

食安監発0106第6号

平成23年1月6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及び米加工品の検知法について

安全性未審査の中国産米加工品の検知法については、平成19年1月26日付食安監発第0126006号により通知（平成19年2月20日付食安監発第0220002号により改正）しているところですが、今般、検査対象を米にも拡大したこと、海外での検出動向を踏まえて CpTI コメの検出用試験を追加したこと等により、平成19年1月26日付食安監発第0126006号別添の検知法を別紙のとおり改正しましたので、通知します。

## 害虫抵抗性遺伝子組換えコメ（63Bt コメ、NNBt コメ及び CpTI コメ）の検査法

本検査法ではコメ及びコメ加工品（コメを主原料とするもので、ビーフン、コメ粉等、未加熱又は加工の程度の低いもの）を検査対象とし、DNA 抽出精製は、以下のシリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2 変法①及び②）を用いる。検査法の対象検体のうち、コメ及びコメ加工品（未加熱のもの）は変法①を、ビーフン等の加熱加工品については変法②を、それぞれ適用する。1 検体から 2 並行で DNA を抽出し、各抽出 DNA 試料液を用いてリアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法を実施する。なお、コメ加工品の検体採取及び粉砕については、「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）に従い、コメについては同通知中の 1.1.1. の検体採取と同様に行う。

### 1. DNA の抽出精製

1.1. DNA 抽出精製には、対象検体により 1.1.1. または 1.1.2. の方法を適用する。

1.1.1. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 2 変法①（コメ及びコメ加工品（未加熱のもの）に適用）

均質に\*1 粉砕した試料 500 mg をポリプロピレン製遠沈管（2mL 容）に量り採り、GE1 緩衝液\*2 700 µL、Proteinase K (20 mg/mL)\*2 20 µL、α-Amylase (高濃度品)\*2 2 µL、及び、RNase A (100 mg/mL)\*2 10 µL 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\*3、65°C の条件で 15 分間加温する。GE2-K 緩衝液\*2 85 µL を加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後\*4、氷上に 10 分間静置する。13,000×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心\*5 する。次いでその上清\*6 400 µL を 1.5 mL チューブに移し、GB3 緩衝液\*2 150 µL 及びイソプロパノール 150 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する\*7。混合液 700 µL を spin column に負荷した後、13,000×g 以上、4°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\*2 650 µL を負荷し、13,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。spin column を新たな 1.5mL 容チューブに移し、水 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、13,000×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 均質に細粉砕しないと抽出 DNA 量に変動があることがあるので、十分細粉砕し、均質化する。

\*2 GE1 緩衝液、GE2-K 緩衝液、GB3 緩衝液、GW 緩衝液、Proteinase K、α-Amylase、及び、RNase A はシリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker 2）付属のもの、又は、同等の効力を持つものを用いる。

\*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 2 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 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2 mL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。チューブの蓋の部分に液が付着した場合は軽くスピンドウンして全量を spin column に負荷する。

### 1.1.2. シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker 2 変法②) (ビーフン等の加熱加工品に適用)

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\*2.1mL、Proteinase K (20 mg/mL) \*2 60  $\mu$ L、 $\alpha$ -Amylase (高濃度品) \*2 6  $\mu$ L、及び、RNase A (100 mg/mL) \*2 30  $\mu$ 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\*2 255  $\mu$ L を加え、ボルテックスミキサーで十分に混和後\*4、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\*5 遠心する。上清\*6 を新しいチューブ (2 mL 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\*7 を新しいチューブ (15 mL 容) に移し、上清 1 mL に対して GB3 緩衝液\*2 375  $\mu$ L 及びイソプロパノール 375  $\mu$ L を添加した後、10~12 回転倒混和する\*8。混合液を 700  $\mu$ L ずつ spin column に負荷した後、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。すべての混合液を負荷するまでこの操作を繰り返す。次いで GW 緩衝液\*2 650  $\mu$ 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 (1.5 mL 容) に移し、水 50  $\mu$ 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、GE2-K 緩衝液、GB3 緩衝液、GW 緩衝液、Proteinase K、 $\alpha$ -Amylase、及び、RNase A はシリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE GM quicker 2) 付属のもの、又は、同等の効力を持つものを用いる。
- \*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 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 15 mL 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 できる限り多くの上清を回収する。
- \*7 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。
- \*8 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。チューブの蓋の部分に液が付着した場合は軽くスピンドウンして全量を spin column に負荷する。

