

20消安第20号
平成20年4月7日

独立行政法人
農林水産消費安全技術センター理事長 殿

農林水産省 消費・安全局長

組換えDNA技術応用飼料の検査方法の一部改正について

組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物については、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令(昭和51年農林省令第35号)により安全性に関する確認を義務付けるとともに、「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」(平成15年4月1日付け14生畜第8598号農林水産省生産局長・水産庁長官通知)により、組換えDNA技術応用飼料の検査方法を示しているところです。

今般、米国における安全性が未確認である遺伝子組換えトウモロコシ DAS59132 の種子の流通事例の情報を受け、当該米国産飼料用トウモロコシの検査を開始することとしたことから、同通知を別紙新旧対照表のとおり改正したので、御了知されるとともに、貴管下関係者への指導方お願いします。

(別紙)

「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について」(平成15年4月1日付け14生畜第8598号農林水産省生産局長・水産庁長官通知)

新旧対照表

(下線部分は改正部分)

改正後	現行
<p>1～3 (略)</p> <p><u>4 立入検査について</u> <u>飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律(昭和28年法律第35号。以下「法」という。)第4条の規定に違反のないことを確認するため、必要に応じて独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、法第57条第1項の規定に基づく立入検査を行うものとする。検査方法は、別添3の「組換えDNA技術応用飼料の検査方法」によるものとする。</u></p> <p><u>5 製造基準について</u> (1)～(2) (略)</p> <p><u>6 その他</u> (1)～(2) (略)</p> <p>別添1・別添2 (略)</p> <p>別添3 組換えDNA技術応用飼料の検査方法</p> <p>1. 検体採取方法</p> <p>1.1. 組換えDNA技術応用飼料の検体採取</p> <p>1.1.1. トウモロコシ穀粒の検体採取 組換えDNA技術応用飼料が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に</p>	<p>1～3 (略)</p> <p>4 製造基準について (1)～(2) (略)</p> <p>5 その他 (1)～(2) (略)</p> <p>別添1・別添2 (略)</p> <p>別添3 組換えDNA技術応用飼料の検査方法</p> <p>1. 検体採取方法</p> <p>1.1. 組換えDNA技術応用飼料の検体採取</p> <p>1.1.1. トウモロコシ穀粒の検体採取 組換えDNA技術応用飼料が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に</p>

掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な一定量*を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。

* トウモロコシ (CBH351) の定性及び定量分析にはそれぞれ 2,400 粒の穀粒、トウモロコシ (Bt10) 及びトウモロコシ (DAS59132) の定性分析には 500g の穀粒を使用する。

1.1.1.2 ~ 1.1.1.2.2 (略)

2. 安全性未確認の組換え DNA 技術応用飼料の検査方法

2.1. トウモロコシ (CBH351) の検査方法 (略)

2.2. トウモロコシ (Bt10) の検査方法 (略)

2.3 トウモロコシ (DAS59132) の検査方法

2.3.1 トウモロコシ (DAS59132) の定性法

トウモロコシ穀粒について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法で行う。なお、試料の準備は 2.1.1.1 に定めるところにより行う。

2.3.1.1 プライマー対及びプローブ

2.3.1.1.1 トウモロコシ陽性対照用プライマー対及びプローブ

トウモロコシ陽性対照用試験は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 (SSIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対 SSIb-3 とプローブ SSIb-Taq を用いる。

2.3.1.1.2 DAS59132 検出用プライマー対

F-primer (32f) : 5'-CCG CAA TGT GTT ATT AAG TTG TCT AAG-3'

掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な一定量*を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。

* トウモロコシ (CBH351) の定性及び定量分析にはそれぞれ 2,400 粒の穀粒、トウモロコシ (Bt10) の定性分析には 500g の穀粒を使用する。

1.1.1.2 ~ 1.1.1.2.2 (略)

2. 安全性未確認の組換え DNA 技術応用飼料の検査方法

2.1. トウモロコシ (CBH351) の検査方法 (略)

2.2. トウモロコシ (Bt10) の検査方法 (略)

R-primer (32r) : 5'-GGT GAA TGT CGC CGT GTG T-3'

(各プライマーは水で溶解する。)

2.3.1.1.3 DAS59132 検出用プローブ

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

(プローブは水で溶解する。)

2.3.1.2 PCR 用反応液の調製

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、対象プライマー対溶液 (各プライマー、10 μ mol/L) 1.0 μ L *²、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L を混合し、水で全量 20 μ L に調製後、10ng/ μ L DNA 試料液 5.0 μ L (50ng) を添加する*³。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ターを用いて行う*⁵。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 *⁶ 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 2well 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 対象プライマー対溶液量

トウモロコシ陽性対照用試験では各プライマー (25 μ mol/L) を
用いる場合には 0.5 μ L を加えること。

* 3 可能であれば、陽性対照として DNA 試料液の代わりに陽性

対照プラスミドを用いた反応液を調製することが望ましい。

* 4 (ABI PRISMTM 7900、7500) 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。

* 4 (ABI PRISMTM 7700) 96 ウェルプレート及びプレートの蓋

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems 社) 及び MicroAmp Optical Caps、Scaps/strips(Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

* 5 当該操作はABI PRISMTM 7700を使用する場合は必要ない。

* 6 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Applied Biosystems 社) を使用する。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。なお、ABI PRISMTM 7700 では、当該 Pad は使用しない。

2.3.1.3 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。

2.3.1.4 PCR

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、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。

* ABI PRISM7500 については component を確認する。

2.3.1.5 結果の判定

トウモロコシ陽性対照用試験および 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 値の確認および 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および 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のみで判定する。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。再抽出 (3 点目) 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、本試料からのトウモロコシ (DAS59132) の検出は不可

能とする。判定例は、**2.1.1.3.5** の判定例の表を参照のこと。(ただし、確認用プライマーの欄は除く。)