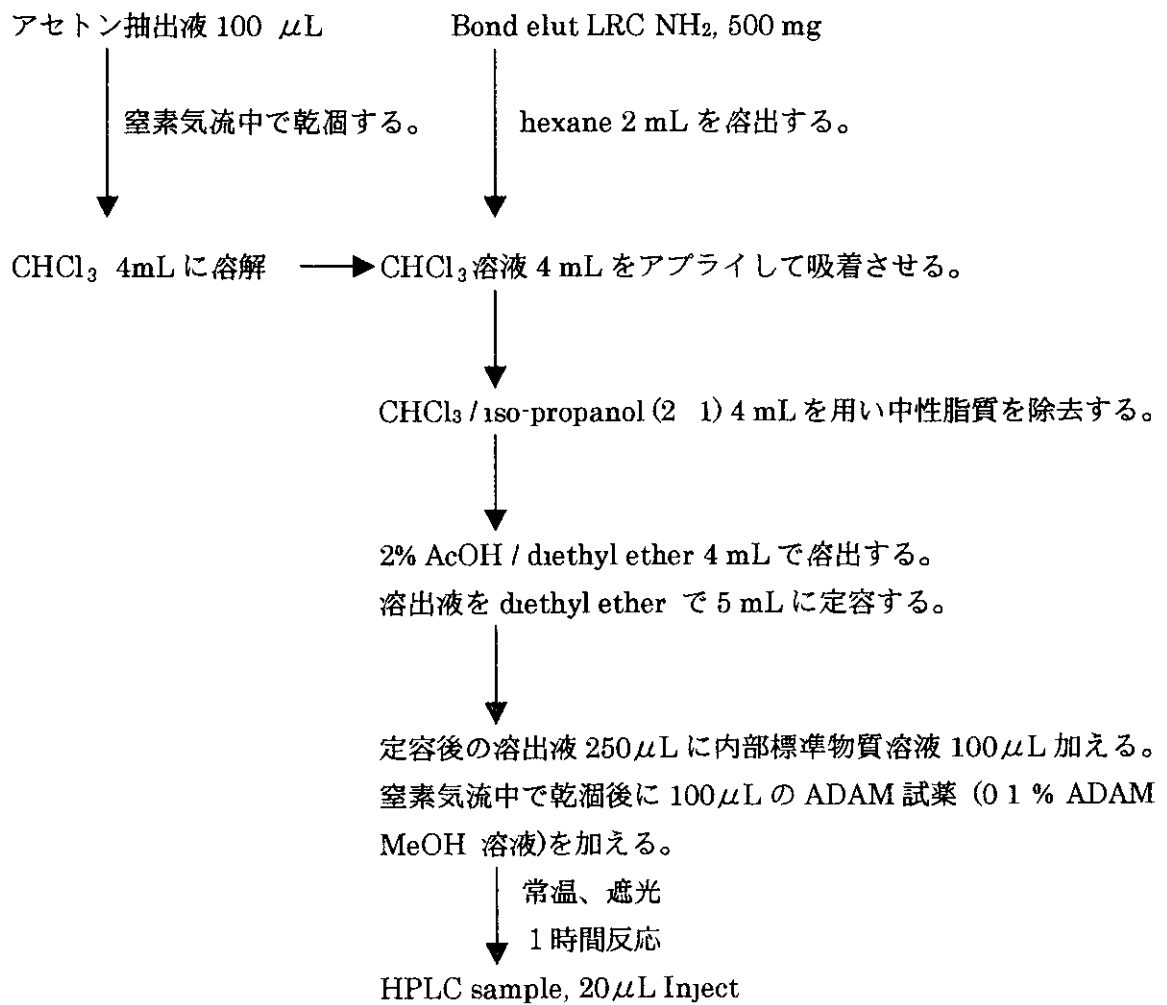


表1 各遊離脂肪酸の定量下限と相関係数及び保持時間

濃度 (μg/mL)	cis6,9,12,15 EPA octadeca tetraenoic acid	EPA C205	DHA C226	AA C204	palmitoleic acid, miristic acid	C161 C140	linoleic acid	C182	oleic acid, palmitic acid	C181 C160	stearic acid	C180	aracidic acid	C200
10	318890	371855	218600	461371	880983	297314	797273	343927	291095					
5	146803.28	201646.86	119369.86	241041.7	421700.05	145475.18	378435.1	168344.82	155214.97					
1	5037.7321	20382.548	23552.582	38761.585	79127.664	28558.73	73777.245	34021.8	13827.706					
0.5	7130.4449	13432.219		30844.567			24615.843	16445.566						
定量下限(μg/mL)	1	0.5	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.998	
保持時間(min)	31.6	37.253	40.858	44.485	46.618	48.048	55.45	64.389	74.864					



