（別紙）

「食品表示基準について」（新旧対照表）

※　規定全体が改正される箇所は、破線で改正前欄と改正後欄を囲って対応させています。

改正後（新）	改正前（旧）
食品表示基準について（平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号） **（総則関係）**　（略） **（加工食品）** 1　義務表示事項 （１）～（14）　（略） （15）食品表示基準別表第 19 に定めるもの ①　（略） ②　食肉製品 ア～ウ　（略） エ　缶詰及び瓶詰の食肉製品のうちコンビーフにあっては「コンビーフ」、コーンドミートにあっては「コーンドミート」（ただし、牛肉と馬肉を併用したもの（牛肉の重量が牛肉及び馬肉の合計重量の 20%以上のものに限る。）にあっては、「ニューコーンドミート」又は「ニューコンミート」）、ランチョンミートにあっては「ランチョンミート」と表示することにより、「加熱食肉製品」である旨の表示に代えることができること。	食品表示基準について（平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号） **（総則関係）**　（略） **（加工食品）** 1　義務表示事項 （１）～（14）　（略） （15）食品表示基準別表第 19 に定めるもの ①　（略） ②　食肉製品 ア～ウ　（略） エ　缶詰及び瓶詰の食肉製品のうち、缶容器又は瓶容器に内容物を入れ、密封した後、摂氏 120 度で４分間以上加圧加熱殺菌したものについては、「容器包装に入れた後加熱殺菌したもの」である旨の表示は、省略することができること。 また、缶詰及び瓶詰の食肉製品のうちコンビーフにあっては「コンビーフ」、コーンドミートにあっては「コーンドミート」（ただし、牛肉と馬肉を併用したもの（牛肉の重量が牛肉及び馬肉の合計重量の 20%以上のものに限る。）にあっては、「ニューコーンドミート」又は「ニューコ

改正後	改正前
	ンミート」)、ランチョンミートにあっては「ランチョンミート」と表示することにより、「加熱食肉製品」である旨の表示に代えることができること。
(削る。)	オ　非加熱食肉製品又は特定加熱食肉製品の pH、水分活性及び保存方法の表示は、以下の例によることができること。 (ｱ) 非加熱食肉製品 　　pH　水分活性　保存方法 表示例１　――　0.95 以上　４℃以下 表示例２　――　0.95 未満　10℃以下 表示例３　4.6 未満　――　―― 表示例４　4.6 以上　5.1 未満　0.93 未満　―― (ｲ) 特定加熱食肉製品 　　水分活性　保存方法 表示例１　0.95 以上　４℃以下 表示例２　0.95 未満　10℃以下.
オ　(略)	カ　(略)
(削る。)	キ　原料肉名について (ｱ) 食肉製品にあっては原料肉名を表示する必要があり、そのうち、魚肉である原料については「魚肉」の文字を表示する必要があるが、この場合、「魚肉（まぐろ)」等と表示しても差し支えない。 (ｲ) 鳥獣の種類については、原料鳥獣の種類を、牛、馬、豚、めん羊、山羊、カンガルー、鶏、七面鳥等のように動物名で表示すること。 　なお、２種類以上を混合したものについては、それぞれの動物名を表示すること。 (ｳ) 原料肉名の鳥獣の種類は、食肉の表示の方法と同様に表示するものであるが、この場合、羊肉はマトンと表示して差し支えないが、ラビ

③　乳、乳製品及び乳又は乳製品を主要原料とする食品

ア　種類別

(ア)・(イ)　（略）

(ウ)　乳酸菌飲料のうち、無脂乳固形分３．０％以上のものにあっては、乳製品である旨を種類別の表示に併記することとされているが、その表示は次の例の表示でも差し支えない。

（例）「種類別：乳酸菌飲料（乳製品）」、「種類別：乳製品乳酸菌飲料」

（削る。）

ット、スモール、ビーフ、ポーク、ラム、さくら肉等の表示は適当でないこと。なお、うさぎ肉、兎肉、家兎肉の表示は差し支えない。

(エ)　魚肉については、魚肉と表示することとなっているが、その種類別として「魚肉（かじき類）」、「魚肉（まぐろ類）」等と表示することは差し支えない。

(オ)　原料肉に含まれた魚肉の表示方法について魚肉の全てを魚肉と表示する場合は、鳥獣のそれぞれとの配合量と比較して多いものから順に表示すること。また、魚肉の種類別を表示する場合は、そのそれぞれを鳥獣のそれぞれとの配合分量と比較して多いものから順次に表示すること。

(カ)　(ア)から(オ)までに関わらず、食品表示基準別表第４において、別途原材料名の表示方法が規定されている食肉製品については、これらの規定に従い表示すること。

③　乳、乳製品及び乳又は乳製品を主要原料とする食品

ア　種類別

(ア)・(イ)　（略）

(ウ)　乳酸菌飲料のうち、無脂乳固形分３．０％以上のものにあっては、乳製品である旨を、殺菌したものにあってはその旨を、それぞれ種類別の表示に併記することとされているが、その表示は次の例の表示でも差し支えない。

（例）「種類別：殺菌乳酸菌飲料（乳製品）」、「種類別：乳製品乳酸菌飲料」

(エ)　種類別の文字の大きさの規定は、最小限度の文字の大きさを示すものであるので、当該容器包装の大きさ、形態、他の表示等の文字の大きさ、字体等を考慮して、当該容器包装にみあった大きさの文字で種

	類別が明らかになるように表示すること。
（削る。）	イ　殺菌温度及び時間 (ｱ) 殺菌温度 (a) 保持式により摂氏 63 度から摂氏 65 度までの間で加熱殺菌するものにあっては、「63℃～65℃」又は「63～65℃」と表示して差し支えない。 (b) 摂氏 75 度以上で加熱殺菌するものにあっては、「85℃」、「132℃」等と当該処理場で行っている実際の殺菌温度を表示し、「75℃以上」、「130℃以上」等と表示しないこと。 (ｲ) 殺菌時間 (a) 分を「′」、「m」、「min」等、秒を「″」、「s」、「sec」等と表示しないこと。 (b) 「15 分間以上」、「２秒間以上」等と表示しないこと。
（削る。）	ウ　保存の方法の表示 常温保存可能品にあっては、「常温を超えない温度で保存」等常温を超えない温度で保存を要することが明らかに分かるように表示すること。また、開封後はできる限り早く消費すること、開封後保存する場合は、10 度以下に冷却して保存すること等その適正な取扱いを容器包装に表示すること等により、消費者の啓発を十分に図ること。
（削る。）	エ　主要原料、主要混合物 (ｱ) 加糖練乳、加糖脱脂練乳及び加糖粉乳における主要な混合物とは、しょ糖をいうこと。 (ｲ) 調製粉乳及び調製液状乳における主要な混合物とは、乳又は乳製品以外に混合したもののうち主要なもの及び量の多少にかかわらず製品の組成に必要不可欠なものをいうこと。 (ｳ) 主要な混合物の重量パーセントの表示のうち、ビタミン無機塩類等

	微量栄養素については、混合量を製品 100ｇ中の重量又は国際単位で表示して差し支えない。この場合、ビタミンを「Ｖ」、国際単位を「ＩＵ」、ミリグラムを「mg」、マイクログラムを「μｇ」等と表示することは差し支えない。
イ　その他	オ　その他
(ｱ)～(ｳ)　（略）	(ｱ)～(ｳ)　（略）
（削る。）	(ｴ)　調製液状乳にあっては、調製粉乳と同様に、乳又は乳製品以外に混合したもののうち主要なもの及び量の多少にかかわらずその製品の組成に必要不可欠なものの名称及びその重量百分率を表示すること。
④　（略）	④　（略）
⑤　生かき	⑤　生かき
ア　生食用かきの採取水域の表示は、ノロウイルスに汚染されたかきにより食中毒が発生した際に、採取水域までの遡り調査を緊急に行うとともに、食中毒の被害拡大防止に資するためのものであるので、国内産かきと外国産かきを混合し、同一包装で販売しないこと。	ア　生食用かきの採取水域の表示は、小型球形ウィルス（ＳＲＳＶ）に汚染されたかきにより食中毒が発生した際に、採取水域までの遡り調査を緊急に行うとともに、食中毒の被害拡大防止に資するためのものであるので、国内産かきと外国産かきを混合し、同一包装で販売しないこと。
イ～キ　（略）	イ～キ　（略）
⑥　（略）	⑥　（略）
⑦　冷凍食品	⑦　冷凍食品
ア　名称のほか、冷凍食品である旨を表示する。 イ　凍結させる直前に加熱されたものであるかどうかの別の表示にあっては、「凍結直前未加熱」、「凍結直前加熱」など、食品衛生法に基づく規格が適用される食品であることがわかるよう、冷凍食品である旨の表示に	名称のほか、冷凍食品である旨を表示する。

近接した箇所に表示する。	
⑧　（略）	⑧　（略）
（削る。）	⑨　缶詰の食品 ア　缶詰食品にあっては、主要原材料名を表示する必要があるが、主要原材料とは、肉類（畜肉、獣肉、鳥肉、鯨肉）、魚介類、野菜及び果実をいう。この場合、これらが液状又は泥状になっているものについては、主要な原材料に含めない。 イ　原材料は、その種類名を表示する必要があるが、以下にその例を示す。 （例）畜肉にあっては、「牛」、「馬」、「豚」、「山羊」、「羊」等 鳥肉にあっては、「鶏」、「鴨」等 畜肉以外の獣肉にあっては、「兎肉」、「猪肉」等 鯨肉にあっては、「鯨」 魚介類にあっては、「タイ」、「サンマ」、「ハマグリ」等 野菜にあっては、「トマト」、「アスパラガス」、「コーン」等 果実にあっては、「リンゴ」、「ミカン」、「ナシ」等 ウ　「名称その他の表示から主要原材料が十分判断できるもの」における「その他」とは、説明文等他の表示事項中に原材料を明記してあるものを指す。
（削る。）	⑩　水のみを原料とする清涼飲料水（ミネラルウォーター類） ア　水のみを原料とする清涼飲料水をミネラルウォーター類としているが、これには、鉱水のみのもの、二酸化炭素を注入したもの、カルシウム等を添加したもの等、規格基準の第１　食品の部Ｄ　各条の項の○　清涼飲料水の２の（１）の２.の表の第１欄に掲げる事項のうち臭気、味、色度

	及び濁度に関する規定を満たすものが含まれるものであること。 イ　高濃度にフッ素を含有するミネラルウォーター類について 0.8mg／Ｌを超えるフッ素を含有する原水を用いて製造されたミネラルウォーター類にあっては、「７歳未満の乳幼児は、このミネラルウォーターの飲用を控えてください。（フッ素濃度○mg／Ｌ）」の旨の表示をすること。
（削る。）	⑪　清涼飲料水 ドリンク剤類似清涼飲料水については、容器包装の見やすい箇所（商品名と同時に見える箇所）に８ポイント以上の大きさで「清涼飲料水」又は「炭酸飲料」の文字を他の表示事項と紛らわしくないようにして明記すること。
（削る。）	⑫　豆腐 豆腐の保存基準に合う保存方法の表示は、例えば、「冷蔵すること」、「冷蔵庫又は冷水中に保存」、「冷蔵保存すること」、「要冷蔵」等その趣旨が十分に表現されているものであれば差し支えない。
（削る。）	⑬　無菌充填豆腐 無菌充填豆腐については、主要面等、消費者にとって分かりやすい場所に「常温保存可能品」の文字を表示すること。また、開封後はできる限り早く消費すること、開封後保存する場合は、10 度以下に冷却して保存すること等その適正な取扱いを容器包装に表示すること等により、消費者の啓発を十分に図ること。 また、一括表示の保存方法の欄に「冷蔵すること」、「冷蔵庫に保存」、「冷蔵保存すること」、「要冷蔵」等、冷蔵保存が必要である旨を表示する場合

	は、「常温保存可能品」の文字を表示してはならない。 なお、「常温保存可能品」の文字を表示した場合であっても、一括表示以外の場所に、保存の方法としてではなく、当該豆腐の食べ方として、「冷やしてお召し上がりください」等の文字を表示することは差し支えない。
２・３　（略）	２・３　（略）
４　任意表示 （１）　（略）	４　任意表示 （１）　（略）
（２）栄養成分の補給ができる旨及び栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨 ①・②　（略）	（２）栄養成分の補給ができる旨及び栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨 ①・②　（略）
③　栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨 ア　（略） イ　ノンオイルドレッシングの取扱いについては、食品表示基準別表第13の備考１によることとするが、ノンオイルドレッシングのうち食品表示基準別表第13の備考１の基準値（３ｇ／100ｇ未満）は満たすものの、食品表示規準別表第13の第２欄の基準値（0.5ｇ／100ｇ未満）を超えるものにあっては、消費者に適切な情報提供を図るため、原材料として食用油脂を使用していない旨及び当該食品の脂質量の由来を明らかにする旨の表示を行うよう努めること。	③　栄養成分又は熱量の適切な摂取ができる旨 ア　（略） イ　ドレッシングタイプ調味料（いわゆるノンオイルドレッシング）の取扱いについては、食品表示基準別表第13の備考１によることとするが、ノンオイルドレッシングのうち食品表示基準別表第13の備考１の基準値（３ｇ／100ｇ未満）は満たすものの、食品表示規準別表第13の第２欄の基準値（0.5ｇ／100ｇ未満）を超えるものにあっては、消費者に適切な情報提供を図るため、原材料として食用油脂を使用していない旨及び当該食品の脂質量の由来を明らかにする旨の表示を行うよう努めること。
ウ・エ　（略）	ウ・エ　（略）

（３）・（４）　（略）

５～７　（略）

（生鮮食品）～（附則）　（略）

別添　添加物１－４

各一括名の定義及びその添加物の範囲

１～13　（略）

14　膨張剤

（１）定義　パン，菓子等の製造工程で添加し，ガスを発生して生地を膨張させ多孔性にするとともに食感を向上させる添加物及びその製剤

（２）一括名　膨張剤，膨脹剤，ベーキングパウダー又はふくらし粉

（３）添加物の範囲　以下の添加物を膨張剤としての目的で使用する場合

アジピン酸	Ｌ―アスコルビン酸
塩化アンモニウム	クエン酸
クエン酸カルシウム	グルコノデルタラクトン
DL―酒石酸	Ｌ―酒石酸
DL―酒石酸水素カリウム	Ｌ―酒石酸水素カリウム
炭酸アンモニウム	炭酸カリウム（無水）
炭酸カルシウム	炭酸水素アンモニウム
炭酸水素ナトリウム	炭酸ナトリウム

（３）・（４）　（略）

５～７　（略）

（生鮮食品）～（附則）　（略）

別添　添加物１－４

各一括名の定義及びその添加物の範囲

１～13　（略）

14　膨脹剤

（１）定　義　パン，菓子等の製造工程で添加し，ガスを発生して生地を膨脹させ多孔性にするとともに食感を向上させる添加物及びその製剤

（２）一括名　膨脹剤，膨張剤，ベーキングパウダー又はふくらし粉

（３）添加物の範囲　以下の添加物を膨脹剤としての目的で使用する場合

アジピン酸	Ｌ―アスコルビン酸
塩化アンモニウム	クエン酸
クエン酸カルシウム	グルコノデルタラクトン
DL―酒石酸	Ｌ―酒石酸
DL―酒石酸水素カリウム	Ｌ―酒石酸水素カリウム
炭酸アンモニウム	炭酸カリウム（無水）
炭酸カルシウム	炭酸水素アンモニウム
炭酸水素ナトリウム	炭酸ナトリウム

炭酸マグネシウム	乳酸
乳酸カルシウム	ピロリン酸四カリウム
ピロリン酸二水素カルシウム	ピロリン酸二水素二ナトリウム
ピロリン酸四ナトリウム	フマル酸
フマル酸一ナトリウム	ポリリン酸カリウム
ポリリン酸ナトリウム	メタリン酸カリウム
メタリン酸ナトリウム	硫酸カルシウム
硫酸アルミニウムアンモニウム	硫酸アルミニウムカリウム
DL―リンゴ酸	DL―リンゴ酸ナトリウム
リン酸三カルシウム	リン酸水素二カリウム
リン酸二水素カリウム	リン酸一水素カルシウム
リン酸二水素カルシウム	リン酸水素二ナトリウム
リン酸二水素ナトリウム	

別添　アレルゲンを含む食品に関する表示

第１　アレルゲンを含む食品に関する表示の基準

１　（略）

２　表示の対象

（１）特定原材料

食物アレルギー症状を引き起こすことが明らかになった食品のうち、特に発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高いものを食品表示基準において特定原材料として定め、次の９品目の表示を義務付けている。

炭酸マグネシウム	乳酸
乳酸カルシウム	ピロリン酸四カリウム
ピロリン酸二水素カルシウム	ピロリン酸二水素二ナトリウム
ピロリン酸四ナトリウム	フマル酸
フマル酸一ナトリウム	ポリリン酸カリウム
ポリリン酸ナトリウム	メタリン酸カリウム
メタリン酸ナトリウム	硫酸カルシウム
硫酸アルミニウムアンモニウム	硫酸アルミニウムカリウム
DL―リンゴ酸	DL―リンゴ酸ナトリウム
リン酸三カルシウム	リン酸水素二カリウム
リン酸二水素カリウム	リン酸一水素カルシウム
リン酸二水素カルシウム	リン酸水素二ナトリウム
リン酸二水素ナトリウム	

別添　アレルゲンを含む食品に関する表示

第１　アレルゲンを含む食品に関する表示の基準

１　（略）

２　表示の対象

（１）特定原材料

食物アレルギー症状を引き起こすことが明らかになった食品のうち、特に発症数、重篤度から勘案して表示する必要性の高いものを食品表示基準において特定原材料として定め、次の８品目の表示を義務付けている。

えび、カシューナッツ、かに、くるみ、小麦、そば、卵、乳、落花生（ピーナッツ）	えび、かに、くるみ、小麦、そば、卵、乳、落花生（ピーナッツ）
（２）特定原材料に準ずるもの 食物アレルギー症状を引き起こすことが明らかになった食品のうち、症例数や重篤な症状を呈する者の数が継続して相当数みられるが、特定原材料に比べると少ないものを特定原材料に準ずるものとして、次の 20 品目を原材料として含む加工食品については、当該食品を原材料として含む旨を可能な限り表示するよう努めることとする。	（２）特定原材料に準ずるもの 食物アレルギー症状を引き起こすことが明らかになった食品のうち、症例数や重篤な症状を呈する者の数が継続して相当数みられるが、特定原材料に比べると少ないものを特定原材料に準ずるものとして、次の 20 品目を原材料として含む加工食品については、当該食品を原材料として含む旨を可能な限り表示するよう努めることとする。
アーモンド、あわび、いか、いくら、オレンジ、キウイフルーツ、牛肉、ごま、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、ピスタチオ、豚肉、マカダミアナッツ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン	アーモンド、あわび、いか、いくら、オレンジ、カシューナッツ、キウイフルーツ、牛肉、ごま、さけ、さば、大豆、鶏肉、バナナ、豚肉、マカダミアナッツ、もも、やまいも、りんご、ゼラチン
（３）　（略）	（３）　（略）
３　表示の方法 （１）～（５）　（略）	３　表示の方法 （１）～（５）　（略）
（６）その他留意事項 ①～④　（略）	（６）その他留意事項 ①～④　（略）
⑤　特定原材料に準ずるものについては、表示が義務付けられておらず、その表示を欠く場合、アレルギー疾患を有する者は当該食品が「特定原材料に準ずるものを使用していない」又は「特定原材料に準ずるものを使用しているが、表示がされていない」のいずれであるかを正確	⑤　特定原材料に準ずるものについては、表示が義務付けられておらず、その表示を欠く場合、アレルギー疾患を有する者は当該食品が「特定原材料に準ずるものを使用していない」又は「特定原材料に準ずるものを使用しているが、表示がされていない」のいずれであるかを正確

に判断することが困難となっている。このため、アレルゲンを含む食品の表示の対象が「特定原材料9品目」又は「特定原材料に準ずる20品目を含む29品目」のいずれであるかを一括表示の外へ表示するよう努めること。特に「特定原材料9品目」のみを表示対象としている場合は、ウェブサイト等の活用及び電話等による消費者からの問合せへの対応等、情報提供の充実を図られたい。

⑥～⑧　（略）

第２・第３　（略）

別表１

特定原材料等の範囲

特定原材料等	分類番号（１）	分類番号（２）	大分類	中分類	小分類
えび	（略）				
カシューナッツ	69	8594	殻果類	その他の殻果類	カシューナッツ
かに	（略）				
くるみ	69	8591	殻果類	その他の殻果類	くるみ
（削る。）					

に判断することが困難となっている。このため、アレルゲンを含む食品の表示の対象が「特定原材料8品目」又は「特定原材料に準ずる20品目を含む28品目」のいずれであるかを一括表示の外へ表示するよう努めること。特に「特定原材料8品目」のみを表示対象としている場合は、ウェブサイト等の活用及び電話等による消費者からの問合せへの対応等、情報提供の充実を図られたい。

⑥～⑧　（略）

第２・第３　（略）

別表１

特定原材料等の範囲

特定原材料等	分類番号（１）	分類番号（２）	大分類	中分類	小分類
えび	（略）				
（加える。）					
かに	（略）				
（加える。）					
卵	70	31	食用鳥卵	鶏卵	
	70	32	〃	あひるの卵	
	70	33	〃	うずらの卵	
	70	39	〃	その他の食用鳥	

（略）					
そば	（略）				
卵	70	31	食用鳥卵	鶏卵	
	70	32	〃	あひるの卵	
	70	33	〃	うずらの卵	
	70	39	〃	その他の食用鳥	

				卵	
	73	3111	鶏卵の加工製品	液鶏卵	全液鶏卵
	73	3112	〃	〃	卵白液鶏卵
	73	3113	〃	〃	卵黄液鶏卵
	73	3121	〃	粉末鶏卵	全粉鶏卵
	73	3122	〃	〃	卵白粉鶏卵
	73	3124	〃	〃	卵黄粉鶏卵
	73	313	〃	鶏卵加工冷凍食品	
	73	319	〃	その他の鶏卵加工製品	
	73	391	その他の加工卵製品	あひるの卵の加工製品	
	73	392	〃	うずらの卵の加工製品	
	73	399	〃	他に分類されない加工卵製品	
（略）					
そば	（略）				

（加える。）

				卵	
	73	3111	鶏卵の加工製品	液鶏卵	全液鶏卵
	73	3112	〃	〃	卵白液鶏卵
	73	3113	〃	〃	卵黄液鶏卵
	73	3121	〃	粉末鶏卵	全粉鶏卵
	73	3122	〃	〃	卵白粉鶏卵
	73	3124	〃	〃	卵黄粉鶏卵
	73	313	〃	鶏卵加工冷凍食品	
	73	319	〃	その他の鶏卵加工製品	
	73	391	その他の加工卵製品	あひるの卵の加工製品	
	73	392	〃	うずらの卵の加工製品	
	73	399	〃	他に分類されない加工卵製品	
乳	－	－	乳	生乳	
分類は食品	－	－	〃	牛乳	
衛生法乳等	－	－	〃	特別牛乳	
命令に準じ	－	－	〃	成分調整牛乳	
る	－	－	〃	低脂肪牛乳	
牛乳及びチ	－	－	〃	無脂肪牛乳	

（加える。）

ーズを含む	–	–	〃	加工乳	
	–	–	乳製品	クリーム	
	–	–	〃	バター	
	–	–	〃	バターオイル	
	–	–	〃	チーズ	ナチュラルチーズ
	–	–	〃	〃	プロセスチーズ
	–	–	〃	濃縮ホエイ	
	–	–	〃	アイスクリーム類	アイスクリーム
	–	–	〃	〃	アイスミルク
	–	–	〃	〃	ラクトアイス
	–	–	〃	濃縮乳	
	–	–	〃	脱脂濃縮乳	
	–	–	〃	無糖練乳	
	–	–	〃	無糖脱脂練乳	
	–	–	〃	加糖練乳	
	–	–	〃	加糖脱脂練乳	
	–	–	〃	全粉乳	
	–	–	〃	脱脂粉乳	
	–	–	〃	クリームパウダー	
	–	–	〃	ホエイパウダー	
	–	–	〃	たん白質濃縮ホエイパウダー	

	－	－	〃	バターミルクパウダー	
	－	－	〃	加糖粉乳	
	－	－	〃	調製粉乳	
	－	－	〃	調製液状乳	
	－	－	〃	発酵乳	
	－	－	〃	乳酸菌飲料	
	－	－	〃	乳飲料	
	－	－	乳又は乳製品を主原料とする食品		
（略）					
オレンジ	（略）				
（削る。）					
（略）					
牛肉	（略）				
（削る。）					
（略）					
バナナ	（略）				
ピスタチオ	69	8595	殻果類	その他の殻果類	ピスタチオナッツ
（略）					
（削る。）					

（略）					
オレンジ	（略）				
カシューナッツ	69	8594	殻果類	その他の殻果類	カシューナッツ
（略）					
牛肉	（略）				
くるみ	69	8591	殻果類	その他の殻果類	くるみ
（略）					
バナナ	（略）				
（加える。）					
（略）					
※分類番号が無いものの分類					

（削る。）

乳			乳	生乳	
分類は食品			〃	牛乳	
衛生法乳等			〃	特別牛乳	
命令に準じ			〃	成分調整牛乳	
る牛乳及び			〃	低脂肪牛乳	
チーズを含			〃	無脂肪牛乳	
む			〃	加工乳	
			乳製品	クリーム	
			〃	バター	
			〃	バターオイル	
			〃	チーズ	ナチュラルチーズ
			〃	〃	プロセスチーズ
			〃	濃縮ホエイ	
			〃	アイスクリーム類	アイスクリーム
			〃	〃	アイスミルク
			〃	〃	ラクトアイス
			〃	濃縮乳	
			〃	脱脂濃縮乳	
			〃	無糖練乳	
			〃	無糖脱脂練乳	
			〃	加糖練乳	
			〃	加糖脱脂練乳	
			〃	全粉乳	

ゼラチン	－	－			

別表２

特定原材料等由来の添加物についての表示例

			〃	脱脂粉乳	
			〃	クリームパウダー	
			〃	ホエイパウダー	
			〃	たん白質濃縮ホエイパウダー	
			〃	バターミルクパウダー	
			〃	加糖粉乳	
			〃	調製粉乳	
			〃	調製液状乳	
			〃	発酵乳	
			〃	乳酸菌飲料	
			〃	乳飲料	
			乳又は乳製品を主原料とする食品		
ゼラチン	（加える。）	（加える。）			

別表２

特定原材料等由来の添加物についての表示例

1　特定原材料

特定原材料の名称	区分	添加物名	特定原材料の表示	備考
えび かに	（略）			
カシューナッツ	―	―	―	―
（略）				

2　特定原材料に準ずるもの

特定原材料に準ずるものの名称	区分	添加物名	特定原材料に準ずるものの表示	備考
（略）				
オレンジ	（略）			
（削る。）				
（略）				
バナナ	（略）			
ピスタチオ	―	―	―	―
（略）				

（注）　（略）

別表３

特定原材料等の代替表記等方法リスト

1　特定原材料

1　特定原材料

特定原材料の名称	区分	添加物名	特定原材料の表示	備考
えび かに	（略）			
（加える。）				
（略）				

2　特定原材料に準ずるもの

特定原材料に準ずるものの名称	区分	添加物名	特定原材料に準ずるものの表示	備考
（略）				
オレンジ	（略）			
カシューナッツ	―	―	―	―
（略）				
バナナ	（略）			
（加える。）				
（略）				

（注）　（略）

別表３

特定原材料等の代替表記等方法リスト

1　特定原材料

特定原材料（食品表示基準で定められた品目）	代替表記	拡大表記（表記例）
	表記方法や言葉が違うが、特定原材料と同一であるということが理解できる表記	特定原材料名又は代替表記を含んでいるため、これらを用いた食品であると理解できる表記例
えび	（略）	
カシューナッツ		
（略）		

※　（略）

2　特定原材料に準ずるもの

通知で定められた品目	代替表記	拡大表記（表記例）
	表記方法や言葉が違うが、特定原材料に準ずるものと同一であるということが理解できる表記	特定原材料に準ずるものの名称又は代替表記を含んでいるため、これらを用いた食品であると理解できる表記例
（略）		
オレンジ	（略）	
（削る。）		
（略）		
バナナ	（略）	
ピスタチオ	ピスタチオナッツ	
（略）		

特定原材料（食品表示基準で定められた品目）	代替表記	拡大表記（表記例）
	表記方法や言葉が違うが、特定原材料と同一であるということが理解できる表記	特定原材料名又は代替表記を含んでいるため、これらを用いた食品であると理解できる表記例
えび	（略）	
（加える。）		
（略）		

※　（略）

2　特定原材料に準ずるもの

通知で定められた品目	代替表記	拡大表記（表記例）
	表記方法や言葉が違うが、特定原材料に準ずるものと同一であるということが理解できる表記	特定原材料に準ずるものの名称又は代替表記を含んでいるため、これらを用いた食品であると理解できる表記例
（略）		
オレンジ	（略）	
カシューナッツ		
（略）		
バナナ	（略）	
（加える。）		
（略）		

最終改正：2026年４月１日	（加える。）
別添　アレルゲンを含む食品の検査方法	別添　アレルゲンを含む食品の検査方法
序文～2.1.2.　（略）	序文～2.1.2.　（略）
2.2. 定性検査法 2.2.1. 定性検査法の概要 定性検査法には、ウエスタンブロット法、PCR法、リアルタイムPCR法、PCR-核酸クロマト法やLC-MS/MS法がある。一般的に、卵、乳についてはウエスタンブロット法、えび、かにについてはPCR法、小麦、そば、落花生についてはPCR法又はリアルタイムPCR法、くるみについてはリアルタイムPCR法又はPCR-核酸クロマト法、カシューナッツについてはリアルタイムPCR法、PCR-核酸クロマト法又はLC-MS/MS法が用いられる。 なお、ウエスタンブロット法、PCR法、リアルタイムPCR法、PCR-核酸クロマト法及びLC-MS/MS法以外の定性検査法を用いることは妨げないが、この場合には、これらの検査法と同等又は同等以上の性能を持っていること。 操作に当たっては、試薬、注意事項を含め各検査の説明書に記載された手技に従って検査する。	2.2. 定性検査法 2.2.1. 定性検査法の概要 定性検査法には、ウエスタンブロット法、PCR法、リアルタイムPCR法やPCR-核酸クロマト法がある。一般的に、卵、乳については、ウエスタンブロット法が用いられる。一方、えび、かにについては一般的にPCR法、小麦、そば、落花生については一般的にPCR法又はリアルタイムPCR法、くるみについては一般的にリアルタイムPCR法又はPCR-核酸クロマト法が用いられる。 なお、ウエスタンブロット法、PCR法、リアルタイムPCR法、PCR-核酸クロマト法以外の定性検査法を用いることは妨げないが、この場合には、これらの検査法と同等又は同等以上の性能を持っていること。 操作に当たっては、試薬、注意事項を含め各検査の説明書に記載された手技に従って検査する。
2.2.2.　（略）	2.2.2.　（略）
2.2.3. PCR法 食品からDNA抽出を行い、得られたDNA試料液を用いて以下に示す定性PCRを行う。なお、DNA抽出は１調製試料につき２点並行で行い、それ以降、PCR増幅産物の確認に至るまでの全操作は、この２点に対し独立並行で行う。	2.2.3. PCR法 食品からのDNA抽出精製法（2.2.3.2.）に従いDNA抽出を行い、得られたDNA試料液を用いて以下に示す定性PCRを行う。なお、DNA抽出は１調製試料につき２点並行で行い、それ以降、PCR増幅産物の確認に至るまでの全操作は、この２点に対し独立並行で行う。