## 1.2. 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、水を用いて適宜希釈し\*1、200～320nm の範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260nm 及び 280nm 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 50 ng/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、適量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 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。

## 2. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 (Applied Biosystems 7900HT, Applied Biosystems 7500)

害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用3試験においては、63Btコメ検出用試験としてBtコメ検出用のプライマー対及び63Btコメ検出用プローブ、NNBtコメ検出用試験としてBtコメ検出用のプライマー対及びNNBtコメ検出用プローブ、CpTIコメ検出用試験としてCpTI検出用プライマー対及びCpTI検出用プローブをそれぞれ用い、リアルタイムPCRの3試験を行い判定する。また、試験にあたっては、コメ陽性対照用試験としてphospholipase D (PLD) 遺伝子配列を検知するプライマー対及びプローブを用いる。各プライマー\*1及びプローブ\*1の塩基配列は以下の通りである。

### コメ陽性対照用試験 (PLD)

コメ陽性対照用プライマー対、及び、プローブは以下の通りである。

KVM159 : 5'-TGG TGA GCG TTT TGC AGT CT-3'

KVM160 : 5'-CTG ATC CAC TAG CAG GAG GTC C-3'

TM013 : FAM-TGT TGT GCTGCC AAT GTG GCC TG-TAMRA

### 害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3 試験

#### 63Bt コメ検出用試験

Bt コメ検出用のプライマー対は以下の通りである。

T51-SF : 5'-GCA GGA GTG ATT ATC GAC AGT TC-3'

OsNOS-R2 : 5'- AAG ACC GGC AAC AGG ATT CA-3'

63Bt コメ検出用プローブは以下の通りである。

63Bt コメ検出用プローブ (GM63-Taq) :

FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCCC-TAMRA

#### NNBt コメ検出用試験

Bt コメ検出用のプライマー対は 63Bt コメ検出用試験のプライマー対 (T51-SF と OsNOS-R2) と同様である。

NNBt コメ検出用プローブは以下の通りである。

NNBt コメ検出用プローブ (NGMr-Taq) :

FAM-AATGAGAATTTCGGTACCCCGACCTGCA-TAMRA

CpTI コメ検出用試験

CpTI コメ検出用プライマー対以下の通りである。

CpTi-1F : 5'- CGT GTC ACT CGG CTT GCA-3'

CpTi-1R : 5'- AAC GAC ACT TGC CTG GCA TT-3'

CpTI コメ検出用プローブは以下の通りである。

CpTI コメ検出用プローブ (CpTi-P) : FAM- ATC CTG CAT GTG TAC ACG-MGB

\*1 各プライマー、プローブは水に溶解する。

## 2.1. PCR 用反応液の調製

コメ陽性対照用試験の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  $\mu\text{L}$ 、5'及び3'プライマー (各 0.75  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )、対照プローブ (300 nmol/L) を混合し、水で全量 20  $\mu\text{L}$  に調製後、10 ng/ $\mu\text{L}$  DNA 試料液 5.0  $\mu\text{L}$  (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 well 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ターを用いて行う。最後に well 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、MicroAmp 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、各 DNA 試料液あたり 2 well 並行で行うものとし、リアルタイム PCR のブランク反応液として、DNA 試料液を加えず水を代替試料液として加えたもの 1well 分についても同時に調製する。PCR 用反応試薬は 5 well 分 (2 DNA 試料液/1 検体  $\times$  2 well/ DNA 試料液+1 well/ ブランク反応液) を調製する。

