合全量、201~400 粒の場合 2 等分、401~500 粒の場合 3 等分し、フードミル（ミルサー 700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉碎する。均質な種子粉碎物 3 点を DNA 抽出・精製操作に供する。必要量の種子を一度に粉碎できない場合、複数回に分けて粉碎し、粉碎物を十分混合する。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 3 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からの DNA 抽出・精製

種子粉碎物 1 点につき 2 反復*1 で実施する。

種子粉碎物 50 mg*2 を 1.5 mL 容チューブに量り採り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液 400 µL と RNase A 溶液 4 µL を加え、試料液中に塊がなくなるまで混合し、65 °C で 10 分間加温する。その間、2、3 回、1.5 mL 容チューブを反転させて試料を攪拌する。加温後、P3 緩衝液を 130 µL 加えて混合し、氷上に 5 分間静置する。次に 20,000 × g、室温で 5 分間遠心した後、沈殿物や浮遊物を避けつつ上清を分取し、QIAshredder Mini Spin Column（薄紫色）に負荷し、20,000×g で 2 分間遠心する。ペレット化した細胞破片が剥がれないようにして、コレクションチューブ内の溶出液を新しい 1.5 mL 容チューブに移した後、得られた溶出液の 1.5 倍量の AW1 緩衝液・エタノール混合液（溶出液 200 µL に対して、AW1 緩衝液・エタノール混合液 300 µL）を加え、ピペットで混合する。混合液 650 µL を DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000 × g で

1 分間遠心した後、溶出液を捨てる。1.5 mL 容チューブ内の溶液が全て無くなるまでこの工程を繰り返し行う。次に、新しい2 mL コレクションチューブ（キット添付）にセットした DNeasy Mini Spin Column に AW2 緩衝液 500 μ L を負荷し、6,000 \times g で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。再度 AW2 緩衝液 500 μ L を負荷した後、20,000 \times g で 2 分間遠心し、DNeasy Mini Spin Column のメンブレンを乾燥させる。DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、あらかじめ 65 $^{\circ}$ C に温めておいた滅菌蒸留水 50 μ L を加え、5 分間静置した後、6,000 \times g で 1 分間遠心する。この工程を再度繰り返しした後、得られた溶出液（約 100 μ L）を DNA 試料原液とする。

*1 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*2 種子粉碎物が 50 mg に満たない場合は全量。

2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

2.1 DNA 試料原液中の DNA の純度の確認

DNA 試料原液の適当量を採り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320 nm の範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm 及び 280 nm の吸光度を記録する。次いで 260 nm の吸光度 1.0 を 50 ng/ μ L DNA として、DNA 濃度を算出する。また 260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が 1.7~2.0 の場合、DNA が十分に精製されていることを示すが、1.7~2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA 試料液の調製及び保存

純度を確認した DNA 試料原液を滅菌蒸留水で希釈して 10 ng/ μ L に調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 20 μ L ごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が 10 ng/ μ L に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

*1 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイム PCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性 PCR 法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA 試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、アグロバクテリウム・Ti プラスミド NOS ターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対プローブ「NOS ter」及び選択マーカーに用いる NPTII を検知するプライマー対プローブ「NPTII」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、アブラナ科の Cruciferin A 遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Cru A」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

- ① 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
TNOS-F : 5'-GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG-3'
TNOS-R : 5'-CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T-3'
TNOS-P : 5'-FAM -AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA-TAMRA-3'
- ② 組換え遺伝子 (NPTII) 検知プライマー対・プローブ「NPTII」
npt 1-5' : 5'- GAC AGG TCG GTC TTG ACAAAA AG-3'
npt 1-3' : 5'- GAA CAA GAT GGA TTG CAC GC-3'
NPT-1-Taq : 5'- FAM-CCC TGC GCT GAC AGC CGG A -TAMRA-3'
- ③ 内在性遺伝子検知プライマー対・プローブ「Cru A」
Cru A-F : 5'- GGC CAG GGT TTC CGT GAT -3'
Cru A-R : 5'- CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG -3'
Cru A-P : 5'- FAM-AGT CCT TAT GTG CTC CAC TTT CTG GTG CA -TAMRA-3'

3.1 PCR 用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 μ L / ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 各0.2 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、滅菌蒸留水9.6 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用の Pre-mix溶液を作成して、各ウェルに23 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液 2 μ Lを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

^{*1} TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTCにはDNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2 μ L 添加する。

^{*3} 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-ウェル Reaction Plate (Life Technologies 社)、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*⁴ ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置や種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「NTC」: Non-Template Control、「UNKN」: DNA 試料液)の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「Reporter」が「FAM」、「Quencher」が「TAMRA」となるように設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は次のとおりである。50°Cで2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次に、95°C・15秒間保持後60°C・1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行い、最後に、Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として 0.2 に設定する。ただし、Th. line がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた全 DNA 試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施した内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「NOS ter」又は「NPTII」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子 (NOS ter) 検知試験、組換え遺伝子 (NPTII) 検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合であって、
 - 1) 個々の種子粉砕物から得た全ての DNA 試料液について一致した PCR 結果が得られた場合、遺伝子組換え体を含む種子粉砕物と含まない種子粉砕物があったため PCR 結果が一致しなかったと判断し、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。
 - 2) 個々の種子粉砕物から得た全ての DNA 試料液について一致した PCR 結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用クリーピングベントグラス種子における遺伝子組換え体の検査法

本検査法は栽培用のクリーピングベントグラスの種子を対象とする。DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN 社) を用い、1 検体から 2 反復で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したクリーピングベントグラス種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、1 g を無作為に収去試料の複数箇所から採取し、表面に種子コーティング (Nコート等) が施されている場合は、超純水で 10 回洗浄後、65℃ で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに 65℃ で乾燥させる。その後、ビーズ式粉砕器 (マルチビーズショッカー MB601 (安井器械社) 又はその同等品) 等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル (改訂第 3 版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からの DNA 抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復で実施する。

種子粉砕物 0.2 g を 2 mL チューブに量り取り、あらかじめ 65℃ に温めておいた AP1 緩衝液 800 μ L と、RNase A 8 μ L を加え、試料液中に塊がなくなるまでボルテックスミキサーにより混合し、65℃ で 10 分間加温する。P3 緩衝液を 260 μ L 加え、ボルテックスミキサーにより混合した後、氷上で 5 分間静置する。次に、20,000 \times g、室温で 5 分間遠心分離し、上清 550 μ L を QIAshredder Mini Spin Column に負荷し、20,000 \times g、室温で 2 分間遠心分離する。溶出液 450 μ L を新しい 1.5 mL チューブに移し、AW1 緩衝液・エタノール混液を 625 μ L 加え、ピペットで混合する。混合液 500 μ L を DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000 \times g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液が全てなくなるまでこの工程を繰り返し行う。新しい 2 mL のコレクションチューブ (キット付属) にセットした DNeasy Mini Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 μ L を負荷し、20,000 \times g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。再度、DNeasy Mini

Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 μ L を負荷し、20,000 \times g、室温で 2 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、あらかじめ 65 $^{\circ}$ C に温めておいた滅菌蒸留水 100 μ L を加え、5 分間静置した後、20,000 \times g、室温で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7~2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20 $^{\circ}$ C以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20ng/ μ lに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

^{*1}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・Ti プラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、クレーピングベントグラスの植物共通18S rRNA 遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「18S rRNA」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」

TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'

TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'

TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA

③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマー対・プローブ「18S rRNA」

18S rRNA 2-F : 5'- TGT TGG CCT TCG GGA TCG GGA TCG GAG TA -3'

18S rRNA 2-R : 5'- GCT TTC GCA GTT GTT CGT CTT TCA -3'

18S rRNA 2-P : FAM 5'- TCG GGG GCA TTC GTA TTT CAT AGT CAG A -3'
TAMRA

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 μ L/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 各0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、滅菌超純水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

^{*1} TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTCにはDNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに2.5 μ L 添加する。

^{*3} 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社)、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社)を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

^{*4} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社)を使用する。

なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置、種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関して、「Reporter」については、「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C・2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次いで、95°C・15秒間、60°C・1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認、及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line（Th. line）として0.2に設定する。ただし、Th. line がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた全 DNA 試料液1点につき2ウェル並行で実施した内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

- (1) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで43未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで43未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで43未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみすべてのウェルで43未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。

- (2) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用ケンタッキーブルーグラス種子における遺伝子組換え体の検査法

本検査法は栽培用のケンタッキーブルーグラスの種子を対象とする。GM quicker 2

(NIPPON GENE 社) を用い、1 検体から 2 反復で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したケンタッキーブルーグラス種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、5g を無作為に採取し、フードミル（ミルサー700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からのDNA抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復で実施する。

種子粉砕物 1g をポリエチレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、GE 1 緩衝液 5 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65°C で 15 分間静置する。GE 2-K 緩衝液 625 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合する。スイング式遠心分離機又はアングルロータにより 4,000 \times g、室温で 10 分間遠心分離する。上清 1 mL を 1.5 mL 容サンプルチューブに分取し、遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 5 分間遠心分離する。上清 700 μ L を新たな 2.0 mL 容サンプルチューブに分取し、GB3 緩衝液 260 μ L 及びイソプロピルアルコール 260 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する。混合液 600 μ L を Spin column に負荷した後、遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液が全てなくなるまでこの操作を繰り返す。GW 緩衝液 650 μ L を Spin column に負荷し、遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。Spin column を新たな 1.5 mL 容サンプルチューブに移し、滅菌蒸留水 50 μ L を加え、室温で 3 分間静置する。遠心分離機により 18,000 \times g 以上、室温で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200～320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A260/A280)。この比が1.7～2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7～2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20℃以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20ng/μlに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

^{*1}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びイネアクチン1遺伝子のイントロン領域を検知するプライマー対・プローブ「AINT」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ケンタッキーブルーグラスの植物共通18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「18S rRNA」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

② 組換え遺伝子 (AINT) 検知プライマー対・プローブ「AINT」

AINT-F : 5'- TCG TCA GGC TTA GAT GTG CTA GA -3'

AINT-R : 5'- CTG CAT TTG TCA CAA ATC ATG AA -3'

AINT-P : FAM 5'- TTT GTG GGT AGA ATT TGA ATC CCT CAG C -3' TAMRA

- ③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマー対・プローブ「18S rRNA」
18S rRNA 2-F : 5'- TGT TGG CCT TCG GGA TCG GGA TCG GAG TA -3'
18S rRNA 2-R : 5'- GCT TTC GCA GTT GTT CGT CTT TCA -3'
18S rRNA 2-P : FAM 5'- TCG GGG GCA TTC GTA TTT CAT AGT CAG A -3'
TAMRA

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 μ L/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 各0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、滅菌超純水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{※2}。操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリーケーターを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

^{*1} TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTCにはDNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに2.5 μ L添加する。

^{*3} 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社)、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社)を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

^{*4} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社)を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置、種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレート
の配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「NTC」: Non-Template Control、

「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。またプローブ特性に関して、「Reporter」については、「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C・2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次いで、95°C・15秒間、60°C・1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認、及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として 0.2 に設定する。ただし、Th. line がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

2点並行で抽出した DNA 試料液 1 点につき、2 ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「AINT」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合に

は、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用ダイズ種子における遺伝子組換えダイズ(MON87701)の検査方法

本検査法は栽培用のダイズの種子を対象とする。DNeasy Plant Maxi kit 又は Genomic-tip 20/G（どちらも QIAGEN 社）を用い、1 検体から 2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 1 検体から 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したダイズ種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要な粒数採取する。表面に種子コーティング及び薬剤処理が施されている場合は、1% SDS 溶液で 10 回洗浄後、滅菌蒸留水で 3 回リンスし、65℃で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに 65℃で乾燥させる。その後、超遠心粉碎機（ZM100（レッチェ社）又はその同等品）やフードミル（ミルサー 700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉碎する。均質な粉末状になったものを DNA 抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉碎できない場合には、複数回に分けて粉碎する。粉碎物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 3 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からの DNA 抽出・精製

種子粉碎物 1 点につき 2 反復*1で、JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 3 版）基本操作編」に従い実施する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、1.0 g*2を採取し、マニュアル基本操作編「3.1.6.1 DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、2.0 g*2を採取し、マニュアル基本操作編「3.2.6 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。

*1 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*2 種子粉碎物が 1.0g または 2.0g に満たない場合は全量。

2 DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存

2.1 DNA 試料原液中の DNA の純度の確認

DNA試料原液の適当量を採り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200～320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A260/A280)。この比が1.7～2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7～2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20℃以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20ng/μlに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

^{*1}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、MON87701に特異的な遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「MON87701」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ダイズ内在性遺伝子レクチン遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Le1」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

- ① 組換え遺伝子 (MON87701) 検知プライマー対・プローブ「MON87701」
MON87701 2 (forward) 5' -TG GTGATATGAAGATACATGCTTAGCAT-3'
MON87701 1 (reverse) 5' -CGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAA-3'
MON87701 (probe) FAM-TCAGTGT TTGACACACACACTAAGCGTGCC -TAMRA
- ② 内在性遺伝子検知プライマー対・プローブ「Le1」
Le1n02-5' (forward) 5' -GCCCTCTACTCCACCCCA-3'
Le1n02-3' (reverse) 5' -GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'
Le1-Taq (probe) FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3'

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 μL/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 μmol/L）各0.5 μL、対象プローブ溶液（10 μmol/L）0.5 μL、滅菌蒸留水8.5 μLとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μLを添加する。PCRの blanks 反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

