

収去・検出標準手順書の概要について

資料4



- 経済産業大臣の指示により、以下に掲げる者がその行為を行う場所等に立ち入り、
 - a. 当該遺伝子組換え生物等、施設等の検査及び関係者への質問
 - b. 検査に必要な最少限度の分量の遺伝子組換え生物等の収去を行う。(法第32条)

- 経済産業省からの指示による立入検査において収去した試料から、漏洩した遺伝子組換え微生物を「生菌」として検出するための手法を標準作業手順書として作成した。
平成26年度産構審バイオ小委員会：「大腸菌」（原核のモデル微生物）
平成27年度産構審バイオ小委員会：「酵母」（真核のモデル微生物）

- ✓ これらを基に、その他以下の微生物群を宿主とした遺伝子組換え微生物を対象とする手順書を作成し外部有識者で構成されたNITE内部委員会*にて標準作業手順書として承認を得られたものである。
 - *Bacillus* 属・*Brevibacillus* 属を（芽胞形成）
 - グラム陰性細菌（大腸菌以外）
 - グラム陽性細菌（*Bacillus* 属・*Brevibacillus* 属以外）
 - 放線菌
 - 糸状菌

* 遺伝子組換え生物等収去・検出技術検討委員会委員（敬称省略）

委員長	藤田 正憲	大阪大学	名誉教授
委員	江崎 孝行	岐阜大学	名誉教授
	津田 雅孝	東北大学	教授
	中村 和憲	産業技術総合研究所	研究顧問
	正木 春彦	東京大学	教授
	前川 秀彰	バイオメディカルサイエンス研究会	常任理事

収去・検出標準作業手順書

(対象：遺伝子組換え微生物)

(独) 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター

目次

はじめに.....	3
第1章 目的.....	4
第2章 検査対象範囲.....	4
第3章 検査に関する安全対策、遵守義務.....	4
第4章 検査の進め方.....	5
第5章 収去.....	6
1. 収去のための準備.....	6
2. 収去の方法の決定.....	6
3. 収去方法.....	7
(1) 土壌からの試料収去.....	7
(2) 排水等からの試料収去.....	7
(3) 壁や床からの試料収去.....	8
第6章 生菌の検出.....	9
1. 生菌検出のための準備.....	9
2. 生菌の検出方法.....	10
(1) 土壌からの生菌の検出.....	10
(2) 排水等からの生菌の検出.....	11
(3) 壁や床面からの生菌の検出.....	11
第7章 PCR による検出.....	11
1. 検出のための準備.....	11
2. 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出.....	12
第8章 PCR で増幅された産物のシーケンシング.....	13
1. シーケンシングのための準備.....	13
2. シーケンシングによる確認.....	13
第9章 主な試薬の調整及び必要な器具.....	13
別紙1.....	15
別紙2.....	16
別紙3.....	20
別紙4.....	22

はじめに

本マニュアルは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（以下「カルタヘナ法」という。）第31条及び第32条に基づく立入検査において、検査に必要な最小限度の分量に限り遺伝子組換え微生物を収去した際における、遺伝子組換え微生物の収去・検出マニュアルを作成したものである。

平成16年2月19日に、カルタヘナ法が施行されて以来、その施行対策の一環として、立入検査において収去した各種試料から、環境中に漏出した遺伝子組換え微生物を適切に検出する手法を確立することが求められてきた。製品評価技術基盤機構（以下「NITE」という。）は経済産業大臣の指示により、遺伝子組換え生物等を使用している場所に立ち入り、施設等の検査及び遺伝子組換え生物等を収去する機関としてカルタヘナ法第32条に規定されている。これにより、NITE は経済産業省からの委託を受けて、「環境対応技術開発等（カルタヘナ法施行対策）事業」を実施し、更に染色体組換え微生物検出技術についての検討と環境からの単離手法の検証及び環境漏洩事故時においていかに不活化処理を行うべきかについて、学識経験者から構成される収去・検出技術検討委員会を開催し検討を行ってきた。

これらの調査及び検討結果を踏まえ、原核微生物のモデル微生物として大腸菌を対象とする収去・検出方法を整えた「収去・検出標準作業手順書（対象：遺伝子組換え大腸菌）」を平成26年度の産業構造審議会バイオ小委員会にて審議承認していただいたのに続き、真核微生物では酵母を対象とした「収去・検出標準作業手順書（対象：遺伝子組換え酵母）」を平成27年度に審議承認していただいた。これらを基に微生物種全般を対象とし、NITE における遺伝子組換え微生物の収去・検出を適切に実施するものとして本マニュアルを整えたものである。

第1章 目的

本手順書は、カルタヘナ法第32条に基づき、経済産業大臣から立入検査における収去の指示により、収去による検査をする際の遺伝子組換え微生物を検出するための手順書である。

第2章 検査対象範囲

検査対象は、立入検査において収去した遺伝子組換え微生物を含む収去品とする。また本マニュアルにおいて対象とする収去品は遺伝子組換え微生物を含む土壌試料、排水試料あるいは壁や床からの試料とする。

第3章 検査に関する安全対策、遵守義務

収去した試料及び検査において生じた遺伝子組換え微生物の使用等に当たっては、カルタヘナ法に従うこととする。その他の関係法令、条例や内部規程等にしがたい微生物の取扱いに關しての事項を遵守するほか、十分な安全確保に努めなければならない。

また検査に必要な全ての作業は、NITE バイオテクノロジーセンター内の「遺伝子組換え実験安全管理規程」第15条に基づき承認を受けた立入検査における収去検査用の実験室（以下「検査場所」という。）にて行い、収去した環境試料の取扱いは研究用安全キャビネット内にて行う^{*1}。生菌の検出作業に当たっては、コンタミネーションの防止に努力し、特に以下の項目について注意すること。

- ・ 収去した試料及び当該試料から単離した微生物の取扱いは、可能な限り検査期間は専用の実験室を確保することとし、他の実験と共用を行わない。
- ・ 検査を実施する実験室には、「収去試料の検査中につき検査担当者以外立入禁止」を明示し予定検査期間や検査担当者等の表示を行い、関係者以外の入室を制限する。
- ・ 実験室のドアは常に閉めておき、検査員が不在の場合は施錠して検査員が鍵を保管管理する。
- ・ 実験室内においては個人保護具として清潔な実験室用白衣及び実験用手袋を着用する。また収去試料等の検査で飛沫の可能性のある場合は、必要に応じて防護めがね及び顔面用シールドを着用する。
- ・ 収去試料の検査内容については、可能な限り詳細な実験の記録を保存する。

