

生食発 0831 第 5 号

平成 29 年 8 月 31 日

各

都道府県知事 保健所設置市長 特別区長

 殿

厚生労働省大臣官房
生活衛生・食品安全審議官
(公 印 省 略)

安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法の一部改正について

安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法については、「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」（平成 24 年 11 月 16 日付け食安発 1116 第 3 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）により通知しているところです。

今般、国立医薬品食品衛生研究所における検討を踏まえ、当該通知の別添「安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法」について、「遺伝子組換えさけ (AquAdvantage)」の検体採取及び検査方法を新たに定め、別紙のとおり改正しましたので、その取扱いに遺漏のないようお願いいたします。

【照会先】

厚生労働省 医薬・生活衛生局
食品監視安全課 化学物質係
TEL : 03(5253)1111 (内線 4242)
FAX : 03(3503)7964

(参考)

(別添)

安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法

目次

I. 検体採取方法

II. 個別検査方法

- ・ 亜麻 (FP967) の検査方法
- ・ コムギ (MON71800) の検査方法
- ・ コムギ (MON71700 及び MON71800) の検査方法
- ・ コメ (63Bt、NNBt、CpTI) の検査方法
- ・ コメ (LL601) の検査方法
- ・ トウモロコシ (Bt10) の検査方法
- ・ トウモロコシ (CBH351) の検査方法
- ・ トウモロコシ (DAS59132) の検査方法
- ・ ナタネ (RT73 *B. rapa*) の検査方法
- ・ パパイヤ (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) の検査方法
- ・ ばれいしょ (F10、J3) の検査方法
- ・ さけ (AquAdvantage) の検査方法

III. 検査方法の同等性確認方法

I . 検体採取方法

1. 亜麻、コムギ、コメ、トウモロコシ、ナタネの検体採取

1.1. 亜麻、コムギ、コメ、トウモロコシ、ナタネの穀粒の検体採取

組換えDNA技術応用食品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。

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。

ナタネの穀粒に関しては、1 検体（検体採取量 1 kg）のうち500 gを粉砕して用いる。残りの500 gは穀粒の状態でも保管する。粒検査の時にはこれを用いる。

1.1.1. 袋又はカートン積みの場合

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量 (kg)	検体数
≦ 15	2	1	1
16 ~ 25	3	1	1
26 ~ 90	5	1	1
91 ~ 150	8	1	1
151 ~ 280	13	1	1
281 ~ 500	20	1	1
501 ~ 1,200	32	1	1
1,201 ~ 3,200	50	1	1
3,201 ~ 10,000	80	1	1
10,001 ~ 35,000	125	1	1
35,001 ~ 150,000	200	1	1
150,001 ~ 500,000	315	1	1
≧ 500,001	500	1	1

1.1.2. ばら積みの場合

1.1.2.1. サイロ搬入時

サイロに搬入する際に 1 サイロを 1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって15 回、計10 kg以上を検体採取したものを縮分してサイロ毎に1 検体（1 kg以上）とする。

既にサイロに搬入したものについては、他のサイロに移動させる時点で同様に検体採取を行う。

1.1.2.2. はしけ搬入時

はしけ（内航船を含む。）に搬入する際に1 はしけを1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて検体採取を行うものとし、適正な時間的間隔をもって15回計10 kg以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に1 検体（1 kg以上）とする。

1.1.2.3. はしけにおける検体採取

すでにはしけに搬入したものについて検体採取を行う場合、1 はしけを1 ロットとして、ロット全体を代表する検体となるよう上層、中層、下層毎に各5カ所、計15カ所から、計10 kg以上を検体採取したものを縮分してはしけ毎に1 検体（1 kg以上）とする。

1.1.2.4. コンテナにおける検体採取

1コンテナを1ロットとして、ロット全体を代表する検体となるよう上層、中層、下層毎に各5カ所、計15カ所から、計10 kg以上を採取したものを縮分してコンテナ毎に1検体（1 kg以上）とする。

1.2. 加工食品の検体採取

加工食品の検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行う。

1.2.1. トウモロコシの粉砕加工品（コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、穀粒を粉砕したもの）

検体採取については、1.1.1.の袋又はカートン積みの場合に従う。

1.2.2. それ以外の加工食品

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量 (g)	検体数
≦ 15	2	120	1
16 ~ 50	3	120	1
51 ~ 150	5	120	1
151 ~ 500	8	120	1
501 ~ 3,200	13	120	1

3,201	～	35,000	20	120	1
35,001	～	500,000	32	120	1
	≧	500,001	50	120	1

1.3. コムギの粉砕加工品の検体採取（小麦粉等、穀粒を粉砕したもの）

検体採取については、1.1.1.の袋積みの場合に従う。

2. パパイヤ及び、ばれいしょ及びさけの検体採取

2.1. 生鮮のパパイヤ及び、生鮮のばれいしょ及び生さけの検体採取

生鮮のパパイヤ及び、生鮮のばれいしょ及び生さけの検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量（個）
≦ 50	2	2
51 ～ 500	3	3
501 ～ 35,000	5	5
≧ 35,001	8	8

