



20消安第2496号
平成20年6月18日

各都道府県知事

独立行政法人

農林水産消費安全技術センター理事長

あて

農林水産省 消費・安全局長

組換えDNA技術応用飼料の検査方法の一部改正について

「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」(平成15年4月1日付け14生畜第8598号農林水産省生産局長・水産庁長官通知)別添3の組換えDNA技術応用飼料の検査方法を、別添新旧対照表のとおり改正したので、御了知されるとともに、貴管下関係者への周知徹底につき御協力をお願いします。

(別紙)

「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について」(平成15年4月1日付け14生畜第8598号農林水産省生産局長・水産庁長官通知)

新旧対照表

(下線部分は改正部分)

改正後	現 行
<p>1～6 (略)</p> <p>別添1・別添2 (略)</p> <p>別添3 組換えDNA技術応用飼料の検査方法</p> <p>1. 検体採取方法 (略)</p> <p>2. 安全性未確認の組換えDNA技術応用飼料の検査方法</p> <p>2.1. トウモロコシ(CBH351)の検査方法 (略)</p> <p>2.2. トウモロコシ(Bt10)の検査方法 (略)</p> <p>2.3 トウモロコシ(DAS59132)の検査方法</p> <p>2.3.1 トウモロコシ(DAS59132)の定性法</p> <p>トウモロコシ穀粒について、リアルタイムPCR*を用いた定性PCR法で行う。なお、試料の準備は2.1.1.1に定めるところにより行う。</p> <p><u>*リアルタイムPCR</u></p> <p><u>リアルタイムPCRは、ABI PRISM™ 7700、ABI PRISM™ 7900HT若しくはABI PRISM™ 7500又は同等の結果の得られるものを用いる。</u></p> <p>2.3.1.1 プライマー対及びプローブ</p> <p>2.3.1.1.1 トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブ</p>	<p>1～6 (略)</p> <p>別添1・別添2 (略)</p> <p>別添3 組換えDNA技術応用飼料の検査方法</p> <p>1. 検体採取方法 (略)</p> <p>2. 安全性未確認の組換えDNA技術応用飼料の検査方法</p> <p>2.1. トウモロコシ(CBH351)の検査方法 (略)</p> <p>2.2. トウモロコシ(Bt10)の検査方法 (略)</p> <p>2.3 トウモロコシ(DAS59132)の検査方法</p> <p>2.3.1 トウモロコシ(DAS59132)の定性法</p> <p>トウモロコシ穀粒について、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法で行う。なお、試料の準備は2.1.1.1に定めるところにより行う。</p> <p>2.3.1.1 プライマー対及びプローブ</p> <p>2.3.1.1.1 トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブ</p>

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。

*トウモロコシ陽性対照用プライマー対 SSIIb-3 及びプローブ SSIIb-Taq は、ニッポンジーン又はファスマックにて購入可能である。

2.3.1.1.2 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'
(各プライマーは水で溶解する。)

2.3.1.1.3 DAS59132 検出用プローブ

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'
(プローブは水で溶解する。)

2.3.1.2 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、水で全量 20 μ L に調製後、10ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L (50ng) を添加する*³。PCR 反応の陰性コントロールとして、必ず DNA 試料液を加えず水で全量 25 μ L としたのも同時に調製する。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*⁵。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 *⁶ 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 2well 並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2well 分を同時に調製する。

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。

2.3.1.1.2 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'
(各プライマーは水で溶解する。)

2.3.1.1.3 DAS59132 検出用プローブ

FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA
(プローブは水で溶解する。)

2.3.1.2 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、水で全量 20 μ L に調製後、10ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L (50ng) を添加する*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*⁵。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 *⁶ 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 2well 並行で行うものとし、PCR 用反応試薬は 2well 分を同時に調製する。

*** 1 Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)**

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 μ mol/L) を
用いる場合には 0.5 μ L 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 PRISMTM 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 PRISMTM 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、
Scaps/strips(Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

* 5 当該操作は ABI PRISMTM 7700 を使用する場合は必要な
い。

*** 6 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad**

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied
Biosystems 社) を使用する。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。なお、ABI
PRISMTM 7700 及び ABI PRISMTM7500 では、当該 Pad は使
用しない。

2.3.1.3 プレート情報の設定

*** 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 μ mol/L) を
用いる場合には 0.5 μ L 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 PRISMTM 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 PRISMTM 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、
Scaps/strips(Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

* 5 当該操作は ABI PRISMTM 7700 を使用する場合は必要な
い。

*** 6 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad**

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied
Biosystems 社) を使用する。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。なお、ABI
PRISMTM 7700 では、当該 Pad は使用しない。

2.3.1.3 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、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（「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。

2.3.1.4 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 °C 15 秒、60 °C 1 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。

(削除)

2.3.1.5 結果の判定

トウモロコシ陽性対照用試験および 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 値の確認および 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および 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

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（「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。

2.3.1.4 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 °C 15 秒、60 °C 1 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 PRISMTM7500 については component を確認する。

2.3.1.5 結果の判定

トウモロコシ陽性対照用試験および 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 値の確認および 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および 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。2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。再抽出（3 点目）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、本試料からのトウモロコシ（DAS59132）の検出は不可能とする。判定例は、2.1.1.3.5 の判定例の表を参照のこと。（ただし、確認用プライマーの欄は除く。）

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。2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。再抽出（3 点目）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、本試料からのトウモロコシ（DAS59132）の検出は不可能とする。判定例は、2.1.1.3.5 の判定例の表を参照のこと。（ただし、確認用プライマーの欄は除く。）