^{*1} 遺伝子組換え実験の全ての実験及び保管について適用する。

第4章 検査の進め方

遺伝子組換え微生物の検査の進め方について、以下の図1に主な収去・検出作業の流れを示す。

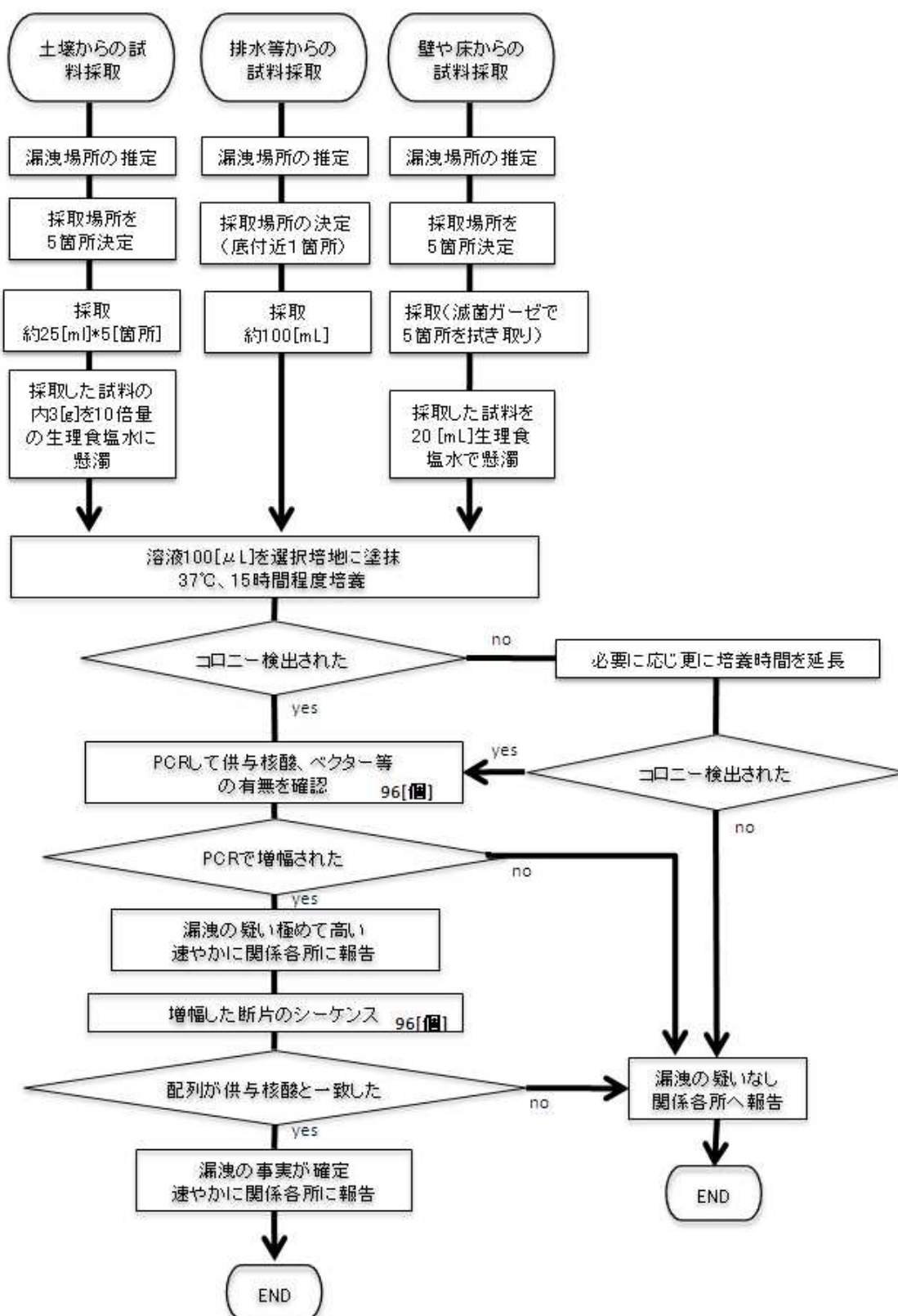


図1. 主な収去・検出作業の流れ（例：遺伝子組換え大腸菌）

第5章 収去

1. 収去のための準備

収去する環境試料は、立入検査の現場において現地調査、聞き取り調査等を行い総合的な判断をもって収去対象及び収去範囲を決定する。よって、いかなる環境からも収去ができるように、次の「収去用具の区分」に示す器具類を全て持参する。ただし、収去対象があらかじめ既知の場合においては、適宜、必要な器具を選択し持参してもよい。また、第6章での生菌の検出ができるよう選択培地等をあらかじめ準備する（詳細は第6章を参照）。

「収去用具の区分」

① 土壌収去用具一式

- ・ 試料収去用滅菌済み容器（遠沈管 50～250 mL 容量） 5 個以上
- ・ 滅菌済み収去用移植ごて 5 個以上
- ・ メジャー
- ・ 滅菌済み藁さじ

② 水収去用具一式

- ・ 試料収去用滅菌済み容器（遠沈管 50～250 mL 容量） 5 個以上
- ・ 滅菌済み採水用具

③ 壁面等ふき取り収去器具

- ・ 滅菌ガーゼ（小サイズ、例「滅菌ハイディアー（イワツキ）」折りたたまれた状態で 5 cm × 5 cm サイズ）
- ・ 50 mL 滅菌済みチューブ 20 個以上
- ・ 滅菌済みピンセット 20 本以上
- ・ メジャー
- ・ 生理食塩水（0.9% 食塩水）

④ その他共通用具

- ・ 運搬用クーラーバック
- ・ 滅菌用 70% エタノール
- ・ 収去用具持ち帰り用オートクレーブバック
- ・ 洗浄、清掃用器具
- ・ キムワイプ・キムタオル
- ・ 使い捨てグローブ
- ・ 保護衣、マスク、保護メガネ
- ・ 保冷剤（現地購入）
- ・ パラフィルム
- ・ チャック付きビニル袋
- ・ 滅菌水
- ・ ガムテープ
- ・ 油性ペン
- ・ デジタルカメラ

2. 収去の方法の決定

- ① 立入検査員は、漏洩等の事故の日時、量、状態について「立入検査用記録用紙」（別紙 1）に記載する。
- ② 立入検査員は、漏洩事故後に不活化処理が行われている場合は、その具体的な方法を別紙 1 に記載する。
- ③ 立入検査員は、上記①、②のほか必要な情報、及び収去する範囲を決定し別紙 1 に記載する。
- ④ 立入検査員は、決定した収去範囲の対象となる環境を確認し別紙 1 に記載する（必要に応じて被検査者の了解を得た後、写真撮影する）。
- ⑤ 立入検査員は、収去対象に応じて収去方法を決定し別紙 1 に記載する。

- ⑥ 立入検査員は、収去対象及びサンプル数を **NITE** バイオテクノロジーセンターの検出検査を行う担当者（以下「検出検査担当者」という。）に連絡をする。
- ⑦ 立入検査員は、収去する旨を被検査者に伝えるときともに、経済産業省及び被検査者等から遺伝子組換え微生物に関し必要と思われる情報は可能な限り入手する。