2.2. パパイヤ及び、ばれいしょ及びさけの加工食品の検体採取

パパイヤ及び、ばれいしょ及びさけの加工食品の検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて 1.2.2.の表に従い検体採取を行う。なお、果汁・飲料製品、氷菓等製品については、検体採取量を 480 g とする。また、パパイヤ又は、ばれいしょ又はさけの含有量が少ない加工品について実施する場合は、製品分類ごとに複数回の前処理試行が可能となるよう適宜検体採取量を増やして採取すること。

検査原則

当検査は、生鮮及び種々の加工食品が検査対象検体として想定されるため、その性状により測定結果は変動する。これらを縮小するための原則について記す。

- ・ 検査対象検体は、一検体数を一単位とする。
- ・ 原則として、検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とする。（例えば、生鮮のパパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分、ばれいしょについては皮を除いた塊茎部分、さけについては鱗を除いた皮や筋肉などのさけの細胞を十分に含む部分）
- ・ 試料中の成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に試料全量を粉碎器等*で十分に破碎し、均質混和して調製試料とする。

- 検査に供する調製試料は固体や液体の性状に関わらず、重量測定にて一定量を採取する。
 - 試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐよう実施する。
 - 微量測定のため、粉碎用器具*容器、秤量用器具、凍結乾燥瓶は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。あるいは超音波洗浄機を用い、30分間の超音波処理を行う。洗浄後は、DNA Zap solution (Thermo Fisher Scientific社製) などを使用し器具・容器に付着したDNAを分解し、改めてよく洗浄した後に、実験に使用することを薦める。
- * レッチェGM200(レッチェ社製)、ミルサー(イワタニ社製)、Force Mill(大阪ケミカル社製)、Xtreame Blender(Waring社製)、磁製乳鉢・乳棒および同等の結果が得られるものを用いる。

3. その他

市販の亜麻、コメ、ナタネに関しては、検体採取量は検査を繰り返し行うのに十分な量とする。

Ⅱ. 個別検査方法

亜麻（FP967）の検査方法（略）

コムギ (MON71800) の検査方法

コムギ穀粒又は粉砕加工品を検査対象として、DNA 抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法 (DNeasy Plant Maxi Kit, QIAGEN) を用い、1検体から2併行でDNAを抽出精製する。得られた各DNA試料液を用いて、2ウェル並行で定性リアルタイムPCRを実施する。

1.~2. (略)

3. 結果の解析と判定 (図1参照)

MON71800検知試験およびコムギ陽性対照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上での対象蛍光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、MON71800検知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、MON71800陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 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 Threshold line (Th. line) として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。

まず、2併行抽出したそれぞれのDNA試料液 (各2ウェル) について、以下の結果の判定スキームに従って判定する。

各DNA試料液において、

- (1) コムギ陽性対照試験にて2ウェル並行すべてで43未満のCt値が得られ、かつMON71800検知試験にて2ウェル並行すべてで43未満のCt値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。
- (2) コムギ陽性対照試験にて2ウェル並行すべてで43未満のCt値が得られ、かつMON71800検知試験にて2ウェル並行すべてで43未満のCt値が得られない場合、当該試料は陰性と判定する。
- (3) コムギ陽性対照試験にて2ウェル並行すべてで43未満のCt値が得られ、かつMON71800検知試験にて2ウェル並行すべてで一致した結果が得られない場合は、再度、検体からの「1. DNA抽出精製」以降の操作を行い、判定する。

2併行抽出した両方のDNA試料液 (合計4ウェル) において陽性と判定された検体を陽性と判断し、少なくとも一方のDNA試料液において陰性と判定された検体を陰性と判断する。(3)の場合、再抽出精製したDNA試料液においても陽性の判定が得られない場合には、MON71800陰性と判定する。

なお上記判定によりMON71800陽性が判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMまたはVIC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またはVICの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する。また、コムギ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、検体からの「1. DNA抽出精製」以降の操作を行い、それでもコムギ陽性対照試験にて少なくとも1ウェルで43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。

(図1略)

コメ（63Bt、NNBt、CpTI）の検査方法

本検査法ではコメおよびコメ加工品（コメを主原料とするもので、コメ粉やビーフン等、非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、以下のイオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip 100/G）を使用したDNAの抽出精製法を用いる。別法としてシリカゲル膜タイプのDNA抽出精製キット（NIPPON GENE GM quicker 2）を使用したDNA抽出精製法をコメおよび非加熱加工品に適用できる。

1 検体から2 併行でDNAを抽出精製し、DNA試料液を用いて定性リアルタイムPCR法を実施する。

1.～2. (略)

3. 結果の解析と判定（図1参照）

コメ陽性対照用試験およ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、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。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陽性を疑う。次いで、ベースラインを（3 サイクルから15 サイクル）設定し、 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Threshold line（Th. line）として0.2に設定する。ただし、Th. lineがノイズや指数関数的でない増幅曲線と交わる場合は、それらと交わらないようTh. lineを適宜設定する。

2併行抽出より得られたDNA試料液（1抽出あたり2ウェル並行で測定）の合計4ウェルすべてを用いて判定する。

DNA試料液において、

- （1）コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで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、すべてのウェルで48未満のCt値が得られた場合に、当該試料は害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陽性と判定する。
- （2）コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで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の3 試験のいずれかのすべての試験において、すべてのウェルで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。
- （3）コメ陽性対照用試験の2併行すべてのウェルで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すべてのウェルの結果が一致しない場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2 回目のDNA

抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ陰性と判定する。

2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液（各2ウェル）について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液（合計4ウェル）について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

陽性検体のパターン				
	陽性対照用PLD	63Bt	NNBt	CpTI
抽出DNA試料液①	(+/+)	(+/+)	(+/+)	(+/+)
抽出DNA試料液②	(+/+)	(+/+)	(+/+)	(+/+)
		↓	↓	↓
		63Btコメ陽性	NNBtコメ陽性	CpTIコメ陽性

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のすべてのウェルで48未満のCt値が得られないDNA試料については、再度、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を行い、それでもコメ陽性対照用試験のすべてのウェルで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。

ABI PRISM™ 7900または7500以外のリアルタイムPCR機器として、ABI PRISM™ 7700、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）イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip）は、キアゲン（〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1 FOREFRONT TOWER II. Tel. 03-6890-7300 Fax. 03-5547-0818）から購入可能である。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 富山市間屋町1-8-7. Tel.076-451-6548 Fax. 076-451-6547）から購入可能である。

（2）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（KDEL-P）を除く。）およびリアルタイムPCR法用標準プラスミド（GMコメ害虫抵抗性コメ検出用陽性コントロールプラスミド）は、ニッポンジーン（〒930-0834 富山市間屋町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）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（KDEL-P）についてはライフ

テクノロジーズ社（〒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。

（図 1 略）

トウモロコシ (Bt10) の検査方法 (略)

トウモロコシ (CBH351) の検査方法 (略)

トウモロコシ (DAS59132) の検査方法 (略)

ナタネ (RT73 *B. rapa*) の検査方法 (略)

パパイヤ（PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN）の検査方法（略）

ばれいしょ（F10、J3）の検査方法（略）

さけ（AquAdvantage）の検査方法

本法では生さけ及びさけ加工食品を検査対象とし、DNAの抽出精製は、以下のシリカゲル膜タイプキット（NIPPON GENE GM quicker 3）又はイオン交換樹脂タイプキット（QIAGEN Genomic-tip 20/G）を用いる。GMさけAquAdvantageの検出は、AquAdvantage検知用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCRとさけ陽性対照用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCRの2試験を行い判定する。

AquAdvantage検知用として、サケゲノム配列と北太平洋サケ（マスノスケ）由来の成長ホルモン遺伝子プロモーター領域の境界領域を検知するよう設計したプライマー、プローブを用いる。また、リアルタイムPCR反応陽性対照用としてさけ由来18S rRNA遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。

1検体から2併行でDNAを抽出精製し、DNA試料液を得る。そのDNA試料液を用いて定性リアルタイムPCR法を実施する。

1. 生さけ及びさけ加工食品からのDNA抽出精製

生さけ及びさけ加工食品は以下の3種類の製品に細分類し、以下に示したそれぞれの試料前処理プロトコルに従ってDNA抽出精製前の試料調製を行う。

- ①生さけ等（スモークサーモン、缶詰（水煮など）、さけフレークなど）
- ②乾燥製品（ふりかけ、お茶漬けなど）
- ③さけの卵（すじこ、いくら）及びその加工食品

1.1. 試料前処理

1.1.1. 生さけ等（スモークサーモン、缶詰（水煮など）、さけフレークなど）

一包装分（又は多い場合は脂肪分を除いたさけの可食部 120 g）を採取し、等重量分の滅菌蒸留水を加え、Millser等で粉碎し、均質にした試料 1 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り取る。

1.1.2. 乾燥製品（ふりかけ、お茶漬けなど）

一包装分（又は 120 g）を採取し、Millser等で粉碎し、均質にした試料 0.5 gをポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量り取る。

1.1.3. さけの卵（すじこ、いくら）及びその加工食品

卵 50 g を採取する。等重量分の滅菌蒸留水を加え、Millser 等で粉砕する。粉砕した試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量りとる。

1.2. 試料からの DNA の抽出精製

DNA の抽出精製法は、前処理済検体に緩衝液の特段の吸収性のないもの（生さけ、スモークサーモン、缶詰（水煮など）、さけフレークなど）については、1.2.1.1. シリカゲル膜タイプキット（NIPPON GENE GM quicker 3）A 法、前処理済検体に緩衝液の吸収性のあるもの（乾燥製品（ふりかけ、お茶漬けなど）など）については、1.2.1.2. シリカゲル膜タイプキット（NIPPON GENE GM quicker 3）B 法、又は魚卵など油分の多い加工食品（すじこ、いくらなど）については、1.2.1.3. イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip 20/G）法を使用する。