^{*1} TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μL 添加する。

^{*3} 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate（Life Technologies 社）及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover（Life Technologies 社）を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

^{*4} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad（Life Technologies 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置や種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「Reporter」については「FAM」に設定する。「Quencher」については「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μL に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は次のとお

りである。50℃で2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次に、95℃・15秒間保持後60℃・1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行い、最後に、Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認及びmulticomponent上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。

まず、遺伝子組換え体検知試験において目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line(Th. line)として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた全DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施した内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来DNAの抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行ったDNA試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイムPCRを用いた定性PCRに複数回供した場合であっても全てのウェルで43未満のCt値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来DNAの抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行ったDNA試料液においても全てのウェルで43未満のCt値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用トールフェスク種子における遺伝子組換え体の検査法

本検査法は栽培用のトールフェスクの種子を対象とする。DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN 社) を用い、1 検体から 2 反復で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したトールフェスク種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、2 g (外穎を含む) を収去試料の複数箇所から無作為に採取し、ビーズ式粉砕器 (マルチビーズショッカー MB601 (安井器械社) 又はその同等品) 等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル (改訂第 3 版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からのDNA抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 反復で実施する。

種子粉砕物 0.4 g を 15 mL チューブに量り取り、あらかじめ 65 °C に温めておいた AP1 緩衝液 1.6 mL と、RNase A 16 µL を加え、試料液中に塊がなくなるまでボルテックスミキサーにより混合し、65 °C で 10 分間加温する。P3 緩衝液を 520 µL 加え、ボルテックスミキサーにより混合した後、氷上で 5 分間静置する。次に、4,000 × g、室温で 5 分間遠心操作し、上清 1 mL を 1.5 mL チューブに移し、20,000 × g、室温で 2 分間遠心分離する。上清 600 µL を QIAshredder Mini Spin Column に負荷し、20,000 × g、室温で 2 分間遠心分離する。溶出液 450 µL を新しい 1.5 mL チューブに移し、AW1 緩衝液・エタノール混液を 625 µL 加え、ピペットで混合する。混合液 500 µL を DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000 × g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液が全てなくなるまでこの工程を繰り返し行う。新しい 2 mL のコレクションチューブ (キット付属) にセットした DNeasy Mini Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 µL を負荷し、20,000 × g、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。再度、DNeasy Mini Spin Column に AW2 緩衝液・エタノール混液 500 µL を負荷し、20,000 × g、室温で 2 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、あらかじめ 65 °C に温めてお

いた滅菌蒸留水100 μ Lを加え、5分間静置した後、20,000 \times g、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7~2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調製及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20°C以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20ng/ μ lに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

^{*1}希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・Ti プラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、トールフェスクの植物共通18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「18S rRNA」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

- ② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
 TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
 TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
 TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA
- ③ 植物共通遺伝子 (18S rRNA) 検知プライマー対・プローブ「18S rRNA」
 18S rRNA 2-F : 5'- TGT TGG CCT TCG GGA TCG GGA TCG GAG TA -3'
 18S rRNA 2-R : 5'- GCT TTC GCA GTT GTT CGT CTT TCA -3'
 18S rRNA 2-P : FAM 5'- TCG GGG GCA TTC GTA TTT CAT AGT CAG A -3'
 TAMRA

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、以下の手順により、25 μ L/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 各0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、滅菌超純水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRの blanks 反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

*2 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加する。

*3 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社)、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置、種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関して、「Reporter」については、「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C・2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次いで、95°C・15秒間、60°C・1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認、及び multicomponent 上で対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。まず、遺伝子組換え体検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として 0.2 に設定する。ただし、Th. line がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

2点並行で抽出した DNA 試料液 1 点につき、2 ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果、

- (1) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。

- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用トウモロコシ種子における遺伝子組換えトウモロコシ（Bt10）の検査方法

トウモロコシ種子について、定性 PCR 法で分析し、陽性と判定された場合は、再度、定性 PCR 法により確認検査を行う。なお、確認検査の際は、新たに 2,400 粒の種子を準備し検査を行う。確認検査においても陽性と判定された場合は、当該検体を陽性と判定する。

* 試料の処理方法等の選択・組合せ、それらの手順、結果の判定方法等について、あらかじめ詳細を作業書等に定めておくこと。

1. 試料の準備

検査に用いるトウモロコシ種子は、破砕粒や他の混入物を取り除いた完全粒とし、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認すること。

定性 PCR 法に用いる粉砕物は、0.5 mm メッシュを通過したものをを用いることを推奨する。また、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いは十分に配慮すること。コンタミネーション対策は、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 2 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

2. 定性 PCR 法

2.1. DNA 抽出精製

PCR 増幅には 2.1.1. シリカゲル膜タイプキット法①（DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN 社）を使用する方法）又は 2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法④（GM quicker2（NIPPON GENE 社）を使用する方法）により抽出した DNA 試料液を用いる。

2.1.1. シリカゲル膜タイプキット法①（DNeasy Plant Mini Kit を使用する方

均質に粉砕した試料 2 g を遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液^{*1} 10 mL と RNase A 20 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°C で 15 分間加温する。その間 2、3 回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2 緩衝液^{*2} 3,250 µL を加え、氷上に 10 分間静置した後、4,000 × g 以上、4°C の条件で 20 分間遠心する^{*3}。次いでその上清 500 µL を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 4 分間遠心後、溶出液を遠沈管（15 mL 容）に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の 1.5 倍量の AP3 緩衝液 * 4 ・エタノール混液^{*5} を加える。その混合液 500 µL を mini spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6} 遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 µL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW 緩衝液^{*7} 500 µL を負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6} 遠心し、溶出液を捨てる。

同様の操作を計3回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000 × g 以上で20分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ65 °C に温めておいた滅菌蒸留水 70 μL を加え、5分間静置した後、10,000 × g 以上で1分間遠心しDNA を溶出する。もう一度滅菌蒸留水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*2 AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*5 AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液^{*4} とエタノール (96-100%) を 1 : 2 で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

*6 遠心時間

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜調整する。

*7 AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール(96-100%)を混合したものを AW 緩衝液とする。

2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法④ (GM quicker2 を使用する方法)

均質に粉砕した試料 (トウモロコシ種子粉末) 2.0 g を遠沈管 (50 mL 容) に量り採る。GE1 Buffer^{*1} 10 mL を 50 mL 容チューブに添加し、ボルテックスミキサーにて約 30 秒間激しく混合する^{*2}。遠心分離する (≥5,000 g、20 分、室温)^{*3}。沈殿を吸わないように、上

清 700 μL を新しい 2.0 mL 容チューブに移し Proteinase K (20 mg/mL) 20 μL 、 α -アミラーゼ 2 μL 及び RNase A (100 mg/mL) *4 10 μL を添加し、ボルテックスミキサーにてよく混合する。15 分、60°C で加温する。GE2-K Buffer*5 85 μL 添加し、ボルテックスミキサーで良く混合する。遠心分離 ($\geq 13,000$ g、5 分、室温) する。沈殿を吸わないように、上清 400 μL を新しい 1.5 mL 容チューブに移す。GB3 Buffer*6 150 μL 添加後、イソプロパノール 150 μL を添加し、液が透明になるまで、10~12 回チューブを激しく転倒させ、良く混合する*7。この混合液を Spin Column に添加後、遠心分離 ($\geq 13,000$ g、1 分、室温) し、濾液を廃棄する。650 μL の GW Buffer*8 を Spin Column に添加し、遠心分離 ($\geq 13,000$ g、1 分、室温) し、濾液を廃棄する。Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移す。50 μL の滅菌蒸留水を滴下し、3 分間室温にて静置する。遠心分離 ($\geq 13,000$ g、1 分、室温) する。これにより得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 GE1 Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker2) 付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

*2 攪拌が不十分な場合には、DNA 収量が減少する原因となるため、さらに 30~60 秒攪拌
する。

*3 使用するローター及び遠沈管 (50 mL 容) の特徴を考慮した上で、g が最大になるよう
に遠心条件を設定する。

*4 Proteinase K、 α -アミラーゼ、RNase A

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

*5 GE2-K Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

*6 GB3 Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

*7 GB3 Buffer を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析
出物が生じた場合には、カラムが詰まる原因となるために、液が透明になるまで十分に転
倒混合する。

*8 GW Buffer

シリカゲル膜タイプのキット（GM quicker 2）付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

2.2. PCR 増幅

PCR 用反応試料管に反応液を以下のように調製する。

反応液は、PCR 緩衝液^{*1}、0.16 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、それぞ
れ 0.6 μmol/L の Bt10 検出用プライマー対^{*2}並びに 0.8 units Taq DNA ポリメラーゼ^{*3}
を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 5.0 μL（DNA として 50 ng）を氷中で加
え、全量を 25 μL にする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置^{*4}にセットする。反応
条件は次のとおりである。94°Cに 10 分間保ち反応を開始させた後、94°C 25 秒間、62°C 30
秒間、72°C 45 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応
として 72°C で 7 分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。
この際、必ず次の 4 つの対照を同時に調整することとする。試料から DNA が抽出されて
いることの確認として、DNA 試料液ごとに、Bt10 検出用プライマー対の代わりに内在性
遺伝子 Zein 検出用プライマー対^{*5}を用いて同様に PCR 増幅を行ったもの、陽性対照とし
て、DNA 試料液の代わりに市販の陽性対照プラスミド^{*6}を用いた反応液を調整し、同様に
PCR 増幅を行ったもの、PCR 反応のブランク反応液として、プライマー対を加えないも
の及び DNA 試料液を加えないもの、の 4 つである。ただし、内在性遺伝子 Zein 検出用
プライマー対を用いた対照については、同時に実施した他系統の分析で確認している場合は
操作を省いてもよい。

以上の結果、内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対及び Bt10 検出用プライマー対で陽
性で、かつ、プライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないものがともに陰性
となった場合、Bt10 確認用プライマー対^{*7}を用い PCR 増幅^{*8}を行う^{*9}。

*1 PCR 緩衝液

PCR buffer II（Applied Biosystems 社、塩化マグネシウムを含まないもの）又は同等
の結果が得られるものを用いる。

*2 Bt10 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (JSF5) : 5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG GTT ACT CA-3'

R-primer (JSR5) : 5'-ACA CGG AAA TGT TGA ATA CTC ATA CTC T-3'

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ（Applied Biosystems 社）又は同等の結果が得られ
るものを用いる。

*4 PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*5 内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

*6 陽性対照プラスミド

NIPPON GENE 社から公定法準拠試薬 (PCR 法) として販売されているもの又は同等の結果が得られるものを用いる。

*7 Bt10 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Bt10LS-5') : 5'-GCC ACA ACA CCC TCA ACC TCA-3'

R-primer (Bt10LS-3') : 5'-GAA GTC GTT GCT CTG AAG AAC AT-3'

*8 Bt10 確認用プライマー対を用いる場合の PCR 条件は以下のとおり。

94°Cに 10 分間保ち反応を開始させた後、94°C 25 秒間、65°C 30 秒間、72°C 45 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72°C で 7 分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

*9 プライマーの精製グレード

ここで使用するプライマーの精製グレードは、全て HPLC 精製グレードとする。

2.3. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、DNA 増幅バンドを確認する。

2.3.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液 * を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に、ゲルを 50°C前後まで冷やした後、ゲルメーカーにゲルを流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、泳動する目的産物のバンド長にあわせてゲル濃度 (1.0~4.0%) を決める。

* TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mmol/L Tris-酢酸、1 mmol/L EDTA となるように滅菌蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

2.3.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 5.0~7.5 µL と

適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 1/3 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.3.3. ゲルの染色

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100 mL 当たり、5 μ L のエチジウムブロミド*溶液 (10 mg/mL) を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。

* エチジウムブロミド

2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

2.3.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ* を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線 (312 nm) を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的のバンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

* 食品包装用ラップ

ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

3. 結果の判定

最初にプライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないもので PCR 増幅バンドが検出されていないことを確認する。このどちらかに PCR 増幅バンドが確認された場合は、実験中に汚染が起きたと判断されるため、実験をやり直すことにする。また、陽性対照プラスミドを加えたもので PCR 増幅バンドが確認されない場合も PCR 増幅反応が適切に行われていないと判断されるため、実験をやり直すこととする。

内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対を用いたレーンで 157 bp の PCR 増幅バンドが検出され*¹、Bt10 検出用プライマー対を用いたレーンで 117 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 反応液を調製し、Bt10 確認用プライマー対を用い PCR 増幅を行う。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、151 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検体は Bt10 陽性と判定する*²。なお、2 つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。

また、どちらか一方の DNA 抽出液において、Zein 検出用プライマー対で予定長の PCR

増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、その DNA 抽出液での結果を無効とし、もう一方の DNA 抽出液の結果だけで判定する。2つの DNA 抽出液とも Zein 検出用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 増幅バンドが検出できない場合には、改めて3回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。3回目の DNA 抽出液を用いた場合でも Zein 検出用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの未承認の種子の検知は不能とする。

試料（ロット）の判定例

		使用したプライマー対	試料番号											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A (1,20 0粒)	DNA 抽出 液1	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		検出用プライマー	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	
		確認用プライマー	+	+	+	+	-	/	-	/	-	/	/	
	DNA 抽出 液2	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	/	/	/	/	/	
B (1,20 0粒)	DNA 抽出 液1	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	
	DNA 抽出 液2	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	/	/	/	/	/	
判 定			陽 性	陽 性	陽 性	陽 性	陰 性	陰 性	陰 性	陰 性	※ 1	※ 1	※ 2	

