

関係団体の長 殿

農林水産省消費・安全局長

「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
に基づく、栽培用の種苗に係る生物検査の実施要領」の策定について

我が国においては、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「カルタヘナ法」という。）第4条第1項の規定に基づく承認を受けていない遺伝子組換え農作物（以下「未承認GMO」という。）の栽培用種子・苗が輸入されることがないように、農作物の栽培用種子・苗の輸入時に、カルタヘナ法第31条の規定に基づく立入検査等を実施しています。

今般、未承認GMOの栽培用種子・苗の輸入防止の一層の徹底を図るため、平成30年4月1日から、カルタヘナ法第16条の規定に基づき、未承認GMOの栽培用種子・苗をこれに該当すると知らないで輸入するおそれが高い場合を農林水産大臣が指定し、その指定に係る輸入をしようとする者に対して、その都度農林水産大臣に対する届出を義務付けるとともに、カルタヘナ法第17条第1項の規定に基づき、当該届出をした者に対し、その輸入に係る生物につき、未承認GMOでないかどうかについて、登録検査機関による検査（以下「生物検査」という。）を受けることを命ずることとしました。

ついては、当該届出及び生物検査の実施に当たって必要な事項を別添のとおり定めましたので、御了知の上、適宜、貴会会員に対し周知方よろしく申し上げます。

<参考>

カルタヘナ法に基づく輸入の届出及び生物検査の手続（農林水産省ウェブページ）

URL: http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/seibutu_kensa.html

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に
基づく、栽培用の種苗に係る生物検査の実施要領

第1 趣旨

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16条又は第17条の規定に基づく、栽培用の種苗に係る輸入の届出又は生物検査命令の実施については、法及び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施行規則（平成15年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第1号。以下「施行規則」という。）に定めるもののほか、この通知に定めるところによる。

第2 輸入時の届出

1 届出書の記載事項

平成30年3月22日農林水産省告示第576号（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16条、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24条第1項の規定により納付すべき手数料の額を定める政令並びに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施行規則第17条及び第22条の規定に基づき、農林水産大臣が生産又は流通を所管する検査対象生物である物についての同法第16条の主務大臣が指定する場合等を定める件。以下「告示」という。）による指定に係る生物を輸入しようとする者は、施行規則様式第3（以下「届出書」という。）の各欄に、届出書の備考に掲げるほか、次に掲げるとおり記載することとする。

- (1) 「輸入される海空港名及び入港月日」には、届出時点において予定されている輸入港名及び入港月日を記載する。
- (2) 「輸入する数量」の欄には、同一の輸入荷口にて複数のロット（一の生産期間内に一連の生産工程により均質性を有するように生産された一群をいう。以下同じ。）を輸入する場合であって、品種名、生産者名、生産番号等によりそれらのロットを区別することが可能な場合においては、ロット番号又は品種名、生産者名、生産番号等ロットを区別するための情報及びロットごとの輸入数量を記載する。
- (3) 「積載船（機）名」の欄には、届出時点において予定されている積載船（機）名を記載することとし、届出時点において積載船（機）が未定の場合にあってはその旨を記載する。

2 届出書の添付書類

法第16条の規定に基づく届出を行う者（以下「届出者」という。）は、あらかじめ農林水産省消費・安全局長（以下「消費・安全局長」という。）が適当と認めた検査方法により、生産国又は生産地域（以下「生産国等」という。）の政府機関又はそれと同等の機関で行われた検査の結果、告示による指定の理由となった遺伝子組換え生

物等ではないことを証明する検査証明書がある場合には、届出書に添付することとする。

3 届出書の提出先及び提出期限

届出書の提出先は、農林水産省消費・安全局農産安全管理課（以下「農産安全管理課」という。）とする。

届出者は、届出書を、告示で定められた期日（荷口の本邦への到着予定の10日（行政機関の休日に関する法律（昭和63年法律第91号）第1条第1項各号に掲げる日の日数は、算入しない。）前）までに農産安全管理課に到着するように、提出することとする。