3. 収去方法

立入検査員は収去対象となる環境に応じ、以下（１）～（３）にしたがい収去を行う。

（１）土壌からの試料収去

- ① 試料収去地点は、図 2 に示す漏洩場所の中心点 **A** 及び中心点 **A** から 4 つの方向に等距離をとった **B～E** 地点の 5 地点とし、収去地点を別紙 1 に記録する。なお、中心点 **A** から **B～E** 地点までの距離は、漏洩範囲に応じ立入検査員が適宜決定する。また必要な場合は、図 2 に示す漏洩がおよんでいないはずの地点 **F～I** についてもネガティブコントロール試験用の試料として採取を行い、同様に記録する。
- ② 試料収去地点から滅菌済みの収去用具を用いて **25 mL** 容量を目安に表面から深さ **3 cm** 程度までの土壌を収去し、滅菌済みの容器に入れ密閉する。
- ③ 容器に収去した区画等について、シールの貼付等による方法で明記する。
- ④ 試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。保冷剤が容器に直接接触することにより試料が **0 °C** 以下とならないようにする。
- ⑤ 試料は検査期間中、低温で保存する。

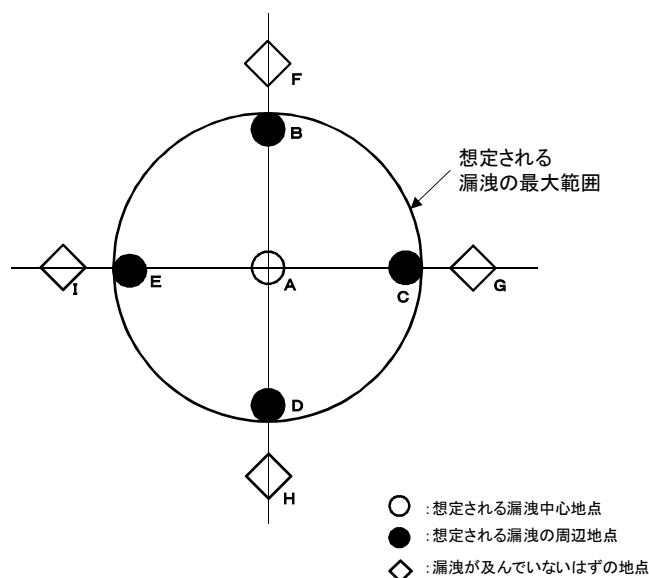


図 2. 5 地点の収去法（例）

（２）排水等からの試料収去

- ① 滅菌済みの収去用具を用いて、漏洩事故状況を勘案して、最も漏洩した遺伝子組換え微生物が含まれていると考えられる地点（例えば排水マス）について、任意の 5 地点から採水する。採水する深さは、採水する地点の底付近とし、**100 mL** 程度を収去し、滅菌済みの容器に入れ密閉する。
- ② 収去した容器表面に、収去した場所、深さ（例えば排水マスの底部中心と四方 4 地点等）等について、シールの貼付等による方法で明記する。
- ③ 試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検

査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に
応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。保冷剤が容器に直接接触すること
により試料が 0℃以下とならないようにする。

- ④ 試料は検査期間中、低温で保存する。

(3) 壁や床からの試料収去

ケース 1 亀裂の入った壁面（内外両方実施）

- ① 収去範囲を亀裂の周囲 5 cm 幅とする（図 3 参照）。
- ② 50 mL チューブにあらかじめ滅菌済みの生理食塩水を 3 mL 入れておく。
- ② 滅菌ガーゼを 50 mL 容チューブ内で 3 mL の生理食塩水で湿らせる。
- ③ 滅菌済みピンセットで前記③の湿らせた滅菌済みガーゼを挟み壁面を拭く。
- ④ 拭いたガーゼを生理食塩水の入った 50 mL 容チューブに入れ、更に 17 mL の生理食
塩水を加え、密閉する（合計 20 mL の生理食塩水を使用）。
- ⑤ 10 cm 区画を拭き取ったごとにガーゼを換え②及び③を繰り返し、収去範囲全てを
ふき取る。
- ⑥ 容器に収去した区画等について、シールの貼付等による方法で明記する。
- ⑦ 試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入
れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検
査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に
応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。保冷剤が容器に直接接触すること
により試料が 0℃以下とならないようにする。
- ⑧ 試料は検査期間中、低温で保存する。

ケース 2 通常の壁面及び舗装面

- ① 収去範囲を 10 cm 間隔で区分する。
- ② 50 mL チューブにあらかじめ滅菌済みの生理食塩水を 3 mL 入れ、滅菌ガーゼを 50
mL 容チューブに入れ、滅菌済みの生理食塩水で湿らせる。
- ③ 選択した区画を滅菌済みピンセットで湿潤させた滅菌済みガーゼを挟み設定した 5
区画（10 cm 角）の壁面等を拭く。
- ④ 拭いたガーゼを滅菌済みの 50 mL 容チューブに入れ、更に 17 mL の生理食塩水を加
え、密閉する（合計 20 mL の生理食塩水を使用）。
- ⑤ 容器に収去した区画等について、シールの貼付等の方法で明記する。
- ⑥ 試料容器が破損等した場合に備えて密閉可能な二次容器（チャック付き袋等）に入
れ、この二次容器を保冷剤と共にクーラーバック等に入れて低温を保った状態で検
査場所まで運搬する。また、試料温度を低温に維持するため、移動距離及び時間に
応じて必要な数の交換用の保冷剤を準備する。保冷剤が容器に直接接触すること
により試料が 0℃以下とならないようにする。
- ⑦ 試料は検査期間中、低温で保存する。

