

食安監発第0126006号

平成19年1月26日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課長
(公印省略)

安全性未審査の中国産米加工品の検知法について

昨年9月6日、環境団体がEUにおいて中国産加工品（ビーフン、はるさめ）から遺伝子組換え米（Cry1Ac）を検出したと公表したことから、当該食品の検知法を国立医薬品食品衛生研究所において開発してきました。今般、中国産米加工品から遺伝子組換え米の混入を確認したことから、今後の監視指導に資するため、別添検査法を通知いたします。

Bt コメの PCR 検査法

コメ加工品（米を主原料とするもので、ビーフン、米粉等、未加熱又は加熱の程度の低いものについて検知できることが明らかになったことから、お知らせいたします。）について、以下の定性PCRを行う。DNA抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2 変法）を用いる。1検体から2並行でDNAを抽出し、各DNA試料液を用いて定性PCR法を実施する。なお、下記に示したPCR増幅及び結果の判定を除き、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」（平成13年3月27日付け食発第110号、最新改正食安発第0629002号）2.1.1.2.1と同様の方法で定性PCRを行う。以下に示す定性PCR法により、陽性と判断された場合には、最終確認試験（リアルタイムPCRを用いた定性PCR法）を実施する。

定性 PCR 法

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

均質に^{*1}細粉碎した試料 500 mgをポリプロピレン製遠沈管(15mL容)に量り採り、GE1 緩衝液^{*2} 2.1 mL、Proteinase K(20mg/mL) 60 μ L、 α -アミラーゼ(高濃度品) 6 μ LおよびRNase A(100mg/mL) 30 μ Lを加え、試料塊が無いようにボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後^{*3}、65°Cの条件で 30 分間加温する。GE2-K緩衝液^{*4} 255 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後^{*5}、氷上に 10 分間静置する。6,000 x g以上、4°Cの条件で15分間^{*6}遠心する。上清^{*7}を新しいチューブ(2mL容)に移し、13,000 x g以上、4°Cの条件で 5 分間遠心する。次いでその上清^{*8}を新しいチューブ(15mL容)に移し、上清 1 mLに対してGB3 緩衝液 375 μ L及びイソプロパノール 375 μ Lを添加した後、10~12 回転倒混和する^{*9}。混合液を 700 μ Lずつspin columnに負荷^{*10}した後、13,000 x g以上、4°Cの条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。すべての溶出液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 x g以上、4°Cの条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin columnを新しいチューブ(1.5mL容)に移し、TE緩衝液 50 μ Lを加え 3 分間室温で静置した後、13,000 x g以上、4°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} 均質に細粉碎しないと抽出DNA量に変動があることがあるので、十分細粉碎し、均質化する。

^{*2} GE1 緩衝液は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用いる。

^{*3} 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 15 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。

^{*4} GE2-K緩衝液はシリカゲル膜タイプのキット(NIPPON GENE GM quicker 2)付属のもの、あるいは別途購入したものを用いる。

^{*5} 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。

^{*6} 使用するローター及び 15mL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。

^{*7} できる限り多くの上清を回収する。上清を移す際にピペットがポリプロピレン製遠沈管の内壁にあたらないように注意する。

^{*8} 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。

^{*9} 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。

*¹⁰ 混合液を採取する際に、ピペットがポリプロピレン製遠沈管の内壁にあたらないように注意する。

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、TE緩衝液を用いて適宜希釈し、200～320 nmの範囲で紫外外部吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度 (O. D. 260 及びO. D. 280^{*2}) を記録する。次いでO. D. 260 の値を 50ng/μL DNAとしてDNA濃度を算出する。またO. D. 260/O. D. 280 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試料原液を以後の試験に必要な濃度に水で希釈してDNA試料液とし、20μLごとにマイクロ試料管に分注し、-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、残った溶液は再度保存せず廃棄する。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。

¹ 試験の目的により、DNA試料原液は水で調製されている。希釈する場合には、DNA試料原液の調製に使用した溶解液を用いる。また、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、適宜とする。

*² O.D.260 がDNA由来の吸光度、O.D.280 がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

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、0.6 μmol/L 5'及び3'プライマー並びに0.8 units Taq DNAポリメラーゼ^{*2} 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)を水中で加え、全量を 25 μLにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置^{*3} にセットする。

Cry1Ac検出用プライマー対^{*4}を用いたPCR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℃ 30 秒間、60℃ 30 秒間、72℃ 30 秒間を 1 サイクルとして、45 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、陽性対照用プライマー対^{*5,*6}を用い、同様にPCR増幅を行う。

*¹ PCR緩衝液は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 Taq DNAポリメラーゼは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。

*³ PCR増幅装置は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。なおGeneAmp PCR System 9700 を用いる場合はエミュレーションモードで行う。

*⁴ Cry1Ac検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer(AC-3F): 5'- GTT CGC CTA TGG AAC CTC TT-3'

R-primer(AC-3R): 5'-TTC TGT GGT GGG ATT TCG TC-3'

