

(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

### 1. 実施期間

平成20年4月1日から平成21年3月31日まで

### 2. 対象及び実施件数等

#### (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目害虫抵抗性トウモロコシCBH351(スターリンク)、チョ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又はコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グ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) 検査件数

① 原則として100件を下回らない件数の検体を収去すること。

② 収去到っては、当該検査対象の輸入実態等を勘案し、以下の点に留意すること。

ア 分析対象の生産国であるアメリカ合衆国からの輸入物の検査を重点的に行うこと。

イ 収去を行う際は、概ね100kg以上の荷口を対象とすること。

ウ 収去する対象を選定するに当たっては、ア、イの事項に留意した上で、期間別及び各検査機関管内における輸入実態を反映した収去数とすること。

#### (3) 実施機関

横浜植物防疫所、名古屋植物防疫所、神戸植物防疫所、門司植物防疫所及び那覇植物防疫事務所(支所及び出張所を含む。以下「検査機関」という。)が立入検査等において検体の収去を実施し、収去した検体は、3.(7)①に定める適切な方法により運搬又は送付の上、横浜植物防疫所(以下「分析機関」という。)において分析検査を実施すること。

### 3. 検体の検査

(1) 検体の収去到は、以下の手順により、分析検査に必要な量の検体を採取すること。なお、この検査においては、1回の検査につき2,400粒の種子を使用するため、確認検査に使用する分及び夾雑物の除去等により発生するロスを見込み、1検体につき1.5kg以上(5,000粒以上)の種子を収去すること。品種により1.5kgで5,000粒に満たない場合は、5,000粒を確保できる量を収去すること。

① 荷口全体の中から、荷姿、品種、その他関係書類等で確認できる均一な一定量を単位として、検査の対象とするロットを設定すること。

② 袋積み又は少量ずつ小分けになっている荷口の場合は、設定したロットの大きさに応じ、以下の表に従い（抽出した梱から検査に必要な量の試料を採取できないときは、適宜追加抽出を行う）当該ロットから一定数の袋を無作為に抽出すること。

・ 1 梱当たりの重量が100kg以下の場合

ロットの大きさ	開梱数
1 ～ 2	全数
3 ～ 27	3 以上
28 ～ 64	4 以上
65 ～ 125	5 以上
126 ～ 216	6 以上
217 ～	7 以上

・ 1 梱当たりの重量が100kgを超える場合

ロットの大きさ	開梱数
1	全数
2 ～ 8	2 以上
9 ～ 27	3 以上
28 ～ 64	4 以上
65 ～ 125	5 以上
126 ～ 216	6 以上
217 ～	7 以上

\* 表の抽出数は、輸入種苗検査要綱（昭和53年9月30日付け53農蚕第6963号農蚕園芸局長通達）第8の2に規定する栽培用種子に関する1次検査の方法に準拠するものである。

③ 設定したロット全体又は抽出した袋から当該ロット全体を代表する検体となるよう一定量を採取すること。採取物の全量または必要に応じて採取物を縮分したものを1検体として収去すること。

(2) 検体の採取に当たっては、以下の点に留意すること。

① 遺伝子組換え生物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、包装形態に応じて検体採取を行うこと。

② 検体採取に際しては、他ロットの種子が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等はいし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。

(3) 検査職員は、立入検査等に当たっては、その内容等を取りまとめた別記様式第1による立入検査等記録書を作成し、被検査者又は被検査者の委任を受けた者であつて当該検査に立会う者（以下「立会人等」という。）に閲覧させること。

(4) 検査職員は、立会人等の求めに応じて、別記様式第2により見本採取票を発行することができる。

(5) 収去した検体は、当該検査についての立入検査等記録書の写しとともに分析機関に送付し、速やかに分析検査に供すること（検査機関と分析機関が同一の機関の場合は、速やかに分析検査に供すること。）。

(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。

(7) その他

- ① 検査機関及び分析機関は、検体の取扱い、試薬等の管理、機械器具の保守管理、検査の実施に当たっては、ここに定める事項のほか、JIS Q 17025「試験所及び校正機関の能力に関する一般的要求事項」、又は別添2に基づき、作業の管理を行うこと。また、各検査機関における作業の細部について記載した作業書等を作成の上作業を実施し、各作業ごとに詳細な記録を残すことにより、検査の精度及び信頼性の確保を図ること。
- ② 分析検査に供した検体及び粉碎物の残り並びに検査過程で得られた標本については、疑義が生じた場合等の再検査等に備え、原則として最低3ヶ月間は良好な条件の下で保管すること。

#### 4. 検査結果の報告

- (1) 分析機関は、分析検査の結果、検体から分析対象である遺伝子組換え生物等が検出された場合には、直ちに別記様式第3により植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告するとともに、当該検体の収去を実施した検査機関にその旨連絡し、別途消費・安全局長の指示に従うこと。
- (2) 分析機関の長は、分析検査を実施したときは、遅滞なく別記様式第4により、当該検体の収去を実施した検査機関の長に連絡すること。
- (3) 検査機関の長は、当該検体の分析検査の結果を被検査者の求めに応じ、別記様式第5により通知することができる。
- (4) 分析機関は、毎月の検査の結果を取りまとめ、別記様式第6により四半期毎に当該四半期が終了した翌月の15日までに植物防疫課を経由して農産安全管理課に報告すること。

#### 5. その他

- (1) 当該検査は、輸入貨物に対して無作為に抽出を行い実施するものであり、特定の輸入者等に偏ることのないよう行うとともに、輸入者の申出により省略するものではないことに留意すること。
- (2) 円滑な立入検査を実施するため必要と判断される場合で、通告しても適切な立入検査の実施に支障が生じない場合には、あらかじめ被検査者に通告して検査することができる。



整理番号 \_\_\_\_\_

### 立入検査等記録書

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第31条第1項の規定に基づき、本職は下記のとおり、遺伝子組換え生物等の使用等をしている者、又はした者、遺伝子組換え生物等を譲渡し、又は提供した者、国内管理人、遺伝子組換え生物等を輸出した者その関係者に対する立入検査等を実施し、立入検査等記録書を作成した。

この立入検査等記録書を被検査者又は被検査者の委任を受け当該検査に立ち会う者(以下「立会人等」という。)に閲覧させたところ、記載内容が事実と相違ない旨の申し出があったので、共に記名押印(氏名を自署する場合にあっては押印を省略できるものとする。)した。

平成 年 月 日

検査職員

検査機関名及び役職

検査職員氏名

印

立会人等

所属及び役職

氏 名

印

被検査者の氏名 (法人の場合は法人の名称 及び代表者の氏名)	
被検査者の住所 (法人の場合は主たる事務 所の所在地)	
被検査者の連絡先 (担当者の電話番号等)	
立入検査等を行った日	平成 年 月 日
立入検査等を行った場所	

備考

「被検査者の氏名」及び「被検査者の住所」については、被検査者と立会人が同一の場合は記載を省略できる。

検査検体の収去
収去した検体について
1. 種類の名称及び用途
2. 生産、輸出入及び流通の状況 (輸入日、生産日、輸入者、輸出者、生産者、原産国、生産地、集荷地、輸出港、その他インボイスまたは船荷証券番号等当該荷口(ロット)を特定することができる情報を記載。)
3. 荷姿・包装形態・在庫量・陸揚げ後の荷口の保管場所等
4. 収去した量及び収去の対象としたロットの量
5. 収去・縮分方法
6. 備考
業務に関する帳簿書類その他の検査
その他検査に関し参考となる事項

別記様式第2 (日本工業規格A4)

整理番号  
平成 年 月 日

見本採取票

殿

所属官署  
(機関)  
氏名 印

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第31条第1項の規定に基づき、検査のため収去したので通知する。

収去した貨物	品名・銘柄		数量	
積載船(機)名			入港年月日	
蔵置場所			収去年月日	
B/L No.			申告番号	
採取職員所属氏名		印		
見本処理区分	<input type="checkbox"/> 返却 <input type="checkbox"/> 保存 <input type="checkbox"/> 分析			
返却欄	申告者受取印		受取年月日	
備考				

(注) 1. 太線枠内は、税関以外の公務員が見本採取したときは記入を要しない。  
2. 本様式は、3片を1組とし、第1片を原本、第2片を通知用、第3片を倉主等用とする。