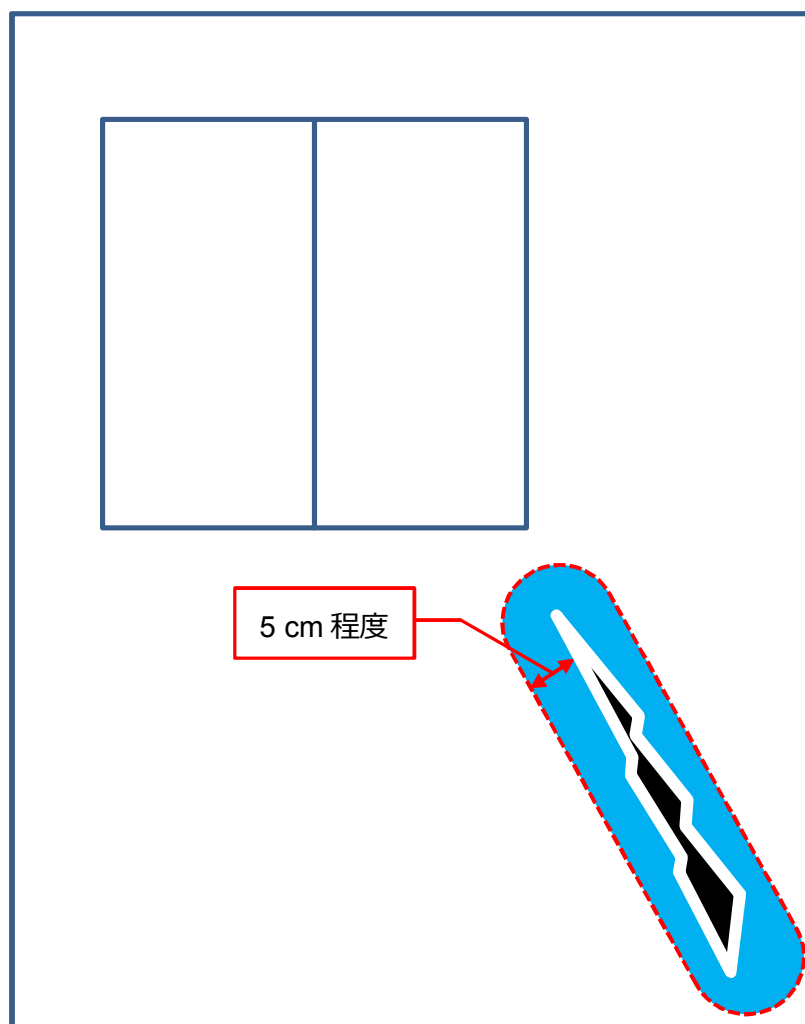


図 3. 亀裂での収去範囲（例）

第 6 章 生菌の検出

1. 生菌検出のための準備

検出検査担当者は、原則として大臣からの立入検査の指示後、立入検査時まで、対象となる遺伝子組換え微生物に関する申請書の情報から選択培地（利用できる抗生物質等の選択マーカーも利用）を別紙 2 より選択し、以下に示す生菌を検出するための機械・器具等を準備する。特に、第 5 章 2. ⑦の連絡後速やかに第 6 章 1. ④の選択平板培地を準備する。

生菌の検出作業開始までの期間は、原則として収去翌日から 5 営業日以内とする。

なお、別紙 2 では検出対象となる微生物種を以下のとおり分類している。

- A. 大腸菌を宿主とした遺伝子組換え微生物
- B. *Bacillus* 属・*Brevibacillus* 属を宿主とした遺伝子組換え微生物
- C. グラム陰性細菌（大腸菌以外）を宿主とした遺伝子組換え微生物
- D. グラム陽性細菌（*Bacillus* 属・*Brevibacillus* 属以外）及び放線菌（コリネ型細菌）を宿主とした遺伝子組換え微生物
- E. 放線菌（孢子形成をする）を宿主とした遺伝子組換え微生物
- F. 酵母を宿主とした遺伝子組換え微生物
- G. 糸状菌を宿主とした遺伝子組換え微生物

① 機器

- ・オートクレーブ（高圧蒸気滅菌器）
- ・研究用安全キャビネット

- ・ ミキサー（又は振とう機）
- ・ インキュベーター（恒温槽）
- ・ 直示式天秤
- ② 器具（試料数に応じて調整）
 - ・ 滅菌済みシャーレ（直径 9 cm 程度）
 - ・ 100 mL 容滅菌済み容器（密栓可のもの）
 - ・ 滅菌済み 10 mL メスピペット
 - ・ 滅菌済み 1 mL メスピペット
 - ・ 機械式（電動）ピペッター
 - ・ 100 μ L 用マイクロピペット
 - ・ 滅菌済み 100 μ L 容ピペットチップ
 - ・ コロニーカウンター又はマジック（コロニーの計測に適した形状推奨）等
 - ・ 試薬皿（又は薬包紙等）
 - ・ 培地調整用フラスコ等
 - ・ （コンラージ棒）
 - ・ 滅菌済み 15 mL 容チューブ
- ③ 試薬
 - ・ 滅菌済み生理食塩水 1 L
 - ・ 選択培地等
 - ・ 70% エタノール
- ④ 選択平板培地
 - a. 原則として別紙 2 による培地を利用する。
各培地組成については、別紙 3 を参照し調整する。
 - b. 三角フラスコ等に培地を規定量で調製し、軽く封をして 121 $^{\circ}$ C、15 分で高圧蒸気滅菌する。
 - c. 滅菌後、60 $^{\circ}$ C 程度になるまで封をしたまま冷却する。添加物（抗生物質等）を加える場合は冷却後に、別途滅菌済みのものを加える。検出対象に利用できる抗生物質等の選択マーカーがある場合は、適宜至適量を加える。
 - d. 研究用安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で、冷めた培地を手早くシャーレに 20 mL ずつまき、蓋をする。
 - e. 試料数の 5 倍以上の枚数のプレートを作製する。
 - f. 培地が固まるまで研究用安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内に置いておく。
- ⑤ ポジティブコントロール試験

目的の遺伝子組換え微生物を選択培養する場合は、以下のポジティブコントロール試験を行う。

 - ・ 漏洩した遺伝子組換え微生物と同じ、又は同等の遺伝子組換え微生物を被検査者等から収去し、使用する選択培地で生育することを確認する。
 - ・ 上記の収去した遺伝子組換え微生物を選択培地で培養し、生育したコロニーで性状等の比較を行う。

2. 生菌の検出方法

検出検査担当者は収去した試料に応じ、以下（1）～（3）にしたがい生菌の検出を行う。

（1）土壌からの生菌の検出（論理的検出下限：100 cfu/g）*2

「第 5 章 3.（1）土壌からの試料収去」の方法により 5 地点から収去した土壌試料の全てを、以下の方法によってそれぞれ生菌の検出を行う。また、漏洩が及んでいない

*2 cfu : colony forming unit の略

ネガティブコントロールとして採取した試料についても生菌が検出されないことを確認する。

- ① 収去した土壌をボルテックスミキサー等でよく攪拌する。
- ② 土壌 3 g を直示式天秤で量り取る。
- ③ 滅菌済みの 50 mL の容量の容器 (50 mL 遠沈管) に土壌を移し、10 倍量の生理食塩水 (土壌が 3 g であれば 30 mL) を加え密栓する。
- ④ 容器をミキサー等で攪拌し十分に懸濁する。
- ⑤ 試料を用意した平板培地に 100 μ L ずつ接種しコンラージ棒で塗抹後、素早く蓋をする (原則として収去する資料は不活化処理されていることを想定しているが、漏洩後の処理状況等の情報に合わせ希釈が必要な場合は適宜希釈すること)。
- ⑥ 試料を塗抹する平板培地の枚数は 1 地点あたり 5 枚 ($n=5$) とする。
- ⑦ 試料を塗抹した平板培地を至適温度で培養する。
* 検出に嫌気環境での培養が必要な微生物については、嫌気培養が可能な角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れ、脱酸素・炭酸ガス発生剤を入れ、素早く密閉する (必要な器具については第 9 章⑩を参照)。
- ⑧ 培養後、発生したコロニーを選別し、その数を計測する。コロニーの選抜については、「第 6 章 1. ⑤ポジティブコントロール試験」で検出対象の微生物を培養している場合は、目視による比較で判断を行う。
- ⑨ コロニーが見られなかったときは、必要に応じてさらに培養を継続することとする。