1.2.1. DNA の抽出精製

1.2.1.1. シリカゲル膜タイプキット（NIPPON GENE GM quicker 3）A 法

（生さけ、スモークサーモン、缶詰（水煮など）、さけフレークなど、緩衝液の特段の吸収性のないものに適用。）

ポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量りとった DNA 抽出用試料に、GE1 緩衝液^{*1} 1 mL、RNase A^{*1} 10 µL 及び Proteinase K^{*1} 5 µL を加え、試料塊がないように試験管ミキサーで 30 秒間以上混合した後^{*2}、65°C で 30 分間加温する。その間、10 分間毎に 2 回、試験管ミキサーで 10 秒間激しく攪拌する。GE2-P 緩衝液^{*1} 200 µL を加え、試験管ミキサーでよく混合する。4,000×g 以上^{*3}、4°C の条件で 10 分間遠心し、上清^{*4} 800 µL を 2.0 mL 容チューブに移す。GB3 緩衝液^{*1} 600 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する。12,000×g 以上、4°C の条件で 15 分間遠心し、上清を可能な限り採取する。その上清 700 µL を spin column に負荷し、10,000×g 以上、4°C の条件で 30 秒間遠心し、溶出液を捨てる。残りの混合液全量を同じ spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液^{*1} 600 µL を負荷し、10,000×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 1.5 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、10,000×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。

*1 GE1 緩衝液、GE2-P 緩衝液、GB3 緩衝液、GW 緩衝液、RNase A、Proteinase K はシリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの又は同等の活性を有するものを用いる。

*2 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。

*3 使用するローター及び 50 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。遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちららを用いてもよい。

*4 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。

1.2.1.2. シリカゲル膜タイプキット（NIPPON GENE GM quicker 3）B 法

（乾燥製品（ふりかけ、お茶漬けなど）など、緩衝液の吸収性のあるものに適用。）

ポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとったDNA抽出用試料に、GE1緩衝液^{*1} 2.25 mL、RNase A^{*1} 10 µL及びProteinase K^{*1} 5 µLを加え、試料塊がないように試験管ミキサーで30秒間以上混合した後^{*2}、65°Cで30分間加温する。その間、10分間毎に2回、試験管ミキサーで10秒間激しく攪拌する。GE2-P緩衝液^{*1} 250 µLを加え、試験管ミキサーでよく混合する。4,000×g以上^{*3}、4°Cの条件で10分間遠心し、上清^{*4} 800 µLを2.0 mL容チューブに移す。GB3緩衝液^{*1} 600 µLを添加した後、10～12回転倒混和する。12,000×g以上、4°Cの条件で15分間遠心し、上清を可能な限り採取する。その上清700 µLをspin columnに負荷し、10,000×g以上、4°Cの条件で30秒間遠心し、溶出液を捨てる。残りの混合液全量を同じspin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。次いでGW緩衝液^{*1} 600 µLを負荷し、10,000×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1.5 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、10,000×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。

^{*1} GE1緩衝液、GE2-P緩衝液、GB3緩衝液、GW緩衝液、RNase A、Proteinase Kはシリカゲル膜タイプのキット（NIPPON GENE GM quicker）付属のもの又は同等の活性を有するものを用いる。

^{*2} 攪拌操作が不十分であると、DNAの収量が減少する。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} 使用するローター及び50 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。遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。

^{*4} 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。

1.2.1.3. イオン交換樹脂タイプキット（QIAGEN Genomic-tip 20/G）法 (すじこやいくらなど、油分の多い加工食品に適用。)

ポリプロピレン製遠沈管（50 mL容）に量りとったDNA抽出用試料に、G2緩衝液^{*1} 8 mL、Proteinase K^{*2} 50 µLとRNase A^{*2} 10 µLを加えて、試験管ミキサー又は転倒混和により激しく攪拌した後、50°Cで1時間放置する。その間、2、3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、3,000×g以上で、低温下（4°C）15分間遠心^{*3}し、得られた上清をポリプロピレン製遠沈管（15 mL容）に移し、さらに、3,000×g以上で、低温下（4°C）5分間遠心する。次いで、得られた上清は、QBT緩衝液^{*1} 1 mLを用い平衡化したQIAGEN Genomic-tip 20/Gに2 mLずつ数回に分けて負荷する^{*4}。次いで、QIAGEN Genomic-tip 20/GはQC緩衝液^{*1}で2 mLずつ3回洗浄した後、新しい遠沈管に移す。予め50°Cに温めておいたQF緩衝液^{*1}を1 mLずつ2回加え、DNAを溶出する。溶出液は、高速遠心に耐えられる遠沈管に移し、等量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、10,000×g以上で、低温下（4°C）、15分間遠心し、上清を捨てる。70%（v/v）エタノール1 mLを加え、さらに10,000×g以上で、低温下（4°C）5分間遠心する。上清は捨て^{*5}、沈殿物を乾燥させた後、50°Cに温めた滅菌水50 µLを加え、ピペティングによりDNAを溶解させ、DNA試料原液とする。

^{*1} G2緩衝液、QBT緩衝液、QC緩衝液、QF緩衝液はキアゲン社Genomic DNA Buffer Set（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