2.2.3.1.～2.2.3.5.　（略）

2.2.3.5.1.　落花生を対象としたPCR検査結果の判定

（略）

2.2.3.5.2.　そばを対象としたPCR検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpのPCR増幅バンドが検出され、そば検出用プライマー対を用いたレーンで127 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はそば陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.3.5.3.　小麦を対象としたPCR検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpのPCR増幅バンドが検出され、小麦検出用プライマー対を用いたレーンで141bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は小麦陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.3.5.4.　えびを対象としたPCR検査結果の判定

（略）

2.2.3.5.5.　かにを対象としたPCR検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、かに検出用プライマー

2.2.3.1.～2.2.3.5.　（略）

2.2.3.5.1.　落花生を対象とした検査結果の判定

（略）

2.2.3.5.2.　そばを対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpのPCR増幅バンドが検出され、そば検出用プライマー対を用いたレーンで127 bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はそば陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.3.5.3.　小麦を対象とした検査結果の判定

植物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bpのPCR増幅バンドが検出され、小麦検出用プライマー対を用いたレーンで141bpのPCR増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体は小麦陽性と判定する。なお、結果判定の手順、判定例、及び注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.3.5.4.　えびを対象とした検査結果の判定

（略）

2.2.3.5.5.　かにを対象とした検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、かに検出用プライマー

対を用いたレーンで 62 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はかに陽性と判定する*。なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

＊ 偽陽性を示すかにの種類

シャコは偽陽性を示すことが確認されている。その他にも一部のえびで偽陽性を示すものがあることが確認されている。

2.2.4.～2.2.4.2.　（略）

2.2.4.3. 定性リアルタイム PCR 法

定性リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅をリアルタイムでモニターする方法として数種の手法があるが、ここではプローブ法を用いる。プローブ法では、5’末端を蛍光物質で、3’末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチド（プローブ）を PCR の反応系に加える。プローブは、アニーリングステップで標的とする DNA 配列に特異的にハイブリダイズし、伸長反応の際に分解されてクエンチャー物質による蛍光抑制が解除されることで、蛍光物質由来の蛍光を発する。この蛍光を専用の装置を用いて検出することにより PCR 増幅をリアルタイムでモニターし、その結果を解析する。留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.）と同様である。

2.2.4.3.1. PCR 増幅のリアルタイム測定

定性リアルタイム PCR 法により検知が可能な特定原材料は小麦、そば、落花生、くるみ、カシューナッツの 5 種である。その各につきリアルタイム PCR 増幅の条件が異なる。2.2.4.3.2. から 2.2.4.3.6. までに記載する方法のうち、検査対象とする特定原材料種に即した方法を用いて検査を行う。また、各検査とも、1 調製試料より 2 点並行で抽

対を用いたレーンで 62 bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、本検査対象検体はかに陽性と判定する*。なお、結果判定の手順、判定例、ならびに注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

＊ 偽陽性を示すかにの種類

シャコは偽陽性を示すことが確認されている。その他にも一部のえびで偽陽性を示すものがあることが確認されている。

2.2.4.～2.2.4.2.　（略）

2.2.4.3. 定性リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法は、PCR 増幅をリアルタイムでモニターする方法であり、数種の手法があるが、ここではプローブ法を用いる。プローブ法では、5’末端を蛍光物質で、3’末端をクエンチャー物質で修飾したオリゴヌクレオチド（プローブ）を PCR の反応系に加える。プローブは、アニーリングステップで標的とする DNA 配列に特異的にハイブリダイズし、伸長反応の際に分解されてクエンチャー物質による蛍光抑制が解除されることで、蛍光物質由来の蛍光を発する。この蛍光を専用の装置を用いて検出することにより PCR 増幅をリアルタイムでモニターし、その結果を解析する。留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.）と同様である。

2.2.4.3.1. リアルタイム PCR 増幅

定性リアルタイム PCR 法により検知が可能な特定原材料は小麦、そば、落花生、くるみの 4 種である。その各につきリアルタイム PCR 増幅の条件が異なる。2.2.4.3.2. から 2.2.4.3.6. までに記載する方法のうち、検査対象とする特定原材料種に即した方法を用いて検査を行う。また、各検査とも、1 調製試料より 2 点並行で抽出された DNA の各々

出された DNA の各々を規定濃度に調製した後、リアルタイム PCR 法の鋳型 DNA として供する。まず、リアルタイム PCR の増幅曲線を植物 DNA 検出用リアルタイム PCR プライマー対とプローブ*1*3*4 又は動物 DNA 検出用リアルタイム PCR プライマー対とプローブ*2*3*5 を用いて取得する、あるいは 2.2.3.3.1.に従って植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR を行い、その結果を 2.2.3.5.に記載のある判定例に照らして判じ、判定に準じて検査対象である特定原材料のリアルタイム PCR 増幅を行う。

*1　植物 DNA 検出用のリアルタイム PCR プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

植物 DNA 検出用リアルタイム PCR プライマー対（増幅長 124 bp）
5’プライマー（CP03-5’）: 5’-CGGACGAGAATAAAGATAGAGT-3’
3’プライマー（CP03-3’）: 5’-TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA-3’
プローブ（CP03-probe）: 5’-FAM-AGGAAAATCCGT-MGB-3’

*2　動物 DNA 検出用のリアルタイム PCR プライマー対及びプローブは以下のとおりである。

動物 DNA 検出用プライマー対（増幅長 370-470 bp）
5’プライマー(AN-5’)：
AN1-5’: 5’-TGACCGTGCGAAGGTAGC-3’
AN2-5’: 5’-TAACTGTGCTAAGGTAGC-3’
AN1-5’及び AN2-5’を 1:1 の比率で混合して使用する。
3’プライマー（AN-3’）: 5’-CTTAATTCAACATCGAGGTC-3’
プローブ（AN-probe）: 5’- FAM-CGCTGTTATCCC-MGB-3’

*3　植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対の性質、及び留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.1.）と同様である。

*4　植物 DNA 検出用のリアルタイム PCR 反応条件は以下のとおりであ

を規定濃度に調製した後、リアルタイム PCR 法の鋳型 DNA として供する。まず、2.2.3.3.1 に従って植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR を行い、その結果を 2.2.3.5.に記載のある判定例に照らして判じ、判定に準じて検査対象である特定原材料のリアルタイム PCR 増幅を行う。

（加える。）

（加える。）

（加える。）

（加える。）

る。

反応液は、反応試料管にリアルタイム PCR 試薬*6 10 μL、5’及び 3’プライマー（いずれも 12.5 μM） それぞれ 0.8 μL、プローブ（10 μM）0.4 μL、及び水 5.5 μL を含むマスターミックス（下記表参照）に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*7 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL にする。DNA 試料液の代わりに陽性コントロール溶液*8 2.5 μL を加えたものを調製し、結果の判定の際に基準とすることが望ましい。PCR のブランク反応液として、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。 次に、その反応試料管をリアルタイム PCR 増幅装置*9 にセットする。反応条件は次のとおりである。95℃に 15 分間保ち反応を開始させた後、95 15 秒、55℃ 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルのリアルタイム PCR 増幅を行う。Reporter、Quencher の入力が必要な装置の場合は、Reporter は FAM に、Quencher は NFQ-MGB（又は None）に設定する。

マスターミックス組成（植物）

試薬	1 反応液当たり必要量（μL）
リアルタイム PCR 試薬*6	10
5’プライマー（12.5 μM）	0.8
3’プライマー（12.5μM）	0.8
プローブ（10 μM）	0.4
水	5.5
合計	17.5

*5 動物 DNA 検出用のリアルタイム PCR 反応条件は以下のとおりである。

（加える。）

反応液は、反応試料管にリアルタイム PCR 試薬*6 10 μL、5’プライマーAN1 及び 2（12.5 μM）それぞれ 0.4 μL、3’プライマー（12.5 μM）0.8 μL、プローブ（10 μM）0.4 μL、及び水 5.5 μL を含むマスターミックス（下記表参照）に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*7 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL にする。DNA 試料液の代わりに陽性コントロール溶液*8 2.5 μL を加えたものを調製し、結果の判定の際に基準とすることが望ましい。PCR のブランク反応液として、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。次に、その反応試料管をリアルタイム PCR 増幅装置*9 にセットする。反応条件は次のとおりである。95℃に 15 分間保ち反応を開始させた後、95℃ 15 秒、55℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルのリアルタイム PCR 増幅を行う。Reporter、Quencher の入力が必要な装置の場合は、Reporter は FAM に、Quencher は NFQ-MGB（又は None）に設定する。

マスターミックス組成（動物）

試薬	1 反応液当たり必要量（μL）
リアルタイム PCR 試薬*6	10
5’プライマーAN1-5’（12.5μM）	0.4
5’プライマーAN2-5’（12.5μM）	0.4
3’プライマー（12.5μM）	0.8
プローブ（10 μM）	0.4
水	5.5
合計	17.5

*6 リアルタイム PCR 試薬は、QuantiTect Probe PCR Master Mix（キアゲン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

（加える。）

*7　原則として DNA 試料液は 20 ng/μL の濃度で調製することとするが、検査対象検体によっては DNA の抽出効率が悪く、それ以下の濃度でしか調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、原則に最も近い最大の濃度で調製し、DNA 試料液とする。

*8　陽性コントロール溶液は DNA 量として 0.25 fg(50 コピー相当)の「植物検出用陽性コントロールテンプレート」又は「動物検出用陽性コントロールテンプレート」(オリエンタル酵母工業社製)、あるいは同等の結果が得られるものを用いる。なお、陽性コントロール溶液の解析結果は、DNA 試料液中に植物由来 DNA 又は動物由来 DNA が含まれているかを確認する際、判定の基準となる規定値として用いることができる。

*9　リアルタイム PCR 増幅装置は、上記の温度条件が達成できる装置を使用すること。なお、新しく条件を設定する際には、蛍光データの取得が適切に設定されているかを確認すること。

2.2.4.3.2. 落花生の検知を目的とした PCR 増幅のリアルタイム測定

(削る。)

（略）

(削る。)

2.2.4.3.2. 落花生の検知を目的としたリアルタイム PCR 法

2.2.4.3.2.1. リアルタイム PCR 増幅

（略）

2.2.4.3.2.2. リアルタイム PCR 増幅結果の解析

リアルタイム PCR 装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれの DNA 試料液についてリアルタイム PCR 増幅の有無を判断する。解析時に任意の Threshold Line を設定できる機種(ABI 7900HT 等) の場合、高濃度プラスミド溶液をリアルタイム PCR 増幅した反応試料管のみで、Analysis Settings で Threshold Line、及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、Cq 値 (Ct 値)

2.2.4.3.3. そばの検知を目的としたPCR増幅のリアルタイム測定

（削る。）

2.2.4.3.2.に従って行う。ただし、5’プライマーと3’プライマーの濃度はいずれも25 μMである。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はそば検出用プライマー対及びプローブである。

＊ （略）

（削る。）

を算出する。得られたThreshold Lineの値を、小数点以下7桁目を四捨五入した下6桁まで記録する。次に、リアルタイムPCR増幅した全ての反応試料管に対し、記録したThreshold Lineの値を用いてCq値を算出する。上記の解析を実施できない場合、又はその他の機種の場合、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対してCq値を算出する。DNA試料液において、算出されたCq値が、2点並行で測定した基準プラスミド溶液の平均Cq値より小さかった場合、標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断する。なお、2点並行で測定した基準プラスミド溶液の平均 Cq 値から2点並行で測定した高濃度プラスミド溶液の平均Cq値を差し引いた値が4.6～6.6から外れた場合、本法によるリアルタイムPCR増幅は妥当に行われなかったと判断し、リアルタイムPCR増幅をやり直す。また、ブランク反応液で標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、実験環境からのコンタミネーションがあったと判断し、リアルタイムPCR増幅をやり直す。

2.2.4.3.3. そばの検知を目的としたリアルタイムPCR法

2.2.4.3.3.1. リアルタイムPCR増幅

2.2.4.3.2.1.に従って行う。ただし、5’プライマーと3’プライマーの濃度はいずれも25 μMである。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はそば検出用プライマー対及びプローブである。

＊ （略）

2.2.4.3.3.2. リアルタイムPCR増幅結果の解析

2.2.4.3.2.2.に従って行う。

2.2.4.3.4. 小麦の検知を目的としたPCR増幅のリアルタイム測定

（削る。）

2.2.4.3.2.に従って行う。5’プライマーと3’プライマーの濃度はいずれも50 μMである。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*は小麦検出用プライマー対及びプローブである。

* （略）

（削る。）

2.2.4.3.5. くるみの検知を目的としたPCR増幅のリアルタイム測定

2.2.4.3.5.1. くるみ-H法

2.2.4.3.2.に従って行う。ただし、5’プライマーと3’プライマーの濃度はいずれも25 μMである。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はくるみ検出用プライマー対及びプローブである。

* （略）

2.2.4.3.5.2. くるみ-N法

（削る。）

（削る。）

（削る。）

（略）

2.2.4.3.6. カシューナッツの検知を目的としたPCR増幅のリアルタイム測定

2.2.4.3.4. 小麦の検知を目的としたリアルタイムPCR法

2.2.4.3.4.1. リアルタイムPCR増幅

2.2.4.3.2.1.に従って行う。5’プライマーと3’プライマーの濃度はいずれも50 μMである。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*は小麦検出用プライマー対及びプローブである。

* （略）

2.2.4.3.4.2. リアルタイムPCR増幅結果の解析

2.2.4.3.2.2.に従って行う。

2.2.4.3.5. くるみの検知を目的としたリアルタイムPCR-H法

2.2.4.3.5.1. リアルタイムPCR増幅

2.2.4.3.2.1.に従って行う。ただし、5’プライマーと3’プライマーの濃度はいずれも25 μMである。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はくるみ検出用プライマー対及びプローブである。

* （略）

2.2.4.3.5.2. リアルタイムPCR増幅結果の解析

2.2.4.3.2.2.に従って行う。

2.2.4.3.6. くるみの検知を目的としたリアルタイムPCR-N法

2.2.4.3.6.1. リアルタイムPCR増幅

（略）

（加える。）

2.2.4.3.6.1. カシューナッツ-H法 2.2.4.3.2.に従って行う。ただし、5’プライマーと3’プライマーの濃度はいずれも25 μMである。また、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブである。 * H法のカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。 5’プライマー (AoI1F7) : 5’ - CTCCCGTCGCCCCGTG-3’ 3’プライマー (AoI1R4) : 5’ - CTGACAATGAAAGGAGGCAACGCT-3’ プローブ (AoI1P) : 5’-FAM- CGGTGCGCGTGCGGGA-MGB-3’	(加える。)
2.2.4.3.6.2. カシューナッツ-N法 2.2.4.3.5.2.に従って行う。ただし、5’プライマー、3’プライマー及びプローブ*はカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブである。 * N法のカシューナッツ検出用プライマー対及びプローブは以下のとおりである。 5’プライマー (ANAr-F) : 5’ - GAGTCGCGCCAAGGAATCTTAC-3’ 3’プライマー (ANAr-R) : 5’ - CGTTGCCGAGAGTCGTCACT-3’ プローブ (ANAr-P) : 5’-FAM- CCGTGCTCGGTGCG-MGB-3’	(加える。)
2.2.4.4. 結果の解析 2.2.4.4.1. リアルタイムPCR測定結果の解析 リアルタイムPCR装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれのDNA試料液についてリアルタイムPCR増幅の有無を判断する。Threshold Lineを用いる機種（ABI 7500等）の場合は、Analysis	2.2.4.3.6.2. リアルタイムPCR増幅結果の解析 (加える。) リアルタイムPCR装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれのDNA試料液についてリアルタイムPCR増幅の有無を判断する。Threshold Line を用いる機種 （ABI 7500 等）の場合は、

改正後	改正前
Settings で Threshold Line、及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、全ての Cq 値を算出する。その他の機種（Roche LightCycler 96 等）の場合は、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対して Cq 値を算出する。 なお、高感度 ROX 装置等の使用により ROX のレベルが高い場合は、ノーマライザーとしての ROX チャネルの補正を解除し、Cq 値を算出する。 植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR の結果を 2.2.3.5 に記載のある判定例に照らして判ずるに当たり、まず、ブランク反応液で Cq 値が規定値* より大きいことを確認した後、DNA 試料液の測定結果を確認する。Cq 値が規定値以下の試料液は、標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断する。	Analysis Settings で Threshold Line、及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、全ての Cq 値を算出する。その他の機種（Roche LightCycler 96 等）の場合は、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対して Cq 値を算出する。ブランク反応液で Cq 値が得られていないことを確認した後、DNA 試料液の測定結果を確認する。Cq 値が得られている試料液は、標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断する。
*　規定値 植物 DNA を検出する場合：36、あるいは、陽性コントロール溶液の解析結果（平均値）と比べ、いずれかのより小さい値を選択する。 動物 DNA を検出する場合：38、あるいは、陽性コントロール溶液の解析結果（平均値）と比べ、いずれかのより小さい値を選択する。	（加える。）
2.2.4.4.2. 落花生の検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析 リアルタイム PCR 装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれの DNA 試料液についてリアルタイム PCR 増幅の有無を判断する。解析時に任意の Threshold Line を設定できる機種（ABI 7900HT	（加える。）

等）の場合、高濃度プラスミド溶液をリアルタイム PCR 増幅した反応試料管のみで、Analysis Settings で Threshold Line 及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、Cq 値（Ct 値）を算出する。得られた Threshold Line の値を、小数点以下７桁目を四捨五入した下６桁まで記録する。次に、リアルタイム PCR 増幅した全ての反応試料管に対し、記録した Threshold Line の値を用いて Cq 値を算出する。上記の解析を実施できない場合、又はその他の機種の場合、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対して Cq 値を算出する。DNA 試料液において、算出された Cq 値が、２点並行で測定した基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかった場合、標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断する。なお、２点並行で測定した基準プラスミド溶液の平均 Cq 値から２点並行で測定した高濃度プラスミド溶液の平均 Cq 値を差し引いた値が 4.6～6.6 から外れた場合、本法によるリアルタイム PCR 増幅は妥当に行われなかったと判断し、リアルタイム PCR 増幅をやり直す。また、ブランク反応液で標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、実験環境からのコンタミネーションがあったと判断し、リアルタイム PCR 増幅をやり直す。	
2.2.4.4.3. そばの検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析 2.2.4.4.2. に従って行う。	（加える。）
2.2.4.4.4. 小麦の検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析 2.2.4.4.2. に従って行う。	（加える。）
2.2.4.4.5. くるみの検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析	（加える。）

2.2.4.4.5.1. くるみ-H 法 2.2.4.4.2.に従って行う。	（加える。）
2.2.4.4.5.2. くるみ-N 法 リアルタイム PCR 装置によって得られた蛍光シグナルを解析し、それぞれの DNA 試料液についてリアルタイム PCR 増幅の有無を判断する。Threshold Line を用いる機種 （ABI 7500 等）の場合は、Analysis Settings で Threshold Line 及び Baseline が Auto 設定になっていることを確認した後、全ての Cq 値を算出する。その他の機種（Roche LightCycler 96 等）の場合は、絶対定量用の解析ツールによって、装置の初期設定の解析条件で全ての反応試料管に対して Cq 値を算出する。ブランク反応液で Cq 値が得られていないことを確認した後、DNA 試料液の測定結果を確認する。Cq 値が得られている試料液は、標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断する。	（加える。）
2.2.4.4.6. カシューナッツの検知を目的としたリアルタイム PCR 測定結果の解析	（加える。）
2.2.4.4.6.1. カシューナッツ-H 法 2.2.4.4.2.に従って行う。	（加える。）
2.2.4.4.6.2. カシューナッツ-N 法 2.2.4.4.5.2.に従って行う。	（加える。）
2.2.4.5. 結果の判定	2.2.4.4. 結果の判定
2.2.4.5.1. 落花生を対象としたリアルタイム PCR 検査結果の判定	2.2.4.4.1. 落花生を対象とした検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたリアルタイムPCRで、Cq値が規定値以下であり指数関数的にDNAが増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅反応液の電気泳動で124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出されており、落花生の検知を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体は落花生陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.4.5.2. そばを対象としたリアルタイムPCR検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたリアルタイムPCRで、Cq値が規定値以下であり指数関数的にDNAが増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅反応液の電気泳動で124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出されており、そばの検知を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はそば陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.4.5.3. 小麦を対象としたリアルタイムPCR検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたリアルタイムPCRで、Cq値が規定値以下であり指数関数的にDNAが増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたPCR増幅反応液の電気泳動で124 bp又は370-470 bpのPCR増幅

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、落花生の検知を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体は落花生陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.4.4.2. そばを対象とした検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、そばの検知を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はそば陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.4.4.3. 小麦を対象とした検査結果の判定

植物又は動物DNA検出用プライマー対を用いたレーンで124 bp又は370-470 bpのPCR増幅バンドが検出され、小麦の検知を目的としたリアルタイムPCR法において標的とする配列がリアルタイムPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体は小麦陽性と判定する。

バンドが検出されており、小麦の検知を目的としたリアルタイム PCR 法において標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体は小麦陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.4.5.4. くるみを対象としたリアルタイム PCR 検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR で、Cq 値が規定値以下であり指数関数的に DNA が増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出されており、くるみの検知を目的としたリアルタイム PCR 法において標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はくるみ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.4.5.5. カシューナッツを対象としたリアルタイム PCR 検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたリアルタイム PCR で、Cq 値が規定値以下であり指数関数的に DNA が増幅する適切な増幅曲線が得られている、あるいは植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出されており、カシューナッツの検知を目的としたリアルタイム PCR 法において標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.4.4.4. くるみを対象とした検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたレーンで 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出され、くるみの検知を目的としたリアルタイム PCR 法において標的とする配列がリアルタイム PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はくるみ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

（加える。）

花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

2.2.5.～2.2.5.2.　（略）

2.2.5.3.　定性 PCR-核酸クロマト法

PCR-核酸クロマト法は、タグのついたプライマーを用いて PCR 増幅を行い、その増幅産物を専用のストリップに展開させて（核酸クロマトグラフィー）、標的 DNA の有無をバンドの有無により目視で判定する方法である。留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.）と同様である。

2.2.5.3.1.　核酸クロマトグラフィーのための PCR 増幅

PCR-核酸クロマト法により検知が可能な特定原材料はくるみ及びカシューナッツの２種である。その各につき PCR 増幅の条件が異なる。2.2.5.3.2.から 2.2.5.3.3 に記載する方法のうち、検査対象とする特定原材料種に即した方法を用いて検査を行う。また、各検査とも、１調製試料より２点並行で抽出された DNA の各々を規定濃度に調製した後、核酸クロマトにおける PCR 増幅の鋳型 DNA として供する。まず、2.2.3.3.1.に従って植物 DNA 検出用プライマー対又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR を行い、その結果* を 2.2.3.5.項に記載のある判定例に照らして判じ、判定に準じて PCR-核酸クロマトを各特定原材料検出用プライマー対を用いて行う。

*　2.2.4.3.1.に従って実施した植物 DNA 又は動物 DNA 検出リアルタイム PCR の結果に置き換え判断することもできる。

（削る。）

2.2.5.3.2.　核酸クロマトグラフィーによるくるみの検知を目的とした PCR 増

2.2.5.～2.2.5.2.　（略）

2.2.5.3.　PCR-核酸クロマト法

PCR-核酸クロマト法は、タグのついたプライマーを用いて PCR 増幅を行い、その増幅産物を専用のストリップに展開させて（核酸クロマトグラフィー）、標的 DNA の有無をバンドの有無により目視で判定する方法である。留意点は定性 PCR 法（2.2.3.3.）と同様である。

（加える。）

2.2.5.3.1.　くるみの検知を目的とした PCR-核酸クロマト法

2.2.5.3.1.1.　PCR 増幅

幅 （略） 2.2.5.3.3. 核酸クロマトグラフィーによるカシューナッツの検知を目的とした 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 試薬*1 5 μL、5’及び 3’プライマー*2（いずれも 10 μM） それぞれ 0.6 μL、及び水 11.3 μL に、20 ng/μL に調製した DNA 試料液*3 2.5 μL（DNA として 50 ng）を加え、全量を 20 μL とする。PCR のブランク反応液として、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。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置*4 にセットする。反応条件は次のとおりである。95 ℃に 2 分間保ち反応を開始させた後、95℃ 5 秒、67℃ 15 秒、72℃ 10 秒を 1 サイクルとして、35 サイクルの PCR 増幅を行う。その後 4 ℃で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。 *1 PCR 試薬は、AllTaq Master Mix（キアゲン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。 *2 カシューナッツ検出用プライマー対は以下のとおりである。なお、本検査は、カシューナッツ検出用プライマー対（TBA 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。 5’プライマー（STH_CS-F1）：5’-[F-1]- GAGTCGCGCCAAGGAATCTTAC -3’ 3’プライマー（STH_CS-R1）：5’-Biotin- CGTTGCCGAGAGTCGTCACT -3’ *3 原則として DNA 試料液は 20 ng/μL の濃度で調製することとするが、検査対象検体によっては DNA の抽出効率が悪く、それ以下の濃	（略） （加える。）

度でしか調製することができない場合が考えられる。そのような場合には、原則に最も近い最大の濃度で調製し、DNA 試料液とする。

*4　PCR 増幅装置は上記の温度条件が達成できる装置を使用すること。

2.2.5.4.　核酸クロマトグラフィー

2.2.5.4.1.　くるみの検知を目的とした核酸クロマトグラフィー

（略）

2.2.5.4.2.　カシューナッツの検知を目的とした核酸クロマトグラフィー

2.2.5.4.1.に従って行う。

2.2.5.5.　結果の判定

2.2.5.5.1.　くるみを対象とした PCR-核酸クロマト検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出* され、くるみの検知を目的とした PCR-核酸クロマト法において標的とする配列が PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はくるみ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、考え方及び判定例は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

*　2.2.4.4.1. と同じく、植物 DNA　又は動物 DNA 検出リアルタイム PCR の結果に置き換え判断することもできる。

2.2.5.5.2.　カシューナッツを対象とした PCR-核酸クロマト検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いた PCR 増幅反応液の電気泳動で 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出* され、カ

（加える。）

2.2.5.3.1.2.　核酸クロマトグラフィー

（略）

（加える。）

2.2.5.4.　結果の判定

2.2.5.4.1.　くるみを対象とした検査結果の判定

植物又は動物 DNA 検出用プライマー対を用いたレーンで 124 bp 又は 370-470 bp の PCR 増幅バンドが検出され、くるみの検知を目的とした PCR-核酸クロマト法において標的とする配列が PCR 増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はくるみ陽性と判定する。

なお、結果判定の手順、判定例及び注意事項は 2.2.3.5.1. 記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。

（加える。）

（加える。）

シューナッツの検知を目的としたPCR-核酸クロマト法において標的とする配列がPCR増幅されたと判断された場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。 なお、結果判定の手順、考え方及び判定例は2.2.3.5.1.記載の落花生を対象とした検査結果の判定に同じ。 ＊ 2.2.4.4.1と同じく、植物DNA 又は動物DNA検出リアルタイムPCRの結果に置き換え判断することもできる。	
2.2.6. LC-MS/MS法 LC-MS/MS法においては、食品から酵素消化したペプチドを調製し、得られたペプチド試料液を用いて分析する。なお、タンパク質抽出は調製1試料につき2点並行で行い、それ以降、標的ペプチドの確認に至るまでの全操作は、この2点に対し独立並行で行う。	(加える。)
2.2.6.1. 試料調製法 1.1.及び1.2.に従って、試料を調製する。	(加える。)
2.2.6.2. 酵素消化ペプチド精製法 試料から酵素消化ペプチドを得るためには、まず均質化した試料からタンパク質を抽出し、酵素処理により消化を行う。次いで、得られたペプチド混合物を精製し、濃縮乾固して回収する。通常、酵素消化ペプチドは、夾雑物を除去したタンパク質抽出液にジチオスレイトール（DTT）及びヨードアセトアミド（IAA）を加えて還元・アルキル化処理した後、トリプシンまたはキモトリプシンなどのプロテアーゼにより限定分解し、固相抽出カラムなどを用いて精製することが一般的である。検査対象物となる酵素消化ペプチドは、配列により異なる特徴を有するため、	(加える。)

各検査に適した方法にて精製を行う。本項では、pNH 法（陽イオン交換タイプ）、pNS 法（C18/陰イオン交換タイプ）、pHF 法（陽イオン/陰イオン交換タイプ）を用いた精製法を記す。

なお、タンパク質の抽出精製の際に用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ/cm まで精製した超純水とする。

2.2.6.2.1. pNH 法（陽イオン交換タイプ）

（加える。）

調製試料２g をポリプロピレン製遠沈管(15 mL 容) *1 に量り採り、同遠沈管に抽出用緩衝液（４M 尿素、１M チオ尿素、0.1M ジチオスレイトール含有 0.2 M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.5)）10 mL を加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合する。次いで、37℃に設定した恒温振とう水槽に遠沈管を振とう方向に対し水平に並べて１時間振とうする。その後、2,000 × g の条件で 10 分間遠心する。遠心した上清１mL を４mL の希釈用溶媒（50 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液）及び 200 μL の 500 mM ヨードアセトアミド溶液を予め分注した別の遠沈管(15 mL 容)*1 に速やかに移し、ボルテックスミキサーで混合する。混和後、37℃に設定した恒温振とう水槽に遠沈管を垂直に立てて 30 分間振とうする。その後、遠沈管に１％トリプシン溶液*2 を 200 μL 加えてボルテックスミキサーで混合し、37℃に設定した恒温振とう水槽に遠沈管を振とう方向に対し水平並べて３時間振とうする。酵素消化処理後、遠沈管にギ酸を 55 μL 加え、ボルテックスミキサーで混合し、2,000 × g の条件で 10 分間遠心する。

遠心分離して得た上清を、陽イオン交換タイプの固相抽出カラム*3 に全量負荷する。次いで、溶出液を固相抽出カラムに通液し、10 μL 程のプロピレングリコールを滴下したナシ型フラスコに全量回収す

る。フラスコ内の溶媒を留去*4 した後、0.5 mL の５%アセトニトリル 0.1%ギ酸水溶液を加えて撹拌・混合し、ペプチドを再溶解する。溶解液はマイクロ遠沈管（0.5 mL 容）*5 に移し、10,000 × g の条件で５分間遠心*6 する。遠心後、HPLC 用バイアル*7 に分注したものを NH 法のペプチド試料液とする。

*1 試料液の調製、採取は 2.2.6.1. に記載の方法に従う。ポリプロピレン製遠沈管は、Protein Lo Bind Tubes 15 mL（Eppendorf 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*2 トリプシンはウシ膵臓由来トリプシン（製品番号 T1426、シグマアルドリッチ社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*3 陽イオン交換タイプ固相抽出カラムは、Oasis MCX 6 cc Vac Cartridge, 150 mg Sorbent per Cartridge, 60 μm（Waters 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、Oasis MCX を使用する場合、カラムは５mL の１%アンモニア含有メタノール、５mL のメタノール、そして５mL の超純水の順で通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷（自然落下）した後、カラムを５mL の１%ギ酸水溶液及び５mL の 80%アセトニトリル１%ギ酸水溶液で順次洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、５mL の 75%アセトニトリル５%トリフルオロ酢酸水溶液の通液（自然落下）を２回繰り返して溶出する。この際、溶出液は最後にシリンジを用いて全て押し出し回収する。

*4 ロータリーエバポレーターを用いて 50℃に加温することを推奨する。この際、溶液が突沸しないよう注意する。

*5 マイクロ遠沈管はプロテオセーブ SS マイクロチューブ 0.5 mL(住友ベークライト社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*6 遠心ろ過フィルターに通すことで分析機器への負担を軽減できる

場合がある。フィルターはTORAST-H Filter Device、0.2 μm、親水化PTFE（島津ジーエルシー社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*7 HPLC用バイアルはTORAST-H PP Vial（島津ジーエルシー社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.6.2.2. pNS法（C18/陰イオン交換タイプ）

