

食安発第0618001号
平成20年6月18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18年6月29日付け食安発第0629002号により一部改正)によって通知しているところであるが、今般、新たに安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査法の評価が終了したことにより、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

「2.1.3.1.2. 結果の判定」の項目の次に、別紙に示す「2.1.4. トウモロコシ(DAS59132)の検査」の項を加える。

(別紙)

2.1.4. トウモロコシ(DAS59132)の検査

トウモロコシ穀粒について、DNA 抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: トウモロコシに適用)(2.2.1.2.)に従って、一試料につき2回並行で抽出を行い、得られたDNA 溶液を用いて以下のリアルタイムPCRを用いた定性PCR法を実施する。

2.1.4.1. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法

トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブは、トウモロコシ(3.2.)定量PCR法(3.2.1.)と同様に、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。

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

2.1.4.1.1.1. PCR用反応液の調製

PCR用反応液は 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 μL 、対象プライマー対溶液(各プライマー、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.0 μL ^{*2}、対象プローブ溶液(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL ^{*3}を混合し、水で全量 20 μL に調製後、10 ng/ μL DNA試料液 5.0 μL (50 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。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。試験は、1DNA試料液当たり2ウェル並行で行うものとし、PCR用反応試薬は2ウェル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

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

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'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3(各プライマー濃度、25 μmol/L)を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

*³ 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

*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、定量結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.1.4.1.1.2. 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。

2.1.4.1.1.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、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。その後、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。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。

2.1.4.1.2. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (ABI PRISM™ 7500)

2.1.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製

PCR用反応液は 25 μL/wellとして調製する。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix *¹ 12.5 μL、対象プライマー対溶液(各プライマー、10 μmol/L)1.0 μL *²、対象プローブ溶液(10 μmol/L)0.5 μL *³を混合し、水で全量 20 μL

に調製後、10 ng/μL DNA試料液 5.0 μL (50 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。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。試験は、1DNA試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR用反応試薬は 2 ウェル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

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

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'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25 μmol/L)を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

*3 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5'-FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

*4 96 ウェルプレート、シール及びシーリングアプリーター

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。

2.1.4.1.2.2. 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(「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。

2.1.4.1.2.3. PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、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。その後、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。なおランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。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。

2.1.4.1.3. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (ABI PRISM™ 7700)

2.1.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製

PCR用反応液は 25 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 μL 、対象プライマー対溶液(各プライマー、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1.0 μL *²、対象プローブ溶液(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0.5 μL *³を混合し、水で全量 20 μL に調製後、10 ng/ μL DNA試料液 5.0 μL (50 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。分注操作終了後、真上からキャップシ *⁴、完全にウェルを密閉する。このとき、専用のシーリング用アプリケーションを用いて行う。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。試験は、1DNA試料液当たり 2 ウェル並行で行うものとし、PCR用反応試薬は 2 ウェル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

DAS59132 検出用プライマー対は以下のとおりである。(各プライマーは水で溶解する。)

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'

なお、トウモロコシ陽性対照用試験では、プライマー対 SSIIb-3 (各プライマー濃度、25 $\mu\text{mol}/\text{L}$)を用いる場合には 0.5 μL を加えること。

*³ 対象プローブ

DAS59132 検出用プローブは以下のとおりである。(プローブは水で溶解する。)

5' -FAM-CAA TTT GTT TAC ACC AGA GGC CGA CAC G-TAMRA-3'

*³ 96 ウェルプレートおよびプレートの蓋

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。

2.1.4.1.3.2. 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(「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。

2.1.4.1.3.3. PCR 増幅

装置にプレートをセットし、反応とデータの取込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。50℃、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。その後、95℃ 15 秒、60℃ 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。

2.1.4.1.4 結果の解析と判定

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 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だけで判定する。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。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、本試料からの安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検知は

不能とする。

* 個々の機種の状態によってAmplification plot上の ΔRn 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。従ってAmplification plot上でベースライン(3サイクルから15サイクル)の ΔRn 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™ 7700、ABI PRISM™ 7900 及びABI PRISM™ 7500 のいずれにおいても0.2-0.5の範囲であると考えられる。