(2) 排水等からの生菌の検出 (論理的検出下限: 未希釈時 (10 cfu/mL)、希釈時 (100 cfu/mL))
「第 5 章 3. (2) 排水等からの試料収去」の方法により 5 地点から収去した試料の全てを以下の方法によって、それぞれ生菌の検出を行う。

- ① 試料の濁度を目視で確認し、試料を直接プレートに塗抹できるか判断し、必要に応じて、以下の②～④の操作をする。
- ② 研究用安全キャビネット内で、安全ピペッターを使用してメスピペットで試料 1 mL はかり、15 mL 容滅菌済み容器に入れる。
- ③ 安全ピペッターを使用してメスピペットで滅菌済み生理食塩水 9 mL はかり、試料の入った 15 mL 容容器に加え 10 倍希釈する。
- ④ 容器を振とうさせ、攪拌する。
- ⑤ 以降の操作は上記 (1) ⑤から⑨と同様に行う。

(3) 壁や床面からの生菌の検出 (論理的検出下限: 1 cfu/cm²)

「第 5 章 3. (3) 壁や床からの試料収去」の方法により 5 地点から収去した試料の全てを以下の方法によって、それぞれ生菌の検出を行う。

- ① 研究用安全キャビネット内で安全ピペッターを使用してメスピペットで滅菌済み生理食塩水 10 mL はかり、ガーゼの入った 15 mL 容容器に加え栓をする。
- ② 容器を振とうさせ、攪拌する。
- ③ 以降の操作は上記 (1) ⑤から⑨と同様に行う。

第 7 章 PCR による検出

1. 検出のための準備

収去した遺伝子組換え微生物の宿主、ベクター、挿入 DNA の PCR 増幅による判別が可能なように大臣指示後直ちに、対象案件の申請書から特異的プライマーが設計できるか検討を行う。申請書で塩基配列情報が入手できない等の理由によりプライマーが設計出来ない場合は、申請書情報の生物種及び遺伝子情報を参考に公共のデータベースから塩基配列情報を入手し、特異的プライマーを複数組設計する。PCR による検出検査開始前までにプライマーを入手する。また想定される PCR 産物長を算出し、適切なサイズマーカーを選択するなど、事前に実験の準備を行う。

PCR による検出作業開始までの期間は原則として生菌の検出から 5 営業日以内とする。

- ① 機器
 - ・ PCR 用サーマルサイクラー
 - ・ 電気泳動装置
 - ・ 滅菌済み竹串等
 - ・ ゲルスキャナー
- ② 器具
 - ・ PCR 用 96 ウェルプレート
 - ・ チューブラック、プレートラック
 - ・ マイクロピペット
 - ・ 0.2, 0.5, 1.5, 2 mL 等マイクロチューブ
- ③ 試薬
 - ・ PCR 用試薬
 - ・ プライマー（宿主^{*3}、ベクター、挿入 DNA 用）
 - ・ 電気泳動用ゲル（アガロース）
 - ・ 電気泳動用バッファー
 - ・ ゲル染色用試薬

2. 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

- ① 平板培地に生えた遺伝子組換え微生物の宿主と想定されるコロニーから 96 個を目安に選び出す。コロニーの総数が 96 個に満たない場合は、全数を対象とする（ただし、収去現場の状況やサンプル数等によっては、更に数を増やしてもよい。）。
- ② コロニーの選抜については、「第 6 章 1. ⑤ポジティブコントロール試験」で検出対象の微生物を培養している場合は、目視による比較で判断を行う。
- ③ 96 ウェル PCR プレートに TE あるいは滅菌蒸留水等 20 μ L を加える。
- ④ 滅菌済み竹串（爪楊枝及びチップでも可）でコロニーをつつき、96 ウェル PCR プレートの滅菌蒸留水に植菌し、懸濁する。
- ⑤ コロニー懸濁液 20 μ L 入りの 96 ウェル PCR プレートから半分の 10 μ L を再試験用として平底プレートに移し替え、シールをして保管する（再試験用に適宜液体培地を入れて培養を行い、グリセロールストック等としても保管する。PCR 反応は、液体培養後あるいはグリセロールストック等の保管試料から PCR 反応を行ってもよいが、再試験以外はコロニーダイレクト PCR^{*}を優先的に行う。）。
- ⑥ 10 μ L のコロニー懸濁液が入った 96 ウェル PCR プレートは、5 分間ボイルした後、2 μ L 程度を PCR 増幅用の鋳型とする。ただし、PCR 反応の鋳型量は PCR 反応液量の 1/10 を越えないように注意する。
- ⑦ 過去において 16S 又は 26S (28S) rDNA 等の PCR 増幅が可能な市販の PCR キットを利用して、キットの至適条件（別紙 2）で PCR 反応を行う（反応液量は 25 μ L 以上とする。）^{**}, ^{***}。
- ⑧ PCR 反応後、電気泳動用ゲルのコームに PCR 反応液をバンドが確認できると推察される適量をローディングダイに混ぜた後に入れ、泳動マーカータととも電気泳動を行う。
- ⑨ 電気泳動後、ゲル染色用試薬で染色反応を行う。
- ⑩ 染色したゲルのバンドの有無を確認する。
- ⑪ 宿主、ベクター、挿入 DNA のいずれの領域も増幅されたコロニーがないか確認する。
- ⑫ 宿主、ベクター、挿入 DNA のいずれの領域でも増幅されたコロニーを確認した場合は直ちにその旨を関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。宿主と同種と思われるコロニーは検出されなかった場合においても、同様に関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。

* グラム陽性細菌（含む放線菌）や真菌の場合は、コロニーダイレクト PCR では

^{*3} 宿主用プライマー：16S rDNA 領域（細菌）、26S (28S) rDNA 領域（真菌）

増幅しないこともあるため、この場合は定法に則った **DNA 抽出**を行い **PCR 反応**させる。

**** PCR 反応条件等の評価のために必ず増幅することを確認しているサンプルも同時反応させる。**

***** 微生物種判別に用いるプライマーを別紙 3 に掲載する。**

第 8 章 PCR で増幅された産物のシーケンシング

1. シーケンシングのための準備

宿主、ベクター、挿入 **DNA** の全てにおいて **PCR 反応**での増幅が確認できたコロニーを検出した場合は、申請書のほか必要に応じて文献等を調査し、シーケンシング用プライマーの設計を行う。挿入 **DNA** の情報については、立入検査員から入手する。

シーケンシングによる **PCR 増幅産物**の判定作業開始までの期間は、原則として「第 7 章 **PCR による検出**」による **PCR 反応**での増幅を確認してから **5 営業日以内**とする。

① 機器

- ・ サーマルサイクラー
- ・ **DNA** シーケンサー

② 器具

- ・ **PCR 用 96 ウェルプレート**
- ・ チューブラック、プレートラック
- ・ マイクロピペット
- ・ **0.2, 0.5, 1.5, 2 mL** 等マイクロチューブ