*⁵ 陽性対照用のプライマー対は以下の通りである。

F-primer(SPSF) : 5'-TTG CGC CTG AAC GGA TAT-3'

R-primer(SPSR) : 5'-CGG TTG ATC TTT TCG GGA TG-3'

- *6 陽性対照用プライマー対を用いる場合のPCR条件は以下の通りである。94℃に 10 分間保ち反応を開始させた後、94℃ 30 秒間、56℃ 30 秒間、72℃ 30 秒間を 1 サイクルとして、45 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。

結果の判定

陽性対照用プライマー対^{*5, *6}を用いたレーンで 81bpのPCR増幅バンドが検出され、Cry1Ac検出用プライマー対^{*4}を用いたレーンで 90bpのPCR増幅バンドが検出された場合、新たに同一のDNA試料液とBtコメ検出用プライマー対^{*7, *8}及び同一のDNA試料液とBtコメ確認用プライマー対^{*9, *10}を用いPCR用反応液を調製し、PCR増幅を行う。得られた各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、Btコメ検出用プライマー対^{*7, *8}を用いたレーンで147bpのPCR増幅バンドが検出されるか、あるいはBtコメ確認用プライマー対^{*9, *10}を用いたレーンで120bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検体はBtコメ陽性と判定する。なお、2つのDNA試料液由来のPCR増幅液のどちらか一方でもBtコメ検出用プライマー対^{*9, *10}を用いたレーンで147bpのPCR増幅バンドが検出されるか、あるいはBtコメ確認用プライマー対^{*9, *10}を用いたレーンで120bpのPCR増幅バンドが検出され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用プライマー対^{*5, *6}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用プライマー対^{*5, *6}でPCR増幅バンドが検出されないときは、本試料からのBtコメの検知は不能とする。判定例は以下を参照のこと。

結果判定の留意点

DNA試料液由来のPCR増幅液において、Btコメ検出用プライマー対^{*7, *8}を用いたレーン及びBtコメ確認用プライマー対^{*9, *10}を用いたレーンともに、まれに予定長以外に非特異的増幅バンドが検出されることがある。そのため、結果の判定に関してはDNA分子量標準と比較して、慎重に予定長の増幅バンドを判断する。

判定例

	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
抽出1	SPS 陽性対照用プライマー対	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	AC-3F/AC-3R Cry1Ac 検出用プライマー 対	+	+	+	+	+	-	+	+	+	/
	OsCry1Ac-F/OsNOS-R2 Bt コメ検出用プライマー対	+	+	+	+	+	/	-	-	-	/
	actACS3F/actACS3R Bt コメ確認用プライマー対	+	+	+	-	-	/	-	-	-	/
抽出2	SPS 陽性対照用プライマー対	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	AC-3F/AC-3R Cry1Ac 検出用プライマー 対	+	+	+	-	-	-	-	+	-	/
	OsCry1Ac-F/OsNOS-R2 Bt コメ検出用プライマー対	+	+	-	/	/	/	/	-	/	/
	actACS3F/actACS3R Bt コメ確認用プライマー対	+	-	+	/	/	/	/	-	/	/
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	不能

試料番号 10 の例の場合には、3 回目の抽出を行う。

+ 予定長増幅バンド検出、予定長増幅バンド不検出、/ 試験不要

*7 Bt コメ検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer(Oscry1Ac-F) : 5'-GCA GGA GTG ATT ATC GAC AG-3'

R-primer(OsNOS-R2) : 5'-AAGACCGGCAACAGGATTCA-3'

*8 Bt コメ検出用プライマー対^{*7}を用いたPCR条件は次の通りである。95°Cに 10 分間保ち反応を開始させた後、95°C 30 秒間、60°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 1 サイクルとして、45 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 Bt コメ確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer(actACS3F) : 5'- TTC ATC GGT AGT TTT TCT TTT CAT-3'

R-primer(actACS3R) : 5'- GGC CTG CAG TTG TCC AT-3'

*10 Bt コメ確認用プライマー対^{*9}を用いる場合のPCR条件は以下の通りである。94°Cに 10 分間保ち反応を開始させた後、94°C 30 秒間、56°C 30 秒間、72°C 10 秒間を 1 サイクルとして、45 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。

最終確認試験 (リアルタイムPCR法)

リアルタイム PCR 法において用いる対象プライマー対及び対象プローブは、使用する PCR 機種に依ることなく、以下の通りである。

対照プライマー対

コメ陽性対照用プライマー対は以下の通りである。

F-primer(SPSF): 5'-TTG CGC CTG AAC GGA TAT-3'

R-primer(SPSR): 5'-CGG TTG ATC TTT TCG GGA TG-3'

最終確認 Bt コメ検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer(T51-SF): 5'-GCA GGA GTG ATT ATC GAC AGT TC-3'

R-primer(OsNOS-R2): 5'- AAG ACC GGC AAC AGG ATT CA-3'

対照プローブ

コメ陽性対照用試験のコメ陽性対照用プローブは以下の通りである。

(SPS-Taq) : FAM-GACGCACGGACGACGGCTCGGA-TAMRA

Bt コメ検出用試験の Bt コメ検出用の 2 つのプローブは以下の通りである。

63 Bt コメ検出用プローブ(GM63-Taq):

FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCCC-TAMRA

NN Bt コメ検出用プローブ (NGMr-Taq) :

