

平成20年4月7日

各植物防疫（事務）所長 殿

消費・安全局長

「平成20年度における遺伝子組換えトウモロコシに係る立入検査等実施要領」
の一部改正について

栽培用の遺伝子組換えトウモロコシ種子の輸入については、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成15年法律第97号。以下「法」という。）に基づく承認を受けることとされており、また、わが国への流入を防止する措置として、「平成20年度における遺伝子組換えトウモロコシに係る立入検査等実施要領」（平成20年3月7日付け19消安第14265号消費・安全局長通知。以下「要領」という。）により、法第31条第1項に基づく立入検査等（以下「検査」という。）を実施しているところである。

今般、法に基づく承認が得られていない遺伝子組換えトウモロコシDAS59132が、米国において誤って栽培され、流通したとの情報を入手した。

このため、遺伝子組換えトウモロコシDAS59132を検査の対象とすることとし、要領の一部を別紙のとおり改正したので、御了知の上、適切な検査の実施方よろしく願います。

(別紙)

「平成20年度における遺伝子組換えトウモロコシに係る立入検査等実施要領」

(平成20年3月7日付け19消安第14265号) 一部改正新旧対照表

改正後	理行
(別紙)	(別紙)
平成20年度における遺伝子組換えトウモロコシに係る立入検査等実施要領	平成20年度における遺伝子組換えトウモロコシに係る立入検査等実施要領
1. (略)	1. (略)
2. 対象及び実施件数等	2. 対象及び実施件数等
(1) 検査対象	(1) 検査対象
栽培の用に供するトウモロコシ種子を立入検査等の対象(以下「検査対象」という。)とし、当該検査対象が除草剤グルホシネート耐性及びチョウウ目害虫抵抗性トウモロコシ(CBH351(スターリンク)、チョウウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシBt10又はコウチュウ害虫抵抗性及び除草剤ダリホシネート耐性トウモロコシDAS59132(以下「分析対象」という。))を含有するかどうかについて分析検査を実施すること。 (2)・(3) (略)	栽培の用に供するトウモロコシ種子を立入検査等の対象(以下「検査対象」という。)とし、当該検査対象が除草剤グルホシネート耐性及びチョウウ目害虫抵抗性トウモロコシ(CBH351(スターリンク)、並びにチョウウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシBt10(以下「分析対象」という。))を含有するかどうかについて分析検査を実施すること。 (2)・(3) (略)
3. 検体の検査	3. 検体の検査
(1)～(5) (略)	(1)～(5) (略)
(6) 分析検査に際しては、別添1-1、別添1-2及び別添1-3により、正確かつ迅速に実施すること。	(6) 分析検査に際しては、別添1-1及び別添1-2により、正確かつ迅速に実施すること。
(7) (略)	(7) (略)
4.・5. (略)	4.・5. (略)
(別添1-1) (略)	(別添1-1) (略)
(別添1-2) (略)	(別添1-2) (略)
(別添1-3)	(略)
栽培用種子における遺伝子組換えトウモロコシ(DAS59132)の検査方法について	トウモロコシ種子について、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法で分析し、陽性と判定された場合は、再度、リアルタイムPCR法により確認検査を行う。なお、確認検査の際は、新たに2,400粒の種子を準備し検査を行い、確認検査においても陽性と判定された場合は、当該検体を陽性と判定する。 *試料の処理方法等の選択・組合せ、それらの手順、結果の判定方法等について、

あらかじめ詳細を作業書等に定めておくこと。

1. 試料の準備

別添1-1の1.と同様の方法で試料の準備を行う。

2. リアルタイムPCRを用いた定性PCR法 (ABI PRISM™ 7900、7700、7500)

検査は、採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒で2,400粒を採取し、2,400粒を2回以上に分割し、それぞれ検査を行う。2.1.のDNA抽出精製に従って、分割した検体のそれぞれにつき2回並行でDNA抽出を行い、得られたDNA試料液を用い、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法を行う。1検体あたり2回以上(計2,400粒)の検査を実施し、いずれかが陽性となった場合、その検体を陽性と判定する。

*本項では、2,400粒を1,200粒ずつ2回に分けて検査を行うこととする。

2.1. DNA抽出精製

PCR増幅には別添1-1の3.1.2. シリカゲル膜タイプキット法① (QIAGEN DN easy Plant Mini Kit を使用する手法) により抽出したDNA試料液を用いる。

2.2. プライマー対及びプローブ

2.2.1 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 (SSI1b) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対SSI1b-3とプローブSSI1b-Taqを用いる。

2.2.2 DAS59132 検出用プライマー対

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

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。)

2.2.3 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 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、シール*4又はMicroAmp Optical Capsで真上から完全にウェルを密閉する。シールを用いる際には、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を用いて行う。シール又はキャップをした後、ボルテックスミキサーにより攪拌し、プレートを軽く遠心してスピンドウンする。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、プレートの上になるよう、プレートの上面にセットする。試験は、IDNA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 PRISM™ 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 PRISM™ 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, 8caps/strips(Flat) (Applied Biosystems 社) を使用する。

*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。(ABI PRISM™ 7700では、当該Padは使用しない。)

2.4 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、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 (「UNK」: 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。

2.5 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℃、2分間の条件で保持した後、95℃で10分間加熱し、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分となったことを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

*ABI PRISMTM7500についてはcomponentを確認する。

3. 結果の判定

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 ΔRn 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のみで判定する。二つの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DAS59132の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

試料 (ロット) の判定例

A (1, 200 粒)	ターゲット名	試料番号						
		1	2	3	4	5	6	7
DNA抽出液1	トウモロコシ内在性DNA	+	+	+	+	+	+	-
	DAS59132系統由来DNA	+	+	+	-	-	-	-
DNA抽出	トウモロコシ内在性	+	+	-	+	-	-	-

出液2	DNA														
B (1,200 粒)	DNA 抽 出液1	DAS59132系統由来DNA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DNA 抽 出液2	トウモロコシ内在性 DNA	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DAS59132系統由来DNA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		トウモロコシ内在性 DNA	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		DAS59132系統由来DNA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	※1	※2

は陽性、-は陰性を表す。

※1 Bの試料を用い、3回目の抽出を行う。

※2 A及びBの試料を用い、それぞれ3回目の抽出を行う。

(別添2) (略)

(別添2) (略)