Scheme 1 固相抽出法を用いたアセトン抽出液からの遊離脂肪酸の精製操作

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と  
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

### 分担研究報告書

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および  
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究／食品衛生検査制度管理調査における  
適正調査試料作製と質向上に関する調査研究（その 6）

一食品衛生外部精度管理調査（遺伝子組換え食品）における調査結果  
および検査法の検討一

主任研究者	柳澤 健一郎	（財）食品薬品安全センター	理事長
分担研究者	松木 容彦	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 副所長
協力研究者	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所	食品部長
	穠山 浩	国立医薬品食品衛生研究所	食品第三室長
	渡邊 敬浩	国立医薬品食品衛生研究所	研究員
	笠間 菊子	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	鈴木 達也	（財）食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員

#### 研究要旨

安全性審査済みのダイズについて外部精度管理を実施した。各機関の測定値は ELISA 法ではほぼ混合重量比通りであり、測定精度も良好であった。定量 PCR 法では、DNA 抽出法によって測定値に差が生じることが明らかとなったほか、測定精度の悪い機関がいくつか認められた。また、配布試料の長期にわたる安定性を確認するため基礎的検討を行った結果、DNA の品質が定量 PCR 結果に影響することが明らかになった。

#### A 研究の目的

平成 13 年度より食品衛生外部精度管理調査の新たな調査項目として、遺伝子組換え食品検査を実施している。今年度は平成 14 年度分として予定していた安全性審査済みのダイズの外部精度管理を ELISA 法および定量 PCR 法により実施した。さらに外部精度管理における配布試料の長期にわたる安定性を確認するため、コピー数を測定する方法について基礎データの収集を行った。

#### B 研究方法

##### 1. ダイズ外部精度管理調査

国立食品医薬品衛生研究所にて作成された遺伝子組換えダイズ擬似混入試料（混合重量比 0%、1%、5%）を 35 機関に配布し、ELISA 法または定量 PCR 法により外部精度管理を行い、結果の集計を行った。

##### 2 配布試料の安定性確認のための基礎実験

国産ダイズ試料から「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 改訂第 2 版に」従って DNA を抽出

し、得られた DNA 溶液について 260nm および 280nm の吸光度を指標として DNA の純度および収量について検討した。さらにこの DNA について「厚生労働省通知 組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」に従って内在性遺伝子レクチンについて定量 PCR を行い、得られたコピー数から DNA 抽出の抽出間の再現性および抽出日による差、定量 PCR において試料を測定したときの同一ラン内の再現性および異なるラン間における再現性について検討した。

## C. 結果

### 1. ダイズ外部精度管理調査

ELISA 法に参加した 17 機関の測定値(平均±SD)は、混合重量比 1%、5%試料についてそれぞれ  $1\,058 \pm 0\,136$ 、 $5\,658 \pm 1\,033$  であった。この測定値は高濃度でやや高値を示したものの、混合重量比と近い測定結果であった。一方、定量 PCR 法に参加した 22 機関の測定値(平均±SD)は、混合重量比 1%、5%試料についてそれぞれ  $0\,696 \pm 0\,175$ 、 $3\,759 \pm 0\,671$  であり、低濃度、高濃度試料ともに重量混合比よりも低い測定結果となった。このように、ELISA 法と定量 PCR 法では乖離した測定値が得られることが明らかとなったため、精度管理における統計解析は測定法別に実施することとした。さらに、定量 PCR 法において DNA 抽出法ごとに測定値の集計を行ったところ、シリカゲル膜タイプキット法を用いた 18 機関ではそれぞれ  $0\,659 \pm 0\,157$ 、 $3\,533 \pm 0\,386$  であったのに対して、シリカゲル膜タイプキット法以外の抽出法を用いた 4 機関の測定値はそれぞれ  $0\,865 \pm 0\,166$ 、 $4\,778 \pm 0\,791$  と異なる測定値を示した。このため、定量 PCR 法についてはさらに DNA 抽出法ごとに解析を行うこととした。

混合重量比 1%および 5%の測定値につい

て、統計解析を行った結果、ELISA 法に参加した 17 機関の測定値のうち、z-スコアが 2 を超えたのは、1 機関の 1%濃度の 1 測定のみで、施設内の測定値のばらつきを示す R 管理図で管理限界を超えた機関も 1 測定、1 機関のみであった。定量 PCR 法ではシリカゲル膜タイプキット法により DNA 抽出を行った 18 機関では、z-スコアが 2 を超えたのは、1 機関の 1%濃度の 1 測定のみであったが、R 管理図で管理限界を超えた機関が 3 測定、3 機関あった。なお、定量 PCR 法でシリカゲル膜タイプキット法以外の方法により DNA 抽出を行った 4 機関については、例数が少ないため統計解析を行わなかった。