調製試料１gをポリプロピレン製遠沈管(50 mL容）に量り採り*1 、同遠沈管に抽出用緩衝液*2 19 mLを加え、沸騰水浴中で10分間加熱する。この間、ボルテックスミキサーで計３回（加熱処理前、加熱処理中、加熱処理終了後）試料を撹拌する。次いで、低温下（４℃）、10,000 × gの条件で20分間遠心する。遠心分離して得た上清を２本のマイクロ遠沈管（２mL容）*3 に0.7 mLずつ移し、それぞれ70 μLの１M炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液（pH 7.3-7.8）を加える。次いで、28 μLの１M ジチオトレイトールを加え、速やかにボルテックスミキサーで混合し、75℃に設定した恒温槽で15分間加温する。加温処理後、室温下に15分間静置し、用時調製した28 μLの１M ヨードアセトアミドを加え、速やかにボルテックスミキサーで混合する。室温下暗所で45分間静置した後、0.1%ギ酸水溶液で20 mg/mLに調製した10 μLのトリプシン*4 を加え、ボルテックスで混合し、37℃で１時間以上加温する。酵素消化処理後、10 μLのギ酸水溶液及び892 μLの酢酸エチルを加え、ボルテックスミキサーで混合する。次いで、低温下（４℃）、10,000 × gの条件で５分間遠心し、分離した上層をマイクロピペットで除いた後、水層（下層）のうち0.7 mLを新しいマイクロ遠沈管(1.5 mL容)*3 に移す。分取した水層に20 μLの10 mg/mLアミログルコシダーゼを加え、２本のチューブのうち片方にのみ、100

（加える。）

µL の内標準液*5 を加える。得られた溶液を濃縮装置*6 を用いて 37℃で１時間濃縮する。濃縮した溶液に 500 μＬの 0.1%ギ酸水溶液を加え、低温下（4℃）、10,000 × g の条件で３分間遠心する。

遠心分離して得た上清を、C18 タイプの固相抽出カラム*7 に全量負荷する。次いで、溶出液を固相抽出カラムに通液し、マイクロ遠沈管（1.5 mL 容）に全量を回収する。

得られた溶出液を陰イオン交換タイプのレジン*8 を量り採ったマイクロ遠沈管（1.5 mL 容）*3 に加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合し、低温下（4℃）、10,000 × g の条件で３分間遠心する。遠心分離して得た上清を新しいマイクロ遠沈管に移す。次いで、沈殿したレジンに 200 μＬの 60%アセトニトリル 0.1%ギ酸水溶液を加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合する。懸濁後、低温下（4℃）、10,000 × g の条件で３分間遠心し、先に回収した同じ容器に上清を移す。混合した上清は、濃縮装置を用いて 40℃の加温下で溶媒を留去し、試料を完全乾固する。溶媒が残っていないことを確認した後、100 μＬの５%アセトニトリル 0.1%ギ酸水溶液を加え、ピペッティングによりペプチドを溶解させ、フィルター*9 でろ過したものを、NS 法のペプチド試料液とする。

*1 試料液の調製、採取は 2.2.6.1. に記載の方法に従う。

*2 抽出用緩衝液は、APEX Reagents（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*3 マイクロ遠沈管は、タンパク質低吸着チューブ（ワトソン社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*4 トリプシンは、Worthington 社製(Cat. No. TRTPCK)又は同等の結果が得らえるものを用いる。

*5 内標準液は、2 種類の標的ペプチドの末端アルギニン残基を安定

同位体標識したペプチド混合液であり、ペプチド①を 10 ppb、ペプチド②を 20 ppb 含有する。なお、内標準液を添加しない反応液には加えないように注意する。 *6　濃縮装置は、遠心エバポレーター又は同等の結果が得られるものを用いる。 *7　C18 タイプ固相抽出カラムは、MonoSpinC18 L 型（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、MonoSpinC18 L 型を使用する場合、カラムは 1 mL のアセトニトリル及び 1 mL の 0.1%ギ酸水溶液を順次通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷（自然落下）した後、カラムを 1 mL の 1 %アセトニトリル 0.1%ギ酸水溶液で洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、0.4 mL の 30%アセトニトリル 0.1%ギ酸水溶液を通液して溶出する。なお、カラムに溶液を通液する際は、室温下、600 × g の条件で 1 分間遠心する。 *8　陰イオン交換タイプのレジンは、InertSep SAX（粒子径 45 μm）（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSep SAX を使用する場合、チューブ当たり 20 mg のレジンを用いる。 *9　フィルターはコスモスピンフィルターG 0.2 μm（ナカライテスク社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。 2.2.6.2.3. pHF 法（陽イオン/陰イオン交換タイプ） 調製試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り*1 、同遠沈管に抽出用緩衝液*2 19 mL を加え、ボルテックスミキサーで撹拌・混合する。次いで振とう機に遠沈管を横向きに並べ、室温条件下で一晩振とうする。その後、室温下、3,000 × g の条件で 20 分間遠	 （加える。）

心し、上清をろ紙でろ過したものを試料抽出液とする。

1 mL の試料抽出液及び外標準溶液*3 に、50 μL の PVP 水溶液、200 μL の HP-βCD 水溶液、10 μL の安定同位体標識ペプチド（内標準）水溶液、及び 50 μL のキモトリプシン水溶液*4 を加え、ボルテックスミキサーで混合し、37℃で 1.5 時間加温する。酵素消化処理後、20 μL のギ酸を加えてボルテックスミキサーで混合し、室温下、13,000 × g 以上の条件で 10 分間遠心する。

遠心分離して得た上清を、陽イオン交換タイプの固相抽出カラム*5 に全量負荷する。次いで、溶出液を陽イオン交換固相抽出カラムに通液し、全量を回収する。得られた溶出液に等量の水を加えて混合し、陰イオン交換タイプの固相抽出カラム*6 に全量負荷する。その後、溶出液を陰イオン交換固相抽出カラムに通液して全量を回収し、濃縮装置*7 を用いて溶媒を留去する。試料が完全乾固したことを確認した後、200 μL の５%アセトニトリル 0.1%ギ酸を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、マイクロ遠沈管（2 mL 容）に移す。次いで、室温下、13,000 × g 以上の条件で５分間遠心し、0.2 μm PTFE シリンジフィルターでろ過して HPLC 用バイアル*8 に分取したものを、HF 法のペプチド試料液とする。

*1　試料液の調製、採取は 2.2.6.1. に記載の方法に従う。

*2　抽出用緩衝液は、定量検査法（ELISA 法）の抽出用緩衝液である特定原材料抽出液 ExSta™ 液（森永生科学研究所製）又は同等の結果が得られるものを用いる。

*3　外標準溶液は、別添３の「標準品規格」に従って調製した標準液を抽出用緩衝液で希釈したものであり、特定原材料由来のタンパク質含有量が調製試料１ g 当たり 10 μg/g (ppm)相当含む。

*4　キモトリプシンは、ウシ膵臓由来 α-キモトリプシン（MP バイオ

ケミカル社製）又は同等の結果が得られるものを用いる

*5　陽イオン交換タイプ固相抽出カラムは、InertSep MCX 60 mg/3 mL カラム（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSep MCX を使用する場合、カラムは１ mL のメタノール及び１ mL の１％ギ酸を順次通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷した後、カラムを１ mL の１％ギ酸及び１ mL のメタノールで順次洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、0.5 mL の 80％メタノール 1％アンモニア及び 0.5 mL の 50％メタノール１％アンモニアを順次通液して同じ容器に回収する。カラムに溶液を通液する際は、室温下、200 × g の条件で１分間遠心してもよい。

*6　陰イオン交換タイプ固相抽出カラムは、InertSep MAX 60 mg/3 mL カラム（ジーエルサイエンス社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSep MAX を使用する場合、カラムは１ mL のメタノール及び１ mL の水を順次通液し、コンディショニングを実施する。次いで、試料溶液をカラムに負荷した後、カラムを１ mL の水及び１ mL のメタノールで順次洗浄する。カラムに吸着した酵素消化ペプチドは、0.5 mL の 99％メタノール１％ギ酸及び 0.5 mL の 20％メタノール１％ギ酸を順次通液して同じ容器に回収する。カラムに溶液を通液する際は、室温下、200 × g の条件で１分間遠心してもよい。

*7　濃縮装置は、遠心エバポレーター又は同等の結果が得られるものを用い、加温する際には溶液が突沸しないよう注意すること。

*8　HPLC 用バイアルは材質が TPX 樹脂であるもの又は同等の結果が得られるものを用いる。

2.2.6.3. 酵素消化ペプチドの精製度の確認 ペプチド試料液について、200-320 nm の範囲で紫外吸収スペクトルを測定する。この際 230 nm、260 nm 及び 280 nm 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. 280 値 1 を 1 mg/mL 相当のタンパク質としてペプチド濃度を算出する。BCA 法による比色分析やアミノ酸分析等によりペプチド濃度を算出してもよい。試料液中のペプチド濃度が、2.2.6.4.2.1. から 2.2.6.4.2.3. までに記載する上限濃度を超える場合、原則として、使用する機器の性能に照らして注入量の削減や希釈等を検討し、LC-MS/MS 測定を行う。なお、ブランク溶液と比較して試料液中に相当量のペプチドが確認されない場合には、当該検査対象検体からのペプチド精製が困難である可能性を考慮し、定性 LC-MS/MS 法による検知の可否を含め、結果を総合的に判断する。 ＊　ペプチド結合に起因する吸収波長である O.D. 230 と、芳香族アミノ酸の吸収波長である O.D. 280 の比を計算する。また核酸の特徴的な吸収である O.D. 260 と O.D. 280 の比を計算する。O.D. 280/ O.D. 230 比あるいは O.D. 260/ O.D. 280 比がそれぞれ(0.2－0.6)あるいは(0.5－0.9)の範囲にあることが望ましい。本条件を満たすペプチド試料液の品質が確認されない場合には、夾雑成分の影響等により測定感度の低下を生じることがある。	(加える。)
2.2.6.4. 定性 LC-MS/MS 法 定性 LC-MS/MS 法においては、液体クロマトグラフィー（LC）を用いてペプチド試料液に含まれる成分を分離し、タンデム質量分析計(MS/MS)により特定のプリカーサーイオンを断片化させ生じるプロダクトイオンを検出する。本法により、対象とする特定原材料を特異的に検知する事が可能であり、標的ペプチドに特有のプリカーサーイオンとプロダクトイ	(加える。)

オンの組み合わせを確認することによって、検査対象検体中における特定原材料の有無を判定する。	
2.2.6.4.1. LC-MS/MS 測定 定性 LC-MS/MS 法により検知が可能な特定原材料は、カシューナッツの１種である。本法では、カシューナッツに含まれるタンパク質に由来する特異的なペプチド配列を標的とし、2.2.6.4.2.に記載する方法を用いて検査を行う。検査は、１調製試料につき２点並行で抽出を行い、酵素消化後に精製したペプチド試料液を検液として用いる。これを各精製法に応じた規定手順に従って LC に注入* し、MS/MS により測定を行う。 * 注入量を過度に増加させると、非揮発性成分などが試料中に残存した場合、イオン源の汚染やカラムの劣化を招き、感度の低下及びにピーク形状の悪化、並びに保持時間の変動を生じ得る。したがって、実際の実験操作及び日頃の実験環境の保全に当たり、事前に注入量を抑えた条件で感度等を確認し、使用する機器の性能に応じて段階的に注入量の増量を検討することが望ましい。	(加える。)
2.2.6.4.2. カシューナッツの検知を目的とした LC-MS/MS 測定	(加える。)
2.2.6.4.2.1. カシューナッツ-NH 法（内標準非添加・シグナルノイズ比判定） 分析対象は、2.2.6.2.1.に記載の pNH 法で調製したペプチド試料液*1 とする。 脱気した移動相 A（0.2%酢酸水溶液）及び B（0.2%酢酸含有アセトニトリル溶液）を LC システムのチューブに接続し、フローラインのエアパージを行った後、システムの平衡化を行う。次いで、標的ペプチド①、②の標準品をそれぞれ LC-MS/MS システムに注入し、MS	(加える。)

分析条件の最適化を行う。分析条件の設定では、まずイオン化方式としてエレクトロスプレーイオン化法（ESI）の正イオンモードを選択する。次に、イオン化されるペプチドのうちMSで選別する特定の質量電荷比（m/z）を持ったプリカーサーイオンと、MSMSで分析するコリジョンセルで断片化されるプロダクトイオンを選択し、それぞれのイオンペアを測定するための多重反応モニタリング（MRM）における信号強度が最大になるようにパラメータ*2 の最適化を図る。最適化後、LCシステムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラム*3 を接続し、カラムオーブンを適正温度に設定の上、0.4 mL/minの流速にてカラムの平衡化を行う。次いで、標的ペプチド①、②の混合液をLCシステムに注入し標的ペプチドのカラム保持時間*4 を確定する。分析対象の確認後、最適化した分析条件に従って試料を測定する。まず、標的ペプチド①、②の混合液（10 ng/mL）を注入し、測定を３回繰り返し行い、保持時間に問題がないか確認する。標的ペプチド①②混合液の測定後、ブランク溶液の測定を３回繰り返し、pNH法により調製した検液の測定を開始する。注入量*5 は使用する測定機器の感度に応じて設定する。なお、連続分析を実施する際は、10検体につき、１回のブランク溶液の測定を挟むこと。また、検液全ての測定終了後には再びブランク溶液を１回測定した後、標的ペプチド①、②の混合液を再測定し、保持時間及び分析機器の感度に変動が無いこと確認すること。

LCグラジエント条件*6

時間，分	%B
0.00	5
3.00	5
15.00	40

16.00	95
20.00	95
20.01	5
25.00	5 (Stop run)

LC-MS/MS の接続部の配管径が 0.1-0.18 mm の場合､流速は 0.4 mL/分とする。また、オートサンプラーを使用する際の設定温度は 10℃とする。

標的ペプチドの検出条件（MRM トランジション）

ペプチド	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
標的ペプチド① ADIYTPEVGR	560.8	557.3
		658.4
		821.4
標的ペプチド② LTTLNSLNLPILK	720.4	298.2
		470.3
		1011.6

LC-MS/MS のデータ取得時間はペプチド標品の保持時間の前後 1 分程度とする*7。

*1　試料液のペプチド濃度が 8 mg/mL を超える場合は、注入量の削減等を検討する。

*2　パラメータは、コリジョンエネルギー（CE）及びイオン化電圧、並びに使用する装置の特性に応じた項目とする。

*3　オクタデシルシリル化シリカゲルカラムは、Raptor Inert ARC-18 2.7 μm, 3.0 x 100 mm（Restek 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、Raptor Inert ARC-18 を用いる場合、カラムオーブンの設定温度は 50℃とする。

*4　Raptor Inert ARC-18 を用いる場合のカラム保持時間の目安を、標的ペプチド①は 7.7 分、標的ペプチド②は 11.7 分とするが、測定で使用する機器により前後する場合がある。

*5　注入量は標的ペプチドのカラム保持時間への影響や感度低下を考慮し 10μL 以下に設定することが望ましい。

*6　使用する LC 機種によって、カラムの洗浄及び平衡化時間が不十分と考えられる場合は各時間を延長してもよい。基本的には、各溶媒の割合は変更しない。ただし、指定のグラジエント条件において標的ペプチドと夾雑成分の分離が不十分と判断される場合には、3-15min 5-40%B から 3-30min 5-30%B に変更することが望ましい。

*7　MS の汚染による感度低下を抑制するため、LC-MS のバルブ切り替え時間を設定し、MS 側に移動相を流す時間は標的ペプチド①の保持時間の 1.5 分程度前から、標的ペプチド②の保持時間の 1.5 分程度後までとすることが望ましい。

2.2.6.4.2.2. カシューナッツ-NS 法（２段階内標準相対比判定）

分析対象は、2.2.6.2.2. に記載の pNS 法で調製したペプチド試料液*1 とする。

脱気した移動相 A（0.2%酢酸）及び B（0.2%酢酸-アセトニトリル）を LC システムのチューブに接続し、フローラインのエアパージを行った後、システムの平衡化を行う。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の標準品をそれぞれ LC-MS/MS システムに注入し、MS 分析条件の最適化を行う。分析条件の設定では、まずイオン化方式としてエレクトロスプレーイオン化法（ESI）の正イオンモードを選択する。次に、MS で選別する特定の m/z を持つプリカーサー

（加える。）

イオンと、MS/MS で分析するプロダクトイオンを選択し、MRM モードに関する信号強度が最大になるようにパラメータ*2 の最適化を図る。最適化後、LC システムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラム*3 を接続し、カラムオーブンを適正温度に設定の上、0.3 mL/分の流速にてカラムの平衡化を行う。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の混合液（①10 ppb、②20 ppb）を LC システムに注入し、移動相 B グラジエント条件下における標的ペプチドのカラム保持時間*4 を確定する。分析対象の確認後、最適化した分析条件に従って試料を測定する。まず、ブランク溶液を注入し、クロマトグラムのベースラインが安定しているかを確認する。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の混合液（①1 ppb、②2 ppb）を測定した後、pNS 法により調製した検液の測定を開始する。注入量*5 は、測定機器の感度に応じて設定し、まず内標準添加無しのペプチド検液を測定した後、内標準添加ありのペプチド検液を測定する。なお、連続分析を実施する際は、20 検体につき 1 回のブランク溶液の測定を挟むこと。また、検液全ての測定終了後、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の混合液（①1 ppb、②2 ppb）の検液を再測定し、保持時間及び分析機器の感度に変動が無いことを確認すること。

LC グラジエント条件

時間，分	%B
0	5
16	25
18	95
23	95
23.1	5

30	5 (Stop run)

LC-MS/MS の接続部の配管径が 0.1-0.18 mm の場合、流速は 0.3 mL/分とする。また、オートサンプラーを使用する際の設定温度は 18℃とする。

標的ペプチドの検出条件（MRM トランジション）

	標的ペプチド		安定同位体標識ペプチド（アルギニン）	
	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
指標ペプチド① GQVQVV DNFGNR	666.8	920.5	671.8	930.5
		821.4		831.4
		722.3		732.3
	444.9	722.3	448.2	732.3
指標ペプチド② DVFQQQ QQHQSR	510.2	657.8	513.6	662.8
		438.9		442.2

LC-MS/MS のデータ取得時間はペプチド標品の保持時間の前後 0.5 分以上とする。

*1　試料液のペプチド濃度が 8　mg/mL を超える場合は、注入量の削減等を検討する。

*2　パラメータは、コリジョンエネルギー（CE）及びイオン化電圧、並びに使用する装置の特性に応じた項目とする。

*3　オクタデシルシリル化シリカゲルカラムは、カートリッジカラム 3 μm 2.1 x 10 mm をガードカラムとして連結した Triart C18 メタルフリー 3 μm、2.1 x 100 mm（YMC 製 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、Triart C18 メタルフリーを用いる場合、カラムオーブンの設定温度は 50℃とする。

*4　Triart C18 メタルフリーを用いる場合のカラム保持時間の目安を指標ペプチド①は 9.7 分、指標ペプチド②は 4.7 分とするが、測定で使用する機種により前後する場合がある。

*5　注入量は標的ペプチドのカラム保持時間への影響や感度低下を考慮し、2～10 μL 程度に設定することが望ましい。

2.2.6.4.2.3. カシューナッツ-HF 法（１段階内標準相対比判定）　　（加える。）

分析対象は、2.2.6.2.3. に記載の pHF 法で調製したペプチド試料液*1 とする。

脱気した移動相 A（0.1 %ギ酸）及び B（0.1 %ギ酸-アセトニトリル）を LC システムのチューブと接続し、フローラインのエアパージを行った後、システムの平衡化を行う。次いで、安定同位体標識した標的ペプチド①、②の標準品をそれぞれ LC-MS/MS システムに注入し、MS 分析条件の最適化を行う。分析条件の設定では、まずイオン化方式としてエレクトロスプレーイオン化法（ESI）の正イオンモードを選択する。次に、MS で選別する特定の m/z を持つプリカーサーイオンと、MS/MS で分析するプロダクトイオンを選択し、MRM モードに関する信号強度が最大になるようにパラメータ*2 の最適化を図る。最適化後、LC システムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラム*3 を接続し、カラムオーブンを適正温度に設定の上、0.3 mL/分の流速にてカラムの平衡化を行う。次いで、ブランク溶液を LC シ

ステムに注入し、移動相Bのグラジエント条件下においてクロマトグラムのベースラインが安定しているかを確認する。その後、同条件で安定同位体標識したペプチド①、②の混合液を測定し、カラム保持時間*4 を確定する。分析対象の確認後、試料の測定を開始する。まず、外標準の検液の測定を行い、注入量*5 は使用する測定機器の感度に応じて設定する。次いで、ブランク溶液を測定し、キャリーオーバーが認められないことを確認した後、検液の測定を実施する。なお、検液全ての測定終了後、外標準の検液を再度測定し、保持時間及び分析機器の感度に変動が無いことを確認すること。

LC グラジエント条件*6

時間, 分	%B
0	5
20	25
20.1	95
25	95
25.1	5
30	5 (Stop run)

LC-MS/MS の接続部の配管径が 0.1-0.18 mm の場合、流速は 0.3 mL/分とする。

また、オートサンプラーを使用する際の設定温度は 10℃とする。

標的ペプチドの検出条件（MRM トランジション）*7

	標的ペプチド		安定同位体標識ペプチド	
	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)

指標ペプチド①KGEEVEELY	548.2645	801.3625 914.4478	552.2716	809.3767 922.4620
指標ペプチド②RGEEVEELY	562.2652	829.3679 942.4527	567.2716	839.3762 952.4610

LC-MS/MS のデータ取得時間は指標ペプチドの保持時間の前後 2 分とする。*8

*1　試料液のペプチド濃度が 15 mg/mL を超える場合は、注入量の削減等を検討する。

*2　パラメータは、コリジョンエネルギー（CE）及びイオン化電圧、並びに使用する装置の特性に応じた項目とする。

*3　オクタデシルシリル化シリカゲルカラムは、InertSustain AX-C18 3 μm, 3.0 x 150 mm（ジーエルサイエンス 社製）又は同等の結果が得られるものを用いる。なお、InertSustain AX-C18 を用いる場合、カラムオーブンの設定温度は 50℃とする。

*4　InertSustain AX-C18 を用いる場合のカラム保持時間の目安を、指標ペプチド①は 9.2 分、指標ペプチド②は 9.5 分とするが、測定で使用する機種により前後する場合がある。

*5　注入量は標的ペプチドのカラム保持時間への影響や感度低下を考慮し、5～10 μL 程度に設定することが望ましい。なお、高感度の分析機器を使用する場合、外標準の感度に照らし注入量をさ

らに減じて 2 μL にしてもよい。
*6　基本的には、各溶媒の割合は変更しない。ただし、指定のグラジエント条件において標的ペプチドと夾雑成分の分離が不十分と判断される場合には 25%B に至るまでの所要時間を 20 分から 30 分に変更して分析することが望ましい。
*7　設定可能な m/z 値が小数点以下 1 桁までの装置は、下表の小数点以下 2 桁目を四捨五入した m/z 値を用いる。
*8　MS の汚染による感度低下を抑制するため、LC-MS/MS のバルブ切り替え時間を設定し、MS 側に移動相を流す時間はデータ取得時間に合わせて設定することが望ましい。

2.2.6.5. 結果の解析 (加える。)

LC-MS/MS 装置を用いて特定のカラム保持時間を示すペプチドのイオンシグナルを解析し、それぞれのペプチド試料液について特定原材料に由来するペプチドの有無を判断する。標的ペプチドの標準品と同じカラム保持時間において、特定のトランジッションが確認された試料液は、標的とするペプチドが検出されたと判断する。

2.2.6.5.1. カシューナッツを対象とした LC-MS/MS 測定結果の解析 (加える。)

2.2.6.5.1.1. カシューナッツ-NH 法（内標準非添加・シグナルノイズ比判定） (加える。)

解析対象は、2.2.6.4.2.1. に記載のカシューナッツ-NH 法で測定された試料である。

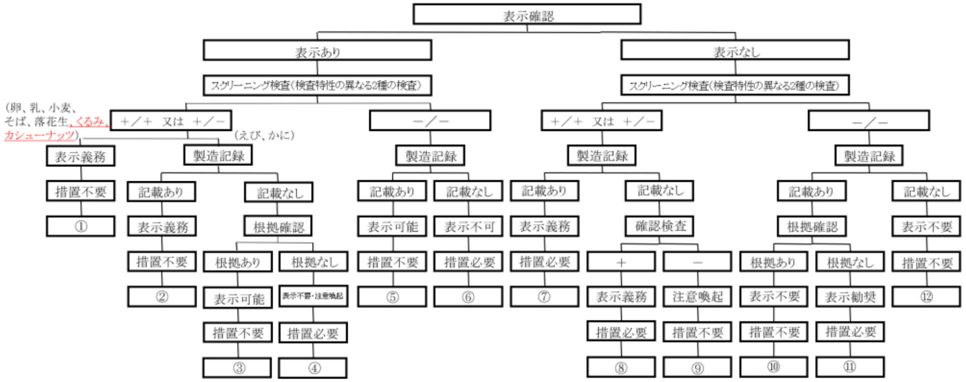
まず、標的ペプチドの検出条件の表に従い、標的ペプチド①、②の混合液の測定結果から、各ペプチドのカラム保持時間と各 MRM トランジションのクロマトグラムを確認する*1。次いで、検体のクロマトグラムにおいて、各標的ペプチドの保持時間付近にピークが認

められた場合、ノイズ範囲*2 を指定し、各ピークのシグナル対ノイズ（S/N）比を計算*3 する。 *1　各標的ペプチドのクロマトグラムは、それぞれ３種類の MRM トランジションのクロマトグラムを重ね合わせて確認することが望ましい。 *2　ノイズ範囲は、標的ペプチド①及び②のピーク前後の夾雑成分由来のピークが認められない 0.5 分間程度とする。 *3　S/N 比の算出方法が解析ソフトウェアで設定可能な場合、計算方法は二乗平均平方根（RMS）法とする。なお、四重極-飛行時間型質量分析計（Q-TOF-MS）や四重極-キングドントラップ型質量分析計（Orbitrap™）など高分解能型質量分析計で測定した場合、得られる測定ノイズがゼロのため S/N 比が算出できない場合がある。その場合、検出されたピークは S/N 比が 10 を満たすものとして考える。	
2.2.6.5.1.2. カシューナッツ-NS 法（２段階内標準相対比判定） 解析対象は、2.2.6.4.2.2. に記載のカシューナッツ-NS 法で測定された試料である。 まず、標的ペプチドの検出条件の表に従い、内標準添加ありと内標準添加なしの結果を比較し、標的ペプチドのカラム保持時間を確定*1 する。次いで、内標準添加ありの結果について、各トランジション*2 ごとに、標的ペプチドのシグナル面積から安定同位体標識ペプチドのシグナル面積*3 を除し、面積比を算出する。 *1　内標準添加ありの検液でしか認められないシグナルを安定同位体標識した標的ペプチド由来のピークとする。マトリックス効果等により、当該ピークが確認できなかった場合、または得られた	(加える。)

シグナルが外標準以下の強度であった場合、不検出と判断する。なお、注入量が多い場合などでは、標的ペプチドのカラム保持時間が検体によって大きく変化する場合があるため、対象時間を広げて解析すること。 *2　各ペプチドのトランジションは、保持時間が全て±0.05min 以内で一致していることを確認する。 *3　安定同位体標識ペプチドのシグナル面積は、夾雑成分由来の妨害ピークによる影響を除外するため、内標準添加なしの解析データから求める夾雑成分由来シグナル面積を減じて算出する。なお、大きな妨害ピークが存在する場合、クロマトグラムの縦軸の強度に注意し、適宜拡大して確認すること。	
2.2.6.5.1.3. カシューナッツ-HF 法（１段階内標準相対比判定） 解析対象は、2.2.6.4.2.3.に記載のカシューナッツ-HF 法で測定された試料である。 標的ペプチドの検出条件の表に従い、試料の測定結果から、各指標ペプチドのカラム保持時間におけるトランジションごとに、標的ペプチドのシグナル面積から安定同位体標識ペプチドのシグナル面積*1 を除し、面積比*2 を算出する。 *1　安定同位体標識した標的ペプチドのカラム保持時間±0.1 分以内に検出されたシグナルを標的ペプチド由来のトランジションと判断する。測定した外標準のいずれかのトランジションにおいてシグナルが確認できない場合は、酵素消化ペプチドの精製または使用する装置における MS 分析条件の最適化等をやり直す。 *2　標的ペプチド由来のトランジションにおいて、シグナルが確認できない場合は非検出とする。	（加える。）

2.2.6.6. 結果の判定	(加える。)
2.2.6.6.1. カシューナッツを対象としたLC-MS/MS検査結果の判定	(加える。)
2.2.6.6.1.1. カシューナッツ-NH法(内標準非添加・シグナルノイズ比判定) 判定対象は、2.2.6.5.1.1. カシューナッツ-NH法で解析された検査結果である。 1調製試料より2点並行で抽出し、ペプチド試料液を調製した後、LC-MS/MS法を実施する。その結果、各標的ペプチドにおいて、全てのMRMトランジションがS/N比10以上を満たすピークとして検出された場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。	(加える。)
2.2.6.6.1.2. カシューナッツ-NS法(2段階内標準相対比判定) 判定対象は、2.2.6.5.1.2. カシューナッツ-NS法で解析された検査結果である。 1調製試料より2点並行で抽出し、ペプチド試料液を調製した後、LC-MS/MS法を実施する。その結果、検出された各標的ペプチドの全てトランジションにおいて、試料中の標的ペプチドのシグナル面積値が安定同位体標識したペプチドのシグナル面積値の10分の1以上である場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。なお、安定同位体標識ペプチドのシグナルが検出できなかったトランジションは不検出として判定の対象外* とし、各指標ペプチドにつき1つのトランジションが検出されていれば判定の対象とすることができる。 * 安定同位体標識した指標ペプチド由来のトランジションシグナルがいずれも非検出であった場合、当該検査対象のNS法による定性分析は不可能であり、検知不能と判断する。	(加える。)

2.2.6.6.1.3. カシューナッツ-HF 法（１段階内標準相対比判定） 判定対象は、2.2.6.5.1.3. カシューナッツ-HF 法で解析された検査結果である。 １調製試料より２点並行で抽出し、ペプチド試料液を調製した後、LC-MS/MS 法を実施する。その結果、各標的ペプチドの全てのトランジションについて、試料で算出されたシグナル面積比が外標準で算出されたシグナル面積比の 10 分の１以上である場合、本検査対象検体はカシューナッツ陽性と判定する。なお、安定同位体標識ペプチドのシグナルが検出できなかったトランジション*は不検出として判定の対象外とし、各安定同位体標識ペプチドにつき１つのトランジションが検出されていれば判定の対象とすることができる。 ＊　安定同位体標識ペプチドのシグナル強度が外標準の安定同位体標識ペプチドのシグナル強度に比べ 1/4 以下となり、対応する標的ペプチド由来のトランジションを検出できなかった場合、当該検査対象の HF 法による定性分析は不可能であり、検知不能と判断する。	（加える。）
2.3.～3.（略）	2.3.～3.（略）
最終改正：2026 年４月１日	（加える。）
（別添１）	（別添１）



