

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－

An Outline of External Quality Assessment for Food Hygiene

－ In the Reference to Qualitative Test for *Salmonella* spp. and its Investigation Results －

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
食品衛生外部精度管理調査事業部

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

Division of External Quality Assurance for
Food Hygiene
Hatano Research Institute, Food and Drug
Safety Center

Yukio OHSHIMA, Tatsuya SUZUKI,
Ken-ichi YAMADA, Megumi TAKANO,
Nanami YAMAMOTO, Kyoko SUZUKI,
Masaru KAWASAKI, Yasuhiko MATSUKI

はじめに

食品衛生外部精度管理調査の実施に当たりその対象となる微生物検査は、「食品の汚染指標菌」や「食品を起源として発生する感染症の起因菌（病原微生物）」がその主たる対象の微生物として挙げられる。現在までのところ特定微生物検査のための調査試料として、大腸菌群検査用、大腸菌検査用、サルモネラ属菌検査用、ならびに黄色ブドウ球菌検査用試料の4種類を用いてきた。大腸菌検査に関する食品衛生外部精度管理調査については、本誌7月号（Vol.53, No.7, 2003）で過去2年間の調査結果とその概要について解説した。本稿では、平成13年度より開始されたサルモネラ属菌検査にかかわる食品衛生外部精度管理調査について、その概要と今後の外部精度管理調査を進める上でのサルモネラ属菌検査における注意点について概説する。

調査にあたっては模擬食材のカテゴリーの指定を平成13年度は「食肉製品」、平成14年度は「加

熱食肉製品（加熱殺菌後包装）」とし、それぞれに対応するサルモネラ属菌の検査法は、各機関で作成されている標準操作手順書（SOP）に従って実施することとした。なお、サルモネラ属菌検査の外部精度管理調査に当たっては実施に先駆け、平成11年度に、各検査機関で日常検査に用いられているサルモネラ属菌の検査方法についてアンケート形式により調査した。検査対象食材のカテゴリーを指定せずにアンケート調査を実施したため、食材別の記載による回答は得られていないが、参加機関の多くは、ほぼ共通の検査手順を採用していることが確認されたことから、平成13年度以降のサルモネラ属菌検査にかかわる外部精度管理調査試料の配布においては、従来の調査試料のように参加機関すべてが共通菌種で作製した同一の組合せ試料に代えて、複数菌種による異なった組合せの調査試料を配布する新たな方式に変更することとした。また、表1に平成11年度に実施したアンケート調査をもとに、各検査機関の日常検査で用いられている試薬と培地を示した。

表1 サルモネラ属菌検査に関するアンケート調査結果 (平成11年度実施)

検体の採取量	採用施設数
1) 25g	241
2) 10g	20
3) その他 (5g, 20g, 50gなど)	10
第一段階：前増菌培養と使用培地	採用施設数
1) EEM ブイヨン	229
2) 緩衝ペプトン水 (FeSO ₄ · 7H ₂ O 添加, L-システイン添加緩衝ペプトン水を含む)	75
3) その他 (サルモシスト, 乳糖ブイヨン, トリプトソイ培地, ハートインフュージョンブイヨン, 乾燥ブイヨンなど)	8
第二段階：増菌培養と使用培地	採用施設数
1) ラバポート培地 (ラバポートバシリアディス, RVSを含む)	131
2) セレナイト培地 (セレナイトシスチンを含む)	107
3) SBG培地 (SBGスルファ, 亜セレン酸加SBGを含む)	81
4) ハーナ・テトラチオン酸培地	55
5) テトラチオネート培地	50
6) その他 (HAAなど)	
第三段階：分離培養と使用培地	採用施設数
1) DHL寒天培地	194
2) MLCB寒天培地	154
3) SS寒天培地 (SS-SB寒天培地を含む)	55
4) クロモアガーランパック寒天培地	30
5) XLD寒天培地	16
6) プリリアントグリーン寒天培地 (BGM, BGSを含む)	32
7) その他 (SMID, SSB, ESサルモネラ, 合成基質培地など)	23
簡易同定キット使用の有無とキットの種類	採用施設数
1) 使用する (API20E, IDテストEB20, バイオテスト1号, エンテオグラム, BBL CRYSTAL E/NF, エンテロチューブ, VITECなど)	159
2) 使用しない	108
血清型別の実施と使用血清	採用施設数
1) 実施する (O血清・H血清・Vi血清を用いた凝集反応, ラテックス凝集反応など, O血清による凝集反応の実施施設が多い)	223
2) 実施しない	44

回収アンケート数 271施設

I 調査試料作製法の検討とその確認試験

1 試験菌株および接種菌液調製

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所保存の *Salmonella* Typhimurium HIC12041, *Salmonella* Enteritidis HIC12042 と *Proteus Mirabilis* HIC 12051 を試験菌株として用いた。なお、試験菌液

の調製に当たっては、調製するつど、試験菌株の生化学的性状を確認し、いずれの菌株も *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* および *P. Mirabilis* の性状を示す菌株であることを確認した後、菌液調製を実施した。なお、今回試験菌として用いた *S. Typhimurium* は、硫化水素産生能、ならびに MLCB 寒天培地上での発育能が比較的弱いことが確認されている菌株を採用した。

いずれの菌株もソイビーン・カゼイン・ダイジ

表2 低温保存によるマッシュポテト基材中での *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis および *Proteus* *Mirabilis* の生菌数の推移

接種菌	接種菌数	No.	保存日数 (低温保存 10℃以下)			
			接種直後	Day 7	Day14	Day21
<i>Salmonella</i> Typhimurium HIC12041	2.5×10^6	1	2.5×10^6	6.8×10^6	6.0×10^6	4.4×10^6
		2	6.3×10^6	4.0×10^6	4.5×10^6	3.9×10^6
	2.5×10^4	3	6.2×10^4	2.2×10^4	1.8×10^4	2.1×10^4
		4	6.1×10^4	5.7×10^4	3.1×10^4	2.7×10^4
<i>Salmonella</i> Enteritidis HIC12042	8.3×10^5	5	2.1×10^6	7.6×10^5	7.6×10^5	1.6×10^6
		6	9.7×10^5	8.2×10^5	3.0×10^5	2.5×10^5
	8.3×10^3	7	9.9×10^3	1.9×10^3	2.1×10^3	6.0×10^3
		8	8.3×10^3	2.2×10^3	1.6×10^3	1.7×10^3
<i>Proteus</i> <i>Mirabilis</i> HIC12051	5.8×10^6	9	6.1×10^6	6.0×10^6	4.5×10^6	3.8×10^6
		10	7.7×10^6	5.6×10^6	5.6×10^6	4.0×10^6
	5.8×10^4	11	7.3×10^4	4.0×10^4	2.6×10^4	2.3×10^4
		12	4.3×10^4	5.0×10^4	3.1×10^4	2.7×10^4

表中の数値はマッシュポテト基材 1 g あたりの生菌数を示す。

エスト培地に移植して 32.5 ± 2.5 ℃で 24 ± 2 時間培養した後、滅菌生理食塩液に懸濁して十分攪拌、均一化し、最終菌液濃度が約 1.0×10^8 colony forming units (cfu) /mL となるように調製したものを試験菌液とした。