＋は陽性、－は陰性、/ は検査不要を表す。

※1 Bの試料を用い、3回目の抽出を行う。

※2 A及びBの試料を用い、それぞれ3回目の抽出を行う。

栽培用トウモロコシ種子における遺伝子組換えトウモロコシ（CBH351）の検査方法

トウモロコシ種子について、ラテラルフロー法または定性 PCR 法で分析し、陽性と判定された場合は定性 PCR 法により確認検査を行う。なお、確認検査の際は、新たに 2,400 粒の種子を準備し検査を行う。確認検査においても陽性と判定された場合は、当該検体を陽性と判定する。

* 試料の処理方法等の選択・組合せ、それらの手順、結果の判定方法等について、あらかじめ詳細を作業書等に定めておくこと。

1. 試料の準備

検査に用いるトウモロコシ種子は、破砕粒や他の混入物を取り除いた完全粒とし、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認すること。

定性 PCR 法に用いる粉砕物は、0.5mm メッシュを通過したものをを用いることを推奨する。また、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いは十分に配慮すること。コンタミネーション対策は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 2 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

2. ラテラルフロー法

検査に用いるトウモロコシ種子数は 2,400 粒とし、テストキットの仕様によって、例えば 800 粒用キットの場合は 3 回に分け、600 粒用キットの場合は 4 回に分けて試験を行う。市販のテストキットは、<Trait>Bt9 Corn Grain 5-Minute Test Kit (Part# 7000012)

(Strategic Diagnostics (SDI) 社)、Agri-Screen® Cry9C Strip Test (Part# 8003)

(Neogen Corporation 社) またはこれらと同等の結果が得られるものをを用いる。以下に記述する方法は、キットの説明書に記載の方法と基本的に同一である。キットの仕様・手順等が変更された場合は、キットの説明書に従い分析を行うこと。なお、試験を行う場合には、水は特に断り書きがない限り、滅菌蒸留水を用いることを推奨する。

2.1. <Trait>Bt9 Corn Grain 5-Minute Test Kit (Part# 7000012)

2.1.1. 実験操作

採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒で 800 粒を採取し粉砕した後、粉砕物を 500 mL 容量程度の口の広い蓋付きの容器に採り、試料の重量の 1.25 倍量の滅菌蒸留水を加えたのち、10~20 秒間、試料が全て湿潤するまで良く振とうし、静置する。もしこの段階で上澄み液が生じなければ、さらに少量の滅菌蒸留水を加え、試料を良く振とうし、静置後上澄み液が生じたかどうか観察する。数 mL 程度の上澄み液が生じるまで少量の滅菌蒸留水を加え同様の操作を行う。次に、試料の上澄み液 0.5 mL をキット付属の 1.5 mL 容

チューブに移し、そのチューブに Trait Bt9 テストストリップを垂直に立てる。

2.1.2. 判定法

テストストリップを 1.5 mL 容チューブに立てて静置し、5 分経過した時点*で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に 2 本現れれば陽性、コントロールライン 1 本のみが現れれば陰性と判定する。また、1 本も現れなければ、その試験は無効とし、再試験を行う。1 検体 3 回（計 2,400 粒）の試験のうち 1 回でも陽性のものがあつた場合、その検体を陽性と判定する。

* 5 分間以上経過すると赤色のラインが濃くなる場合があり、正しく判定することができないので、注意が必要である。

2.2. Agri-Screen® Cry9C Strip Test (Part# 8003)

2.2.1. 実験操作

採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒で 800 粒を採取し粉砕した後、粉砕物を 500 mL 容量程度の口の広い蓋付きの容器に採り、滅菌蒸留水 400±20 mL を加えたのち、30～40 秒間、試料が全て湿潤するまでよく振とうし、静置する。次に試料の上澄み液 0.5 mL をキット付属の 1.5 mL 容チューブに移し、そのチューブに Agri-Screen® Cry9C テストストリップを垂直に立てる。

2.2.2. 判定法

テストストリップを 1.5 mL 容チューブに立てて静置し、10 分経過した時点*で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に 2 本現れれば陽性、コントロールライン 1 本のみが現れれば陰性と判定する。また、1 本も現れなければ、その試験は無効とし、再試験を行う。1 検体 3 回（計 2,400 粒）の試験のうち 1 回でも陽性のものがあつた場合、その検体を陽性と判定する。

* 10 分間以上経過すると赤色のラインが濃くなる場合があり、正しく判定することができないので注意が必要である。

3. 定性 PCR 法

定性 PCR 法は、抽出された DNA の一部をプライマー対を用いて PCR 増幅し、電気泳動法により、その増幅 DNA を検知する方法である。

検査は、採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒で 2,400 粒を採取し、2,400 粒を 2 回以上に分割し、それぞれ検査を行う。3.1.の DNA 抽出精製法に従って、分割した検体のそれぞれにつき 2 回並行で DNA 抽出を行い、得られた DNA 試料液を用い、3.3.の条件で定性 PCR を行う。1 検体 2 回以上（計 2,400 粒）の検査のうちいずれかが陽性となった場合、その検体を陽性と判定する。

- * 本項では、2,400 粒を 1,200 粒ずつ 2 回に分けて検査を行うこととする。
- * PCR では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅される。したがって、目的外の DNA（特に PCR 増幅産物）の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase 等がコンタミネーションしないよう注意して用いること。また、定性 PCR の際に用いる水は、特に断り書きがない限り滅菌蒸留水を用いること。
- * また、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 2 版）コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

3.1. DNA 抽出精製

採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒 2,400 粒を採取し、3. に従い分割したそれぞれの検体を均質に粉碎して、それぞれから 2 回並行で DNA を抽出する。DNA 抽出は、市販の DNA 抽出キットを使用する方法、界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）を使用する方法等いくつかの方法があるが、界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）とフェノール/クロロホルム混合液を用いて抽出精製する CTAB 法は、応用範囲が広い上、PCR 阻害物質が残存しにくく、純度の高い DNA を得ることができる非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルムという有害試薬を用いること及び煩雑な精製操作が必要という欠点がある。一方、市販の DNA 抽出キットを用いるとこれらの欠点を解消することができる。市販の DNA 抽出キットには、シリカゲル膜タイプのもの、シリカベースのレジンタイプのもの、イオン交換樹脂タイプのもの、マグネット吸着ビーズタイプのものがあるが、いずれの方法を利用しても、トウモロコシの種子から PCR に利用可能な DNA を抽出精製することができる。以上の点を考慮して、本項では、CTAB 法、シリカゲル膜タイプのキット（DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN 社）、DNeasy Plant Maxi Kit、GM quicker（NIPPON GENE 社）又は GM quicker²）、シリカベースのレジンタイプのキット（Promega Wizard DNA Clean-up System）を用いた DNA 抽出法を記す。

3.1.1. CTAB 法

均質に粉碎された試料 2 g を遠沈管（50 mL 容）に量り採り、CTAB 緩衝液^{*1} 15 mL を入れ、ホモジナイザーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の縁とホモジナイザーの先を洗浄するように CTAB 緩衝液 30 mL を加え、転倒混和後 55°C で 30 分間放置する。次いで放置液を攪拌し、均質化した溶液 600 μ L をマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に量り採る。次いで 500 μ L のフェノール/クロロホルム混合液^{*2} を加え、転倒混和後ミキサー

で軽く懸濁し、7,500×gで15分間室温遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時中間層に触れないように注意する。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液*3 500 μLを加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×gで15分間室温で遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロピルアルコール（室温）を加え、転倒混和後7,500×gで10分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。500 μLの70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500×gで1分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2～3分間真空乾燥する。このとき完全に乾燥しないように注意する。50 μLのTE緩衝液*4を加えてよく混和後、室温に15分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5 μLを加え、37℃で30分間放置する。200 μLのCTAB緩衝液を加えた後、250 μLのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×gで15分間室温遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。このとき、中間層に触れないように採取する。200 μLのイソプロピルアルコールを加え、転倒混和してから、7,500×gで10分間、室温で遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、200 μLの70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500×gで1分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2～3分間真空乾燥する。このとき、完全に乾燥しないよう注意する。50 μLの滅菌蒸留水を加えて混合した後、15分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものをDNA試料原液とする。

*1 CTAB緩衝液

ビーカーに、0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 8 mL、1 mol/L Tris-塩酸 (pH8.0) 20 mL、5 mol/L 食塩水 56 mLを入れ、約150 mLとなるように滅菌蒸留水を加え、攪拌しながらCTAB 4 gを加えて完全に溶解する。さらに滅菌蒸留水を加え全量を200 mLとし、オートクレーブで滅菌したものをCTAB緩衝液とする。

:2 フェノール/クロロホルム混合液

1 mol/L Tris-塩酸 (pH8.0) 飽和フェノールとクロロホルム/イソアミルアルコール混合液*3を1 : 1 (v/v)で混合したものをフェノール/クロロホルム混合液とする。

*3 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24 : 1 (v/v)で混合したものをクロロホルム/イソアミルアルコール混合液とする。

*4 TE緩衝液

各最終濃度が10 mmol/L Tris-塩酸 (pH8.0)、1 mmol/L EDTA (pH8.0)となるように滅菌蒸留水を用いて調製したものをTE緩衝液とする。

3.1.2. シリカゲル膜タイプキット法① (DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社) を使用す

る方法)

均質に粉碎した試料 2 g を遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液^{*1} 10 mL と RNase A 20 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°C で 15 分間加温する。その間 2、3 回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2 緩衝液^{*2} 3,250 µL を加え、氷上に 10 分間静置した後、4,000 × g 以上、4 °C の条件で 20 分間遠心する^{*3}。次いでその上清 500 µL を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 4 分間遠心後、溶出液を遠沈管 (15 mL 容) に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の 1.5 倍量の AP3 緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}を加える。その混合液 500 µL を mini spin column に負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6}遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 µL を同じ mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW 緩衝液^{*7} 500 µL を負荷し、10,000 × g 以上で 1 分間^{*6}遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計 3 回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10,000 × g 以上で 20 分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌蒸留水 70 µL を加え、5 分間静置した後、10,000 × g 以上で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度滅菌蒸留水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*2 AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*5 AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液^{*4} とエタノール (96-100%) を 1 : 2 で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

*6 遠心時間

mini spin columnに負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜調整する。

*7 AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール(96-100%)を混合したものをAW 緩衝液とする。

3.1.3. シリカゲル膜タイプキット法② (DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN 社) を使用する 方法)

均質に粉砕された試料 1 g を 50 mL 容チューブに量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 5 mL と、RNase A (キット付属) 10 μ L を加え、試料がチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーで激しく混合し、65°C の恒温水槽内で 1 時間保温する。その間 15 分ごとに 3 回、試料を激しく転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌する。反応後のチューブに AP2 緩衝液 1.8 mL を加え、試験管ミキサーを用いて 10 秒間最高速で攪拌後、氷中に 15 分間静置する。次にスイング式遠心分離器を使用し、3,000 \times g で室温で 15 分間遠心分離する*¹。上清を 4.2 mL 採取し*²、QIAshredder spin column (lilac) に負荷し、3,000 \times g で室温で 5 分間遠心分離後、上清 4 mL を新しい 50 mL 容チューブに移す*²。このチューブを試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌後、3.4 mL を採取し、新しい 50 mL 容チューブに移す。次いで、5.1 mL の AP3/Et-OH 緩衝液を加え、試験管ミキサーを用いて最高速で 10 秒間攪拌後、溶液全量を DNeasy Spin Column (colorless) に負荷し、3,000 \times g で室温で 5 分間遠心分離する。遠心後、溶出液を廃棄し、カラムに AW 緩衝液 12 mL を負荷し、3,000 \times g で室温で 15 分間遠心分離する。その後、カラムをキット付属の 50 mL 容チューブに移し、あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌蒸留水 1 mL を加え、5 分間室温で静置後、3,000 \times g で室温で 10 分間遠心分離する。この溶出液の液量を量り、2 mL 容のチューブに移し、溶出液と等量のイソプロパノールを添加する。このチューブを上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置する。その後、12,000 \times g で、4°C、15 分間遠心分離後、上清を廃棄する。500 μ L の 70% エタノールを加えて沈殿物を洗浄後、再び 12,000 \times g で、4°C、3 分間遠心分離し、上清を廃棄する。沈殿物を乾燥させた後、50~100 μ L の TE 緩衝液*³ を加えて沈殿物を溶解し、DNA 試料原液とする。

*1 以下、カラムの遠心分離操作は、スイング式遠心分離器を使用する。

*2 沈殿物や上層の膜を吸わないように注意する。

*3 各最終濃度が 10 mmol/L Tris-塩酸 (pH8.0)、1 mmol/L EDTA (pH8.0) となるように滅菌蒸留水を用いて調製したものを TE 緩衝液とする。

3.1.4. シリカゲル膜タイプキット法③ (GM quicker (NIPPON GENE 社) を使用する方 法)

均質に粉碎した試料 1 g を遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、GE1 緩衝液*1 6 mL と RNase A 20 μ L を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後*2、室温で 10 分間静置する。GE2 緩衝液*3 750 μ L を加え、10~12 回転倒混和し*4、氷上に 10 分間静置する。5,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 10 分間遠心*5 する。次いでその上清*6 400 μ L を 1.5 mL 容チューブに移し、GB3 緩衝液 50 μ L 及びエタノール (100%) 200 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する*7。混合液 650 μ L (全量) を spin column に負荷した後、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 600 μ L を負荷し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を乾燥させるため、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 3 分間遠心する。spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、滅菌蒸留水 50 μ L を加え 3 分間室温で静置した後、13,000 \times g 以上で 1 分間遠心し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 GE1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker (NIPPON GENE 社)) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*2 攪拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。ボルテックスに対して 50 mL 容チューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと攪拌する。攪拌が不十分な場合はさらに 30~60 秒間攪拌する。