別記様式第3（日本工業規格A4）

整理番号 _____	
違反連絡票	
収去した生物の種類の名称	
収去した生物の用途	
品種、ロット番号	
収去した生物の輸出国又は地域（生産地）	
ロット数量	
輸入（生産）年月日	
輸出者	
被検査者の氏名及び住所	
収去日	
収去場所	
分析検査の結果	
分析検査日	
分析者	
<p>平成 年 月 日、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第31条第1項の規定に基づき収去した上記の生物等について、違反が認められましたので連絡します。</p> <p>平成 年 月 日</p> <p style="text-align: right;">分析検査実施機関名</p>	

備考

1. 被検査者の氏名及び住所の欄には、担当者の電話番号等を併せて記入すること。
2. 以下の書類の写しを添付すること。
  - ① 当該立入検査等に係る記録書
  - ② 当該分析試験に係る実験記録、データ等（再試験等も含めたもの）



整理番号 \_\_\_\_\_

### 分析検査結果連絡書

平成 年 月 日

検査機関の長 殿

分析機関の長

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第31条第1項の規定に基づき収去した生物等について、分析検査の結果を次のとおりお知らせします。

収去した生物の種類の名称	
収去した生物の用途	
品種、ロット番号	
収去した生物の輸出国又は地域（生産地）	
輸出者	
被検査者の氏名及び住所	
収去日	
収去場所	
分析検査の結果	
分析検査日	
分析者	

整理番号 \_\_\_\_\_

### 分析検査結果通知書

平成 年 月 日

被検査者 殿

検査機関の長 印

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第31条第1項の規定に基づき収去した生物等について、検査の結果を次のとおりお知らせします。

収去した生物の種類の名称	
収去した生物の用途	
品種、ロット番号	
収去した生物の輸出国又は地域（生産地）	
輸出者	
収去日	
収去場所	
分析検査の結果	

## 立入検査等結果報告書

平成 年 月 日

消費・安全局長 殿

分析機関の長

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第31条第1項の規定に基づき立入検査等を実施したので、その結果を別添のとおり報告します。

年 月 ~	年 月	検査実施分
立入検査等実施件数 (うち違反件数)		件( 件)

### 備考

別添として、別記様式第6-2により月別の一覧を添付すること。

別記様式第6-2 (日本工業規格A4)

平成 年 月 分 (分析機関名: )

整理番号	検査日	検査場所	被検査者	収去した生物の種類 の名称及び用途	輸出国又は地 域 (生産地)	分析検査の項目	分析検査の 結果	その他

備考

- 1 収去した検体ごとに一覧を作成すること。
- 2 「分析検査の項目」の欄には、分析の対象とした遺伝子組換え生物の名称を記載すること。
- 3 「分析検査の結果」の欄には、分析の対象とした遺伝子組換え生物の検出の有無または定量結果を記載すること。

(別添1-1)

## 栽培用種子における遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) の検査方法について

トウモロコシ種子について、ラテラルフロー法または定性PCR法で分析し、陽性と判定された場合は定性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う。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・組合わせ、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

検査に用いるトウモロコシ種子は、破砕粒や他の混入物を取り除いた完全粒とし、十分に洗浄・乾燥を行い、表面に他の付着物がないことを確認すること。

定性PCR法に用いる粉砕物は、0.5mmメッシュを通過したものをを用いることを推奨する。また、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉砕時の環境や使用器具の取扱いは十分に配慮すること。コンタミネーション対策は、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル (改訂第2版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

### 2. ラテラルフロー法

検査に用いるトウモロコシ種子数は2,400粒とし、テストキットの仕様によって、例えば800粒用キットの場合は3回に分け、600粒用キットの場合は4回に分けて試験を行う。市販のテストキットは、Strategic Diagnostics社 (SDI) 製<Trait>Bt9 Corn Grain 5-Minute Test Kit (Part# 7000012)、Neogen Corporation製Agri-Screen® Cry9C Strip Test (Part# 8003) またはこれらと同等の結果が得られるものをを用いる。以下に記述する方法は、キットの説明書に記載の方法と基本的に同一である。キットの仕様・手順等が変更された場合は、キットの説明書に従い分析を行うこと。なお、試験を行う場合には、水は特に断り書きがない限り、全て逆浸透膜精製したRO水または蒸留水を用いることを推奨する。

#### 2.1. <Trait>Bt9 Corn Grain 5-Minute Test Kit (Part# 7000012)

##### 2.1.1. 実験操作

採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒で800粒を採取し粉砕した後、粉砕物を500mL容量程度の口の広い蓋付きの容器に採り、試料の重量の1.25倍量の水を加えたのち、10~20秒間、試料が全て湿潤するまで良く振とうし、静置する。もしこの段階で上澄み液が生じなければ、さらに少量の水を加え、試料を良く振とうし、静置後上澄み液が生じたどうか観察する。数mL程度の上澄み液が生じるまで少量の水を加え同様の操作を行う。次に、試料の上澄み液0.5mLをキット付属の1.5mL容チューブに移し、そのチューブにTrait Bt9テストストリップを垂直に立てる。

### 2.1.2. 判定法

テストストリップをチューブに立てて静置し、5分経過した時点\*で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に2本現れれば陽性、コントロールライン1本のみが現れれば陰性と判定する。また、1本も現れなければ、その試験は無効とし、再試験を行う。1検体3回（計2,400粒）の試験のうち1回でも陽性のものがあつた場合、その検体を陽性と判定する。

\* 5分間以上経過すると赤色のラインが濃くなる場合があり、正しく判定することができないので、注意が必要である。

## 2.2. Agri-Screen® Cry9C Strip Test (Part# 8003)

### 2.2.1. 実験操作

採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒で800粒を採取し粉砕した後、粉砕物を500mL容量程度の口の広い蓋付きの容器に採り、水400±20mLを加えたのち、30～40秒間、試料が全て湿潤するまでよく振とうし、静置する。次に試料の上澄み液0.5mLをキット付属の1.5mL容チューブに移し、そのチューブにAgri-Screen® Cry9Cテストストリップを垂直に立てる。

### 2.2.2. 判定法

テストストリップをチューブに立てて静置し、10分経過した時点\*で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に2本現れれば陽性、コントロールライン1本のみが現れれば陰性と判定する。また、1本も現れなければ、その試験は無効とし、再試験を行う。1検体3回（計2,400粒）の試験のうち1回でも陽性のものがあつた場合、その検体を陽性と判定する。

\* 10分間以上経過すると赤色のラインが濃くなる場合があり、正しく判定することができないので注意が必要である。

## 3. 定性PCR法

定性PCR法は、抽出されたDNAの一部をプライマー対を用いてPCR増幅し、電気泳動法により、その増幅DNAを検知する方法である。

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。3.1.のDNA抽出精製法に従って、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、3.3.の条件で定性PCRを行う。1検体2回以上（計2,400粒）の検査のうち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。

\* PCRでは、鋳型DNAが微量存在しても増幅される。したがって、目的外のDNA（特にPCR増幅産物）の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNAは、人間の皮膚表面から分

泌されているDNA分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使い捨てのチューブ、チップ等を使用し、DNA、DNase等がコンタミネーションしないよう注意して用いること。また、定性PCRの際に用いる水は、特に断り書きがない限りすべて逆浸透膜精製したRO水又は蒸留水をMilli-Q等で17MΩ/cmまで精製した超純水をオートクレーブで121℃、15分間以上で滅菌したものなど、DNA、DNase等がコンタミネーションしていないものを用いること。

\* また、独立行政法人農林水産消費技術センター作成の「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル（改訂第2版）コンタミネーション防止編」も参考にし、コンタミネーション防止に細心の注意を払うこと。

### 3.1. DNA抽出精製

採取したトウモロコシ種子から無作為に完全粒2,400粒を採取し、3.に従い分割したそれぞれの検体を均質に粉碎して、それぞれから2回並行でDNAを抽出する。DNA抽出は、市販のDNA抽出キットを使用する方法、界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）を使用する方法等いくつかの方法があるが、界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）とフェノール/クロロホルム混合液を用いて抽出精製するCTAB法は、応用範囲が広い上、PCR阻害物質が残存しにくく、純度の高いDNAを得ることができる非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルムという有害試薬を用いること及び煩雑な精製操作が必要という欠点がある。一方、市販のDNA抽出キットを用いるとこれらの欠点を解消することができる。市販のDNA抽出キットには、シリカゲル膜タイプのもの、シリカベースのレジンタイプのもの、イオン交換樹脂タイプのもの、マグネット吸着ビーズタイプのものであるが、いずれの方法を利用しても、トウモロコシの種子からPCRに利用可能なDNAを抽出精製することができる。以上の点を考慮して、本項では、CTAB法、シリカゲル膜タイプのキット（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit、QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit 又は NIPPON GENE GM quicker）、シリカベースのレジンタイプのキット（Promega Wizard DNA Clean-up System）を用いたDNA抽出法を記す。