③ 試薬

- ・ シーケンシング用試薬
- ・ シーケンシング用プライマー

2. シーケンシングによる確認

- ① **PCR 産物各 96 個**ずつを目安にテンプレートとしてシーケンシング反応を行う（**PCR 反応**はサーマルサイクラーに合わせ、過去の実験において最も安定して解析可能な反応条件を適宜選択する）。
- ② 宿主、ベクター及び挿入 **DNA** のシーケンス反応後、それぞれ **96 ウェルプレート**毎に **DNA** シーケンサーで解析する。
- ③ 宿主、ベクター、挿入 **DNA** の配列それぞれを決定する。
- ④ 宿主、ベクター、挿入 **DNA** の配列が申請書等（申請書に配列情報が記載されていない場合は、立入検査において入手した配列情報等あるいは公共のデータベース等から宿主、ベクター、挿入 **DNA** とされる配列情報を入手する）の情報と一致している否かの確認を行う。
- ⑤ 全て一致したコロニーが存在した場合は、遺伝子組換え体を検出した事実及びその検出量について、直ちに関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。漏洩したとされる遺伝子組換え微生物と異なる場合においても、同様に関係各所に連絡すると共に、その後の取扱いについて指示を受ける。

第 9 章 主な試薬の調整及び必要な器具

収去検出検査で利用する汎用試薬は、原則として検査毎に調整する。調整後に使用しなかった場合でも、四半期に 1 度は再度調整する。汎用プライマーやゲル染色試薬等を除き、調整した試薬を 1 度でも使用した場合は、その後の収去した試料の検出作業には利用しない。

① 滅菌蒸留水

超純水を **121 °C、15 分以上オートクレーブ**で処理して使用する。オートクレーブ処理後、ガラスビン中で室温保存する。滅菌水はコンタミネーションの原因となり易いので、できるだけ使用量に見合う分ずつ小分けして、一度開封したものは再使用しないようにする。

② 70% エタノール

試薬特級のエタノールを①で調整した滅菌蒸留水を加え、70% に調整する。滅菌済みの瓶に入れ使用にあたっては、滅菌作業に利用する。

③ 生理食塩水

塩化ナトリウムを超純水で 0.9% の濃度になるように調整し、121 °C、15 分以上オートクレーブで処理して使用する。

④ 平板寒天培地

対象案件の申請書の遺伝子組換え微生物に関する情報から選択培地（利用できる抗生物質等の選択マーカーも利用）を、別紙 2 を参考に選択し、121 °C、15 分以上オートクレーブした後、60 °C 程度になるまで封をしたまま冷却する。適宜抗生物質等を添加し、シャーレに分注し、平板培地を作製する。

⑤ ピペット、チップ等消耗品

全体を滅菌可能なもの若しくは滅菌済みのものを使用することとし、検査開始直前に滅菌したものを使用する。消耗品は検査専用とし、収去試料の検査以外の用途に使用しない。ピペット、チップ等については、綿栓等のフィルター付きものを使用する。

⑥ プライマー

プライマーは、オリゴ合成会社等に発注し、発注先の品質確認データ入手し品質確認を行うこと。

プライマー溶液のコンタミネーション等の異常は、直接結果に影響を与えるので、取り扱いに当たっては、次の注意事項を厳密に守ること。

- ・希釈に使用する TE 及び滅菌水は、できるだけ使用の間近に滅菌して使用する。
- ・分注・希釈作業は、他の作業と別に行う（クリーンベンチ内が望ましい）。
- ・コンタミネーションを起こした場合やコンタミネーションが疑われる場合は速やかに処分する。
- ・凍結融解や繰り返しや遮光をせず 4 °C で保管を行うとプライマーが劣化するため、100 反応ずつ小分けし凍結保管することが望ましい。

⑦ 電気泳動用ゲル

DNA の分離能が確認されている電気泳動用ゲルを利用する。ゲル濃度は、分離する目的の DNA サイズにより適宜調整する。

⑧ 電気泳動用バッファー

原則として利用実績のあるバッファーとする。

⑨ ゲル染色試薬

ゲルの染色の際は、染色試薬を最適な染色可能な濃度に希釈して染色する。

⑩ 嫌気培養用器具等

下記のような脱酸素・炭酸ガス発生剤を利用すると簡便に嫌気環境の調整ができる。脱酸素・炭酸ガス発生剤の使用する場合は、使用期限が切れていないことを確認する。

- ・脱酸素・炭酸ガス発生剤（アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）等）
- ・角形ジャー容器（アネロパック・ケンキ角形ジャー（三菱ガス化学）等）
- ・ダブルチャック付き袋（アネロパック・ケンキ用ダブルチャックパウチ袋（三菱ガス化学）等）

別紙 1

立入検査用記録用紙^{*4}

	管理用仮番号：
1. 立入検査対象者の氏名及び住所、 代表者名及び収去立会人氏名	
2. 立入検査実施年月日	
3. 収去対象試料	
①遺伝子組換え微生物の情報（宿 主、ベクター、挿入 DNA 等）	
②漏洩等の事故の日時、量、状態 （培地等）	
③不活化処理の方法（処理日時、 薬剤等の別、濃度、投入量、攪 拌方法等）	
④漏洩等の事故以降の天候状態	
⑤その他収去試料に関する重要な 事項	
4. 収去場所施設名、位置、見取図、 写真	
5. 収去試料の量	
6. 立入検査員氏名	

^{*4} 様式内に記載出来ない場合は適宜別紙を利用する。

別紙 2

微生物種に分類による「第 6 章 生菌の検出」における培養条件及び「第 7 章 PCR による検出」での PCR 反応条件

- ・ 選択培地で使用している培地組成については、別紙 3 を参照する。
- ・ 選択培地に使用する各抗生物質等のオートクレーブによる滅菌を行えない添加試薬については、0.22 μm フィルターにより滅菌する。
- ・ 培養期間は目安であり、コロニーの直径が 1 mm 程度になるまで適宜時間を調整する
- ・ コロニーの目視で確認できる特徴がある場合は、コロニーの差異が判断可能となるまで適宜培養時間を調整する。
- ・ PCR 反応に使用する Taq DNA ポリメラーゼは、増幅が認められるものであれば、いずれの市販の酵素であっても使用することができる。(以下で記載している酵素は、NITE での検証実験に使用したものであり、当該試薬を限定するものではない。)
- ・ PCR 反応液の調整は、使用する Taq DNA ポリメラーゼに付属している推奨方法に準ずるものとする。
- ・ PCR 反応条件は、宿主同定のための 16S rDNA 若しくは 26S(28S) rDNA 等の設定条件であるため、ベクターや挿入 DNA では事前調査により判明した産物長や設計プライマーの Tm 値により必要に応じて反応条件を調整する。

A. 大腸菌を宿主とした遺伝子組換え微生物

A.1 選択培地

マッコンキー寒天培地

※時間と共に他の菌体も赤くなり、更に、大腸菌のコロニーも平たくなるので長期間の培養はしないこと。

A.2 培養条件

培養温度：37 °C

培養期間：15 時間

A.3 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

PCR 反応で推奨される Taq DNA ポリメラーゼ：KOD FX Neo (TOYOBO)