2 基材調製と調査試料の作製

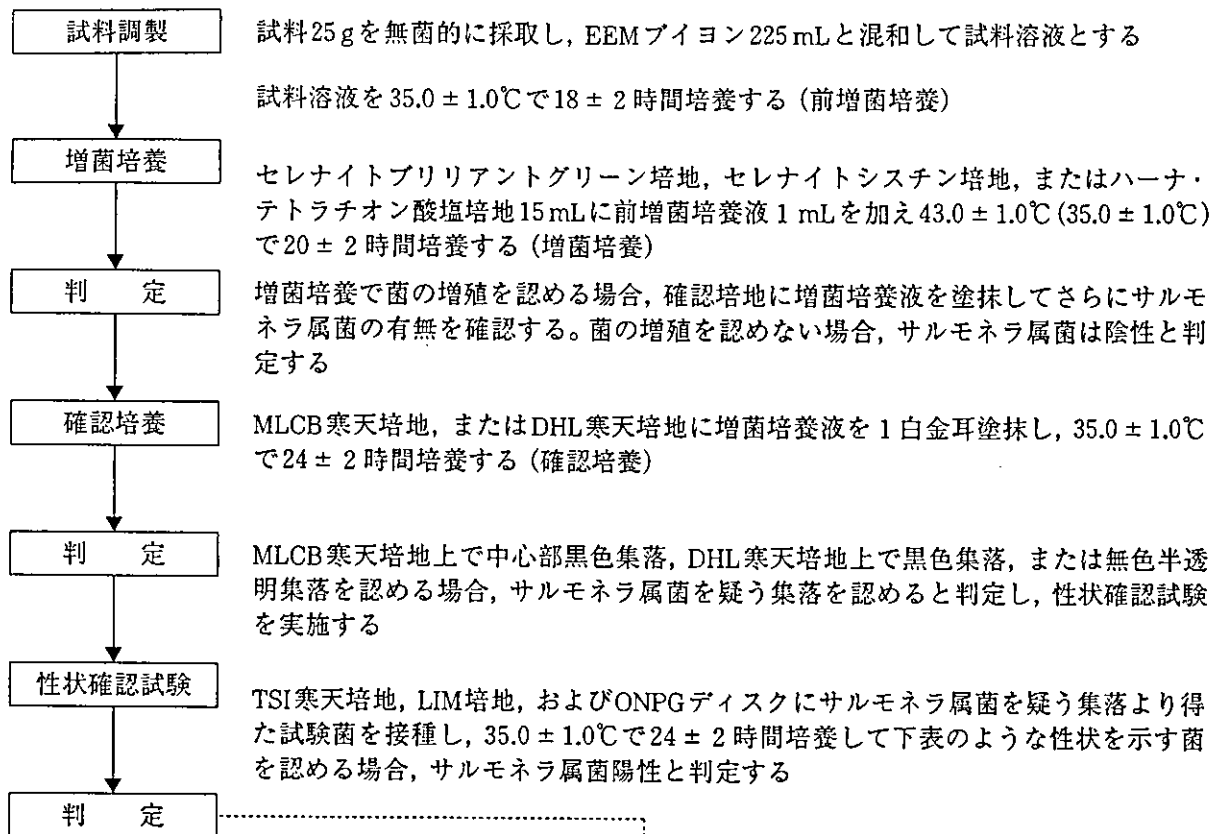
市販のマッシュポテト (粉末) を用いて調査試料の基材を調製した。マッシュポテト 1 容量に対して安定化剤を含む生理食塩液 5 容量の比で混合し、十分攪拌して基材とした。基材 50 g を試料瓶に分取して 121℃で 30 分間、高圧蒸気滅菌処理して調査試料用基材とした。調査試料用基材 50 g に対して試験菌液 0.5 mL (最終菌液濃度が約 1.0×10^6 cfu/g) を添加し、試験菌液と基材が均一になるように滅菌攪拌棒を用いて十分攪拌して調査試料を作製した。

3 調査試料中の試験菌の生残菌数

調査試料を 3 週間低温室 (約 5℃下) に保存し、試験菌の生残菌数を測定して、試料中の試験菌についてその安定性を確認した。生残菌数測定は、試験菌接種直後、および毎週 1 回、3 週目まで試料瓶よりマッシュポテト 10 g を無菌的に採取し、滅菌リン酸緩衝液 90 mL に加えて測定溶液を作製して、標準寒天培地を用いた寒天平板混釈法により測定を行った。測定結果より調査試料中の生残菌数を算出して、試験菌の低温保存における安定性を確認した (表 2)。

4 調査試料からのサルモネラの検出確認

調査試料 25 g を無菌的に採取し、EEM ブイヨン (または、緩衝ペプトン水) 225 mL に加えて、ストマッカー処理し、得られた溶液を測定溶液とした。



TSI寒天培地				
培地	項目	陽性	陰性	判定
斜面部	乳糖／白糖分解	黄色	無変化	-
高層部	ブドウ糖分解	黄色	無変化	+
	硫化水素産生	黒色	無変化	+*1
	ガス産生	気泡／亀裂	無変化	+/-

LIM寒天培地				
培地	項目	陽性	陰性	判定
高層部	リジン脱炭酸	紫色	黄色	+
	運動性	混濁	無変化	+/-
試薬部	インドール産生	赤色	無変化	-

*1: 多くは陽性 (+), 一部陰性 (-)

図1 非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品、加熱食肉製品（加熱殺菌後包装）のサルモネラ属菌検査法（定性試験）（公定法）

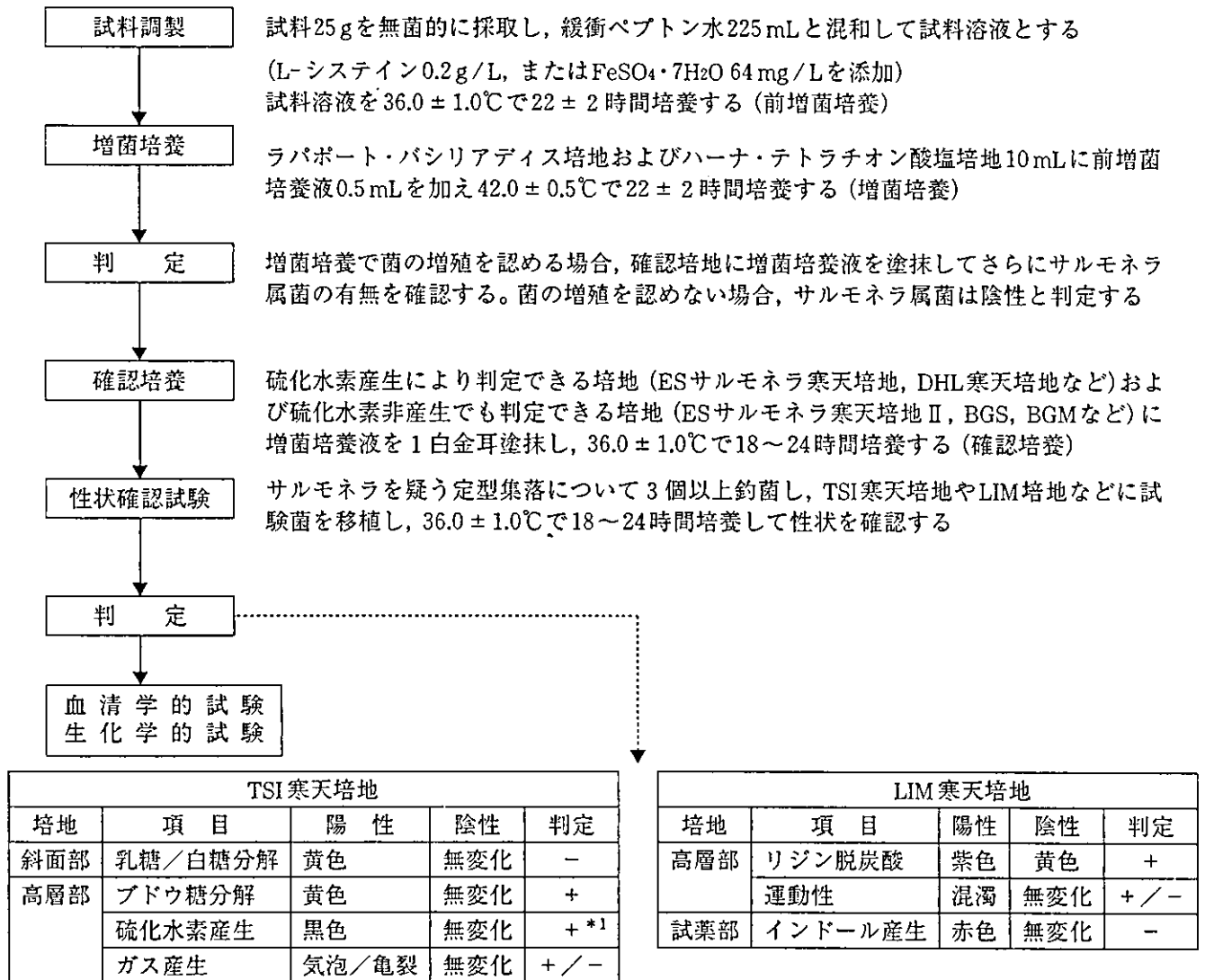
この測定溶液を用いたサルモネラ属菌の検査法は、「非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品、加熱食肉製品（加熱殺菌後包装）のサルモネラ属菌検査法（公定法，図1）」，ならびに「液卵からのサルモネラ属菌検査法（公定法，図2）」をサルモネラ属菌の検出確認の手順として併用した。各種培地中での増殖確認ならびに確認培地上での発育集落の観察を行い，確認培地上に発育したサルモネラ属菌の性状を示す集落については，簡易同定キットを用いてその生化学的性状の確認を行った。なお，