### 2. 配布試料の安定性確認のための基礎実験

ダイズ試料から「JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査 分析マニュアル 改訂第 2 版」に従い 2 日間にわたって  $n=8$  で DNA を抽出した。得られた DNA 溶液についてそれぞれ 260nm および 280nm の吸光度を測定し、DNA 純度の指標となる 260nm と 280nm の吸光度比および収量を求めた。結果は表 1 に示したが、1 日目と 2 日目の DNA 収量に日間差が認められた。

次いでこの DNA を  $20\text{ng}/\mu\text{L}$  に希釈後「厚生労働省通知 組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」に従って内在性遺伝子 Lel について定量 PCR を行い、検量線からコピー数を算出した。表 2 には、表 1 の No 8 の DNA について Lel について定量 PCR を  $n=5$  で 3 ラン繰り返した時の再現性について検討した結果を示した。 $n=5$  の測定の同一ラン内の RSD は 4.8~8.5%、またラン内の平均値の 3 ラン間の RSD は 10.0%であった。表 3 には 8 抽出の DNA について、 $n=1$  でそれぞれ 3 回 Lel について定量 PCR のランを行った結果を示した。それぞ

れの DNA の 3 ラン間 RSD は 0.6~6.7% とそれほど大きくなかったが、同一ラン内の 8 抽出の DNA 間の RSD は約 25% と変動が大きかった。また表には示さなかったが、このとき得られた Le1 コピー数に DNA 抽出日によって差が認められたため、抽出日ごとに同一ラン内の RSD を求めたところ、9.4~20.7% と幾分変動が小さくなった。

#### D E 考察・結論

ダイズ外部精度管理において ELISA 法の測定値は高濃度でやや高値を示したものの、混合重量比に近い測定結果であった。一方、定量 PCR 法では DNA 抽出法ごとに集計を行ったところ、シリカゲル膜タイプキット法を用いた機関の測定値が重量混合比よりも低い測定結果であったのに対して、これ以外の抽出法を用いた 4 機関の測定値はより混合重量比に近い測定値を示した。このことから定量 PCR 法では、DNA 抽出法が測定値に影響を与え、混合重量比よりも低い測定結果が示されたものと考えられた。このように ELISA 法と定量 PCR 法、さらに定量 PCR 法においては DNA 抽出法の違いによって乖離した測定値が得られることが明らかとなったため、精度管理における統計解析は測定法ごとに実施した。ELISA 法に参加した 17 機関の測定値のうち、z スコアが 2 をこえたのは、1 機関の 1% 濃度の 1 測定のみで、施設内の測定値のばらつきを示す R 管理図で管理限界を超えた機関も 1 測定、1 機関のみであり、各機関ともおおむね良好な測定精度を保っているものと考えられた。定量 PCR 法ではシリカゲル膜タイプキットにより DNA 抽出を行った 18 機関では、z スコアが 2 をこえたのは、1 機関の 1% 濃度の 1 測定のみであったが、R 管理図で管理限界を超えた機関が 3 測定、3 機関あり、測定の再現性が十分でない機関があることが明らかになった。

#### 2 配布試料の安定性確認のための基礎実験

抽出 No 8 の DNA について n=5 での定量 PCR 測定を 3 ラン繰り返した時の同一ラン内の RSD は 4.8~8.5%、またラン内の平均値の 3 ラン間の RSD は 10.0% であった。さらに、8 抽出の DNA についてそれぞれ n=1 で 3 ラン、定量 PCR を行ったときの同一試料のラン間の RSD も 0.6~6.7% であった。以上の結果から、定量 PCR の同一 DNA 試料を繰り返し測定したときのラン内およびラン間の RSD は最大 10% 程度であると考えられた。一方 8 抽出の DNA を n=1 で同時に測定した時のラン内の RSD は 25% 以上であり同一 DNA 試料を繰り返し測定したときの RSD よりも大きかった。また DNA について抽出日ごとに比較したところ、260nm と 280nm の吸光度比および DNA 収量、さらに定量 PCR により得られた Le1 のコピー数にも差が認められた。これらのことから DNA の品質が定量値(コピー数)に大きく影響した可能性が考えられた。抽出日によって DNA の品質に差が生じた原因としては繰り返し回数との関係で 1 日目と 2 日目では操作時間等が異なることが考えられたため、DNA 抽出操作全般について時間を揃えるなどの検討を行いたいと考えている。

#### F 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

渡邊敬浩、笠間菊子、和久井千世子、渋谷雅明、松木容彦、穂山 浩、米谷民雄 (2003) 遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) ならびにジャガイモ (NewLeaf Plus および NewLeaf Y) 定性検査方法を対象とした外部精度管理方法の検討 食品衛生学雑誌 第 44 巻 第 6 号

- 2. 学会発表  
なし

H. 知的所有権の取得状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

表1 DNA抽出の日間差

第1日			
抽出容器 番号	吸光度比 (260nm/280nm)	DNA ( $\mu$ g)	
1	1 763	23 8	
2	1 768	26 7	
3	1 792	21 5	
4	1 771	25 5	
5	1 776	27 7	
Mean	1 77	25 00	
S D	0 01	2 46	
RSD	0 6	9 8	

第2日			
抽出容器 番号	吸光度比 (260nm/280nm)	DNA ( $\mu$ g)	
6	1 890	15 5	
7	1 835	15 6	
8	1 904	13 9	
Mean	1 88	15 00	
S D	0 04	0 95	
RSD	1 9	6 4	

表2 同一DNAを同時に5回測定したときおよびこれを3回繰り返したときの LeI コピー数の再現性

ラン番号	測定数					Mean (ラン内)	S D (ラン内)	RSD(%) (ラン内)
	1	2	3	4	5			
1	33144	28007	28397	29330	26588	29093	2470	8.5
2	30785	32866	35028	33902	32723	33061	1574	4.8
3	33849	35702	37648	37393	33891	35697	1828	5.1
Mean (ラン間)						32617		
S D (ラン間)						3324		
RSD(%) (ラン間)						10.2		

表3 異なった抽出を同一ランで測定した時の再現性および同一DNAを異なったランで3回測定したときの再現性

ラン番号	抽出容器番号								Mean (容器間)	S D (容器間)	RSD(%) (容器間)
	1	2	3	4	5	6	7	8			
1	22780	18911	29783	23957	25212	39730	35039	33144	28570	7052	24.7
2	22689	20411	31473	24506	24729	41984	37733	30785	29289	7612	26.0
3	22532	20083	34036	26382	24985	44335	38252	33849	30557	8406	27.5
Mean (ラン間)	22667	19802	31764	24948	24975	42017	37008	32593	29472		
S D (ラン間)	126	789	2141	1271	242	2303	1725	1604	1006		
RSD(%) (ラン間)	0.6	4.0	6.7	5.1	1.0	5.5	4.7	4.9	3.4		



厚生労働科学研究費補助金研究（食品安全確保研究事業）

「ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における  
信頼性確保と生体曝露モニタリング法の確立に関する研究」

研究成果に関する刊行物

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koichi Saito, Andreas Sjodim, Courtney D Sandau, Mark D Davis, Hiroyuki Nakazawa, Yasuhiko Matsuki and Donald G Patterson, Jr	Development of a Accelerated Solvent Extraction and Gel Permeation Chromatography Analytical Method for Measuring Persistent Organohalogen Compounds in Adipose and Organ Tissue Analysis Method	Bull Environ Cotam Toxicol,			in press
Koichi Saito, Masahiro Ishizuka, Yukio Sugawara, Hiroyuki Nakazawa and Yasuhiko Matsuki	Cleanup method using disposable tandem cartridge system for the determination of dioxins in human milk by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	J Chromatogr			in press
Mikiko Takekuma, Koichi Saito, Masahiko Ogawa, Ryuji Matumoto, Susumu Kobayashi	Levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in human milk in Saitama, Japan, and epidemiological research	Chemosphere	54	127-135	2004
Shinji KUMAGAI, Shigeki KODA and Hajime ODA	Exposure Evaluation of Dioxins in Municipal Waste Incinerator Workers	Industrial Health	41	167-174	2003
Kazuhiko Akutsu, Mikiya Kitagawa, Hiroyuki Nakazawa, Tsunehisa Makino, Katsuhiko Iwazaki, Hajime Oda, Shinjiro Hori	Time-trend(1973-2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk	Chemosphere	53	645-654	2003
熊谷信二、織田肇、田淵武夫、赤坂進、小坂博、吉田仁、甲田茂樹、毛利一平	自治体焼却施設における堆積粉塵中ダイオキシン類濃度と労働者の血清中ダイオキシン類濃度との関係	産業衛生学雑誌	46	19	2004

MITSUNOBU OKUYAMA, NORIHIRO KOBAYASHI, WAKAKO TAKEDA, TAKAKO ANJO, YASUHIKO MATSUKI, JUNICHI GOTO, AKIRA KAMBEGAWA and SHINJIRO HORI	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Monitoring Toxic Dioxin Congeners in Milk Based on a Newly Generated Monoclonal Anti-Dioxin Antibody	Analytical Chemistry			in press
渡邊敬浩、笠間菊子、和久井千世子、渋谷雅明、松木容彦、穰山 浩、米谷民雄	遺伝子組換えトウモロコン (CBH351) ならびにジャガイモ (NewLeaf Plus および NewLeaf Y) 定性検査方法を対象とした外部精度管理方法の検討	食品衛生学雑誌	44		2003
大島赴夫、鈴木達也、山田健一、高野恵美、山本奈々美、川崎 勝、松木容彦	食品衛生外部精度管理調査の概要-大腸菌検査に係る検査方法と調査成績について-	食品衛生研究	53 (7)	39 47	2003
大島赴夫、鈴木達也、山田健一、高野恵美、山本奈々美、鈴木恭子、川崎勝、松木容彦	食品衛生外部精度管理調査の概要-サルモネラ属菌検査に係る検査方法と調査成績について-	食品衛生研究	53 (8)	12 27	2003
福原克治、勝村利恵子、高坂典子、川崎勝、鈴木達也、黒田万紀子、松木容彦	食品衛生外部精度管理調査の概要-理化学検査調査試料作製と経年的評価結果-	食品衛生研究	53 (11)	25 36	2003

学会発表

発表者氏名	タイトル名	発表学会名	出版年
齊藤貢一	母乳中ダイオキシンの酵素免疫測定法の開発	日本薬学会第 123 年会	2003 年 3 月
渡邊敬浩	遺伝子組換え大豆定量検査法の外部精度管理について	第 40 回全国衛生化学技術協議会年会	2003 年 11 月
穰山 浩	遺伝子組換えパパイアの定性検査法の外部精度管理について	横浜市神奈川区食品衛生協会講習会	2003 年 10 月

20031193

以降 P 187－P 318は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における  
信頼性確保と生体曝露モニタリング法の確立に関する研究」

研究成果に関する刊行物

学 会

## 遺伝子組換え大豆定量検査法の外部精度管理について

○渡邊敬浩<sup>1</sup>、穂山浩<sup>1</sup>、米谷民雄<sup>1</sup>、笠間菊子<sup>2</sup>、松木容彦<sup>2</sup>、児玉貴志<sup>3</sup>、栗原秀夫<sup>3</sup>、日野明寛<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所, <sup>2</sup>(財)食品薬品安全センター秦野研究所, <sup>3</sup>(独)農林水産消費技術センター, <sup>4</sup>(独)食品総合研究所)

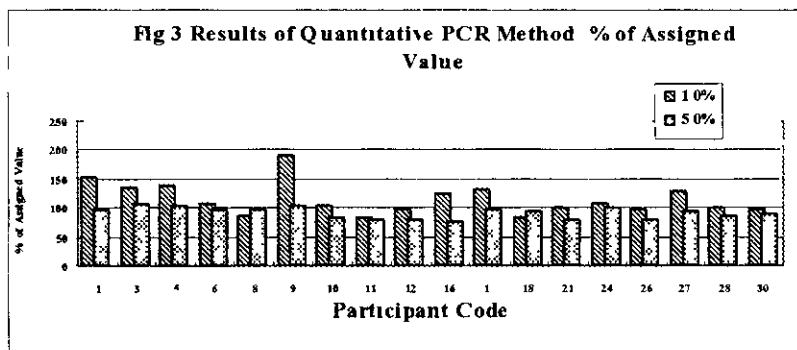
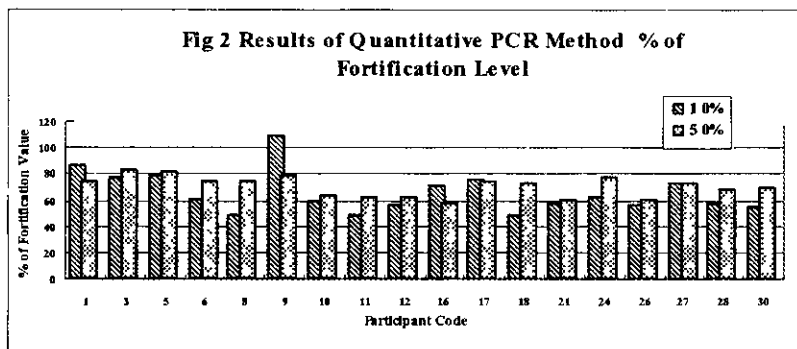
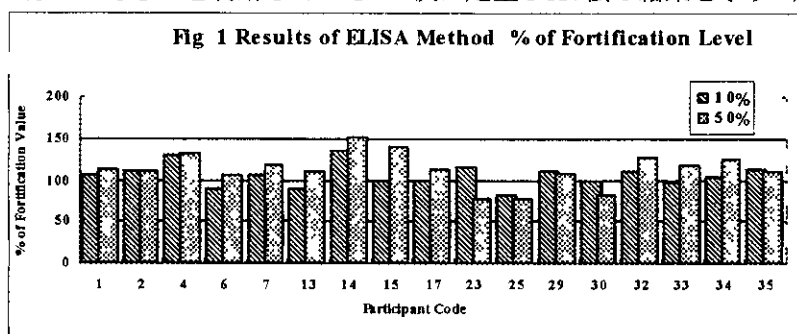
【緒言】厚生労働省では平成 13 年 4 月以降、公衆衛生の観点から遺伝子組換え(GM)食品の安全性審査を義務付けるものとし、併せて表示制度を施行している。またこれに伴い、流通ならびに表示の科学的検証を目的とした検査方法を記した「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」を医薬局食品保健部長通知し、GM 食品の検査方法を定めた。当該検査方法は平成 13 年 3 月 27 日に通知されて以降、科学的検証法の改良や対象 GM 食品の変遷等に合わせて順次改訂を重ね、平成 15 年 6 月 18 日に通知された食発第 0618001 号においては、分析適応可能機種種の拡充に伴い、定量 PCR 法の項を中心とした大幅な改訂を行ったところである。

GM 食品のうち、安全性審査を終了した GM 食品に関しては食品衛生法に規格基準が設けられており、意図せざる場合、5%の混入率を目安に分別流通管理が正しく行われているか否かが判断される。行政上、この数値をもって判断がなされるため、当該検査方法を用いて得られる測定結果の信頼性を確保することが大変重要である。この測定結果の正当性を保証するためには、精度管理が不可欠である。すなわち、諸検査機関が厚生労働省通知法に従い配布検査試料を同一時期に分析し、その分析結果をもとに、当該分析法における検査機関間のデータのばらつきの程度ならびに検査水準を把握すること、さらには、検査担当者が自己の技術を客観的に認識し、検査技術の維持向上を図ることは極めて重要と思われる。しかしながら GM 食品定量検査方法に採用されている ELISA 法、ならびに定量 PCR 法を対象とした外部精度管理方法については国際的にもほとんど検討されておらず、既存の外部精度管理方法が適用できるのかについての情報は少ない。本研究では、昨年度本会において報告した GM トウモロコシおよび GM ジャガイモの定性検査法に引き続き、安全性審査の終了した GM 大豆の定量検査方法を対象とした外部精度管理方法を検討することを目的とし、35 機関(定量 PCR 法のみ 18 機関、ELISA 法のみ 13 機関、両法 4 機関)による試験を実施し、集計された共通未知試料の分析結果の相互比較を通して検査機関によるばらつきの程度ならびにその要因について詳細な検討を行った。

【方法】GM 大豆試料は厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課を通じ、また 0%試料ならびに疑似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え(non-GM)大豆試料(アメリカ産大豆)は(独)食品総合研究所を通し入手した。入手した全ての大豆試料を粒径が均一に 200  $\mu\text{m}$  となるよう粉碎し、その後、被験物質の混入率が重量換算で 10%、50%となるよう混合した。混合は以下の通り行った。まず、均一に粉碎した試料を再度凍結乾燥処理した。その後、上記重量比となるよう 0%試料と被験物質を正確に秤量し、全量を 500 g としてプラスチック製の袋に量り採った。袋中で十分な混合を行った後、篩にかけ、再び袋中で混合を繰り返した。この混合操作は合計で 3 回行った。混合操作後の試料を粉碎机で再度粉碎した後、疑似混入試料とした。疑似混入試料調製後、0%試料ならびに疑似混入試料を 6.5 g (定量 PCR 法) または 2.0 g (ELISA 法)となるようそれぞれ 50 mL あるいは 15 mL 容遠沈管 50 本に秤量分注し小分け試料とした。小分け試料のうち 6 点を無作為選出し、定量 PCR 法を用いた均一性試験を食品総合研究所で、ELISA 法を用いた均一性試験を国立衛研で実施した。試験の結果は統計的に処理し、十分な均一性を確認した。安定性試験は小分け試料 4 点を無作為選出し、試料配布日を 0 日目とし、-20°Cの条件で 30 日間保存した後に、試験終了時としての測定を実

施した 測定試験はPCR法, ELISA法の両法を用いて行い, 外部精度管理実施期間中における保存安定性について検討した 均一性確認後, 各小分け試料は0%試料を「低濃度」, 10%試料を「中濃度」, 50%試料を「高濃度」検体と表記し参加機関に送付した またこれに合わせ ELISA法, 定量PCR法ともに, 厚生労働省通知法食発第0618001号に従い試験するものとし, 当該通知法に従ったマニュアルを作成し, 同送した. 報告された測定データの統計処理は, ISO/IEC GUIDE 43-1等の国際基準を参考に実施した

【結果及び考察】ELISA法を実施した各機関において得られた定量値を, 送付検体のGM大豆混入率に対する相対値に換算した結果を Fig 1 に示す 5%検体を測定した場合, 機関14ならびに15においてそれぞれ152.4%(定量値 7.62), 140.8%(定量値 7.04)と高めの値が報告された また一方で, 機関23ならびに25からはそれぞれ76%(定量値 3.82)と若干低めの値が報告されている これら機関間にみられる測定値のばらつきの原因については現在解析しているところであるか, 全体としては10%検体を測定した平均値が106%(相対値 105.8%), 5%検体を測定した場合の平均値が56.6%(相対値 113.2%)と報告されており, 良好な試験が行われたものと判断している 次に定量PCR法の結果を示す 定量PCR法を実施した22機関中18の機関



がシリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant mini kit)を用いてDNA抽出を行っていた Fig 2には, それら機関より報告された定量値を送付検体のGM大豆混入率に対する相対値に換算した結果を示す シリカゲル膜タイプキット法を用いた機関から報告された定量値は, 10%検体の平均値が0.66%(相対値 65.7%), 5%検体の平均値が3.53%(相対値 70.7%)と混入率に比較して低めであった しかし, Fig 3に示すように, 国立衛研において同法を用いて得られた定量値に対し相対値を算出した場合には, 機関番号1ならびに6の機関から報告された10%検体に対する結果を除き, 良好な試験が行われたことが示唆されている(10%検体相対値 115.3%, 5%検体相対値 91.3%) また, 他のDNA抽出法を採用した機関からは混入率に比較し良好と判断される結果が報告されている(10%検体平均値 0.87%, 5%検体平均値 4.78%) これらの結果から, 大豆検体からシリカゲル膜タイプキット

法(QIAGEN DNeasy Plant mini kit)を用いて抽出されたDNAを対象にPCR法を実施した場合, 何らかの要因により測定値が低くなる可能性が示唆され 通知の改正が必要と考えられた

【謝辞】本研究は厚生労働省医薬局食品保健部の食品等検査費により実施した 本試験にご参加いただきました各検査機関の諸氏に深謝いたします

## 遺伝子組換えパパイヤの定性検査法の外部精度管理について

○ 穂山浩<sup>1</sup>、渡邊敬浩<sup>1</sup>、笠間菊子<sup>2</sup>、松木容彦<sup>2</sup>、米谷民雄<sup>1</sup>、  
(<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所、<sup>2</sup>(財)食品安全センター秦野研究所)

【緒言】厚生労働省では、平成12年の厚生省告示232号、233号により、安全性審査がされていない遺伝子組換え(GM)食品が国内で流通しないよう、食品衛生法の規格基準を改正して、平成13年4月から食品衛生法に基づく安全性審査を法的に義務付けることとし、それと伴に表示についても法的に義務化することにした。これに関連し、厚生労働省では、医薬局食品保健部長通知として「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成13年3月27日、食発第110号、一部改正 同年5月25日、同158号、一部改正 同年9月14日、同241号、一部改正 平成14年4月30日、同0430001号、一部改正 平成15年5月6日、同0506002号、一部改正 同0618001号)でGM食品の検査方法を定めた。

この検査法の測定結果の質あるいは正当性を保証するために、検査法の精度管理が不可欠である。食品分析に従事する諸検査機関が、厚生労働省通知法に従い同一検査試料を同一時期に分析し、その評価結果をもとに検査機関におけるデータのばらつきの程度ならびに検査水準を把握すること、また、参加機関の検査担当者が自己の技術を客観的に認識して、検査技術の維持、向上を図ることが重要である。これは外部精度管理といわれ、多数の試験機関が共通試料を分析した結果を相互比較し、個々の分析機関の能力を客観的に評価する手法である。

昨年度、GM トウモロコシと GM シャカイモの定性PCR法について外部精度管理調査を試験的に実施している。本年度は、パパイヤを検査対象とし、定性PCR法およびGUS( $\beta$ -glucuronidase)法について外部精度管理調査を行い、参加機関のデータのばらつきの程度ならびに検査水準を把握することを目的とした。また、パパイヤ配布試料については確認試験および安定性試験を実施し、配布試料の妥当性について検討した。

### 【方法】

#### 1 精度管理試料の調製および送付

厚生労働省医薬局食品保健部を通して、関連業者よりハワイ産 GM パパイヤおよび非組換え(non-GM)パパイヤ各16個を購入し、果肉と種子を分別後、それぞれを必要数に分割して精度管理試料とした。GUS法に参加した13機関には、種子試料4検体、報告書様式、実施要領および厚生労働省通知準拠マニュアルを、定性PCR法に参加した21機関には、果肉試料4検体分、報告諸様式、実施要領および厚生労働省通知準拠マニュアルを送付した。各機関での分析終了後、返送された分析結果について集計を行った。

#### 2. 確認試験

外部精度管理試料配布時に配布した全個体につき、果肉および種子の一部をサンプリングし、厚生労働省の通知法(種子についてはGUS法、果肉については定性PCR法)に従って分析し、GMパパイヤ、non-GMパパイヤか表示通りであるか否かについて検討した。

#### 3 安定性試験



配布試料として使用しなかった残りの GM パパイヤおよび non-GM パパイヤの各 1 個について、それぞれ果肉および種子を分割して約 4°C で保存した。種子については保存第 0 日、3 日、9 日および 16 日目に GUS 法で、果肉については保存第 0 日、3 日、7 日および 14 日目に凍結乾燥に付した後定性 PCR 法で試験し、外部精度管理実施期間中における保存安定性について検討した。

## 【結果】

### 1 PCR 法

試験した 21 機関の結果を集計した結果、陽性検体 2 検体ともすべての機関で検出され陽性と判定された。また陰性検体 2 検体ともすべて陰性と判定された。アンケート調査からパパイヤからの DNA 抽出の精製度としての吸光度比及び DNA 濃度、各検査機関で実施された PCR 条件、各検査機関で実施されたアカロースゲル電気泳動条件、各検査機関の検査区域及び測定機器の共用状況、各検査機関の検査主担当者の経験年数及び担当者数等についてまとめ、判定結果と得られた情報から問題点を考察した。

### 2 GUS 法

試験した 13 機関の結果を集計した。その結果、陽性検体 2 検体ともすべて検出され陽性と判定された。また陰性検体 2 検体ともすべて陰性と判定された。

## 【考察】

パパイヤ試料の外部精度管理の結果、GUS法、定性PCR法とも参加したすべての機関ですべての試料についてGMパパイヤおよびnon-GMパパイヤが正しく判定された。従って、通知法通りに検査を行った場合、外部精度管理に参加した機関においては検査水準が適正に保たれていることが推察された。しかし、1 機関で検出用プライマーを用いた際には検出され、確認用プライマーを用いた際には検出されず、最終判定は陰性とした例が 1 検体あった。提出された電気泳動の画像解析写真を確認したところ、予想されたサイズと同じ位置付近にハントが見られた。この原因として、①非特異的ハントの検出、②他の GM パパイヤ検体から、検出用のみコンタミネーションの可能性、の 2 点が考えられた。他の機関には、非特異的ハントがアンプリコンサイズ付近に見られていないことから、検出用プライマーを用いた際にのみ、GM パパイヤからの抽出液のコンタミネーションか、あるいは電気泳動操作の際のアンプリコンのコンタミネーションか考えられた。

個々の機関における試験実施方法を調査したところ、GUS 法については全ての機関で通知法に従って実施していたのに対し、定性 PCR 法では凍結乾燥の代わりに 60°C で乾燥した機関や、吸光度計が壊れた理由で、DNA 抽出液の濃度測定を行わずにそのまま使用した機関、また DNA 濃度算出方法における吸光度の取り扱いが通知法 (320 nm で補正) と異なる機関などがみられた。さらに 230 nm (塩及び糖類) と 320 nm (フランク) の吸光度の記載を求めたか、通知ではこれら吸収測定は義務ではないので、測定していない機関が数機関あった。

【謝辞】本研究は厚生労働省医薬局食品保健部の食品等検査費により実施した。本試験にご参加いただきました各検査機関の諸氏に深謝いたします。