*3 GE2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker (NIPPON GENE 社)) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

*4 発生した泡がチューブ内に残っていても、続けて GE2 緩衝液を添加することが可能である。抽出液には粘性が生じているので、添加した GE2 緩衝液が十分に均一となるよう混合する。

*5 使用するローター及び 50 mL 容チューブの特性を考慮したうえで、g が最大となるように遠心条件を設定する。

*6 沈殿や浮遊物等を可能な限り取らないように上清を回収する。また、上清は 4 mL 程分取することが可能であり、4 $^{\circ}$ C の条件であれば、数日は安定である。その後の試験にあわせ、DNA の再抽出・精製が必要となった場合には、本上清を用い、それ以降の操作を実施する。

*7 GB3 緩衝液を添加し、続いてエタノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析出物が生じて白濁している場合は、液が透明になるまで十分転倒混和する。

3.1.5. シリカゲル膜タイプキット法④ (GM quicker2 (NIPPON GENE 社) を使用する方法)

均質に粉碎した試料 (トウモロコシ種子粉末) 2.0 g を遠沈管 (50 mL 容) に量り採る。GE1 Buffer*¹ 10 mL を 50 mL 容チューブに添加し、ボルテックスミキサーにて約 30 秒間激しく混合する*²。遠心分離 (≥5,000×g、20 分、室温)*³ する。沈殿を吸わないように、上清 700 μL を新しい 2.0 mL 容チューブに移し Proteinase K (20 mg/mL) 20 μL、α-アミラーゼ 2 μL 及び RNase A (100 mg/mL) *⁴ 10 μL 添加し、ボルテックスミキサーにてよく混合する。15 分、60°C で加温する。GE2-K Buffer*⁵ 85 μL 添加し、ボルテックスミキサーで良く混合する。遠心分離 (≥13,000×g、5 分、室温) する。沈殿を吸わないように、上清 400 μL を新しい 1.5 mL 容チューブに移す。GB3 Buffer*⁶ 150 μL 添加後、イソプロパノール 150 μL 添加し、液が透明になるまで、10~12 回チューブを激しく転倒させ、良く混合する*⁷。この混合液を Spin Column に添加後、遠心分離 (≥13,000×g、1 分、室温) し、濾液を廃棄する。650 μL の GW Buffer*⁸ を Spin Column に添加し、遠心分離 (≥13,000×g、1 分、室温) し、濾液を廃棄する。Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移す。50 μL の滅菌蒸留水を滴下し、3 分間室温にて静置する。遠心分離 (≥13,000×g、1 分、室温) する。これにより得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 GE1 Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker2 (NIPPON GENE 社)) 付属のもの、または別途購入したものをを用いる。

*2 攪拌が不十分な場合には、DNA 収量が減少する原因となるため、さらに 30~60 秒攪拌する。

*3 使用するローター及び遠沈管 (50 mL 容) の特徴を考慮した上で、g が最大になるように遠心条件を設定する。

*4 Proteinase K、α-アミラーゼ、RNase A

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものをを用いる。

*5 GE2-K Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものをを用いる。

*6 GB3 Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

*7 GB3 Buffer を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析
出物が生じた場合には、カラムが詰まる原因となるために、液が透明になるまで十分に転
倒混合する。

*8 GW Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

3.1.6. シリカベースレジンタイプキット法

均質に粉砕した試料 2 g を遠沈管 (50 mL 容) に量り採り、抽出用緩衝液^{*1} 17.2 mL、
5 mol/L グアニジン-塩酸 2 mL 及び、20 mg/mL Proteinase K を 0.8 mL 加え、激しくポ
ルテックスミキサーで攪拌後、55~60°C で振とうしながら 3 時間保温する。次いで、室温
まで温度を下げ、3,000×g で 10 分間遠心する。上清が濁っている場合、上清の一部をマ
イクロ遠沈管(1.5 mL 容)に移し、更に 14,000×g で 10 分間遠心する。得られた澄明な上
清 500 µL と、DNA Clean-up Resin 1 mL をマイクロ遠沈管(1.5 mL 容)に採り、転倒混和
し、混合液とする。次に mini column の上部に注射筒を付け、マニホールド (吸引装置)
^{*2}に装着する。マニホールドのコックが閉じていることを確認した後、混合液を注射筒か
ら mini column に負荷する。コックを開け、減圧吸引して溶液を完全に除去し、次いで 2
mL の 80%イソプロピルアルコールを注射筒から加えカラムを洗浄する。注射筒を外した
mini column をマイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) に装着し、室温下 10,000×g で 2 分間遠心
し、カラムを乾燥する。次に mini column を新しいマイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) に移し、
あらかじめ 65~70°C に温めておいた滅菌蒸留水 50 µL を滴下する。1 分間放置後、室温
下 10,000×g 以上で 1 分間遠心し、DNA を溶出し、得られた溶出液を DNA 試料原液とす
る。

*1 抽出用緩衝液

150 mM 塩化ナトリウム、2 mmol/L EDTA 及び 1% SDS を含む 10 mmol/L Tris-塩酸
緩衝液 (pH7.5)

*2 吸引装置

吸引装置がない場合には、遠心等で同様の結果が得られる。

3.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料の適当量を取り、原液もしくは必要に応じて DNA 溶液と同じ溶液で 10~50 倍希釈した希釈液について 200~300 nm の範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、230 nm、260 nm 及び 280 nm の吸光度 (A230、A260 及び A280*) を記録する。次いで A260 が 1 のときの DNA 濃度を 50 ng/μL DNA として、DNA 試料原液の DNA 濃度を算出する。また、A 260/A280 を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の PCR に必要な濃度に滅菌蒸留水で希釈し DNA 試料液とし、-20℃以下で冷凍保存する。冷凍保存した DNA 試料液は、融解後直ちに使用する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

* A260 が DNA 由来の吸光度、A280 がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

3.3. PCR 増幅

PCR 用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、PCR 緩衝液*1、0.20 mmol/L dNTP、3 mmol/L 塩化マグネシウム、それぞれ 0.2 μmol/L の CBH351 検出用プライマー対*2 並びに 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ*3 を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 2.5 μL (DNA として 25 ng) を氷中で加え、全量を 25 μL にする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置*4 にセットする。反応条件は次の通りである。95℃に 10 分間保ち反応を開始させた後、95℃ 0.5 分間、60℃ 0.5 分間、72℃ 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72℃で 7 分間保った後、4℃で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

この際、必ず次の 4 つの対照を同時に調整することとする。試料から DNA が抽出されていることの確認として、DNA 試料液ごとに、CBH351 検出用プライマー対の代わりに内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対*5 を用いて同様に PCR 増幅を行ったもの、陽性対照として、DNA 試料液の代わりに市販の陽性対照プラスミド*6 を用いて反応液を調整し、同様に PCR 増幅を行ったもの、PCR 反応のブランク反応液として、プライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないもの、の 4 つである。ただし、内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対を用いた対照については、同時に実施した他系統の分析で確認している場合は操作を省いてもよい。

以上の結果、内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対、CBH351 検出用プライマー対及び陽性対照で陽性で、かつ、プライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないものがともに陰性となった場合、CBH351 確認用プライマー対*7 を用い、同様に PCR 増幅を行う*8。

*1 PCR 緩衝液

PCR buffer II ((Applied Biosystems 社)) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2 CBH351 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (CaM03-5') : 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

R-primer (CBH02-3') : 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ ((Applied Biosystems 社)) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*4 PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 ((Applied Biosystems 社)) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*5 内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

*6 陽性対照プラスミド

NIPPON GENE 社から公定法準拠試薬 (PCR 法) として販売されているもの又は同等の結果が得られるものを用いる。

*7 CBH351 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Cry9C-5') : 5'-TAC TAC ATC GAC CGC ATC GA-3'

R-primer (35Ster-3') : 5'-CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA-3'

*8 プライマーの精製グレード

ここで使用するプライマーの精製グレードは、全て HPLC 精製グレードとする。

3.4. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅バンドを確認する。

3.4.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液*を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に、ゲルを 50°C前後まで冷やした後、ゲルメーカーにゲルを流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、泳動する目的産物のバンド長にあわせてゲル濃度 (1.0~4.0%) を決める。

* TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mmol/L Tris-酢酸、1 mmol/L EDTA となるように滅菌蒸留水を用いて

調製したものを TAE 緩衝液とする。

3.4.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 5.0~7.5 μ L と適量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100 V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 1/3 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

3.4.3. ゲルの染色

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100 mL 当たり、5 μ L のエチジウムブロミド* 溶液 (10 mg/mL) を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。

* エチジウムブロミド

2 本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取り扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

3.4.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ* を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線 (312 nm) を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的のバンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

* 食品包装用ラップ

ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

3.5. 結果の判定

最初にプライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないもので PCR 増幅バンドが検出されていないことを確認する。このどちらかに PCR 増幅バンドが確認された場合は、実験中に汚染が起きたと判断されるため、実験をやり直すこととする。また、陽性対照プラスミドを加えたもので PCR 増幅バンドが確認されない場合も PCR 増幅反応が適切に行われていないと判断されるため、実験をやり直すこととする。

内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー対を用いたレーンで 157 bp の PCR 増幅バンドが検出され、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで 170 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 反応液を調製し、確認用プライマー

対を用い PCR 増幅を行う。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、171 bp の PCR 増幅バンドが検知された場合、本検体は CBH351 陽性と判定する。なお、2つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。

また、どちらか一方の DNA 抽出液において Zein 検出用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、その DNA 抽出液での結果を無効とし、もう一方の DNA 抽出液の結果だけで判定する。2つの DNA 抽出液とも Zein 検出用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 増幅バンドが検出できない場合には、改めて3回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。3回目の DNA 抽出液を用いた場合でも Zein 検出用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの未承認の種子の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

試料（ロット）の判定例

		使用したプライマー対	試料番号											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A (1,200粒)	DNA 抽出液1	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		検出用プライマー	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	
		確認用プライマー	+	+	+	+	-	/	-	/	-	/	/	
	DNA 抽出液2	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	/	/	/	/	/	
B (1,200粒)	DNA 抽出液1	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	
	DNA 抽出液2	内在性遺伝子 Zein 検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	/	/	/	/	/	
判定			陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	※1	※1	※2	

＋は陽性、－は陰性、/ は検査不要を表す。

※1 Bの試料を用い、3回目の抽出を行う。

※2 A及びBの試料を用い、それぞれ3回目の抽出を行う。

栽培用トウモロコシ種子における遺伝子組換えトウモロコシ（DAS59132）の検査方法

トウモロコシ種子について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法で分析し、陽性と判定された場合は、再度、リアルタイム PCR 法により確認検査を行う。なお、確認検査の際は、新たに 2,400 粒の種子を準備し検査を行い、確認検査においても陽性と判定された場合は、当該検体を陽性と判定する。

* 試料の処理方法等の選択・組合せ、それらの手順、結果の判定方法等について、あらかじめ詳細を作業書等に定めておくこと。

1. 試料の準備

検査に用いるトウモロコシ種子は、破砕粒や他の混入物を取り除いた完全粒とし、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認すること。

定性 PCR 法に用いる粉砕物は、0.5 mm メッシュを通過したものをを用いることを推奨する。また、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いは十分に配慮すること。コンタミネーション対策は、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第 2 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

2. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法(ABI PRISM™ 7900、7700、7500)

検査は、採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒で 2,400 粒を採取し、2,400 粒を 2 回以上に分割し、それぞれ検査を行う。2.1. の DNA 抽出精製に従って、分割した検体のそれぞれにつき 2 回並行で DNA 抽出を行い、得られた DNA 試料液を用い、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を行う。1 検体あたり 2 回以上（計 2,400 粒）の検査を実施し、いずれかが陽性となった場合、その検体を陽性と判定する。

* 本項では、2,400 粒を 1,200 粒ずつ 2 回に分けて検査を行うこととする。

2.1. DNA 抽出精製

PCR 増幅には 2.1.1. シリカゲル膜タイプキット法①（DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN 社）を使用する方法）又は 2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法④（GM quicker2（NIPPON GENE 社）を使用する方法）により抽出した DNA 試料液を用いる。

2.1.1. シリカゲル膜タイプキット法①（DNeasy Plant Mini Kit を使用する方

均質に粉砕した試料 2 g を遠沈管（50 mL 容）に量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液*1 10 mL と RNase A 20 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサ

一で激しく混合し、65°Cで15分間加熱する。その間2、3回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2 緩衝液^{*2} 3,250 µL を加え、氷上に10分間静置した後、4,000×g以上、4°Cの条件で20分間遠心する^{*3}。次いでその上清500 µLをQIAshredder spin columnに負荷し、10,000×g以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管（15 mL容）に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の1.5倍量のAP3 緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}を加える。その混合液500 µLをmini spin columnに負荷し、10,000×g以上で1分間^{*6}遠心する。残りの混合液のうち、さらに500 µLを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いでAW 緩衝液^{*7} 500 µLを負荷し、10,000×g以上で1分間^{*6}遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計3回繰り返す。溶出液を捨て、mini spin columnを乾燥させるため、10,000×g以上で20分間遠心する。mini spin columnをキットの遠沈管に移し、あらかじめ65°Cに温めておいた滅菌蒸留水70 µLを加え、5分間静置した後、10,000×g以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度滅菌蒸留水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*2 AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*5 AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液^{*4} とエタノール（96-100%）を1：2で混合したものをAP3 緩衝液・エタノール混液とする。

