

(別添)

組換えDNA技術応用食品の検査方法

1. 検体採取方法

1.1. 組換えDNA技術応用食品の検体採取

1.1.1. トウモロコシ及び大豆の穀粒の検体採取

組換えDNA技術応用食品が不均一に分布しているということを前提として、ロットを代表するような検体採取を行うため、対象となるロットの大きさ、荷姿、包装形態に応じて、以下に掲げる検体採取を行う。検体採取に際しては、他ロットの穀粒が混入しないよう十分配慮し、使用する器具・容器包装等は使い捨てのものを使用するか、その都度、十分に洗浄等を行い使用すること。

次に、検体採取した穀粒が均質になるよう十分に混合した後、この中から検査に必要な定量*を採り、粉砕器等を用いて均質に粉砕する。

*定量用の試料として用いるには、約500g必要である。

1.1.1.1. 袋積みの場合

以下の表に従って検体採取を行う。

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

1.1.1.2. ばら積みの場合

1.1.1.2.1. サイロ搬入時

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

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

1.1.1.2.2. はしけ搬入時

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

1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取

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

1.1.2. パパイアの検体採取

パパイアの検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行うこと。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量(個)	検体数
≦ 50	2	2	1
51 ~ 500	3	3	1
501 ~ 35,000	5	5	1
≧ 35,001	8	8	1

1.2. 加工食品の検体採取

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

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

検体採取については、1.1.1.1.袋積みの場合に従う。

1.2.2. それ以外の加工食品

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量 (g)	検体数	
			定性	定量
≦ 15	2	120	1	3
16 ~ 50	3	120	1	3
51 ~ 150	5	120	1	3
151 ~ 500	8	120	1	3
501 ~ 3,200	13	120	1	3
3,201 ~ 35,000	20	120	1	3
35,001 ~ 500,000	32	120	1	3
≧ 500,001	50	120	1	3

2. 安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法

2.1. 検査方法

2.1.1. トウモロコシ(CBH351)の検査

トウモロコシの穀粒については、ラテラルフロー法で行う。また、コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等、遺伝子組換えにより新たに発現されるタンパク質が物理化学的な変化を受けていない粉砕加工品(以下、「トウモロコシ半製品」という。)についても、ラテラルフロー法で行う。

その他のトウモロコシ加工品については定性 PCR 法で行う。

なお、トウモロコシ半製品については、ラテラルフロー法で行った後、定性 PCR 法による確認試験を行う。

2.1.1.1. トウモロコシ穀粒からの CBH351 トウモロコシの検知

2.1.1.1.1. ラテラルフロー法

市販の Test Kit は、Strategic Diagnostics 社(SDI)製 Trait✓Bt9 Corn Grain Test Kit を用いる方法である。以下に記述する方法は、キットの説明書に記載の方法と基本的に同一である。なお、実験室で実験を行う場合には、水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製した RO 水または蒸留水を用いることを推奨する。

2.1.1.1.1.1. 実験操作

採取したトウモロコシ穀粒から無作為に 400 粒を採取し粉砕した後、粉砕物*を 500 mL 容量程度の口の広い蓋付きの容器に採り、水 145 mL を加えたのち、10-20 秒間、試料が全て濡れるまでよく振とうする。もしこの段階で上澄み液が生じなければ、少量の水を加え、試料をよく振とうし、振とう後上澄み液が生じたどうか観察する。振とう後、数 mL 程度の上澄み液が生じるまで水を加える。次に、試料の上澄み液 0.5 mL をキット付属の 1.5 mL 容試料管に移し、Trait✓サンプル緩衝液 5 滴を加え、よく混合する。次に試料管に Trait✓Bt9 テストストリップを垂直に立てる。

*通常 115 g を量り採り粉砕したもの(115 g で 400 粒に満たないときは 400 粒の粉砕物。)

2.1.1.1.1.2 結果の判定

テストストリップを試料管に立て、10 分経過した時点*で、テストストリップの表示部を観察する。赤色のラインがテストストリップ表示部に 2 本現れれば陽性、コントロールラインだけが現れれば陰性と判定する。また、1 本も現れなければ、その試験は、無効と判定する。

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

2.1.1.2. トウモロコシ加工品からの CBH351 トウモロコシの検知

加工食品からの DNA の抽出精製法(2.2.3.)に従って、一試料につき 2 回並行で抽出を行い、得られた DNA 溶液を用い、以下の条件で定性 PCR を行う。

2.1.1.2.1. 定性 PCR

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

*PCR では、鋳型 DNA が微量存在しても増幅される。従って、目的外の DNA(特に PCR 増幅産物)の混入に特に注意を払う必要がある。また、DNA は、人間の皮膚表面から分泌されている DNA 分解酵素により分解されるので、本酵素の混入を防止しなければならない。これらの点を考慮し、使用するチューブ、チップは使い捨てとし、使用する直前に 121°C、20 分以上オートクレーブ滅菌したものをを用いる。また、定性 PCR の際用いる水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製した RO 水または蒸留水を Milli-Q 等で 17 M Ω/cm まで精製した超純水を 121°C、20 分以上オートクレーブで滅菌したものとする。

2.1.1.2.1.1. PCR 増幅

PCR 用反応試料管に反応液を以下のように調製する。反応液は、PCR 緩衝液*1、0.20 mmol/L dNTP、3 mmol/L 塩化マグネシウム、0.2 μ mol/L 5'及び 3'プライマー*2、及び 0.625 units Taq DNA ポリメラーゼ*3を含む液に、10 ng/mL に調製した DNA 試料液 2.5 μ L(DNA として 25 ng)を氷中で加え、全量を 25 μ Lにする。次に、その反応試料管を PCR 増幅装置*4 にセットする。反応条件は次の通りである。95°C に 10 分間保ち反応を開始させた後、95°C 0.5 分間、60°C 0.5 分間、72°C 0.5 分間を 1 サイクルとして、40 サイクルの PCR 増幅を行う。次に終了反応として 72°C で 7 分間保つた後、4°C で保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。PCR 反応のブランク反応液として、必ずプライマーを加えないもの並びに DNA 試料液を加えないものについても同時に調製する。また、試料から DNA が抽出されていることの確認として、各 DNA 試料液ごとに、CBH351 検出用プライマー対の代わりに陽性対照用プライマー対*5を用い、同様に PCR 増幅を行う。

