

食安発第0517001号
平成17年5月17日

各

都道府県知事
保健所設置市長
特別区長

 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長

組換えDNA技術応用食品の検査方法について（一部改正）

組換えDNA技術応用食品の検査方法については、平成13年3月27日付け食発第110号厚生労働省医薬局食品保健部長通知（平成16年6月28日付け食安発第0628001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知により一部改正）によって通知しているところであるが、今般、安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシBt10の検査法を追加する等のため、当該通知を下記のとおり改正することとしたので、検査を行う場合には、これらの方法により実施されたい。

なお、改正後の同通知別添「組換えDNA技術応用食品の検査方法」全文を参考までに添付する。

記

1. 「1.1.1. トウモロコシ及び大豆の穀粒の検体採取」の項目中、注釈を「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品のうち、該当するトウモロコシ系統の検査を目的とした定性PCR用試料又は安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品を対象とした定量検査用試料として用いるには、500g必要である。」に改める。【理由：安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシBt10の検査法を追加したことから。】
2. 「1.2.1. トウモロコシ及び大豆の粉砕加工品（コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、穀粒を粉砕したもの）」の項目に、「なお、安全性未審査の組換えDNA技術応用食品のうち、該当するトウモロコシ系統の検査を目的とした定性PCR用試料には、採取した検体のうち、500gを均質に粉砕した試料を用いる。」を加える。【理由：安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシBt10の検査

法を追加したことから。】

3. 「2.1.1.2.1.2.2. 電気泳動」の項目中、「ゲルの1/3から2/3まで」を「ゲルの1/2から2/3まで」に改める。【理由：泳動が不十分であると誤判定を招くおそれがあることから。】
4. 「2.1.1.2.1.2.3. ゲルの染色（後染色）」の項目に、「その後、TAE 緩衝液のみの入った容器に染色済みのゲルを移し、30分程度軽く浸透しながら脱染色を行う。」を加える。【理由：染色したゲルをそのまま解析に供すると、PCR 増幅バンドが不明瞭となり誤判定を招くおそれがあることから。】
5. 「2.1.2.2.2. 結果の判定」の項目の次に、「2.1.3. トウモロコシ(Bt10)の検査」として別紙1に示すトウモロコシ(Bt10)の検査を加える。【理由：安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ Bt10 の検査法を追加したことから。】
6. 「2.2.1.1. CTAB 法」の項目に、注釈2として「ホモゲナイザーを使用しない場合には、ボルテックスミキサーを用いて試料塊がないように激しく混合する。その際には、まず15mL の CTAB 緩衝液を加え十分に混合した後、さらに CTAB 緩衝液30mL を加え混合する。混合後は、加温処理以降の操作に従う。」を加える。【理由：抽出操作の簡便化及びコンタミネーションの防止に資することから。】
7. 「2.2.1.3. シリカベースレジソタイプキット法」の項目を別紙2のとおり改める。【理由：DNA 試料原液を定量 PCR 法に供する際に、従来法では DNA の収量が少なく、かつ、安定しないとの報告があること等から。】
8. 「2.2.2.1. CTAB 法」の項目に、注釈として「マイクロミキサーを使用しない場合には、ボルテックスミキサーを用いて試料塊がないように激しく混合する。その際には、まず300 μ L の CTAB 緩衝液を加え十分に混合した後、さらに CTAB 緩衝液300 μ L を加え混合する。混合後は、加温処理以降の操作に従う。」を加える。【理由：抽出操作の簡便化及びコンタミネーションの防止に資することから。】
9. 「2.2.4. 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」の項目に、注釈2として「定量 PCR 法に供する際は、TE 緩衝液を用いて希釈する。」を加える。【理由：定性 PCR 法と定量 PCR 法で DNA 試料原液の溶解液が異なることから。】

(別紙 1)

2.1.3. トウモロコシ(Bt10)の検査

2.1.3.1. 定性 PCR 法

トウモロコシ穀粒又はトウモロコシ半製品について、PCR増幅及び結果の判定を除き、2.1.1.2.1.と同様の方法で定性 PCR を行う。なお、DNA 抽出精製は、2.2.1.2.に示すシリカゲル膜タイプキット法を用いる。

2.1.3.1.1. 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、0.16mmol/L dNTP、1.5mmol/L 塩化マグネシウム、0.6µmol/L 5'及び3'プライマー*²並びに0.8units Taq DNA ポリメラーゼ*³を含む液に、10ng/µLに調製したDNA 試料液 5.0µL (DNA として50ng)を水中に加え、全量を25µL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。94℃に10分間保ち反応を開始させた後、94℃ 25秒間、62℃ 30秒間、72℃ 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℃ 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。PCR 反応のブランク反応液として、必ず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についても同時に調製する。また、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陽性対照用プライマー対*⁵を用い、同様に PCR 増幅を行う。

*¹ PCR 緩衝液

PCR buffer II(アプライドバイオシステムズ社製、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(JSF3) : 5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG G-3'

R-primer(JSR3) : 5'-GGG AAT AAG GGC GAC ACG G-3'

*³ Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ(アプライドバイオシステムズ社製)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(アプライドバイオシステムズ社製)又は同等の結果が得られるものを用いる。

*⁵ 陽性対照用の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

2.1.3.1.2. 結果の判定

陽性対照プライマー対を用いたレーンで157bp 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130bp 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*²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、127bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検体は Bt10 系統陽性と判定する*³。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、どちらか一方の抽出液において、陽性対照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 抽出液とも陽性対照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陽性対照プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの安全性未審査の食品の検知は不能とする。判定例は 2.1.1.2.1.4.を参照のこと。

*¹ Bt10 検出用プライマー対を用いた試験においては、特異的 PCR 増幅バンドとは異なる位置に非特異的 PCR 増幅バンドが検知される場合があるため、PCR 増幅バンド長の確認は正確に行うこと。

*² Bt10 確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Bt11 3-5') : 5'-AAA AGA CCA CAA CAA GCC GC-3'

R-primer (Bt11 3-3') : 5'-CAA TGC GTT CTC CAC CAA GTA CT-3'

*³ Bt10 確認用プライマー対を用いて増幅する DNA 配列は、既に安全性審査を終了している Bt11 トウモロコシにも導入されている。本試験法は、Bt10 検出のための反応液組成及び反応条件を示しているが、Bt11 が混入している場合にも確認試験の結果は陽性となる可能性が考えられるため、必ず Bt10 検出用プライマー対を用いた結果と併せて結果の判定を行うこと。

(別紙2)

2.2.1.3. 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2gをポリプロピレン製遠沈管(50mL容)に量り採り、抽出用緩衝液^{*1} 17.2mL、5mol/L グアニジン-塩酸2mL 及び20mg/mL Proteinase Kを0.8mL 加え、激しくボ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(1.5mL容)に移し、さらに14,000×g で10分間遠心する。得られた澄明な上清500μLと、DNA Clean-up Resin1mLをマイクロ遠沈管(1.5mL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(吸引装置)に装着する。マニホールのコックを閉じ、吸引装置内部が十分に減圧になっ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。直ちにコックを開け、最速で減圧吸引して溶液を完全に除去し、次いで2mL 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(1.5mL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(1.5mL容)に移し、あらかじめ65~70°Cに温めておいた水100μLを滴下する^{*2}。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

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

^{*2} 定量PCR法に供する際は、水の代わりにあらかじめ65~70°Cに温めておいたTE緩衝液100μLを滴下する。