*6 遠心時間

mini spin columnに負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜調整する。

*7 AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール(96-100%)を混合したものを AW 緩衝液とする。

2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法④ (GM quicker2 を使用する方法)

均質に粉砕した試料 (トウモロコシ種子粉末) 2.0 g を遠沈管 (50 mL 容) に量り採る。GE1 Buffer^{*1} 10 mL を 50 mL 容チューブに添加し、ボルテックスミキサーにて約 30 秒間激しく混合する^{*2}。遠心分離 (≥5,000g、20 分、室温)^{*3}する。沈殿を吸わないように、上清 700 μL を新しい 2.0 mL 容チューブに移し Proteinase K (20 mg/mL) 20 μL、 α -アミラーゼ 2 μL 及び RNase A (100 mg/mL) ^{*4} 10 μL 添加し、ボルテックスミキサーにてよく混合する。15 分、60°C で加温する。GE2-K Buffer^{*5} 85 μL 添加し、ボルテックスミキサーで良く混合する。遠心分離 (≥13,000g、5 分、室温) する。沈殿を吸わないように、上清 400 μL を新しい 1.5 mL 容チューブに移す。GB3 Buffer^{*6} 150 μL 添加後、イソプロパノール 150 μL 添加し、液が透明になるまで、10~12 回チューブを激しく転倒させ、良く混合する^{*7}。この混合液を Spin Column に添加後、遠心分離 (≥13,000 g、1 分、室温) し、濾液を廃棄する。650 μL の GW Buffer^{*8} を Spin Column に添加し、遠心分離 (≥13,000 g、1 分、室温) し、濾液を廃棄する。Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移す。50 μL の滅菌蒸留水を滴下し、3 分間室温にて静置する。遠心分離 (≥13,000g、3 分、室温) する。これにより得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 GE1 Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker2) 付属のもの、または別途購入したものを用いる。

*2 攪拌が不十分な場合には、DNA 収量が減少する原因となるため、さらに 30~60 秒攪拌する。

*3 使用するローター及び遠沈管 (50 mL 容) の特徴を考慮した上で、g が最大になるように遠心条件を設定する。

*4 Proteinase K、 α -アミラーゼ、RNase A

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものを用いる。

*5 GE2-K Buffer

シリカゲル膜タイプのキット (GM quicker 2) 付属のもの、または別途購入したものを用いる。

*6 GB3 Buffer

シリカゲル膜タイプのキット（GM quicker 2）付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

*7 GB3 Buffer を添加し、続いてイソプロパノールを添加した後に、攪拌操作を行う。析
出物が生じた場合には、カラムが詰まる原因となるために、液が透明になるまで十分に転
倒混合する。

*8 GW Buffer

シリカゲル膜タイプのキット（GM quicker 2）付属のもの、または別途購入したものを
用いる。

2.2 プライマー対及びプローブ

2.2.1 トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブ

トウモロコシ陽性対照用試験はトウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、
スターチシンターゼ IIb（SSIIb）遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対
SSIIb-3 とプローブ SSIIb-Taq を用いる。

2.2.2 DAS59132 検出用プライマー対

F-primer (32f) : 5' -CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

R-primer (32r) : 5' -GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

（各プライマーは滅菌蒸留水で溶解する。）

2.2.3 DAS59132 検出用プローブ

FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA

（プローブは滅菌蒸留水で溶解する。）

2.3 PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μ L /well として調製する。その組成は以下のとおりである。

Universal PCR Master Mix*1 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、10 μ mol/L）
1.0 μ L*2、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.5 μ L を混合し、滅菌蒸留水で全量 20 μ L に
調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L（50 ng）を添加する*3。分注操作終了後、シール*4
又は MicroAmp Optical Caps で真上から完全にウェルを密閉する。シールを用いる際には、
しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャターを用いて行う。シール又
はキャップをした後、ボルテックスミキサーにより攪拌し、プレートを軽く遠心してスピ
ンダウンする。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad*5 を茶色

の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。試験は、1DNA 試料液あたり 2 well 並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2 well 分を同時に調製する。

*1 Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ずボルテックスミキサーを用いて 3 秒程度混合した後、軽く遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 対象プライマー対溶液量

トウモロコシ陽性対照用試験では各プライマー (25 $\mu\text{mol/L}$) を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

*3 可能であれば、陽性対照として DNA 試料液の代わりに陽性対照プラスミドを用いた反応液を調製することが望ましい。

*4 (ABI PRISM™ 7900、7500) 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーションター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 (ABI PRISM™ 7700) 96 ウェルプレート及びプレートの蓋

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び MicroAmp Optical Caps、8caps/strips(Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

*5 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems 社) を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。(ABI PRISM™ 7700 では、当該 Pad は使用しない。)

2.4 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置、種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類 (「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。またプローブ特性に関しては、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように設定する。なお、トウモロコシ陽性対照用、DAS59132 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

2.5 PCR

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50°C、2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C15秒、60°C1分を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行う。Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* ABI PRISM™7500については component を確認する。

3. 結果の判定

トウモロコシ陽性対照用試験及び DAS59132 検出用試験のいずれについても、結果の判定は、Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認及び multicomponent 上での対象色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。第一に目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合に陽性を疑う。次いでベースライン (3サイクルから 15サイクル) の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th.Line を選択する。その Th.Line から Ct 値が得られるか否かを解析する。その後トウモロコシ陽性対照用試験及び DAS59132 検出用試験の両方において、38未満の Ct 値が得られた場合に陽性と判定し、38未満の Ct 値が得られない場合は陰性と判定する。なお、上記判定により陽性が判定された結果について multicomponent を解析し、目視で FAM の蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROX の蛍光強度の明確な下降や FAM の蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。

また、どちらか一方の抽出液において、トウモロコシ陽性対照用試験で 38未満の Ct 値が得られない場合には、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法以降の操作を行い、それでも 38未満の Ct 値が得られない場合には、その抽出液での結果を無効とし、もう一方の抽出液の結果のみで判定する。二つの DNA 抽出液ともにトウモロコシ陽性対照用試験で 38未満の Ct 値が得られない場合には、改めて3回目の DNA 抽出精製を行い、さらにリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法以降の操作を実施して、判定を行う。3回目の DNA 抽出液を用いた場合でもトウモロコシ陽性対照用試験で 38未満の Ct 値が得られない場合には、本試料からの DAS59132 の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

試料（ロット）の判定例

		ターゲット名	試料番号						
			1	2	3	4	5	6	7
A (1,200 粒)	DNA 抽	トウモロコシ内在性 DNA	+	+	+	+	+	+	-
	出液 1	DAS59132 系統由来 DNA	+	+	+	-	-	-	-
	DNA 抽	トウモロコシ内在性 DNA	+	+	-	+	+	-	-
	出液 2	DAS59132 系統由来 DNA	+	-	-	+	+	-	-
B (1,200 粒)	DNA 抽	トウモロコシ内在性 DNA	+	+	-	+	+	-	-
	出液 1	DAS59132 系統由来 DNA	+	-	-	-	-	-	-
	DNA 抽	トウモロコシ内在性 DNA	+	+	-	+	-	-	-
	出液 2	DAS59132 系統由来 DNA	+	-	-	-	-	-	-
判 定			陽 性	陽 性	陽 性	陽 性	陰 性	陰 性	陰 性

＋は陽性、－は陰性を表す。

栽培用ナス及びピーマン種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査法は栽培用のナス及びピーマン（トウガラシを含む）の種子を対象とする。GM quicker 2（NIPPON GENE 社）を用い、1検体から2反復^{*}でDNAを抽出・精製する。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え体由来遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイムPCRに供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 1検体から2反復分の種子粉砕物が得られない場合は反復なし。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したナス又はピーマン種子から破砕粒や他の混入物を取り除き、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要な粒数採取する。表面に種子コーティング及び薬剤処理が施されている場合は、1%SDS溶液で10回洗浄後、滅菌蒸留水で3回リンスし、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、さらに65℃で乾燥させる。その後、フードミル（ミルサー700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉砕する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉砕できない場合には、複数回に分けて粉砕する。粉砕物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉砕物からのDNA抽出・精製

種子粉砕物1点につき2反復^{*1}で実施する。

種子粉砕物1 g^{*2}を遠沈管(50 mL 容)に量り採り、GE 1 緩衝液4 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 µL、Proteinase K (20 mg/mL) 20 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65℃で15分間静置する。GE 2-K 緩衝液500 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合する。スイング式遠心分離機又はアングルロータにより4,000 ×g、室温で10分間遠心分離する。上清1 mLを1.5 mL容チューブに分取し、遠心分離機により13,000 ×g以上、室温で5分間遠心分離する。上清400 µLを新たな1.5 mL容チューブに分取し、GB 3 緩衝液150 µL及びイソプロピルアルコール 150 µLを添加した後、10～12回転倒混和する。混合液全量をSpin columnに負荷した後、遠心分離機により13,000 ×g以上、室温で1分間遠心分離する。溶出液を捨て、Spin column にGW緩衝液650 µLを加え、遠心分離機により13,000 ×g以上、室温で1分間遠心分離する。Spin column を新た

な1.5 mL容チューブに移し、滅菌蒸留水50 μ Lを加え、室温で3分間静置する。遠心分離機により13,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA 試料原液とする。

*¹ 2反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*² 種子粉碎物が1 gに満たない場合は全量。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適当量を採り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7~2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調整及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20°C以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20ng/ μ lに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

*¹希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・TiプラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ナスの β -fructosidase遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Pomt F、Pomt R及びAubpr」又はピーマンの β -fructosidase遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Pomt F、Poiv R及びPoiv pr」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

- ① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」
 P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'
 P35S-R : 5'- CCT CTC CAAATG AAA TGA ACT TCC T -3'
 P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA
- ② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
 TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
 TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
 TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA
- ③ ナス内在性遺伝子 (β -fructosidase) 検知プライマー対・プローブ「Pomtom F、Pomtom R 及び Aubpr」
 Pomtom F: 5'- CTG CCT CCG TCAAGA TTT GGT CAC T -3'
 Pomtom R: 5'- CTC TTC CCT TTC TTG ATG G -3'
 Aubpr: FAM 5'- TAA TTC ATC CAA CCA TAT CT -3' MGB
- ④ ピーマン内在性遺伝子 (β -fructosidase) 検知プライマー対・プローブ「Pomtom F、Poiv R 及び Poiv pr」
 Pomtom F: 5'- CTG CCT CCG TCAAGA TTT GGT CAC T -3'
 Poiv R: 5'- ATC TTG GAT TTC TTG ATG GGA CGG T -3'
 Poiv pr: VIC 5'- GAT ATT CGA TCC TTC CCA -3' MGB

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 μ L/ウェルになるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 各0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、滅菌蒸留水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

*1 TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

*2 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μL 添加する。

*3 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーケーター

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、測定結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「NTC」: Non-Template Control、「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。またプローブ特性に関して、「Reporter」については、ピーマン β -fructosidase 遺伝子配列検知試験で「VIC」に設定するのを除き「FAM」に設定する。「Quencher」については、35S プロモーター遺伝子配列検知試験及び NOS ターミネーター遺伝子配列検知試験では「TAMRA」、ナス及びピーマン β -fructosidase 遺伝子配列検知試験では Applied Biosystems 7900HT の場合は「Non Fluorescent」、Applied Biosystems 7500 の場合は「MGB」、StepOne Plus 及び QuantStudio 5 の場合は「NFQ-MGB」にそれぞれ設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μL に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50 $^{\circ}\text{C}$ ・2分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}\text{C}$ で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次に、95 $^{\circ}\text{C}$ ・30秒間、60 $^{\circ}\text{C}$ ・1分間を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行い、最後に、Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM 又は VIC) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって

行う。まず、遺伝子組換え体検知試験において目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルで設定し、 ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として 0.2 に設定する。ただし、Th. line がノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1 検体から得られた全 DNA 試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施した内在性検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれかのみすべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉碎物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

栽培用パパイヤ種子における未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法 (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN)

本検査法はパパイヤの種子を対象とする。GM quicker2 (NIPPON GENE 社) を用い、種子粉碎物 1 点につき 1 又は 2 点の DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換えパパイヤの含有の有無を判定する。組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブは、カリフラワーモザイクウイルス 35S 検知用に加え、パパイヤ種子が台湾産又はインド産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知用、タイ産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-SC) 検知用、中国産又はベトナム産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN) 検知用を用いる。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したパパイヤ種子から、破碎粒や他の混入物を取り除き、表面にゼリー状の皮膜等の付着物がないことを確認し、無作為に必要な粒数の種子を採取し、1% SDS 溶液で 10 回洗浄後、滅菌蒸留水で 3 回リンスし、65℃で 2 時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に 65℃で乾燥する。余った種子は冷蔵保管する。