*1 PCR 緩衝液

PCR buffer II (PE バイオシステムズ社製) 及び同等の結果が得られるものをを用いる。

*2 CBH351 検出用プライマー対は以下の通りである。

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

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

*3 Taq DNA ポリメラーゼ

AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (PE バイオシステムズ社製) 及び同等の結果が得られるものをを用いる。

*4 PCR 増幅装置

GeneAmp PCR System 9600 (パーキンエルマー社製) 及び同等の結果が得られるものをを用いる。

*5 陽性対照用のプライマー対は以下の通りである。

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

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

2.1.1.2.1.2. アガロースゲル電気泳動

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

2.1.1.2.1.2.1. アガロースゲルの作成

必要量のアガロースを秤量し、TAE 緩衝液*1を加え、加熱してアガロースを溶解する。次に 100 mL 当たり 5 μ L のエチジウムブロミド溶液(10 mg/mL)*2を加え*3、ゲルが 50°C 前後まで冷えたらゲルメーカーにゲルを流し込み、十分に室温で冷やし固めてゲルを作製する*3。ゲルはすぐに使用するのが望ましいが、緩衝液に浸して数日間保存することもできる。ゲルの濃度は泳動する DNA の長さに応じて決める必要があるため、泳動する目的産物のバンド長にあわせてゲル濃度(1.0 – 4.0%)を決める。

*1 TAE 緩衝液

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

*2 エチジウムブロミド

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

*3 前染色

ここでは、前染色法を述べる。この段階でエチジウムブロミド溶液を加えず、電気泳動終了後、2.1.1.2.1.2.3.に従って、ゲルを後染色しても良い。

2.1.1.2.1.2.2. 電気泳動

TAE 緩衝液を満たした電気泳動槽にゲルをセットする。PCR 増幅反応液 7.5 μ L と適当量のゲルローディング緩衝液を混ぜ合わせた後、ゲルの well に注入する。ゲルへの試料注入に時間がかかりすぎると、DNA が拡散し鮮明な結果が得られにくくなるので注意する。次に、100 V 定電圧で電気泳動を行い、ゲルローディング緩衝液に含まれる BTB がゲルの 1/2 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

2.1.1.2.1.2.3. ゲルの染色(後染色)

前染色を行った場合は本項の操作は必要ない。

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

2.1.1.2.1.3. ゲルイメージ解析

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

*食品包装用ラップ

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

2.1.1.2.1.4. 結果の判定

陽性対照プライマー対を用いたレーンで 157bp の PCR 増幅バンドが検出され、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで 170bp の PCR 増幅バンドがされた場合、新たに同一の DNA 試料液を用い PCR 反応液を調製し確認用プライマー対*を用い PCR 増幅を行う。得られた PCR 増幅反応液についてアガロースゲル電気泳動、ゲルイメージ解析を行い、171bp の増幅バンドが検知された場合、本検体は CBH351 陽性と判定する。なお、2 つの DNA 抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定する。また、どちらか一方の抽出液において対照プライマー対で予定長の増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降の操作を行い、それでも予定長の増幅バンドが検出されない場合には、その抽出液での結果を無効とし、もう一方抽出液の結果だけで判定する。2 つの DNA 抽出液とも対照プライマー対を用いたレーンで対応する増幅バンドが検出できない場合には、改めて 3 回目の抽出を行い、さらに PCR 以降の操作を実施して、判定を行う。3 回目の DNA 抽出液を用いた場合でも対照プライマー対で PCR 増幅バンドが検出されないときは、本試料からの未承認食品の検知は不能とする。以下に判定例を示す。

判定例

	試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
抽出1	対照プライマー	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	検出用プライマー	+	+	+	+	-	-	+	+	/
	確認用プライマー	+	+	+	+	/	-	-	-	/
抽出2	対照プライマー	+	+	+	-	+	-	+	-	-
	検出用プライマー	+	+	-	-	-	-	+	-	/
	確認用プライマー	+	-	/	/	/	/	-	/	/
判定		陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性	/

試料番号 9 の例の場合には、3 回目の抽出を行う。

*+ は陽性、- は陰性、/ は検査不要を表す。

*CBH351 確認用プライマー対は以下の通りである。

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

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

2.1.1.3 トウモロコシ半製品(コーングリッツ、コーンフラワー、コーンミール等)からの CBH351 トウモロコシの検知

試料について粉砕せず、そのまま 115 g 採る他は 2.1.1.1.1.ラテラルフロー法に従って行い、陽性の結果が得られたものについては、2.2.1.に従い 2 回並行で DNA を抽出し、DNA 試料液を用いてさらに 2.1.1.2.1.の定性 PCR を実施し、どちらかの抽出液由来の PCR 増幅液において、陽性対照プライマー対を用いたレーンで 157bp の PCR 増幅バンドが検出され、CBH351 検出用プライマー対を用いたレーンで 170bp の PCR 増幅バンドが検出された場合、陽性と判定する。

2.1.2. パパイヤ(55-1)の検知

生食用パパイヤ及び加工食品については、検出用として 207bp の増幅バンドが検出される 55-1 検出用プライマー対(NosC-5', CaMVN-3')並びに陽性対照用として 211bp の増幅バンドが検出される Papain プライマー対(papain-5', papain-3')を用いること及び、250bp の増幅バンドが検出される 55-1 確認用プライマー対(CaM 3-5', GUS n-3')が異なる他は 2.1.1.2.1.と

同様の方法で、定性 PCR を行う。

55-1 検出用プライマー対

F-primer (NosC-5') : 5'-TTA CGG CGA GTT CTG TTA GG-3'

R-primer (CaMVN-3') : 5'-CAT GTG CCT GAG AAA TAG GC-3'

Papain 遺伝子検出用プライマー対

F-primer (papain-5') : 5'-GGG CAT TCT CAG CTG TTG TA-3'

R-primer (papain-3') : 5'-CGA CAA TAA CGT TGC ACT CC-3'

55-1 確認用プライマー対

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

R-primer (GUS n-3') : 5'-TCG TTA AAA CTG CCT GGC AC-3'

2.1.3. New leaf Plus ジャガイモ (加工品を含む。) の検知

2.1.1.2.1. に準じた方法で定性 PCR を行う。New leaf Plus 検知プライマー対として 172bp の増幅バンドが検出される PLRV-rep 遺伝子検出用プライマー対、陽性対照用プライマー対として 216bp の増幅バンドが検出される Pss プライマー対 (ジャガイモに普遍的な Patatin 遺伝子を検知する) を用いる。確認試験としては、p-FMV 遺伝子検出用プライマー対を用いて同様の方法で定性 PCR を実施し、150bp の増幅バンドが検知されることで行う。