PCR 反応条件：

98 °C	10 s	} 40 サイクル
55 °C	30 s	
68 °C	1 m	

B. *Bacillus* 属・*Brevibacillus* 属を宿主とした遺伝子組換え微生物

B.1 選択培地

NBRC Medium No.802 に以下を添加

ポリミキシシン B 50 $\mu\text{g/mL}$

シクロヘキシミド 50 $\mu\text{g/mL}$

抗生物質（濃度等は調整） 50 $\mu\text{g/mL}$

B.2 培養条件

培養温度：30 °C

培養期間：1 日

B.3 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

PCR 反応で推奨されるポリメラーゼ：KOD FX Neo (TOYOBO)

PCR 反応条件：

98 °C	10 s	} 40 サイクル
55 °C	30 s	
68 °C	1 m	

C. グラム陰性細菌（大腸菌以外）を宿主とした遺伝子組換え微生物

C.1 選択培地

NBRC Medium No.802 に以下を添加

シクロヘキシミド 50 µg/mL

抗生物質（濃度等は調整） 50 µg/mL

C.2 培養条件

培養温度：30 °C

培養期間：1 日

C.3 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

PCR 反応で推奨されるポリメラーゼ：KOD FX Neo (TOYOBO)

PCR 反応条件：

98 °C	10 s	} 40 サイクル
55 °C	30 s	
68 °C	1 m	

D. グラム陽性細菌（*Bacillus* 属・*Brevibacillus* 属以外）及び放線菌（コリネ型）を宿主とした遺伝子組換え微生物

D.1 選択培地

NBRC Medium No.802 に以下を添加

ポリミキシシン B 50 µg/mL

シクロヘキシミド 50 µg/mL

抗生物質（濃度等は調整） 50 µg/mL

D.2 培養条件

培養温度：28 °C

培養期間：1-2 日

D.3 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

PCR 反応で推奨されるポリメラーゼ：KOD FX Neo (TOYOBO)

PCR 反応条件：

98 °C	10 s	} 40 サイクル
55 °C	30 s	
68 °C	1 m	

E. 放線菌（孢子形成をする）を宿主とした遺伝子組換え微生物

E.1 選択培地

原則として以下の腐植酸-ビタミン(HV) 寒天培地を利用する。

HV 寒天培地^{*5}

ナリジクス酸 20 µg/mL

シクロヘキシミド 50 µg/mL

抗生物質（濃度等は調整） 50 µg/mL

E.2 培養条件

培養温度：28 °C

培養期間：10～14 日

E.3 孢子形成の促進方法（検出対象が孢子を形成する放線菌に限る）

前述の培養において、漏洩環境に由来すると思われるコロニーが多数出現するなどにより、検出対象の放線菌のピッキングが困難となる場合は、以下の処理も含めた培養を行う。第6章2. 各検出方法①の処理後、ガラスシャーレ等に収去土壌を広げ乗せ 3 日から 7 日間程度自然乾燥をさせた後、100 °Cで 1 時間の乾

^{*5} 乙黒美彩:”放線菌の分離と抗生物質の探索” 生物工学, 90, 8 (2012)

熱処理を行う。

＊) 自然乾燥により孢子の形成を促し、熱処理により孢子非形成の微生物を死滅させることを目的に行う。

E.4 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

PCR 反応で推奨されるポリメラーゼ : KOD FX Neo (TOYOBO)

PCR 反応条件 :

98 °C	10 s	} 40 サイクル
55 °C	30 s	
68 °C	1 m	

F. 酵母を宿主とした遺伝子組換え微生物

F.1 酵母を検出するための選択培地

YPD 培地

カナマイシン	50 µg/mL
クロラムフェニコール	50 µg/mL
抗生物質 (濃度等は調整)	50 µg/mL

嫌気培養においてもカビの増殖が認められる場合は、抗カビ剤 (0.2% プロピオン酸ナトリウム等) を培地に加えることによりカビの増殖を抑えることができる。

F.2 培養条件

培養温度 : 30 °C

培養期間 : 1~3 日

培養環境 : 嫌気培養 (嫌気培養用の角型ジャー容器あるいはチャック付き袋に入れ、脱酸素・炭酸ガス発生剤を入れ、素早く密閉する。)

F.3 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

PCR 反応で推奨されるポリメラーゼ : KOD FX Neo (TOYOBO)

PCR 反応条件 :

98 °C	10 s	} 40 サイクル
55 °C	30 s	
68 °C	1 m	

G. 糸状菌を宿主とした遺伝子組換え微生物

G.1 糸状菌を検出するための選択培地

原則として以下の NBRC No.1 培地、または市販の PDA 寒天培地を利用する。

通常 pH は、pH 5.6 で調整するが、検出対象が「遺伝子組換え *Aspergillus oryzae*」の場合は pH9.5 とすることで選択的な培養ができる場合がある。

ナリジクス酸	20 µg/mL
ジクロラン	2 µg/mL
ローズベンガル	35 µg/mL
抗生物質 (濃度等は調整)	50 µg/mL

ケカビなどの生育が早い糸状菌の抑制効果のある薬剤であるジクロラン、ローズベンガルを添加する。

G.2 培養条件

培養温度 : 28 °C

培養期間 : 10~14 日

G.3 生菌が確認されたコロニーの PCR 法による検出

PCR 反応で推奨されるポリメラーゼ : KOD FX Neo (TOYOBO)

PCR 反応条件 :

98 °C	10 s	} 40 サイクル
55 °C	30 s	
68 °C	1 m	

- ※ いずれの培養方法でも長時間培養することにより、他の菌が増殖してくる場合もあるため注意する。
- ※ 使用する抗生物質の期待される効果
 - ナリジクス酸：グラム陰性細菌の増殖を抑える。
 - ポリミキシン B：グラム陰性細菌の増殖を抑える。
 - シクロヘキシミド：真菌の増殖を抑える。
 - カナマイシン：細菌の増殖を抑える。
 - クロラムフェニコール：細菌の増殖を抑える。
 - プロピオン酸ナトリウム：糸状菌の増殖を抑える。
 - ジクロラン、ローズベンガル：菌糸の伸張を抑制する。

別紙 3

培地組成一覧

◆NBRC Medium No.802

ポリペプトン*	10.0 g
酵母エキス	2.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
蒸留水	1 L
寒天	15.0 g

pH7.0

* Bactopeptone で代替可

◆マッコンキー寒天培地

ペプトン	20.0 g
乳糖	10.0 g
胆汁酸	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ニュートラルレッド	0.075 g
蒸留水	1 L
寒天	12.0 g

◆HV 寒天培地 (Humic acid - vitamin agar)

1. 基礎培地

KCl	1.71 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
CaCO ₃	0.02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
Agar	18 g