^{*2} キットに付属のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

^{*3} 遠心機のローターはスウィング式、アングル式のどちらを用いてもよい。

^{*4} 浮遊物は出来るだけ負荷しないようにする。

^{*5} 沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を完全に除去する。

1.2.2 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、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈し^{*1}、200～320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 及び 280 nm の吸光度 (A_{260} 及び A_{280} ^{*2}) を記録する。次いで A_{260} の値 1.0 を 50 ng/ μ L DNA として DNA 濃度を算出する。また、 A_{260}/A_{280} を計算し、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^{*3}。得られた DNA 濃度から、滅菌蒸留水で DNA 試料原液を 10 ng/ μ L に希釈して調製し、DNA 試料液とする。DNA 試料液は 25 μ L ずつマイクロ遠沈管に分注し、-20°C 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 試料原液の濃度がリアルタイム 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} A_{260} が DNA 由来の吸光度、 A_{280} がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

^{*3} A_{260}/A_{280} の比が 1.7～2.0 の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

2. 定性リアルタイムPCR法

AquAdvantage の検出は、AquAdvantage 検知用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCRとリアルタイムPCR反応陽性対照用のプライマー、プローブを用いたリアルタイムPCRの2試験を行い判定する。各プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解する。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

・ AquAdvantage 検知用プライマー対、プローブ

AquAd-F: 5'-TGCTGATGCCTCTGATACCAC-3'

AquAd-R: 5'-ATGCCTCTAGTGCAAGTTCAGTC-3'

AquAd-P: 5'-FAM- CAGTAGTACAACGTTGGCAGATGTATGAGAACT-BHQ1-3'

・ リアルタイムPCR反応陽性対照用プライマー対、プローブ

18S F: 5'- TGT GCC GCT AGA GGT GAA ATT -3'

18S R: 5'-GCA AAT GCT TTC GCT TTC G -3'

18S P: 5'-FAM- TTG GAC CGG CGC AAG ACG G-TAMRA-3'

2.1. PCR用反応液の調製

リアルタイムPCR用反応液は25 μ L/well として調製する^{*1}。組成は以下のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox)^{*2}、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.4 μ L、対象プローブ溶液(10 μ mol/L) 0.25 μ Lを混合し、滅菌蒸留水で全量 20 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA試料液 5 μ L (50 ng) を添加する。PCRのブランク反応液^{*3}として、

必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製する。各DNA試料液あたりAquAdvantage検知用とリアルタイムPCR反応陽性対照用のリアルタイムPCRをそれぞれ2ウェル併行して行うものとする。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（チューブの場合は専用キャップをする。）。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ーケーター^{*4}を用いて行う。ABI PRISMの場合は、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。プレート遠心機で反応液をスピンドウン（目安：1,500g、2分間）する。ABI PRISM 7900HTの場合は、MicroAmp Optical Cover Compression Pad^{*5}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。

^{*1} ABI PRISM 7900HT又はABI 7500を使用する場合は、MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate（Thermo Fisher Scientific社）を、LightCycler 96又は480を使用する場合は、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96又はLightCycler 8-Tube Strips（white）（LightCycler 480の場合は、LightCycler 8-Tube Strip Adapter Plateを用いる。）（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を用いる。

^{*2} FastStart Universal Probe Master（Rox）（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を含む溶液は粘性が高いため、混合操作及び採取を行う際には注意が必要である。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。使う直前には必ず軽く攪拌後、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。

^{*3} Non-Template Control（NTC）

DNA 試料液の添加の際、NTC にはDNA 試料液の代わりに水をウェルに5 µL添加する。

^{*4} シール及びシーリング用アプリーケーター

ABI PRISM 7900HT又はABI 7500の場合は、ABI PRISM Optical Adhesive Cover（Thermo Fisher Scientific社）を使用する。LightCycler 96又は480の場合は、LightCycler® 480 Sealing Foil（ロシュ・ダイアグノスティックス社）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。

^{*5} MicroAmp Optical Cover Compression Pad（Thermo Fisher Scientific社）

ABI PRISM 7900HTの場合のみ使用する。ABI PRISM 7500やLightCycler 96又は480では使用しない。

2.2. リアルタイムPCRによる測定

（ABI PRISM 7900HTの他、同等の性能を持つABI 7500、LightCycler 96又はLightCycler 480を使用する。）

2.2.1. ABI PRISM 7900HT

- ① オペレーション用 PC の電源を入れ、起動させる。PC が完全に起動してから ABI PRISM 7900HT 本体の電源を入れ、30 分以上ウォーミングアップしたのちに反応を開始する。
- ② デスクトップ上のアプリケーション [ABI PRISM 7900 SDS Software] をダブルクリックして開く。メニューバーの [File] → [New] を選択し、{New Document} ダイアログを表示させる。{Assay} は [Absolute Quantification (Standard Curve)]、{Container} は [96 Wells Clear Plate]、{Template} は [Blank Template] を選択し、[OK] ボタンをクリックする。
- ③ メニューバーの [Tools] → [Detector Manager] を選択し、{Detector Manager} ダイアログを表示させる。[New] ボタンをクリックし、{Add Detector} ダイアログを開く。

Detector の設定は、AquAdvantage 検知試験は Reporter を [FAM]、Quencher を [BHQ] とし、リアルタイム PCR 反応陽性対照試験は Reporter を [FAM]、Quencher を [TAMRA]として[OK] ボタンをクリックする。{Detector Manager} ダイアログ上で使用する Detector (リアルタイム PCR 反応陽性対照試験、AquAdvantage 検知試験) を選択し、[Copy To Plate Document] ボタンをクリックし、[Set Up] タブ上に使用する Detector を登録し、最後に [Done] ボタンをクリックする。