PLRV-rep 遺伝子検出用プライマー対

F プライマー (PLRV-rep1-5') : 5'-TCGTCATTA AACTTGACGAC-3'

R プライマー (PLRV-rep1-3') : 5'-CTTCTTTCACGGAGTTCAG-3'

Pss プライマー対 (Patatin 遺伝子検出用プライマー対)

F プライマー (Pss 01n-5') : 5'-TGA CCT GGA CAC CAC AGT TAT -3'

R プライマー (Pss 01n-3') : 5'-GTG GAT TTC AGG AGT TCT TCG A-3'

p-FMV 遺伝子検出用プライマー対

F プライマー (p-FMV04-5') : 5'-GTC AGG GTA CAG AGT CTC CA-3'

R プライマー (p-FMV04-3') : 5'-TGC CCA CTA ACT TTA AGT CT-3'

2.2. DNA 抽出精製法

DNA の抽出精製の際用いる水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製した RO 水または蒸留水を Milli-Q 等で 17. M Ω/cm まで精製した超純水を 121°C、20 分以上オートクレーブで滅菌したものとする。

2.2.1. トウモロコシ及び大豆穀粒からの DNA 抽出精製

界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) とフェノール/クロロホルム混合液を用いて抽出精製する CTAB 法は、応用範囲が広い上、PCR 阻害物質が残りにくく、純度の高い DNA を得ることが出来る非常に優れた方法であるが、フェノール、クロロホルム、という有害試薬を用いること及び煩雑な精製操作が必要という欠点がある。市販の DNA 抽出キットを用いるとこれらの欠点を解消することが出来る。市販の DNA 抽出キットには、シリカゲル膜タイプのもの、シリカベースのレジンタイプのもの、イオン交換樹脂タイプのもの、マグネット吸着ビーズタイプの

ものがあるが、いずれの方法を利用しても、トウモロコシ、大豆等の穀粒から PCR に利用可能な DNA を抽出精製することができる。以上の点を考慮して、本項では、CTAB 法とシリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini)、シリカベースのレジンタイプのキット(Promega Wizard DNA Clean-Up System)を用いた精製を記す。

2.2.1.1. CTAB 法

均質に粉碎された試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管(50 mL容)に量り採り、CTAB緩衝液*1 15 mL を入れ、ホモゲナイザーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の縁とホモゲナイザーの先を洗浄するように CTAB緩衝液 30 mL を加え、転倒混和後 55°C で 30 分間放置する。次いで放置液を攪拌し、均質化した溶液 600 μ L をマイクロ遠沈管(1.5 mL容)に量り採る。次いで 500 μ L のフェノール/クロロホルム混合液*2 を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7500 x g で 15 分間室温遠心後、水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時中間層にさわらないように注意する。500 μ L クロロホルム/イソアミルアルコール混合液*3 を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7500 x g で 15 分間室温で遠心後、水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロピルアルコール(室温)を加え、転倒混和後 7500 x g で 10 分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。500 μ L の 70% エタノールを壁面から静かに加え、ピペットで上清を除去した後、7500 x g で 1 分間室温遠心し、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3 分間真空乾燥する。このとき完全に乾燥しないように注意する。50 μ L の TE 緩衝液*4 を加えてよく混和後、室温に 15 分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5 μ L を加え、37°C で 30 分間放置する。200 μ L の CTAB 緩衝液を加えた後、250 μ L のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7500 x g で 15 分間室温遠心後、水層(上層)を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時、中間層にさわらないように採取する。200 μ L のイソプロピルアルコールを加え、転倒混和してから、7500 x g で 10 分間、室温で遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。次いで、200 μ L の 70% エタノールを壁面から静かに加え、ピペットで上清を除去した後、7500 x g で 1 分間室温遠心し、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3 分間真空乾燥する。この時、完全に乾燥しないよう注意する。50 μ L の水を加えて混合した後、15 分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものを DNA 試料原液とする。

*1 CTAB 緩衝液

ビーカーに、0.5 M EDTA (pH 8.0) 8 mL、1 M Tris / 塩酸 (pH 8.0) 20 mL、5 mol/L 食塩水 56 mL を入れ、約 150 mL となるように水を加え、攪拌しながらセチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB) 4 g を加えて完全に溶解する。さらに水を加え全量を 200 mL とし、オートクレーブで滅菌したものを CTAB 緩衝液とする。

*2 フェノール/クロロホルム混合液

1 mol/L Tris/塩酸 (pH 8.0) 飽和フェノールとクロロホルム/イソアミルアルコールを 1:1 (v/v) で混合したものをフェノール/クロロホルム混合液とする。

*3 クロロホルム/イソアミルアルコール混合液

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

*4 TE 緩衝液

各最終濃度が10 mmol/L Tris/塩酸(pH 8.0)、1 mmol/L EDTA(pH 8.0)となるように水を用いて調製したものをTE 緩衝液とする。

2.2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法

均質に粉碎された試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、予め 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 10 mL と RNase A 20 μ L を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで激しく混合し、65°C で 15 分間放置する。その間 2, 3 回、遠沈管を反転させて試料を攪拌する。AP2 緩衝液 3250 μ L を加え、氷上に 5 分間放置した後、3000 x g 以上で 5 分遠心する。次いでその上清 500 μ L を QIAshredder spin column に負荷し、10000 x g 以上で 4 分遠心する。溶出液をマイクロ遠沈管(2 mL 容)に移し、1.5 倍量の AP3 緩衝液・エタノール混液*1を加え、500 μ L を mini spin column に負荷し、10000 x g 以上で 1 分間遠心する。残りの混合液のうち、さらに 500 μ L を同じ Mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液が全てなくなるまで同様の操作を繰り返す。次いで AW 緩衝液 500 μ L を負荷し、10000 x g 以上で 1 分間遠心し、溶出液を捨てもう一度 AW 緩衝液を加え、同様の操作を繰り返す。溶出液を捨て、mini spin column を乾燥させるため、10000 x g 以上で 15 分間遠心する。mini spin column をキットの遠沈管に移し、予め温めておいた水 70 μ L を加え、5 分間放置した後、10000 x g 以上で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