対照として使用した *P. Mirabilis* についても同様の手順で検出の有無を確認した。この操作を生残菌数測定と同様に低温保存3週目までサルモネラ属菌の検出の可否について毎週確認した。また，低温保存3週目の確認結果を表3に示した。

II 調査の実施

1 調査試料の組合せ

サルモネラ属菌検査の外部精度管理調査に当た



*1: 多くは陽性 (+), 一部陰性 (-)

図2 液卵からのサルモネラ属菌検査法 (定性試験) (公定法)

っては、調査開始に先駆け各検査機関で実施されているサルモネラ属菌の検査手順についてのアンケート調査 (平成11年度実施) を行い、SOPにどのような方法が採用されているかを調査した。その結果、検査試料によって各機関で採用されている検査手順は、ほぼ同様であり「食肉検査の場合」と「液卵検査の場合」とに大別されて作成されていた。これまで実施した特定微生物検査 (大腸菌群検査, 大腸菌検査, 黄色ブドウ球菌検査) の調査試料については、「陽性試料と陰性試料を1組」として各検査機関すべてに同一の組合せで調査試

料を配布していたが、サルモネラ属菌検査については調査試料を2種の組合せで作製し、参加機関を無作為に2群に分けた後、配布した。

すなわち、平成13年度は1種の定型サルモネラ属菌を用い、配布試料の組合せとしては、組合せ1「容器番号1: *S. Enteritidis*, 容器番号2: *P. Mirabilis*」と組合せ2「容器番号1: *S. Enteritidis*, 容器番号2: *S. Enteritidis*」を作製し、グループI (174施設; 組合せ1) とグループII (173施設; 組合せ2) の2群にそれぞれの調査試料を配布した。

平成14年度は、参加機関の希望も考慮して平成

表3 前増菌培地、増菌培地および確認培地での *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Proteus Mirabilis* の発育確認試験成績 (低温保存3週目)

No.	EEM ブイヨン									緩衝ペプトン水								
	ラバポート培地			セレナイトシスチン培地			テトラチオネート培地			ラバポート培地			セレナイトシスチン培地			テトラチオネート培地		
	BGA	XLD	MLCB	BGA	XLD	MLCB	BGA	XLD	MLCB	BGA	XLD	MLCB	BGA	XLD	MLCB	BGA	XLD	MLCB
1	+	+	+	+	+	±	+	+	±	+	+	-	+	+	±	+	+	±
2	+	+	+	+	+	±	+	+	±	+	+	-	+	+	±	+	+	±
3	+	+	+	+	+	±	+	+	±	+	+	-	+	+	±	+	+	±
4	+	+	+	+	+	±	+	+	±	+	+	-	+	+	±	+	+	±
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
10	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
11	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
12	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-

表中のNo.は、表2のNo.と同じものを示す。

EEM培地または緩衝ペプトン水で前増菌培養を行い、引き続きラバポート培地、セレナイトシスチン培地およびテトラチオネート培地で増菌培養を実施する。

増菌培養後、培養液1白金耳をBGA培地、XLD寒天培地、MLCB寒天培地に塗抹して培養する。

「-は、集落形成を認めない、±は、無色の発育集落を認める、+は、XLD寒天培地またはMLCB寒天培地上で黒色の集落を認め、BGA培地では赤変を認める」をそれぞれ示す。なお、BGA培地およびXLD寒天培地は、24～48時間培養後に判定し、MLCB寒天培地では24時間培養後に判定した。

13年度より一步踏み込んだ調査を試みることにし、非定型サルモネラ属の菌株を加えて調査試料を作製した。調査試料は、一次評価試料として *S. Enteritidis* (定型サルモネラ属菌株) を添加した試料を作製し、すべての参加機関に対し共通に評価できる調査試料 (容器番号1) とした。二次評価試料としては、*P. Mirabilis* と *S. Typhimurium* の2種を別々に調製した調査試料 (容器番号2) を作製した。すなわち、組合せ1「容器番号1：*S. Enteritidis*, 容器番号2：*P. Mirabilis*」と組合せ2「容器番号1：*S. Enteritidis*, 容器番号2：*S. Typhimurium*」の2組の調査試料を作製し、平成13年度と同様に参加機関を無作為にグループA (139施設；組合せ1) とグループB (139施設；組合せ2) の2群に分けて調査した。

2 調査試料の配布および検査方法

実施年度の初めに実施項目と配布予定日のお知らせ、ならびに参加の申込みを行い、平成13年度は347施設、平成14年度は278施設がサルモネラ属菌検査に参加した。各参加機関に対して検査関連書類およびサルモネラ属菌検査用調査試料2本/1組をクール宅急便にて郵送し、試験開始前まで冷凍を避けて低温保存を指定した。なお、調査試料は金曜日に期日指定 (翌週月曜着) で発送し、週の初めから試験が開始できるように配慮した。また、平成13年度実施については、調査試料に複数の組合せがあることはあらかじめ参加機関に連絡せずに実施した。平成14年度については検査関連書類に複数の組合せがあることを明記した。調査

試料は、単独菌接種で作製し、試料瓶には識別番号を記載したラベルを貼って区別した（前述調査試料の組合せ参照）。なお、調査試料は、前項に示した方法に従い作製し、作製時と配布後4週間目（低温保存）に調査試料中の生菌数測定、ならびに試験菌の検出確認を行い、調査試料の有効性を確認した。

サルモネラ属菌検査の方法は、特に指定せず、模擬食材のカテゴリーを指定することで、各機関が独自に作成しているSOPに従って実施することを明記した。

3 結果報告と評価方法

調査試料配布後、各機関に速やかに検査を実施されるようお願いし、調査試料の受領日、検査開始および終了日、検査担当者の経験年数、検査経過記録（検査手順の概略など）を記載した書式、検査結果の報告書、ならびに調査試料に関する意見やアンケートなどを指定期日までに結果報告する形式を採用した。検査結果については、調査試料番号（No.1およびNo.2について）ごとにサルモネラ属菌の陽性または陰性の別を記載して結果報告することとした。

検査結果の評価は、調査試料該当番号がサルモネラ属菌の陽性・陰性の判定で適・不適とした。しかしながら、検査結果の報告に誤りがあった場合は、採用した試験方法の確認、ならびに試験方法によるものなのか、試料の取り違いなどによるものなのか、または記載ミスによるもののかなどできるだけ経過記録書を参考に誤りの箇所を確認することとした。なお、調製した調査試料に関する情報、報告された経過記録書、ならびに検査成績に関する資料を評価委員会（外部の専門委員と厚生労働省から構成）に提出して最終評価を行った。参加機関に対する評価結果の報告は、年度ごとに全体の調査結果（食品衛生外部精度管理調

査結果報告書^{1, 2)}）および個別評価結果表（必要に応じてコメントを付けて）を送付した。

III 調査試料の確認結果と調査成績

1 調査試料作製および試験菌の検出確認結果

調査試料中の*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* および *P. Mirabilis* の生残菌数を測定した結果、試験に用いたいずれの試験菌株も添加直後の生菌数に比べ低温保存3週後ではわずかな生菌数の減少を認めるが、接種菌数とほぼ同等の生菌数の回収量が確認され、マッシュポテト基材中で比較的安定した生残菌数で推移した（表2）。

EEM ブイヨン（および緩衝ペプトン水）で $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間前増菌培養した後、ラポポート培地、セテナイトシスチン培地およびテトラチオネート培地のそれぞれに各前増菌培地1.0mLずつを加えて $42.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間増菌培養を行い、さらに分離培地ブリリアントグリーン寒天培地、XLD寒天培地およびMLCB寒天培地のそれぞれに各増菌培養液を1白金耳塗抹して $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養により試験菌の検出確認を行った。前増菌培養、ならびに増菌培養において各試験菌は、十分な発育を示したが、確認培地上での試験菌の発育は菌種間で相違が認められた（表3）。すなわち、*S. Enteritidis*（定型菌種）接種試料では、公定法（図1）^{3, 4)} に記載されているいずれの培地を選択しても定型集落として検出可能であったが、*S. Typhimurium*（非定型菌種）接種試料では、確認培地にMLCB寒天培地のみを使用して検査をした場合、検出できないことが多く、複数の確認培地を併用することが適切であった（表3）。これらの結果よりマッシュポテトを基材とした調査試料は、模擬食材として調査試料に使用可能であると判断し、これらを用いて

表4 サルモネラ属菌検査における検体の採取量、使用培地、同定試験ならびに血清型別について（平成14年度実施）

検査検体の採取量		グループA (139施設)	グループB (139施設)
25g採取		125	129
その他(10g, 5g, 2g, 1g)		14	10
培養段階	培地の種類	グループA (139施設)	グループB (139施設)
第一段階 前増菌培養	EEMブイヨン	126	113
	緩衝ペプトン水	11	21
	前増菌培養を実施せず	2	5
第二段階 増菌培養	セレナイトシスチン培地(セレナイト培地を含む)	57	52
	ハーナ・テトラチオネート培地(テトラチオネート培地を含む)	37	33
	ラバポート培地(ラバポート-バシリアディスを含む)	29	37
	セレナイトプリリアントグリーン培地(SBGスルファ, 亜セレン酸加SBGを含む)	27	31
第三段階 確認培養	DHL寒天培地	109	103
	MLCB寒天培地	81	70
	クロモアガーサルモネラ寒天培地	29	25
	SS寒天培地(白糖加SS寒天培地を含む)	16	13
	プリリアントグリーン寒天培地(BGS, BGMを含む)	7	6
	XLD寒天培地	7	10
	その他(ESサルモネラ, ランバック, SMIDなど)	14	23
その他の項目	簡易同定キットおよび血清などの種類	グループA (139施設)	グループB (139施設)
同定試験の実施施設	簡易同定キット(API20E, ID32E API, IDテストEB20, パイオテスト1号, エンテオグラム, エンテロチューブ, BBL CRYSTAL E/NE or TM RS/E, VITECなど)	97	79
血清型別の実施施設	O血清による凝集反応, ラテックス凝集反応など	46	50
その他	PCR法によるサルモネラの確認	1	2

増菌培養ならびに確認培養では、複数培地の選択による検査の実施も含む。

平成13, 14年度食品衛生外部精度管理調査を実施した。また、接種菌数は、基材1gあたり 10^4 cfuレベルでも検出可能であったが、輸送による影響を考慮して 10^6 cfuレベルの接種とした(表3)。

2 参加機関で採用された検査方法 および検査結果

サルモネラ属菌検査の外部精度管理調査に参加した検査機関は、平成13年度が347施設、平成14年度が278施設であり、これらの施設の調査結果をまとめた。

調査試料について模擬食材のカテゴリーを指定した結果、平成13, 14年度のいずれの年度においても、検査機関の多くが「非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品、加熱食肉製品(加熱殺菌後包装)のサルモネラ属菌検査手順(公定法)」に準拠して検査を実施していた。また、検査機関によっては、血清学的検査(O血清によるためし凝集反応など)や簡易同定キットを用いた生化学的性状検査結果をもとに最終的に検査結果の判定を行っていた(表4)。

平成13年度は、グループI(174施設)では、

S. Enteritidis と *P. Mirabilis* を含む調査試料 (No. 1 陽性, No. 2 陰性) を, またグループⅡ (173 施設) では, ともに *S. Enteritidis* を含む調査試料 (No. 1 陽性, No. 2 陽性) についての調査結果は, すべての参加機関 (347 施設) で正しい回答が示されていた。

平成 14 年度は, グループ A (139 施設) では, *S. Enteritidis* と *P. Mirabilis* を含む調査試料 (No. 1 陽性, No. 2 陰性) を, またグループ B (139 施設) では, *S. Enteritidis* と *S. Typhimurium* を含む調査試料 (No. 1 陽性, No. 2 陽性) とそれぞれ菌種を変えた調査試料として配布した。報告された調査結果は, 一次評価試料 (グループ A, B 共通の定型サルモネラ属菌を添加した試料: *S. Enteritidis*) については, ほぼ全参加機関が正しい回答を示していたが, 2 施設のみが誤った報告であった。二次評価試料については, グループ A (サルモネラ属菌以外の試験菌を添加した試料: *P. Mirabilis*) では 139 施設中 1 施設のみ誤って解答を報告し, グループ B (非定型サルモネラ属菌を添加した試料: *S. Typhimurium*) を配布した施設では, 139 施設中 32 施設で誤った解答を報告し, 正解率 77% と低い結果であった。一次評価試

料 (No. 1) と二次評価試料 (No. 2) についてともに誤った回答を示した施設が, 全参加施設中 1 施設であった。グループ B の二次評価試料について誤った回答を示した施設では, 確認培地に MLCB 寒天培地 1 種のみを採用して判定している施設が多く見受けられた。また, 検査経過記録書を見ると, 検査結果を誤って判定したと思われる施設も数施設あった。

Ⅳ 考 察

平成 13, 14 年度の 2 年間では, マッシュポテト基材を用いた調査試料を模擬食材とし, 模擬食品のカテゴリーを指定することで食品衛生外部精度管理調査を実施した。また, 検査検体としては, 両年度とも食肉製品 [または加熱食肉製品 (加熱殺菌後包装)] をそのカテゴリーとして検査するよう指定した。さらに, サルモネラ属菌検査においては, 日常実施している検査手順 (標準操作手順書 SOP) に従って実施することとし, 添付資料には当方からの検査方法の指定は行わず, それぞれの機関の SOP に従って実施することを記載した。

検査検体を食肉製品のカテゴリーとして指定した場合には, 基本的には第一段階として EEM プ

最新刊

HACCPの現状とQ&A

HACCPの問題点とたいへん役立つ270問のQ&A

HACCPシステムを推進するために企業の中での勉強会用として、また企業の経営者における衛生管理の認識を再確認するためにも重要な一冊です。

- ◇編集 小久保 彌太郎
- ◇体裁 A4判 130ページ
- ◇定価 2,500円(本体価格+税)
- ◇送料 390円

社団法人 日本食品衛生協会

TEL 03-3403-2114
FAX 03-3403-2384・2946

イオンによる前増菌培養，第二段階としてセレナイトブリアントグリーン培地，セレナイトシスチン培地またはハーナ・テトラチオン酸培地などの内1種の増菌培地を選択した増菌培養，第三段階としてMLCB寒天培地またはDHL寒天培地などの内1種の確認培地を用いた確認培養が行われ，サルモネラ属菌を疑う集落についてTSI寒天培地やLIM寒天培地，ONPGディスクなどを用いた性状確認試験，判定といった一連の手順（公定法，図1）となる。また，血清学的試験や生化学的試験が実施される。平成11年度にサルモネラ属菌の検査方法に関するアンケート調査を実施した結果，検査機関の多くが公定法に従って，それぞれ同様の検査手順（表1）を採用していることが明らかとなったため，平成13，14年度のサルモネラ属菌検査にかかわる外部精度管理調査試料の配布に当たっては，新たに複数の組合せを採用することとした。

平成13年度実施の調査においては，定型のサルモネラ属菌株とサルモネラ属菌以外の菌株を用いた組合せで，かつ，調査試料中には高濃度の試験菌（最終濃度約 10^6 cfu/g）を接種した試料であったためか，試験菌の検出が比較的容易，検査結果もきわめて良好であり，すべての参加機関が正解を報告した。試験菌株として用いた*S. Enteritidis*は，表3にも示したように公定法に例示されている前増菌培地，増菌培地，確認培地いずれの組合せを採用しても検出可能であり，増菌培地，確認培地をそれぞれ1種のみを採用で実施しても判定可能である。このことから，各施設とも公定法による「食肉製品のサルモネラ属菌検査法（図1）」に記載されている手順で十分良好な検査成績が得られたものと判断された。一方，平成13年度調査時の調査試料に関するアンケートにおいて，複数の組合せ試料で調査をする場合，異なった菌種の組合せや非定型のサルモネラ属菌（硫化水素非産

生菌など）の採用を検討してほしいとの強い要望が多数寄せられ，さらに平成13年度の結果（正解率100%）を加味して，平成14年度は，試験菌株として定型のサルモネラ属菌の性状を示す菌種（*S. Enteritidis*）と非定型の菌種（*S. Typhimurium*）の2種の組合せ試料を作製して調査することとした。

平成14年度の調査結果における定型のサルモネラ属菌の性状を示す菌種（*S. Enteritidis*）やサルモネラ属菌以外の菌種（*P. Mirabilis*）を用いた調査試料に対する回答は，期待通り平成13年度と同様にほぼ100%に近い正解率を示したが，非定型のサルモネラ属菌（*S. Typhimurium*）を用いた調査試料では正解率が77%と低い結果であった。後者の正解率が低かった原因として，①食肉製品のサルモネラ属菌検査法（公定法，図1）では，採用される選択増菌培地，確認培地について複数種培地の選択の記載がないこと，②公定法に記載されている確認培地（MLCB寒天培地，DHL寒天培地）には硫化水素産生菌をおもな検査対象菌として確認する手順になっていることなどが主要因と考えられた。加えて，前述のように今回用いた*S. Typhimurium*は，MLCB寒天培地のみを採用して確認培養を行った場合，検出できない可能性のある菌種であった（表3）。したがって，食肉製品のサルモネラ属菌の検査についても「液卵のサルモネラ属菌検査（公定法，図2）⁵⁾」と同様に，非定型サルモネラ属菌（硫化水素非産生菌など）の検出を考慮した複数の増菌培地，ならびに確認培地を選択する検査手順の記載があれば誤った回答は少なかったものと推察する。実際，正解を報告した検査機関の検査実施報告書を詳細に見ると，複数の培地を採用して検査を行い，正解を得ている施設が多く見受けられる。

後藤らの報告⁶⁾によれば，「食肉のサルモネラモニタリング」においてサルモネラ属菌検査法を

採用した場合、硫化水素産生サルモネラ属菌の検出は米国農務省（FSIS）の示す方法とほぼ同等の検出率であるが、硫化水素非産生サルモネラ属菌の検出ではFSISの示す方法に比べ検出率が低いことがすでに示されている。平成13、14年度実施の外部精度管理調査成績は、後藤らの報告結果を正に反映している結果と考えられる。したがって、「食肉製品のサルモネラ属菌検査（公定法，図1）」においても「液卵のサルモネラ属菌検査（公定法，図2）」のように硫化水素非産生サルモネラ属菌のような非定型の菌種も考慮して複数の培地を組み合わせて選択する検査手順の導入が必須であると考えられる。

V おわりに

サルモネラ属菌検査の外部精度管理調査では、食材のカテゴリの指定により採用される検査方法がほぼ同一であること、指定した菌の有無を判定する定性的検査であることから、複数の組合せ調査試料を導入することでこれまでより高いブラインド性を持たせた調査を試みた。そのため、参加機関を無作為に2グループに分け、調査試料も2種の組合せを作製して実施した。過去2年間、食肉製品として食材のカテゴリを指定し外部精度管理調査を実施したが、定型のサルモネラ属菌の検査については特に問題はないと判断できる調査結果であった。しかしながら、非定型のサルモ

ネラ属菌（硫化水素非産生菌など）の検査については、正解率77%と低い検査結果であった。今回の調査結果のように、日常検査においても選択される培地の特性に依存して、非定型サルモネラ属菌の検出率の低下が起こりうる事態であることは否定できない。このことは、「食肉製品を検査対象」とする検査手順が定型のサルモネラ属菌の検出を主とした手法になっているためと思われ、「液卵を検査対象」とする検査方法のように増菌培地や確認培地の複数種の選択などを踏まえた検査方法による確認の必要性が強く示唆された。

サルモネラ属菌検査を含む外部精度管理調査の質的向上を図る上で、試験菌株の選択、調査試料中の試験菌株の組合せ、実際の食材を用いた調査試料の作製など、今後取り組まなければならない課題も多い。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、食品衛生外部精度管理調査の推進に対し貴重なご意見ならびにご指導を賜りました厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課ならびに食品衛生外部精度管理調査成績評価委員の先生方に深謝いたします。なお、「食品衛生外部精度管理調査のための基材の開発と調査試料作製に関する検討」は、厚生労働科学研究補助金の助成によって実施されたものです。

参 考 文 献

- 1) 平成13年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書（2002）
- 2) 平成14年度食品衛生外部精度管理調査結果報告書（2003）
- 3) 食品衛生検査指針—微生物編— 厚生省生活衛生局 監修（1990）
- 4) 食品衛生検査指針追補Ⅱ 厚生省生活衛生局 監修（1996）
- 5) 厚生省生活衛生局 通知 生衛発第1647号「液卵からのサルモネラ属菌検査法」（1998年11月25日）
- 6) 後藤公吉，渡 昭博，瀬ノ口芳文，春口真一，増田高志，塚本定三，小沼博隆，品川邦汎：食肉のサルモネラモニタリング，日本獣医公衆衛生学会誌，53，473-477（2000）

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

(平成 15 年 5 月 23 日受理)

渡邊敬浩*^{1,†} 笠間菊子*³ 和久井千世子*¹ 波谷雅明*²
松木容彦*³ 穂山 浩*¹ 米谷民雄*¹

Laboratory-performance Study of the Notified Methods to Detect Genetically
Modified Maize (CBH351) and Potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y)

Takahiro WATANABE*^{1,†}, Kikuko KASAMA*³, Chiseko WAKUI*¹, Masaaki SHIBUYA*²,
Akihiko MATSUKI*³, Hiroshi AKIYAMA*¹ and Tamio MAITANI*¹

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;
*²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo: 7-3-1, Hongo, Bunkyo-
ku, Tokyo 113-0033, Japan; *³Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center: 729-5,
Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan; †Corresponding author)

To investigate the key factors affecting the reliability of the analytical results, a laboratory-performance study was attempted for the notified methods to detect genetically modified (GM) maize (CBH351) and GM potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y). The test samples were designed as three pairs of blind duplicates, which included 0%, 0.1% and 1.0% GM maize (CBH351) or GM potato (NewLeaf Plus or NewLeaf Y). Fourteen laboratories participated in the study. The test samples were sent to the participating laboratories along with the protocol. The data were collected from all laboratories and statistically analyzed. For the 0% sample of the CBH351 maize, one laboratory reported a false-positive result. It was considered that contamination could have occurred *via* the common use of equipment or tools for the test. For the 0.1% samples of the NewLeaf Plus potato or NewLeaf Y potato, on the other hand, three laboratories reported false-negative results. It was presumed that these results were due to changes of the conditions of the electrophoresis and agarose-gel staining. The other laboratories reported appropriate results. It was considered that the method employed in this study was suitable for the assessment of laboratory performance.

(Received May 23, 2003)

Key words: 遺伝子組換えトウモロコシ genetically modified mize; 遺伝子組換えジャガイモ genetically modified potato; 検査方法 detection method; ポリメラーゼ連鎖反応 PCR; 外部精度管理 laboratory-performance study

緒 言

厚生労働省では平成 12 年の厚生省告示第 232 号ならびに第 233 号により、安全性の確認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、平成 13 年 4 月以降、当該食品の安全性

審査ならびに表示を法的に義務付けた^{1), 2)}。さらに、流通ならびに表示の科学的検証を行うため、「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)^{3)~5)} を通知し、GM 食品の検査方法を定めた。この検査方法を用いて安全性審査の終了していない GM 食品が定性検知された場合、行政指導の対象となる。そのため、当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たいへん重要であり、それには精度管理が不可欠である。

† 連絡先

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野 1-18-1

*² 東京大学大学院薬学系研究科: 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

*³ (財)食品薬品安全センター-秦野研究所: 〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5

精度管理は「内部精度管理」と「外部精度管理」に分類され、前者は機関内での精度の均一化を目的とし、後者は機関間での均一化を目的とする。一般に機関間に見られる試験結果のばらつきは機関内でのばらつきに比べ大きいことから、外部精度管理を実施することにより、一定の検査方法における機関間のばらつきの程度ならびにその要因を把握すること、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食品定性検査方法に採用されている定性PCR法を対象とした外部精度管理方法については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、GM食品定性検査方法を対象とした外部精度管理方法を検討するため、14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じ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。さらに、これらの検討結果に基づき、外部精度管理における主目的とされる機関間の均一化に寄与する要因を明らかにすることが可能であったかを考察したので報告する。

実験方法

1. 試料

試験対象として選定した安全性審査が終了していない^{*4} GMトウモロコシ Starlink (CBH351)、同ジャガイモ NewLeaf Y (SEMT 15-15 系統, Shepody 種)、安全性審査の終了している GM ジャガイモ NewLeaf Plus (RBMT 21-350 系統, Russet Burbank 種)、および 0% 試料として使用した非遺伝子組換え (non-GM) 試料 (ブラジル産トウモロコシ) は、厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課を通じて入手した。0% 試料として使用した non-GM ジャガイモには、世田谷区内のスーパーマーケットで購入した国内産ジャガイモ (男爵) を使用した。

2. 試薬

DNA の抽出精製には Qiagen 社製 DNeasy Plant Mini Kit (シリカゲル膜タイプキット) を用いた方法、またはセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 法を用いた。CTAB は Sigma 社製を用いた。DNA ポリメラーゼとしてはアプライドバイオシステムズ社製の AmpliTaq™ Gold を、dNTP、10×PCR bufferII ならびに塩化マグネシウムは、AmpliTaq™ Gold に付属のものを用いた。アガロースとしては宝酒造 (株) 製 LO3 「TAKARA」を用いた。DNA マーカーとしては宝酒造 (株) 製 100 bp ラダーを用いた。水は日本ミリポア (株) 製 Milli-Q Synthesis A10 で精製した超純水を 120℃、20 分の条件でオートクレーブ滅菌したものを用いた。他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

^{*4} GM ジャガイモについては平成 15 年 7 月の時点において、申請のあったすべての系統の審査を終了している。

3. 機器

試料粉碎・混合機: MM 200 (Retch 社製)、恒温槽: ドライサーモユニット DTU-1B (タイテック社製)、冷却遠心機: Avantii HP25 (Beckman 社製)、卓上遠心機: KR-1000 (フナコシ (株) 製)、タッチミキサー: MT-51 (ヤマト (株) 製)、分光光度計: Gene Quant II (Pharmacia Biotech 社製)、サーマルサイクラー: GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社製)、電気泳動装置: Mupid[®] (アドバンス社製)、ゲルイメージ解析装置: Diana システム (Raytest 社製)。

4. 試料の調製

入手したすべてのトウモロコシおよびジャガイモ試料を凍結乾燥処理した後に粒径が 500 μm (トウモロコシ)、あるいは 200 μm (ジャガイモ) 均一になるよう粉碎した。non-GM トウモロコシおよびジャガイモについては、粉碎試料の一部を分取し、食発第 158 号⁴⁾ 記載の定性 PCR 法を用いて増幅産物が得られないことを確認した後に 0% 試料とした。また、疑似混入試料については被験物質の混入率が重量換算で 0.1、1.0% となるよう 0% 試料をマトリックスとして混合し、調製した。混合法は、Trapmann ら⁶⁾ ならびに Kuribara ら⁷⁾ が報告している GM トウモロコシおよびダイズ疑似混入試料調製法を参考にし、一部改変した。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 100% の精度で正確にひょう量し全量を 50 g とし、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、ふるいにかけ、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、凍結乾燥処理した。疑似混入試料調製後、0% 試料ならびに疑似混入試料を 2 g (トウモロコシ) または 200 mg (ジャガイモ) となるよう、それぞれ 50 mL 容遠沈管または 15 mL 容遠沈管にひょう量分注した。分注した小分け試料数は参加機関数の約 4 倍数である 50 点とした。小分け試料の均一性について確認するため、小分け試料 1 種類につき 9 点を無作為選出し均一性試験を実施した。均一性試験においては、試料の均一性に加え、同一検査方法を用いて得られる結果の安定性についても確認することを目的に、すべての小分け試料を 3 機関 (国立医薬品食品衛生研究所 (国立衛研)、食品薬品安全センター秦野研究所、東京大学大学院) で等分し試験を実施した。また、安定性試験は、国立衛研において各小分け試料 3 点を -20℃ の条件で 1 か月間保存後、再度測定することによって実施した。

5. DNA 溶液の調製

トウモロコシおよびジャガイモの 0% 試料ならびに各疑似混入試料を検体とし、通知食発第 158 号⁴⁾ に記載の方法を遵守して DNA 溶液を調製した。また、抽出した DNA 溶液の吸光度を測定し、O.D. 260/280 nm の比を求め精製度の確認を行った。なお、この比が 1.7 以上であった場合に良好な精製が行われたものと判断した。

6. プライマー

食発第 158 号⁴⁾に記載のプライマーを使用した。トウモロコシを検体とした場合には CBH351 に特異的に挿入されている発現カセット上の異なる領域に設計されており、それぞれ 170 bp, 171 bp の増幅産物を生じる検出用、確認用プライマー対を用いた試験、また同時に、トウモロコシゲノムに内在的に含まれる遺伝子である Zein 遺伝子を標的遺伝子とし、157 bp の増幅産物を生じる対象プライマー対を用いた試験を実施した。ジャガイモを検体とした場合には、それぞれの GM ジャガイモ系統に特異的に挿入されている発現カセット上の異なる領域に設計された NewLeaf Plus 検出用および、確認用プライマー対、または NewLeaf Y 検出用および、確認用プライマー対を用いた。NewLeaf Plus 検出用、確認用プライマー対はそれぞれ 234 bp, 172 bp の増幅産物を生じる。また NewLeaf Y 検出用、確認用プライマー対はそれぞれ 225 bp, 161 bp の増幅産物を生じる。さらに同時に実施したジャガイモゲノムに内在的に存在する Patatin 遺伝子を標的とした対象プライマー対を用いた試験においては 216 bp の増幅産物を生じる。

7. PCR 条件

食発第 158 号⁴⁾に記載の条件を遵守した。

8. 試験の実施

均一性の確認された小分け試料を乱数表を用いた無作為選出を行った上で検体とし、blind duplicate として 14 の参加機関に送付した。なお、検体名称および 1 機関当たりの検体総数ならびに内容は以下のとおりである。トウモロコシ：検体名称、トウモロコシ粉砕物；検体総数、6 (0% 試料, 0.1, 1.0% 各疑似混入試料 2 検体ずつ)；ジャガイモ：検体名称、ジャガイモ凍結乾燥粉末；検体総数、10 (0% 試料 2 検体, NewLeaf Plus 0.1, 1.0% 各疑似混入試料 2 検体ずつ, NewLeaf Y 0.1, 1.0% 各疑似混入試料 2 検体ずつ)。また、検体送付時には、諸注意事項を含む実施要領、食発第 158 号⁴⁾に準じ作成した試験マニュアル、調査項目ならびに試験結果についての報告方法を規定した各種報告様式を同送した。調査項目としては、検査全般についての経験年数、遺伝子組換え食品の検査実績、検査実施環境および実験機器、器具共用の有無、各種機器のメーカー、採用した DNA 抽出法、プライマーの合成法ならびにグレード、電気泳動条件、染色方法を取り上げ、検査全般にわたって詳細な調査が行えるよう配慮した。試験結果については、抽出された DNA の吸光度 (230, 260, 280 ならびに 320 nm) と収量、さらに各種プライマー対を用いた試験において遺伝子増幅産物が得られたか否かを記載の上、結果を判定し、報告するものとした。これら試験方法の作成に当たっては Thompson らによる報告⁸⁾ならびに Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International のマニュアル⁹⁾を参考にした。

結果および考察

1. 各種検体に対する均一性の確認および安定性試験

ジャガイモならびにトウモロコシ各 0% 試料ならびに 0.1, 1.0% 疑似混入試料を対象とした均一性試験結果の一例を、Fig. 1 から Fig. 3 に示す。Fig. 1 に示すように、NewLeaf Plus 定性検査方法で採用されている検出用プライマー対と確認用プライマー対を用いた結果を比較すると、確認用プライマー試験区における増幅バンドの濃さが薄かった。これに対し、対照プライマー試験区で得られる増幅バンドの濃淡に試料による明確な差がないことから、

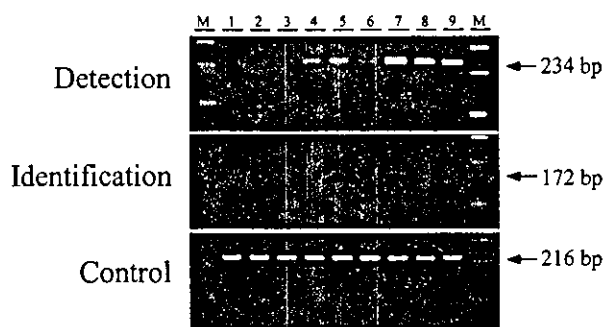


Fig. 1. Homogeneity of NewLeaf Plus samples

Lanes 1 to 3: Amplification of 0% samples; Lanes 4 to 6: Amplification of 0.1% samples; Lanes 7 to 9: Amplification of 1.0% samples
M: 100 bp ladder size standard

The detection and identification primer pairs amplify 234 and 172 bp fragments, respectively. The control primer pair, designed to detect an endogenous gene of potato (patatin gene), amplifies a 216 bp fragment.

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

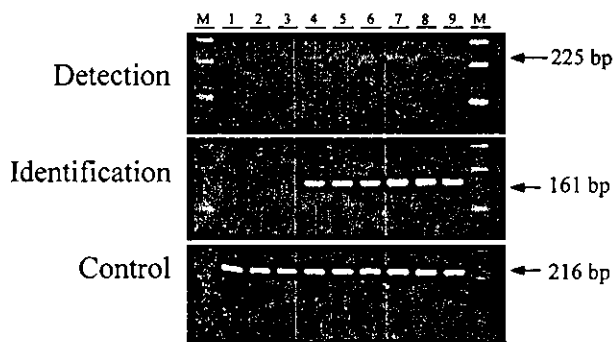


Fig. 2. Homogeneity of NewLeaf Y samples

Lanes 1 to 3: Amplification of 0% samples; Lanes 4 to 6: Amplification of 0.1% samples; Lanes 7 to 9: Amplification of 1.0% samples
M: 100 bp ladder size standard

The detection and identification primer pairs amplify 225 and 161 bp fragments, respectively. The control primer pair, designed to detect an endogenous gene of potato (patatin gene), amplifies a 216 bp fragment.

Arrows indicate the expected PCR amplification products.

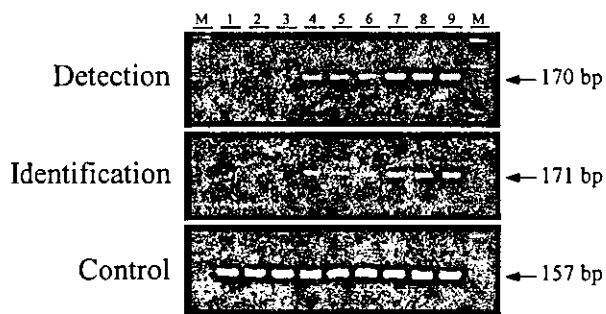


Fig. 3. Homogeneity of CBH351 samples
 Lanes 1 to 3: Amplification of 0% samples; Lanes 4 to 6: Amplification of 0.1% samples; Lanes 7 to 9: Amplification of 1.0% samples
 M: 100 bp ladder size standard
 The detection and identification primer pairs amplify 170 and 171 bp fragments, respectively. The control primer pair, designed to detect an endogenous gene of corn (zein gene), amplifies a 157 bp fragment.
 Arrows indicate the expected PCR amplification products.

この結果は検出用プライマー対と確認用プライマー対とで達せられる増幅効率が異なることを示唆していると考えられた。また、NewLeaf Plusを対象とした試験結果とは逆に、NewLeaf Yを対象とした試験結果では、確認用プライマー対に比べ、検出用プライマー対により得られる増幅

バンドの濃さが薄かった (Fig. 2)。この結果もまた、検出用プライマー対と確認用プライマー対とで達せられる増幅効率が異なっていることを示唆していると考えられた。一方、Fig. 3 に示すように、CBH351 を対象とした試験においては、ジャガイモの場合とは異なり、検出用、確認用両プライマー対を用いて得られる結果に増幅効率の違いは認められず、供した試料のすべてにおいて、ほぼ均一な濃さの増幅バンドが得られた。上記の結果は均一性試験を実施した3機関に共通して認められており、このことは、方法として用いた検査方法により安定した結果が得られることを示唆している。また、調製後の各試料は分注し50点の小分け試料としたが、その18%に当たる9点の小分け試料において同等の結果が得られたことから、いずれの試料においても均一性が確認できたものと考えられた。

また結果は示していないが、検体送付日から1か月間 -20°C の条件で各小分け試料3点を保存し、それらを対象に均一性試験と同様の試験を行った結果、均一性試験において得られた結果と同一の結果を得た。このことから試験期間中の試料の安定性が示唆された。

2. 抽出 DNA の収量ならびに精製度

トウモロコシならびにジャガイモ検体について、各機関において抽出された DNA の収量ならびに吸光度比 (O.D. 260/280 nm) を基準とした精製度についての結果を Fig. 4 ならびに Fig. 5 に示す。Fig. 4 は、トウモロコシ検体

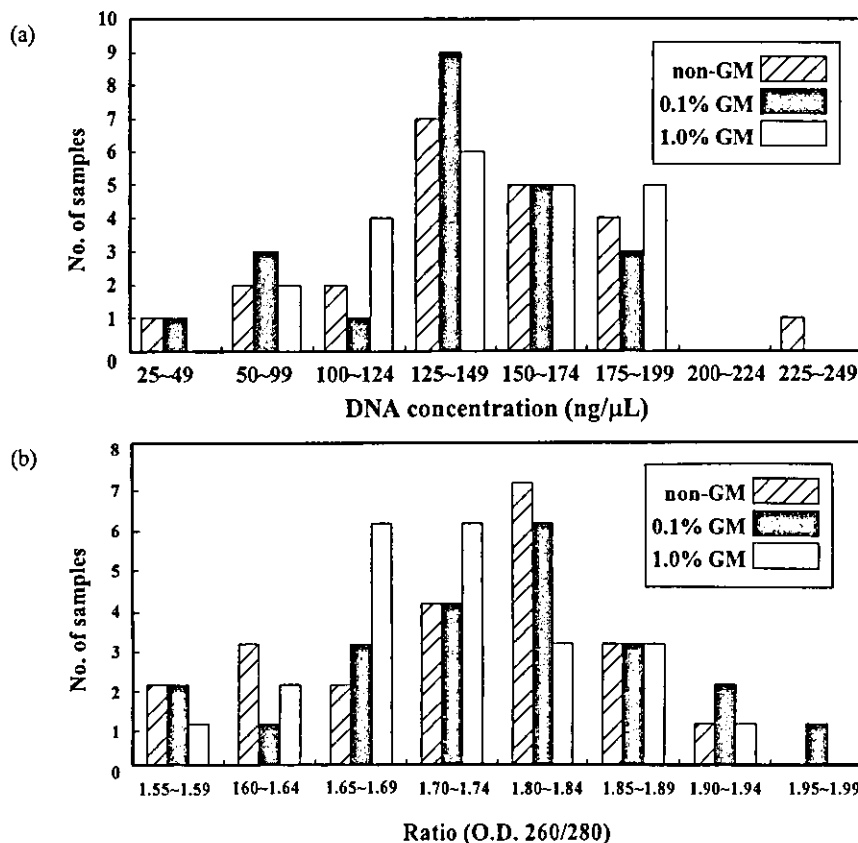


Fig. 4. Yield (a) and quality (b) of DNA in sample solution extracted from maize samples with silica-membrane type kit
 (a): DNA concentration; (b): Ratio of UV absorption at 260 nm to that at 280 nm