(1) 種子数が 10 粒未満の場合

滅菌済みのピンセットを用い、乾燥した種子を 3 粒ずつ¹、クリーンベンチ内で 30 分以上 UV 照射し滅菌した厚手のビニル袋²に入れ、常温で、ビニル袋の上から、乳棒等を用い、平らに押し潰した後、磨砕する。磨り潰した試料に GE1 緩衝液 800 µL を加え、マイクロピペットを用いて混合し、全量を 1.5 mL 容チューブに移し、速やかに「1.2 種子粉碎物からの DNA 抽出・精製」の RNase A 10 µL の添加以降の操作に移行する。

上記により、分析試料は、乾燥後の種子数が 1～3 粒以下の場合は 1 点、4～6 粒以下の場合は 2 点、7～9 粒の場合は 3 点得られる。

¹ 分析に供する種子が 3 粒、6 粒又は 9 粒に満たない場合、非遺伝子組換えパパイヤであることが明らかな種子を補いそれぞれ 3 粒、6 粒又は 9 粒とすること。

² 試料磨砕用厚手袋 (ヨーパー袋) 大洋社 アズワン、品番: 6-631-01 (75 mm × 130 mm × 0.1 mm) と同等のものを用いる。

(2) 種子数が 10 粒以上の場合

滅菌済みのピンセットを用い、乾燥した種子を粉碎容器に移す。種子数が 10～100 粒の場合は、ステンレスビーズ等とともに、50 mL 容チューブに入れ、シェイクマスター (BMS 社) *1 等を用い、種子を粉碎する。ビーズを取り除いた後、滅菌済の葉さじで壁面につい

た種子粉碎物を底に集め、ボルテックスミキサーでよく攪拌し分析試料とする。種子数が100粒以上の場合は、シェイクマスターにより複数回に分けて粉碎し混合するか、フードミル（ミルサー700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い、種子を粉碎する。

上記により、種子粉碎物が1点得られる。なお、種子粉碎物の全量が100 mgに満たない場合、全量を「1.2 種子粉碎物からのDNA抽出・精製」以降の操作に供する。

1 シェイクマスター（BMS）がない場合は、乳棒やフードミル（ミルサー700G（イワタニ社）又はその同等品）等、同等の粉碎方法を用いること。その際、試料を均質化するため、粉碎した試料を一度、葉包紙の上に取り、50 mL容チューブに入れ、ボルテックスミキサーで混合すること。なお、シェイクマスター（BMS）を使用する場合は、15 mmステンレスビーズ1個を用い、600 rpmで2分間、次いで1,000 rpmで30秒間の処理又は20 mmジルコニアビーズ1個及び10 mmジルコニアビーズ1個を用い、1,000 rpmで1分間の処理により粉碎可能であることを確認している。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からのDNA抽出・精製

1.1の(1)で得られた種子粉碎物については、RNase Aの添加以降の操作に供し、1点につきDNA抽出物1点を得る。

1.1の(2)で得られた種子粉碎物については、全量が200 mg以上の場合は1点につきDNA抽出物2点を、200mgに満たない場合は1点につきDNA抽出物1点を得る。

種子粉碎物100 mgを1.5 mL容チューブに量り採り、GE1緩衝液800 μ L、RNase A 10 μ L、Proteinase K 20 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65°Cで15分間静置する。GE2-K緩衝液100 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで混合する。13,000 \times g以上、4°Cの条件で10分間遠心分離する。上清550 μ Lを新たな1.5 mL容チューブに移し、13,000 \times g以上、4°Cの条件で10分間遠心分離する。上清を新たな1.5 mL容チューブに移し、GB3緩衝液200 μ L及びイソプロパノール200 μ Lを添加した後、10~12回転倒混和する。混合液650 μ LをSpin columnに負荷した後、13,000 \times g以上、4°Cの条件で30秒間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液全量を負荷するまでこの操作を繰り返す。次いでGW緩衝液650 μ Lを負荷し、13,000 \times g以上、4°Cの条件で1分間遠心分離し、溶出液を捨てる。Spin columnを新たな1.5 mL容チューブに移し、滅菌蒸留水50 μ Lを加え室温で3分間静置した後、13,000 \times g以上で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200～320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A260/A280)。この比が1.7～2.0になれば、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7～2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調整及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとにマイクロ試料管に分注後、-20℃以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 ng/μLに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

^{*1} 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3 リアルタイムPCR (Applied Biosystems 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

収去したパパイヤ種子が台湾産又はインド産の場合、組換え遺伝子(PRSV-YK)検知用として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列(以下「CaMV 35SP」という。)と、パパイヤリングスポットウイルスYK株の膜タンパク質 (PRSV-cp)の遺伝子配列の境界領域を検知するプライマー対・プローブを2種類(「YK-1」、「YK-2」)、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

収去したパパイヤ種子がタイ産の場合、組換え遺伝子(PRSV-SC)検知用として、CaMV 35SPと*Papaya Ringspot Virus coat protein* (PRSV-cp)遺伝子配列の境界領域を検知するプライマー対・プローブ「SC」、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

収去したパパイヤ種子が中国産又はベトナム産の場合、組換え遺伝子(PRSV-HN)検知用として、遺伝子組換えパパイヤHuanong No.1に導入されたDNA配列とパパイヤゲノムの境界領域を検知するプライマー対・プローブ「HN」、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

収去したパパイヤ種子が台湾産、タイ産、中国産、ベトナム産又はインド産以外の国又は地域に由来する場合、CaMV 35SPを検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用として、Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライ

マー対・プローブ「Chy」を用いる。

プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

(1) 組換え遺伝子(PRSV-YK)検知用プライマー対・プローブ

① 「YK-1」

YK-1F : 5'-GAT CCC CGG GTG GTC AGT -3'

YK-1R : 5'-CCG GTA TCC ACA GCT TCA TTT T -3'

YK-P : 5'-FAM- AGA CGC CAT GGA AGG-MGB-3'

② 「YK-2」

YK-2F : 5'-ACA CGG GGG ACT CTA GAG -3'

YK-2R : 5'-ACC GGT ATC CAC AGC TTC -3'

YK-2P : 5'-FAM- TCC CTT CCA TGG CGT C- TAMRA-3'

(2) 組換え遺伝子(PRSV-SC)検知用プライマー対・プローブ「SC」

SC-F : 5'-CAT TTC ATT TGG AGA GAA CAC G -3'

SC-R : 5'-ACC AGC ATC CAC AGC TTC -3'

SC-P : 5'-FAM- ACT CTA GAG GAT CCA TGT CCA A-TAMRA-3'

(3) 組換え遺伝子(PRSV-HN)検知用プライマー対・プローブ「HN」

HN-F : 5'-GAC GAG TAC AAG GAG ACG CC-3'

HN-R : 5'-GTT GTC ACT GAA GCG GGAAG-3'

HN-P : 5'-FAM-TGG CTG CTA TTG GGC GAA TCAACT AC-BHQ1-3'

(4) 組換え遺伝子 (CaM) 検知用プライマー対・プローブ

「CaM」

35S-F : 5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R : 5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C-3'

35S-P : 5'-FAM- CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3

(5) 内在性遺伝子検知用プライマー対・プローブ「Chy」

Q-Chy-1F2: 5'-CCA TGC GAT CCT CCC A-3'

Q-Chy-2R: 5'-CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA-3'

Q-Chy-P(new): 5'-FAM-TTC CCT TCA TCC ATT CCC ACT CTT GAG A-TAMRA-3'

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は25 µL/ウェルになるように調製する。1ウェル当たりの試薬の分量は次のとおりである。TaqMan Gene Expression Master Mix^{*1}12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 µmol/L）各0.4 µL、対象プローブ溶液（10 µmol/L）0.25 µL、滅菌蒸留水8.95 µL。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 µLずつ分注した後、各DNA試料液2.5 µLを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。また、PCRの陽性対照

反応液として陽性コントロールプラスミド^{*3}を加えたものを1ウェル分同時に調整する。操作終了後、真上からシール^{*4}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*5}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

^{*1} TaqMan Gene Expression Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加する。

^{*3} GM パパイヤ系統別 DNA PRSV HN 陽性コントロールプラスミド(ニッポンジーン社)等を使用する。

^{*4} 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーション

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

^{*5} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5 では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置や種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類(「NTC」: Non-Template Control、「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「Reporter」を「FAM」に設定する。「Quencher」については、「YK-1」及び「HN」は「Non Fluorescent」、その他のプローブは「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。なお、ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は次のとおりである。50 $^{\circ}$ C、2分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 $^{\circ}$ C 15秒間、60 $^{\circ}$ C 1分間を1サイクルとして、50サイク

ルの増幅反応を行い、最後に、Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用のいずれについても、結果の判定はAmplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認及びmulticomponent上での対象色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行う。

組換え遺伝子検知用について目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN又はそれ以外)陽性を疑う。次いで、ベースライン（3サイクルから15サイクル）の ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. line)を選択する*1。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた全DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

ただし、NTCについて何れかのウェルでCt値が得られた場合、又は、陽性対照反応液について何れかのウェルで43未満のCt値が得られない場合は、再度、定性PCRに供する。

*1 個々の機種の状態によってAmplification plot上の ΔR_n が変動することから、普遍的なTh. lineの設定の数値を示すことが困難である。特段の問題がない限り、Th.lineは0.2を指定し、必要に応じ変更する。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、かつ、組換え遺伝子(CaM)検知試験、いずれか1系統の組換えパパイヤ遺伝子(PRSV-YK、PRSV-SC及びPRSV-HN)検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られた場合、当該試料は組換え遺伝子(PRSV-YK、PRSV-SC及びPRSV-HN)検知試験に用いたプライマー対・プローブが特異的に検出する遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
- (2) 内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、かつ、組換え遺伝子(CaM)検知試験、組換えパパイヤ遺伝子(PRSV-YK、PRSV-SC及びPRSV-HN)検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、かつ、組換え遺伝子(CaM)検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、組換え遺伝子(PRSV-YK、PRSV-SC及びPRSV-HN)検知試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK、PRSV-SC及びPRSV-HN)以外の遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
- (4) 内在性遺伝子検知用試験の全てのウェルで43未満のCt値が得られ、かつ、組換え遺伝子(CaM)検知試験、組換え遺伝子(PRSV-YK、PRSV-SC及びPRSV-HN)検知試

験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合であって、

- 1) 個々の種子粉砕物から得た全てのDNA試料液について一致したPCR結果が得られた場合、遺伝子組換えパパイヤを含む種子粉砕物と含まない種子粉砕物があったためPCR結果が一致しなかったと判断し、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
 - 2) 個々の種子粉砕物から得た全てのDNA試料液について一致したPCR結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来DNAの抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行ったDNA試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、農産安全管理課に報告する。
- (5) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイムPCRを用いた定性PCRに複数回供した場合であっても全てのウェルで43未満のCt値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来DNAの抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行ったDNA試料液においても全てのウェルで43未満のCt値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、農産安全管理課に報告する。

パパイヤ葉における遺伝子組換えパパイヤの検査方法

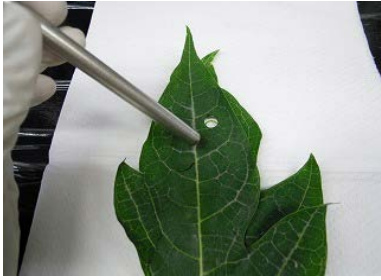
本検査法はパパイヤの葉を対象とする。1検体から葉粉碎物1点調製し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社)を用い、葉粉碎物1点につき1~3点、DNAを抽出・精製する。1検体の葉粉碎物が、150mg以上の場合は50mgを3点、150mg未満100mg以上の場合は50mgを2点、100mg未満50mg以上の場合は50mgを1点、50mg未満の場合は全量を1点得る。得られたDNA試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイムPCRに供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換えパパイヤの含有の有無を判定する。組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブは、カリフラワーモザイクウイルス35S検知用に加え、パパイヤ種子が台湾産又はインド産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知用、タイ産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-SC) 検知用、中国産又はベトナム産の場合は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-HN) 検知用を用いる。

1 葉由来 DNA の抽出・精製

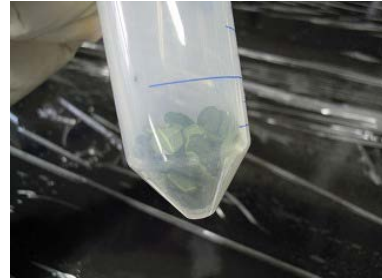
1.1 試料の粉碎

収去したパパイヤ葉から、口径（外径）12.5 mm のコルクボーラーでくりぬいた切片を分析試料とする。分析試料は、滅菌蒸留水を満たした50 mL容チューブに入れ、ボルテックスミキサーを用いてよく洗浄する。この洗浄操作を3回繰り返す。試料をキムタオル上に均一に広げ、65°Cに設定した乾燥機で3時間乾燥させる。試料が粉状になるまで乳棒又は粉碎機^{*1}でよく粉碎する。粉碎した試料50 mgを2 mL容チューブに1~3点量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液500 µLを加え、1.2の「DNA抽出」に供する。残った試料については、-20°C以下で保存する。なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

^{*1}シェイクマスター（BMS）を使用する場合は、15 mm ステンレスビーズ1個を用い800 rpmで1分間の処理又は10 mm ジルコニアビーズ3個を用い1,000 rpmで1分間の処理により粉碎可能であることを確認している。