- ④ 画面左上枠でリアルタイム PCR 反応陽性対照試験又は AquAdvantage 検知試験のウェルを選択し、右枠の [Set Up] タブ上で、Detector が [リアルタイム PCR 反応陽性対照試験]又は [AquAdvantage 検知試験] の行の {Use} 欄にチェックを入れる。次にウェルごとに {Task} 欄でそれぞれの情報 (Non-Template Control : NTC、測定対象検体 : Unknown) を選択し、{Sample Name} フィールドにサンプル番号を入力する。{Passive Reference} が [ROX] に設定されていることを確認する。
- ⑤ [Instrument] タブ上の [Thermal Profile] よりサーマルサイクラー条件を以下のように設定する。[50°C, 2分 → 95°C, 10分 → (95°C, 15秒 → 57°C, 1分) ×45 サイクル]
- ⑥ {Sample Volume} を [25 µL] に設定し、{9600 emulation モード} にチェックが入っていることを確認する。
- ⑦ 設定条件をプレートドキュメント (.sds) として保存する。
- ⑧ [Instrument] タブ上の [Connect] ボタンをクリックし、PC と ABI PRISM 7900HT 本体を connect 状態にする。[Instrument] タブ上の [Open / Close] ボタンをクリックし、ステージを装置本体から出し、2.1.で調製した 96 ウェルプレートで切欠き部を右上にしてステージ上に載せる。再び [Open / Close] ボタンをクリックし、96 ウェルプレートを装置本体にセットする。
- ⑨ [Instrument] タブ上の [Start] ボタンをクリックし、反応とデータの取り込み (所要時間 : 約 2 時間) を開始する。

2.2.2. ABI 7500

- ① オペレーション用 PC の電源を入れ、起動させる。PC が完全に起動してから ABI7500 本体の電源を入れ、30 分以上ウォーミングアップしたのちに反応を開始する。
- ② デスクトップ上のアプリケーション [7500 System Software] をダブルクリックして開く。メニューバーの [File] → [New] を選択し、{New Document} ダイアログを表示させる。{Assay} は [Absolute Quantification (Standard Curve)]、{Container} は [96 Wells Clear]、{Template} は [Blank Template] 、{Run Mode} は [9600 emulation]を選択し、[NEXT] ボタンをクリックする。
- ③ Detector の設定は、AquAdvantage 検知試験は Reporter を [FAM]、Quencher を [BHQ] とし、リアルタイム PCR 反応陽性対照試験は Reporter を [FAM]、Quencher を [TAMRA]として、[ADD] ボタンをクリックする。{Passive Reference} が [ROX] に設定されていることを確認し、[NEXT] ボタンをクリックする。
- ④ 画面下枠でリアルタイム PCR 反応陽性対照試験又は AquAdvantage 検知試験のウェルを選択し、上枠で、Detector が [さけ陽性対照試験] 又は [AquAdvantage 検知試験] の行の {Use} 欄にチェックを入れる。次にウェルごとに {Task} 欄でそれぞれの情報 (Non-Template Control : NTC、測定対象検体 : Unknown) を選択し、[FINISH] ボタンをクリックする。
- ⑤ [Setup] タブ上の各ウェルをダブルクリックし、サンプル名を入力する。
- ⑥ [Instrument] タブ上の [Thermal Cycle Protocol] よりサーマルサイクラー条件を以下

のように設定する。[50°C, 2分 → 95°C, 10分 → (95°C, 15秒 → 57°C, 1分) × 45 サイクル]

- ⑦ {Sample Volume} を[25 µL] に設定する。
- ⑧ 設定条件をプレートドキュメント (.sds) として保存する。
- ⑨ 2.1. で調製した 96 ウェルプレートを切欠き部を右上にして、装置本体のステージ上に載せセットする。
- ⑩ [Instrument] タブ上の [Start] ボタンをクリックし、反応とデータの取り込み（所要時間：約 2 時間）を開始する。

2.2.3. LightCycler 96

- ① LightCycler 96 本体の電源を入れ、セルフテストが完了して起動するまで約 5 分待機する。
- ② LightCycler 96 本体タッチパネル上の [New] をタッチし {Create New Experiment} を表示させる。 [Roche template] から [RunTemplate_HydrolysisProbes_Amp] を選択し、 {Experiment Name} を設定し [Create] する。
- ③ [Run Editor] タブの [Measurement] で、 {Reaction Volume(µl)} を [25 µL] に設定する。
- ④ [Run Editor] タブの [Profile] でサーマルサイクラー条件を [95°C, 10分 → (95°C, 15秒 → 57°C, 1分) × 45 サイクル] のように設定する。 57°C の Step の Acquisition .Mode が [Single] となっていることを確認する。
- ⑤ [Eject] をタッチしてブロックを引出し、 2.1. で調製した 96 ウェルプレートを切欠き部を右下にして、サーマルブロック上に載せセットして閉じる。
- ⑥ [Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。
- ⑦ 反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。
- ⑧ [Sample Editor] タブ画面のウェルフォーマット図でリアルタイム PCR 反応陽性対照試験又は AquAdvantage 検知試験のウェルを選択し、 Gene の {FAM} 欄に該当する遺伝子名を入力する（一度入力すると、プルダウンから選択する事が出来る。）。次にウェルごとに Sample の {Type} 欄でそれぞれの情報（Negative Control、測定対象検体：Unknown）を選択する。
- ⑨ ウェルフォーマット図の各ウェルをクリックし、Sample の {Name} 欄にサンプル名を入力する（一度入力すると、プルダウンから選択する事が出来る。）。

2.2.4. LightCycler 480

- ① LightCycler 480 本体の電源を入れ、セルフテストが完了して起動するまで約 5 分待機する。オペレーション用 PC の電源を入れ、起動させる。
- ② デスクトップ上のアプリケーション [LightCycler480 SW] をダブルクリックし、 [User Name] と [Password] を入力してソフトを立ち上げる。
- ③ [New Experiment from Template] をクリックし {Create Experiment from Template} から [Mono color HydrolysisProbe-UPL] を選択し、OK する。
- ④ [Run Protocol] タブで、 {Reaction Volume} を [25] に設定し、サーマルサイクラー条件を次のように設定する [95°C, 10分 → (95°C, 15秒 → 57°C, 1分「Single」) × 45 サイクル → 40°C, 30秒]。 57°C の Step の Acquisition Mode が [Single] となっていることを確認する。
- ⑤ Save をクリックし設定条件を保存する。

- ⑥ 本体のプレートローディングボタンを押してプレートローダー出し、2.1. で調製した 96 ウェルプレートを切欠き部を右下にしてセットした後、再度ボタンを押してプレートローダーを格納する。
- ⑦ [Start Run] をクリックし、反応とデータの取り込みを開始する。
- ⑧ (反応中に) [Subset Editor]にて、(+) ボタンから New Subset を作成し、サンプルをセットしたウェルを選択した後 Apply をクリックする。
- ⑨ [Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから⑧で作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれの情報 (Negative Control、測定対象検体：Unknown) を選択する。

3. 結果の解析と判定 (図 1 参照)

リアルタイムPCR反応陽性対照試験と AquAdvantage検知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 (Cq) 値の確認及び対照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。

ABI PRISM 7900HT又はABI 7500を使用した場合のデータの解析

- ① メニューバーの [Analysis] → [Analyze] を選択する。
- ② 画面右枠の [Result] タブをクリックして {Amplification Plot} 画面を表示させる。
- ③ {Amplification Plot} 画面上の {Plot} 欄で [ΔRn vs Cycle] を表示させ、{Threshold} 欄に [0.2] と入力する。
- ④ {Amplification Plot} 画面上の {Detector} 欄で [All] を選択する。表中に Ct 値が表示される。

LightCycler 96を使用した場合のデータの解析

- ① [Analysis]タブをクリックし[Add Analysis] を選択し{Create New Analysis}を表示させる。[Abs Quant]を選択し[OK]をクリックする。
- ② [Amplification Curves]に増幅曲線が、[Result Table] に Cq 値が表示される。

LightCycler480を使用した場合のデータの解析

- ① [Analysis]ボタンをクリックし{Create new analysis}にて、[Abs Quant/2nd Derivative Max]を選択し[Subset]プルダウンから 2.2.4⑧で作成した Subset を選択し [OK]をクリックする。
- ② 表示された画面で、[Calculate]をクリックする。
- ③ 増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2平行抽出より得られたDNA試料液 (1抽出あたり2ウェル併行で測定。) の合計4ウェルすべてを用いて判定する。

DNA試料液において、

- (1) リアルタイムPCR反応陽性対照試験の2平行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、かつAquAdvantage検知用試験のすべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られた場合、当該試料は陽性と判定する。

(2) リアルタイムPCR反応陽性対照試験の2併行すべてのウェルで43未満のCt (Cq) 値が得られ、かつAquAdvantage検知用試験のすべてのウェルにおいて43未満のCt (Cq) 値が得られない場合は陰性と判定する。

(3) AquAdvantage検知用試験において、すべてのウェルで一致した結果が得られなかった場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「2. 定性リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、AquAdvantage陰性と判定する。

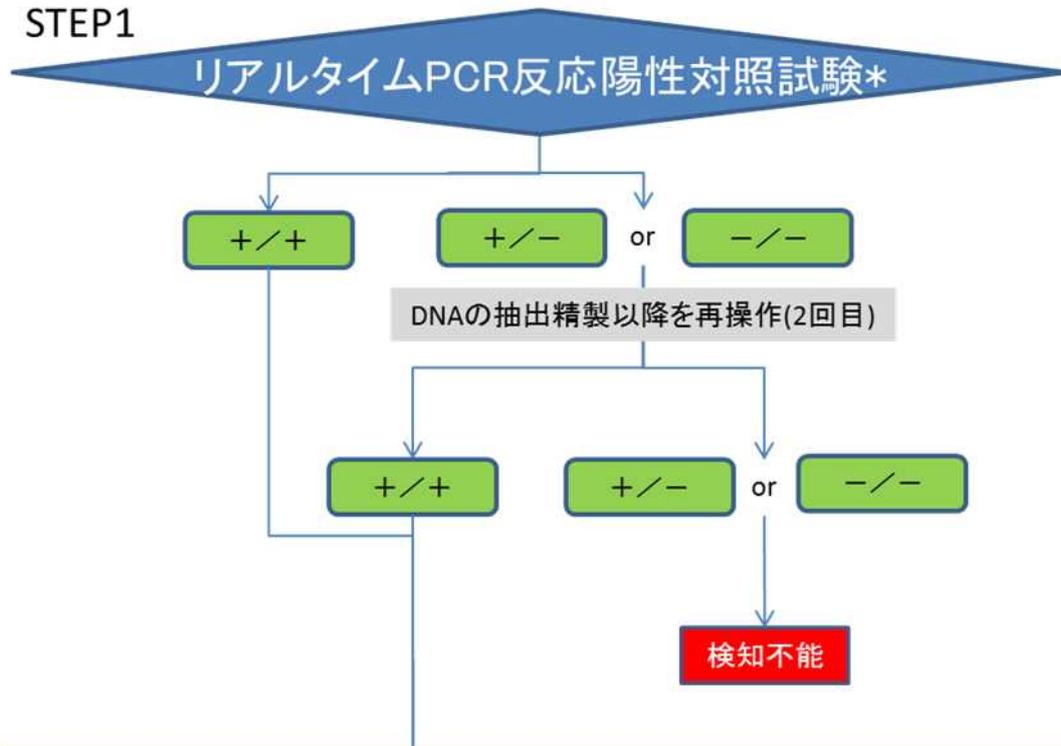
2併行抽出のそれぞれの抽出DNA試料液（各2ウェル）について、結果の判定スキームに従って判定し、両方の抽出DNA試料液（合計4ウェル）について陽性と判定された検体を陽性と判断する。

なお、ABI PRISM 7900HT又はABI 7500を使用した場合は、上記判定によりAquAdvantage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。

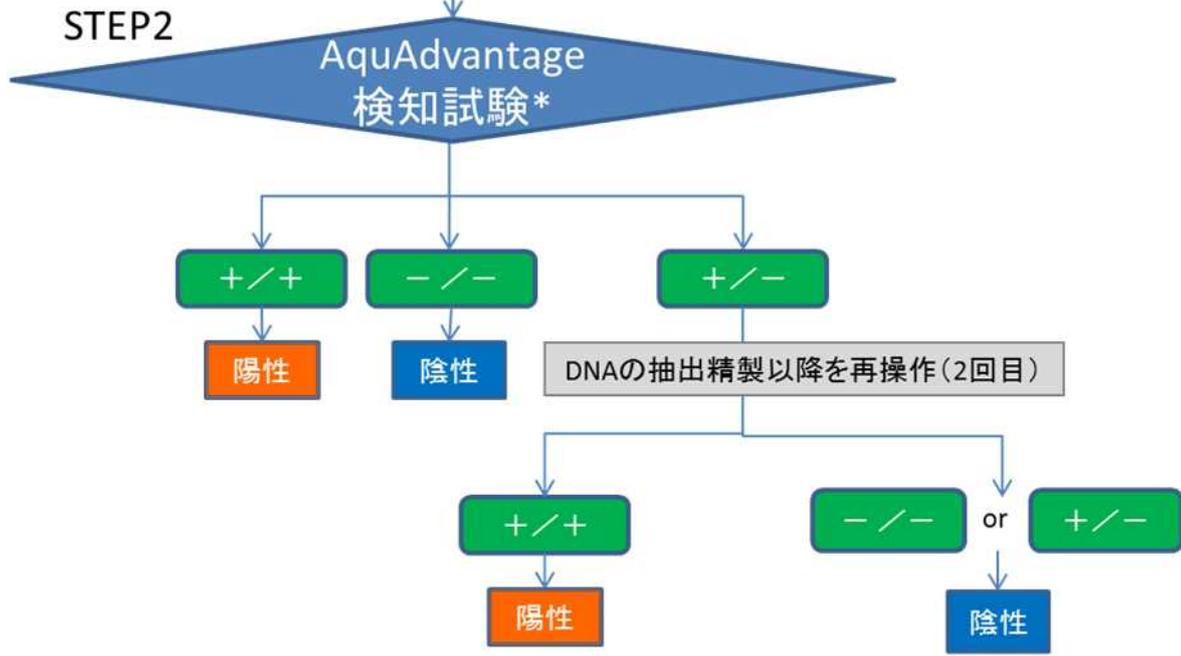
また、リアルタイムPCR反応陽性対照用試験で2ウェル併行の両方で43未満のCt(Cq)値が得られないDNA試料液については、再度、検体からの「1.2. 試料からのDNAの抽出精製」以降の操作を行い、それでも2ウェル併行の両方で43未満のCt (Cq) 値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする。

図1 結果の判定スキーム

STEP1



STEP2



*注:ブランク反応液で増幅が見られた場合は、コンタミネーション等が疑われ、適切な検査が行われていなかったことを示す。

Ⅲ. 検査方法の同等性確認方法（略）