*1 AP3 緩衝液・エタノール混液

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

2.2.1.3. シリカベースレジンタイプキット法

均質に粉碎された試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、抽出用緩衝液*1 17.2 mL、5 mol/L グアニジン-塩酸 2 mL 及び、20 mg/mL Proteinase K を 0.8 mL 加え、激しくボルテックスミキサーで攪拌後、55-60°C で振とうしながら 3 時間保温する。次いで、室温まで温度を下げ、3000 x g で 10 分間遠心する。上清が濁っている場合、上清の一部をマイクロ遠沈管(1.5 mL 容)に移し、さらに 14000 x g で 10 分間遠心する。得られた澄明な上清 500 μ L と、DNA Clean-Up Resin を 1 mL をマイクロ遠沈管(1.5 mL 容)に採り、転倒混和し、混合液とする。次に mini column の上部に注射筒を付け、マニホールド(吸引装置)*2 に装着する。マニホールドのコックが閉じていることを確認した後、混合液を注射筒から mini column に負荷する。コックを開け、減圧吸引して溶液を完全に除去し、次いで 2 mL の 80% イソプロピルアルコールを注射筒から加えカラムを洗浄する。注射筒を外した mini column をマイクロ遠沈管(1.5 mL 容)に装着し、室温下 10000 x g で 2 分間遠心し、カラムを乾燥させる。次に mini column を新しいマイクロ遠沈管(1.5 mL 容)に移し、予め 65-70°C に温めておいた水 50 μ L を滴下する。1 分間放置後、室温下 10000 x g 以上で 1 分間遠心し、DNA を溶出し、得られた溶出液を DNA 試料原液とする。

*1 抽出用緩衝液

150 mM 塩化ナトリウム、2 mmol/L EDTA、1% SDS を含む 10 mmol/L Tris-塩酸緩衝液(pH 7.5)

*2 吸引装置

吸引装置がない場合には、遠心等で同様の結果が得られる。

2.2.2. パパイヤからの DNA 抽出精製

採取したパパイヤから種子を除いた果肉部分をおよそ 10 mm 角に切り出し、凍結乾燥を行う。次にミキサーミル等でこれらを混合し、粉砕する。粉砕試料を用い、以下の CTAB 法または、シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini) を用いた方法に従って DNA を抽出精製する。

2.2.2.1. CTAB 法

粉砕試料 20 mg をマイクロ遠沈管 (1.5 mL 容) に量り採り、CTAB 緩衝液 150 μ L を入れ、マイクロミキサーで組織が見えなくなるまで均一化する。遠沈管の先を洗浄するように CTAB 緩衝液 450 μ L を加え、転倒混和してから 55 $^{\circ}$ C で 30 分間放置する。500 μ L のフェノール/クロロホルム混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7500 x g で 15 分間室温遠心後、水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時中間層にさわらないように注意する。500 μ L クロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7500 x g で 15 分間室温遠心後、水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。等容量のイソプロピルアルコール (室温) を加え、転倒混和後 7500 x g で 10 分間室温遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨てる。500 μ L の 70% エタノールを壁面から静かに加え、ピペットで上清を除去した後、7500 x g で 1 分間室温遠心し、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3 分間真空乾燥する。このとき完全に乾燥しないように注意する。50 μ L の TE 緩衝液を加えてよく混和後、室温に 15 分間放置して、時々転倒混和して完全に溶かす。RNase A 5 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間放置する。200 μ L の CTAB 緩衝液を加えた後に、250 μ L のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、転倒混和後ミキサーで軽く懸濁し、7500 x g で 15 分間室温遠心後、水層 (上層) を新しいマイクロ遠沈管に移す。この時、中間層にさわらないように採取する。200 μ L のイソプロピルアルコールを加え、転倒混和してから、7500 x g で 10 分間、室温で遠心し、デカンテーションで上澄み液を捨て、ピペットでイソプロピルアルコールを捨てる。次いで、200 μ L の 70% エタノールを壁面から静かに加え、ピペットで上清を除去した後、7500 x g で 1 分間室温遠心し、沈殿にさわらないようにできる限りエタノールを吸い取り捨てる。その後、2~3 分間真空乾燥する。この時、完全に乾燥しないよう注意する。50 μ L の水を加えて混合した後、15 分間室温に放置して、時々転倒混和して完全に溶解したものを DNA 試料原液とする。

2.2.2.2. シリカゲル膜タイプキット法

粉砕試料 80 mg をマイクロ遠沈管 (2 mL 容) に量り採り、シリカゲル膜タイプのキット (QIAGEN DNeasy Plant Mini) を用い、以下の方法に従って DNA を抽出精製する。

試料に予め 65 $^{\circ}$ C に温めておいた AP1 緩衝液 400 μ L とキット付属の Rnase A 4 μ L を加え、試料塊がないようホモジナイザーを用いて混合し、65 $^{\circ}$ C で 15 分間放置する。その間数回遠沈管を反転させ試料を攪拌する。その後 AP2 緩衝液 130 μ L を加え、氷上に 5 分放置後、室温下 10000 x g で 5 分間遠心する。上清を QIAshredder spin column に負荷し、室温下 10000 x g で 2 分間遠心し、溶出液をマイクロ遠沈管 (2 mL 容) に移す。遠沈管に、1.5 倍量の AP3 緩衝液・エタノール混液を加え、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、得られた混合液のうち 500 μ L を、Mini spin column に負荷し、室温下 10000 x g で 5 分間遠心し*、溶出液を捨てる。次いで、残りの混合液のうち、さらに 500 μ L を同じ Mini spin column に負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に混合液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。

次いで、column に AW 緩衝液 500 μ L を加え、室温下 10000 x g で 5 分間遠心し、溶出液を捨て、もう一度 AW 緩衝液を加え、同じ操作を繰り返す。溶出液を捨て、Mini spin column を乾燥させるため、10000 x g 以上で 15 分間遠心する。Mini spin column をキットの遠沈管に移し、予め温めておいた水 50 μ L を加え、5 分間放置した後、10000 x g で 1 分間遠心し DNA を溶出する。もう一度水を加え、同様の操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA 試料原液とする。