#### 3.1.1. CTAB法

均質に粉碎された試料2gをポリプロピレン製遠沈管（50mL容）に量り採り、CTAB緩衝液\*<sup>1</sup>15mLを入れ、ホモゲナイザーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の縁とホモゲナイザーの先を洗浄するようにCTAB緩衝液30mLを加え、転倒混和後55℃で30分間放置する。次いで放置液を攪拌し、均質化した溶液600μLをマイクロ遠沈管（1.5mL容）に量り採る。次いで500μLのフェノール/クロロホルム混合液\*<sup>2</sup>を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×gで15分間室温遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時中間層に触れないように注意する。クロロホルム/イソアミルアルコール混合液\*<sup>3</sup>500μLを加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500×gで15分間室温で遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロピルアルコール（室温）を加え、転倒混和後7,500×gで10分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。500μLの70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500×gで1分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2～3分間真空乾燥する。このとき完全に乾燥しないように注意する。50μLのTE緩衝液\*<sup>4</sup>を加えてよく混和後、室温に15分間放置して、時々転

倒混和して完全に溶かす。RNase A 5  $\mu$ Lを加え、37°Cで30分間放置する。200  $\mu$ LのCTAB緩衝液を加えた後、250  $\mu$ Lのクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7,500 $\times$ gで15分間室温遠心後、水層（上層）を新しいマイクロ遠沈管に移す。このとき、中間層に触れないように採取する。200  $\mu$ Lのイソプロピルアルコールを加え、転倒混和してから、7,500 $\times$ gで10分間、室温で遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、200  $\mu$ Lの70%エタノールを壁面から静かに加え、7,500 $\times$ gで1分間室温遠心し、沈殿に触れないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3分間真空乾燥する。このとき、完全に乾燥しないよう注意する。50  $\mu$ Lの水を加えて混合した後、15分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものをDNA試料原液とする。

\*1 CTAB緩衝液

ビーカーに、0.5mol/L EDTA (pH8.0) 8mL、1mol/L Tris-塩酸 (pH8.0) 20mL、5mol/L食塩水56mLを入れ、約150mLとなるように水を加え、攪拌しながらCTAB 4gを加えて完全に溶解する。さらに水を加え全量を200mLとし、オートクレーブで滅菌したものをCTAB緩衝液とする。

\*2 フェノール/クロロホルム混合液

1mol/L Tris-塩酸 (pH8.0) 飽和フェノールとクロロホルム/イソアミルアルコール混合液\*3を1:1 (v/v) で混合したものをフェノール/クロロホルム混合液とする。

\*3 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1 (v/v) で混合したものをクロロホルム/イソアミルアルコール混合液とする。

\*4 TE緩衝液

各最終濃度が10mmol/L Tris-塩酸 (pH8.0)、1mmol/L EDTA (pH8.0) となるように水を用いて調製したものをTE緩衝液とする。

3.1.2. シリカゲル膜タイプキット法① (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit を使用する方法)

均質に粉碎した試料2gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量り採り、あらかじめ65°Cに温めておいたAP1緩衝液\*1 10mLとRNase A 20  $\mu$ Lを加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで15分間加温する。その間2、3回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2緩衝液\*2 3,250  $\mu$ Lを加え、氷上に10分間静置した後、4,000 $\times$ g以上、4°Cの条件で20分間遠心する\*3。次いでその上清500  $\mu$ LをQIAshredder spin columnに負荷し、10,000 $\times$ g以上で4分間遠心後、溶出液を遠沈管 (15mL容) に移す。この操作を再度繰り返した後、その溶出液の1.5倍量のAP3緩衝液\*4・エタノール混液\*5を加える。その混合液500  $\mu$ Lをmini spin columnに負荷し、10,000 $\times$ g以上で1分間\*6遠心する。残りの混合液のうち、さらに500  $\mu$ Lを同じmini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いでAW緩衝液\*7 500  $\mu$ Lを負荷し、10,000 $\times$ g以上で1分間\*6遠心し、溶出液を捨てる。同様の操作を計3回繰り返す。溶出液を捨て、m1



mini spin columnを乾燥させるため、 $10,000\times g$ 以上で20分間遠心する。mini spin columnをキットの遠沈管に移し、あらかじめ $65^{\circ}\text{C}$ に温めておいた水 $70\mu\text{L}$ を加え、5分間静置した後、 $10,000\times g$ 以上で1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液とする。

\*1 AP1緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*2 AP2緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*3 遠心後の上清

上清を確認し、澄明でない場合には、同条件での遠心操作を再度繰り返し、以降の操作を行う。

\*4 AP3緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*5 AP3緩衝液・エタノール混液

AP3緩衝液\*4 とエタノール (96-100%) を1 : 2で混合したものをAP3緩衝液・エタノール混液とする。

\*6 遠心時間

mini spin columnに負荷する液の性状により、カラムの通過に時間がかかることがある。すべての液がカラムを通過するのに必要な遠心時間を適宜調整する。

\*7 AW緩衝液

使用する直前に、容器ラベルに記載された適量のエタノール (96-100%) を混合したものをAW緩衝液とする。

### 3.1.3. シリカゲル膜タイプキット法② (QIAGEN DNeasy Plant Maxi Kit を使用する方法)

均質に粉碎された試料1gを50mL容チューブに量り採り、あらかじめ $65^{\circ}\text{C}$ に温めておいたAP1緩衝液5mLと、RNase A (キット付属)  $10\mu\text{L}$ を加え、試料がチューブの底に残らなくなるまで転倒混和した後、試験管ミキサーで激しく混合し、 $65^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽内で1時間保温する。その間15分ごとに3回、試料を激しく転倒混和した後、試験管ミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌する。反応後のチューブにAP2緩衝液1.8mLを加え、試験管ミキサーを用いて10秒間最高速で攪拌後、氷中に15分間静置する。次にスイング式遠心分離器を使用し、 $3,000\times g$ で室温で15分間遠心分離する\*1。上清を4.2mL採取し\*2、QIAshredder spin column (lilac) に負荷し、 $3,000\times g$ で室温で5分

間遠心分離後、上清4 mLを新しい50 mL容チューブに移す\*<sup>2</sup>。このチューブを試験管ミキサーを用いて最高速で10秒間攪拌後、3.4 mLを採取し、新しい50 mL容チューブに移す。次いで、5.1 mLのAP3/Et-OH緩衝液を加え、試験管ミキサーを用いて最高速で10秒間攪拌後、溶液全量をDNeasy Spin Column (colorless) に負荷し、3,000×gで室温で5分間遠心分離する。遠心後、溶出液を廃棄し、カラムにAW緩衝液12 mLを負荷し、3,000×gで室温で15分間遠心分離する。その後、カラムをキット付属の50 mL容チューブに移し、あらかじめ65℃に温めておいた水1 mLを加え、5分間室温で静置後、3,000×gで室温で10分間遠心分離する。この溶出液の液量を量り、2 mL容のチューブに移し、溶出液と等量のイソプロパノールを添加する。このチューブを上下にゆっくり10回転倒混和後、5分間室温で静置する。その後、12,000×gで、4℃、15分間遠心分離後、上清を廃棄する。500 μLの70%エタノールを加えて沈殿物を洗浄後、再び12,000×gで、4℃、3分間遠心分離し、上清を廃棄する。沈殿物を乾燥させた後、50~100 μLのTE緩衝液\*<sup>3</sup>を加えて沈殿物を溶解し、DNA試料原液とする。

\*<sup>1</sup> 以下、カラムの遠心分離操作は、スイング式遠心分離器を使用する。

\*<sup>2</sup> 沈殿物や上層の膜を吸わないように注意する。

\*<sup>3</sup> 各最終濃度が10 mmol/L Tris-塩酸 (pH8.0)、1 mmol/L EDTA (pH8.0) となるように水を用いて調製したものをTE緩衝液とする。

### 3.1.4. シリカゲル膜タイプキット法③ (NIPPON GENE GM quickerを使用する方法)

均質に粉砕した試料1 gをポリプロピレン製遠沈管 (50 mL容) に量り採り、GE1 緩衝液\*<sup>1</sup> 6 mLとRNase A 20 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\*<sup>2</sup>、室温で10分間静置する。GE2 緩衝液\*<sup>3</sup> 750 μLを加え、10~12回転倒混和し\*<sup>4</sup>、氷上に10分間静置する。5,000×g以上、4℃の条件で10分間遠心\*<sup>5</sup>する。次いでその上清\*<sup>6</sup> 400 μLを1.5 mLチューブに移し、GB3 緩衝液 50 μL及びエタノール (100%) 200 μLを添加した後、10~12回転倒混和する\*<sup>7</sup>。混合液650 μL (全量)をspin columnに負荷した後、13,000×g以上、4℃の条件で30秒間遠心し、溶出液を捨てる。次いでGW緩衝液600 μLを負荷し、13,000×g以上、4℃の条件で1分間遠心し、溶出液を捨てる。spin columnを乾燥させるため、13,000×g以上、4℃の条件で3分間遠心する。spin columnを新たな1.5 mL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以上で1分間遠心し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

\*<sup>1</sup> GE1 緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE GM quicker) 付属のもの、あるいは別途購入したものをを用いる。

\*<sup>2</sup> 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50 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。

\*3 GE2緩衝液

シリカゲル膜タイプのキット (NIPPON GENE GM quicker) 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50mL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。また、上清は4mL程分取することが可能であり、4℃の条件であれば、数日は安定である。その後の試験にあわせ、DNAの再抽出・精製が必要となった場合には、本上清を用い、それ以降の操作を実施する。

\*7 GB3緩衝液を添加し、続いてエタ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。

### 3.1.5. シリカベースレジソタイプキット法

均質に粉砕した試料2gをポリプロピレン製遠沈管(50mL容)に量り採り、抽出用緩衝液\*<sup>1</sup>17.2mL、5mol/L グアニジン-塩酸2mL及び、20mg/mL Proteinase Kを0.8mL加え、激しくボルテックスミキサーで攪拌後、55~60℃で振とうしながら3時間保温する。次いで、室温まで温度を下げ、3,000×gで10分間遠心する。上清が濁っている場合、上清の一部をマイクロ遠沈管(1.5mL容)に移し、更に14,000×gで10分間遠心する。得られた澄明な上清500μLと、DNA Clean-up Resin 1mLをマイクロ遠沈管(1.5mL容)に採り、転倒混和し、混合液とする。次にmini columnの上部に注射筒を付け、マニホールド(吸引装置)\*<sup>2</sup>に装着する。マニホールドのコックが閉じていることを確認した後、混合液を注射筒からmini columnに負荷する。コックを開け、減圧吸引して溶液を完全に除去し、次いで2mLの80%イソプロピルアルコールを注射筒から加えカラムを洗浄する。注射筒を外したmini columnをマイクロ遠沈管(1.5mL容)に装着し、室温下10,000×gで2分間遠心し、カラムを乾燥する。次にmini columnを新しいマイクロ遠沈管(1.5mL容)に移し、あらかじめ65~70℃に温めておいた水50μLを滴下する。1分間放置後、室温下10,000×g以上で1分間遠心し、DNAを溶出し、得られた溶出液をDNA試料原液とする。

\*1 抽出用緩衝液

150mM 塩化ナトリウム、2mmol/L EDTA及び1% SDSを含む10mmol/L Tris-塩酸緩衝液(pH7.5)

\*2 吸引装置

吸引装置がない場合には、遠心等で同様の結果が得られる。

### 3.2. 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試料の適当量を取り、原液もしくは必要に応じてDNA溶液と同じ溶液で10～50倍希釈した希釈液について200～300nmの範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、230nm、260nm及び280nmの吸光度（O. D. 230、O. D. 260及びO. D. 280\*）を記録する。次いでO. D. 260が1のときのDNA濃度を50ng/μL DNAとして、DNA試料原液の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PCRに必要な濃度に水で希釈しDNA試料液とし、-20℃以下で冷凍保存する。冷凍保存したDNA試料液は、融解後直ちに使用する。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。

\* 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。

### 3.3. 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\*<sup>1</sup>、0.20mmol/L dNTP、3mmol/L 塩化マグネシウム、それぞれ0.2μmol/LのCBH351検出用プライマー対\*<sup>2</sup>並びに0.625units Taq DNAポリメラーゼ\*<sup>3</sup>を含む液に、10ng/μLに調製したDNA試料液2.5μL（DNAとして25ng）を氷中で加え、全量を25μLにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置\*<sup>4</sup>にセットする。反応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℃ 0.5分間、60℃ 0.5分間、72℃ 0.5分間を1サイクルとして、40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。

この際、必ず次の4つの対照を同時に調整することとする。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、CBH351検出用プライマー対の代わりに内在性遺伝子Zein検出用プライマー対\*<sup>5</sup>を用いて同様にPCR増幅を行ったもの、陽性対照として、DNA試料液の代わりに市販の陽性対照プラスミド\*<sup>6</sup>を用いて反応液を調整し、同様にPCR増幅を行ったもの、PCR反応のブランク反応液として、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、の4つである。ただし、内在性遺伝子Zein検出用プライマー対を用いた対照については、同時に実施した他系統の分析で確認している場合は操作を省いてもよい。

以上の結果、内在性遺伝子Zein検出用プライマー対、CBH351検出用プライマー対及び陽性対照で陽性で、かつ、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がともに陰性となった場合、CBH351確認用プライマー対\*<sup>7</sup>を用い、同様にPCR増幅を行う\*<sup>8</sup>。

#### \*<sup>1</sup> PCR緩衝液

PCR buffer II（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。

#### \*<sup>2</sup> CBH351検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (CaM03-5') : 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

R-primer (CBH02-3') : 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'

\*3 Taq DNAポリメラーゼ

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。

\*4 PCR増幅装置

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。

\*5 内在性遺伝子Zein検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

\*6 陽性対照プラスミド

ニッポンジーン社から公定法準拠試薬（PCR法）として販売されているもの又は同等の結果が得られるものを用いる。

\*7 CBH351確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Cry9C-5') : 5'-TAC TAC ATC GAC CGC ATC GA-3'

R-primer (35Ster-3') : 5'-CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA-3'

\*8 プライマーの精製グレード

ここで使用するプライマーの精製グレードは、全てHPLC精製グレードとする。

### 3.4. アガロースゲル電気泳動

PCR増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、PCR増幅バンドを確認する。

#### 3.4.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE緩衝液\*を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に、ゲルを50℃前後まで冷やした後、ゲルメーカーにゲルを流し込み、室温で十分に冷やし固めてゲルを作製する。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動するDNAの長さに応じて決める必要があるため、泳動する目的産物のバンド長にあわせてゲル濃度（1.0～4.0%）を決める。

\* TAE緩衝液

各最終濃度が40mmol/L Tris-酢酸、1mmol/L EDTAとなるように蒸留水を用いて調製したものをTAE緩衝液とする。

#### 3.4.2. 電気泳動

TAE緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR増幅反応液5.0～7.5μLと適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルのウェルに注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNAが拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100V定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含

まれるBPBがゲルの1/3から2/3まで進んだところで電気泳動を終了する。

#### 3.4.3. ゲルの染色

ゲルが浸る量のTAE緩衝液が入った容器に、泳動後のゲルを移し入れる。次に緩衝液100mL当たり、5  $\mu$ Lのエチジウムブロミド\*溶液（10mg/mL）を加え、容器を振とう器に乗せて軽く振とうしながら30分程度染色する。

#### \* エチジウムブロミド

2本鎖DNAの鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発ガン作用と毒性がある。取扱いには必ず手袋をはめ、マスクを着用すること。

#### 3.4.4. ゲルイメージ解析

ゲルイメージ解析装置内のステージに食品包装用ラップ\*を置き、その上に電気泳動と染色が終了したゲルをのせて紫外線（312nm）を照射する。ゲルイメージ解析装置の画面で電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標準と比較して目的のバンドの有無を判定する。ブランク反応液で対応するPCR増幅バンドが検知された場合は、DNA抽出操作以降の結果を無効として、改めて実験をやり直す。泳動結果は画像データとして保存しておく。

#### \* 食品包装用ラップ

ポリ塩化ビニリデン製のフィルムでないと紫外線は吸収されてしまい、像が得られない場合があるので注意を要する。

#### 3.5. 結果の判定

最初に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でPCR増幅バンドが検出されていないことを確認する。このどちらかにPCR増幅バンドが確認された場合は、実験中に汚染が起きたと判断されるため、実験をやり直すこととする。また、陽性対照プラスミドを加えたものでPCR増幅バンドが確認されない場合もPCR増幅反応が適切に行われていないと判断されるため、実験をやり直すこととする。

内在性遺伝子Zein検出用プライマー対を用いたレーンで157bpのPCR増幅バンドが検出され、CBH351検出用プライマー対を用いたレーンで170bpのPCR増幅バンドが検出された場合、新たに同一のDNA試料液を用いPCR反応液を調製し、確認用プライマー対を用いPCR増幅を行う。得られた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、171bpのPCR増幅バンドが検知された場合、本検体はCBH351陽性と判定する。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DNA抽出液においてZein検出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DNA抽出液での結果を無効とし、もう一方のDNA抽出液の結果だけで判定する。2つのDNA抽出液ともZein検出用プライマー対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Zein検出用プライマー対でPCR増幅バンドが検出されないときは、本試料からの未承認の種子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

		使用したプライマー対	試料番号											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A (1, 200粒)	DNA 抽出液 1	内在性遺伝子Zeln検出用プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		検出用プライマー	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
		確認用プライマー	+	+	+	+	-	/	-	/	-	/	/	/
	DNA 抽出液 2	内在性遺伝子Zeln検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/
B (1, 200粒)	DNA 抽出液 1	内在性遺伝子Zeln検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	-	/	/	/	/	/
	DNA 抽出液 2	内在性遺伝子Zeln検出用プライマー	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
		検出用プライマー	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
		確認用プライマー	+	-	/	/	-	/	/	/	/	/	/	/
判定			陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	※1	※1	※2	

+は陽性、-は陰性、/は検査不要を表す。

※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1-2)

## 栽培用種子における遺伝子組換えトウモロコシ (Bt10) の検査方法について

トウモロコシ種子について、定性PCR法で分析し、陽性と判定された場合は、再度、定性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う。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. 定性PCR法

#### 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 DNeasy Plant Mini Kit を使用する) により抽出したDNA試料液を用いる。

#### 2.2. 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<sup>\*1</sup>、0.16mmol/L dNTP、1.5mmol/L 塩化マグネシウム、それぞれ0.6μmol/L のBt10検出用プライマー対<sup>\*2</sup>並びに0.8units Taq DNA ポリメラーゼ<sup>\*3</sup>を含む液に、10ng/μL に調製したDNA試料液5.0μL (DNAとして50ng) を氷中で加え、全量を25μLにする。次に、その反応試料管をPCR増幅装置<sup>\*4</sup>にセットする。反応条件は次のとおりである。94℃に10分間保ち反応を開始させた後、94℃ 25秒間、62℃ 30秒間、72℃ 45秒間を1サイクルとして、40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。

この際、必ず次の4つの対照を同時に調整することとする。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、Bt10検出用プライマー対の代わりに内在性遺伝子Zein検出用プライマー対<sup>\*5</sup>を用いて同様にPCR増幅を行ったもの、陽性対照として、DNA試料液の代わりに市販の陽性対照プラスミド<sup>\*6</sup>を用いた反応液を調整し、同様にPCR増幅を行ったもの、PCR反応のブランク反応液として、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、の4つである。ただし、内在性遺伝子Zein検出用プライマー対を用いた対照については、同時に実施した他系統の分析で確認している場合は操作を省いてもよい。

以上の結果、内在性遺伝子Zein検出用プライマー対及びBt10検出用プライマー対で陽性で、かつ、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がともに陰性となった場合、Bt10確認用プライマー対<sup>\*7</sup>を用いPCR増幅<sup>\*8</sup>を行う<sup>\*9</sup>。

#### \*1 PCR 緩衝液

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。

\*<sup>2</sup> Bt10 検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (JSF5) : 5'-CAC ACA GGA GAT TAT TAT AGG GTT ACT CA-3'

R-primer (JSR5) : 5'-ACA CGG AAA TGT TGA ATA CTC ATA CTC T-3'

\*<sup>3</sup> Taq DNA ポリメラーゼ

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。

\*<sup>4</sup> PCR 増幅装置

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。

\*<sup>5</sup> 内在性遺伝子Zein検出用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Zein n-5') : 5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'

R-primer (Zein n-3') : 5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'

\*<sup>6</sup> 陽性対照プラスミド

ニッポンジーン社から公定法準拠試薬 (PCR法) として販売されているもの又は同等の結果が得られるものを用いる。

\*<sup>7</sup> Bt10確認用プライマー対は以下の通りである。

F-primer (Bt10LS-5') : 5'-GCC ACA ACA CCC TCA ACC TCA-3'

R-primer (Bt10LS-3') : 5'-GAA GTC GTT GCT CTG AAG AAC AT-3'

\*<sup>8</sup> Bt10確認用プライマー対を用いる場合のPCR条件は以下のとおり。

94℃に10分間保ち反応を開始させた後、94℃ 25秒間、65℃ 30秒間、72℃ 45秒間を1サイクルとして、40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。

\*<sup>9</sup> プライマーの精製グレード

ここで使用するプライマーの精製グレードは、全てHPLC精製グレードとする。

### 2.3. アガロースゲル電気泳動

PCR増幅反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、DNA増幅バンドを確認する。

アガロースゲルの作成、電気泳動、ゲルの染色及びゲルイメージ解析については、別添1-1の3.4.1.~3.4.4.の方法に従って行う。

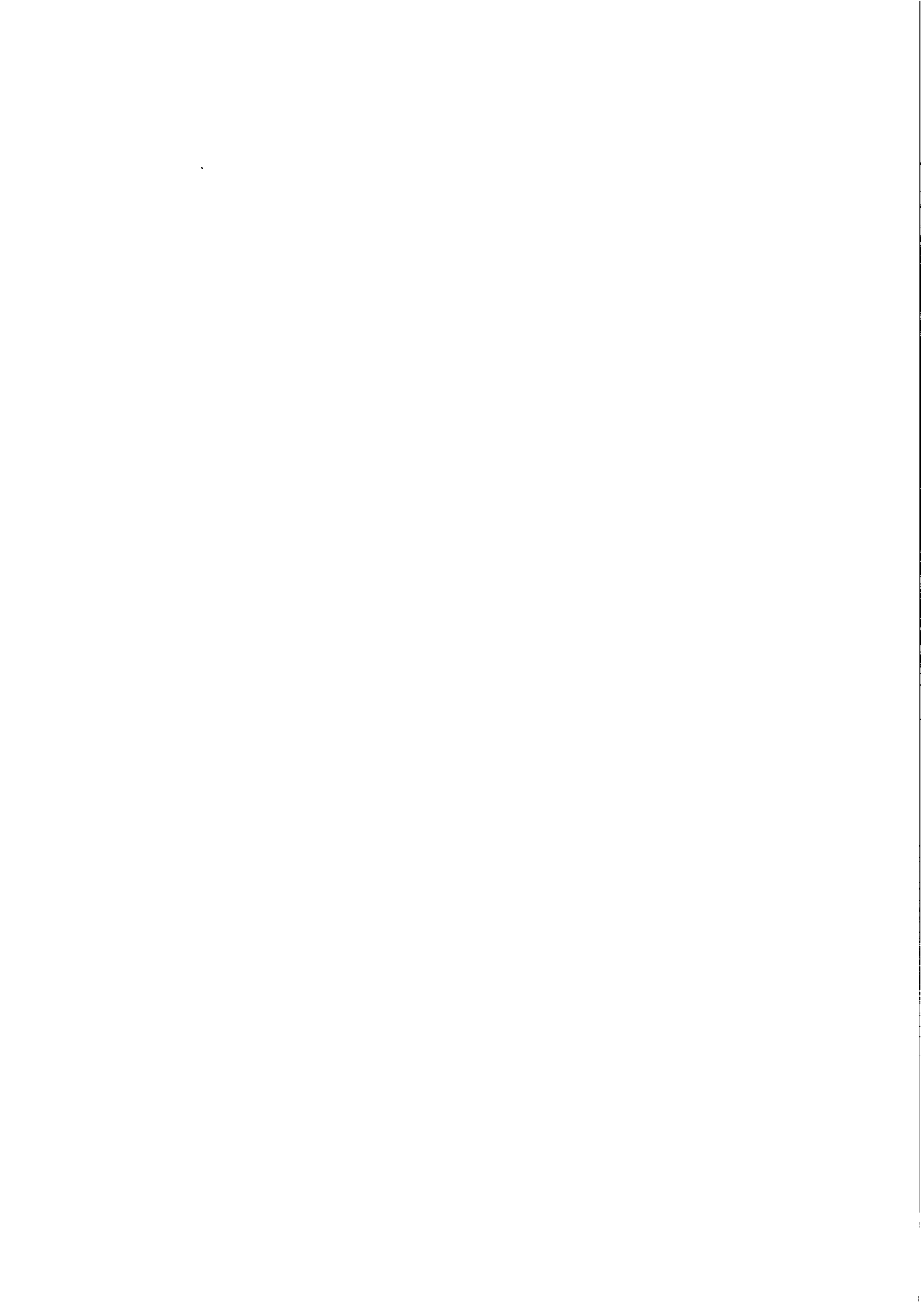
### 3. 結果の判定

最初に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でPCR増幅バンドが検出されていないことを確認する。このどちらかにPCR増幅バンドが確認された場合は、実験中に汚染が起きたと判断されるため、実験をやり直すことにする。また、陽性対照プラスミドを加えたものでPCR増幅バンドが確認されない場合もPCR増幅反応が適切に行われていないと判断されるため、実験をやり直すこととする。

内在性遺伝子Zein検出用プライマー対を用いたレーンで157bpのPCR増幅バンドが検出され\*<sup>1</sup>、Bt10検出用プライマー対を用いたレーンで117bpのPCR増幅バンドが検出された場合、新たに同一のDNA試料液を用いPCR反応液を調製し、Bt10確認用プライマー対を用いPCR増幅を行う。得られた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、151bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検体はBt10陽性と判定する\*<sup>2</sup>。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DNA抽出液において、Zein検出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DNA抽出液での結果を無効とし、もう一方のDNA抽出液の結果だけで判定する。2つのDNA抽出液ともZein検出用プライマー対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Zein検出用プライマー対でPCR増幅バンドが検出されないときは、本試料からの未承認の種子の検知は不能とする。

判定例は別添1-1の3.5.を参照のこと。



(別添1-3)

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 DNeasy Plant Mini Kit を使用する)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 (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を標的とするプライマー対SSIIb-3とプローブSSIIb-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  $\mu$ 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<sup>\*1</sup> 12.5  $\mu$ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、10  $\mu$ mol/L）1.0  $\mu$ L<sup>\*2</sup>、対象プローブ溶液（10  $\mu$ mol/L）0.5  $\mu$ Lを混合し、水で全量20  $\mu$ Lに調製後、10ng/ $\mu$ L DNA試料液 5.0  $\mu$ L（50ng）を添加する<sup>\*3</sup>。分注操作終了後、シール<sup>\*4</sup>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ーターを用いて行う。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<sup>\*5</sup>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  $\mu$ mol/L）を用いる場合には0.5  $\mu$ Lを加えること。

<sup>\*3</sup>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（「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。

## 2.5 PCR

装置にプレートを設定し、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分間加温し、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 PRISM™7500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値が得られるか否かを解析する。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

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

## 立入検査等に係る作業管理等要領

### 1 目的

この要領は、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。）第31条第1項及び第32条第1項の規定に基づく立入検査等（以下「検査等」という。）を実施する機関における検査等に係る作業の管理等について細則を定め、検査等の信頼性を確保することを目的とする。

### 2 組織

- (1) 検査機関（支所及び出張所を含まない。）及び分析機関の長は、立入検査等に係る作業書の作成及び管理、検査業務全般の管理を行う者（以下「検査責任者」という。）をあらかじめ指名し、当該業務を行わせること。
- (2) 検査機関（支所及び出張所を含まない。）及び分析機関の長は、検査責任者の業務が適切に遂行されているかを確認すること。

### 3 機械器具の管理

- (1) 検査責任者は、機械器具の管理に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全管理課長が定めるところにより機械器具保守管理標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、機械器具保守管理標準作業書の作成又は改定については、別添の1及び2に留意すること。
- (2) 検査責任者は、機械器具保守管理標準作業書に従い、個別の機械器具について管理を担当する検査員を定め、次の事項の確認を行うこと。
  - ① 機械器具について、常時行うべき保守点検（計器にあつては、校正を含む。）及び定期的な保守点検を実施し、不備を発見した場合にあつては、必要な整備又は修理を行い、その記録を作成し保存すること。
  - ② 機械器具について、検査の方法に最も適したものを使用し、使用後は直ちに洗浄、消毒、滅菌、清掃等を行い、適切に乾燥、保管、廃棄等を行うこと。

### 4 試薬等の管理

- (1) 検査責任者は、試薬、試液、標準品、標準液等（以下「試薬等」という。）の管理に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全管理課長が定めるところにより試薬等管理標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、試薬等管理標準作業書の作成及び改定については、別添の1及び3に留意すること。
- (2) 検査責任者は、試薬等管理標準作業書に従い、試薬等について管理を担当する検査員を定め、次の事項の確認を行うこと。
  - ① 試薬、試液及び標準液については、その容器に名称、純度又は濃度、保存方法、調製年月日、使用期限等を表示し、適切に保存すること。

また、変質したもの、使用期限を経過したものを使用しないこと。

- ② 標準品については、その容器に名称、純度又は濃度、保存方法、入手源、入手年月日、使用期限のほか、必要に応じ製造年月日等を表示すること。

また、変質を防止するために適切な条件下に保存し、適切なものを検査に使用すること。

- ③ 試薬等を調製した場合は、その記録を作成し保存すること。

## 5 有毒な又は有害な物質及び危険物の管理

- (1) 検査責任者は、毒物、劇物、高圧ガスその他の有毒、有害物質及び危険物の保管、設置等について関係法令を遵守して適切に管理すること。
- (2) 検査責任者は、検体、試薬、試液等検査に用いられる全てのものに係る廃棄物について安全かつ衛生的に管理すること。

## 6 検体の取扱いの管理

- (1) 検査責任者は、検体の取扱いの管理に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全管理課長が定めるところにより検体取扱標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、検体取扱標準作業書の作成及び改定については、別添の1及び4に留意すること。
- (2) 検体を採取する検査員は、次の事項を遵守すること。
  - ① 検査対象生物等を代表するよう採取すること。
  - ② ロットによる区分けが必要な場合は、ロットを混同しないよう採取すること。
  - ③ 他物の混入及び汚染がないよう採取すること。
  - ④ 採取量、採取目的、採取年月日、採取者等その他必要な事項の記録を保存すること。
  - ⑤ 検体を入れる容器は、検体の種類、形状及び検査の目的に適したものであって、搬送、洗浄及び滅菌が容易なものをを用いること。
- (3) 検体を搬送する者は、次の事項を遵守すること。
  - ① 他物の混入及び汚染がないよう搬送すること。
  - ② 検査に支障を及ぼさないように保存すること。
  - ③ 検体の搬送条件及び保存条件を適切な方法を用いて確認すること。
  - ④ 運搬業者等に検体の搬送を委託する場合は、上記①～③の条件に合う方法で搬送されることを確認するとともに、搬送中に開梱等が行われないように封印等を用いて梱包を行うこと。
- (4) 検体を受領する者は、次の事項を確認するとともに、その記録を作成し保存すること。
  - ① 検査記録書等の関連書類の記載事項と検体に同一性があること。
  - ② 検体の状態が検査の目的に適切であること。
  - ③ 検体の量が検査に十分な量であること。
  - ④ 検体の搬送が(3)の要件を満たす形で適正に行われていること。
- (5) 検査責任者は、検体の取扱いについて次の事項が遵守されていることを確認するこ

と。

- ① 検体の保管に当たっては、検体を保管する容器ごとに検体番号(検体の識別に用いる記号又は番号をいう。以下同じ。)等を表示するとともに、期限表示がされているものについてはその年月日、特定の保存条件が必要なものについてはその条件をそれぞれ表示すること。
- ② 検体が温度、湿度、害虫等により変質しないように適切な設備に保存すること。
- ③ 検体の分割及び検査機関の事業所内の検体の移動に当たっては、汚染や品質低下のおそれがない方法で行い、検体番号等必要な表示を行うとともに、検体の分割又は移動の年月日その他必要な事項を検体ごとに記録し保存すること。
- ④ 検体の輸送、運搬及び保管に当たって、検体の取り違い、紛失等を防ぐため、必要に応じて関連書類との照合、関連書類の確認等を行うこと。

## 7 検査の操作等の管理

- (1) 検査の方法は、当該検査項目に関する関係通知等で定められた方法とすること。
- (2) 検査責任者は、検査の実施に当たっては、別表に定める項目につき、別に農産安全課長が定めるところにより検査実施標準作業書を作成の上、適切な管理を実施すること。なお、検査実施標準作業書の作成及び改定については、別添の1及び5に留意するとともに、具体的な操作の手順の設定に当たっては、最新の知見を踏まえて行うこと。

また、同一の検査項目であっても、検体の種類ごとに操作手順等が異なる場合には、当該検体の種類ごとに作成すること。

## 8 検査の結果の処理

- (1) 検査員は、検査終了後、その内容が検査の目的を十分に満たしたものであることを点検の上、必要な事項を検査結果表(以下「結果表」という。)に記入すること。
- (2) 検査員は、結果表にデータ、標本等を添えて、検査責任者に提出すること。
- (3) 検査責任者は、結果表等の提出を受け、次の事項を確認すること。
  - ① 検査員の氏名
  - ② 検査の実施の方法
  - ③ データ
  - ④ 結果を算出した根拠(結果を算出するための計算方法を含む。)
  - ⑤ 検出限界又は定量限界
  - ⑥ 標準作業書からの逸脱とその検査結果への影響
  - ⑦ 過去に実施された類似の検査結果との関係
  - ⑧ 検査中の予期し得なかった事項とその検査結果への影響
  - ⑨ その他の必要な事項
- (4) 検査責任者は、確認終了後、検査の結果に疑義がないと認める場合には、結果表に検査が完了した旨とともに検査終了年月日及び検査の結果を確認した旨を記入し、検査結果通知書を作成する者に回付すること。
- (5) 検査責任者は、確認終了後、検査の結果に疑義があると認める場合には、他の検査

員に再検査を行わせる等必要な措置を講じること。この場合において、検査責任者は、その経過を詳細に記録し保存すること。

(6) 検査責任者は、検査の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある事態について、その内容及び講じられた改善措置を記録し保存すること。

(7) 検査責任者は、検査の過程で得られた標本を保存すること。

ただし、その状態を維持することが困難な場合には、この限りでない。

## 9 検査結果通知書

(1) 検査結果通知書は、別途定めている場合を除き、次の事項を記載し、検体ごとに作成すること。

① 検査年月日（検体を採取した日と分析試験を行った日が異なる場合はその両方を記載する。）

② 被検査者の氏名及び住所（法人にあっては、その氏名及び主たる事務所の所在地。）

③ 検査命令書の発行年月日及び番号（法第17条第1項の生物検査の場合に限る。）

④ 検査対象生物等の名称並びに数量及び重量

⑤ 検査対象生物等の生産地

⑥ 検査対象生物等の輸入届出年月日（法第17条第1項の生物検査の場合に限る。）

⑦ 検査対象生物等の本邦への到着年月日（検査対象生物等が本邦へ輸入されるものである場合に限る。）

⑧ 検体の数量及び重量

⑨ 検査項目

⑩ 検査の方法（出典及び根拠を含む。）

⑪ 検査結果（検出限界又は定量下限の記載を含む。）

⑫ 検査結果通知書の作成又は発行年月日並びに番号

⑬ 検査実施施設の名称及び所在地

⑭ 本通知書に関する連絡担当者の氏名

⑮ その他

(2) 分析機関の長は、検査結果通知書が適正に作成されていることを確認し、発行について承認すること。

## 10 検体の保存

検査に用いた検体については、その一部を当該検査に係る検査結果通知書の発行後少なくとも3か月間（可能な場合は1年間）、適切な条件の下に保存すること。ただし、その状態を維持することが困難な場合にあってはこの限りでない。

## 11 内部点検

(1) 検査責任者は、検査の業務の管理に関する内部点検の方法を記載した文書に基づき内部点検を行い、又はあらかじめ指定した者に行わせ、次の事項を含む記録を作成し保存すること。

① 点検を行った年月日

- ② 点検項目
- ③ 点検結果
- ④ 必要な改善措置又は指導の内容
- ⑤ 確認を行った改善措置又は指導の内容及びその年月日

## 1.2 精度管理

- (1) 検査責任者は、検査員の技能について、次の事項の評価を定期的に行うこと。
  - ① 通常の検体を用いて、定められた方法により検査結果の再現性を維持できる技能
  - ② 添加量が明らかな検体を用いて、定められた方法により検査する技能
  - ③ 真値を伏せた特別な検体を用いて、定められた方法により検査する技能
- (2) (1) を行うに当たって、検査責任者は、①から③の評価及び必要に応じこれに基づく改善措置を記録すること。
- (3) 検査機関の長及び分析機関の長は、精度管理が適切に行われているか確認するとともに、必要に応じて検査責任者に対し改善等を指示すること。

## 1.3 外部精度管理調査

- (1) 検査責任者は、外部精度管理調査について、外部機関が実施している精度管理プログラム等（GIPSA、CSL、ISTA等）を活用し、その定期的な参加計画を作成すること。
- (2) 検査責任者は、外部精度管理調査の結果をとりまとめ、改善措置が必要な場合には、その内容を記録し保存すること。
- (3) 分析機関の長は、外部精度管理調査が適切に行われているか確認するとともに、必要に応じて検査責任者に対し改善等を指示すること。

## 1.4 データの作成

- (1) 検査中に得られるデータの作成は、次により行うこと。
  - ① 読み易く、かつ、容易に消すことのできない方法で作成すること。
  - ② 作成の年月日を記載し、検査員等の署名又は捺印を行うこと。
- (2) データの内容を変更する場合にあつては、変更前の内容を不明瞭にしない方法で行うとともに、変更の理由及び年月日を記入し、変更者の署名又は捺印を行うこと。
- (3) コンピュータ等により直接データの作成を行い、保存する場合にあつては、次の事項を確認すること。
  - ① 作成されたデータの保存、管理の方法が規定されていること。
  - ② データの処理、記録、伝送、保存等の完全性並びに機密保持等に関して、データ保護のための手順が確立されていること。
  - ③ 使用するソフトウェアが十分な信頼性を有すること。
  - ④ コンピュータその他の設備が適切な方法で保守管理されていること。
  - ⑤ 電磁的記録のバックアップ及び保護の手順並びに記録への無許可のアクセス又は修正を防止する手順が確立されていること。
  - ⑥ データの内容を変更する場合にあつては、変更前のデータを残すとともに、変更者の氏名、年月日、変更理由を明確にすること。

### 15 検体、データ等の保存

(1) 検体及びデータ、記録、報告書の控え等(以下「データ等」という。)は、適切な設備に保存すること。

なお、検体、データ等を別々の施設に保存する場合は、データ等を保存する施設において、検体、データ等の保存場所を確認可能とすること。

(2) 検査責任者は、データ等の保存に際し担当者を定め、索引を付ける等、検索に便利な方法で整理するとともに、データ等の損傷又は品質の変化を最小限にとどめるよう適切に措置すること。

(3) データ等の保存期間は、次表のとおりとすること。

事項	保存期間
洗淨剤、害虫駆除及び消毒剤の使用に関する記録 機械器具の保守管理に関する記録 試薬等の管理に関する記録 検体の管理に関する記録 検査に関する記録 検査結果表 検査結果に疑義のある場合に講じられた措置の記録 検査の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある事態の内容とその改善措置に関する記録 内部点検の内容、結果及び指導とそれに対して講じられた改善措置に関する記録 精度管理の内容及び結果並びにこれに基づく改善措置に関する記録 外部精度管理調査の内容及び結果並びにこれに基づく改善措置に関する記録	3年間

別表

作成すべき標準作業書の種類	記載すべき事項
機械器具保守管理標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 機械器具の名称</li> <li>2 常時行うべき保守点検（計器にあっては、校正を含む。）の方法</li> <li>3 定期的な保守点検に関する計画</li> <li>4 故障が起こった場合の対応（測定中に故障が起こった場合にあっては、検体の取扱いを含む。）の方法</li> <li>5 機械器具の保守管理に関する記録の作成要領</li> <li>6 作成及び改定年月日</li> </ol>
試薬等管理標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 試薬、試液、標準品及び標準液（以下「試薬等」という。）の容器にすべき表示の方法</li> <li>2 試薬等の管理に関する注意事項</li> <li>3 試薬等の管理に関する記録の作成要領</li> <li>4 作成及び改定年月日</li> </ol>
検体取扱標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 検体の採取、搬送及び受領に当たっての注意事項</li> <li>2 検体の管理の方法</li> <li>3 検体の管理に関する記録の作成要領</li> <li>4 作成及び改定年月日</li> </ol>
検査実施標準作業書	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 検体の種類</li> <li>2 検査の実施の方法（検査法の名称、検査の具体的な手順等）</li> <li>3 試薬等の選択及び調製の方法</li> <li>4 試料の調製の方法</li> <li>5 検査に用いる機械器具の操作の方法（機械器具の選択または使用に関する注意事項、機械器具の洗浄の方法を含む）</li> <li>6 検査に当たっての注意事項（試料等の処理または反応条件、試料採取後の検体又は試料溶液残部の保存方法等）</li> <li>7 検査によって得られた値の処理の方法</li> <li>8 検査に関する記録の作成要領</li> <li>9 作成及び改定年月日</li> </ol>

(別添)

## 標準作業書の作成又は改定に当たり留意する事項

### 1 一般的事項

- (1) 標準作業書の作成に当たっては、それが実行可能であることを確認し、その記録を保存すること。
- (2) 標準作業書は、使用者に周知され、いつでも使用できるようそれぞれ適切な場所に備え付けられていること。
- (3) 検査に対しての継続的な適切さと適合性を確実にするため、標準作業書の定期的な見直しを行い、必要に応じて改定すること。
- (4) 標準作業書の作成及び改定ごとにその年月日及び理由を明記すること。また、これを管理するためのリスト(改廃履歴)を作成すること。
- (5) 標準作業書の改定が行われた場合には、旧文書の誤使用を防止するため、旧文書を速やかに撤去する等の措置を講じること。

### 2 機械器具保守管理標準作業書の作成に当たっては、次の点に留意すること。

- (1) 「常時行うべき保守点検(計器にあつては、校正を含む。)の方法」として、次の事項が含まれていること。
  - ① 計器の校正方法、校正頻度及び校正項目
  - ② 機械器具の使用開始時及び使用時の保守点検の方法
  - ③ 機械器具の使用終了後の保守点検(洗浄、乾燥、滅菌、保管、廃棄等)の方法
- (2) 「定期的な保守点検に関する計画」として、各機器ごとに保守点検の日時、保守点検を行う者の氏名等を記載した計画表が作成されていること。
- (3) 「故障が起こった場合の対応(測定中に故障が起こった場合にあつては、検体の取扱いを含む。)の方法」として、次の事項が含まれていること。
  - ① 機械器具に故障が起こった場合の修理の方法及び修理業者の連絡先
  - ② 故障時において検査していた検体の取扱いの方法
- (4) 「機械器具の保守管理に関する記録の作成要領」として、帳簿への次の記載事項が含まれていること。
  - ① 機械器具の名称
  - ② 保守点検の日時
  - ③ 保守点検を行った者(修理を行う業者等を含む。)の氏名
  - ④ 保守点検の結果
  - ⑤ 整備、修理等の日時、実施者及びその内容

### 3 試薬等管理標準作業書の作成に当たっては、次に留意すること。

- (1) 「試薬、試液、標準品及び標準液(以下「試薬等」という。)の容器にすべき表示の方法」として、次の事項を適切に表示できる方法が含まれていること。
  - ① 入手年月日、調製年月日又は開封年月日



- ② 入手源
- ③ 調製を行った者の氏名
- ④ 名称
- ⑤ ロット番号(ロットを構成しない試薬等については、製造番号)
- ⑥ 純度又は濃度
- ⑦ 保存方法(常温、冷蔵及び冷凍の別等)
- ⑧ 使用期限

(2) 「試薬等の管理に関する注意事項」として、試薬等の保存の方法その他試薬等の管理を行う上で注意すべき具体的事項が含まれていること。

(3) 「試薬等の管理に関する記録の作成要領」には、次の帳簿への記載事項のうち必要なものが含まれていること。

- ① 入手年月日及び調製年月日
- ② 入手源
- ③ 名称
- ④ ロット番号
- ⑤ 純度又は濃度
- ⑥ 保存方法
- ⑦ 試薬等の調製の記録
- ⑧ 試薬等を使用した量、年月日、検査員の氏名

4 検体取扱標準作業書の作成に当たっては、次の事項に留意すること。

(1) 「検体の採取、搬送及び受領に当たっての注意事項」として、次の事項が含まれていること。

① 検体の採取に際し輸入届出書等に基づき確認すべき事項

- ア 検査対象生物等の名称
- イ 検査対象生物等の数量及びロット
- ウ 検体の採取、保存及び搬送の方法について必要な事項
- エ 検体の採取量
- オ 検体の採取日又は予定日
- カ 検査の目的
- キ 検査方法
- ク 被検査者の名称、所在地等
- ケ その他検査の実施に必要な事項

② 検体の採取に際し留意すべき事項

③ 検体の容器の条件について必要な事項

④ 検体の搬送に際し留意すべき事項

⑤ 検体の受領に際し確認すべき事項

- ア 輸入生物等に関する記載事項と検体の同一性があること。
- イ 検体の状態が検査の目的に適切であること。
- ウ 検体の量が検査に十分な量であること。

エ 検体の搬送が前記④の事項について適正に取り扱われていること。

(2) 「検体の管理の方法」としては、次の事項が含まれていること。

- ① 受領した検体の表示の方法
- ② 検体の保存の方法及び期間
- ③ 検体の分割の方法
- ④ 検査機関又は施設内における検体の移動及び確認の方法

(3) 「検体の管理に関する記録の作成要領」には、次の帳簿への記載事項が含まれていること。

① 検体の採取の記録

- ア 採取量
- イ 採取年月日
- ウ 採取を行った者の氏名
- エ 検体の外観における異常の有無
- オ 検体の包装における表示事項
- カ 採取の方法
- キ 検体の保存の状態

② 検体の受領の記録

- ア 輸入届出書等の記載事項と検体が合致している旨の確認
- イ 検体の状態が検査の目的に相当である旨の確認
- ウ 検体の量が検査に十分なものである旨の確認
- エ 上記アからウに定めるほか、検体の採取及び搬送に際し留意すべき事項が遵守されている旨の確認
- オ 受領年月日及び検体番号

③ その他の検体の管理の記録

- ア 検体の保存の記録
- イ 検体の分割の記録
- ウ 検査機関又は施設内における移動の記録

5 検査実施標準作業書の作成に当たっては、次に留意すること。

(1) 次の事項に関する記載が含まれていること。

- ① 検体の種類
- ② 検査の実施の方法(検査法の名称、検査の具体的な手順等)
- ③ 試薬等の選択及び調製の方法
  - ア 試薬及び試液の調製の方法
  - イ 標準品の選択及び標準液の調製の方法
  - ウ その他試薬等の選択又は使用に関する注意事項
- ④ 試料の調製の方法
  - ア 試料採取の方法(採取量を含む。)
  - イ 前処理の方法
  - ウ 試料溶液の調製の方法

- ⑤ 検査に用いる機械器具の操作の方法(機械器具の選択又は使用に関する注意事項、機械器具の洗浄の方法等を含む。)
- ⑥ 検査に当たっての注意事項(試料等の処理又は反応条件、試料採取後の試験品又は試料溶液残部の保存方法等)
- ⑦ 検査によって得られた値の処理の方法
  - ア 結果を算出するための計算方法(回収率を算出するための計算方法を含む。)
  - イ 結果の評価方法(検出限界又は定量限界等の設定、空試験又は対照試験との関係を含む。)

(2)「検査に関する記録の作成要領」には、次の帳簿への記載事項が含まれていること。

ただし、⑧から⑰までの事項については、帳簿とは別にデータ等としてその記録を保存する場合には内容を確認した旨の記載で差し支えないこと。

- ① 検査を受けた者の氏名及び住所(法人の場合は、その名称及び所在地)
- ② 検査を行った年月日
- ③ 検査を行った生物等の名称
- ④ 検査を行った検体の数量
- ⑤ 検査を実施した検査員の氏名
- ⑥ 検体番号
- ⑦ 検査の方法の名称、具体的な手順等
- ⑧ 試薬等の選択又は使用の記録
- ⑨ 標準品の選択及び標準液の調製の記録
- ⑩ 試料採取の記録
- ⑪ 前処理の記録
- ⑫ 試料溶液の調製の記録
- ⑬ 機械器具の選択、使用、洗浄等の記録
- ⑭ 結果を算出するための計算の記録
- ⑮ 結果の評価の記録
- ⑯ 検査実施中の異常及びその対応に関する記録(データの記録及び保管を含む。)
- ⑰ 検査の結果