最終改正：2026年４月１日

（別添２）

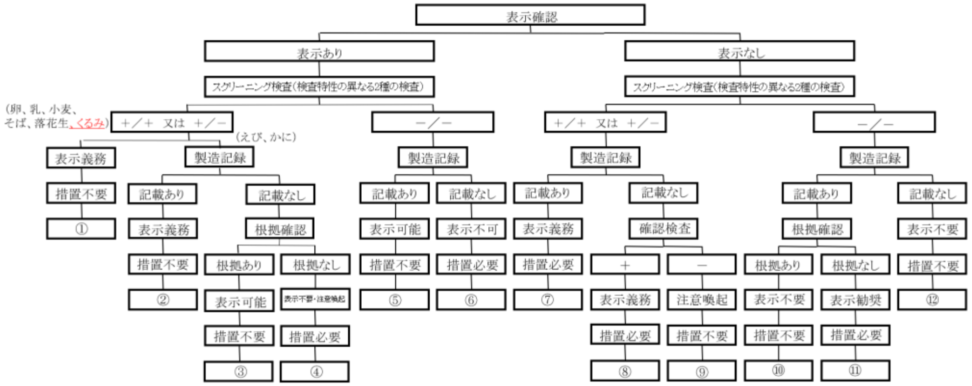
判断樹について

１～３　（略）

４　確認検査について

（１）・（２）（略）

（３）小麦、そば、落花生の確認検査は、一般的に PCR 法又はリアルタイム PCR 法が使用されている。PCR 法では特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。リアルタイム PCR 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。えび、かにの確認検査は、一般的に PCR 法が使用されている。PCR 法で特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。くるみの確認検査は、一般的にリアルタイム PCR 法又は PCR-核酸クロマト法が使用されている。リアルタイム PCR くるみ-H 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。くるみ-N 法では Cq 値が得られたものを



（加える。）

（別添２）

判断樹について

１～３　（略）

４　確認検査について

（１）・（２）（略）

（３）小麦、そば、落花生の確認検査は、一般的に PCR 法又はリアルタイム PCR 法が使用されている。PCR 法では特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。リアルタイム PCR 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。えび、かにの確認検査は、一般的に PCR 法が使用されている。PCR 法で特異的遺伝子増幅バンドが検出されたものを陽性とする。くるみの確認検査は、一般的にリアルタイム PCR 法又は PCR-核酸クロマト法が使用されている。リアルタイム PCR-H 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。リアルタイム PCR-N 法では Cq 値が得られたもの

陽性とする。PCR-核酸クロマト法ではテストストリップの所定の位置に着色ラインが認められたものを陽性とする。カシューナッツの確認検査は、一般的にリアルタイム PCR 法、PCR-核酸クロマト法又は LC-MS/MS 法が使用されている。リアルタイム PCR カシューナッツ-H 法では算出された Cq 値が基準プラスミド溶液の平均 Cq 値より小さかったものを陽性とする。カシューナッツ-N 法では Cq 値が得られたものを陽性とする。PCR-核酸クロマト法ではテストストリップの所定の位置に着色ラインが認められたものを陽性とする。LC-MS/MS カシューナッツ-NH 法では、S/N 比が 10 を超えたものを陽性とする。カシューナッツ-NS 法およびカシューナッツ-HF 法では、安定同位体標識ペプチドに対するピーク面積比が基準以上であったものを陽性とする。

（４）　（略）

5　（略）

6　枝①から⑫までの考え方

（卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ、カシューナッツの監視のみ）

①	特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ、カシューナッツ）の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも１つが「＋（プラス）」の場合

- この場合でも製造記録の確認を行うことは望ましく、この判断樹がこれを妨げるものではないが、省略は可能。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考えられ、行政措置は不要。

②～⑫　（略）

を陽性とする。PCR-核酸クロマト法ではテストストリップの所定の位置に着色ラインが認められたものを陽性とする。

（４）　（略）

5　（略）

6　枝①から⑫までの考え方

（卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみの監視のみ）

①	特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生、くるみ）の表示があり、２種の検査によるスクリーニング検査結果のうち少なくとも１つが「＋（プラス）」の場合

- この場合でも製造記録の確認を行うことは望ましく、この判断樹がこれを妨げるものではないが、省略は可能。
- 確認検査は不要。
- 適正表示と考えられ、行政措置は不要。

②～⑫　（略）

最終改正：2026年４月１日

（別添３）

標準品規格

1.　卵検知用標準液

1.1.　（略）

1.2.　規格

卵標準品原液規格　（略）

参考　以下に示す値は参考値とする。

卵一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は卵標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。卵標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9. に示すような泳動像が得られる。

2.　牛乳検知用標準液

2.1.　（略）

2.2.　規格

牛乳標準品原液規格　（略）

参考　以下に示す値は参考値とする。

牛乳一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は牛

（加える。）

（別添３）

標準品規格

1.　卵検知用標準液

1.1.　（略）

1.2.　規格

卵標準品原液規格　（略）

参考　以下に示す値は参考値とする。

卵一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は卵標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。卵標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8. に示すような泳動像が得られる。

2.　牛乳検知用標準液

2.1.　（略）

2.2.　規格

牛乳標準品原液規格　（略）

参考　以下に示す値は参考値とする。

牛乳一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は牛

乳標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。牛乳標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9. に示すような泳動像が得られる。	乳標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。牛乳標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8. に示すような泳動像が得られる。
3. 小麦検知用標準液	3. 小麦検知用標準液
3.1. （略）	3.1. （略）
3.2. 規格	3.2. 規格
小麦標準品原液規格　（略）	小麦標準品原液規格　（略）
参考　以下に示す値は参考値とする。	参考　以下に示す値は参考値とする。
小麦一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は小麦標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。小麦標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9. に示すような泳動像が得られる。	小麦一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度は小麦標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。小麦標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8. に示すような泳動像が得られる。
4. そば検知用標準液	4. そば検知用標準液
4.1. （略）	4.1. （略）
4.2. 規格	4.2. 規格
そば標準品原液規格　（略）	そば標準品原液規格　（略）
参考　以下に示す値は参考値とする。	参考　以下に示す値は参考値とする。
そば一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はそば標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。そば標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9. に示すような泳動像が得られる。	そば一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はそば標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。そば標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8. に示すような泳動像が得られる。

5. 落花生検知用標準液 5.1. (略) 5.2. 規格 落花生標準品原液規格　(略) 参考　以下に示す値は参考値とする。 落花生一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製) により定量するとき、その濃度は落花生標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。落花生標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。 6. 甲殻類検知用標準液* ＊　(略) 6.1. (略) 6.2. 規格 甲殻類標準品原液規格　(略) 参考　以下に示す値は参考値とする。 甲殻類一次希釈液調製のタンパク質を 2-D Quant kit (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製) により定量するとき、その濃度は甲殻類標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。甲殻類標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得ら	5. 落花生検知用標準液 5.1. (略) 5.2. 規格 落花生標準品原液規格　(略) 参考　以下に示す値は参考値とする。 落花生一次希釈液のたんぱく質を、2-D Quant kit (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製) により定量するとき、その濃度は落花生標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。落花生標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8.に示すような泳動像が得られる。 6. 甲殻類検知用標準液* ＊　(略) 6.1. (略) 6.2. 規格 甲殻類標準品原液規格　(略) 参考　以下に示す値は参考値とする。 甲殻類一次希釈液調製のタンパク質を 2-D Quant kit (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製) により定量するとき、その濃度は甲殻類標準品原液のタンパク質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。甲殻類標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8.に示すような泳動像が得ら

改正案	現行
れる。 7. くるみ検知用標準液 7.1. （略） 7.2. 規格 くるみ標準品原液規格 参考　以下に示す値は参考値とする。 くるみ一次希釈液調製のたんぱく質を 2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はくるみ標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。くるみ標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9. に示すような泳動像が得られる。 8. カシューナッツ検知用標準液 8.1. 調製法 以下に示す方法に従い、カシューナッツ一次標準粉末、カシューナッツ標準品原液、カシューナッツ一次希釈液、カシューナッツ高濃度標準液を調製する。カシューナッツ標準品原液からカシューナッツ高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。 カシューナッツ一次標準粉末調製法 ベトナム産カシューナッツを乳鉢で粉砕したもの 3 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、アセトン 30 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて 1 分間撹拌した後、10,000×g で 30 分間遠心分離し、上清を除く。この操作を 3	れる。 7. くるみ検知用標準液 7.1. （略） 7.2. 規格 くるみ標準品原液規格 参考　以下に示す値は参考値とする。 くるみ一次希釈液調製のたんぱく質を 2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はくるみ標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。くるみ標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、8. に示すような泳動像が得られる。 （加える。） （加える。）

回繰り返す。チューブを 45 ℃のアルミバス上に置き、約 7 時間乾燥した後、目開き 500 μm のふるいを通過したものをカシューナッツ一次標準粉末とする。

カシューナッツ標準品原液調製法

カシューナッツ一次標準粉末 0.1 g を 50 mL PP 製チューブに採取し、抽出用緩衝液* 20 mL を加え、ボルテックスミキサーを用いて 1 分間攪拌して固形物を分散させた後、振とう機（90～110 rpm）で一晩抽出する。抽出液を 10,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清を孔径 0.8 μm のミクロフィルターでろ過し、カシューナッツ標準品原液とする。

抽出に際しては、振とう機に遠心管を横にして置く。振とう幅は 3 cm 程度とし、振とうにより液が両端に打ち付けるようになるくらいの振とう回数とする。時々チューブの上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着するサンプルを分散させる。

* 抽出用緩衝液 0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.05 % Tween20 を含有する 120 mM Tris-HCl（pH7.5）

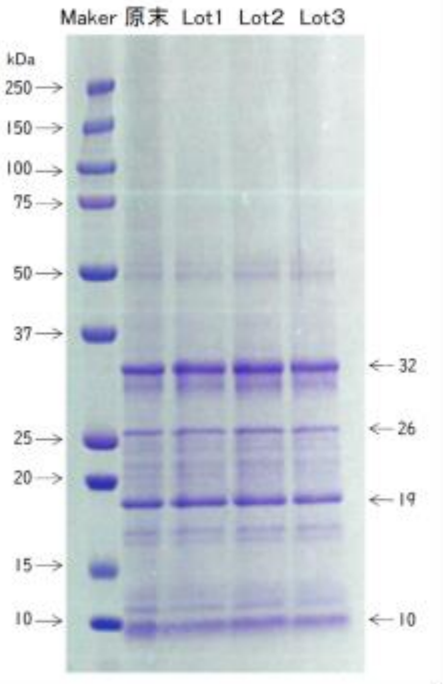
カシューナッツ一次希釈液調製法

カシューナッツ標準品原液を、0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウムを含む pH 7.4 の PBS で 10 倍に希釈し、カシューナッツ一次希釈液とする。

カシューナッツ高濃度標準液調製法

カシューナッツ一次希釈液を、0.6 % SDS、0.1M 亜硫酸ナトリウム、0.2% BSA を含む pH 7.4 の PBS で 2 倍に希釈し、カシューナッツ高濃度標準液とする。カシューナッツ標準品原液からカシューナッツ高濃度標準液調製までの操作は、1 日の内に行う。

8.2. 規格 カシューナッツ標準品原液規格 電気泳動像 SDS-PAGE による電気泳動を行うとき、10kDa、19 kDa、26 kDa 及び 35 kDa 付近にそれぞれ 1 本の明瞭なバンドを認める。 たんぱく量 2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により、たんぱく質を定量するとき、その濃度は 1.5～2.1 mg/mL である。 参考　以下に示す値は参考値とする。 カシューナッツ一次希釈液調製のたんぱく質を 2-D Quant kit（グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン社製）により定量するとき、その濃度はカシューナッツ標準品原液のたんぱく質濃度の 0.08 倍～0.12 倍である。カシューナッツ標準品原液について SDS-PAGE を行うとき、9.に示すような泳動像が得られる。	（加える。）
9. 各標準品原液の SDS-PAGE 電気泳動像	8. 各標準品原液の SDS-PAGE 電気泳動像
卵、牛乳、小麦、そば、落花生、甲殻類、くるみ　（略）	卵、牛乳、小麦、そば、落花生、甲殻類、くるみ　（略）
カシューナッツ	（加える。）



原末：卵・牛乳・小麦・そば・落花生・甲殻類・くるみ・カシューナッツ標準粉末

Lot1-3：ロット番号

別添　安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

目次

1. 検体採取方法 9
1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取 9
1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取 9

原末：卵・牛乳・小麦・そば・落花生・甲殻類・くるみ標準粉末

Lot1-3：ロット番号

別添　安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

目次

1. 検体採取方法 8
1.1. 遺伝子組換え食品の検体採取 8
1.1.1. ダイズ及びトウモロコシの穀粒の検体採取 8

1.1.1.1. 袋積みの場合 9
1.1.1.2. ばら積みの場合 10
1.1.1.2.1. サイロ搬入時 10
1.1.1.2.2. はしけ搬入時 10
1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取 10
1.1.2. ダイズ及びトウモロコシの加工食品の検体採取 10
1.1.3. パパイヤの検体採取 11
1.1.3.1. 生鮮パパイヤの検体採取 11
1.1.3.2. パパイヤ加工品の検体採取 11
2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法 12
2.1. ダイズ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） 12
2.1.1. 定量 PCR 法 12
2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR 14
2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 14
2.1.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 16
2.1.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 16
2.1.1.1.4. 検量線の作成(ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) 16
2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR 17
2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 17
2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well） 17

1.1.1.1. 袋積みの場合 8
1.1.1.2. ばら積みの場合 9
1.1.1.2.1. サイロ搬入時 9
1.1.1.2.2. はしけ搬入時 9
1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取 9
1.1.2. ダイズ及びトウモロコシの加工食品の検体採取 9
1.1.3. パパイヤの検体採取 10
1.1.3.1. 生鮮パパイヤの検体採取 10
1.1.3.2. パパイヤ加工品の検体採取 10
2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法 11
2.1. ダイズ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） 11
2.1.1. 定量 PCR 法 11
2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR 13
2.1.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 13
2.1.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 14
2.1.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 15
2.1.1.1.4. 検量線の作成(ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700) 15
2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR 16
2.1.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 16
2.1.1.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well） 16

2.1.1.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384 well） 19
2.1.1.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 19
2.1.1.2.5. 検量線の作成（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 19
2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR 20
2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000） 20
2.1.1.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000） 20
2.1.1.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000） 21
2.1.1.3.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7000） 21
2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR 21
2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 21
2.1.1.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 21
2.1.1.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 23
2.1.1.4.4. 検量線の作成（Applied Biosystems® 7500） 23
2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR 23
2.1.1.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System） 23
2.1.1.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System） 25
2.1.1.5.3. PCR（Roche LightCycler System） 25
2.1.1.5.4. 検量線の作成（Roche LightCycler System） 26
2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR 26
2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 26
2.1.1.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 26
2.1.1.6.3. PCR（QuantStudio 5） 27
2.1.1.6.4. 検量線の作成（QuantStudio 5） 27
2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR 28

2.1.1.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96well 及び 384 well） 17
2.1.1.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 18
2.1.1.2.5. 検量線の作成（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 18
2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR 19
2.1.1.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000） 19
2.1.1.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000） 19
2.1.1.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000） 20
2.1.1.3.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7000） 20
2.1.1.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定量 PCR 20
2.1.1.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 20
2.1.1.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 20
2.1.1.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 22
2.1.1.4.4. 検量線の作成（Applied Biosystems® 7500） 22
2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR 22
2.1.1.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System） 22
2.1.1.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System） 24
2.1.1.5.3. PCR（Roche LightCycler System） 24
2.1.1.5.4. 検量線の作成（Roche LightCycler System） 25
2.1.1.6. QuantStudio 5 を用いた定量 PCR 25
2.1.1.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 25
2.1.1.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 25
2.1.1.6.3. PCR（QuantStudio 5） 26
2.1.1.6.4. 検量線の作成（QuantStudio 5） 26
2.1.1.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定量 PCR 27

2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 28	2.1.1.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 27
2.1.1.7.2.プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 28	2.1.1.7.2.プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 27
2.1.1.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 29	2.1.1.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 28
2.1.1.7.4. 検量線の作成（QuantStudio 12K Flex） 29	2.1.1.7.4.検量線の作成（QuantStudio 12K Flex） 28
2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR.. 29	2.1.1.8. LightCycler® 96 を用いた定量 PCR.. 28
2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 29	2.1.1.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 28
2.1.1.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 29	2.1.1.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 28
2.1.1.8.3. PCR（LightCycler® 96） 30	2.1.1.8.3. PCR（LightCycler® 96） 29
2.1.1.8.4. 検量線の作成（LightCycler® 96） 30	2.1.1.8.4. 検量線の作成（LightCycler® 96） 29
2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR...................................... 30	2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR...................................... 29
2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 30	2.1.1.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 29
2.1.1.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 31	2.1.1.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 30
2.1.1.9.3. PCR（LightCycler® 480） 31	2.1.1.9.3. PCR（LightCycler® 480） 30
2.1.1.9.4. 検量線の作成（LightCycler® 480） 31	2.1.1.9.4. 検量線の作成（LightCycler® 480） 30
2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算 32	2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算 31
2.1.3. 結果の判定 32	2.1.3. 結果の判定.. 31
2.1.4. Liberty Link Soybean（Event A2704-12）定量法（参考検査法） 32	（加える。）
2.1.5. ELISA 法（参考検査法） 33	2.1.4. ELISA 法（参考検査法） 31
2.2. ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） 35	2.2. ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） 33
2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 35	2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 33
2.2.1.1. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 35	2.2.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 34
2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 35	2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 34
2.2.1.1.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 37	2.2.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） .36
2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 38	2.2.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 36

2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 39
2.2.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR................. 39
2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 39
2.2.1.2.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） . 39
2.2.1.2.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 40
2.2.1.2.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 40
2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR.. 40
2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 40
2.2.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 40
2.2.1.3.3. PCR（QuantStudio 5） 41
2.2.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 41
2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 41
2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 41
2.2.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 41
2.2.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 42
2.2.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 42
2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR...................................... 42
2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 42
2.2.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 42
2.2.1.5.3. PCR（LightCycler® 96） 42
2.2.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 43
2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.................................... 43
2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 43
2.2.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 43
2.2.1.6.3. PCR（LightCycler® 480） 43
2.2.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 44

2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 37
2.2.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR....................... 37
2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 37
2.2.1.2.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 37
2.2.1.2.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 38
2.2.1.2.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 38
2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR.. 38
2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 38
2.2.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 39
2.2.1.3.3. PCR（QuantStudio 5） 39
2.2.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 39
2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 39
2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 39
2.2.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 40
2.2.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 40
2.2.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 40
2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR...................................... 40
2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 40
2.2.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 41
2.2.1.5.3. PCR（LightCycler® 96） 41
2.2.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 41
2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.................................... 42
2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 42
2.2.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 42
2.2.1.6.3. PCR（LightCycler® 480） 42
2.2.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 42

2.2.2. 結果の判定 44
2.3. トウモロコシ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） 50
2.3.1. 定量 PCR 法 50
2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量 51
2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量 52
2.3.1.3. 結果の判定 52
2.3.2. マルチプレックス PCR 法 52
2.3.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング 53
2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 53
2.3.2.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） . 56
2.3.2.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 56
2.3.2.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 56
2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング 56
2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 56
2.3.2.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 57
2.3.2.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 57
2.3.2.2.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 57
2.3.2.3. 結果の判定（図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム） 58
2.3.3. 粒単位検査法 60

2.2.2. 結果の判定 43
2.3. トウモロコシ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） 48
2.3.1. 定量 PCR 法 48
2.3.1.1. *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S が組み込まれた組換え系統の定量 49
2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量 50
2.3.1.3. 結果の判定 50
2.3.2. マルチプレックス PCR 法 50
2.3.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング 51
2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 51
2.3.2.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） . 54
2.3.2.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 54
2.3.2.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 54
2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング 55
2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 55
2.3.2.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 55
2.3.2.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 55
2.3.2.2.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 56
2.3.2.3. 結果の判定（図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム） 56
2.3.3. 粒単位検査法 58

2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法..... 60
2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製 60
2.3.3.1.2. プレート情報の設定 61
2.3.3.1.3. PCR 61
2.3.3.1.4. PCR 結果の解析 61
2.3.3.2. 結果の判定........ 61
2.3.4. グループ検査法 61
2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法..... 62
2.3.4.1.1. 反応液の調製 62
2.3.4.1.2. プレート情報の設定 64
2.3.4.1.3. PCR 64
2.3.4.1.4. PCR 結果の解析 65
2.3.4.1.5 結果の判定（図 5 グループ検査法試験結果の判定スキーム）........ 66
2.3.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法） 69
2.3.4.2.1. リアルタイム PCR........ 69
2.3.4.2.2. プレート情報の設定 71
2.3.4.2.3. PCR 71
2.3.4.2.4. 結果の判定........ 72
2.4. トウモロコシ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） 72
2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法........ 72
2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR........ 73
2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 73
2.4.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）. 75
2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 75

2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法..... 58
2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製 58
2.3.3.1.2. プレート情報の設定........ 59
2.3.3.1.3. PCR........ 59
2.3.3.1.4. PCR 結果の解析 59
2.3.3.2. 結果の判定 59
2.3.4. グループ検査法 59
2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法..... 60
2.3.4.1.1. 反応液の調製........ 60
2.3.4.1.2. プレート情報の設定........ 62
2.3.4.1.3. PCR........ 63
2.3.4.1.4. PCR 結果の解析 63
2.3.4.1.5 結果の判定（図 5 グループ検査法試験結果の判定スキーム）........ 64
2.3.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法） 67
2.3.4.2.1. リアルタイム PCR 67
2.3.4.2.2. プレート情報の設定........ 69
2.3.4.2.3. PCR........ 69
2.3.4.2.4. 結果の判定 70
2.4. トウモロコシ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） 70
2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 70
2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 71
2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 71
2.4.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）. 73
2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 73

2.4.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 75
2.4.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR....................... 76
2.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 76
2.4.1.2.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 76
2.4.1.2.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 77
2.4.1.2.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 77
2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR.. 77
2.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 77
2.4.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 77
2.4.1.3.3. PCR（QuantStudio 5） 78
2.4.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 78
2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 78
2.4.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 78
2.4.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 78
2.4.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 79
2.4.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 79
2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR...................................... 79
2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 79
2.4.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 80
2.4.1.5.3. PCR（LightCycler® 96） 80
2.4.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 80
2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.................................... 80
2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 80
2.4.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 81
2.4.1.6.3. PCR（LightCycler® 480） 81
2.4.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 81

2.4.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 73
2.4.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR....................... 74
2.4.1.2.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 74
2.4.1.2.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 74
2.4.1.2.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 75
2.4.1.2.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 75
2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR.. 75
2.4.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 75
2.4.1.3.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 75
2.4.1.3.3. PCR（QuantStudio 5） 76
2.4.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 76
2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 76
2.4.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 76
2.4.1.4.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 76
2.4.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 77
2.4.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 77
2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR...................................... 77
2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 77
2.4.1.5.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 78
2.4.1.5.3. PCR（LightCycler® 96） 78
2.4.1.5.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 78
2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR.................................... 78
2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 78
2.4.1.6.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 79
2.4.1.6.3. PCR（LightCycler® 480） 79
2.4.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 79

2.4.2. 結果の判定 81
2.5. ダイズ加工食品の検査法 87
2.5.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR . 87
2.5.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 87
2.5.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 88
2.5.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 88
2.5.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 88
2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR. 89
2.5.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 89
2.5.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well） 89
2.5.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 90
2.5.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 90
2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 91
2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR 91
2.5.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000） 91
2.5.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000） 92
2.5.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000） 92
2.5.3.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7000） 92
2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 92
2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 92
2.5.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 93

2.4.2. 結果の判定 79
2.5. ダイズ加工食品の検査法 85
2.5.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定性 PCR.. 85
2.5.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 85
2.5.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 86
2.5.1.3. PCR（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 86
2.5.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700） 86
2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定性 PCR. 87
2.5.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 87
2.5.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well） 87
2.5.2.3. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 88
2.5.2.4. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 88
2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well） 89
2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR 89
2.5.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000） 89
2.5.3.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7000） 90
2.5.3.3. PCR（ABI PRISM® 7000） 90
2.5.3.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7000） 90
2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 90
2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） 90
2.5.4.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500） 91

2.5.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 93	2.5.4.3. PCR（Applied Biosystems® 7500） 91
2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 94	2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500） 91
2.5.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR 94	2.5.5. Roche LightCycler System を用いた定性 PCR 91
2.5.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System） 94	2.5.5.1. PCR 用反応液の調製（Roche LightCycler System） 91
2.5.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System） 95	2.5.5.2. キャピラリー情報の設定（Roche LightCycler System） 92
2.5.5.3. PCR（Roche LightCycler System） 95	2.5.5.3. PCR（Roche LightCycler System） 92
2.5.5.4. 測定結果の解析（Roche LightCycler System） 95	2.5.5.4. 測定結果の解析（Roche LightCycler System） 93
2.5.6. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR 95	（加える。）
2.5.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5） 95	（加える。）
2.5.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5） 96	（加える。）
2.5.6.3. PCR（QuantStudio 5） 96	（加える。）
2.5.6.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） 96	（加える。）
2.5.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR 96	（加える。）
2.5.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） 96	（加える。）
2.5.7.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 97	（加える。）
2.5.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex） 97	（加える。）
2.5.7.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） 97	（加える。）
2.5.8. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR 97	（加える。）
2.5.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） 97	（加える。）
2.5.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） 98	（加える。）
2.5.8.3. PCR（LightCycler® 96） 98	（加える。）
2.5.8.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96） 98	（加える。）
2.5.9. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 98	（加える。）
2.5.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480） 98	（加える。）
2.5.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480） 99	（加える。）
2.5.9.3. PCR（LightCycler® 480） 99	（加える。）

2.5.9.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480） 99
2.5.10. 測定結果の判定 100
2.6. トウモロコシ加工食品の検査法 103
2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 103
2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 103
2.6.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 105
2.6.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 105
2.6.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 105
2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 106
2.6.2.1. PCR 用反応液の調製*1（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 106
2.6.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 107
2.6.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 108
2.6.2.4. 測定結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 108
2.6.3. 測定結果の判定 108
2.7. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法 112
2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法 112
2.7.1.1. CTAB 法 112
2.7.1.2. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit:トウモロコシに適用） 114
2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用） 115
2.7.1.4. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用） 116

（加える。）
2.5.6. 測定結果の判定 93
2.6. トウモロコシ加工食品の検査法 97
2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 97
2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 97
2.6.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 99
2.6.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 99
2.6.1.4. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well） 99
2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR...... 100
2.6.2.1. PCR 用反応液の調製*1（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 100
2.6.2.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 101
2.6.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 102
2.6.2.4. 測定結果の解析（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 102
2.6.3. 測定結果の判定 102
2.7. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法 106
2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法 106
2.7.1.1. CTAB 法 106
2.7.1.2. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit:トウモロコシに適用） 108
2.7.1.3. シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit: ダイズに適用） 109
2.7.1.4. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用） 110

2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用） 117
2.7.1.6. シリカベースレジンタイプキット法（Promega Wizard DNA Clean-up System） 118
2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法 119
2.7.2.1. 検体前処理 120
2.7.2.1.1. ダイズ加工食品 120
2.7.2.1.2. トウモロコシ加工食品 123
2.7.2.2. DNA の抽出精製 124
2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用） 124
2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用） 126
2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出 127
2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用） 128
2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用） 129
2.7.2.2.6. CTAB を用いた DNA の抽出 130
2.7.3. 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 131
2.7.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製 131
2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製 132
2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製（NIPPON GENE GM quicker） 133
2.8. パパイヤ検査法（55-1 系統） 134

2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用） 111
2.7.1.6. シリカベースレジンタイプキット法（Promega Wizard DNA Clean-up System） 112
2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法 113
2.7.2.1. 検体前処理 114
2.7.2.1.1. ダイズ加工食品 114
2.7.2.1.2. トウモロコシ加工食品 117
2.7.2.2. DNA の抽出精製 118
2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用） 118
2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用） 120
2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出 121
（加える。）
（加える。）
2.7.2.2.4. CTAB を用いた DNA の抽出 122
2.7.3. 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 123
2.7.4. トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料液調製 124
2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製 125
2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製（NIPPON GENE GM quicker） 125
2.8. パパイヤ検査法（55-1 系統） 126

2.8.1. 検査原則及び試料調製法 134
2.8.2. GUS 試験法 134
2.8.2.1. 実験操作 134
2.8.2.2. 結果の判定 136
2.8.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 136
2.8.3.1. 試料前処理 137
2.8.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製 138
2.8.3.2.1. DNA の抽出精製*1 138
2.8.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存 140
2.8.3.3. リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500） 140
2.8.3.3.1. PCR 用反応液の調製 141
2.8.3.3.2. プレート情報の設定 141
2.8.3.3.3. PCR 142
2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定 142
（別紙 1）内標比 145
（別紙 2）トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順 152
（参考） 154
検査方法の同等性確認方法 156

別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

1. （略）

2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法

2.8.1. 検査原則及び試料調製法 126
2.8.2. GUS 試験法 127
2.8.2.1. 実験操作 127
2.8.2.2. 結果の判定 129
2.8.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 129
2.8.3.1. 試料前処理 130
2.8.3.2. パパイヤ試料からの DNA の抽出精製 131
2.8.3.2.1. DNA の抽出精製*1 131
2.8.3.2.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製及び保存 132
2.8.3.3. リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500） 133
2.8.3.3.1. PCR 用反応液の調製 133
2.8.3.3.2. プレート情報の設定 134
2.8.3.3.3. PCR 135
2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定 135
（別紙 1）内標比 138
（別紙 2）トウモロコシ粒単位検査法のための DNA 試料調製手順 144
（参考） 146
検査方法の同等性確認方法 148

別添 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法

1. （略）

2. 安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査法

（略）

2.1. ダイズ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法）

遺伝子組換えダイズに関しては、国内に流通する Roundup Ready Soybean（40-3-2）（以下「RRS」という。）、Roundup Ready 2 Yield （Event MON89788）（以下「RRS2」という。）及び *Streptomyces viridochromogenes* 由来の phosphinothricin-N-acetyltransferase（以下「PAT」という。）を持つ系統を対象とする。PAT を持つ遺伝子組換えダイズとしては、A2704-12、A5547-127、DAS44406、DAS68416、DAS81419、SYHT0H2 等がある。

2.1.1. 定量 PCR 法

TaqMan Chemistry を応用した定量 PCR 法を行う。同法では、プライマー対及び蛍光オリゴヌクレオチドプローブを使用する。当プローブはプライマー対により増幅される塩基配列中に相補鎖を形成するよう設計されている。また、同プローブにはレポーター、クエンチャー両色素が結合しており、DNA ポリメラーゼによる増幅産物の伸長反応に伴い加水分解を受けると、蛍光を放射する。蛍光強度は、PCR サイクル数に対し指数関数的に増強し、また一定の蛍光強度に達するまでのサイクル数は、鋳型 DNA 量に依存する。したがって、一定の蛍光強度に達した PCR サイクル数を比較することで、鋳型 DNA 量が求められる。

遺伝子組換え農産物の定量は、非組換え体、組換え体を問わず普遍的に存在する遺伝子（内在性遺伝子）を内標として用い、内在性遺伝子のコピー数に対する組換え遺伝子のコピー数を求めることで行う。本法においては、標準物質として標準プラスミド DNA 溶液*1 を使用する。標準プラスミド DNA 溶液に含まれる DNA の量はコピー数として規定されており、そのため、定量 PCR の結果はコピー数として求められる。

（略）

2.1. ダイズ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法）

遺伝子組換えダイズに関しては、国内に流通する RoundupReady Soybean（40-3-2）（以下「RRS」という。）、Liberty Link Soybean （Event A2704-12）（以下「LLS」という。）及び Roundup Ready 2 Yield （Event MON89788）（以下「RRS2」という。）を対象とする。

2.1.1. 定量 PCR 法

TaqMan Chemistry を応用した定量 PCR 法を行う。同法では、プライマー対及び蛍光オリゴヌクレオチドプローブを使用する。当プローブはプライマー対により増幅される塩基配列中に相補鎖を形成するよう設計されている。また、同プローブにはレポーター、クエンチャー両色素が結合しており、DNA ポリメラーゼによる増幅産物の伸長反応に伴い加水分解を受けると、蛍光を放射する。蛍光強度は、PCR サイクル数に対し指数関数的に増強し、また一定の蛍光強度に達するまでのサイクル数は、鋳型 DNA 量に依存する。したがって、一定の蛍光強度に達した PCR サイクル数を比較することで、鋳型 DNA 量が求められる。

遺伝子組換え農産物の定量は、非組換え体、組換え体を問わず普遍的に存在する遺伝子（内在性遺伝子）を内標として用い、内在性遺伝子のコピー数に対する組換え遺伝子のコピー数を求めることで行う。本法においては、標準物質として標準プラスミド DNA 溶液*1 を使用する。標準プラスミド DNA 溶液に含まれる DNA の量はコピー数として規定されており、そのため、定量 PCR の結果はコピー数として求められる。

ダイズを対象とした定量 PCR 法においては、ダイズに普遍的に存在するレクチン遺伝子（以下「Le1」という。）を内在性遺伝子としている。検査の際には、まず Le1 を標的とするプライマー対（Le1-n02）とプローブ（Le1-Taq）*2 を使用し定量 PCR を行い、DNA 試料液中の Le1 のコピー数を求める。また、同時に、同一 DNA 試料液について、組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ*3 を使用し別に定量 PCR を行い、組換え遺伝子のコピー数を求める。組換え遺伝子のコピー数を Le1 のコピー数で除し、その値をあらかじめ求められている係数（内標比*4）でさらに除して得られた値に 100 を乗じたものが、試料中に含まれる遺伝子組換え作物の含有率（重量パーセント）となる。

以下に定量 PCR 法の実際を述べる。定量 PCR は、RRS 検知法は ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT（96 well 及び 384 well）、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。RRS2 検知法及び PAT 検知法は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。また、使用する機種により、試薬、反応液組成、反応条件、手技及び解析手法が異なるため、検査に際しては、以下機種ごとに記載された各項に従い、必ず使用する機種に適した方法を用いること。なお、PCR 法で用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ･cm まで精製した超純水とする。

*1 標準プラスミド DNA 溶液

標準プラスミド DNA（内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とした特

ダイズを対象とした定量 PCR 法においては、ダイズに普遍的に存在するレクチン遺伝子（以下「Le1」という。）を内在性遺伝子としている。検査の際には、まず Le1 を標的とするプライマー対（Le1-n02）とプローブ（Le1-Taq）*2 を使用し定量 PCR を行い、DNA 試料液中の Le1 のコピー数を求める。また、同時に、同一 DNA 試料液について、組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ*3 を使用し別に定量 PCR を行い、組換え遺伝子のコピー数を求める。組換え遺伝子のコピー数を Le1 のコピー数で除し、その値をあらかじめ求められている係数（内標比*4）でさらに除して得られた値に 100 を乗じたものが、試料中に含まれる遺伝子組換え作物の含有率（重量パーセント）となる。

以下に定量 PCR 法の実際を述べる。定量 PCR は、RRS 検知法は ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT（96 well 及び 384 well）、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。LLS 検知法及び RRS2 検知法は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。また、使用する機種により、試薬、反応液組成、反応条件、手技及び解析手法が異なるため、検査に際しては、以下機種ごとに記載された各項に従い、必ず使用する機種に適した方法を用いること。なお、PCR 法で用いる水は、特に断り書きがない限り全て逆浸透膜精製した RO 水又は蒸留水を Milli-Q 等で 17 MΩ･cm まで精製した超純水とする。

*1 標準プラスミド DNA 溶液

標準プラスミド DNA（内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とした特

異的プライマー対により増幅された増幅産物をプラスミド上に連結したもの）を、ColE1/TE 溶液（5 ng/µL）で規定のコピー数となるように希釈した溶液。本分析法においては 20、125、1,500、20,000、250,000 コピーの 5 段階希釈液に加え、標準プラスミド DNA の含まれていない ColE1/TE 溶液（5 ng/µL）をブランク試料液（NTC：no template control）とした、計 6 点について検量線を作成する。なお、ColE1/TE 溶液とは、大腸菌由来の配列確認のされているプラスミド（ColE1 プラスミド）を TE 緩衝液で 5 ng/µL の濃度に調製した溶液である。ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

RRS 検知：GM ダイズ（RRS）陽性コントロールプラスミド

RRS2 検知：GM ダイズ（RRS2）陽性コントロールプラスミド

PAT 検知：GM ダイズ（PAT）陽性コントロールプラスミド

*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ

Le1n 02-5'（5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'）、

Le1n 02-3'（5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'）及び

Le1-Taq（5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA - 3'）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

RRS 検知：

RRS 01-5'（5'-CCTTTAGGATTTCAGCATCAGTGG-3'）、

RRS 01-3'（5'-GACTTGTCGCCGGGAATG-3'）及び

RRS-Taq（5'-FAM-CGCAACCGCCCGCAAATCC-TAMRA-3'）

（削る。）

異的プライマー対により増幅された増幅産物をプラスミド上に連結したもの）を、ColE1/TE 溶液（5 ng/µL）で規定のコピー数となるように希釈した溶液。本分析法においては 20、125、1,500、20,000、250,000 コピーの 5 段階希釈液に加え、標準プラスミド DNA の含まれていない ColE1/TE 溶液（5 ng/µL）をブランク試料液（NTC：no template control）とした、計 6 点について検量線を作成する。なお、ColE1/TE 溶液とは、大腸菌由来の配列確認のされているプラスミド（ColE1 プラスミド）を TE 緩衝液で 5 ng/µL の濃度に調製した溶液である。ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

RRS 検知：GM ダイズ（RRS）陽性コントロールプラスミド

LLS 検知：GM ダイズ（LLS）陽性コントロールプラスミド

RRS2 検知：GM ダイズ（RRS2）陽性コントロールプラスミド

*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ

Le1-n02［Le1n 02-5'（5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'） &

Le1n 02-3'（5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3')］及び

Le1-Taq（5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA - 3'）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

RRS 検知：

RRS-01［RRS 01-5'（5'-CCTTTAGGATTTCAGCATCAGTGG-3'）&

RRS 01-3'（5'-GACTTGTCGCCGGGAATG-3')］及び

RRS-Taq（5'-FAM-CGCAACCGCCCGCAAATCC-TAMRA-3'）

LLS 検知：KVM175（5'-GCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT-3'）、

SMO001（5'-ATTCAGGCTGCGCAACTGTT-3'）及び

TM031（5'-FAM-CGGTCCTCCGATCGCCCTTCC-TAMRA-3'）

RRS2 検知　（略）

PAT 検知：PAT-120F（5'-AGATACCCTTGGTTGGTTGCTG-3'）、

PAT-120R（5'-ATGTGACACGTAAACAGTACTCTCA-3'）及び

PAT-1-Taq（5'-FAM-TGCTTACGCTGGGCCCTGGAAG-TAMRA-3'）

*4 内標比

純粋な遺伝子組換え体の種子を対象に定量 PCR を実施し、得られる組換え遺伝子のコピー数と内在性遺伝子（ダイズの場合 Le1）のコピー数との比を求めたもの。この内標比は各組換え作物系統に固有であり、常に一定の値を示すと考えられる。各プライマー対及びプローブを用いて測定を行った組換え作物系統ごとの内標比は別紙 1 に規定する。PAT を用いた際の内標比は DAS44406 を対象として算出されたものを用いる。同系統は組換え遺伝子中に PAT 配列が 1 コピーしか存在しないことから、遺伝子組換えダイズの含有率を過小評価する可能性は低い。なお、内標比は定量 PCR 法に使用する機種によって異なるため、混入率の算出時には必ず使用した機種につき規定されている内標比を用いること。また、使用する試薬によっても影響を受ける可能性が考えられるため、最終頁の（参考）にも記載のある機種に適した試薬類を確認の上、使用すること。

2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR

2.1.1.1.1～2.1.1.1.3.　（略）

2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量（ΔRn）をプロットした増幅曲線（Amplification Plot）上で、検量線用標準プラ

RRS2 検知　（略）

（加える。）

*4 内標比

純粋な遺伝子組換え体の種子を対象に定量 PCR を実施し、得られる組換え遺伝子のコピー数と内在性遺伝子（ダイズの場合 Le1）のコピー数との比を求めたもの。この内標比は各組換え作物系統に固有であり、常に一定の値を示すと考えられる。各プライマー対及びプローブを用いて測定を行った組換え作物系統ごとの内標比は別紙 1 に規定する。なお、内標比は定量 PCR 法に使用する機種によって異なるため、混入率の算出時には必ず使用した機種につき規定されている内標比を用いること。また、使用する試薬によっても影響を受ける可能性が考えられるため、最終頁の（参考）にも記載のある機種に適した試薬類を確認の上、使用すること。

2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR

2.1.1.1.1～2.1.1.1.3.　（略）

2.1.1.1.4. 検量線の作成（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）

内在性遺伝子及び組換え遺伝子のそれぞれにつき以下の操作で検量線を作成する。サイクル数に対して蛍光シグナルの増加量（ΔRn）をプロットした増幅曲線（Amplification Plot）上で、検量線用標準プラ

スミド DNA 溶液及び DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している ΔRn 部を選択し、Threshold line（Th）を引く。この際、ブランク試料液（NTC）で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と検量線用標準プラスミド DNA 溶液の蛍光シグナルが交差した点を Threshold cycle（Cq）値*1 とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数値（x 軸）に対する Cq 値（y 軸）をプロットし、各 Cq 値に対して得られた近似直線を検量線とする*2。

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5 及び QuantStudio 12K Flex では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本法では表記を Cq 値に統一する。

*2 （略）

2.1.1.2.～2.1.1.8. （略）

2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR

2.1.1.9.1.～2.1.1.9.3. （略）

2.1.1.9.4. 検量線の作成（LightCycler® 480）

（略）

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]

スミド DNA 溶液及び DNA 試料液由来の蛍光シグナルが指数関数的に増幅している ΔRn 部を選択し、Threshold line（Th）を引く。この際、ブランク試料液（NTC）で出現することのある非特異的増幅曲線と交差しないように注意する。また、Base Line は Start を 3 に、End を 15 に設定する。Th と検量線用標準プラスミド DNA 溶液の蛍光シグナルが交差した点を Threshold cycle（Cq）値とする。次に各々の検量線用標準プラスミド DNA 溶液のコピー数の対数値（x 軸）に対する Cq 値（y 軸）をプロットし、各 Cq 値に対して得られた近似直線を検量線とする*。

（加える。）

* （略）

2.1.1.2.～2.1.1.8. （略）

2.1.1.9. LightCycler® 480 を用いた定量 PCR

2.1.1.9.1.～2.1.1.9.3. （略）

2.1.1.9.4. 検量線の作成（LightCycler® 480）

（略）

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}にて、[Analysis Type *Abs

にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cp 値が表示される。Negative Control が増幅していない（Cp 値を算出していない）ことを確認の後、検量線においては「Error.」の値を確認し、0.2 未満であった場合に以降のコピー数の算出を行う。	Quant/2nd Derivative Max]及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cp 値が表示される。Negative Control が増幅していない（Cp 値を算出していない）ことを確認の後、検量線においては「Error.」の値を確認し、0.2 未満であった場合に以降のコピー数の算出を行う。
2.1.2.　（略）	2.1.2.　（略）
2.1.3. 結果の判定 1 検体の粉砕試料（500 g）につき DNA を 3 併行抽出し、DNA 試料を得る（3DNA 試料/1 検体）。各 DNA 試料について、定量 PCR 法により得られた RRS の含有率に RRS2 の含有率と PAT の含有率を加え、3 併行抽出した DNA 試料の平均値を算出する。その値が 5%を超えた試料については、不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。	2.1.3. 結果の判定 1 検体の粉砕試料（500 g）につき DNA を 3 回併行抽出し、DNA 試料を得る（3DNA 試料/1 検体）。各 DNA 試料について、定量 PCR 法により得られた RRS の含有率に LLS の含有率と RRS2 の含有率を加えた平均値が 5%を超えた試料については、不適切な分別生産流通管理が行われていた可能性がある。
2.1.4. Liberty Link Soybean（Event A2704-12）定量法（参考検査法） 参考検査法として、遺伝子組換えダイズ Liberty Link Soybean（Event A2704-12）（以下「LLS」という。）に特異的なリアルタイム PCR 法を用いることができる。同法では検体中の LLS の混入率の定量が可能である（注意：LLS は PAT を持つため、検体に LLS が混入している場合、PAT と LLS を二重に定量することになり、2.1.3.で算出された平均値に同法で算出された LLS の含有率を加えた平均値で分別生産流通管理の判定はできない。）。LLS の混入率は 2.1.1. 定量 PCR 法*1,2,3 を用いて、Le1 のコピー数に対する LLS のコピー数を求めることで算出する。定量 PCR は、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio	(加える。)

5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。操作方法については、2.1.1.2.、2.1.1.4.、2.1.1.6.～2.1.1.9.及び2.1.2.と同様に行う。

*1 標準プラスミド DNA 溶液
LLS 検知：GM ダイズ（LLS）陽性コントロールプラスミド
*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ
Le1n 02-5'（5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'）、
Le1n 02-3'（5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'）及び
Le1-Taq（5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA -3'）
*3 LLS を標的とするプライマー対とプローブ
KVM175（5'-GCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT-3'）、
SMO001（5'-ATTCAGGCTGCGCAACTGTT-3'）及び
TM031（5'-FAM-CGGTCCTCCGATCGCCCTTCC-TAMRA-3'）

2.1.5.　（略）

2.2. ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）（略）

2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

本法では、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、ダイズに普遍的に存在する内在性遺伝子として Le1、RRS 等に共通して存在する組換え配列として Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter（以下「P35S」という。）、DAS44406 等に共通して存在す

2.1.4.　（略）

2.2. ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）（略）

2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

本法では、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、ダイズに普遍的に存在する内在性遺伝子として Le1、RRS 及び LLS に共通して存在する組換え配列として *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S promoter（以下「P35S」という。）並びに RRS2 を検知する

る組換え配列として PAT、並びに RRS2 を検知する 4 試験を行う。PCR 装置は、P35S 及び RRS2 試験については、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行うことができる。PAT 試験については、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行うことができる。

また、本法は、標準試料液を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、DNA 試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における Cq 値と各標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差［ΔΔCq = ΔCq(DNA 試料液) – ΔCq(標準試料液)］を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液*を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。

（削る。）

* 標準プラスミド DNA 溶液

本法においては、Le1 検知試験用：100,000 コピー/μL、P35S 検知試験用：50 コピー/μL、PAT 検知試験用：50 コピー/μL 及び RRS2 検知試験用：50 コピー/μL を使用する。GM ダイズ混入判定用プラス

検知試験 3 試験を行う。PCR 装置は、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。

また、本法は、標準試料液を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、DNA 試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における Cq 値*1 と各標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差［ΔΔCq = ΔCq(DNA 試料液) – ΔCq(標準試料液)］を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液*2 を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5 及び QuantStudio 12K Flex では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本法では表記を Cq 値に統一する。

*2 標準プラスミド DNA 溶液

本法においては、Le1 検知試験用：100,000 コピー/μL、P35S 検知試験用：50 コピー/μL 及び RRS2 検知試験用：50 コピー/μL を使用する。GM ダイズ混入判定用プラスミドセットとして、ニッポンジ

ミドセットとして、ニッポンジーン社又はファスマック社から購入可能である。

2.2.1.1. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。

TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 12.5 µL、対象プライマー対溶液*2,3（各プライマー、25 µM）0.5 µL、対象プローブ溶液*2,3（10 µM）0.5 µL、水 6.5 µL 及び 10 ng/µL DNA 試料液 5 µL（50 ng）、標準プラスミド DNA 溶液 5 µL 又は 5 ng/µL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液：NTC）5 µL*4。DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液はいずれも検知試験ごと、かつ、2 ウェル併行で行う。また、PCR 用反応液は 2 ウェル分を同時に調製する。

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、検知試験ごとに以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ TaqMan® Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 検体の場合は 1 検知試験当たり 208 µL が適当である（下記表参照)。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*5 の微量遠沈管に 46.4 µL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液又はブランク試料液を 11.6 µL 加え、十分に撹拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 µL/well として 96 ウェルプレ

ーン社又はファスマック社から購入可能である。

2.2.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。

TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 12.5 µL、対象プライマー対溶液*2,3（各プライマー、25 µM）0.5 µL、対象プローブ溶液*2,3（10 µM）0.5 µL、水 6.5 µL 及び 10 ng/µL DNA 試料液 5 µL（50 ng）、標準プラスミド DNA 溶液 5 µL 又は 5 ng/µL ColE1/TE 溶液（ブランク試料液：NTC）5 µL*4。DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液及びブランク試料液はいずれも検知試験ごと、かつ、2 ウェル併行で行う。また、PCR 用反応液は 2 ウェル分を同時に調製する。

実際の調製は、反応液の調製及び PCR で生じる誤差を減少させるため、検知試験ごとに以下の手順に従って行う。まず、あらかじめ TaqMan® Universal PCR Master Mix に対象プライマー対、対象プローブを加えた溶液（マスターミックス）を調製する。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 検体の場合は 1 検知試験当たり 208 µL が適当である（下記表参照)。混合時にはボルテックスミキサーを用いて十分に撹拌し、撹拌後には軽く遠心する。次いで、マスターミックスを必要数*5 の微量遠沈管に 46.4 µL ずつ分注する。分注後、各微量遠沈管に対応する DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液又はブランク試料液を 11.6 µL 加え、十分に撹拌した後、軽く遠心する。このようにして調製した混合溶液を 25 µL/well として 96 ウェルプレ

ート上のウェルに分注する。このとき、DNA 試料液については、ΔCq 値を算出する際の各検知試験のウェルの組合せを決めること*6。分注操作終了後、真上からシールし、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ターを用いて行う*7。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（又はプレート用の遠心機が使用できる場合は、遠心して）気泡を抜いておく。

表　（略）

*1　（略）

*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ

Le1n 02-5'（5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'）、
Le1n 02-3'（5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'）及び
Le1-Taq （5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA -3'）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

P35S 検知：
P35S 1-5'（5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'）、
P35S 1-3'（5'- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'）及び
P35S-Taq （5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3'）

PAT 検知：
PAT-120F（5'-AGATACCCTTGGTTGGTTGCTG-3'）、
PAT-120R（5'-ATGTGACACGTAAACAGTACTCTCA-3'）及び

ート上のウェルに分注する。このとき、DNA 試料液については、ΔCq 値を算出する際の各検知試験のウェルの組合せを決めること*6。分注操作終了後、真上からシールし、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ターを用いて行う*7。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（又はプレート用の遠心機が使用できる場合は、遠心して）気泡を抜いておく。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*8 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。

表　（略）

*1　（略）

*2 Le1 を標的とするプライマー対とプローブ

Le1-n02［Le1n 02-5'（5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'）&
Le1n 02-3'（5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'）］及び
Le1-Taq （5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC -TAMRA -3'）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

P35S 検知：
P35S-1［P35S 1-5'（5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'）&
P35S 1-3'（5'- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'）］及び
P35S-Taq （5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3'）

（加える。）

PAT-1-Taq（5'-FAM- TGCTTACGCTGGGCCCTGGAAG-TAMRA-3'）

RRS2 検知　（略）

*4・*5　（略）

*6 DNA 試料液における各検知試験のウェルの組合せ

標準プラスミド DNA 溶液は、2 ウェル併行の平均 Cq 値から ΔCq 値を算出するが、DNA 試料液については、1 ウェルごとの Cq 値から ΔCq 値を算出する。このため、各検知試験の 2 ウェル併行から 1 ウェルずつ選択し、ΔCq 値を算出するウェルの組合せを決めることが必要となる。なお、P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験は、異なるウェルプレート上で行うことも可能だが、その場合はそれぞれのウェルプレート上で Le1 検知試験を行うことに留意する。

*7　（略）

（削る。）

2.2.1.1.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500）

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まずプローブ特性の設定を行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*1 の場合は、プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*2。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブ

RRS2 検知　（略）

*4・*5　（略）

*6 DNA 試料液における各検知試験のウェルの組合せ

標準プラスミド DNA 溶液は、2 ウェル併行の平均 Cq 値から ΔCq 値を算出するが、DNA 試料液については、1 ウェルごとの Cq 値から ΔCq 値を算出する。このため、各検知試験の 2 ウェル併行から 1 ウェルずつ選択し、ΔCq 値を算出するウェルの組合せを決めることが必要となる。なお、P35S 検知試験、RRS2 検知試験は、異なるウェルプレート上で行うことも可能だが、その場合はそれぞれのウェルプレート上で Le1 検知試験を行うことに留意する。

*7　（略）

*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.2.1.1.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まずプローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次

のセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

*1 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合

まず、トップ画面で「Advanced Setup」を選択し、新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する標準プラスミド DNA 溶液、DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「Assign Targets and Samples」画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを

に検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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」：ブランク試料液、「Unknown」：DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

（加える。）

選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*2 （略）

2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）

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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合、反応条件の設定において RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。なお、下降部分は 100%のままで使用する。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）

（略）

2.2.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

* （略）

2.2.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。なお、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェックを入れておく。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。

（加える。）

2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

（略）

2.2.1.2. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR

2.2.1.2.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad*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。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.2.1.2.2. プレート情報の設定（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。設定した Detector を Set up タブに登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

（削る。）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.2.1.2.2. プレート情報の設定（Applied Biosystems® 7500）

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、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*1 の場合は、プローブ特性は Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*2。設定した Detector を Well Inspector に登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、名称を入力しておく。また Passive Reference を「ROX」と設定する。

*1 ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合

* （略）

2.2.1.2.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

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 2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。なお、反応条件の設定において 9600 emulation モードのチェッ

まず、トップ画面で「Advanced Setup」を選択し、新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Plate Setup 画面内の「Define Targets and Samples」画面で Target を作成し、Reporter を「FAM」、Quencher を「TAMRA」となるよう設定する。同じく「Define Targets and Samples」画面で測定する標準プラスミド DNA 溶液、DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、「Assign Targets and Samples」画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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（「N」: ブランク試料液、「U」: DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。「Select the dye to use as the Passive Reference」は「ROX」と設定する。

*2 （略）

2.2.1.2.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）

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 2.2.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。なお、ソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合、反

クを入れておく。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。

（削る。）

2.2.1.2.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

（削る。）

2.2.1.3.2.　（略）

2.2.1.3.3. PCR（QuantStudio 5）

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。

応条件の設定において RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* ソフトウェアのバージョンが 2.0 以降の場合は、ramp rate の変更が必要で温度が上昇していく部分の ramp rate を 100%から 64%に変更する。なお下降部分は 100%のままで使用する。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.2.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。

2.2.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.2.1.3.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.2.1.3.2.　（略）

2.2.1.3.3. PCR（QuantStudio 5）

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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

（削る。）

2.2.1.4.2.　（略）

2.2.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）

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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確

反応条件は 2.2.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.3.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。

2.2.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.2.1.4.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.2.1.4.2.　（略）

2.2.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）

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 2.2.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

認して測定結果の解析を行う。

2.2.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおり。

2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR

2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。ただし、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については、以下の注釈を参照すること*。

* （略）

（削る。）

2.2.1.5.2. （略）

2.2.1.5.3. PCR（LightCycler® 96）

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、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。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で反応条件を設定する。反応条件は 2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。[Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーの

2.2.1.4.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex）

PCR 結果の解析は、2.2.1.1.4. PCR 結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。

2.2.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR

2.2.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、*7 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及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること*1,2。

*1 （略）

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.2.1.5.2. （略）

2.2.1.5.3. PCR（LightCycler® 96）

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、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。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で反応条件を設定する。反応条件は 2.2.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。[Start] をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバー

ステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.2.1.5.4. （略）

2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおり。ただし、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については、以下の注釈を参照すること*。

* （略）

（削る。）

2.2.1.6.2. （略）

2.2.1.6.3. PCR（LightCycler® 480）

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を出し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 2.2.1.1.3. PCR（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.2.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）

のステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

2.2.1.5.4. （略）

2.2.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.2.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.2.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、*7 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及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること*1,2。

*1 （略）

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.2.1.6.2. （略）

2.2.1.6.3. PCR（LightCycler® 480）

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を出し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 2.2.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。 RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

2.2.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）

（略）

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.2.2. 結果の判定

（略）

（図 1）リアルタイム PCR 試験結果の各ウェルの判定スキーム（ダイズ）

DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液における P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験ごとに ΔCq 値を算出する。算出に当たって各検知試験の Cq 値は、DNA 試料液であれば 1 ウェルごとの値* [ΔCq (DNA 試料液) = Cq(P35S、PAT 又は RRS2) – Cq(Le1)]、標準プラスミド DNA 溶液であれば 2 ウェル併行の平均値［ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液) = Cq(P35S、PAT 又は RRS2) – Cq(Le1)］とする。次に、得られた ΔCq 値から DNA 試料液における P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験 1 ウェルごとの ΔΔCq 値［ΔΔCq =ΔCq (DNA 試料液)－ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液)］を算出し、以下の判定を行う。

(1) （略）

(2) 得られた ΔΔCq 値が 0 より大きい場合［ΔΔCq > 0］又は DNA 試料液における P35S 検知試験、PAT 検知試験若しくは RRS2 検知試験において Cq 値が得られず ΔCq 値が算出できない場合、そのウェルは「－」と判定する。

（略）

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}にて、[Analysis Type *Abs Quant/2nd Derivative Max]及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.2.2. 結果の判定

（略）

（図 1）リアルタイム PCR 試験結果の各ウェルの判定スキーム（ダイズ）

DNA 試料液及び標準プラスミド DNA 溶液における P35S 検知試験、RRS2 検知試験ごとに ΔCq 値を算出する。算出に当たって各検知試験の Cq 値は、DNA 試料液であれば 1 ウェルごとの値*［ΔCq (DNA 試料液) = Cq(P35S 又は RRS2) – Cq(Le1)]、標準プラスミド DNA 溶液であれば 2 ウェル併行の平均値[ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液) = Cq(P35S 又は RRS2) – Cq(Le1)] とする。次に、得られた ΔCq 値から DNA 試料液における P35S 検知試験、RRS2 検知試験 1 ウェルごとの ΔΔCq 値［ΔΔCq =ΔCq (DNA 試料液)－ΔCq(標準プラスミド DNA 溶液)］を算出し、以下の判定を行う。

(1) （略）

(2) 得られた ΔΔCq 値が 0 より大きい場合［ΔΔCq > 0］又は DNA 試料液における P35S 検知試験若しくは RRS2 検知試験において Cq 値が得られず ΔCq 値が算出できない場合、そのウェルは「－」と判定する。

＊ ΔCq 値を算出するに当たっての各検知試験（Le1、P35S、PAT 及び RRS2）のウェルの組合せは、PCR 用反応液をプレートに分注する際に決めた組合せとする。

（図 2）リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）
DNA 試料液における P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。
(1)・(2)　（略）
(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記(1)以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

＊　（略）

（図 3）2 併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）
得られた結果から以下の判定を行う。
(1) P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験のうち 1 試験以上で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陽性と判定された場合、当該検体を検体陽性と判定する。
(2) P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験の全てで、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。
(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体から抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を実施し*、得られた結果が上記(1)以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

＊ΔCq 値を算出するに当たっての各検知試験（Le1、P35S 及び RRS2）のウェルの組合せは、PCR 用反応液をプレートに分注する際に決めた組合せとする。

（図 2）リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）
DNA 試料液における P35S 検知試験、RRS2 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。
(1)・(2)　（略）
(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記(1)と(2)以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

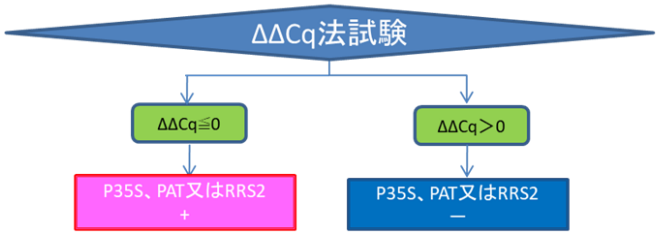
＊　（略）

（図 3）2 併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）
得られた結果から以下の判定を行う。
(1) P35S 検知試験及び RRS2 検知試験のいずれか又は両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陽性と判定された場合、当該検体を検体陽性と判定する。
(2) P35S 検知試験及び RRS2 検知試験の両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。
(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体からの「2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製

* P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験のいずれかで、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合、再抽出した DNA 試料液による当該検知試験は不要とする。なお、いずれの場合も Le1 検知試験は実施する必要があることに留意する。

図1 リアルタイムPCR試験結果の各ウェルの判定スキーム（ダイズ）

ΔCq＝Cq*（P35S、PAT又はRRS2）－Cq*（Le1）
ΔΔCq＝ΔCq（DNA試料液）－ ΔCq（標準プラスミドDNA溶液）



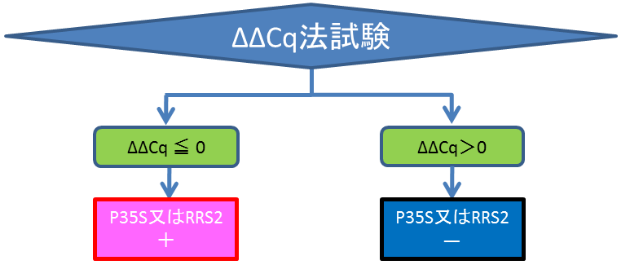
*DNA試料液のCq値は1ウェルごとの値、
標準プラスミドDNA溶液のCq値は2ウェルの平均値を用いる

以降の操作を実施し*、得られた結果が上記(1)と(2)以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

* P35S 検知試験又は RRS2 検知試験で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計 4 ウェル）において試料液陰性と判定された場合、再抽出した DNA 試料液による当該検知試験は不要とする。なお、いずれの場合も Le1 検知試験は実施する必要があることに留意する。

図1 リアルタイムPCR試験結果の各ウェルの判定スキーム（ダイズ）

ΔCq＝Cq *（P35S又はRRS2）－Cq *（Le1）
ΔΔCq＝ΔCq（DNA試料液）－ ΔCq（標準プラスミドDNA溶液）



* DNA試料液のCq値は1ウェルごとの値、
標準プラスミドDNA溶液のCq値は2ウェルの平均値を用いる

図2　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）

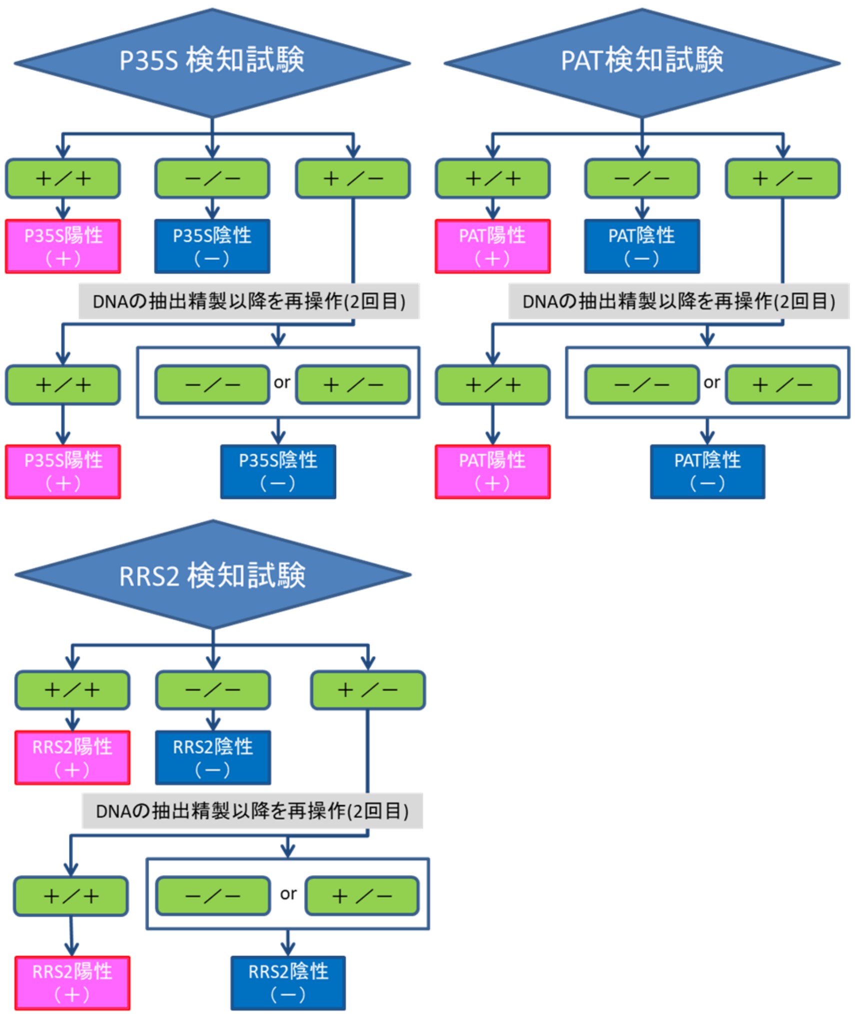


図2　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）

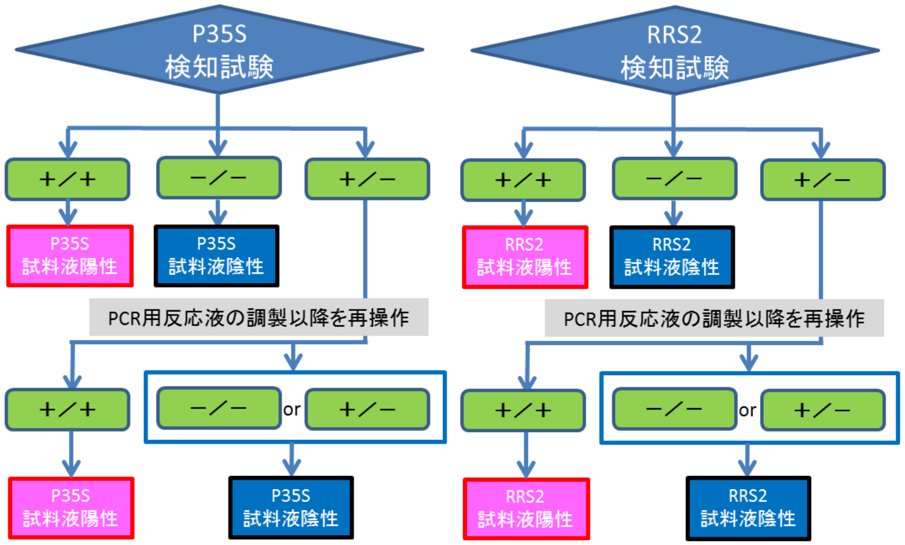


図3-1　2併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ						検知結果
	P35S		PAT		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	DNAの抽出精製以降を再操作※
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

*試料液1及び2共に試料液陰性の検知試験については、DNAの抽出精製以降の操作を不要とする

図3-1　2併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ				検知結果
	P35S		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	DNAの抽出精製以降を再操作※
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

※試料液1及び2共に試料液陰性の検知試験については、DNAの抽出精製以降の再操作は不要とする

図3-2　2併行抽出試験結果の判定スキーム（DNA再抽出時）（ダイズ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ						検知結果
	P35S		PAT		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	検体陰性
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

図3-2　2併行抽出試験結果の判定スキーム（DNA再抽出時）（ダイズ）

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合わせ				検知結果
	P35S		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	検体陰性
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

2.3. トウモロコシ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） （略） 2.3.1. 定量 PCR 法 検体の粉砕試料（500 g）につき DNA を 3 併行抽出し、DNA 試料を得る（3DNA 試料/1 検体）。上述のように、トウモロコシでは分析対象系統数が多数存在する。このため、多くの系統が共通して持つ *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S とそれを持たない系統に特異的な反応を用いてスクリーニングを実施し、結果の判定を行う。なお、ゲノム内に P35S が複数導入されている系統については、混入率が過大に算出される。トウモロコシの場合、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、starch synthase IIb（以下「SSIIb」という。）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 を使用して得られた同遺伝子のコピー数と、分析対象となる組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブを使用して得られた対象遺伝子のコピー数をダイズの場合（2.1.2.項参照）と同様に算出し、2.1.2.項で示した式に基づき対象遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める。P35S が組み込まれた組換え系統及び GA21 については、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT（96 well 及び 384 well）、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。MIR604 及び MIR162 については、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。 2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量	2.3. トウモロコシ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法） （略） 2.3.1. 定量 PCR 法 検体の粉砕試料（500 g）につき DNA を 3 回併行抽出し、DNA 試料を得る（3DNA 試料/1 検体）。上述のように、トウモロコシでは分析対象系統数が多数存在する。このため、多くの系統が共通して持つ *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S とそれを持たない系統に特異的な反応を用いてスクリーニングを実施し、結果の判定を行う。なお、ゲノム内に P35S が複数導入されている系統については、混入率が過大に算出される。トウモロコシの場合、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として、starch synthase IIb（以下「SSIIb」という。）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 を使用して得られた同遺伝子のコピー数と、分析対象となる組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブを使用して得られた対象遺伝子のコピー数をダイズの場合（2.1.2.項参照）と同様に算出し、2.1.2.項で示した式に基づき対象遺伝子組換えトウモロコシの含有率を求める。P35S が組み込まれた組換え系統及び GA21 については、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 5700、ABI PRISM® 7900HT（96 well 及び 384 well）、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、Roche LightCycler® System、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。MIR604 及び MIR162 については、ABI PRISM® 7900 HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。 2.3.1.1. *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S が組み込まれた組換え系

組換えトウモロコシ系統 Event176、Bt11、T25、NK603、MON863、TC1507、MON810、DAS-59122-7、MON88017 及び MON89034 には、共通して P35S 配列が組み込まれているため、同配列含量を指標として、これらの系統の混合物については、大まかな含量を推定することが可能である。分析方法は、用いるプライマー対、プローブを除きダイズの定量 PCR 法で示された方法と同一であるが、PCR 用反応液の調製における TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに用いることができる試薬については、「FastGene™ QPCR Probe Mastermix（日本ジェネティクス社）」を「FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche Diagnostics 社）」*1 に読み替えること。内在性遺伝子として、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*2 を使用する。また、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシプラスミドセットを使用する。対象遺伝子のプライマー対とプローブは P35S-1 と P35S-Taq*3 であり、別紙 1 に規定された内標比を用いて、最終的に P35S 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率を算出する。 *1　（略） *2 SSIIb 遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ SSIIb 3-5’（5’-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3’）、 SSIIb 3-3’（5’-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3’）及び SSIIb-Taq（5’-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3’） *3 P35S を標的とするプライマー対とプローブ P35S 1-5’（5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’）、	統の定量 組換えトウモロコシ系統 Event176、Bt11、T25、NK603、MON863、TC1507、MON810、DAS-59122-7、MON88017 及び MON89034 には、共通して *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S 配列が組み込まれているため、同配列含量を指標として、これらの系統の混合物については、大まかな含量を推定することが可能である。分析方法は、用いるプライマー対、プローブを除きダイズの定量 PCR 法で示された方法と同一であるが、PCR 用反応液の調製における TaqMan® Universal PCR Master Mix の代わりに用いることができる試薬については、「FastGene™ QPCR Probe Mastermix（日本ジェネティクス社）」を「FastStart Universal Probe Master (Rox)（Roche Diagnostics 社）」*1 に読み替えること。内在性遺伝子として、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*2 を使用する。また、検量線用標準プラスミド DNA 溶液として GM トウモロコシプラスミドセットを使用する。対象遺伝子のプライマー対とプローブは P35S-1 と P35S-Taq*3 であり、別紙 1 に規定された内標比を用いて、最終的に P35S 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率を算出する。 *1　（略） *2 SSIIb 遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ SSIIb-3［SSIIb 3-5’（5’-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3’）& SSIIb 3-3’（5’-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3’）］及び SSIIb-Taq（5’-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3’） *3 P35S を標的とするプライマー対とプローブ P35S-1［P35S 1-5’（5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’）&

P35S 1-3’（5’- CCTCTCCAAA TGAAATGAACTTCCT-3’）及び
P35S-Taq（5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3’）

P35S を用いた際の内標比は MON810 を対象として算出されたものを用いる。同系統は組換え遺伝子中に P35S 配列が 1 コピーしか存在しないことから、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を過小評価する可能性は低い。なお、P35S-Taq は、他のプローブの半分の濃度（終濃度：0.1 µM）で使用するため、反応液の調製の際には留意する（定量機器に Roche LightCycler System を用いる場合には、これに当たらず、他のプローブと同濃度で使用する）。

2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量

（略）

* 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

GA21 検知：

GA21-3-5’（5’-GAAGCCTCGGCAACGTCA-3’）、
GA21-3-3’（5’- ATCCGGTTGGAAAGCGACTT-3’）及び
GA21-Taq（5’-FAM-AAGGATCCGGTGCATGGCCG-TAMRA- 3’）

MIR604 検知：

MIR604 primer F（5’-GCGCACGCAATTCAACAG-3’）、
MIR604 primer R（5’-GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3’）
及び
MIR604 probe（5’-FAM- AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-TAMRA- 3’）

MIR162 検知：

P35S 1-3’（5’- CCTCTCCAAA TGAAATGAACTTCCT-3’）］及び
P35S-Taq（5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3’）

P35S を用いた際の内標比は MON810 を対象として算出されたものを用いる。同系統は組換え遺伝子中に P35S 配列が 1 コピーしか存在しないことから、遺伝子組換えトウモロコシの含有率を過小評価する可能性が低い。なお、P35S-Taq は、他のプローブの半分の濃度（終濃度：0.1 µM）で使用するため、反応液の調製の際には留意する（定量機器に Roche LightCycler System を用いる場合には、これに当たらず、他のプローブと同濃度で使用する）。

2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量

（略）

* 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

GA21 検知：

GA21-3［GA21-3-5’（5’-GAAGCCTCGGCAACGTCA-3’） &
GA21-3-3’（5’- ATCCGGTTGGAAAGCGACTT-3’）］及び
GA21-Taq（5’-FAM-AAGGATCCGGTGCATGGCCG-TAMRA- 3’）

MIR604 検知：

MIR604-1［MIR604 primer F（5’-GCGCACGCAATTCAACAG-3’） &
MIR604 primer R（5’-GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT-3’）］
及び
MIR604 probe（5’-FAM- AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-TAMRA- 3’）

MIR162 検知：

MIR162-f1（5'-GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG-3'）、
MIR162-r1（5'-TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA-3'）及び
MIR162-p1（5'-FAM-
TCTAGACAATTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA-TAMRA- 3'）

2.3.1.3. 結果の判定

各 DNA 試料（3DNA 試料/1 検体）について定量 PCR を行った結果、P35S 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率に GA21、MIR604、MIR162 の含有率を加え、3 併行抽出した DNA 試料の平均値を算出する。その値が 4.5%を超えた場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

2.3.2. マルチプレックス PCR 法

2.3.1 項の定量 PCR 法の代わりに、より簡便なマルチプレックス PCR 法にて混入率が 5%を超える可能性があるかを判定するスクリーニングが可能である。本法は、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として SSIIb 遺伝子、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として、P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の nopaline synthase 遺伝子の terminator（以下「TNOS」という。）を同時に検出するマルチプレックスリアルタイム PCR 法にて行う。本法は、複数セットのプライマー対とプローブを PCR 液に添加することで、複数の標的遺伝子を同時に検出することができ、通常のシングルプレックスリアルタイム PCR 法に比べて一度に多検体を処理できる。なお、本スクリーニング検査では SSIIb を検出するプローブは VIC で標識されているが、P35S と TNOS を検出するプローブはどちらも FAM で標識されているため、これらの遺伝子量の合計（P35S+TNOS）に相当する蛍光値が得られる。混入率が 5%

MIR162-1［MIR162-f1（5'-GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG-3'）&
MIR162-r1（5'-TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA-3'）］及び
MIR162-p1（5'-FAM-
TCTAGACAATTCAGTACATTAAAAACGTCCGCCA-TAMRA- 3'）

2.3.1.3. 結果の判定

各 DNA 試料（3DNA 試料/1 検体）について定量 PCR を行った結果、P35S 配列が組み込まれた遺伝子組換えトウモロコシの含有率に GA21、MIR604、MIR162 の含有率を加えた値の平均値が 4.5%を超えた場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

2.3.2. マルチプレックス PCR 法

2.3.1 項の定量 PCR 法の代わりに、より簡便なマルチプレックス PCR 法にて混入率が 5%を超える可能性があるかを判定するスクリーニングが可能である。本法は、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として SSIIb 遺伝子、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として、*Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の nopaline synthase 遺伝子の terminator（以下「TNOS」という。）を同時に検出するマルチプレックスリアルタイム PCR 法にて行う。本法は、複数セットのプライマー対とプローブを PCR 液に添加することで、複数の標的遺伝子を同時に検出することができ、通常のシングルプレックスリアルタイム PCR 法に比べて一度に多検体を処理できる。なお、本スクリーニング検査では SSIIb を検出するプローブは VIC で標識されているが、P35S と TNOS を検出するプローブはどちらも FAM で標識されているため、これらの遺伝子量の合計（P35S+TNOS）に相当する蛍光値

を超える可能性があるかどうかの判定は、標準試料を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、分析試料及び判定基準となる標準試料それぞれの内在性遺伝子における Cq 値と標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる分析試料の ΔCq 値と標準試料の ΔCq 値の差［ΔΔCq = ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料)］を用いて判定を行う。ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があり、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。得られた分析試料の ΔCq 値が、判定基準となる標準試料の ΔCq 値以上である場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%を超える可能性があると判定する。標準試料としては、4%(w/w) MON810 粉末試料*から抽出した DNA 試料液（20 ng/μL）を用い、分析試料と同時に測定する。

（削る。）

* （略）

2.3.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング

2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

（略）

*1～*7　（略）

*8 PCR 用反応液の調製

が得られる。混入率が 5%を超える可能性があるかどうかの判定は、標準試料を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、分析試料及び判定基準となる標準試料それぞれの内在性遺伝子における Cq 値*1 と標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる分析試料の ΔCq 値と標準試料の ΔCq 値の差［ΔΔCq = ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料)］を用いて判定を行う。ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があり、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。得られた分析試料の ΔCq 値が、判定基準となる標準試料の ΔCq 値以上である場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%を超える可能性があると判定する。標準試料としては、4%(w/w) MON810 粉末試料*2 から抽出した DNA 試料液（20 ng/μL）を用い、分析試料と同時に測定する。

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本検査方法では表記を Cq 値に統一する。

*2 （略）

2.3.2.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いたスクリーニング

2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

（略）

*1～*7　（略）

*8 定量 PCR 用反応液の調製

（略）

*9・*10　（略）

*11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため避けること。

2.3.2.1.2.～2.3.2.1.4.　（略）

2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング

2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、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及び MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること[*1,2]。

*1・*2　（略）

2.3.2.2.2.～2.3.2.2.4.　（略）

2.3.2.3. 結果の判定（図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム）

混入率が 5%を超える可能性があるかどうかの判定は、分析試料と標

（略）

*9・*10　（略）

*11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 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。

2.3.2.1.2.～2.3.2.1.4.　（略）

2.3.2.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いたスクリーニング

2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、*10 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及び*11 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること[*1,2]。

*1・*2　（略）

2.3.2.2.2.～2.3.2.2.4.　（略）

2.3.2.3. 結果の判定（図 4 マルチプレックス PCR 法 試験結果の判定スキーム）

混入率が 5%を超える可能性があるかどうかの判定は、分析試料と標

準試料の ΔCq 値を比較して行う。すなわち、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値以上である場合［ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料) ≧ 0］、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合［ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料) < 0］、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%を超える可能性があると判定する。混入率が 5%を超える可能性があると判定された場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

図 4 （略）

2.3.3. 粒単位検査法

（略）

* その他のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM® 7900HT、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられるが、使用する機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液を用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

（略）

2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製

準試料の ΔCq 値を比較して行う。すなわち、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値以上である場合［ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料) ≧ 0］、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%以下であると判定し、分析試料の ΔCq 値が標準試料の ΔCq 値より小さい場合［ΔCq(分析試料) – ΔCq(標準試料) < 0］、分析試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率は 5%以上である可能性があると判定する。混入率が 5%以上である可能性があると判定された場合は、粒単位検査法又はグループ検査法を実施する。

図 4 （略）

2.3.3. 粒単位検査法

（略）

* その他のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM® 7900、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、Applied Biosystems® 7500、LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられるが、使用する機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液を用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

（略）

2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製

（略）

* DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube

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。使う直前に転倒混和及びタッピングによって混合した後、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、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。ABI PRISM® 7900HT、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000 などの ROX が必要なリアルタイム PCR 機器を使用する場合は、本試薬に添付されている ROX を添付のマニュアルに従い適量を添加する。

2.3.3.1.2.～2.3.3.1.4.　（略）

2.3.3.2. 結果の判定

（略）

2.3.4. グループ検査法

トウモロコシ穀粒試料からランダムサンプリングを行い、穀粒 20 粒からなるグループを 10 グループ用意する。2.7.5 項に記載の方法で各グループから DNA 試料液を調製し、各グループに遺伝子組換え穀粒が含まれているか否かをリアルタイム PCR で判定する。遺伝子組換え穀粒を含むグループの数から、遺伝子組換え穀粒の混入率を評価する。10 グループ中遺伝子組換え穀粒を含むグループが 7 以上の場合は、さらに 2 回目の 10 グループの分析を行い、1 回目と 2 回目の総和である 20 グループ中で遺伝子

（略）

* DirectAce qPCR Mix plus ROX Tube

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。使う直前に転倒混和及びタッピングによって混合した後、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、以後撹拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。ABI PRISM® 7900、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000 などの ROX が必要なリアルタイム PCR 機器を使用する場合は、本試薬に添付されている ROX を添付のマニュアルに従い適量を添加する。

2.3.3.1.2.～2.3.3.1.4.　（略）

2.3.3.2. 結果の判定

（略）

2.3.4. グループ検査法

トウモロコシ穀粒試料からランダムサンプリングを行い、穀粒 20 粒からなるグループを 10 グループ用意する。2.7.5 項に記載の方法で各グループから DNA 試料液を調製し、各グループに遺伝子組換え穀粒が含まれているか否かをリアルタイム PCR で判定する。遺伝子組換え穀粒を含むグループの数から、遺伝子組換え穀粒の混入率を評価する。10 グループ中遺伝子組換え穀粒を含むグループが 7 以上の場合は、さらに 2 回目の 10 グループの分析を行い、1 回目と 2 回目の総和である 20 グループ中で遺伝子

組換え穀粒を含むグループの数を決定し、混入率を評価する。本法の適用機種は ABI PRISM® 7900HT、Applied Biosystems® 7500 である。

2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

P35S 及び TNOS を標的とするマルチプレックスリアルタイム PCR を用いて遺伝子組換え穀粒を検出する。これを遺伝子組換え検出反応とする。また、各 DNA 試料から PCR を行うことができることを確認するため、トウモロコシ内在性遺伝子 SSIIb 遺伝子の検出と人為的に添加した微量のプラスミドの検出（Internal Positive Control、IPC）を、マルチプレックスリアルタイム PCR で行う。これを対照反応とする。遺伝子組換え検出反応、対照反応ともに、各 DNA 試料液につき 1 ウェル、また陽性コントロールとして GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えるものを 1 ウェル、陰性コントロールとして水を加えるものを 1 ウェル、合計 12 ウェルで分析を行う。

2.3.4.1.1. 反応液の調製

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合は、以下のとおり、反応液を調製する。

遺伝子組換え検出反応： 1 ウェル当たり 2×DirectAce qPCR Mix No ROX *1 12.5 µL、対象プライマー対として P35S-1*2（25 µM）0.5 µL、NOS ter-2*2（25 µM）0.5 µL、対象プローブとして P35S-TaqFB*3（10 µM）0.25 µL、NOS-TaqFB*3（10 µM）0.25 µL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 µL を混合し、水で 22.5 µL にする。この組成で必要ウェル分を一度に調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロ

組換え穀粒を含むグループの数を決定し、混入率を評価する。本法の適用機種は ABI PRISM® 7900、Applied Biosystems® 7500 である。

2.3.4.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法

Cauliflower mosaic virus 由来の P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の TNOS を標的とするマルチプレックスリアルタイム PCR を用いて遺伝子組換え穀粒を検出する。これを遺伝子組換え検出反応とする。また、各 DNA 試料から PCR を行うことができることを確認するため、トウモロコシ内在性遺伝子 SSIIb 遺伝子の検出と人為的に添加した微量のプラスミドの検出（Internal Positive Control、IPC）を、マルチプレックスリアルタイム PCR で行う。これを対照反応とする。遺伝子組換え検出反応、対照反応ともに、各 DNA 試料液につき 1 ウェル、また陽性コントロールとして GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えるものを 1 ウェル、陰性コントロールとして水を加えるものを 1 ウェル、合計 12 ウェルで分析を行う。

2.3.4.1.1. 反応液の調製

ABI PRISM® 7900 を使用する場合は、以下のとおり、反応液を調製する。

遺伝子組換え検出反応： 1 ウェル当たり 2×DirectAce qPCR Mix No ROX *1 12.5 µL、対象プライマー対として P35S-1*2（25 µM）0.5 µL、NOS ter-2*2（25 µM）0.5 µL、対象プローブとして P35S-TaqFB*3（10 µM）0.25 µL、NOS-TaqFB*3（10 µM）0.25 µL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 µL を混合し、水で 22.5 µL にする。この組成で必要ウェル分を一度に調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロ

コシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 µL ずつ添加し、全量で 25 µL にする[*4]。

対照反応：1 ウェル当たり DirectAce qPCR Mix No ROX[*1] 12.5 µL、対象プライマー対として IPC-1[*2]（25 µM）0.5 µL、SSIIb-3[*2]（25 µM）0.5 µL、対象プローブとして IPC-TaqFB[*3]（10 µM）0.25 µL、SSIIb-TaqHB[*3]（10 µM）0.25 µL、IPC 用プラスミド溶液[*5] 1 µL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 µL を混合し、水で 22.5 µL にする。この組成で必要ウェル分を調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 µL ずつ添加し、全量で 25 µL にする[*4]。

Applied Biosystems® 7500 を使用する場合は、50×ROX Passive Reference 溶液の添加量を 0.05 µL にする。分注操作終了後、真上からシールし[*6]、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ターを用いて行う。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[*7]。

*1～*6　（略）

*7 ABI PRISM® 7900HT の場合は、プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）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。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.3.4.1.2. プレート情報の設定

コシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 µL ずつ添加し、全量で 25 µL にする[*4]。

対照反応：1 ウェル当たり DirectAce qPCR Mix No ROX[*1] 12.5 µL、対象プライマー対として IPC-1[*2]（25 µM）0.5 µL、SSIIb-3[*2]（25 µM）0.5 µL、対象プローブとして IPC-TaqFB[*3]（10 µM）0.25 µL、SSIIb-TaqHB[*3]（10 µM）0.25 µL、IPC 用プラスミド溶液[*5] 1 µL、DirectAce qPCR Mix 付属 50×ROX Passive Reference 溶液 0.5 µL を混合し、水で 22.5 µL にする。この組成で必要ウェル分を調製し、96 ウェルプレートに分注後、各 DNA 試料液、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド又は水を 2.5 µL ずつ添加し、全量で 25 µL にする[*4]。

Applied Biosystems® 7500 を使用する場合は、50×ROX Passive Reference 溶液の添加量を 0.05 µL にする。分注操作終了後、真上からシールし[*6]、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ターを用いて行う。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[*7]。

*1～*6　（略）

*7 ABI PRISM® 7900 の場合は、プレートの確認後、MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）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。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。

2.3.4.1.2. 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う。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前[*1] の場合は、Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの、及び Reporter が「HEX」[*2]、Quencher が「Non Fluorescent」のものの 2 つを設定する。設定した Detector を Set up タブ（ABI PRISM® 7900HT）又は Well Inspector（Applied Biosystems® 7500）に登録した後、測定を行うウェル全てを指定する。遺伝子組換え検出反応については、P35S 及び TNOS を検出するため、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。対照反応については、IPC 検出のために Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを、SSIIb 検出のために Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。Passive Reference は「ROX」と設定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類は Task 欄に「Unknown」を指定する。

*1・*2　（略）

2.3.4.1.3. 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。95°C で 10 分間加温した後、95°C 15 秒間、65°C 1 分間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。

ABI PRISM® 7900HT を使用する場合は、反応条件の設定において

反応に際しては、プレート情報の設定を行う。設定を行う項目は、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。まず、プローブ特性の設定を行う。

ABI PRISM® 7900 を使用する場合及び Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前[*1] の場合は、Detector Manager 画面上で Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のもの、及び Reporter が「HEX」[*2]、Quencher が「Non Fluorescent」のものの 2 つを設定する。設定した Detector を Set up タブ（ABI PRISM® 7900）又は Well Inspector（Applied Biosystems® 7500）に登録した後、測定を行うウェル全てを指定する。遺伝子組換え検出反応については、P35S 及び TNOS を検出するため、Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。対照反応については、IPC 検出のために Reporter が「FAM」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを、SSIIb 検出のために Reporter が「HEX」、Quencher が「Non Fluorescent」のものを設定する。Passive Reference は「ROX」と設定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。検体の種類は Task 欄に「Unknown」を指定する。

*1・*2　（略）

2.3.4.1.3. 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。95°C で 10 分間加温した後、95°C 15 秒間、65°C 1 分間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。

ABI PRISM® 7900 を使用する場合は、反応条件の設定において

9600 emulation モードのチェックを入れておく。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。

Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合は、RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully 」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* （略）

2.3.4.1.4. PCR 結果の解析

Threshold line の設定は、P35S、TNOS、IPC については 0.256、SSIIb については 0.064 とする。Baseline については、Manual baseline mode で 3－15 サイクルと設定する。いずれの標的についても、目視で Amplification plot 上で 15 サイクル以降に指数関数的な増幅曲線があり、増幅曲線が Threshold line と交わる Cq 値が 40 以下の場合に陽性と判定する。

まず、対照反応における IPC 及び SSIIb の検出を判定する。鋳型 DNA として GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えた反応で IPC、SSIIb ともに陽性であること、水を加えた反応で IPC が陽性、SSIIb が陰性であることを確認する。異なる結果が得られた場合には、PCR がうまく実施されていない可能性があるため、PCR 以降の実験を再度行うこととする。穀粒グループ由来の各 DNA 試料について、IPC と SSIIb のいずれかが陰性の場合には、DNA の溶出がうまくいっていない可能性があるため、別の 20 粒を再度サンプリングして、DNA の溶出及び PCR 分析を行う。IPC と SSIIb の両方が陽

9600 emulation モードのチェックを入れておく。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。

Applied Biosystems® 7500 を使用しソフトウェアのバージョンが 1.5.1 以前*の場合は、RUN Mode を 9600 emulation に設定する。RUN の終了を知らせる「The run completed successfully 」の表示を確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

* （略）

2.3.4.1.4. PCR 結果の解析

Threshold line の設定は、P35S、TNOS、IPC については 0.256、SSIIb については 0.064 とする。Baseline については、Manual baseline mode で 3－15 サイクルと設定する。いずれの標的についても、目視で Amplification plot 上で 15 サイクル以降に指数関数的な増幅曲線があり、増幅曲線が Threshold line と交わる Cq 値が 40 以下の場合に陽性と判定する。

まず、対照反応における IPC 及び SSIIb の検出を判定する。鋳型 DNA として GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを加えた反応で IPC、SSIIb ともに陽性であること、水を加えた反応で IPC が陽性、SSIIb が陰性であることを確認する。異なる結果が得られた場合には、PCR がうまく実施されていない可能性があるため、PCR 以降の実験を再度行うこととする。穀粒グループ由来の各 DNA 試料について、IPC と SSIIb のいずれかが陰性の場合には、DNA の溶出がうまくいっていない可能性があるため、別の 20 粒を再度サンプリングして、DNA の溶出及び PCR 分析を行う。IPC と SSIIb の両方が陽

性の DNA 試料について、P35S、TNOS の検出について陽性か陰性かを判定し、陽性の場合にはグループ（20 粒）の中に遺伝子組換えの穀粒が含まれると判定する。

なお、マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法では、ABI PRISM® 7900HT 及び Applied Biosystems® 7500 以外のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、LightCycler® 96、LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられる。使用するリアルタイム PCR 機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.3.4.1.5　（略）

2.3.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法）

（略）

2.3.4.2.1. リアルタイム PCR

（略）

*1～*5　（略）

*6 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。Applied Biosystems® 7500 の場合は不要である。20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

*7　（略）

性の DNA 試料について、P35S、TNOS の検出について陽性か陰性かを判定し、陽性の場合にはグループ（20 粒）の中に遺伝子組換えの穀粒が含まれると判定する。

なお、マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法では、ABI PRISM® 7900 及び Applied Biosystems® 7500 以外のリアルタイム PCR 機器として、ABI PRISM® 7700、ABI PRISM® 7000、LightCycler® 96、LightCycler® 480 等が適用可能であると考えられる。使用するリアルタイム PCR 機器によって、操作、条件、感度等が異なるので、GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミドを用いて事前に PCR 用反応液の調製法、PCR 条件、解析方法を最適化する必要がある。

2.3.4.1.5　（略）

2.3.4.2. 組換え系統の判別（参考検査法）

（略）

2.3.4.2.1. リアルタイム PCR

（略）

*1～*5　（略）

*6 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。Applied Biosystems® 7500 の場合は不要である。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。

*7　（略）

2.3.4.2.2.～2.3.4.2.4.　（略）	2.3.4.2.2.～2.3.4.2.4.　（略）
2.4. トウモロコシ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） （略）	2.4. トウモロコシ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法） （略）
2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 本法では、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として SSIIb、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として P35S 及び TNOS を検知する検知試験 3 試験を行う。PCR 装置は、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。 また、本法は、標準試料液を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、DNA 試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における Cq 値と各標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差[ΔΔCq＝ΔCq(DNA 試料液)－ΔCq(標準試料液)］を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液*を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。	2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法 本法では、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、トウモロコシに普遍的に存在する内在性遺伝子として SSIIb、遺伝子組換えトウモロコシに広く共通して存在する組換え配列として *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の TNOS を検知する検知試験 3 試験を行う。PCR 装置は、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K Flex、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いて行う。 また、本法は、標準試料液を用いた ΔΔCq 法にて行う。ΔΔCq 法は、DNA 試料液及び判定基準となる標準試料液それぞれの内在性遺伝子における Cq 値*1 と各標的遺伝子（本法では組換え遺伝子）における Cq 値の差［ΔCq = Cq(標的遺伝子) – Cq(内在性遺伝子)］を算出し、得られる DNA 試料液の ΔCq 値と標準試料液の ΔCq 値の差[ΔΔCq＝ΔCq(DNA 試料液)－ΔCq(標準試料液)］を用いて検体陽性かどうかの判定を行う。なお、ΔCq 値は混入率の対数値と負の相関があるため、混入率が高いほど ΔCq 値は低くなる。標準試料液としては、標準プラスミド DNA 溶液*2 を用い、分析する DNA 試料液と同時に測定する。

（削る。）

*　（略）

2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

（略）

*1　（略）

*2 SSIIb を標的とするプライマー対とプローブ

SSIIb 3-5’（5’-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3’）、

SSIIb 3-3’（5’-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3’）及び

SSIIb-Taq （ 5’-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3’）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

P35S 検知：

P35S 1-5’（5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’）、

P35S 1-3’（5’- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3’）及び

P35S-Taq （ 5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3’）

TNOS 検知　（略）

*4 ～*8　（略）

2.4.1.1.2.～2.4.1.1.4.　（略）

*1 Cq 値

ABI PRISM® 7900HT 96 well、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5 及び QuantStudio 12K Flex では Ct 値、LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 では Cq 値及び Cp 値とそれぞれ表記されている。本法では表記を Cq 値に統一する。

*2　（略）

2.4.1.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR

2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）

（略）

*1　（略）

*2 SSIIb を標的とするプライマー対とプローブ

SSIIb-3［SSIIb 3-5’（5’-CCAATCCTTTGACATCTGCTCC-3’）&

SSIIb 3-3’（5’-GATCAGCTTTGGGTCCGGA-3’）］及び

SSIIb-Taq （ 5’-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3’）

*3 組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブ

P35S 検知：

P35S-1［P35S 1-5’（5’-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3’）&

P35S 1-3’（5’- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3’）］及び

P35S-Taq （ 5’-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3’）

TNOS 検知　（略）

*4 ～*8　（略）

2.4.1.1.2. ～2.4.1.1.4.　（略）

2.4.1.2.　（略）

2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.4.1.3.1.・2.4.1.3.2.　（略）

2.4.1.3.3. PCR（QuantStudio 5）

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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.3.4.　（略）

2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.4.1.4.1.・2.4.1.4.2.　（略）

2.4.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）

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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.2.　（略）

2.4.1.3. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.4.1.3.1.・2.4.1.3.2.　（略）

2.4.1.3.3. PCR（QuantStudio 5）

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 2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.3.4.　（略）

2.4.1.4. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR

2.4.1.4.1.・2.4.1.4.2.　（略）

2.4.1.4.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）

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 2.4.1.1.3. PCR（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおりである。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.4.1.4.4.　（略）	2.4.1.4.4.　（略）
2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR	2.4.1.5. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR
2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）	2.4.1.5.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96）
PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、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及び MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること[*1,2]。	PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、*7 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及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること[*1,2]。
*1・*2　（略）	*1・*2　（略）
2.4.1.5.2.～2.4.1.5.4.　（略）	2.4.1.5.2.～2.4.1.5.4.　（略）
2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR	2.4.1.6. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR
2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）	2.4.1.6.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）
PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、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及び MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること[*1,2]。	PCR 用反応液の調製は、2.4.1.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）のとおり。ただし、*7 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及び*8 MicroAmp® Optical Film Compression Pad については、以下の注釈を参照すること[*1,2]。
*1・*2　（略）	*1・*2　（略）
2.4.1.6.2.・2.4.1.6.3.　（略）	2.4.1.6.2.・2.4.1.6.3.　（略）
2.4.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）	2.4.1.6.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）

<table>
<tr>
<td>

（略）

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.4.2. 結果の判定

（略）

（図 6）　（略）

（図 7）リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）

DNA 試料液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。

(1)・(2)　（略）

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記(1)以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

*　（略）

（図 8）2 併行抽出試験結果の判定スキーム（トウモロコシ）

得られた結果から以下の判定を行う。

</td>
<td>

（略）

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}にて、[Analysis Type *Abs Quant/2nd Derivative Max]及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

2.4.2. 結果の判定

（略）

（図 6）　（略）

（図 7）リアルタイム PCR 試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）

DNA 試料液における P35S 検知試験、TNOS 検知試験ごとに得られた結果から、以下の判定を行う。

(1)・(2)　（略）

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、同じ DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を行い*、得られた結果が上記(1)と(2)以外の場合は、当該 DNA 試料液は試料液陰性と判定する。

*　（略）

（図 8）2 併行抽出試験結果の判定スキーム（トウモロコシ）

得られた結果から以下の判定を行う。

</td>
</tr>
</table>

(1)・(2)　（略）

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体から抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を実施し*、得られた結果が上記(1)以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

*　（略）

図 6～図 8－2　（略）

2.5. ダイズ加工食品の検査法

ダイズ加工食品においては、1 検体につき DNA を 2 併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、内在性遺伝子 Le1 を検知するダイズ陽性対照試験、並びに P35S、PAT 及び RRS2 を検知する遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験を行う*1。ただし、加工食品では遺伝子によって加工過程での DNA 分解率が一定でないため、定量 PCR による正確な判定はできない。そのため、ダイズ加工食品においては、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述する。なお、PAT 検知試験については、ABI PRISM® 7900HT（96 well）、Applied Biosystems® 7500、QuantStudio 5、QuantStudio 12K、LightCycler 96、LightCycler 480 を使用できる。ただし、最終頁に記載した同等性確認方法*2 にのっとって、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 P35S 検知試験により RRS 等が、PAT 検知試験により DAS44406 等が、

(1)・(2)　（略）

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体からの「2.7.1. ダイズ及びトウモロコシ穀粒からの DNA 抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いて PCR 用反応液の調製以降の操作を実施し*、得られた結果が上記(1)と(2)以外の場合は当該検体を検体陰性と判定する。

*　（略）

図 6～図 8－2　（略）

2.5. ダイズ加工食品の検査法

ダイズ加工食品においては、1 検体につき DNA を 2 回併行抽出したそれぞれの DNA 試料液に対し、内在性遺伝子 Le1 を検知するダイズ陽性対照試験、並びに *Cauliflower mosaic virus* 由来の P35S 及び RRS2 を検知する遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験を行う*1。ただし、加工食品では遺伝子によって加工過程での DNA 分解率が一定でないため、定量 PCR による正確な判定はできない。そのため、ダイズ加工食品においては、リアルタイム PCR を用いた定性 PCR*2 を実施し、遺伝子組換え食品混入の有無について判定する。使用する定性用リアルタイム PCR 装置については、以下に代表的な装置について記述するが、最終頁に記載した同等性確認方法にのっとって、同等性が確認された装置も用いることができる。

*1 RRS 及び LLS は P35S 配列を有しているが、RRS2 は P35S 配列を含ま

及びRRS2検知試験によりRRS2が検出可能である。内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブは以下のとおりである。

Le1検知： Le1n 02-5'（5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'）、
Le1n 02-3'（5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'）及び
Le1-Taq（5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3'）
P35S検知：
P35S 1-5'（5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'）、
P35S 1-3'（5'- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'）及び
P35S-Taq（5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3'）
PAT検知：PAT-120F（5'-AGATACCCTTGGTTGGTTGCTG-3'）、
PAT-120R（5'-ATGTGACACGTAAACAGTACTCTCA-3'）及び
PAT-1-Taq（5'-FAM- TGCTTACGCTGGGCCCTGGAAG-TAMRA-3）
RRS2検知　（略）
*2　（略）

2.5.1. ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700を用いた定性PCR
2.5.1.1.～2.5.1.4.　（略）

2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well及び384 wellを用いた定性PCR
2.5.2.1. PCR用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）
PCR用反応液は25 µL/wellとして調製する。その組成は2.5.1.1 PCR用反応液の調製（ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700）のとおりである。分注操作終了後、真上からシールし、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

ない。そのため、P35S及びRRS2を検知する試験にて、遺伝子組換え食品混入の有無を判定する。内在性遺伝子及び組換え遺伝子を標的とするプライマー対とプローブは以下のとおりである。
Le1検知： Le1-n02［Le1n 02-5'（5'-GCCCTCTACTCCACCCCCA-3'）&
Le1n 02-3'（5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'）］及び
Le1-Taq（5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA-3'）
P35S検知：
P35S-1［P35S 1-5'（5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'）&
P35S 1-3'（5'- CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'）］及び
P35S-Taq（5'-FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-TAMRA -3'）
（加える。）

RRS2検知　（略）
*2　（略）

2.5.1. ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700を用いた定性PCR
2.5.1.1.～2.5.1.4.　（略）

2.5.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well及び384 wellを用いた定性PCR
2.5.2.1. PCR用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）
PCR用反応液は25 µL/wellとして調製する。その組成は2.5.1.1 PCR用反応液の調製（ABI PRISM® 7700及びABI PRISM® 5700）のとおりである。分注操作終了後、真上からシールし、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

ケーターを用いて行う[*1]。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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad[*2]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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 4 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1　（略）

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。

2.5.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well）

PCR 用反応液は 20 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）[*1] 10 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µM）0.4 µL、対象プローブ溶液（10 µM）0.4 µL、水 6.7 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL（50 ng）[*2]又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 µL[*3]。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。この時、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ターを用いて行う[*4]。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 4 試験について、それぞれ 2

ケーターを用いて行う[*1]。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、MicroAmp® Optical Film Compression Pad[*2]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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。

*1　（略）

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad

MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 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。

2.5.2.2. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 384 well）

PCR 用反応液は 20 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）[*1] 10 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µM）0.4 µL、対象プローブ溶液（10 µM）0.4 µL、水 6.7 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL（50 ng）[*2]又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 µL[*3]。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉する。この時、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ターを用いて行う[*4]。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行し

ウェル併行して行うものとする。

*1～*4　（略）

2.5.2.3.・2.5.2.4.　（略）

2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）

遺伝子組換えダイズ検知試 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ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及び Cq 値の確認、並びに 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、遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 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、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。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）として 0.2 に設定する。ただし、Th 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 を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR

2.5.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000）

（略）

*1　（略）

て行うものとする。

*1～*4　（略）

2.5.2.3.・2.5.2.4.　（略）

2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ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及び Cq 値の確認、並びに 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、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 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、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。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）として 0.2 に設定する。ただし、Th 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 を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

2.5.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定性 PCR

2.5.3.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7000）

（略）

*1　（略）

*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。 2.5.3.2.～2.5.3.4.　（略） 2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific 社）*1 12.5 µL、対象プライマー対溶液（各プライマー、25 µM）0.5 µL、対象プローブ溶液（10 µM）0.5 µL、水 9 µL 及び 20 ng/µL DNA 試料液 2.5 µL（50 ng）*2 又は滅菌水（ブランク試料液：NTC）2.5 µL*3。分注操作終了後、真上からシールし、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ターを用いて行う*4。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 4 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。 *1 TaqMan® 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。使う直前に転倒混和及びタッピングにより混合した後、軽	*2 MicroAmp® Optical Film Compression Pad MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 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。 2.5.3.2.～2.5.3.4.　（略） 2.5.4. Applied Biosystems® 7500 を用いた定性 PCR 2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500） PCR 用反応液は 25 µL/well として調製する。その組成は 2.5.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700）のとおりである。分注操作終了後、真上からシールし、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ターを用いて行う*。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。DNA 試料液当たり遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験の合計 3 試験について、それぞれ 2 ウェル併行して行うものとする。 （加える。）

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、以後撹拌、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 DNA 試料液の濃度が 20 ng/μL に満たない場合は、原液を 2.5 μL 使用する。

*3 定性 PCR 用反応液の調製

冷凍庫から出した試薬類は、必要なものにつき室温で融解後、氷上で保存する。

*4 （略）

2.5.4.2.・2.5.4.3. （略）

2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500）

遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ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及び Cq 値の確認、並びに 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、遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 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、遺伝子組換えダイズ陽性を疑う。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）として 0.2 に設定する。ただし、Th 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 を適宜設定する。その Th から Cq 値が得られるか否かを解析する。

（加える。）

（加える。）

* （略）

2.5.4.2.・2.5.4.3. （略）

2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500）

遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）及びダイズ陽性対照試験のいずれについても、結果の判定は 2.5.2.5. 測定結果の解析（ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well）の記載のとおりとする。

2.5.5.　（略）

2.5.6. QuantStudio 5 を用いた定性 PCR

2.5.6.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 5）

PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである*。

* MicroAmp® Optical Film Compression Pad （Thermo Fisher Scientific 社）は使用しない。

2.5.6.2. プレート情報の設定（QuantStudio 5）

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、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「Create New Experiment」を選択し新規プレートファイルを起動する。Properties 画面で「Experiment type」を「Standard Curve」、「Chemistry」を「TaqMan® Reagents」、「Run mode」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。まず、Plate 画面の Quick Setup 画面で Passive Reference を「ROX」と設定する。プローブ特性は Plate 画面上で「Advanced Setup」画面に切り替えて Target を作成する。Target は Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Plate 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。設定した Target を登録した後、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、調製したプレートの配置に対応するように

2.5.5.　（略）

（加える。）

（加える。）

気を付けながら、検体の種類（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。	
* Target の設定 Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。	
2.5.6.3. PCR（QuantStudio 5） 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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。	（加える。）
2.5.6.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 5） PCR 結果の解析は、2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。	（加える。）
2.5.7. QuantStudio 12K Flex を用いた定性 PCR	（加える。）
2.5.7.1. PCR 用反応液の調製（QuantStudio 12K Flex） PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。	（加える。）

2.5.7.2. プレート情報の設定（QuantStudio 12K Flex） 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、測定の初期設定、プローブ特性並びに検体の配置及び種類である。ソフトウェア起動後、トップ画面で「create」を選択し新規プレートファイルを起動する。Experiment Properties 画面で「What type of experiment do you want to set up」を「Standard Curve」、「Which reagents do you want to use to detect the target sequence」を「TaqMan® Reagents」、「What properties do you want for the instrument run」を「Standard」と設定する。次に、プローブ特性の設定を行う。プローブ特性は Define 画面上で Target を作成し、Reporter が「FAM」、Quencher が「TAMRA」となるよう設定する*。同じく Define 画面で測定する DNA 試料液の Samples を作成し名称を入力する。また、Passive Reference を「ROX」と設定する。設定した Target を登録した後、Assign 画面にて同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行うウェル全てを指定する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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（「N」：ブランク試料液、「U」：DNA 試料液）を Task 欄において指定する。この際、DNA 試料液を配置したウェルには同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、該当する Sample のチェックボックスを入力する。 * Target の設定 Target は各プライマー、プローブのセットに対して設定しておくとよい。	（加える。）
2.5.7.3. PCR（QuantStudio 12K Flex）	（加える。）

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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。RUN が終了して解析画面（Analysis）に切り替わったことを確認して測定結果の解析を行う。

2.5.7.4. PCR 結果の解析（QuantStudio 12K Flex） （加える。）

PCR 結果の解析は、2.5.4.4. 測定結果の解析（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。

2.5.8. LightCycler® 96 を用いた定性 PCR （加える。）

2.5.8.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96） （加える。）

PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。ただし、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については、以下の注釈を参照すること*。

* 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については、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.5.8.2. プレート情報の設定（LightCycler® 96） （加える。）

反応の終わったファイルを LC96 Application Software で開く。設定

を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Sample Editor]にて、同じプライマーとプローブのセットを用いて測定を行ったウェル全てを選択し、{Gene}に対象遺伝子名を入力する。反応を行った全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。具体的には、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（「Negative control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を Type において指定する。この際、同一の溶液が分注された 2 ウェルを選択した状態で、Name に名称を入力しておく。

2.5.8.3. PCR（LightCycler® 96）

本体の[Eject]をタッチしてブロックを引き出し、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。Detection Format で[FAM]を選択し反応ボリュームを 25 µL と設定する。Profile で反応条件を設定する。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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行う。［Start］をタッチし、反応とデータの取り込みを開始する。反応後、ステータスバーのステータスが Ready と表示されていることを確認し、結果の解析を行う。

（加える。）

2.5.8.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 96）

サンプルからの蛍光がバックグラウンドを上回るサイクルをそのサンプルの定量サイクル（Cq）値とする。LightCycler® 96 Application Software はあらかじめ設定した蛍光強度の閾値を用いてサンプルの Cq 値を算出する*。

（加える。）

* 蛍光閾値は、その実験に用いられる検出フォーマット（色素）に依存する。

2.5.9. LightCycler® 480 を用いた定性 PCR

2.5.9.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 480）

PCR 用反応液の調製は、2.5.4.1. PCR 用反応液の調製（Applied Biosystems® 7500）のとおりである。ただし、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については、以下の注釈を参照すること*。

* 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については、LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white（Roche Diagnostics 社）及び LightCycler® 480 Sealing Foil（Roche Diagnostics 社）を使用する。なお、LightCycler® 480 Sealing Foil は LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white に付属している。

2.5.9.2. プレート情報の設定（LightCycler® 480）

プレート情報の設定は、PCR 反応中、反応後でも可能である。設定を行う項目は、検出遺伝子並びに検体の配置及び種類である。まず、検出遺伝子の設定を行う。[Subset Editor]にて、(+) ボタンから New Subset を追加し遺伝子名を記載し、全ての対象ウェルを選択した後 Apply をクリックして指定する。反応を行う全ての遺伝子の指定を実施する。次に、検体の配置及び種類を指定する。[Sample Editor]にて、Step1:[Select Workflow]で Abs Quant を選択する。Step2:[Select Samples]の[Subset]プルダウンから作成した Subset を選択する。Step3:[Edit Abs Quant

（加える。）

（加える。）

（加える。）

Properties]で、各ウェルを選択し、[Sample Name]を入力し、{Sample Type} 欄でそれぞれ検体の種類（「Negative Control」: ブランク試料液、「Unknown」: DNA 試料液）を選択する。

2.5.9.3. PCR（LightCycler® 480）

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を出し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 30 秒、59°C 1 分を 1 サイクルとして、48 サイクルの増幅反応を行う。 RUN の終了を知らせる「Run complete」の表示を確認し、測定結果の解析を行う。

（加える。）

2.5.9.4. PCR 結果の解析（LightCycler® 480）

2nd Derivative Maximum 法にて、増幅曲線の最大変曲点を二次導関数により算出し、そのサイクル数を Cq 値とする*。

* 実際は[Analysis]の{Create new analysis}において、[Analysis Type]にて「Abs Quant/2nd Derivative Max」を、及び[Subset]にて遺伝子名を一つプルダウンから選択し [OK]をクリックする。表示された画面で、[Calculate]をクリックする。増幅曲線と、[Result Table] に Cq 値が表示される。

（加える。）

2.5.10. 測定結果の判定

（略）

2.5.6. 測定結果の判定

（略）

（図 9）リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

ダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）について以下の(1)～(3)の判定を行う。ダイズ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度検体から抽出した DNA 試料液でダイズ陽性対照試験(Le1)を行う。再抽出した DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

(1) 遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
(2) 遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られることを確認した後、(1)と(2)以外と判定された遺伝子組換えダイズ検知試験を実施し、上記(1)以外の場合は、陰性と判定する。

（図 10）2 併行抽出試験結果の判定スキーム

(1)遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）のうち 1 試験以上で、2 併行抽出した両方の DNA

（図 9）リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

ダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合は、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）について以下の(1)～(3)の判定を行う。ダイズ陽性対照試験で、少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない DNA 試料液については、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出後の DNA 試料液でダイズ陽性対照試験(Le1)を行う。再抽出後の DNA 試料液で少なくとも 1 ウェルで 43 未満の Cq 値が得られない場合には、当該 DNA 試料液について検知不能とする。

(1) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られた場合、当該 DNA 試料液は陽性と判定する。
(2) 遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）の各試験について、2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られない場合、当該 DNA 試料液は陰性と判定する。
(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてダイズ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 43 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）のいずれか又は両方を実施し、上記(1)と(2)以外の場合は、陰性と判定する。

（図 10）2 併行抽出試験結果の判定スキーム

(1)遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）のいずれか又は両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液（合計

試料液（合計 4 ウェル）において陽性と判定された場合は、当該検体を検体陽性と判定する。

(2)遺伝子組換えダイズ検知試験 3 試験（P35S 検知試験、PAT 検知試験及び RRS2 検知試験）の全てで、2 併行抽出した両方の DNA 試料液のうち少なくとも一方において陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。

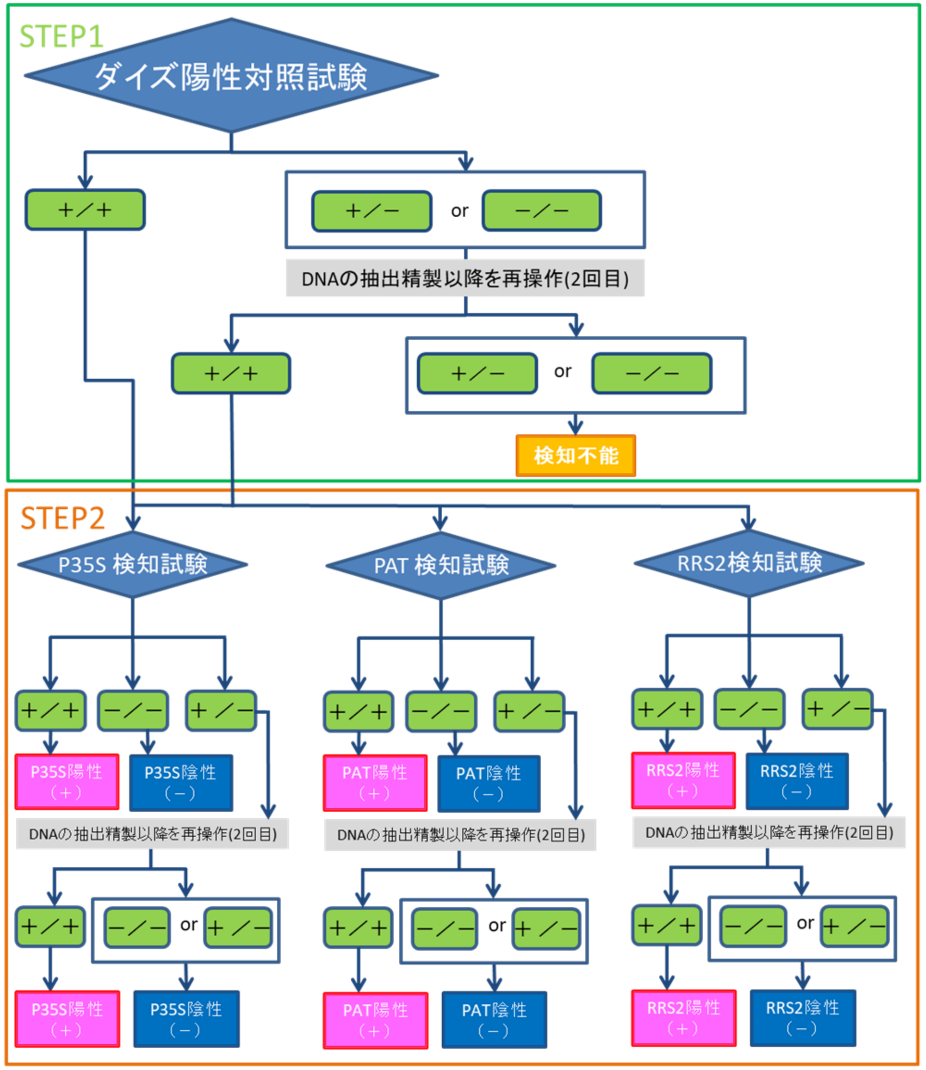
(3)　（略）

4 ウェル）において陽性と判定された場合は、当該検体を検体陽性と判定する。

(2)遺伝子組換えダイズ検知試験 2 試験（P35S 検知試験及び RRS2 検知試験）の両方で、2 併行抽出した両方の DNA 試料液のうち少なくとも一方において陰性と判定された場合は、当該検体を検体陰性と判定する。

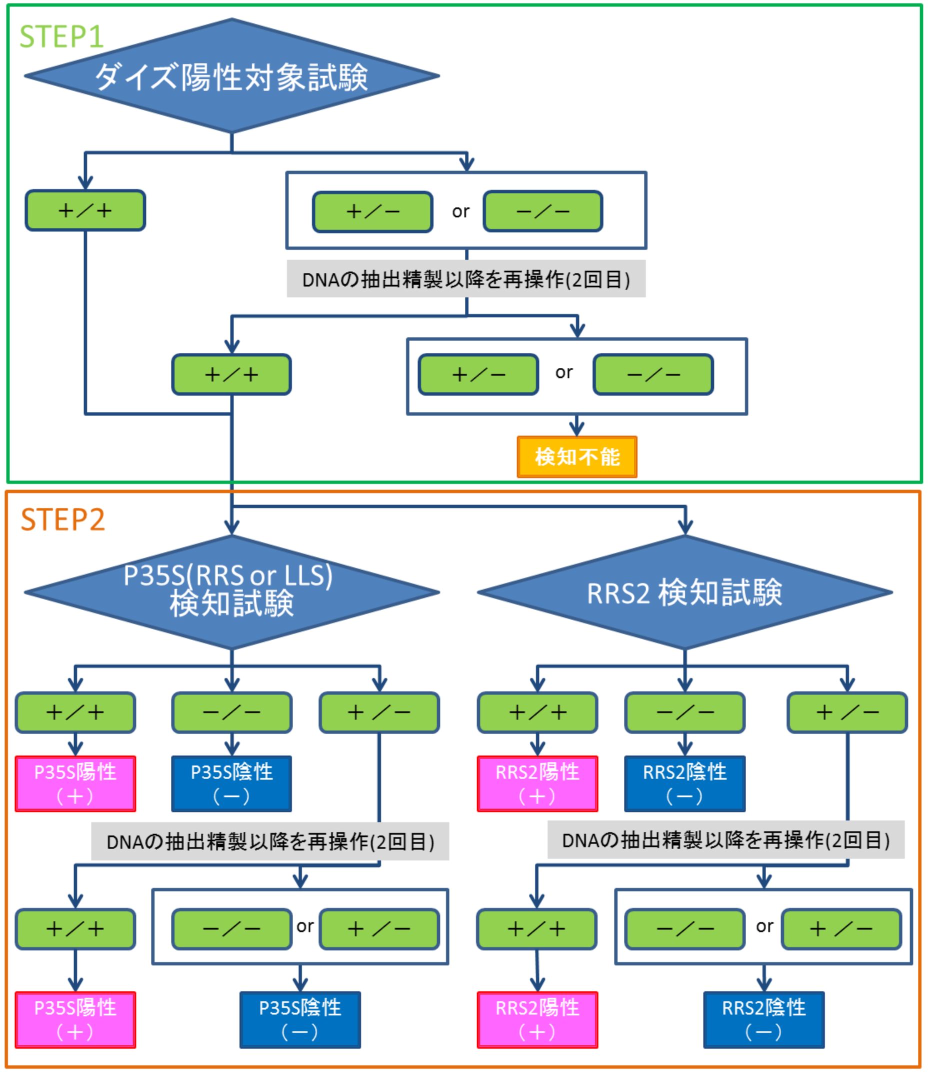
(3)　（略）

図9　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(ダイズ)



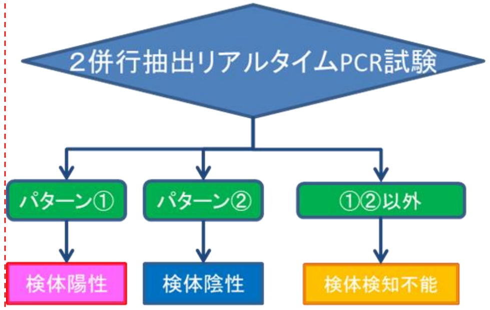
上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに各系統の判定を行う。最終的な判定は図10に従い行う。

図9　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム(ダイズ)



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに各系統の判定を行う。最終的な判定は図10に従い行う。

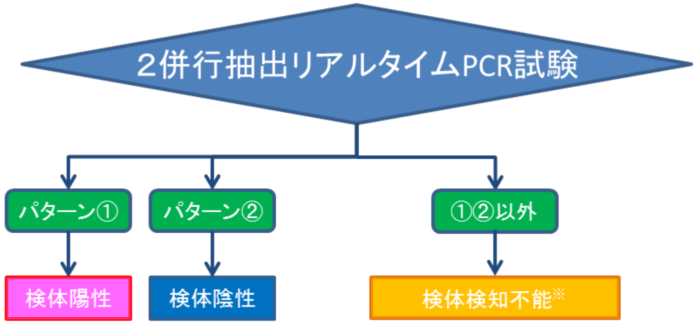
図10　2併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ					
	P35S		PAT		RRS2	
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2
①	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	−
	+	+	+	+	−	+
	+	+	+	+	−	−
	+	+	+	−	+	+
	+	+	+	−	+	−
	+	+	+	−	−	+
	+	+	+	−	−	−
	+	+	−	+	+	+
	+	+	−	+	+	−
	+	+	−	+	−	+
	+	+	−	+	−	−
	+	+	−	−	+	+
	+	+	−	−	+	−
	+	+	−	−	−	+
	+	+	−	−	−	−
	+	−	+	+	+	+
	+	−	+	+	+	−
	+	−	+	+	−	+
	+	−	+	+	−	−
	+	−	+	−	+	+
	+	−	−	+	+	+
	+	−	−	−	+	+
	−	+	+	+	+	+
	−	+	+	+	+	−
	−	+	+	+	−	+
	−	+	+	+	−	−
	−	+	+	−	+	+
	−	+	−	+	+	+
	−	+	−	−	+	+
	−	−	+	+	+	+
	−	−	+	+	+	−
	−	−	+	+	−	+
	−	−	+	+	−	−
	−	−	+	−	+	+
	−	−	−	+	+	+
	−	−	−	−	+	+
②	−	−	−	−	−	−
	+	−	+	−	+	−
	+	−	+	−	−	+
	+	−	+	−	−	−
	+	−	−	+	+	−
	+	−	−	+	−	+
	+	−	−	+	−	−
	+	−	−	−	+	−
	+	−	−	−	−	+
	+	−	−	−	−	−
	−	+	+	−	+	−
	−	+	+	−	−	+
	−	+	+	−	−	−
	−	+	−	+	+	−
	−	+	−	+	−	+
	−	+	−	+	−	−
	−	+	−	−	+	−
	−	+	−	−	−	+
	−	+	−	−	−	−
	−	−	+	−	+	−
	−	−	+	−	−	+
	−	−	+	−	−	−
	−	−	−	+	+	−
	−	−	−	+	−	+
	−	−	−	+	−	−
	−	−	−	−	+	−
	−	−	−	−	−	+

＊一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方のDNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

図10　2併行抽出試験結果の判定スキーム（ダイズ）



パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組合せ			
	P35S		RRS2	
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2
①	+	+	+	+
	+	+	+	−
	+	+	−	+
	+	+	−	−
	+	−	+	+
	−	+	+	+
	−	−	+	+
②	+	−	+	−
	+	−	−	+
	+	−	−	−
	−	+	+	−
	−	+	−	+
	−	+	−	−
	−	−	+	−
	−	−	−	+
	−	−	−	−

※一方のDNA試料液で検知不能と判定された場合、又は両方の DNA試料液で共に検知不能と判定された場合には、当該検体を検体検知不能と判定する。

2.6. トウモロコシ加工食品の検査法 （略） 2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） （略） *1～*11　（略） *12 MicroAmp® Optical Film Compression Pad MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 社）を使用する。なお、20 回以上の繰り返し使用は、結果に影響を及ぼす可能性があるため、避けること。 2.6.1.2.～2.6.1.4.　（略） 2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 2.6.2.1.・2.6.2.2.　（略） 2.6.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 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 30 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクル*の増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。 * LightCycler® 480 の場合、サイクル数は 43 に設定する。	2.6. トウモロコシ加工食品の検査法 （略） 2.6.1. ABI PRISM® 7900HT 96 well を用いた定性 PCR 2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well） （略） *1～*11　（略） *12 MicroAmp® Optical Film Compression Pad MicroAmp® Optical Film Compression Pad（Thermo Fisher Scientific 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。 2.6.1.2.～2.6.1.4.　（略） 2.6.2. LightCycler® 96 及び LightCycler® 480 を用いた定性 PCR 2.6.2.1.・2.6.2.2.　（略） 2.6.2.3. PCR（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480） 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 30 秒間、59°C 1 分 30 秒間を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反応を行う。反応が終了していることを確認した後、測定結果の解析を行う。 （加える。）

2.6.2.4.　（略）

2.6.3. 測定結果の判定

（略）

（図 11）リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

（略）

(1)・(2)　（略）

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度検体から抽出した DNA 試料液を用いてトウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験を実施し、上記(1)以外の場合は、陰性と判定する。

（図 12）　（略）

2.6.2.4.　（略）

2.6.3. 測定結果の判定

（略）

（図 11）リアルタイム PCR 試験結果の判定スキーム

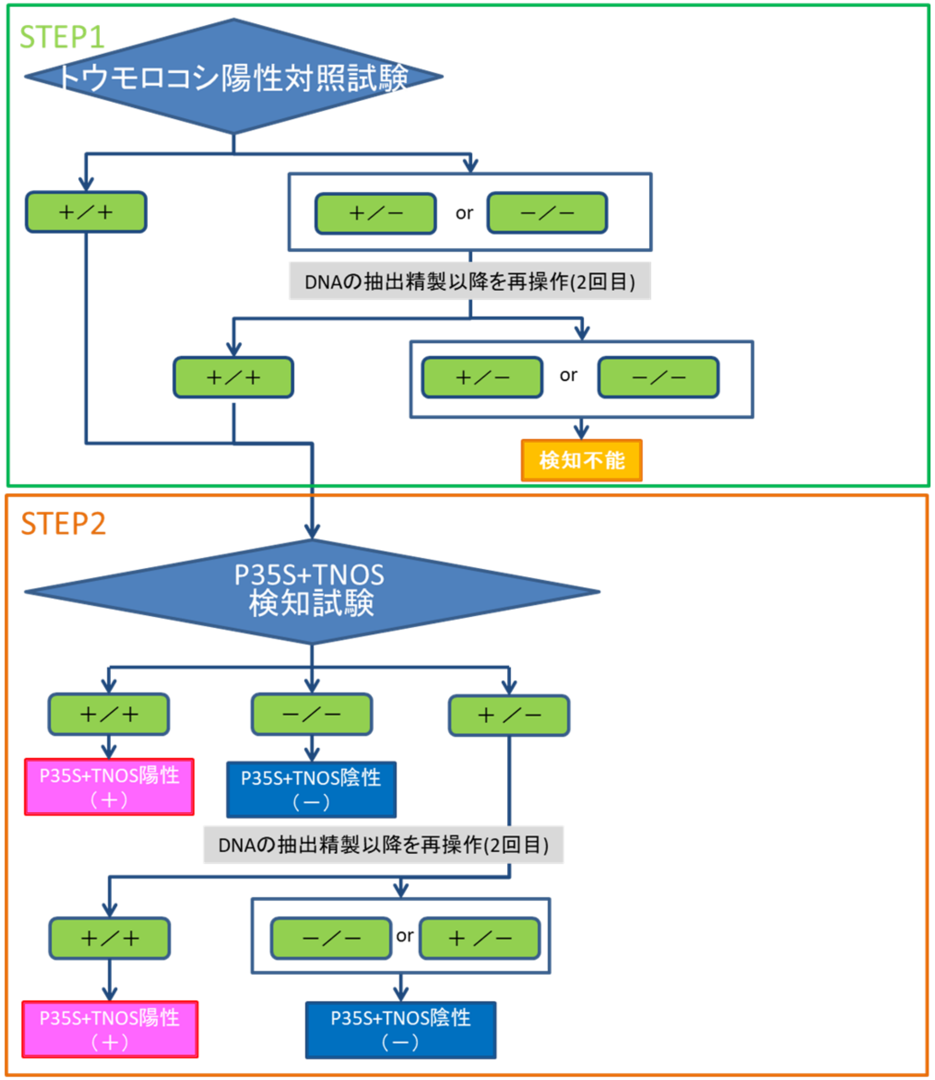
（略）

(1)・(2)　（略）

(3) 上記(1)と(2)以外の場合、再度、検体からの「2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法」以降の操作を同じ DNA の抽出精製法を用いて行い、再抽出した DNA 試料液を用いてトウモロコシ陽性対照試験にて 2 ウェル共に 38 未満の Cq 値が得られることを確認した後、遺伝子組換えトウモロコシ検知試験を実施し、上記(1)と(2)以外の場合は、陰性と判定する。

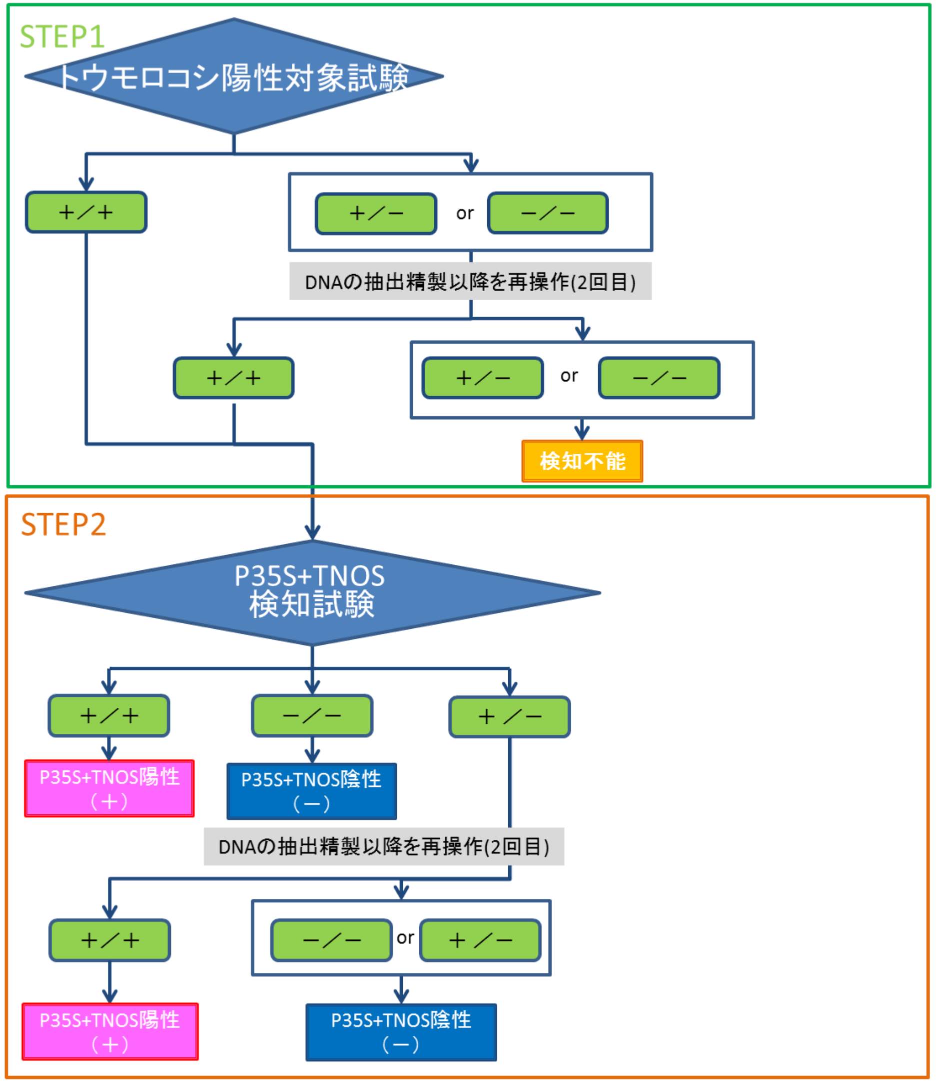
（図 12）　（略）

図11　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに判定を行う。最終的な判定は図12に従い行う。

図11　リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（トウモロコシ）



上記のスキームに従い、DNA試料液ごとに判定を行う。最終的な判定は図12に従い行う。

図 12　（略）

2.7. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法

（略）

2.7.1.　（略）

2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法

食品表示基準第３条第２項に規定する別表第 17 下欄のダイズ及びトウモロコシ加工食品からの DNA の抽出精製は、以下の手法で行う。

検体の粉砕に用いる粉砕器には、水分を含む検体に適した粉砕器と、乾燥検体に適した粉砕器があるので、検体の性状に合わせて選択する。また、粉砕器には、刃が回転するもの、粉砕ボールを利用するボールミル、遠心力と高速回転のローターにより粉砕する超遠心粉砕器等があるが、コンタミネーション防止のために、粉砕容器、カッター等が分解でき、洗浄が十分行えるものを用いる。更に望ましいのは、滅菌できるものである。粉砕容器、カッター等は洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。なお、超音波ホモジナイザーは DNA を分解するので使用してはならない。

2.7.2.1. 検体前処理に記載する方法により前処理をした後、2.7.2.2.に記載する方法により DNA を抽出精製する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、適量（例えば 1 g）を採取し、ダイズ加工食品においては「2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）」、トウモロコシ加工食品においては「2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用）」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、適量（例えば 2 g）を採取し、「2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。GM quicker 4 を使用する場合は、「2.7.2.1. 検体前処理」後に乾燥した状

図 12　（略）

2.7. ダイズ及びトウモロコシからの DNA 抽出精製法

（略）

2.7.1.　（略）

2.7.2. 加工食品からの DNA の抽出精製法

食品表示基準第３条第２項に規定する別表第 17 下欄のダイズ及びトウモロコシ加工食品からの DNA の抽出精製は、以下の手法で行う。

検体の粉砕に用いる粉砕器には、水分を含む検体に適した粉砕器と、乾燥検体に適した粉砕器があるので、検体の性状に合わせて選択する。また、粉砕器には、刃が回転するもの、粉砕ボールを利用するボールミル、遠心力と高速回転のローターにより粉砕する超遠心粉砕器等があるが、コンタミネーション防止のために、粉砕容器、カッター等が分解でき、洗浄が十分行えるものを用いる。更に望ましいのは、滅菌できるものである。粉砕容器、カッター等は洗浄後、可能であれば滅菌して用いる。なお、超音波ホモジナイザーは DNA を分解するので使用してはならない。

2.7.2.1. 検体前処理に記載する方法により前処理をした後、2.7.2.2.に記載する方法により DNA を抽出精製する。DNeasy Plant Maxi kit を使用する場合は、適量（例えば 1 g）を採取し、ダイズ加工食品においては「2.7.2.2.1. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 A（ダイズ加工食品に適用）」、トウモロコシ加工食品においては「2.7.2.2.2. DNeasy Plant Maxi kit による DNA の抽出 B（トウモロコシ加工食品に適用）」に従う。QIAGEN Genomic-tip 20/G を使用する場合は、適量（例えば 2 g）を採取し、「2.7.2.2.3. QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出」に従う。CTAB を用いる方法の場合は、各項目に示した試料量を採取し、「2.7.2.2.4.

態の検体においては「2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用）」、「2.7.2.1. 検体前処理」後に水分を多く含む検体においては「2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用）」に従う。CTAB を用いる方法の場合は、各項目に示した試料量を採取し、「2.7.2.2.6. CTAB を用いた DNA の抽出」に従う。なお、DNA 抽出は 1 試料当たり 2 併行で行う。

加工食品においては、その加工工程で DNA の分解が進んでいることから、ここに示した方法で分析可能な DNA が必ずしも抽出されるわけではないことに留意する必要がある。

2.7.2.1. 検体前処理

2.7.2.1.1. ダイズ加工食品

遺伝子組換えダイズの検査（P35S、PAT 及び RRS2）を行うための前処理を示す。

①～⑮　（略）

2.7.2.1.2.～2.7.2.2.3.　（略）

2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用）

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*1 4 mL、RNase A 10 µL、Proteinase K 20 µL、α-Amylase 2 µL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間以上混合した後*2、65℃で 30 分間加温する。この間、10 分間ごとに試験管ミキサーにて 10 秒間攪拌する。GE2-M 緩衝液*3 400 µL を加え、試験管ミキサーにて良く攪拌する。4,000×g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心する*4。そ

CTAB を用いた DNA の抽出」に従う。なお、DNA 抽出は 1 試料当たり 2 併行で行う。

加工食品においては、その加工工程で DNA の分解が進んでいることから、ここに示した方法で分析可能な DNA が必ずしも抽出されるわけではないことに留意する必要がある。

2.7.2.1. 検体前処理

2.7.2.1.1. ダイズ加工食品

遺伝子組換えダイズ RRS、LLS 及び RRS2 を検知するための前処理を示す。

①～⑮　（略）

2.7.2.1.2.～2.7.2.2.3.　（略）

（加える。）

の上清*5 800 µL を 2 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 600 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する。10,000×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心し、上清*6 を可能な限り、2 mL チューブに回収する。回収した上清 700 µL を spin column に負荷した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。残りの上清全量を spin column に負荷し、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 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、TE 緩衝液 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 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
　ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のもの、又は別途購入したものを用いる。
*2 撹拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。試験管ミキサーに対してチューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと撹拌する。撹拌が不十分な場合はさらに 30～60 秒間撹拌する。
*3 GE2-M 緩衝液
　ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のものを用いる。
*4 使用するローター及び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。
*5 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。
*6 沈殿や浮遊物等がある場合は、可能な限り取らないように上清を回

収する。

2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用）

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*1 1 mL、RNase A 10 µL、Proteinase K 20 µL、α-Amylase 2 µL を加え、試験管ミキサーで 30 秒間以上混合した後*2、65℃で 30 分間加温する。この間、10 分間ごとに試験管ミキサーにて 10 秒間攪拌する。GE2-M 緩衝液*3 200 µL を加え、試験管ミキサーにて良く攪拌する。4,000×g 以上、4°C の条件で 10 分間遠心する*4。その上清*5 800 µL を 2 mL チューブに移し、GB3 緩衝液 600 µL を添加した後、10～12 回転倒混和する。10,000×g 以上、4°C の条件で 5 分間遠心し、上清*6 を可能な限り、2 mL チューブに回収する。回収した上清 700 µL を spin column に負荷した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。残りの上清全量を spin column に負荷し、10,000×g 以上、4°C の条件で 1 分間遠心し、溶出液を捨てる。次いで GW 緩衝液 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、TE 緩衝液 50 µL を加え 3 分間室温で静置した後、10,000×g 以上、4°C の条件で 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

ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のもの、又は別途購入したものを用いる。

*2 攪拌操作が不十分であると、DNA の収量が著しく減少する。試験

（加える。）

管ミキサーに対してチューブを垂直にあて、そのまま 30 秒間しっかりと撹拌する。撹拌が不十分な場合はさらに 30～60 秒間撹拌する。

*3 GE2-M 緩衝液

ニッポンジーン社 NIPPON GENE GM quicker 4 付属のものを用いる。

*4 使用するローター及び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。

*5 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。

*6 沈殿や浮遊物等がある場合は、可能な限り取らないように上清を回収する。

2.7.2.2.6. CTAB を用いた DNA の抽出

（略）

2.7.3.・2.7.4.　（略）

2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製

（略）

*1 （略）

*2 株式会社藤原製作所製穀粒計数板（100 粒ダイズ用）の一部をアルミ箔等で覆ったものを使用することで、効率的にランダムサンプリングを行うことができる。

*3 ～*5　（略）

2.7.2.2.4. CTAB を用いた DNA の抽出

（略）

2.7.3.・2.7.4.　（略）

2.7.5. グループ検査のための DNA 試料液調製

（略）

*1 （略）

*2 不二金属工業社製穀粒係数板（100 粒ダイズ用）の一部をアルミ箔等で覆ったものを使用することで、効率的にランダムサンプリングを行うことができる。

*3 ～*5　（略）

2.7.6.　（略）

2.8. パパイヤ検査法（55-1 系統）

2.8.1.・2.8.2.　（略）

2.8.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

（略）

2.8.3.1・2.8.3.2.　（略）

2.8.3.3. リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500）

（略）

2.8.3.3.1.～2.8.3.3.3.　（略）

2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定

（略）

2.7.6.　（略）

2.8. パパイヤ検査法（55-1 系統）

2.8.1.・2.8.2.　（略）

2.8.3. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法

（略）

2.8.3.1・2.8.3.2.　（略）

2.8.3.3. リアルタイム PCR 法（ABI PRISM® 7900HT, Applied Biosystems® 7500）

（略）

2.8.3.3.1.～2.8.3.3.3.　（略）

2.8.3.3.4. 結果の解析及び判定

（略）

図13　結果の判定スキーム

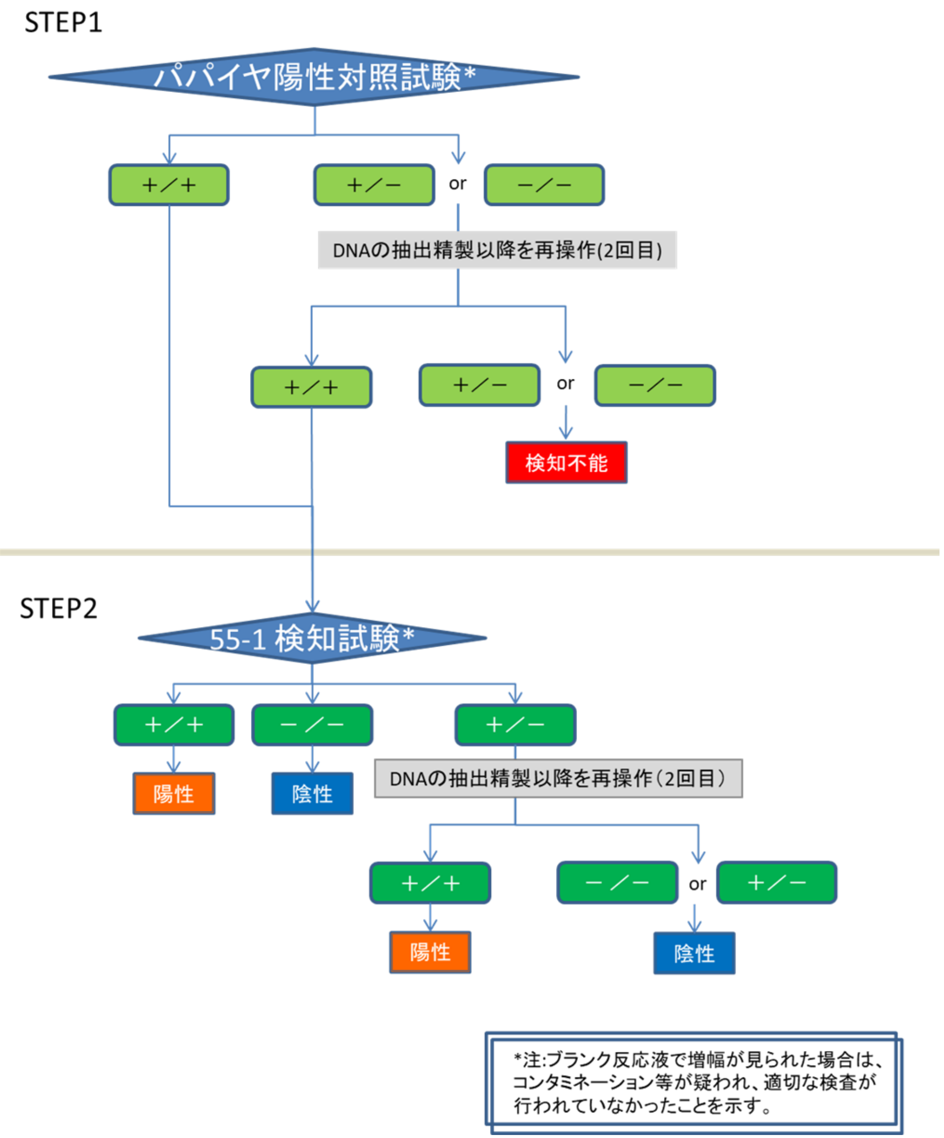
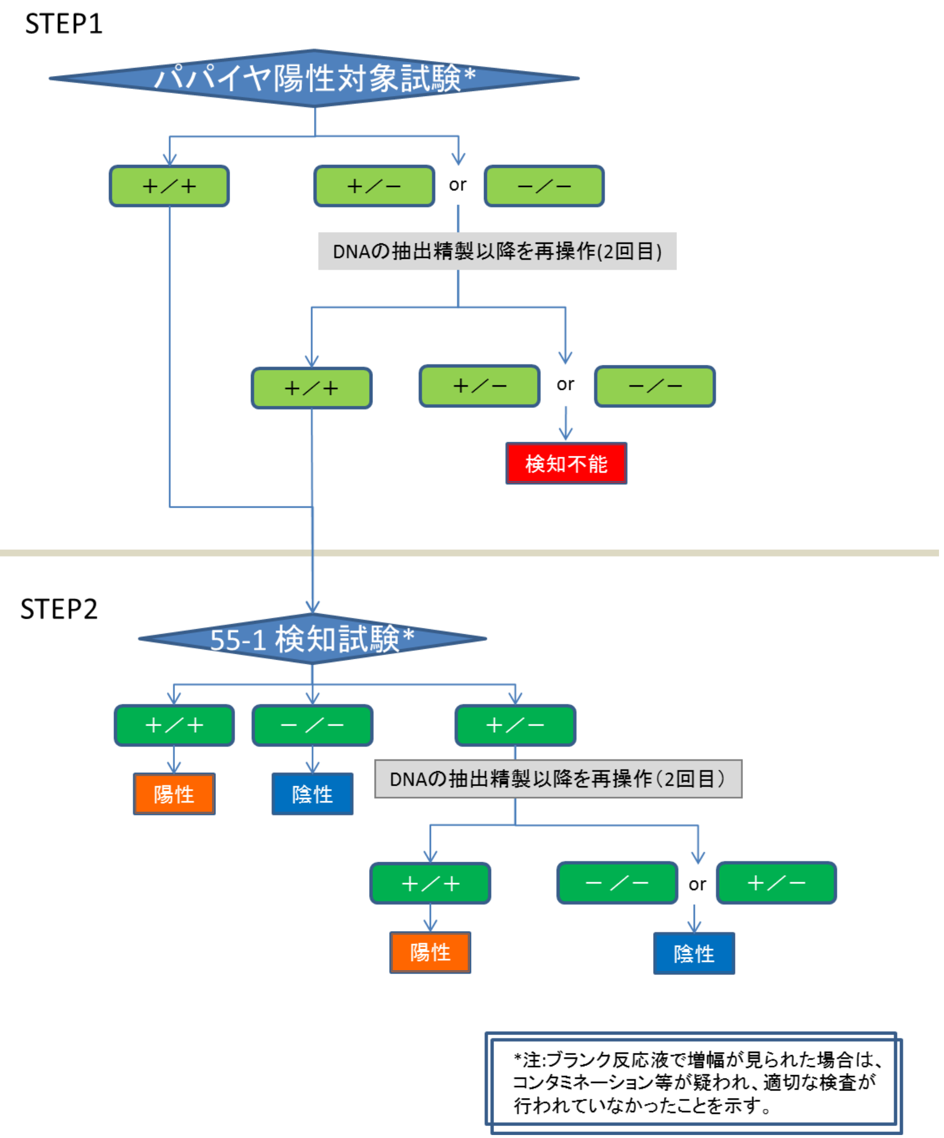


図13　結果の判定スキーム



（別紙 1）内標比

ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5’, Le1n 02-3’ と Le1-Taq 及び RRS 01-5’, RRS 01-3’ と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5’, SSIIb 3-3’ と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5’, P35S 1-3’ と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5’, SSIIb 3-3’ と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5’, GA21-3-3’ と GA21-Taq を使用

ABI PRISM® 7900HT 96 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5’, Le1n 02-3’ と Le1-Taq 及び RRS 01-5’, RRS 01-3’ と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	（略）	Le1n 02-5’, Le1n 02-3’ と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	（略）	Le1n 02-5’, Le1n 02-3’ と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず（スクリーニング）	1.09	Le1n 02-5’, Le1n 02-3’ と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用

（別紙 1）内標比

ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用

ABI PRISM® 7900HT 96 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
（加える。）			

トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-Taq を使用

ABI PRISM® 7900HT 384 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	(略)	(略)	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用

ABI PRISM® 7000

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	(略)	(略)	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
トウモロ	(略)	(略)	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び

トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

ABI PRISM® 7900HT 384 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	(略)	(略)	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	(略)	(略)	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用

ABI PRISM® 7000

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	(略)	(略)	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロ	(略)	(略)	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び

コシ			P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用

Applied Biosystems® 7500

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず（スクリーニング）	1.28	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604-Taq を使用

コシ			P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用

Applied Biosystems® 7500

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
（加える。）			
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用

トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-Taq を使用

Roche LightCycler® System

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用

QuantStudio 5

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず（スクリ	1.16	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用

トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

Roche LightCycler® System

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用

QuantStudio 5

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
（加える。）			

	ーニング）		
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-Taq を使用

QuantStudio 12K Flex

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず（スクリ	1.15	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用

トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

QuantStudio 12K Flex

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
（加える。）			

	ーニング）							
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用		トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用		トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604-Taq を使用		トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-Taq を使用		トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

LightCycler® 96

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず（スクリ	1.06	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用

LightCycler® 96

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
（加える。）			

	ーニング）		
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5', P35S 1-3' と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5', GA21-3-3' と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5', SSIIb 3-3' と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-Taq を使用

LightCycler® 480 96 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び RRS 01-5', RRS 01-3' と RRS-Taq を使用
ダイズ	Liberty Link Soybean	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready 2 Yield	（略）	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
ダイズ	特定せず（スクリ	0.98	Le1n 02-5', Le1n 02-3' と Le1-Taq 及び PAT-120F, PAT-120R と PAT-1-Taq を使用

トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

LightCycler® 480 96 well

農産物名	対象系統	内標比	備考
ダイズ	（略）	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用
ダイズ	LL Soybean	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び KVM175, SMO001 と TM031 を使用
ダイズ	Roundup Ready Soybean 2	（略）	Le1-n02 と Le1-Taq 及び MON89788-F, MON89788-R と MON89788-P を使用
（加える。）			

	ーニング)		
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5’, SSIIb 3-3’ と SSIIb-Taq 及び P35S 1-5’, P35S 1-3’ と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5’, SSIIb 3-3’ と SSIIb-Taq 及び GA21-3-5’, GA21-3-3’ と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5’, SSIIb 3-3’ と SSIIb-Taq 及び MIR604 primer F, MIR604 primer R と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb 3-5’, SSIIb 3-3’ と SSIIb-Taq 及び MIR162-f1, MIR162-r1 と MIR162-Taq を使用

（別紙 2）　（略）

（参考）

(1)　（略）

(2) 2.7.1.4. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用）、2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用）、2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製（NIPPON GENE GM quicker）に記述のシリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker）及び 2.7.2.2.4. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（乾燥した状態の検体に適用）と 2.7.2.2.5. GM quicker 4 を用いた DNA の抽出（水分を多く含む検体に適用）に記述のシリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker 4）に用いられる GE1 及び

トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び P35S-1 と P35S-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び GA21-3 と GA21-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR604-1 と MIR604-Taq を使用
トウモロコシ	（略）	（略）	SSIIb-3 と SSIIb-Taq 及び MIR162-1 と MIR162-Taq を使用

（別紙 2）　（略）

（参考）

(1)　（略）

(2) 2.7.1.4. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: トウモロコシに適用）、2.7.1.5. シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker: ダイズに適用）及び 2.7.6. 組換え系統の判別のための精製 DNA 試料液調製（NIPPON GENE GM quicker）に記述のシリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker）に用いられる GE1 及び GE2 緩衝液及び RNase A は、キットに含まれるものとは別にニッポンジーン社（〒930-0982 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）から購入可能である。

RNase A は、キットに含まれるものとは別にニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 2-7-18. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547。以下同じ。）から購入可能である。同シリカゲル膜タイプキット法（NIPPON GENE GM quicker）に用いられる GE2 緩衝液は、キットに含まれるものとは別にニッポンジーン社から購入可能である。

(3) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ（RRS）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（RRS）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM ダイズ（RRS2）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（RRS2）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM ダイズ（PAT）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（PAT）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）、2.1.4. Liberty Link Soybean（Event A2704-12）定量法に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ（LLS）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（LLS）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-））、2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM トウモロコシプラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）、2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM トウモロコシプラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM トウモロコシ（MIR604）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize（MIR604）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）、GM トウモロコシ（MIR162）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize（MIR162）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）は、ニッポンジーン社、ファスマック社（〒243-0041 厚木市緑ヶ丘 5-1-3. Tel. 046-295-8787 Fax. 046-294-3738。以下同じ。）から購入可能である。

(4) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算、2.1.4. Liberty Link

(3) 2.1.2. 試料の遺伝子組換え農産物含有率の計算に記述の検量線の作成に用いられる標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ（RRS）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（RRS）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM ダイズ（LLS）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（LLS）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM ダイズ（RRS2）プラスミドセット-ColE1/TE-；GM Soybean（RRS2）Detection Plasmid Set-ColE1/TE-、GM トウモロコシプラスミドセット-ColE1/TE-；GM Maize Detection Plasmid Set-ColE1/TE-）は、ニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）、ファスマック社（〒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。

(4) 2.1.1.1. ABI PRISM® 7700 及び ABI PRISM® 5700 を用いた定量 PCR、

Soybean（Event A2704-12）定量法、2.3.1.1. P35S が組み込まれた組換え系統の定量、及び 2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブは、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。

(5) 2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法及び 2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）に記載の標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ混入判定用プラスミドセット、GM ダイズ（PAT）混入判定用プラスミドセット及び GM トウモロコシ混入判定用プラスミドセット）は、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。

(6) 2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）、2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）、2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製、2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）及び 2.6.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブ（SSIIb-TaqV 以外）は、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。また、SSIIb-TaqV は、Thermo Fisher Scientific 社（〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町三丁目 9 番地）から合成依頼による購入が可能である。

2.1.1.2. ABI PRISM® 7900HT 96 well 及び 384 well を用いた定量 PCR、2.1.1.3. ABI PRISM® 7000 を用いた定量 PCR、2.1.1.5. Roche LightCycler System を用いた定量 PCR 及び 2.3.1.2. GA21、MIR604、MIR162 の定量に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブは、ニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）、ファスマック社（〒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。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。

(5) 2.2.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法及び 2.4.1. リアルタイム PCR を用いた定性 PCR 法に記載の標準プラスミド DNA 溶液（GM ダイズ混入判定用プラスミドセット、GM トウモロコシ混入判定用プラスミドセット）は、ニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）、ファスマック社（〒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。

(6) 2.3.2.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）、2.3.2.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）、2.3.3.1.1. PCR 用反応液の調製、2.6.1.1. PCR 用反応液の調製（ABI PRISM® 7900HT 96 well）及び 2.6.2.1. PCR 用反応液の調製（LightCycler® 96 及び LightCycler® 480）に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー対及び対象プローブ（SSIIb-TaqV 以外）は、ニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）、ファスマック社（〒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。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。また、SSIIb-TaqV は、Thermo Fisher Scientific 社（〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町三丁目 9 番地）から合成依頼による購入が可能である。

(7) 2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法（粒単位検査法）に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液は、ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。	(7) 2.3.3.1. マルチプレックスリアルタイム PCR を用いた定性検知法に記載の PCR 用反応液の調製に用いられる GM トウモロコシプラスミドセット DNA 溶液又は GM トウモロコシ陽性コントロールプラスミド DNA 溶液は、ニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）、ファスマック社（〒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。
(8) パパイヤ 55-1 系統のプライマー・プローブ及び標準プラスミドは，ニッポンジーン社、ファスマック社から購入可能である。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。	(8) パパイヤ 55-1 系統のプライマー・プローブ及び標準プラスミドは，ニッポンジーン社（〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547）、ファスマック社（〒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。または、その他の DNA 合成受託会社から合成依頼による購入が可能である。
検査方法の同等性確認方法	検査方法の同等性確認方法
1. （略）	1. （略）
2. 定性用リアルタイム PCR 装置について	2. 定性用リアルタイム PCR 装置について
「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」中で用いられている装置のほかにも同等の性能を有する機種を用いることができる。同等の性能の確認は、感度、繰り返し再現性、ウェル間差及び増幅効率などを考慮して行う。例えば、市販陽性対照プラスミド（ダイズ、トウモロコシ用等）を用意し、現行機種を用いて検出限界より少し高い濃度（10 回中 10 回全て検出される最低濃度）の希釈溶液を作製する。その溶液を用いて、確認したい機種で同様の試験を行い、また、日を変えて 3 回以上行った結果、全て検出されること。96 ウェル間で差がないことを確認する（Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。）。	「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」中で用いられている装置のほかにも同等の性能を有する機種を用いることができる。同等の性能の確認は、感度、繰り返し再現性、ウェル間差及び増幅効率（特に定量する場合）などを考慮して行う。例えば、市販陽性対照プラスミド（例えば、コメ用）を用意し、現行機種（ABI PRISM 7900 等）を用いて検出限界より少し高い濃度（10 回中 10 回全て検出される最低濃度）の希釈溶液を作製する。その溶液を用いて、確認したい機種で同様の試験を行い、また、日を変えて 3 回以上行った結果、全て検出されること。96 ウェル間で差がないことを確認する（Cq 値に最

	大でも 1 以上の差がない。)。
3.　（略）	3.　（略）