

食安輸発第0915002号  
平成18年 9 月15日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課  
輸入食品安全対策室長  
(公印省略)

### 米国産米（長粒種）及びその加工品の取扱いについて

標記については、平成18年8月19日付け食安輸発第0819001号にて通知したところですが、今般、遺伝子組換え米（LLRICE601）の検査法が確立したことから、下記により検査を実施することとしたので対応方よろしく申し上げます。

また、輸入者に対して、引き続き平成18年9月15日付け食安輸発第0915001号に基づき、安全性未審査の遺伝子組換え食品の輸入防止に努めるとともに、検査が実施困難な米国産長粒種米及びその加工品については、輸入を自粛するよう指導方申し上げます。

なお、平成18年8月19日付け食安輸発第0819001号は本日をもって廃止します。

### 記

#### 1 検査対象及び頻度

米国産長粒種米及びその加工品（主原料とするもので、未加熱のものとする。）については輸入の都度、貨物を保留し検査を実施すること。

#### 2 検体採取方法及び試験実施機関

検体採取方法は平成18年3月31日付け食安輸第0331006号に基づき実施し、試験実施機関は平成18年4月17日付け食安検発第0417002号の別表の「遺伝子組換え食品」の欄によること。

#### 3 検査方法

別添の方法によること。

#### 4 備 考

検査の結果、陽性となった場合は、企画情報課検疫所業務管理室を通じて当室まで連絡すること。

なお、登録検査機関において検査実施体制が整備され次第、自主検査に変更する旨、通知する予定である。

## (別添)

### シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker 2)

均質に粉碎した試料 500mgをポリプロピレン製遠沈管 (2mL容) に量り採り、GE1 緩衝液<sup>\*1</sup> 700 $\mu$ L、Proteinase K (20mg/mL) 20 $\mu$ L、 $\alpha$ -アミラーゼ(高濃度品) 2 $\mu$ Lおよび RNase A(100mg/mL) 10 $\mu$ 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<sup>\*2</sup>、65 $^{\circ}$ Cの条件で15 分間加温する。GE2-K緩衝液<sup>\*3</sup> 85 $\mu$ Lを加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後<sup>\*4</sup>、氷上に 10 分間静置する。13,000 $\times$ g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で5分間遠心<sup>\*5</sup>する。次いでその上清<sup>\*6</sup>400 $\mu$ Lを1.5mLチューブに移し、GB3 緩衝液 150 $\mu$ L及びイソプロパノール(100%) 150 $\mu$ Lを添加した後、10~12 回転倒混和する<sup>\*7</sup>。混合液 700 $\mu$ L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 650 $\mu$ 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を新たな 1.5mL容チューブに移し、TE緩衝液 30 $\mu$ Lを加え 3 分間室温で静置した後、13,000 $\times$ g以上、4 $^{\circ}$ Cの条件で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(NIPPON GENE GM quicker2) 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 2mL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-K緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット(NIPPON GENE GM quicker2) 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-K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-K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 2mL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。

\*7 GB3 緩衝液を添加し、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。

リアルタイムPCRを用いた定性PCR法(ABI PRISM™ 7900)

PCR用反応液の調製(ABI PRISM™ 7900)

PCR用反応液は 25μL/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 \* 12.5μL、対象プライマー対溶液(各プライマー、10μmol/L) 1μL、対象プローブ溶液(10μmol/L) 0.5μL、水 5μL、40ng/μL DNA試料液 5.0μL (200ng)。分注操作終了後、真上からシールし、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。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad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。

\*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。

\*<sup>2</sup>対象プライマー対

コメ陽性対象用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (KVM159) : 5' -TGG TGA GCG TTT TGC AGT CT-3'

R-primer (KVM160) : 5' -CTG ATC CAC TAG CAG GAG GTC C-3'

LLRICE601 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (MDB498) : 5' -TAT CCT TCG CAA GAC CCT TCC-3'

R-primer (DPA143) : 5' -ATG TCG GCC GGG CGT CGT TCT G-3'

\*<sup>3</sup>対象プライマー対溶液量

コメ陽性対象用の各プライマーを用いる場合には0.5μLを加えること。

\*<sup>4</sup>対象プローブ

コメ陽性対象用プローブは以下の通りである。

VIC-TGT TGT GCT GCC AAT GTG GCC TG-TAMRA

LLRICE601 検出用プローブは以下の通りである。

FAM-TCT ATA TAA GGA AGT TCA TTT CAT T-MGBNFQ

## プレート情報の設定 (ABI PRISM™ 7900)

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、コメ陽性対象用の場合には、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」となるように、また LLRICE601 検出用の場合には、Reporter が「FAM」、Quencher が「MGB」となるように、設定する。なお、コメ陽性対象用、LLRICE601 検出用ともに、Passive Reference を「ROX」と設定する。

## PCR (ABI PRISM™ 7900)

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、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。

## 結果の判定

コメ陽性対象用試験および LLRICE601 検出用試験のいずれについても、結果の判定は、Th. Line と PCR 産物の増加を示す Amplification plot との交点(Ct 値)が得られるか否かをもって行う。解析の際、Th. Line の値は 0.064 に固定するものとし、Ct 値については Amplification plot 上で目視にて確認するとともに、結果として出力される数値について確認する。出力される数値については、PCR 増幅の繰り返し回数が 45 サイクルであるため、コメ陽性対象用試験および LLRICE601 検出用試験の両方において、45 未満の Ct 値が得られた場合に陽性と判断する。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、どちらか一方の抽出液において、コメ陽性対象用試験で 45 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 45 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 抽出液ともにコメ陽性対象用試験で 45 未満の Ct 値が得られない場合には、改めて 3 回目の抽出を行い、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コメ陽性対象用試験で 45 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。