* 混合液中に析出物が有る場合 column が詰まり易くなる。その場合、完全に溶出させるため遠心時間を 10 分程度まで延ばす。

2.2.3. 加工食品からの DNA の抽出精製

平成 12 年農林水産省告示第 517 号第 3 条に規定する別表 2 の加工食品からの DNA の抽出精製は、農林水産省農林水産消費技術センターが作成した JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル個別品目編」に記載されている方法を準用する。タコス及びトルティーヤ(加熱加工されているものに限る。)、ジャガイモ(加工品を含む。)並びに缶詰のパイヤからの DNA の抽出精製は以下の手法で行う。

2.2.3.1. タコス及びトルティーヤ(加熱加工されているものに限る。)からの DNA の抽出精製

試料を凍結乾燥した後、ミキサーミルなどで粉碎する。次いで粉碎試料 1 g をポリプロピレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採り、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip)を用い以下のように DNA を抽出精製する。

試料に G2 緩衝液*1 4 mL を加えて、ポルテックスミキサーなどで激しく混合し、さらに G2 緩衝液 4 mL、Proteinase K*2 100 μ L と RNase A 10 μ L を加えて、よく振って混合した後、50°C で 2 時間放置する。その間 2, 3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、3000 x g 以上で、低温下(4°C) 15 分遠心し、得られた上清をポリプロピレン製遠沈管(15 mL 容)に移し、さらに軽く遠心する。次いで、QBT 緩衝液*1 1 mL を用い平衡化した QIAGEN Genomic-tip 20/G に 2 mL ずつ数回に分けて負荷する。次いで、tip を QC 緩衝液*1 で 2 mL ずつ 3 回洗浄した後、tip を新しい遠沈管に移し、予め 50°C に温めておいた QF 緩衝液*1 を 1 mL ずつ 2 回加え、DNA を溶出する。溶出液を遠沈管に移し、0.7 倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、10000 x g 以上で、低温下(4°C)、15 分遠心し、上清を捨てた後、70%エタノール 1 mL を加え、さらに 10000 x g 以上で、低温下(4°C) 5 分遠心する。さらに上清を捨て、残った沈殿をアスピレーターを用い乾燥させた後、水 100 μ L を加え、65°C で 5 分間放置し、ピペティングにより DNA を溶解させ、DNA 試料原液とする。

*1 G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液、及び QF 緩衝液はキットに付属しているが、足りない場合にはキットの説明書に従って調製可能である。

*2 QIAGEN 社のものまたは、同等の効力を持つものを用いる。

2.2.3.2. ジャガイモ(加工品を含む。)からの DNA の抽出精製

試料をミキサーミルなどにより粉碎した後、粉碎試料 2 g をポリプロピレン製遠沈管(50 mL 容)に量り採る。試料中に水分が多い場合は 8000 x g で 15 分遠心し、上清を捨てる。次いでシリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini)を用い、以下の様に DNA を抽出精製する。

試料に予め 65°C に温めておいた AP1 緩衝液 1.2 mL と RNase A 10 μ L を加え、試料塊が

ないようボルテックスミキサーで激しく混合し、65°Cで15分間放置する。その間数回遠沈管を反転させサンプルを攪拌する。その後AP2緩衝液400 μ Lを加え、氷上に5分放置後、室温下10000 \times gで5分間遠心する。上清を別の遠沈管に移し、その内500 μ LをQIAshredder spin columnに負荷し、10000 \times g、2分間、室温で遠心し、溶出液をキットの遠沈管に移す。これを全量終えるまで数回繰り返す。得られた溶出液のうち半量を別なマイクロ遠沈管(2 mL容)に移し、それぞれの遠沈管に、1.5倍量のAP3緩衝液・エタノール混液を加え、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、溶解液を得る。得られた溶解液のうち500 μ Lを、Mini spin columnに負荷し、室温下10000 \times gで1分間遠心し、溶出液を捨てる。次いで残りの溶解液のうち、さらに500 μ Lを同じMini spin columnに負荷し、同条件で遠心し溶出液を捨てる。最終的に溶解液がすべてなくなるまで同様の操作を繰り返す。

次いで、columnにAW緩衝液500 μ Lを加え、室温下10000 \times gで1分間遠心し、溶出液を捨てもう一度AW緩衝液を加え、同じ操作を繰り返す。溶出液を捨てた後、Mini spin columnを乾燥させるため、10000 \times g以上で15分間遠心する。Mini spin columnをキットの遠沈管に移し、予め温めておいた水50 μ Lを加え、5分間放置した後、室温下10000 \times gで1分間遠心しDNAを溶出する。もう一度水を加え、同じ操作を行い、得られた溶出液を合わせ、DNA試料原液とする。

2.2.3.3. 缶詰のパパイヤからのDNAの抽出精製

試料を水でよく洗浄し、凍結乾燥した後、ミキサーミルなどで粉碎する。次いで粉碎試料2gをポリプロピレン製遠沈管(50 mL容)に量り採り、イオン交換樹脂タイプのDNA抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip)を用い以下のようにDNAを抽出精製する。

試料にG2緩衝液7.5 mLを加えて、ボルテックスミキサーなどで激しく混合し、さらにG2緩衝液7.5 mL、QIAGEN Proteinase K 200 μ LとRnase A 10 μ Lを加えて、よく振って混合した後、50°Cで2時間放置する。その間2, 3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、3000 \times g以上で、低温下(4°C)15分遠心し、得られた上清をポリプロピレン製遠沈管(15 mL容)に移し、さらに軽く遠心する。次いで、QBT緩衝液1 mLを用い平衡化したQIAGEN Genomic-tip 20/Gに2 mLずつ数回に分けて負荷する。次いで、tipをQC緩衝液で2 mLずつ3回洗浄した後、tipを新しい遠沈管に移し、予め50°Cに温めておいたQF緩衝液を1 mLずつ2回加え、DNAを溶出する。溶出液を遠沈管に移し、0.7倍量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、10000 \times g以上で、低温下(4°C)15分遠心し、上清を捨てた後、70%エタノール1 mLを加え、さらに10000 \times g以上で、低温下(4°C)5分遠心する。さらに上清を捨て、残った沈澱をアスピレーターを用い乾燥させた後、水100 μ Lを加え、65°Cで5分間放置し、ピペティングによりDNAを溶解させ、DNA試料原液とする。