第3 生物検査

1 生物検査命令

農林水産大臣は、輸入の届出がなされた荷口に、第2の2に規定する検査証明書が添付されていない場合には、法第17条第1項の規定に基づき、法第18条第3項の規定に基づき農林水産大臣が登録した者（以下「登録検査機関」という）から法第17条第1項に規定する生物検査（以下「生物検査」という。）を受けべきことを命ずるとともに、法第17条第3項の規定に基づき、当該生物検査の結果の通知を受けるまでの間の検査対象生物の使用等の条件（特定の場所での保管等）を指定することとする。また、併せて、農林水産省接受印が押印された届出書の写しを届出者に送付することとする。

なお、消費・安全局長は、届出書とともに第2の2に規定する検査証明書が提出され、生物検査が不要であることを確認した場合は、その旨を届出者に通知する。

2 生物検査依頼書の記載事項

届出者は、生物検査を依頼する際、同一の輸入荷口にて複数のロットを輸入する場合には、施行規則様式第4の「依頼数量」の欄に、ロット数及びロットごとの輸入数量を記載することとする。

3 生物検査の実施

(1) 採取

登録検査機関は、別紙1「採取方法」に則り、生物検査のための検体を採取するものとする。採取量は、ロットごとに種子については500粒、苗については500株（株ごとに葉1枚）とし、ロットごとの輸入数量が当該採取量に満たない場合には、全量とする。

届出者又はその委託を受けた者は、当該採取を関税法（昭和29年法律第61号）第29条に規定する保税地域内で行う場合には、同法第32条の規定に基づき、見本の一時持出の許可の申請を行うこととする。また、生物検査のための採取は、原則として植物防疫法（昭和25年法律第151号）に基づく植物検疫の終了後に実施するものとする。

採取を行った登録検査機関の職員は、別紙参考の記載例を参考として、採取年月日、採取量、採取者及び登録検査機関名を明記し登録検査機関の印を押印した書面を作成し、採取済みのロットの包材に貼付等を行うものとする。

(2) 検査方法

登録検査機関は、パパイヤにあっては別紙2「未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法」、ワタにあっては別紙3「未承認遺伝子組換えワタの種子の検査方法」に規定する方法により、検査を実施する。


(3) 検査結果の通知

登録検査機関は、法第17条第4項の規定に基づく農林水産大臣を経由して行う生物検査の結果の通知に当たっては、当該通知の正本及び写しの電磁的記録を農産安全管理課に提出するものとする。

(別紙参考)

以下は、第3の3の(1)において包材に貼付等を行うとした書面の例であり、書面の名称を含め、様式として定めるものではない。

(例)

採取済証	
採取年月日	_____
採 取 者	_____
採 取 量	_____
登録検査機関名	_____
	

(別紙 1)

採取方法

生物検査のための検体の採取については、「農林水産大臣がその生産又は流通を所管する遺伝子組換え生物等に関する登録検査機関の登録及び生物検査の業務の実施に関する規程の認可要領」(平成 17 年 2 月 23 日付け 16 消安第 9084 号消費・安全局長通知)の別添「農林水産大臣がその生産又は流通を所管する遺伝子組換え生物等の生物検査に係る作業管理等要領」に定めるもののほか、ここに定めるところによることとする。

1. ロットについて、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ものであることを確認すること。
2. 種子の場合については破損等のない種子を、苗の場合については苗の最下部の葉を 1 枚ずつ、それぞれ 500 粒又は 500 枚以上になるよう採取すること。
3. また、以下の点に留意すること。
 - i) 遺伝子組換え生物等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を得るため、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。

特に、袋積み又は少量ずつ小分けになっているロットの場合は、当該ロット当たりの梱数に応じ、以下の表に従い、当該ロットから一定数の梱を無作為に抽出すること(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)。

ロットの大きさ (1ロット当たりの梱数)	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

* 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。

- ii) 他のロットの種子又は葉が混入しないよう十分配慮し、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。

(別紙2)

未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法

I. 種子の検査方法

本検査法はパパイヤの種子を対象とする。GM quicker2 (NIPPON GENE 社) を用い、種子粉砕物 1 点につき 2 点の DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換えパパイヤの含有の有無を判定する。

1 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉砕

収去したパパイヤ種子から、破砕粒や他の混入物を取り除き、表面にゼリー状の皮膜等の付着物がないことを確認した後、無作為に500粒の種子を採取し、1%SDS溶液で10回洗浄後、滅菌蒸留水で3回リンスし、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に65℃で乾燥させる。余った種子は、生物検査完了までの間、冷蔵保管する。

乾燥した種子は、滅菌したピンセットを用い、ステンレスビーズ等とともに、100粒ずつ50 mL容チューブに入れ、シェイクマスター (BMS社) *1等を用い、粉砕する。ビーズを取り除いた後、滅菌済の葉さじで壁面についた種子粉砕物を底に集め、ボルテックスミキサーでよく攪拌し得られた種子粉砕物5点をDNA抽出・精製に供する。

なお、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には十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター(現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター)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3版)コンタミネーション防止編」を参考にすること。

*1 シェイクマスター (BMS) がいない場合は、乳棒やフードミル (ミルサー700G (イワタニ社) 又はその同等品) 等、同等の種子粉砕物が得られる粉砕方法を用いること。その際、試料を均質化するため、粉砕した試料を一度、葉包紙の上に取り、50 mL容チューブに入れ、ボルテックスミキサーで混合すること。なお、シェイクマスター (BMS) を使用する場合は、15 mmステンレスビーズ1個を用い、600 rpmで2分間、次いで1,000 rpmで30秒間の処理又は20 mmジルコニアビーズ1個及び10 mmジルコニアビーズ1個を用い、1,000 rpm で1分間の処理により粉砕可能であることを確認している。

1.2 種子粉砕物からの DNA 抽出・精製

種子粉砕物 1 点につき 2 点の DNA 抽出物を得る。

種子粉砕物 100 mg を 1.5 mL 容チューブに量り採り、GE 1 緩衝液 800 μ L、RNase A (100 mg/mL) 10 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μ L を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間混合した後、65℃で 15 分間静置する。GE 2-K 緩衝液 100 μ L を加え、ボルテックスミキサーで混合する。13,000 \times g 以上、4℃の条件で 10 分間遠心分離する。上清 550 μ L を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、13,000 \times g 以上、4℃の条件で

10 分間遠心分離する。上清を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、GB3 緩衝液 200 μ L 及びエタノール (100%) 200 μ L を添加した後、10~12 回転倒混和する。混合液 650 μ L を Spin column に負荷した後、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 30 秒間遠心分離し、溶出液を捨てる。混合液全量を負荷するまでこの操作を繰り返す。次いで GW 緩衝液 650 μ L を負荷し、13,000 \times g 以上、4 $^{\circ}$ C の条件で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。Spin column を新たな 1.5 mL 容チューブに移し、滅菌蒸留水 50 μ L を加え室温で 3 分間静置した後、13,000 \times g 以上、室温で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液 とする。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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^{*1}し、200~320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/ μ L DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する (A₂₆₀/A₂₈₀)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

^{*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、使用する装置に応じ調節する。

2.2 DNA試料液の調整及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して10 ng/ μ Lに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μ Lごとにマイクロ試料管に分注後、-20 $^{\circ}$ 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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が10 ng/ μ Lに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

3 リアルタイムPCR (Applied Biosystems 7900HT^{*1}) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液 1 点につき 2 ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列と *Papaya Ringspot Virus coat protein* (PRSV-cp) 遺伝子配列の境界領域を検知するプライマー対・プローブ「YK-1」及び「YK-2」並びにカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「CaM」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用として、Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Chy」を用いる。

プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

^{*1} ABI PRISMTM 7900HTと同等の性能を有することを農産安全管理課が確認した他の機種を用いてもよい。

(1) 組換え遺伝子(PRSV-YK)検知用プライマー対・プローブ

① 「YK-1」

YK-1F : 5'-GAT CCC CGG GTG GTC AGT -3'

YK-1R : 5'-CCG GTA TCC ACA GCT TCA TTT T -3'