先にオートクレーブ滅菌してある、2. を 10 ml 加え溶解後オートクレーブ滅菌する。

2. 腐植酸

腐植酸 (フミン酸)	10 g
0.8%NaOH 液	100 mL

加熱溶解後、オートクレーブ滅菌する。

3. HV 寒天培地の作成

1. を冷まして 60 °C程度になったら、フィルター滅菌した以下を加えシャーレに分注する。

Choline chloride	100 mg/L
D-Calcium pantothenate	100 mg/L
Folic Acid	100 mg/L
Nicotinamide	100 mg/L
Pyridoxal hydrochloride	100 mg/L
Riboflavin	10 mg/L
Thiamine hydrochloride	100 mg/L
i-Inositol	200 mg/L
Sodium Chloride (NaCl)	8500 mg/L

◆YPD 寒天培地

酵母エキス	10.0 g
ペプトン	20.0 g
グルコース	20.0 g
蒸留水	1 L
寒天	15.0 g

pH 無調整

◆PDA（ポテトデキストロース寒天培地）

原則として以下の NBRC No.1 培地、または市販の PDA 寒天培地を利用する。

ジャガイモ（男爵が望ましい） 200 g/L

スクロース 20 g/L

pH 5.6

（調整方法）

1. 皮を剥き 1 cm 角程度に切ったジャガイモ 200g を沸騰させた 1 L 蒸留水で 20 分煮る。
2. モスリン綿（帆布、あるいは3重にしたガーゼでも良い）で煮汁を濾過する。
3. 濾過した煮汁を 1 L になるよう蒸留水でメスアップし、スクロースと寒天粉を加え、攪拌・加熱して溶解する。pH を調製する。
4. オートクレーブで滅菌する。

別紙 4

プライマー一覧

(16S rDNA のPCR 増幅用)

プライマー名	塩基配列(5' to 3')
B10F	AGTTTGATCCTGGCTC
B350F	TACGGGAGGCAGCAG
B520F	GTGCCAGCAGCCGCGG
B800F	ATTAGATACCCTGGTA
B1100F	GCAACGAGCGCAACCC
B1400F	TGTACACACCGCCCGT
B120R	GTGTTACTCACCCGT
B350R	CTGCTGCCTCCCGTAG
B520R	ACCGCGCCTGCTGGC
B680R	TCTACGCATTTACC
B800R	CTACCAGGGTATCTAAT
B920R	GTCAATTCCTTTGAGTTT
B1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG
B1240R	CCATTGTAGCACGTGT
B1400R	ACGGGCGGTGTGTAC
B1500R	GGCTACCTTGTTACGA
B1540R	AAGGAGGTGATCCAGCC

(18S rDNA のPCR 増幅用)

プライマー名	塩基配列(5' to 3')
E21F	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT
E319F	CTGCCCTATCAACTT
E463F	GAGGTAGTGACAATA
E519F	ATTGGAATGAGTACA
E631F	TTAAAAAGCTCGTAG
E807F	ATTAGCATGGAATAA
E1387F	CTTCTTAGAGGGACT
E1576F	TCTTCAACGAGGAAT
E174R	ATGTATTAGCTCTAG
E322R	CGAAAGTTGATAGGG
E519R	GTACTCATTCCAAT
E583R	GAATTACCGCGGCTGCTG
E913R	CCAAGAATTTACCT
E1147R	CCGTCAATTCCTTTAAGTTT
E1239R	TCAATCTGTCAATCC
E1328R	TCTCGTTCGTTATCG
E1473R	CAGTGTAGCGCGCGT
E1641R	ACGGGCGGTGTGTAC
E1778R	AATGATCCTTCCGCAGGTTC

(スぺーサー領域の PCR 増幅用)

プライマー名	塩基配列(5' to 3')
ITS1F	GTAACAAGGT(T/C)TCCGT
ITS1R	CGTTCTTCATCGATG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL2	CTTGTTGCTATCGGTCTC
NL3	GAGACCGATAGCGAACAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

参考資料

- Ikeda, S., K.N.Watanabe, K.Minamisawa and N.Ytow.2004. Evaluation of Soil DNA from Arable Land in Japan Using a Modified Direct-extraction Method. Microbes Environ.19:301-309.
- Seishi Ikeda, Hirohito Tsurumaru, Satoshi Wakai, Chiaki Noritake, Keisuke, Fujishiro, Mariko Akasaka and Katsuhiko Ando.2008.Evaluation of the Effects of Different Additives in Improving the DNA Extraction Yield and Quality from Andosol. Microbes and Environ. 23:159-166.
- 医学細菌同定の手引き (1974) 坂崎利一、近代出版
- 環境省・土壤汚染対策法に係わる技術的事項及びダイオキシン類に係る土壤調査測定マニュアル
- 環境生物工学 (2002) 海野肇、松村正利、藤田幸一、片山新太、丹治保典、講談社
- 食品衛生試験法 微生物編 2015 (2015) 公益社団法人日本食品衛生協会
- 第十六改正日本薬局方
- 土壤・地下水汚染の浄化及び修復技術 (2008) 吉田隆、NTS
- 土壤学概論 (2001) 犬伏和之、安西徹郎編、朝倉書店
- 土壤微生物生態学 (2003) 堀越孝雄、二井一編、朝倉書店
- 日本細菌学会誌 (日本細菌学会講習会テキスト)
- 平成 8 年度バイオインダストリー安全確保対策調査 (微生物の分類・同定手法の検討)
- 微生物学実験法 (1999) 杉山純多、渡辺信、大和田紘一、黒岩常祥、高橋秀夫、徳田元編、講談社サイエンフィック
- 微生物実験マニュアル (1986) 協和発酵東京研究所編、講談社サイエンティフィック
- 微生物の分離法 (1986) 山里一英、宇田川俊一、児玉徹、森地敏樹編、R&D プランニング
- 微生物の分類・同定 (上・下) (1984,1985) 長谷川武治編、学術出版センター
- 微生物の分類同定実験法 (2001) 鈴木健一朗、平石明、横田明編、シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社
- 放線菌の分離と抗生物質の探索. 生物工学会誌 (2012) 90, 493-498.
- 乙黒美彩ら:”放線菌の分離と抗生物質の探索” 生物工学, 90, 8 (2012)

謝辞

これまで NITE ではカルタヘナ法に基づく立入検査における収去品の検査技術の調査のために、遺伝子組換え微生物の検出技術検討委員会を設置し、委員各位よりご助言をいただきながら調査実験を進めてきた。委員会の委員長である、藤田正憲博士（国立大学法人大阪大学名誉教授）はじめ委員の国立大学法人岐阜大学名誉教授 江崎孝行博士、国立大学法人東北大学大学院生命科学研究科教授 津田雅孝博士、国立研究開発法人産業技術総合研究所研究顧問 中村和憲博士、国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科教授 正木春彦博士、特定非営利活動法人バイオメディカルサイエンス研究会常任理事 前川秀彰博士に深謝致します。

製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター