

図 2 中腸腺及び剥き身の遊離脂肪酸の多変量連関図

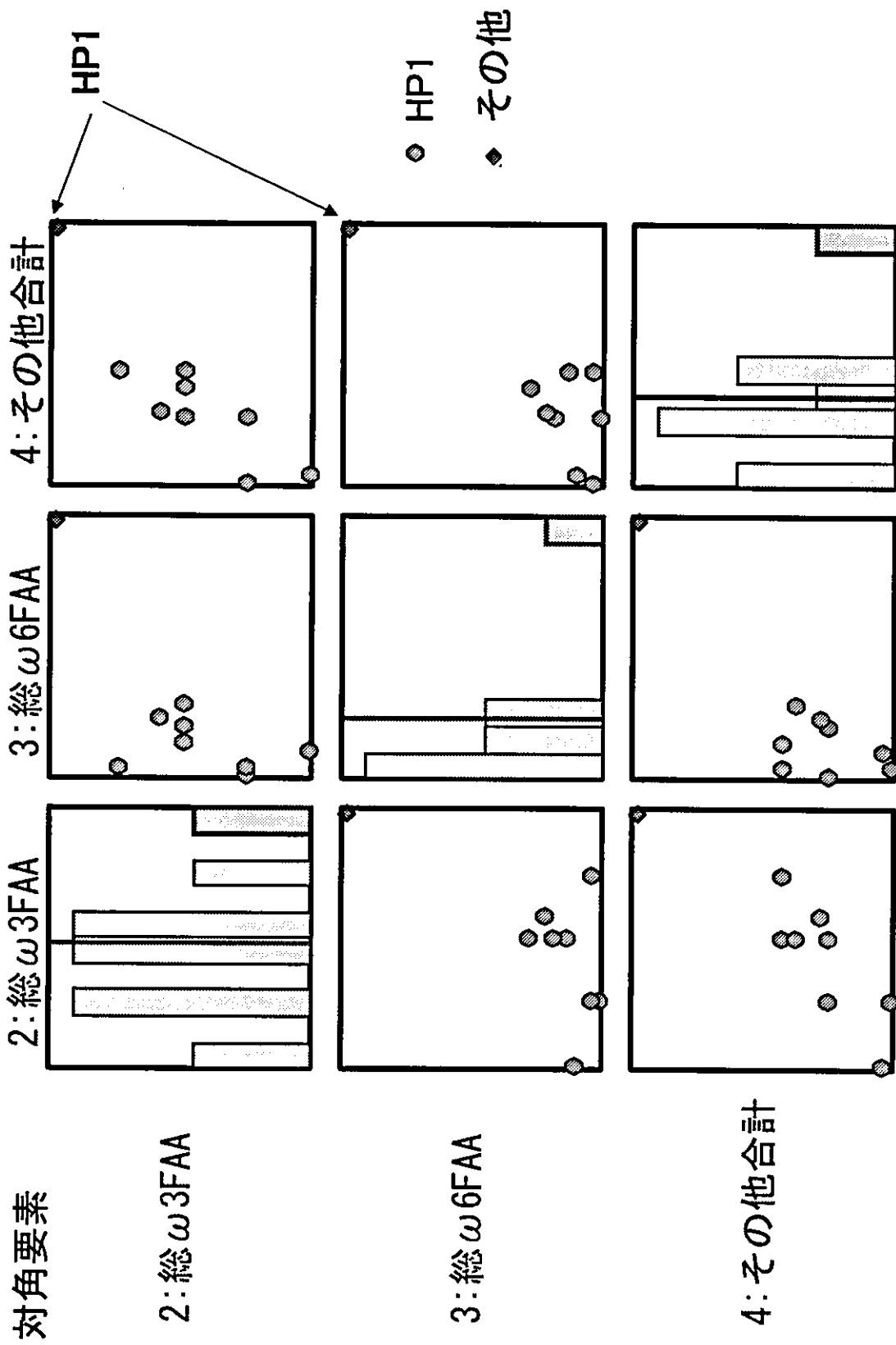


図 3 中腸腺の遊離脂肪酸の多変量連関図

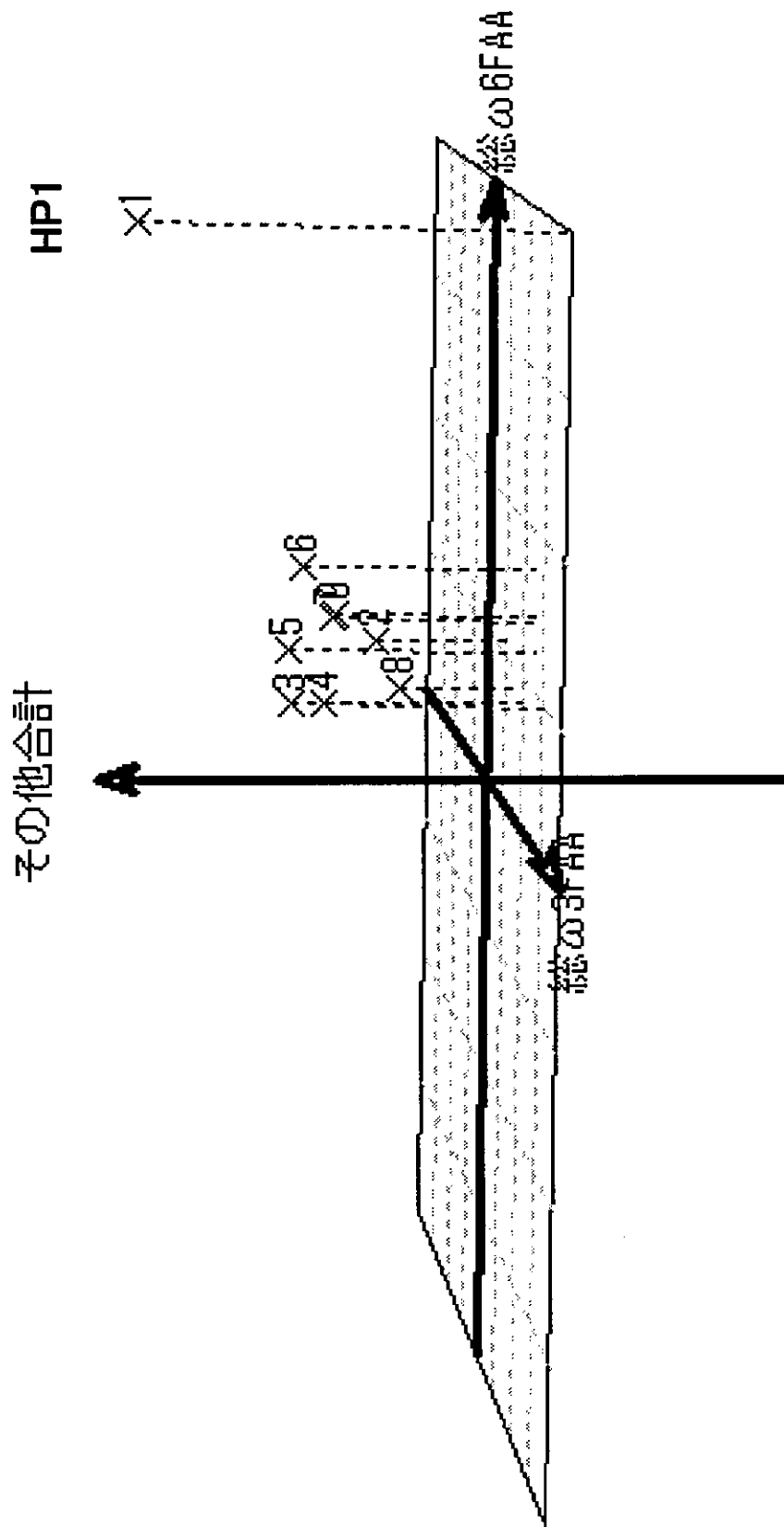
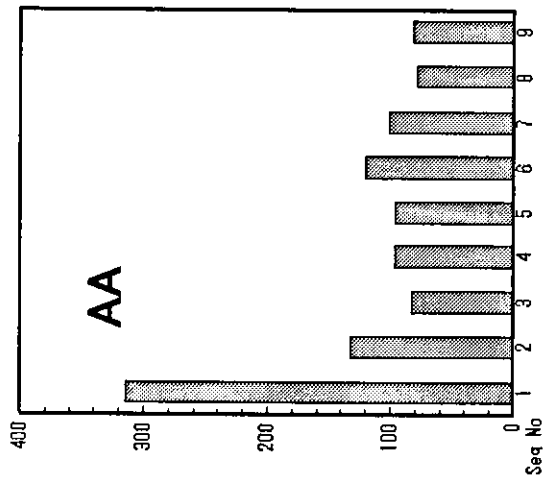
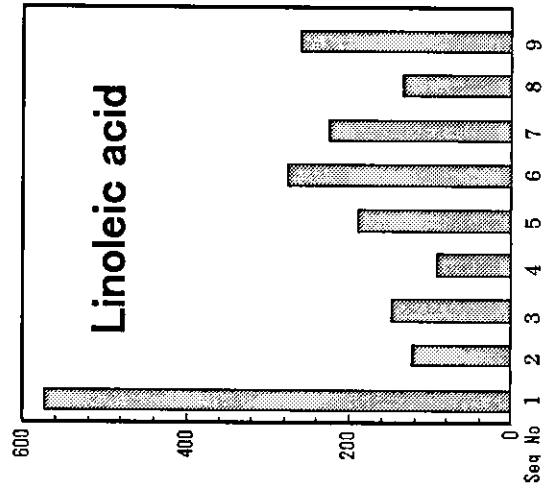


図 4 HP1の三次元図

ω-3系脂肪酸



ω-6系脂肪酸

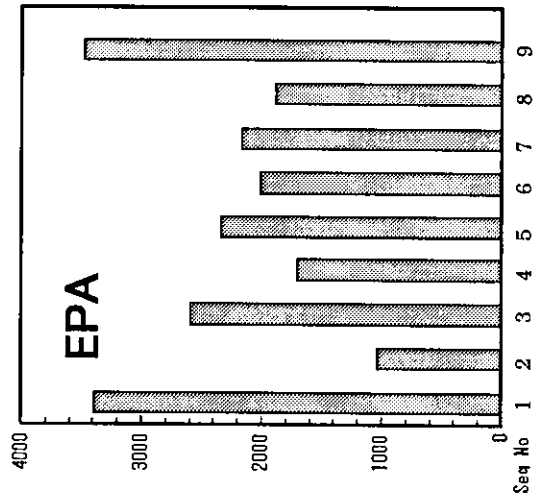
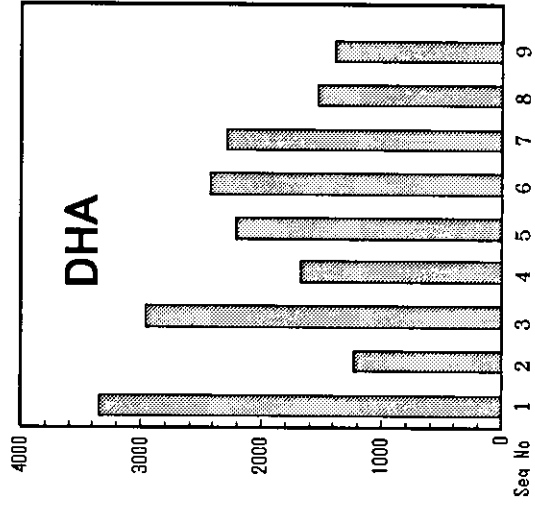


図 5 HP1のω-3及びω-6系脂肪酸の量的比較

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

「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」

平成 16 年度
分担研究報告書

組換えDNA技術応用食品検査の信頼性確保に関わる研究

分担研究者 渡邊敬浩

厚生科学研究費補助金(食品の安全性高度化推進研究事業)

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

分担研究報告書(平成16年度)

組換えDNA技術応用食品検査の信頼性確保に関わる研究

主任研究者	柳澤 健一郎	(財)食品薬品安全センター 特別参事
分担研究者	渡邊 敬浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部 研究員
協力研究者	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品部長
協力研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品第三室長
協力研究者	笠間 菊子	(財)食品薬品安全センター 研究員
協力研究者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター 室長補佐

研究要旨

安全性審査を終了した遺伝子組換え(GM)トウモロコシを対象とした定量分析法として、厚生労働省から通知された「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:平成 16 年 6 月、食安発第 0628001 号)において定量 PCR 法が定められている。昨年度実施した GM ダイズを対象とした試験に引き続き、本年は上記 GM トウモロコシ(Mon810 系統)を対象とした外部精度管理試験を試験的に実施した。また、実施に際し、Mon810 系統試験用試料調製方法の妥当性、ならびに調製試料の均一性および安定性についても検討をおこなった。重量混合比として 5%となるよう調製した試料については、 $5.15 \pm 0.33\%$ の定量値が得られており、試料調製方法の妥当性が確認された。また、6 検体から得られた定量値に対し一元配置の分散分析を行った結果、検体間での有意差は確認されず、試料の均一性が確認された。また、 -20°C で 1 ヶ月間保存した場合にも定量値に有意な変動は認められず、試料の安定性が確認された。外部精度管理試験の結果からは、全体として良好な測定精度をもって試験が行われたことが明らかになった一方で、機関特異的また使用機種特異的な問題があることも明らかにされた。

A.研究目的

厚生労働省では「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:平成 16 年 6 月、食安発第 0628001 号)を通知し、遺伝子組換え(GM)食品に関する検査法を定めた。GM 食品については検査方法としての歴史が浅いことから、外部精度管理体制の整備そのものが立ち後れており、現在、精度管理用試料を含む標準試料についても国際的な議論が開始された段階である。これまでに我々は GM ジャガイモ、トウモロコシ(CBH351 系統)、ダイズ(RRS)を対象に試験用試料調製

方法についての検討を行い、また外部精度管理試験方法の検討を目的とした協同試験を実施してきた。本年度は、前出の厚生労働省通知に記載されている検査方法のうち、トウモロコシ Mon810 系統を対象とし、試験用試料調製後、均一性及び安定性について確認した上で、定量 PCR 法の外部精度管理調査を試験的に行い、参加機関から報告されたデータを基にばらつきの要因、試験法の問題点について検討した。

B.研究方法

B-1. 試料の調製

GM トウモロコシ・Mon810 試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じて入手した。また、非混入試料および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) トウモロコシ試料 (アメリカ産トウモロコシ) は Quality Technology International 社から入手した。入手した全てのトウモロコシ試料を粒径が均一に 500 μm となるよう粉碎した。Non-GM トウモロコシ試料については粉碎後、GM トウモロコシの混入がないことを確認するため定量 PCR 法を用いた分析を行ったが、0.3% 程度の GM トウモロコシの混入が認められたため、低濃度試料として扱うことにした。また、低濃度試料をマトリクスとし、これに Mon810 試料を重量換算で 5.0% となるよう混入させた試料を高濃度試料とした。試料調製後、低濃度試料を 7 g、高濃度試料を 20 g となるよう、それぞれ 50 mL 容遠沈管 50 本に秤量分注し小分け試料とした。

B-2. 均一性試験

低濃度試料および高濃度試料のそれぞれに対し、50 本の小分け試料の 12% に相当する 6 本の小分け試料を使用して、均一性確認試験を実施した。各小分け試料から 2 g のトウモロコシ検体を秤量分取し、厚生労働省通知法食安発第 1113001 号記載のシリカゲル膜タイプキット法を用いて DNA を抽出した。濃度を調整した抽出 DNA を定量 PCR 法における DNA 試料溶液とし、分析を行った。スクリーニング法および、Mon810 系統特異的定量法の両法を用い、また、2 回の繰り返し測定を行うことで Mon810 混入率を算出した。得られた混入率は一元配置の分散分析および t 検定を用いて解析した。

B-3. 安定性試験

試料送付直後、低濃度試料および高

濃度試料のそれぞれから 2g の検体を $n=4$ で秤量分取し、厚生労働省通知法食安発第 1113001 号記載のシリカゲル膜タイプキット法を用いて DNA を抽出した。濃度を調整製した抽出 DNA を定量 PCR 法における DNA 試料溶液とし、分析を行った。分析に際しては、CaM 定量系を用いたスクリーニング法および Mon810、GA21 系統特異的定量法を用い、それぞれの混入率を算出した。また、上記試験試料について約 -20°C で 1 ヶ月間保存した後にも同様の方法にて試験を行い、低濃度試料と高濃度試料のそれぞれについて、保存前後の測定値を比較した。

B-4. 外部精度管理の実施

遠沈管に分注した高濃度試料および低濃度試料を、食品衛生外部精度管理調査参加 27 機関に報告書様式、実施要領および厚生労働省通知準拠マニュアルと共に各 1 本ずつ送付した。各機関での分析終了後、返送された分析結果およびアンケート項目について一覧を作成し、報告された定量値について統計処理 (基本統計量、順序統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、Xbar-R 管理図の作成および z-スコアの算出) を行った。また、統計処理の結果を検討した結果、定量 PCR 装置の機種によって定量値に差が生じた可能性が考えられたため、定量 PCR に機種 F を使用した機関の結果を除いた定量値についても同様に統計処理を行った。

C. 研究結果

C-1. 試料調製方法の妥当性と試料の均一性

低濃度試料および高濃度試料それぞれ 6 本の小分け試料を使用して CaM 定量系、および GA21 特異的定量系ならびに Mon810 特異的定量系を用いた混入率算出試験を行った。その結果、低濃度試料に対し CaM 定量系にて $0.37 \pm 0.04\%$ 、Mon810 特異的定量系にて

0.30±0.08%、GA21 特異的定量系にて trace (定量下限値以下)、また高濃度試料に対し、CaM 定量系にて 5.91±0.94%、Mon810 特異的定量系にて 5.15±0.33%、GA21 特異的定量系にて trace の定量値を得た。これらの結果から、重量混合比率と定量値を比較した場合に有意な差があるとは判断されず、本試料調製方法の妥当性が確認された。また、CaM 定量系ならびに Mon810 特異的定量系を用いて同一試料に対し、2 回の繰り返し測定を行い、それぞれ算出された定量値を用いて一元配置の分散分析および t 検定による有意差検定を行った。その結果、得られた定量値が正規分布していること及び各検体間に認められた差違が、2 回の繰り返し測定間に認められた差違に比べ、有意ではないことが明らかとなった(表 1-1 および 1-2)。

C-2. 試料の安定性

高濃度試料および低濃度試料のそれぞれを-20℃で1ヶ月間保存し、保存の前後について CaM 定量系、Mon810 定量系、GA21 定量系を用いて定量値を算出した。得られた結果につき、保存の前後で定量値を比較した結果、いずれの定量系を用いた場合にも定量値に統計的有意差が認められなかった(表 2-1 および 2-2)。また GA21 定量系を用いた場合には検出限界値以下の測定値しか得られなかったため、定量値の算出および統計解析は行わなかった。

C-3. 外部精度管理試験

各参加機関から報告された試験結果を集計し、表 3 に「トウモロコシ DNA 抽出結果」を、表 4 に「トウモロコシ定量 PCR 結果(スクリーニング低濃度)」を、表 5 に「トウモロコシ定量 PCR 結果(スクリーニング高濃度)」を、表 6 に「Mon810 系統特異的試験結果」を示した。

表 3-2 に示されるように、参加全 27 機

関中、22 機関がシリカゲル膜タイプキット法を、4 機関が CTAB 法を、そして残り 1 機関がシリカベースレジソタイプキット法を DNA 抽出法として採用していた。高濃度試料から抽出された 9 点の検体につき解析を行った結果、同一の DNA 抽出法を採用している機関間においても平均収量の大小が認められており、遠心機器、吸光度測定装置等の使用機器、また、遠心、加温等の処理条件が系統的な誤差を生じる要因となっている可能性が考えられた。さらに、抽出法間で DNA 収量について比較した結果、シリカゲル膜タイプキット法による平均収量が CTAB 法による収量に比べ 3 倍程度高いことが明らかとなった(表 3-2)。また、DNA 収量の検体間におけるばらつきについて、シリカゲル膜タイプキット法および CTAB 法を比較した場合、両法に明確な差は認められなかった(表 3-2)。しかしながら機関別にみると、明らかにばらつきの大きい機関が複数機関認められた(表 3-1)。この収量のばらつきの原因については、別に調査を行った DNA 抽出試薬のロットとの間に明確な相関が認められなかったことから、遠心上清の分離等、手技の習熟が操作上の誤差となり、それに依るところが大きいと考えられた。

スクリーニング試験結果において GA21 系統特異的定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度(機種 C において 16 コピー、機種 A、B、D、E において 20 コピー、機種 F において 40 コピー)を上回った機関はなかった。また系統特異的定量結果において GA21 系統特異的定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度を上回った機関は 1 機関の 1 測定のみであった。このためスクリーニング試験については、CaM 定量系により得られた定量値について、また、系統特異的定量については Mon810 系統

特異的定量系により得られた定量値について統計解析を行うこととした。表 4 に示されるように低濃度試料を対象とした試験において、CaM 定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度を下回った機関が4機関認められた。これら機関から報告された結果については、定量 PCR 法において理論的に規定される絶対的定量下限値 (absolute limit of quantification: $^{abs}LOQ_{method}$) を測定値が満たしておらず、この測定値に基づいて算出される定量値の信頼性を担保する事が出来ないため解析から除外した。

前述の4機関を除く 23 機関から報告された、低濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて得られた定量値について統計処理を行った結果については図 1~3 に示した。表 4 に示されるように、全ての機関から報告された低濃度試料を対象とした CaM 定量値の平均 \pm S.D. は $0.331 \pm 0.058\%$ であった。また、使用された定量 PCR 装置の機種に依存して定量値が変動するような傾向は認められなかった。さらに図 2 および 3 に示したように、管理限界を超える定量値を報告した機関はなかった。

次に高濃度試料を対象とした CaM 定量系および Mon810 系統特異的定量系を用いて得られた定量値について解析を行った。高濃度試料を対象とした試験においては、測定値が $^{abs}LOQ_{method}$ に満たない機関は認められなかった。CaM 定量系を用いて得られた定量値について統計処理を行った結果については図 4~6 に示した。表 5 に示されるように、高濃度試料を対象とした CaM 定量値の平均 \pm S.D. は $5.785 \pm 1.478\%$ であった。また、機種 F を使用した機関から報告された定量値については、他の定量 PCR 装置を使用した機関から報告された定量値に比べ有意に高い傾向が認められた。

さらに、図 5 および 図 6 に示したように、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 2 機関、R が管理限界を超えた機関が 1 機関あった。

高濃度試料を対象とし、Mon810 系統特異的定量系を用いて得られた定量値について統計処理を行った結果については図 7~9 に示した。表 6 に示したように、各機関から報告された Mon810 特異的定量値の平均 \pm S.D. は $5.753 \pm 1.309\%$ であった。また CaM 定量系を用いた試験結果と同様に、機種 F を使用した機関から報告された定量値が他の定量機器を使用した機関から報告された定量値に比べ有意に高い傾向が認められた。さらに、図 8 および 9 に示すように、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 1 機関、R が管理限界を超えた機関が 3 機関あった。

上記のとおり、参加機関から報告された全定量値を対象とした統計解析の結果、Xbar および Z-スコアが管理限界を超える定量値を報告した機関において使用されていた定量 PCR 装置がいずれも機種 F であったため、定量 PCR 装置の機種依存的に定量値に差が生じている可能性が考えられた。このため、機種 F を定量 PCR 装置に使用した機関から報告された定量値を除いたデータについても統計解析を行うこととした。

機種 F を使用した機関を除く 25 機関 (以下 F を除く機関とする) につき、高濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて得られた定量値の統計解析を行った (図 10~12)。前述の 25 機関から報告された CaM 定量値の平均 \pm S.D. は $5.404 \pm 0.572\%$ であった。また、図 11 および 12 に示したように、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 1 機関あり、この機関においては R の管理限界も上回っていた。

CaM 定量系と同様に、Mon810 系統特異的定量系を用いて得られた定量値についても統計解析を行った結果を図 13~15 に示した。25 機関から報告された定量値の平均 ± S.D. は 5.459 ± 0.588 %であった。また、図 14 および 15 に示すように、Xbar および Z-スコアが管理限界を超える定量値を報告した機関が1機関、R が管理限界を超える定量値を報告した機関が2機関あった。

D. 考察

低濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて実施されたスクリーニング試験の定量値については、Xbar-R 管理図および Z-スコア解析の結果、管理限界を超える定量値を報告した機関はなかった。しかし、CaM 定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度を下回った機関が4機関あり、統計に含めることができなかった。これら機関から報告された結果について詳しくみると、測定値が $^{abs}LOQ_{method}$ に満たなかった要因には以下の 4 つが考えられた。1)採用した DNA 抽出法依存的な要因。2)定量 PCR 装置に依存した要因。3)試験実施者の操作上の誤差に依存した要因。4)上記 1)~3)の複合要因。上記 4 機関中、機関 6 は定量 PCR 装置に機種 F を使用しており、機種 F においては試験法としての検量線の設定上、 $^{abs}LOQ_{method}$ が他の PCR 装置に比べて高め(40 コピー)に設定されていることが結果に影響を与えている可能性も考えられた。さらに、詳細については後述するが、機種 F については、ラン間(異なる測定操作間)で作成される検量線に手技に依存すると判断される誤差が生じており、この事が、測定値がラン間で変動する要因の一つとなっている可能性が示唆される。また、さらにこの変動は操作上の誤差から $^{abs}LOQ_{method}$

がラン間で変動し得る事を意味しており、実測サンプルの定量値にも影響を及ぼしかねない。そのため、他の定量 PCR 装置を使用する場合に比べ、より技術的に習熟し、操作上の誤差を軽減させることが必要であると思われる。機関 6 以外の 3 機関においては、DNA 抽出法にシリカゲル膜タイプキット法以外の方法(CTAB 法:機関 21 および 26、シリカベースレジソタイプキット法:機関 17)が採用されていた。CaM 定量系と同時に測定されたトウモロコシ内在性遺伝子(*SSI1b*)定量系により得られた測定値についてみると、CTAB 法を採用した機関 21 および 26 から報告された測定値は、検体間でのばらつきが大きく、また、測定値は、シリカゲル膜タイプキット法を採用した機関に比べて小さい傾向が認められた。これらのことから、上記 2 機関においては抽出操作のばらつきおよび吸光度測定時の不備が原因となり、PCR 反応系に加えた DNA の量が十分でなかった、あるいは操作の不備により PCR 阻害物質を十分に除去することが出来なかったことが考えられ、それらの結果として、CaM 定量系で得られた測定値が検量線の最低濃度を下回ったものと思われた。機関 17 については同法を採用している機関が他にないため、データの比較から考察する事が出来ないが、DNA 抽出法依存的に定量下限値が変動した可能性、および、高濃度試料と低濃度試料との間に *SSI1b* 測定値の差異が認められることから試料依存的な原因があったことの 2 点が推測される。なお、これまでの研究の成果として、同一試料を対象とした協同試験においては、実際的な試料を対象とした定量 PCR 法の定量下限値($^{rel}LOQ_{sample}$)が 0.1~0.5%(w/w:GMトウモロコシ重量混入率)という結果が得られている(上記 $^{rel}LOQ_{sample}$ は、DNeasy Plant Maxi

法により抽出された DNA を対象に機種 A を用いて行われた試験により求められた。DNA 抽出法および定量 PCR 装置の選択によっては変動しうるものと考えられる)。

高濃度試料を対象とした試験においては、CaM 定量系および Mon810 系統特異的定量系のいずれを用いた試験においても、機種 F を定量 PCR 装置として使用した機関から報告された定量値が、 \bar{X} および Z-スコアにおいて管理限界を越えていた。機関 6 から報告された測定値が定量下限値を下回った事についてすでに言及したが、高濃度試料を対象とした試験においても、機種 F を使用した機関については、それ以外の定量 PCR 装置を用いた機関に比べて、同一の DNA を異なったランで繰り返し測定した場合に、測定値が大きく変動していることが示唆された。そこで、抽出番号 1~3 の同一 DNA を対象に行われた CaM 定量ならびに GA21 定量(スクリーニング)、および Mon810 系統特異的定量(系統特異的)を目的とした計 3 回のランについて、各機関から報告された測定値のうち、*SSI1b* の測定値を抽出し、相対標準偏差を求め比較した。その結果、表 7 に示したように、機種 F を用いた機関から報告された *SSI1b* 測定値の相対標準偏差は、各抽出 DNA について、機関 6 においては 56.8%、53.8%、48.5%(相対標準偏差の平均; 53.0%)、機関 19 においては 40.3%、38.5%、28.9%(同平均; 35.9%)であった。これに対し、機関 26 を除くそれ以外の定量 PCR 装置を使用した機関におけるラン間再現性(相対標準偏差の平均 \pm S.D.)は $7.36 \pm 3.78\%$ であった。これらの結果から、機種 F を用いた場合、得られる測定値についてのラン間再現性が低い傾向が明らかとなった。また、F を除く機関から報告された定量

値が \bar{X} および Z-スコアの管理限界を超えた要因としては先に考察した検量線の誤差に起因するものと、それ以外のものが考えられた。まず、検量線について考察すると、検量線が正確に作成されず、またラン間で誤差を生じた場合、測定されるコピー数の大きさの違いから、内在性遺伝子と標的遺伝子とでは受ける影響の大きさが異なる(内在性遺伝子の測定値がより影響を受けやすいものと考えられる)。このため、内在性遺伝子と標的遺伝子の測定値の比として算出される定量値が、真値からはずれた値として算出されるものと考えられる。特に機種 F を用いた定量試験の場合には、検量線の 1 濃度あたり 1 反応系のみ反応に依って検量線を作成するため、わずかな誤差が結果に大きな影響を及ぼしかねない。しかしながら、検量線の誤差のみでは機種 F を使用した 2 機関から報告された定量値が真値と大きく異なっていた結果を十分に説明することが出来ない。そこで、その他の原因を明らかにするため、国立衛研において検証を行った。国立衛研で抽出された 5 点の抽出 DNA を用いて 3 回繰り返し測定試験を行い、*SSI1b* 測定値について解析したところ、ラン間誤差が他の定量 PCR 装置と同等の大きさ(相対標準偏差の平均 \pm S.D. が $6.08 \pm 3.05\%$)になることが確認された。また、さらには機種 F 使用の参加機関から測定に使用した DNA を供与していた 5 点の抽出 DNA を用いて 2 回の繰り返し測定を実施したが、測定値、ラン間再現性、および混入率の全てに関し問題がないと判断される数値が得られた。また、操作方法については担当者への聞き取り調査を行ったが、特別な問題を見つけることができなかった。これらの結果は、参加機関が使用した試薬あるいは機器に何らかの問題があったことを

強く示唆するものと考えられた。

なお、先に示したラン間再現性の解析において、機関 26 からは、通知法とは異なり PCR プレートのフタにキャップを使用した旨報告されており、また、測定値も他の機関と同一に解析する事ができない大きな異常を示していたため、抽出 DNA に大きな問題が含まれていると考え解析から除外した（機関 26 に認められた問題については後述する）。

F を除く機関について解析を行った結果、前述の機関 26 から報告された高濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて得られた定量値については、 \bar{X} および Z-スコアが管理限界を超え、さらには R 管理図においても管理限界を上回っていた。また、Mon810 系統特異的定量系により得られた定量値の統計解析の結果においては、機関 12 から報告された定量値が \bar{X} および Z-スコアにおいて管理限界を超えており、また、R 管理図においては機関 12 および 21 から報告された定量値が管理限界を上回っていた。これら 2 機関について DNA 抽出の結果をみると、機関 12 については同一の DNA 抽出法を採用した他機関に比べ収量が少なく（高濃度試料から抽出された 9 検体の平均が 12.7 μg ）、また、検体間で DNA 収量が大きく変動していること（相対標準偏差が 30.0%）が観察されており、また、機関 21 については収量にばらつきは認められなかったものの、DNA の質を示す O.D.260/230 の値に明らかな異常（高濃度試料から抽出された 9 検体について O.D.260/230 値の平均が 2.47）が認められた。このように、F を除く機関のうち \bar{X} または Z-スコアが管理限界を超えた機関に共通して、抽出 DNA に問題があると考えられた。機種 F 以外の定量 PCR 装置を使用した場合には、高いラン間再現性が示されているこ

とからも、コピー数の測定に対する定量系の影響は少なく、抽出 DNA 由来の要因は、直接測定値に反映されるものと考えられる。そこで、Mon810 系統特異的定量試験において対象とされた抽出 DNA 9 点から得られた測定値のうち *SSIIB* 測定値を抽出し、相対標準偏差を求め、これを指標として、DNA 抽出の再現性について検討した。その結果、表 16 に示したように、*SSIIB* 測定値の相対標準偏差は機関 21 で 68.5%、機関 26 で 66.2%と非常に大きく、定量 PCR 法における測定値のばらつきからも DNA 抽出の並行再現性（量および質の両面において）に問題があることが明らかとなった（さらに報告データを精査した結果、機関 26 については、報告された定量値の解析方法に誤りが認められており、解析法についても改善が必要である）。一方、機関 12 の相対標準偏差は 28.6%であり、他機関と比較して顕著な差は認められなかった。しかし、先に言及したとおり、DNA 収量および質に日差変動が認められており、O.D.260/280 値が異常に高いと判断される検体が含まれる。また、測定された *SSIIB* の測定値も他の機関に比べ高めの傾向が認められる。これらの点から、抽出法の習熟が不十分であるためにおこる抽出間誤差、DNA 濃度測定、および定量 PCR 法に使用する反応液の調製の不確かさが複合要因となって定量値に影響を与えたものと推察された。

以上のように、F を除く機関を対象とした統計処理において \bar{X} 、Z-スコア、R 管理図で管理限界を上回る定量値を報告した機関に関しては、抽出 DNA の収量あるいは質に問題が認められた。また、DNA 抽出法別にみると、CTAB 法を使用した 4 機関のうち 2 機関が定量値に異常を示した機関に含まれており、いず

れの機関についても抽出 DNA の質が定量 PCR に影響した可能性が考えられた。しかし、DNA 抽出法に CTAB 法を採用した残り2機関の結果からはコピー数も含めて問題は認められていない。先にも言及したが、CTAB 法はシリカゲル膜タイプキット法に比べ操作が煩雑なため、定量 PCR 法に適した DNA(量および質の両方において)を得るには熟練を要する。このため、今回管理限界を上回った参加機関は、CTAB 法を用いた DNA 抽出の経験が不十分あるいは、正確な操作を習得出来ていない可能性が考えられた。

E. 結論

遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810系統)を対象とし、精度管理試験用試料の調製法につき検討を行った。試料の均一性、および安定性について検討を行った結果、十分な妥当性が確認された。

試験的に実施した外部精度管理試験の結果、高濃度試料を対象とした CaM 定量系、および Mon810 特異的定量系を用いた測定において、 \bar{X} および Z-スコアが管理限界を超えた機関が使用していた定量 PCR 装置はいずれも機種 F であり、得られる定量値が定量 PCR 装置依存的に異なる可能性が示唆された。その原因について機種 F の使用に限定すれば、キャピラリー間誤差に比較してラン間誤差が大きかったことから、ラン毎に規定される検量線に誤差が生じていた可能性、および精度管理試験後の調査検討の結果からは、試薬あるいは機器に問題があった可能性が強く示唆された。機種 F を使用した機関以外の機関について統計解析の結果をみると、 \bar{X} 、Z-スコア、R 管理図のいずれかで管理限界を上回った機関においては、全ての機関において抽出 DNA

の収量および質に問題が認められており、これらが主原因となって定量値が影響を受けたものと推察された。

その他としては、DNA 濃度測定に系統的な誤差が疑われる機関、また、機種 D を使用している機関中、定量 PCR 装置の検出器付属部品の劣化によるものと思われるデータの不安定性が示唆される機関が認められており、これらのことも得られる定量値の不確かさを増大させる要因になりうると考えられる。また、本文中では結果に大きな問題がみられた機関 26 についてのみ言及したが、その他複数の機関においても定量値の解析方法に誤りが認められており、これら解析方法についても十分注意する必要があると考える。

通知法を改変させた機関独自の方法を用いて試験を実施している機関も見受けられたが、報告された結果には問題がなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

稲山浩, 渡邊敬浩, 笠間菊子, 松木容彦, 米谷民雄 (2003) 「食品衛生外部精度管理調査研究の概要(第1報)遺伝子組換えトウモロコシ(CBH351)および遺伝子組換えジャガイモ(NewLeaf Plus and NewLeaf Y)の検知用試料の作製と調査成績について」食品衛生研究 54(4) 25-35

Takahiro Watanabe, Hideo Kuribara, Takashi Mishima, Hiroyuki Kikuchi, Misao Kubo, Takashi Kodama, Satoshi Futo, Kikuko Kasama, Akie Toyota, Masanori Nouno, Ayako Saita, Kunihiko Takahashi, Akihiro Hino, Hiroshi Akiyama, Tamio Maitani (2004) 「New Qualitative Detection Methods of

Genetically Modified Potatoes」 Biol Pharm
Bull. 27(9):1333-1339

2.学会発表

渡邊敬浩，穉山浩，米谷民雄，笠間菊子，
松木容彦，児玉貴志，栗原秀夫，日野明寛
(2003)「遺伝子組換え大豆定量検査法の外
部精度管理について」全国衛生化学協議会
第40回年会(和歌山)

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 1-1a. 低濃度試料における均一性の確認 (CaM 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	44000.64	74.33	0.43	1	47498.35	63.00	0.35
2	48476.21	62.82	0.33	2	51941.92	67.70	0.34
3	40458.56	60.25	0.38	3	40207.17	47.27	0.31
4	39588.81	70.18	0.45	4	42983.69	66.33	0.41
5	43292.36	59.18	0.35	5	48042.23	61.86	0.34
6	48299.29	62.76	0.33	6	47913.11	47.90	0.26
平均			0.38	平均			0.33

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.03352	5	0.0067	0.13611	2.6219	4.38737	0.05
グループ内	0.01534	6	0.00256				
全変動	0.04886						

表 1-1b. 低濃度試料における均一性の確認 (Mon810 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	44421.15	69.74	0.41	1	48927.21	57.60	0.31
2	46831.15	58.31	0.33	2	48247.70	48.56	0.26
3	41179.26	66.43	0.42	3	40852.09	58.29	0.38
4	41772.69	55.51	0.35	4	43050.16	67.05	0.41
5	46094.72	59.13	0.34	5	48510.56	43.29	0.23
6	48792.2	73.84	0.40	6	46456.37	58.71	0.33
平均			0.38	平均			0.32

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.03805	5	0.00761	0.33021	1.4462	4.38737	0.05
グループ内	0.03157	6	0.00526				
全変動	0.06962						

表 1-2a. 高濃度試料における均一性の確認 (CaM 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	41689.63	970.35	5.97	1	53249.69	1125.77	5.42
2	45076.5	959.17	5.46	2	44132.68	808.85	4.70
3	41100.66	1057.02	6.59	3	40329.27	851.07	5.41
4	39560.67	1036.56	6.72	4	39622.14	875.99	5.67
5	45949.72	1104.22	6.16	5	45004.22	935.99	5.33
6	46356.42	1037.06	5.74	6	44898.08	879.56	5.02
平均			6.11	平均			5.26

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.044193	5	0.008839	0.074373	3.619939	4.387374	0.05
グループ内	0.01465	6	0.002442				
全変動	0.058842						

表 1-2b. 高濃度試料における均一性の確認 (Mon810 定量系)

測定1				測定2			
検体	SSIIb	MON810	GM (%)	検体	SSIIb	MON810	GM (%)
1	40996.40	829.00	5.32	1	41954.28	786.19	4.93
2	43625.25	763.85	4.61	2	46558.70	771.07	4.36
3	37980.80	759.28	5.26	3	38094.28	852.06	5.89
4	36472.68	785.61	5.67	4	39104.06	818.95	5.51
5	45423.61	831.95	4.82	5	46158.12	857.29	4.89
6	45920.81	776.64	4.45	6	43469.02	833.07	5.04
平均			5.02	平均			5.10

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	P-値	分散比	F境界値	有意水準
グループ間	0.017	5	0.003	0.037	5.014	4.387	0.05
グループ内	0.004	6	0.001				
全変動	0.021						

表 2-1. 試料の安定性確認(低濃度)

		低濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
開始前	1	0.44	0.34	trace
	2	0.42	0.24	trace
	3	0.38	0.45	trace
	4	0.42	0.37	trace
	Mean	0.42	0.35	
	S.D.	0.03	0.09	

		低濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
-20°C 1ヶ月 保存後	5	0.50	0.24	trace
	6	0.44	0.22	trace
	7	0.38	0.33	trace
	8	0.38	0.25	trace
	Mean	0.43	0.26	
	S.D.	0.06	0.05	
	t	0.319	1.812	
	t境界値*	2.447	2.447	

*: 信頼度95%

表 2-2. 試料の安定性確認(高濃度)

		高濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
開始前	1	5.67	4.19	trace
	2	5.40	4.99	trace
	3	5.79	4.92	trace
	4	5.79	4.57	trace
	Mean	5.66	4.67	
	S.D.	0.18	0.37	

		高濃度試料		
		CaM	Mon810	GA21
-20°C 1ヶ月 保存後	5	5.57	4.97	trace
	6	5.30	4.49	trace
	7	5.55	4.73	trace
	8	5.12	4.51	trace
	Mean	5.39	4.68	
	S.D.	0.22	0.22	
	t	1.960	0.035	
	t境界値*	2.447	2.447	

*: 信頼度95%

表3-1. DNAの平均収量とばらつき(高濃度試料9抽出)

機関番号	DNA抽出法	平均収量 (μg)	SD	RSD (%)
1	シリカゲル膜タイプキット法	29.3	7.1	24.2
2	シリカゲル膜タイプキット法	25.6	1.2	4.7
3	シリカゲル膜タイプキット法	22.4	1.0	4.4
4	シリカゲル膜タイプキット法	15.6	3.9	25.2
5	シリカゲル膜タイプキット法	22.2	2.2	9.7
6	シリカゲル膜タイプキット法	20.4	1.3	6.5
7	シリカゲル膜タイプキット法	13.3	3.0	22.4
8	シリカゲル膜タイプキット法	24.5	3.7	14.9
9	シリカゲル膜タイプキット法	13.6	0.7	5.4
10	シリカゲル膜タイプキット法	15.2	3.2	20.8
11	シリカゲル膜タイプキット法	25.3	1.7	6.6
12	シリカゲル膜タイプキット法	12.7	3.8	30.0
13	シリカゲル膜タイプキット法	15.0	4.2	28.1
14	シリカゲル膜タイプキット法	22.6	1.6	7.1
15	シリカゲル膜タイプキット法	20.1	2.5	12.4
16	CTAB法	3.3	0.4	12.9
17	シリカベースレジンタイプキット法	55.6	5.8	10.5
18	シリカゲル膜タイプキット法	23.4	1.0	4.4
19	シリカゲル膜タイプキット法	9.4	1.8	18.8
20	シリカゲル膜タイプキット法	16.0	1.6	9.7
21	CTAB法	3.2	0.1	3.1
22	シリカゲル膜タイプキット法	15.8	1.6	10.0
23	シリカゲル膜タイプキット法	24.0	2.5	10.4
24	シリカゲル膜タイプキット法	25.3	1.3	5.0
25	シリカゲル膜タイプキット法	24.6	1.5	6.3
26	CTAB法	3.0	0.4	13.6
27	CTAB法	15.4	1.2	7.8

表3-2. DNAの平均収量とばらつき(高濃度試料9抽出)

抽出法	採用機関数	平均収量	平均SD	平均RSD(%)
シリカゲル膜タイプキット法	22	19.7	2.4	13.0
CTAB法	4	6.2	0.5	9.4
シリカベースレジンタイプキット法	1	55.6	5.8	10.5

表 4. トウモロコシ定量 PCR 結果 (スクリーニング低濃度)

機関番号	定量PCR装置	CaM定量系			
		1	2	3	平均
1	機種A	0.47	0.42	0.40	0.43
2	機種B	0.32	0.27	0.37	0.32
3	機種A	0.38	0.43	0.34	0.38
4	機種D	0.25	0.24	0.40	0.30
5	機種A	0.49	0.43	0.37	0.43
6	機種F				
7	機種A	0.26	0.31	0.36	0.31
8	機種A	0.26	0.26	0.27	0.26
9	機種A	0.40	0.45	0.45	0.43
10	機種A	0.25	0.28	0.36	0.30
11	機種B	0.34	0.26	0.30	0.30
12	機種E	0.25	0.26	0.33	0.28
13	機種C	0.27	0.31	0.26	0.28
14	機種B	0.25	0.31	0.27	0.28
15	機種B	0.32	0.34	0.33	0.33
16	機種C	0.31	0.29	0.23	0.28
17	機種A	0.27			
18	機種B	0.28	0.38	0.39	0.35
19	機種F	0.36	0.43	0.28	0.36
20	機種D	0.25	0.22	0.27	0.25
21	機種B				
22	機種D	0.43	0.31	0.45	0.40
23	機種A	0.28	0.30	0.29	0.29
24	機種B	0.31	0.27	0.32	0.30
25	機種A	0.42	0.31	0.32	0.35
26	機種D			0.86	
27	機種D	0.41	0.38	0.46	0.42
平均					0.331
SD					0.058

定量下限値以下の定量値については空欄

1	0.43
3	0.38
5	0.43
7	0.31
8	0.26
9	0.43
10	0.30
17	
23	0.29
25	0.35
平均	0.35

4	0.30
20	0.25
22	0.40
26	
27	0.42
平均	0.34

6	
19	0.36
平均	0.36

2	0.32
11	0.30
14	0.28
15	0.33
18	0.35
21	
24	0.30
平均	0.31

13	0.28
16	0.28
平均	0.28

表5. トウモロコシ定量 PCR 結果 (スクリーニング高濃度)

機関番号	定量PCR装置	CaM定量系			
		1	2	3	平均
1	機種A	6.28	5.77	6.21	6.09
2	機種B	5.94	5.53	5.92	5.80
3	機種A	5.68	5.20	5.59	5.49
4	機種D	5.06	5.08	5.49	5.21
5	機種A	5.79	5.20	6.39	5.79
6	機種F	11.36	10.18	10.76	10.77
7	機種A	5.32	4.74	4.51	4.86
8	機種A	4.70	5.25	5.64	5.20
9	機種A	5.60	5.61	5.42	5.54
10	機種A	5.95	6.17	5.73	5.95
11	機種B	5.91	4.53	5.05	5.16
12	機種E	5.76	4.76	4.50	5.01
13	機種C	4.51	5.05	4.84	4.80
14	機種B	5.28	4.29	5.12	4.90
15	機種B	5.19	5.36	5.10	5.22
16	機種C	5.01	4.89	4.55	4.82
17	機種A	5.04	5.09	5.16	5.10
18	機種B	5.61	5.13	5.05	5.26
19	機種F	10.82	10.50	9.62	10.31
20	機種D	5.19	4.46	5.14	4.93
21	機種B	5.16	5.59	4.98	5.24
22	機種D	5.27	5.95	6.29	5.84
23	機種A	5.03	5.30	4.96	5.10
24	機種B	5.19	5.02	5.39	5.20
25	機種A	5.51	4.94	5.52	5.32
26	機種D	8.36	7.90	6.16	7.47
27	機種D	6.30	5.28	5.87	5.82
平均				5.785	
SD				1.478	

機種A

1	6.09
3	5.49
5	5.79
7	4.86
8	5.20
9	5.54
10	5.95
17	5.10
23	5.10
25	5.32
平均	5.44

機種D

4	5.21
20	4.93
22	5.84
26	7.47
27	5.82
平均	5.85

機種F

6	10.77
19	10.31
平均	10.54

機種B

2	5.80
11	5.16
14	4.90
15	5.22
18	5.26
21	5.24
24	5.20
平均	5.25

機種C

13	4.80
16	4.82
平均	4.81

表6. Mon810 系統特異的試験結果

機関番号	定量PCR装置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均
1	機種A	5.86	8.18	5.85	5.53	6.37	6.27	5.69	6.34	6.26	6.04
2	機種B	5.11	4.95	5.11	6.10	4.54	5.08	4.61	5.00	4.81	5.03
3	機種A	5.99	5.73	5.38	6.31	5.91	5.95	6.26	6.03	6.44	6.00
4	機種D	5.40	4.82	4.65	4.56	4.37	4.49	4.50	4.79	4.50	4.68
5	機種A	6.96	6.45	6.15	6.60	6.44	6.21	5.63	5.82	5.92	6.24
6	機種F	7.55	8.14	8.31	7.51	8.25	7.55	7.53	6.77	8.16	7.53
7	機種A	4.31	4.12	5.08	4.74	5.07	4.61	5.25	5.18	4.68	4.78
8	機種A	6.36	5.55	6.01	6.06	6.25	5.66	5.97	5.95	5.75	5.95
9	機種A	5.26	6.09	5.29	5.38	5.47	5.46	5.73	5.54	5.33	5.51
10	機種A	5.69	5.07	5.06	5.69	6.00	5.37	5.12	5.45	5.38	5.43
11	機種B	5.53	5.67	5.17	5.08	5.69	5.19	5.89	5.14	4.77	5.35
12	機種E	5.76	6.47	5.83	9.10	6.87	5.76	5.67	9.83	7.91	7.02
13	機種C	4.39	4.58	4.89	4.72	5.21	4.89	5.63	5.31	4.78	4.93
14	機種B	5.58	5.96	5.91	5.60	5.43	5.97	6.52	6.05	5.60	5.85
15	機種B	5.34	5.62	5.77	5.13	5.47	5.60	5.09	5.36	4.92	5.37
16	機種C	5.38	5.24	5.08	5.45	5.47	5.02	4.94	5.12	5.76	5.27
17	機種A	5.65	5.41	4.66	4.90	5.40	5.42	4.08	5.34	5.13	5.11
18	機種B	5.89	5.64	6.75	5.66	5.63	5.72	6.33	5.26	5.05	5.77
19	機種F	9.37	9.43	9.53	8.89	8.99	13.28	14.31	14.05	13.99	11.32
20	機種D	4.91	4.76	4.17	4.07	4.03	4.23	4.89	4.21	3.92	4.35
21	機種B	4.98	6.00	5.68	5.96	9.45	5.79	5.69	5.77	4.35	5.96
22	機種D	5.48	5.28	4.74	6.32	4.70	4.83	5.13	4.92	4.22	5.07
23	機種A	5.79	5.27	6.08	5.57	6.00	5.85	5.54	6.48	6.23	5.87
24	機種B	5.88	6.20	4.43	5.11	5.60	4.66	5.18	6.34	5.34	5.42
25	機種A	5.75	5.11	5.61	5.19	5.52	5.13	5.70	5.63	5.71	5.48
26	機種D	5.35	3.80	4.82	6.31	5.38	5.28	6.17	4.91	5.64	5.30
27	機種D	5.59	4.45	4.29	4.96	4.13	3.93	5.21	4.82	4.89	4.70
平均											5.753
SD											1.309

1	6.04
3	6.00
5	6.24
7	4.78
8	5.95
9	5.51
10	5.43
17	5.11
23	5.87
25	5.48
平均	5.64

4	4.68
20	4.35
22	5.07
26	5.30
27	4.70
平均	4.82

6	7.53
19	11.32
平均	9.43

2	5.03
11	5.35
14	5.85
15	5.37
18	5.77
21	5.96
24	5.42
平均	5.54

13	4.93
16	5.27
平均	5.10

機関番号	ラン間再現性 (3ラン間の相対標準偏差%) ¹⁾				DNA抽出の再現性 (9抽出間の相対標準偏差%) ²⁾	
	抽出1	抽出2	抽出3	平均		
1	5.6	4.7	6.2	5.50	21.5	
2	3.7	7.1	3.2	4.67	10.0	
3	1回のみ測定				2.8	
4	4.5	9.4	9.5	7.80	22.8	
5	3.0	7.0	7.6	5.87	9.9	
6	56.8	53.8	48.5		7.0*	
7	23.6	24.4	10.7	19.57	7.3	
8	5.9	10.3	7.2	7.80	9.5**	
9	4.5	5.3	6.2	5.33	4.2	
10	4.6	10.4	2.6	5.87	24.3	
11	6.7	6.3	5.3	6.10	10.3	
12	8.3	14.3	12.0	11.53	28.6	
13	2回のみ測定				37.1	
14	5.3	3.8	2.1	3.73	5.5	
15	0.9	4.4	7.2	4.17	26.9	
16	5.7	14.5	6.3	8.83	7.9	
17	8.8	6.3	9.8	8.30	12.6	
18	4.7	6.7	9.4	6.93	6.6	
19	40.3	38.5	28.9		18.1*	
20	5.7	7.0	2.8	5.17	6.4	
21	2回のみ測定				68.5	
22	8.8	15.4	11.0	11.73	18.1	
23	1.8	2.7	2.3	2.27	10.5	
24	2回のみ測定				11.4	
25	5.2	6.7	6.9	6.27	4.3	
26	99.2	87.1	92.5		66.2	
27	6.1	18.1	5.0	9.73	12.0	
機種Fおよび機関26 ³⁾ を除いた機関についての				平均	7.36	*:n=5
				標準偏差	3.78	**n=8

表7. トウモロコシ定量PCR SSIIb の測定値を指標とした再現性の検討

- 1) スクリーニング定量(CaM, GA21)、Mon810系統特異的定量で得られたSSIIbのコピー数から計算 (3ラン実施した機関についてのみ算出)
- 2) Mon810系統特異的定量で得られたSSIIbのコピー数から計算
- 3) 他の機関の値と大きく異なるため除外した