YK-P : 5'-FAM- AGA CGC CAT GGA AGG-MGB-3'

② 「YK-2」

YK-2F : 5' -ACA CGG GGG ACT CTA GAG -3'

YK-2R : 5'-ACC GGT ATC CAC AGC TTC -3'

YK-2P : 5'-FAM- TCC CTT CCA TGG CGT C- TAMRA-3'

(2) 組換え遺伝子 (CaM) 検知用プライマー対・プローブ「CaM」

35S-F : 5'-GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R : 5'-AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C-3'

35S-P : 5'-FAM- CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3

(3) 内在性遺伝子検知用プライマー対・プローブ「Chy」

Q-Chy-1F2: 5'-CCA TGC GAT CCT CCC A-3'

Q-Chy-2R: 5'-CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA-3'

Q-Chy-P: 5'-FAM-TTC CCT TCA T(BHQ1)CC ATT CCC ACT CTT GAG A-3'

又は

Q-Chy-P(new): 5'-FAM-TTC CCT TCA TCC ATT CCC ACT CTT GAG A-TAMRA-3'

3.1 PCR用反応液の調製

3.1 PCR用反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μ L/ウェルになるように調製する。1 ウェル当たりの試薬の分量は次のとおりである。TaqMan Gene Expression Master Mix^{*1} 12.5 μ L、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、滅菌蒸留水 8.95 μ L。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR 用の Pre-mix 溶液を作成して、各ウェルに 22.5 μ L ずつ分注した後、各 DNA 試料液 2.5 μ L を添加する。PCR のブランク反応液として DNA 試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。また、PCR の陽性対照反応液として陽性コントロールプラスミド^{*3}を加えたものを同時に調整する。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、専用のシーリング用アプリケーションを用い、注意深く行う。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^{*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 TaqMan Gene Expression 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。不十分であれば、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、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

*2 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 2.5 μ L 添加する。

*3 GM パパイヤ系統別 DNA PRSV HN 陽性コントロールプラスミド（ニッポンジーン社）等を使用する。

*4 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 ABI PRISM 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。

*5 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

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

3.2 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、検体の配置や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（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「Reporter」を「FAM」に設定する。「Quencher」については、「YK-1」が「None」、「HN」及び「Chy」のプローブが Q-Chy-P の場合は「Non Fluorescent」、その他のプローブは「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50 $^{\circ}$ C、2分間の条件で保持した後、95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C・15秒間保持後60 $^{\circ}$ C・1分間保持を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子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 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、組換え遺伝子検知試験の「YK-1」、「YK-2」又は「CaM」について、目視により Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを3サイクルから15サイクルに設定し、 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 Threshold line (Th. line) を選択する（通常、「0.2」に設定）。選択した 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、それらと交わらないよう Th. line を適宜変更する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1検体から得られた10点のDNA試料液について、1点につき2ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

- (1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の「PRSV-YK」及び「CaM」について実施した全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 陽性と判定する。
- (2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ陰性と判定する。

- (3) 内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子 (CaM) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子 (PRSV-YK) 検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 以外の遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
- (4) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の「PRSV-YK」及び「CaM」の何れか、若しくは双方について実施した全てのウェルで一致した結果が得られない場合であって、
- 1) 個々の種子粉碎物から得た全ての DNA 試料液について一致した PCR 結果が得られた場合、遺伝子組換えパパイヤを含む種子粉碎物と含まない種子粉碎物があったため PCR 結果が一致しなかったと判断し、組換え遺伝子検知試験の「PRSV-YK」及び「CaM」について Ct 値が得られた試料は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 陽性、組換え遺伝子検知試験のうち「CaM」についてのみ Ct 値が得られた試料は遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 以外の遺伝子組換えパパイヤ陽性と判定する。
 - 2) 個々の種子粉碎物から得た全ての DNA 試料液について一致した PCR 結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合、当該試料からの本試験法による遺伝子組換えパパイヤの検知は不能とする。
- (5) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、当該試料からの本試験法による遺伝子組換えパパイヤの検知は不能とする。

II. 葉の検査方法

本検査法はパパイヤの葉を対象とする。DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用い、葉粉碎物 1 点につき 2 点の DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換えパパイヤの含有の有無を判定する。

1 葉由来 DNA の抽出・精製

1.1 試料の粉碎

収去したパパイヤ葉 100 枚から、口径（外径）12.5 mm のコルクボーラーを用いて葉 1 枚につき 1 点の切片をくりぬき、集めたものを分析試料とする。残った試料については、生物検査完了までの間、 -20°C 以下で保存する。

分析試料は、滅菌蒸留水を満たした 50 mL 容チューブに入れ、ボルテックスミキサーを用いてよく洗浄する。この洗浄操作を 3 回繰り返す。試料をキムタオル上に均一に広げ、 65°C で 3 時間乾燥させる。試料が粉状になるまで乳棒又は粉碎機^{*1}を用いて十分に粉碎・攪拌した上で DNA 抽出・精製操作に供する。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター（現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター）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 3 版）コンタミネーション防止編」を参考にすること。

^{*1}シェイクマスター（BMS）を使用する場合は、15 mm ステンレスビーズ 1 個を用い 800 rpm で 1 分間の処理又は 10 mm ジルコニアビーズ 3 個を用い 1,000 rpm で 1 分間の処理により粉碎可能であることを確認している。

1.2 DNA 抽出

葉粉碎物 1 点につき 2 点の DNA 抽出物を得る。

葉粉碎物 50 mg を 2 mL 容チューブに量り採り、あらかじめ 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 500 μL 、RNase A 5 μL 加え、ボルテックスミキサーで激しく混合し、 65°C で 15 分間静置する。P3 緩衝液 162 μL を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間激しく攪拌する。氷上に 15 分間静置後、10,000 $\times g$ 以上、 15°C の条件で 10 分間遠心分離する。上清を QIAshredder spin column に負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 4 分間遠心分離後、溶出液を 1.5 mL 容チューブに移す。その溶出液の 1.5 倍量の AW1 緩衝液エタノール混液を加える。混合液 600 μL を DNeasy Mini spin column に負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次に AW2 緩衝液エタノール混液 500 μL を負荷し、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、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、DNeasy Mini spin column を乾燥させるため、10,000 $\times g$ 以上で 20 分間遠心分離する。DNeasy Mini spin column をキットの遠沈管に移し、あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌蒸留水 50 μL を加え 5 分間静置した後、10,000 $\times g$ 以上で 1 分間遠心分離し、得られた溶出液を DNA 試料原液 とする。DNA 試料原液は -20°C 以下で冷凍保存する。

2 DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

以降の操作は、「栽培用パパイヤ種子における未承認遺伝子組換えパパイヤの検査方法」に従う。なお、「種子」と記載されている部分は、「葉」に読み替える。

(別紙3)

未承認遺伝子組換えワタの種子の検査方法

本検査法はワタの種子を対象とする。GM quicker 2 (NIPPON GENE 社) を用い、種子粉碎物 1 点につき 2 点の DNA を抽出・精製する。得られた DNA 試料液を、内在性遺伝子検出用プライマー対・プローブ及び組換え遺伝子検出用プライマー対・プローブを用いたリアルタイム PCR に供し、内在性遺伝子と組換え体由来遺伝子の検出の可否により、遺伝子組換えワタの含有の有無を判定する。

1. 種子由来DNAの抽出・精製

1.1 種子の粉碎

収去したワタ種子から、破砕粒や他の混入物を取り除き、表面に他の付着物がないことを確認した後、無作為に500粒の種子を採取し、1% SDS溶液で10回洗浄後、滅菌蒸留水で3回リンスし、65℃で2時間乾燥させる。種子が十分に乾燥していない場合は、更に65℃で乾燥させる。余った種子は、生物検査完了までの間、冷蔵保管する。

乾燥した種子は、フードミル (ミルサー700G (イワタニ社) 又はその同等品) 等を用い粉碎する。粉碎後、十分に混合し均質な種子粉碎物をDNA抽出・精製操作に供する。なお、全量を一度に粉碎することが困難な場合には、複数回に分けて粉碎し、十分に混合し均質な種子粉碎物とした上でDNA抽出・精製操作に供すること。

なお、試料間のコンタミネーションを避けるため、粉碎時の環境や使用器具の取扱いには十分に配慮すること。コンタミネーションを防止するための対策については、独立行政法人農林水産消費技術センター (現・独立行政法人農林水産消費安全技術センター) 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3版) コンタミネーション防止編」を参考にすること。

1.2 種子粉碎物からのDNA抽出・精製

種子粉碎物 1 点につき 2 点のDNA抽出物を得る。

種子粉碎物 1 gを50 mL容チューブに量り採り、GE 1 緩衝液 4 mL、RNase A (100 mg/mL) 20 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、65℃で15分間静置する。GE 2-K 緩衝液500 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで30秒間混合する。4,000 \times g、室温で10分間遠心分離する。上清 1 mLを1.5 mL容チューブに分取し、13,000 \times g以上、室温で5分間遠心分離する。上清400 μ Lを新たな1.5 mL容チューブに分取し、GB 3 緩衝液150 μ L及びイソプロピルアルコール 150 μ Lを添加した後、10~12回転倒混和する。混合液全量をSpin columnに負荷した後、13,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離し、溶出液を捨てる。Spin column にGW緩衝液 650 μ Lを負荷し、13,000 \times g以上、室温で1分間遠心分離する。Spin column を新たな1.5 mL容チューブに移し、滅菌蒸留水50 μ Lを加え、室温で3分間静置した後、13,000 \times g

以上、室温で1分間遠心分離し、得られた溶出液をDNA 試料原液 とする。DNA試料原液は-20℃以下で冷凍保存する。

2. DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製及び保存

2.1 DNA試料原液中のDNAの純度の確認

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^{*1}し、200~320 nmの範囲で紫外線吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度を記録する。次いで260 nmの吸光度1.0を50 ng/μL DNAとして、DNA濃度を算出する。また260 nmの吸光度と280 nmの吸光度の比を計算する(A260/A280)。この比が1.7~2.0の場合、DNAが十分に精製されていることを示すが、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。

^{*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、使用する装置に応じ調節する。

2.2 DNA試料液の調整及び保存

純度を確認したDNA試料原液を滅菌蒸留水で希釈して20 ng/μLに調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は20 μLごとにマイクロ試料管に分注後、-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、容器内に残った溶液は保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が20 ng/μLに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

3. リアルタイムPCR (ABI PRISM™ 7900HT^{*1}) を用いた定性PCR法

組換え遺伝子検知用及び内在性遺伝子検知用とも、DNA試料液1点につき2ウェル並行で実施する。

組換え遺伝子検知用として、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「P35S」及びアグロバクテリウム・TiプラスミドNOSターミネーター遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「NOS ter」を用いる。

また、内在性遺伝子検知用として、ワタの*IVS of the putative Sinapis Arabidopsis Homolog 7 protein (SAH7)*遺伝子配列を検知するプライマー対・プローブ「Sah7」を用いる。

プライマー対・プローブの塩基配列は以下のとおりである。

^{*1} ABI PRISM™ 7900HTと同等の性能を有することを農産安全管理課が確認した他の機種を用いてもよい。

① 組換え遺伝子 (P35S) 検知プライマー対・プローブ「P35S」

P35S-F : 5'- ATT GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG T -3'

P35S-R : 5'- CCT CTC CAA ATG AAA TGA ACT TCC T -3'

P35S-P : FAM 5'- CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT -3' TAMRA

② 組換え遺伝子 (NOS ter) 検知プライマー対・プローブ「NOS ter」

TNOS-F : 5'- GTC TTG CGA TGA TTA TCA TAT AAT TTC TG -3'

TNOS-R : 5'- CGC TAT ATT TTG TTT TCT ATC GCG T -3'