VIC-AATGAGAATTCGGTACCCCGACCTGCA-TAMRA

リアルタイムPCR法(ABI PRISM™ 7900)

コメ陽性対照用試験のPCR用反応液の調製(ABI PRISM™ 7900)

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、5'及び3'プライマー(各 0.75 μ mol/L)、対照プローブ(300 nmol/L)を混合し、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。分注操作終了後、真上からシール^{*2}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^{*3}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 2 well分を同時に調製する。

Btコメ検出用試験のDuplexPCR用反応液の調製(ABI PRISM™ 7900)

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、5'及び3'プライマー(各 0.75 μ mol/L)、63 Btコメ検出用及びNN Btコメ検出用プローブ(各 150 nmol/L)を混合し、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。ただしDNA試料液以外は同様に 5 ng/ μ L DNA試料液 5.0 μ L(25 ng)を添加したPCR用反応液も別途調製する^{*4}。分注操作終了後、真上からシール^{*2}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^{*3}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 50 ng DNA試料あるいは 25 ng DNA試料を含む 2 つのPCR反応液を調製し、その各PCR反応液あたり 2 well並行で行うものとし (4 well/1DNA試料液)、PCR用反応試薬は 1DNA試料液あたり 4 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 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 (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。

*³ 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。

*⁴ コメ加工品から調製されたDNA試料液には多糖等のPCR阻害夾雑物が多く含まれている可能性もあり、PCR阻害効果による偽陰性検出を避けるため、予め 50 ng DNA試料を含むPCR反応液と 25 ng DNA試料を含むPCR反応液の 2 検体を用意し、試験を行う。

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、コメ陽性対照用試験の場合には、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように、また Bt コメ検出用試験の場合で、63 Bt コメ検出用プローブ検出には、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」で、NN Bt コメ検出用プローブ検出には、Reporter が「VIC」、Quencher が「TAMRA」で、となるように、設定する。なお、コメ陽性対照用、Bt コメ検出用試験ともに、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。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 20 秒、60°C 1 分を 1 サイクルとして、50 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。

結果の解析と判定

コメ陽性対照用試験および Bt コメ検出用試験のいずれについても、結果の判定は、PCR 産物の増加を示す Amplification plot と Threshold Line (Th. Line) の交点(Ct 値)および対象色素由来の蛍光強度比 (Rn) の明確な増加の確認で行う。ベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) の Rn のやや上側 (0.1 から 0.2 程度) で Th. Line を選択し固定する。その Th. Line から Ct 値が得られるか否かを解析する。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50サイクルであるため、コメ陽性対照用試験および両系統Btコメ検出用試験の両方において、50未満のCt値が得られた場合に陽性を疑う。さらに、上記判定により陽性が疑われた結果について **multicomponent** を確認し、50サイクルの反応が終了した時点でのFAM/ROXあるいはVIC/ROXのRnが10サイクルの時点での当該Rnに比べて1.5倍以上の明確な増加を示していた場合に陽性と判定する。なお、Btコメ検出用試験の2つのDNA抽出液のすべてのwell中(合計8well)、コメ陽性対照用試験でCt値が得られ、かつ63Btコメ検出用あるいはNNBtコメ検出においてCt値が得られたwellが1wellでもある場合に陽性と判定する。また、どちらか一方の抽出液において、コメ陽性対照用試験でCt値が得られない場合には、リアルタイムPCR法以降の操作を行い、それでも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照用試験で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照用試験で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Btコメの検知は不能とする。

なおABI PRISM™ 7900以外のリアルタイムPCR機器としてABI PRISM™ 7700、ABI PRISM™ 7500およびABI PRISM™ 7000等が適用可能である。使用するリアルタイムPCR機器によって感度が異なるので、標準プラスミドDNA溶液(下記参考)を用いて事前にPCR用反応液の調製法、PCR条件、解析方法を最適化する。

(参考)

- (1) シリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker 2 変法)の NIPPON GENE GM quicker 2 キットは、ニッポンジーン(〒930-0982 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)から購入可能である。
- (2) Bt コメの定性 PCR 検査法の対象プライマー対及び定性用標準プラスミド溶液(GM コメ Bt コメ陽性コントロールプラスミド)は、ニッポンジーン(〒930-0982 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)、ファスマック(〒243-0041 厚木市緑ヶ丘 5-1-3. Tel. 046-295-8787 Fax. 046-294-3738)から購入可能である。
- (3) 最終確認試験(リアルタイムPCR法)のPCR用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及びリアルタイムPCR法用標準プラスミド溶液(GM コメ Btコメ 最終確認検査用 陽性コントロールプラスミド)は、ニッポンジーン(〒930-0982 富山市問屋町1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)、ファスマック(〒243-0041厚木市緑ヶ丘5-1-3. Tel. 046-295-8787 Fax. 046-294-3738)から購入可能である。