①コルクボーラーで葉をくり抜く



②50 mL 容チューブに入れ滅菌蒸留水で洗浄



③ボルテックスミキサーでよく洗浄する



④ガーゼ・水切りネット等を利用し滅菌蒸留水を捨て、3回洗浄する



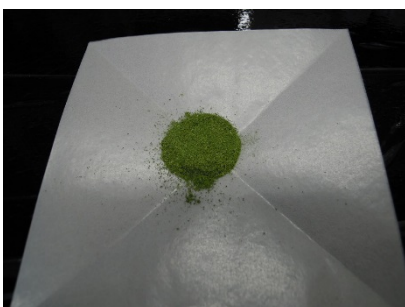
⑤65°Cで3時間乾燥させる



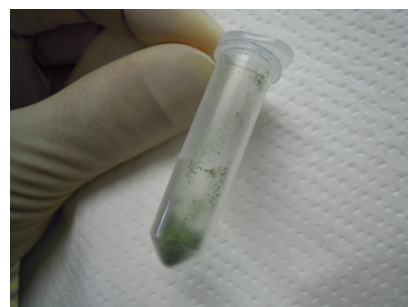
⑥3時間後の葉の様子



⑦粉碎機又は乳鉢を用いて粉碎・混合する



⑧粉碎物を薬包紙に移す



⑨50 mg を 2.0 mL 容チューブに量り採る

1.2 DNA 抽出

1.1 の「試料の粉碎」において AP1 緩衝液を 500 μL 加えられた粉碎試料に、RNase A を 5 μL 加え、ボルテックスミキサーで激しく混合し、65°C で 15 分加温する。P3 緩衝液 162 μL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間激しく攪拌する。氷上に 15 分間静置後、10,000 $\times g$ 以上、15°C の条件で 10 分間遠心分離する。上清を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 4 分間遠心分離後、溶出液を 1.5 mL 容チューブに移す。その溶出液の 1.5 倍量の AW1 緩衝液エタノール混液を加える。混合液 600 μL を DNeasy Mini spin column に負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次に AW2 緩衝液エタノール混液 500 μL を負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。同様の操作を計 3 回繰り返す。溶出液を捨て、DNeasy Mini spin column を乾燥させるため、10,000 $\times g$ 以上で 20 分間遠心分離する。DNeasy Mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌蒸留水 50 μL を加え 5 分間静置した後、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液 とする。DNA 試料原液は -20°C 以下で冷凍保存する。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

以降の操作は、「栽培用パパイヤ種子における未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法 (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 」に従う。なお、「種子」と記載されている部分は、「葉」に読み替える。

ばれいしょ生塊茎の検査方法

1. 試料の準備

採取したばれいしょ生塊茎は、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認すること。

また、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いは十分に配慮すること。コンタミネーション対策は、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第2版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

2. 定性 PCR 法による検査

定性 PCR 法は、抽出された DNA の一部をプライマー対を用いて PCR 増幅し、電気泳動法により、その増幅 DNA を検知する方法である。

検査はまず、採取したばれいしょ生塊茎を凍結乾燥・粉碎処理を行った後、2.1.の DNA 抽出精製法に従って、一検体につき2回並行で DNA 抽出を行う。この結果得られた DNA 試料液を用い、2.3.の条件で PCR 増幅を行う。

そして、1 検体 2 回の検査のうちいずれかが、UGPase 遺伝子検出用プライマー対、スクリーニング用プライマー及び確認用プライマーの全てで陽性で、かつ、プライマーなし及び DNA 試料を加えないものでも陰性となった場合、その検体を陽性と判定する。

* PCR では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅される。したがって、目的外の DNA（特に PCR 増幅産物）の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase 等がコンタミネーションしないよう注意して用いること。また、定性 PCR の際に用いる水は、特に断り書きがない限り、滅菌蒸留水を用いること。

* また、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第2版）コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

* 試料の処理方法等の選択・組合せ、それらの手順、結果の判定方法等について、あらかじめ詳細を作業書等に定めておくこと。

2.1. DNA 抽出精製

採取した 300 個のばれいしょ生塊茎それぞれから一定量の断片に切り出し、凍結乾燥を

行う。次にミキサーミル等でこれらを混合し、粉碎する。その際、全数量を1検体に集約するのが困難な場合は、必要に応じ、300個のばれいしょ生塊茎をいくつかのまとまりにわけてから凍結乾燥を行っても良いこととする。その粉碎試料を用い、2.1.1.に示す、シリカゲル膜タイプのキット（DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN社））を用いた方法に従ってDNAを抽出精製する。

2.1.1. シリカゲル膜タイプキット法（DNeasy Plant Mini Kitを使用する方法）

凍結乾燥後、均質に粉碎した試料200mgを遠沈管（15mL容）に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液^{*1}1.5mLとRNaseA10μLを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合した後、65°Cで15分間静置する。その間2、3回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。その後、AP2緩衝液^{*2}400μLを加え、氷上に5分間静置した後、室温下3,000×g以上で5分間遠心する^{*3}。遠心後の上清を速やかに別の遠沈管に移す。この分取した上清500μLをキット付属のQIAshredder spin columnに負荷し、室温下10,000×g以上で2分間遠心後、溶出液を遠沈管（15mL容）に移す。この操作を残りの上清が全量なくなるまで繰り返す。その後、溶出液の1.5倍量のAP3緩衝液^{*4}・エタノール混液^{*5}を加え、ボルテックスミキサーで攪拌する。その混合液500μLをmini spin columnに負荷し、室温下10,000×g以上で10分間^{*6}遠心し、溶出液を捨てる。この操作を残りの混合液が全量なくなるまで繰り返す。

次いでAW緩衝液^{*7}500μLを負荷し、室温下10,000×g以上で5分間^{*6}遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を更に1回繰り返す。溶出液を捨てた後、mini spin columnを乾燥させるため、室温下10,000×g以上で15分間遠心する。mini spin columnをキット付属の遠沈管に移し、あらかじめ65°Cに温めておいた滅菌蒸留水50μLを加え、5分間静置した後、室温下10,000×g以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度同量の滅菌蒸留水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液とする。

*1 AP1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*2 AP2 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット（DNeasy Plant Mini Kit）付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

*4 AP3 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したのものをを用いる。

*5 AP3 緩衝液・エタノール混液

AP3 緩衝液とエタノール (96-100%) を 1 : 2 で混合したものを AP3 緩衝液・エタノール混液とする。

*6 遠心時間

mini spin column に負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜調整する。

*7 AW 緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール(96-100%)を混合したものを AW 緩衝液とする。

2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA 試料原液の適当量を取り、原液もしくは必要に応じて DNA 溶液と同じ溶液で 10 ~50 倍希釈した希釈液について 200~300 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、230 nm、260 nm 及び 280 nm の吸光度 (A230、A260 及び A280*) を記録する。次いで A260 が 1 のときの DNA 濃度を 50 ng/μL DNA として、DNA 試料原液の DNA 濃度を算出する。また A260/A280 を計算する。この比が 1.7~2.0 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液を以後の PCR に必要な濃度に滅菌蒸留水で希釈し DNA 試料液とし、-20℃以下で冷凍保存する。冷凍保存した DNA 試料液は、融解後直ちに使用する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

* A260 が DNA 由来の吸光度、A280 がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

2.3. PCR 増幅

PCR 用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、PCR 緩衝液*¹、0.20 mmol/L dNTP、1.5 mmol/L 塩化マグネシウム、それぞれ 0.5 μmol/L のスクリーニング用プライマー対*²並びに 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ*³を含む液に、10 ng/μL に調製した DNA 試料液 2.5 μL (DNA として 25 ng) を氷中で加え、全量を 25 μL にする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置*⁴にセットする。反応条件は次の通りである。95℃ に 10 分間保ち反応を開始させた後、95℃ 0.5 分間、60℃ 0.5 分間、72℃ 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72℃で 7 分間保った後、4℃で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

この際、必ず次の 4 つの対照を同時に調整することにする。試料から DNA が抽出されて

いることの確認として、DNA 試料液ごとに、スクリーニング用プライマー対の代わりに内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー対*⁵を用いて同様に PCR 増幅を行ったもの、陽性対照として、DNA 試料液の代わりに市販の陽性対照プラスミド*⁶を用いた反応液を調製し、同様に PCR 増幅を行ったもの、PCR のブランク反応液として、プライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないもの、の4つである。

以上の結果、内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー対及びスクリーニング用プライマー対で陽性で、かつ、プライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないものがともに陰性となった場合、確認用プライマー対*⁷を用い、同様に PCR 増幅を行う*⁸。

*1 PCR 緩衝液

PCR buffer II ((Applied Biosystems 社)) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2 スクリーニング用プライマー対は以下の通りである。

CryⅢA01F : 5'-GAAAGC CTA CAA GCT GCAATC TG-3'

CryⅢA01R : 5'-TCA GGT GTC ACG TAG ATA GTA G-3'

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ ((Applied Biosystems 社)) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*4 PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700 ((Applied Biosystems 社)) 又は同等の結果が得られるものを用いる。

*5 内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー対は以下の通りである。

UGPase01F : 5'-CTC TCC ATA CTC TCT GCT CCT CG-3'

UGPase01R : 5'-CGG CAT CAG CAG GAG AAA G-3'

*6 陽性対象プラスミド

NIPPONG GENE 社から、公定試験法・標準試験法詳解 食品衛生検査指針 理化学編 2005 (社団法人日本食品衛生協会) 記載法準拠 GMO 検知用試薬として販売されているもの又は同等の結果が得られるものを用いる。

*7 3種類の確認用プライマー対は以下の通りである。

New Leaf 確認用

NL-01F : 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TC-3'

NL-01R : 5'-CGG TGT TGT TGT CTG CAG TCA-3'

New Leaf Plus 確認用

NLP-01F : 5'-CCC ATT TGA AGG ACA CAG AAA CA-3'

NLP-01R : 5'-AGC GGC ATA TGC GGT AAA TC-3'

New Leaf Y 確認用

NLY-01F : 5'-CAA AAT CCC AGT ATC AAA ATT CTT-3'

NLY-01R : 5'-TGG TTT TGT ATC TTT CTT GTT GCT TC-3'

*8 プライマーの精製グレード

ここで使用するプライマーの精製グレードは、全て HPLC 精製グレードとする。

2.4. アガロースゲル電気泳動

PCR 増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR 増幅バンドを確認する。

2.4.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液*を加え、加熱してアガロースを溶解する。次にゲルを 50°C前後まで冷やした後、ゲルメーカーにゲルを流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、泳動する目的産物のバンド長にあわせてゲル濃度（1.0~4.0%）を決める。

* TAE 緩衝液

各最終濃度が 40 mmol/L Tris-酢酸、1 mmol/L EDTA となるように滅菌蒸留水を用いて調製したものを TAE 緩衝液とする。

2.4.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 5.0~7.5 μ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100 V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BPB がゲルの 1/3 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.4.3. ゲルの染色

ゲルが浸る量の TAE 緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液 100mL 当たり、5 μ L のエチジウムブロミド*溶液（10 mg/mL）を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら 30 分程度染色する。

* エチジウムブロミド

2本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

2.4.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ*を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線（312 nm）を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して目的のバンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応する PCR 増幅バンドが検知された場合は、DNA 抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

* 食品包装用ラップ

ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

2.5. 結果の判定

最初にプライマー対を加えないもの及び DNA 試料液を加えないもので PCR 増幅バンドが検出されていないことを確認する。このどちらかに PCR 増幅バンドが確認された場合は、実験中に汚染が起きたと判断されるため、実験をやり直すこととする。また、陽性対照プラスミドを加えたもので PCR 増幅バンドが確認されない場合も PCR 増幅反応が適切に行われていないと判断されるため、実験をやり直すこととする。

内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー対を用いたレーンで 111 bp の PCR 増幅バンドが検出され、スクリーニング用プライマー対を用いたレーンで 117 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 反応液を 3 つ調製し、3 種類の確認用プライマー対を用い PCR 増幅を行う。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、New Leaf, New Leaf Plus 並びに New Leaf Y 確認用プライマー対を用いた各レーンでそれぞれ 113 bp, 125 bp, 123 bp の PCR 増幅バンドが、1 ヶ所以上で検出された場合、本検体を陽性と判定する。なお、2 つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。

また、どちらか一方の DNA 抽出液において内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の PCR 増幅バンドが検出されない場合には、その DNA 抽出液での結果を無効とし、もう一方の抽出液の結果だけで判定する。2 つの DNA 抽出液とも内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー対を用いたレーンで対応する PCR 増幅バンドが検出できない場合には、改めて 3 回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。3 回目の DNA 抽出液を用いた場合でも内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの遺伝子組換えばれいしょの検知は不能とする。以下に判定例を示す。

試料（ロット）の判定例

	使用したプライマー対	試料番号								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
DNA 抽出 液 1	内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	スクリーニング用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	-
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	/	-	-	/
DNA 抽出 液 2	内在性 UGPase 遺伝子検出用プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	スクリーニング用プライマー	+	+	-	-	-	-	+	-	-
	確認用プライマー	+	-	/	/	/	/	-	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	※1

+は陽性、-は陰性、/ は検査不要を表す。

※1 3回目の抽出を行う。

栽培用ワタ種子における遺伝子組換え体の検査方法

本検査法はワタの種子を対象とする。GM quicker 2 (NIPPON GENE 社) を用い、1 検体から 2 反復*で DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換え体の含有の有無を判定する。

* 1 検体から 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

1. 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したワタ種子から破碎粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に必要量採取する。1%SDS溶液で10回洗浄後、滅菌蒸留水で3回リンスし、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に65℃で乾燥後、フードミル（ミルサー700G（イワタニ社）又はその同等品）等を用い粉碎する。均質な粉末状になったものをDNA抽出・精製操作に供する。一度に全量を粉碎できない場合には、複数回に分けて粉碎する。粉碎物を十分混合し分析試料とする。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第3版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からのDNA抽出・精製