2.2.4. DNA試料原液中のDNAの純度の確認並びにDNA試料液の調製と保存

DNA試料の適当量を取りTE緩衝液で10倍希釈して200?300 nmの範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、260 nm及び280 nmの吸光度(O.D. 260及びO.D. 280*)を記録する。次いでO.D. 260の値1を50 ng/ μ L DNAとしてDNA濃度を算出する。またO.D. 260/O.D. 280を計算する。この比が1.7?2.0になれば、DNAが十分に精製されていることを示す。得られたDNA濃度から、DNA試料原液を以後のPCRに必要な濃度に水で希釈しDNA試料液とし、20 μ Lごとにマイクロ試料管に分注し、-20°C以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度がPCRで規定された濃度に達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

*O.D. 260 が DNA 由来の吸光度、O.D. 280 がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

3. 安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法

3.1. 大豆

3.1.1. ELISA 法

試料中の CP4EPSPS タンパク質を検知する手法である。100 mesh (編み目の一目の長さ 150 μ m) の篩いを通過した粉末試料 0.5 g を用いて、SDI 社製 GMO Soya Test Kit の説明書に記載された手法に従って試験する。以下に方法について記述する。

試料または標準品 0.5 g をポリプロピレン製遠沈管 (15 mL 容) に正確に量り採り、Soya Extraction 緩衝液 4.5 mL を加え、ボルテックスミキサーを用い 10 秒間混合した後、2500 x g で 5 分間遠心し、上清を抽出液とする。Soya Assay 緩衝液 280 μ L に抽出液 20 μ L を加え攪拌し希釈液とする。更に、Soya Assay 緩衝液 380 μ L に希釈液 20 μ L を加え攪拌し、試料液とする。このキットで作成できる検量線の範囲は 0 - 2.5% であるので、未知検体の抽出液について検量線の範囲内で定量値が内挿できるよう、別に更に 10 倍希釈した試料液も準備しておく。Well に試料液を 100 μ L ずつ加え、37°C で 1 時間保温する。その後、Wash 緩衝液で 3 回洗浄し、Reconstituted and Diluted Soya Conjugate Mix 100 μ L を加え、37°C で 1 時間保温する。さらに Wash 緩衝液で 3 回洗浄する。次に、Color Reagent 100 μ L を加え、室温で 10 分間放置した後、Stop Solution 100 μ L を加えて反応を停止する。反応停止後、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の波長で well の吸光度を測定し、キット添付の標準試料を用い作成した検量線より組換え体の含有量を求める。なお、同一の実験を 2 well で行い、得られた値を平均する。

3.1.2. 定量 PCR 法

TaqMan Chemistry を利用した定量 PCR 法を行う。同法では、両プライマー対間の DNA 配列にアニールするリポーター、クエンチャー 両色素を結合した蛍光オリゴヌクレオチドプローブを使用する。同プローブが、DNA ポリメラーゼの 5'ヌクレアーゼ活性により加水分解されると、リポーター色素がクエンチャー色素から分離し、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する。従って、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、元の DNA 量が求められる。組換え DNA 技術応用食品の定量は、非組み換え体に普遍的に存在する遺伝子を内標として用い、内標に対する組換え遺伝子量を求めることで行う。大豆においては、大豆に普遍的に存在するレクチン遺伝子を内標とし、レクチン遺伝子を認識するプライマー対 (Le1-n02) とプローブ (Le1-Taq) を使用し定量 PCR を行い、DNA 試料中のレクチン遺伝子のコピー数を求める。同時に、同一試料について、組換え遺伝子を認識するプライマー対 (RRS-01) とプローブ (RRS-Taq) を使用し別に定量 PCR を行い、得られた試料中の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レクチン遺伝子のコピー数で除し、その値を予め求められている係数 (内標比*) 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 % 含量となる。以下に定量 PCR の実際を述べる。なお、5.1.2.並びに5.2.2.定量 PCR 法で用いる水は、特に断り書きがないかぎり全て逆浸透膜精製した RO 水または蒸留水を Milli-Q 等で 17 M Ω /cm まで精製した超純水を 121°C、20 分以上オートクレーブで滅菌したものとする。

*内標比: 種子を用い、定められた定量 PCR 反応で検出される種子中の内標遺伝子 (大豆の場合)

合レクチン遺伝子)数に対する対象組換え遺伝子数の比の値を求めたもの。各プライマー対及びプローブを用いた際の内標比は別に規定する。

3.1.2.1. 検量線用標準液の作成

予めコピー数が判明している GM プラスミド DNA 溶液を用意し、サケ精子 DNA 溶液(5 ng / μ L)を用い、2.5 μ L 中にプラスミド DNA が検量線を作成するに適当な一定量(例えば 10, 125, 1,500, 20,000, 250,000 コピー数)になるよう希釈する*1。得られた希釈液を検量線用標準液とする。

*1 DNA 溶液の希釈

DNA が微量非特異的に遠沈管壁面に吸着する影響を避ける目的で、サケ精子 DNA 溶液を用い希釈する。

3.1.2.2. PCR 用反応液の調製

PCR 用反応液 25 μ L の組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix *1 12.5 μ L、対象プライマー 0.5 μ mol/L (12.5 pmol)、対象プローブ 0.2 μ mol/L (5 pmol)、20 ng / μ L DNA 試料液 2.5 μ L (50 ng)、または検量線用標準液 2.5 μ L、あるいは 5 ng / μ L サケ精子 DNA 溶液(ブランク試料液) 2.5 μ L。PCR 反応で生じる誤差を減少させるため、1 DNA 試料液あたり 3 回分(3 well)の PCR 用反応液を調製する*2。

予め Universal PCR Master Mix に対象プライマー、対象プローブを加えた溶液(マスターミックス)を実験に必要な量より多少多めに用意しておき、マスターミックスと各 DNA 試料またはブランク試料液を別な遠沈管で混合し、この混合液をさらにプレート上の各 well に 25 μ L ずつ分注する。分注が終了したら真上からプレートのふたをする。この時、片側に歪みがたまらないよう両側の well から交互に閉める。次に専用ローラーを用い完全に well を密閉する。最後に well の底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートのふちを軽く叩いて気泡を抜いておく。

*1 Universal PCR Master Mix

本液は粘性が高い。従って、同溶液を加えて混合する場合、混合が確実に行われるように注意を要する。不十分な場合には、PCR 反応がうまくいかない場合がある。従って、使う直前に 3 秒程度ボルテックス攪拌後、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と良い。また、well に分注するときは、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、well の底に確実に入れる。

*2 定量 PCR 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。氷上で保存した試薬につき、同一のチップを用い連続分注すると、ピペット内の空気が冷却されるため、2 回目以降、通常のピペット操作では正確に分注されないないので注意する。ピペットの説明書に書かれた、低温試料を扱う場合の操作法(通常、ふきとめと呼ばれる操作)を理解して使用すること。

3.1.2.3. 定量 PCR

ABI PRISM 7700 或いは、同 5700 を用いて行う。装置にプレートをセットし、装置のふたの温度(Cover temperature)が 105°C 付近になったことを確認したのち、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 分間保持の後、95°C で 10 分間保ち、ホットスタート法で反応を開始した後、95°C 30 秒 59°C 1 分を 1 サイクルとして、40 サイクルの増幅反

応。反応終了後、実験結果の解析を行う。

3.1.2.4. 検量線の作成

内標遺伝子並びに組換え遺伝子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(ΔR_n)をプロットした増幅曲線上で、検量線用標準液並びに 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 ΔR_n 部を選択し、threshold line (Th) を引く。この際、ブランク試料液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。Th の厳密な引き方は、農林水産省農林水産消費技術センターが作成した JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品の定量法について」に記載されている方法を準用する。Th と、検量線用標準液の蛍光シグナルが交差した点を threshold cycle (Ct) 値とする。次に各々の検量線用標準液のコピー数の対数值(x 軸)に対する Ct 値(y 軸)をプロットし、各 Ct に対して得られた近似直線を検量線とする。

3.1.2.5. 試料の組換え DNA 技術応用食品含有率の計算

未知 DNA 試料につき検量線作成で用いた Th を使用して Ct 値を求め、内標遺伝子並びに組換え遺伝子につき、それぞれ検量線から各 3 well とも初期遺伝子コピー数を内挿し、その値の平均を初期内標遺伝子コピー数及び初期組換え遺伝子コピー数とする。次に次式に従って、対象組換え DNA 技術応用食品含有率を求める。

対象組換え DNA 技術応用食品含有率(%) = [(初期組換え遺伝子コピー数 / (初期内標遺伝子コピー数 × 内標比))] × 100

大豆の場合、関係する組換え DNA 技術応用食品は RoundUp Ready Soybean のみであり、Le-1 と RRS 遺伝子のコピー数から算出された値は、組換え DNA 技術応用食品含有率を示している。

3.1.3. 結果の判定

分別生産流通管理試料につき 3 回の抽出を行い、ELISA 法又は、定量 PCR 法により得られた値の平均が 5% 以上の組換え DNA 技術応用食品含有率となった試料について、間違った分別生産流通管理が行われている可能性がある。

3.2. トウモロコシ

トウモロコシでは、異なった目的蛋白をもつ組換え品種が存在する上、同一の目的蛋白が発現する組換え品種であっても、組換え品種毎に蛋白の発現量が異なるため、多種の遺伝子組換え作物が混入している穀粒では、遺伝子組換え作物の含有率を求める目的で ELISA 法を用いることはできない。従って、定量 PCR でのみ分析が可能である。

3.2.1. 定量 PCR 法

上述のように、トウモロコシでは分析対象が複数品種存在するため、まず一次スクリーニングを実施し、得られた結果に基づきさらに品種毎の分別定量を行い、組換え品種毎の定量値を合計して、結果の判定を行う。なお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標遺伝子として、スターチシンターゼ IIb (SSIIB) 遺伝子を用い、同遺伝子を認識するプライマー対 SSIIB 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認識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大豆の場合と同様に算出し、3.1.2.5. で示した式に基づき対象遺伝子組換え作物含有率を求める。

3.2.1.1. スクリーニング

3.2.1.1.1. Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter が組み込まれた組換え品種の定量

組換え品種 Event 176、Bt 11、T25、Mon 810 は、全て Cauliflower mosaic virus 由来の 35S promoter (CaM) が組み込まれているため、同遺伝子含量を指標として、これらの品種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、プローブを除き大豆の定量 PCR 法で示された方法と同一である。内標遺伝子として、スターチシンターゼ IIb (SSIIb) 遺伝子を用い、同遺伝子を認識するプライマー対 SSIIb とプローブ SSIIb-Taq 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* であり、別に規定された内標比を用いて、最終的に CaM 遺伝子組み込み遺伝子組換え作物含有率を算出する。

*P35S-1 と P35S-Taq を用いた際の内標比は Mon 810 を対象として算出されたものを用いる。同品種は米国で最も作付け面積が広い組換え品種であること及び、組換え遺伝子中に 35S promoter が 1 コピーしか存在しないため、遺伝子組換え作物含有率を過小評価する可能性が低い。

3.2.1.1.2. GA21 の定量

組換え品種 GA21 は、CaM 遺伝子が組み込まれていない。従って、本品種の含有率を確認するため、CaM 遺伝子を分析するものと同じの DNA 試料液について、別に GA21 特異的なプライマー対 GA21-3 とプローブ GA21-Taq を用い、3.2.1.1.1. と同様の方法で GA21 遺伝子のコピー数を算出し、GA21 の含有率を求める。

3.2.1.1.3. 結果の判定

1 試料につき、1 回の抽出を行い、得られた DNA 試料液について定量 PCR 行った結果、CaM 遺伝子組み込み遺伝子組換え作物含有率に GA21 含有率を加えた値が 4.5% を越える場合、さらに、別に 2 回の抽出を行い、計 3 回の抽出より得られた DNA 試料液について、それぞれトウモロコシ組換え品種特異的定量を行う。

3.2.1.2. トウモロコシ組換え品種特異的定量

3.2.1.2.1. Event 176、Bt 11、T25、Mon 810 の定量

GA21 については、3.2.1.1.2. と同様の方法で行う。組換え品種 Event 176、Bt 11、T25 及び Mon 810 については、定量用プライマー対とプローブとして、それぞれ E176-2 と E176-Taq、Bt11-3 と Bt11-Taq、T25-1 と T25-Taq 及び M810-2 と M810-Taq を用い、3.2.1.1.1. と同様の方法で Event 176、Bt 11、T25、Mon 810 の各遺伝子のコピー数を算出し、Event 176、Bt 11、T25、Mon 810 の品種別含有率を求める。

3.2.2. 結果の判定

3.2.1.1.2. で得られた GA21、Event 176、Bt 11、T25、Mon 810 の含有率について、1DNA 試料液ずつ総和を算出し、それらの平均が 5% を越えた試料について、間違った分別生産流通管理が行われている可能性がある。

(参考)

- 1 2.2. DNA抽出精製法のうち、2.2.1.2.のシリカゲル膜タイプキット法に用いられる AP1 及び AP2 緩衝液及び RNase A は、キットに含まれるものとは別にキアゲン(〒104-0054 東京都中央区勝どき 3-13-1 Forefront Tower II. Tel. 03-5547-0811 Fax. 03-5547-0818)から購入可能である。

- 2 3. 安全性確認済の組換えDNA技術応用食品の検査方法のうち、3.1.2.1.検量線用標準液の作成に用いられる GM 標準プラスミド DNA は、ニッポンジーン(〒930-0982 富山市 問屋町 1-29. Tel. 076-451-6548 Fax. 076-451-6547)から購入可能である。

- 3 3. 安全性確認済の組換えDNA技術応用食品の検査方法のうち、3.1.2.2.PCR 用反応液の調製に用いられる対象プライマー、対象プローブは、ニッポンジーン、ファスマック(〒243 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。

平成12年度 厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究」

分担研究報告書

Ⅱ. 食品の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

1. 精度管理に必要な統計学的処理の手法に関する検討
2. 試薬・標準品等のリファレンス・センターに関する検討
3. 外部精度管理調査のための試料の作製法に関する研究
4. 精度管理調査方法の効率化に関する検討

Ⅱ. 食品の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究

- 1. 精度管理に必要な統計学的処理の手法に関する検討
- 2. 試薬・標準品等のリファレンス・センターに関する検討
- 3. 外部精度管理調査のための適切な試料の作製法に関する研究
- 4. 精度管理調査の効率化に関する検討

分担研究者 小野 宏（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長）
協力研究者 内山貞夫，福原克治，大島赴夫，川崎 勝
（財団法人食品薬品安全センター秦野研究所）
大隅 昇（文部省統計数理研究所 教授）

研究要旨

食品衛生検査の重要性に鑑み、検査の信頼性の確保のために食品衛生検査施設のGLP規制が実施され、検査体制の充実と精度管理の徹底が求められている。食品衛生検査の精度管理の実態を適切に把握するため、外部精度管理調査が必要である。この研究では外部精度管理調査の適正で実質的なあり方を検討し、調査を効率的に行うための諸問題を検討した。まず、(1) 検査結果の評価のために用いられる各種の統計学的手法の検討を、検査方法と評価指標の関連から再吟味を行った。次に、(2) 食品衛生検査のための適正な試薬や標準品の確保のためのリファレンス・センターの実現性を検討した。他の標準品頒布機関についてその実際を調査した。また(3) 外部精度管理調査試料の作製方法の検討を行い、要望の高い食材により近く、均質性と安定性の高い調査試料を作製すべく、試料の作製方法の検討を行った。理化学的検査用調査試料の作製法については、食材を中心に検討した結果、食品添加物では市販かまぼこ中のソルビン酸の均質性、重金属では清涼飲料水中鉛及びカドミウムの均質性と安定性、精白米へのカドミウムの浸漬法による均質性と安定性、農薬では果実酒中のフェンチオンとマラチオンの均質性と安定性が確認した。またマイクロペースト状の野菜を基材とした試料作製の可能性を検討した。細菌学的検査用調査試料においては細菌同定の試料作製について検討し、模擬食材としてグリセリン添加のマッシュポテトを培地とする大腸菌検査ならびにサルモネラ検査用調査試料として実用性が高いものを作製した。さらに、(4) 精度管理調査作業の効率化について検討し、調査参加施設の検査結果の電子通信を用いる方法での回収を検討し、地方衛生研究所などの10検査機関からの報告値連絡調査によってインターネットおよびE-mailを用いる報告の回収は技術的に充分可能であったが、機密保持に関する手順の確立が必要であると考えられた。調査試料輸送中の温度管理についての夏期における調査も行い、大きな問題がないことが明らかとなった。

II-1. 精度管理に必要な統計学的処理の手法に関する検討

大隅 昇 (文部科学省統計数理研究所調査実験解析研究系 教授)

研究要旨

食品の試験・分析における精度管理を行う上で必要となる統計的手法の適用可能性を検証すると共に、測定データ取得環境とデータ解析との関連において生じる諸事象について、統計科学の観点から検討を行った。

とくに本年度は、4年間にわたる食品衛生外部精度管理調査における測定データのうち、重金属添加物（カドミウム、鉛の2種）の継続的測定データを用いて、時系列的に取得された測定データの間に見られる特徴を統計的に検証分析した。

A. 研究目的

本研究の元来の目的は、外部精度管理調査で取得されるような、一般的なデータ測定環境における取得データを前提としたときに必要となる統計的データ解析の対応法や考慮すべき諸事項を、数値事例を通して検証することにある。

精度管理を議論する際に、測定データの取得環境・実験の計画の検討に始まり、具体的に取得した測定データの統計的データ解析を行うまでの一連の過程を一貫した流れの中で研究することが必要とされ、また要請されてきた。統計科学の見地から、食品衛生における精度管理にとって、いかなるデータ測定法やデータ解析法が有効であり、またそれらの適用可能性や限界を知ることがきわめて重要である。

本研究においては、既に数年にわたり、主として食品衛生外部精度管理調査における実測データを用いた検証を続けてきた。

たとえば、平成10年度実施の「食品衛生外部精度管理調査」（以下、「外部精度管理調

査」と言う）の報告書に報告された調査結果のうち、残留動物用医薬品調査で用いられたスルファジミジン測定データを例として、統計的データ処理を進める際の諸問題について考察した。

また、平成11年度実施の外部精度管理調査報告書に報告された調査結果のデータセットのうち、「保存料」調査で用いられたソルビン酸測定データを利用して、調査参加機関における検査法、検査経験年数ほか、測定結果に影響を及ぼすであろう特性要因に注目していくつかの仮説を設定し、これを統計学的見地から解析した。

外部精度管理調査も回を重ね、十分とはいえないまでも、収集データを時間軸にそって比較できる状況になりつつある。そこで、本年度は、継続的に取得されたデータのうち、比較的サンプル数も多く、また比較が容易と思われる重金属類の測定データに注目し、それらのデータを時系列的に観察したとき、どのような特徴があるかを検証した。