TNOS-P : FAM 5'- AGA TGG GTT TTT ATG ATT AGA GTC CCG CAA -3' TAMRA

③ ワタ内在性遺伝子 (SAH7) 検知プライマー対・プローブ「Sah7」

Sah7-uni-f1: 5'- AGT TTG TAG GTT TTG ATG TTA CAT TGA G -3'

Sah7-uni-r1: 5'- GCA TCT TTG AAC CGC CTA CTG -3'

Sah7-uni-s1: FAM 5'- AAA CAT AAA ATA ATG GGA ACA ACC ATG ACA TGT -3' TAMRA

3.1 PCR用反応液の調製

PCR用反応液は、次の手順により、25 μ L/ウェルとなるように調製する。

1 ウェル当たりの試薬の分量は、TaqMan 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、25 μ mol/L）各0.5 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.5 μ L、滅菌蒸留水8.5 μ Lとする。これらを試験点数に応じ必要量混合し、PCR用のPre-mix溶液を作成して、各ウェルに22.5 μ Lずつ分注した後、各DNA試料液2.5 μ Lを添加する。PCRのブランク反応液としてDNA試料液を加えないものも同時に調製する^{*2}。また、PCRの陽性対照反応液として認証標準物質^{*3}から抽出したDNA試料液を加えたものを同時に調整する。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、専用のシーリング用アプリケーションャーを用い、注意深く行う。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^{*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} TaqMan Gene Expression 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。不十分であれば、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、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。

^{*2} Non-Template Control (NTC)

DNA試料液の添加の際、NTCにはDNA試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに2.5 μ L添加する。

^{*3} 認証標準物質 チョウ目害虫抵抗性ワタ MON531 や除草剤グリホサート耐性ワタ MON1445等、P35SやNOSTを有する遺伝子組換えワタの認証標準物質(AOCS製等)を使用する。

^{*4} 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ャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies社)及びABI

PRISM 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。

*5 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

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

3.2 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、検体の配置や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（「NTC」：Non-Template Control、「UNKN」：DNA 試料液）の設定を行う。またプローブ特性に関しては、「Reporter」を「FAM」に、「Quencher」を「TAMRA」に設定する。また、「Passive Reference」は「ROX」に設定する。ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。「Sample Volume」は 25 μ L に設定する。

3.3 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。反応条件は次のとおりである。50°C で 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 秒間保持後 60°C ・ 1 分間保持を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行い、最後に、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。

4. 結果の解析と判定

組換え遺伝子検知試験及び内在性遺伝子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 値の確認及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度 (FAM) の指数関数的な増幅曲線の確認をもって行う。

まず、組換え遺伝子検知試験の「P35S」又は「NOS ter」について、目視により Amplification plot 上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換え体陽性を疑う。次いで、ベースラインを 3 サイクルから 15 サイクルに設定し、 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) を選択する (通常、「0.2」に設定)。選択した 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、それらと交わらないよう Th. line を適宜変更する。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析する。

結果の判定には、1 検体から得られた 2 点の DNA 試料液について、1 点につき 2 ウェル並行で実施した内在性遺伝子検知試験及び組換え遺伝子検知試験の結果を用いる。

判定の手順は以下のとおり。

(1) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の「P35S」及び「NOS ter」の何れか、若しくは双方について実施し

た全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られた場合、当該試料は遺伝子組換え体陽性と判定する。

(2) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合、当該試料は遺伝子組換え体陰性と判定する。

(3) 内在性遺伝子検知試験の全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られ、かつ、組換え遺伝子検知試験の「P35S」及び「NOS ter」の何れか、若しくは双方について実施した全てのウェルで一致した結果が得られない場合、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。なお、再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても遺伝子組換え体陽性の判定が得られない場合には、当該試料からの本試験法による遺伝子組換えワタの検知は不能とする。

(4) 内在性遺伝子検知試験について、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR に複数回供した場合であっても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、再度、検体からの「1. 種子由来 DNA の抽出・精製」以降の操作を行い判定する。再度抽出・精製を行った DNA 試料液においても全てのウェルで 43 未満の Ct 値が得られない場合は、当該試料からの本試験法による遺伝子組換えワタの検知は不能とする。