種子粉碎物 1 点につき 2 反復*¹で実施する。

種子粉碎物 1 g^{*2}を遠沈管(50 mL 容)に量り採り、GE 1 緩衝液 4 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 µL、Proteinase K (20 mg/mL) 20 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65℃で15分間静置する。GE 2-K 緩衝液500 µLを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合する。スイング式遠心分離機又はアングルロータにより4,000×g、室温で10分間遠心分離する。上清 1 mLを1.5 mL容チューブに分取し、遠心分離機により13,000×g以上、室温で5分間遠心分離する。上清400 µLを新たな1.5 mL容チューブに分取し、GB3 緩衝液150 µL及びイソプロピルアルコール 150 µLを添加した後、10~12回転倒混和する。混合液全量をSpin columnに負荷した後、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離する。溶出液を捨て、Spin column にGW緩衝液650 µLを加え、遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離する。Spin column を新たな1.5 mL容チューブに移し、滅菌蒸留水50 µLを加え、室温で3分間静置する。遠心分離機により13,000×g以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA 試料原液 とする。

*¹ 2 反復分の種子粉碎物が得られない場合は反復なし。

*² 種子粉碎物が 1 g に満たない場合は全量。

2. DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200～320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7～2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、1.7～2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2.2 DNA試料液の調整及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとに新たなマイクロ試料管に分注後、-20℃以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20ng/μLに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

*¹ 希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、使用する装置によって調節する。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT*) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用としては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・Ti プラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用としては、ワタのIVS of the putative Sinapis Arabidopsis Homolog 7 protein (SAH7)遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Sah7」を用いる。プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

* ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

- ② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」
 TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'
 TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'
 TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA
- ③ ワタ内在性遺伝子 (SAH7) 検知プライマー対・プローブ「Sah7」
 Sah7-uni-f1: 5'- AGT TTG TAG GTT TTG ATG TTA CAT TGA G -3'
 Sah7-uni-r1: 5'- GCA TCT TTG AAC CGC CTA CTG -3'
 Sah7-uni-s1: FAM 5'- AAA CAT AAA ATA ATG GGA ACA ACC ATG ACA TGT -3'
 TAMRA

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 μ L / ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan Universal PCR Master Mix^{*1}12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、25 μ mol/L) 各0.5 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、滅菌蒸留水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRの空白反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。また、PCRの陽性対照反応液として陽性コントロールプラスミド^{*3}を加えたものを1ウェル分同時に調整する。操作終了後、真上からシール^{*4}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*5}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。

^{*1} TaqMan Universal PCR Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分であれば、PCR がうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、スピンドウンし、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加する。

^{*3} GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド (ニッポンジーン社) 等を使用する。

^{*4} 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社) 及び ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

^{*5} ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies社) を使用する。

Applied Biosystems 7500、QuantStudio 5では使用しない。

3.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置や種類及びプローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「Reporter」については「FAM」に設定する。「Quencher」については、「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

3.3 PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は次のとおりである。50°Cで2分間の条件で保持した後、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次に、95°C・15秒間保持後60°C・1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行い、最後に、Remaining timeが0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子検知試験のいずれについても、結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。

組換え遺伝子検知用について目視で Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないよう Th. line を適宜設定する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた全DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の全ての結果を用いる。

ただし、NTCについて何れかのウェルで Ct 値が得られた場合、又は、陽性対照反応液について何れかのウェルで43未満の Ct 値が得られない場合は、再度、定性PCRに供する。

判定の手順は、以下の通り。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで43未満の Ct 値が得られた場合には、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。なお、内在性遺伝子検知試験のすべてのウェルで43未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験「P35S」又は「NOS ter」のいずれ

れかのみですべてのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合には、農産安全管理課と協議する。

- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合には、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。
- (3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、農産安全管理課と協議する。再抽出・精製に際し、収去量が少量に限られたために種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合には、その時点で本試料からの本試験法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、農産安全管理課と協議する。なお、再抽出・精製に際し、収去量が少量で種子粉砕物が試験に必要な量を満たさない場合も同様に、本試料からの本検査法による検知は不能とし、その都度、農産安全管理課に報告する。

リアルタイム PCR アレイ法 分析プロトコル

リアルタイム PCR アレイ法は、遺伝子組換え作物に導入されている組換え DNA 配列等を1枚の PCR プレート上で一斉に検出する手法である。この方法により、分析試料に含まれる遺伝子組換え作物を網羅的に検出することができる。本検査法は、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所(現、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門)において開発、妥当性確認がなされたものである^{*1,2}。

本プロトコルは、PCR アレイプレート ワタ検査バージョン1の使用を想定したものである。ワタ検査バージョン1の検知対象及びプレートの配置は別表1、別表2に示す。PCR アレイプレートはあらかじめ調製し、 -20°C 以下で冷凍保管する。本プロトコルでは、一般的な DNA 抽出法によって PCR に適した純度の DNA 試料($20\text{ ng}/\mu\text{L}$)^{*3}を準備する。リアルタイム PCR 装置については、Applied Biosystems 社 ABI PRISM 7900HT system 又は ABI 7500 system の使用を想定しているが、同等の性能を有する他の機種を用いてもよい。

リアルタイム PCR アレイ法は様々な標的 DNA 配列を一度に検出する手法であることから、コンタミネーションの影響を受けやすい。このため、各 DNA 試料が混ざらないようにするなど、コンタミネーションの防止を心がける。

*1 Mano et al. J. Agric. Food Chem., 2009, 57(1), 26–37.

*2 Mano et al. J. AOAC Intl., 2012, 95(2), 508–516.

*3 DNA 試料原液の濃度が $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

1. PCR アレイプレートの作製

別表1のプライマー及びプローブを用意する。プローブは5'、3'末端が蛍光色素 FAM 及び TAMRA で標識されたものを使用する。ただし、CaMV-MGB については、5'末端が FAM で標識された TaqMan MGB プローブ(Thermo Fischer Scientific 社)を購入して使用する。反応ごとにプライマー各 $2.5\ \mu\text{M}$ 、プローブ $1\ \mu\text{M}$ を含むプライマープローブミックスを調製する。IPC 用プライマープローブミックスについては、プライマープローブのほかに IPC 用の鑄型 DNA (Internal Positive Control, NIPPON GENE 社)を用意し、プライマープローブミックスに約5コピー/ μL となるよう添加する。ネガティブコントロール(NC)については、プライマープローブミックスの代わりに滅菌蒸留水を使用する。

別表1に従い、各プライマープローブミックスを 96 ウェルプレートの各ウェルに $2\ \mu\text{L}$ ずつ添加する。8連ピペット又は自動分注装置を用いる。プライマープローブミックスの添加が完了後、Fast Gene 圧着シール (FastGene 社、FG-DM100HC) 又は同等のものをプレート上面に貼付する。1 検体分に相当する縦3列でシールを剥がすことができるよう、カッターナイフ等を用いてシールに切れ目を入れる。各ウェルの底面にプライマープローブミックスが添加されていることを目視で確認する。底面以外にプライマープローブミックスが付着している場合は、遠心を行う。すぐに分析に使用しない場合は、 -20°C 以下の冷凍庫で保存する。

2. 反応液の調製

調製済みの PCR アレイプレートを冷凍庫から取り出し、常温に戻す。プレート遠心器を用いて、PCR アレイプレートを $1,000 \times g$ で1分間遠心し、ウェル内の溶液をスピンドウンする。サンプル DNA 溶液をボルテックスミキサーで均一にした後、スピンドウンする。TaqMan Universal PCR Master Mix $135 \mu\text{L}$ 、サンプル DNA 溶液 ($20 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $27 \mu\text{L}$ 、滅菌蒸留水 $54 \mu\text{L}$ をチューブに添加し、ボルテックスミキサーで10秒以上、攪拌する。これをサンプル混合液とする。1枚のPCRアレイプレートでは4サンプルを同時に分析可能なため、4つのサンプル混合液を調製する。PCR アレイプレート上面のシールの内、左側から縦3列分をピンセットで剥がす。この際、シールの切れ端がプレート上に残らないように留意する。電動ピペット (Gilson社 Pipetman concept C-100 など、 $8 \mu\text{L}$ を連続分注できるもの) で1番目のサンプル混合液を $8 \mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。チップの先端から反応液が落ちない場合は、底面にあるプライマープローブミックスにチップの先端が触れないように留意しながら、側面の内壁に滴を付着させる。電動ピペットがない場合は、手動のピペットで行う。分注後、クロスコンタミネーションを避けるために分注済みのウェルをアルミ箔で覆う。続いて、プレート上面のシールのうち、左側から4~6列目までのシールをピンセットで剥がし、同様にサンプル混合液を分注する。被せたアルミ箔を剥がし、2つのサンプル混合液を添加したウェルを新たなアルミ箔で覆う。上記と同様に3番目、4番目のサンプル混合液を各ウェルに分注する。サンプルを全て分注し終わったら、最後に MicroAmp Optical Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific 社) をプレート上面に貼付し、ウェルを密封する。 $1,000 \times g$ で1分間遠心を行った後、プレートを下からのぞき込み、各ウェルの反応液が下側にスピンドウンされ、大きな気泡が残っていないことを確認する。気泡がある場合は再度遠心を行う。

3. プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、プローブ特性、検体の種類、熱サイクル条件である。新規シートを作成し、使用する Detector として「Reporter が FAM、Quencher が TAMRA のもの」、「Reporter が FAM、Quencher が Non Fluorescent のもの」の2つを設定する。別表 2 に記載の CaMV のウェルについては、「Reporter が FAM、Quencher が Non Fluorescent のもの」を設定する。それ以外は、「Reporter が FAM、Quencher が TAMRA のもの」を使用する。検体の種類については、全てのウェルについて「Unknown」を設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する*。Sample Volume を $10 \mu\text{L}$ とする。熱サイクル条件は次のとおり設定する。 50°C で2分間保持した後、 95°C で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。次に、 95°C で15秒間保持後、 60°C で1分間保持を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行う。

* QuantStudio 5 では、9600 emulation モードがないため、設定しない。

4. PCR 増幅と結果の解析

装置にプレートをセットし、反応とデータの取り込みを開始する。Remaining time が0分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

反応終了後、Analysis Settings を開き、Manual Ct を 0.256、Manual Baseline を Start 3、End 10

として設定する。Analyze を実行し、Threshold line (0.256)と増幅曲線が交差したウェルを陽性と判定する。

別表1 PCR アレイプレートワタ検査バージョン1で使用する反応とその標的遺伝子配列

検出の種類	反応名	標的とする遺伝子配列
組換え DNA	P35S	Cauliflower mosaic virus 由来 35S プロモーター領域
	TNOS	Rhizobium radiobacter 由来ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター
	PFMV	Figwort mosaic virus 由来 35S プロモーター
	TE9	エンドウマメ由来リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ E9 遺伝子ターミネーター領域
	TPIN	ジャガイモ由来プロテアーゼインヒビターII 遺伝子ターミネーター領域
	AINT	イネ由来アクチン 1 遺伝子イントロン領域
	NPTII	Escherichia coli 由来ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子
	CryAb/Ac	Bacillus thuringiensis 由来殺虫性結晶タンパク質 CryIAb 及び CryIAc 遺伝子
	PAT	Streptomyces viridochromogenes 由来ホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子
	BAR	Streptomyces coelicolor 由来ホスフィトリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子
	GOX	Ochromobactrum anthropi 由来グリホサートオキシドレダクターゼ遺伝子
	EPSPS1, EPSPS2	Agrobacterium 属細菌由来 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子及びその改変型
	MON531	系統特定
	MON15985	
	MON1445	
MON88913		
LLCotton25		
GHB119		
T304-40		
作物種特異的遺伝子	SAH7	ワタ由来シナビスアラビドプシスホモログ 7 タンパク質遺伝子
組換え DNA 供与生物	CaMV	Cauliflower mosaic virus

別表2 PCR アレイプレートワタ検査バージョン1における各反応の配置(例)

※別表1の MON531～SAH7 については、以下の SSIIb～18SrRNA と置き換える。

	サンプル1			サンプル2			サンプル3			サンプル4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P35S	PAT	HMG	P35S	PAT	HMG	P35S	PAT	HMG	P35S	PAT	HMG
B	TNOS	BAR	SAH7	TNOS	BAR	SAH7	TNOS	BAR	SAH7	TNOS	BAR	SAH7
C	PFMV	GOX	GS	PFMV	GOX	GS	PFMV	GOX	GS	PFMV	GOX	GS
D	TE9	EPSPS1	UGPase	TE9	EPSPS1	UGPase	TE9	EPSPS1	UGPase	TE9	EPSPS1	UGPase
E	TPIN	EPSPS2	18SrRNA	TPIN	EPSPS2	18SrRNA	TPIN	EPSPS2	18SrRNA	TPIN	EPSPS2	18SrRNA
F	AINT	SSIIb	CaMV	AINT	SSIIb	CaMV	AINT	SSIIb	CaMV	AINT	SSIIb	CaMV
G	NPTII	Le1	IPC	NPTII	Le1	IPC	NPTII	Le1	IPC	NPTII	Le1	IPC
H	CryIAb/Ac	SPS	NC	CryIAb/Ac	SPS	NC	CryIAb/Ac	SPS	NC	CryIAb/Ac	SPS	NC