害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3 試験 (63Bt コメ検出用試験、NNBt コメ検出用試験、CpTI コメ検出用試験)

各試験の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  $\mu\text{L}$ 、各検出用5'及び3'プライマー (各0.75  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )、各検出用プローブ (300 nmol/L) を混合し、水で全量20  $\mu\text{L}$ に調製後、10 ng/ $\mu\text{L}$  DNA試料液5.0  $\mu\text{L}$  (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well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ターを用いて行う。最後にwell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、MicroAmp 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。

各試験は、各DNA試料液あたり2 well並行で行うものとし、リアルタイムPCRのブランク反応液として、DNA試料液を加えず水を代替試料液として加えたもの1well分についても同時に調製する。各PCR用反応試薬は5 well分 (2 DNA試料液/1検体  $\times$  2 well/ DNA試料液+1 well/ ブランク反応液) を調製する。

1検体当たりのwell使用数は、コメ陽性対照用試験で5 well、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用3試験で15 well、合計20 well/検体となる。

**\*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、well に分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、well 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ケーション**

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社) 及び MicroAmp Optical Adhesive Cover (Life Technologies 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 MicroAmp Optical Cover Compression Pad**

MicroAmp Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。Applied Biosystems 7500 では使用しない。

## 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、コメ陽性対照用試験、63Bt コメ検出用試験又は NNBt コメ検出用試験の場合には Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるように、また CpTI コメ検出用試験の場合で Reporter が「FAM」、Quencher が「None」となるように設定する。なお、コメ陽性対照用、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験各 3 試験のいずれとも、Passive Reference を「ROX」と設定する。

## 2.3. PCR 増幅

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。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。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。

## 3. 結果の解析と判定

コメ陽性対照用試験及び害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験3試験の各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。

まず害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験3試験において目視でAmplification plot上

に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、害虫抵抗性遺伝子組換えコメの陽性を疑う。次いで、ベースライン（3サイクルから15サイクル）の $\Delta Rn$ 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Threshold line (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。各DNA試料液においてコメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験3試験のいずれかの試験において、2つのDNA抽出液のうち1 wellでも48未満のCt値が得られた場合に、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陽性と判定する。コメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られ、かつ害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験3試験のいずれかの試験で48未満のCt値が得られない場合は、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陰性と判定する。なお上記判定により害虫抵抗性遺伝子組換えコメ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降下や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、コメ陽性対照用試験で48未満のCt値が得られないDNA試料については、再度、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48未満のCt値が得られない場合には、そのDNA試料液の測定結果を無効とし、48未満のCt値が得られたDNA試料液の結果だけで判定する。2つのDNA試料液ともにコメ陽性対照用試験で48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照用試験で48未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

なおApplied Biosystems 7900HT及びApplied Biosystems 7500以外のリアルタイムPCR機器として、ABI PRISM™ 7700、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。

\* 個々の機種の状態によってAmplification plot上の $\Delta Rn$ 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 $\Delta Rn$ 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Applied Biosystems 7900HT、及び、Applied Biosystems 7500ともに0.2-0.5の範囲であると考えられる。

(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) 害虫抵抗性遺伝子組換えコメの検査法に用いるプライマー対、プローブ（CpTI コメ検出用プローブ（CpTi-P）を除く。）及びリアルタイムPCR法用標準プラスミドⅡ（GM コメ害虫抵抗性コメ検査用陽性コントロールプラスミド）は、ニッポンジーン（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）又はファスマック（〒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) 害虫抵抗性遺伝子組換えコメの検査法に用いるプローブのうち、CpTI コメ検出用プローブ (CpTi-P) については Life Technologies Japan 社 (〒108-0023 港区芝浦 4-2-8 住友不動産三田ツインビル東館 Tel. 03-6832-9300) から購入可能である。