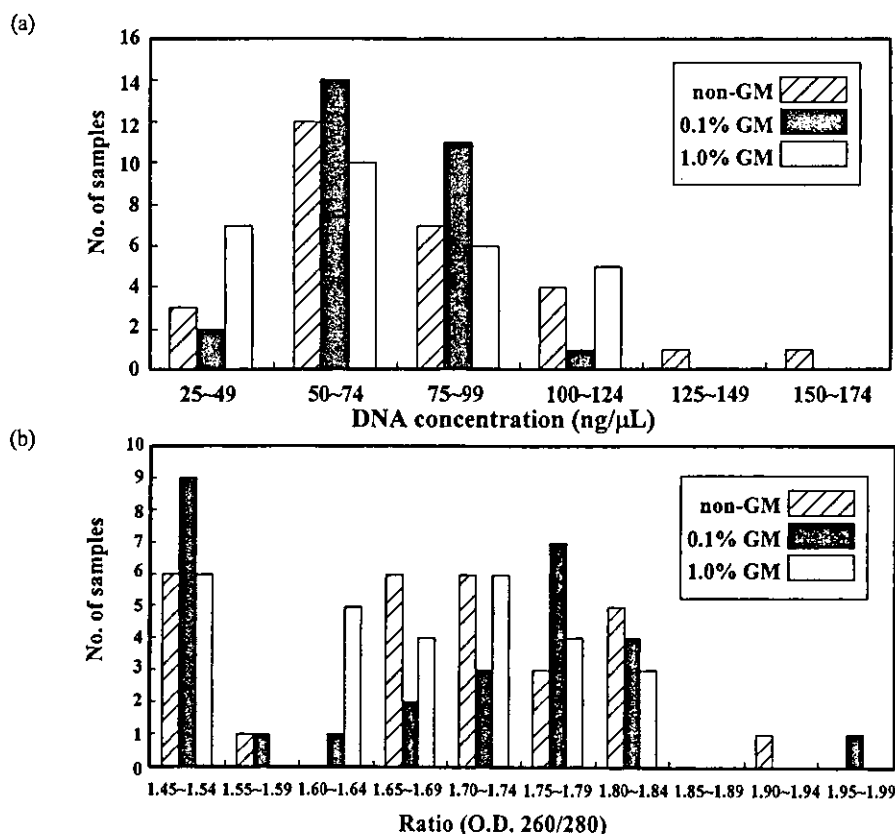


Fig. 5. Yield (a) and quality (b) of DNA in sample solution extracted from NewLeaf Plus potato samples with silica-membrane type kit

(a): DNA concentration; (b): Ratio of UV absorption at 260 nm to that at 280 nm

を対象に DNeasy Plant Mini Kit 法を用いて DNA 抽出を行った結果である。食発第 158 号⁴⁾ 中では、トウモロコシからの DNA 抽出法として DNeasy Plant Mini Kit (シリカゲル膜タイプキット) 法に加え、CTAB 法が併記されており、3 機関において CTAB 法が使用されていた。この 2 法の分析結果を比較するため、1 検体当たりの平均収量 (DNA 濃度)、ならびに平均精製度 (O.D. 260/280 nm) を算出し比較すると、DNeasy Plant Mini Kit 法においては平均収量が $119 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、平均精製度が 1.72 であったのに対し、CTAB 法においては平均収量が $106 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、平均精製度が 1.56 であった。平均収量はほぼ同等と判断されるが、平均精製度に若干の差異が認められる。これは CTAB 法を用いて DNA 抽出を実施した 3 機関のうち、1 機関における精製度が極めて低かった (1.2) ためであり、抽出操作が煩雑であるため実験者の手技が結果に反映されやすいとされる CTAB 法の特徴が現れた結果であると考えられる。

一方、ジャガイモからの DNA 抽出法は DNeasy Plant Mini Kit を用いた方法のみが指定されている。Fig. 5 は NewLeaf Plus を対象検体とする結果であるが、NewLeaf Plus と NewLeaf Y の各検体間で明確な差異は認められなかった。また Fig. 5 には検体数として示してあるが、収量、精製度共に若干のばらつきが認められる。これを機関ごとに精査すると、収量、精製度共に低い数値を報

告している機関は検体によらず一定であった。DNeasy Plant Mini Kit を用いた DNA 抽出法においては、試料から粗精製液を分離する操作が含まれているが、この分離が不十分であると収量、精製度が共に減少する。これら手技的な不備が該当機関での結果に影響を与えている可能性が高いと推定される。

さらに、トウモロコシとジャガイモから抽出された DNA の収量ならびに精製度を比較した場合、収量、精製度共にジャガイモがトウモロコシに比べ若干劣る結果となった。これはトウモロコシとジャガイモという試料の違いに加え、抽出法の内容 (初発材料量および抽出緩衝液の量など) が異なるため、これらの差異が結果に影響したものと考えられた。

3. トウモロコシ検体を対象とした試験

Table 1 に示すように、トウモロコシ検体を対象とした試験の結果、0.1% ならびに 1.0% 疑似混入試料については、14 機関で試験に供された各 2 検体 (計 28 検体) すべてが陽性と正しく判定された。しかし、0% 試料 (non-GM 検体) については、28 検体中 4 検体において CBH351 検出用プライマー対を用いた試験で増幅産物が確認され、つづく確認用プライマー対を用いた試験においても、2 検体について増幅産物が確認された。Table 3 には機関ごとの正答率を示しているが、上記両プライマー対を用いて増幅産物が確認された 2 検体は同一機関 (機関

Table 1. Results of Laboratory-performance Study for Testing CBH351 Maize

Primers	Maize samples						
	non-GM		CBH351				
			0.1%		1.0%		
		+	-	+	-	+	-
Control	Zein n-5', Zein n-3'	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28
Detection	CaM03-5', CBH02-3'	4/28	24/28	28/28	0/28	28/28	0/28
Identification	Cry9C-5', 35Ster-3'	2/4	2/4	28/28	0/28	28/28	0/28

+: positive; -: negative

□: false-positive

First PCR was performed with the control primer pair and detection primer pair.

When the result was positive, a second PCR was performed with the identification primer pair.

Table 2. Results of Laboratory-performance Studies for Testing NewLeaf Plus and NewLeaf Y Potato

Primers	Potato samples										
	non-GM		NewLeaf Plus				NewLeaf Y				
			0.1%		1.0%		0.1%		1.0%		
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Control	Pss 01n-5', Pss 01n-3'	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28
Plus detection	p-FMV02-5', PLRV01-3'	2/28	26/28	28/28	0/28	28/28	0/28	2/28	26/28	0/28	28/28
Plus identification	PLRV-rep1-5', PLRV-rep1-3'	0/2	2/2	21/28	7/28	28/28	0/28	0/2	2/2	\	\
Y detection	p-FMV05-5', PVY02-3'	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	26/28	2/28	27/28	1/28
Y identification	PVY01-5', PVY01-3'	\	\	\	\	\	\	26/26	0/26	27/27	0/27

+: positive; -: negative; \: no test

□: false-negative

First PCR was performed with the control primer pair and detection primer pair.

When the result was positive, a second PCR was performed with the identification primer pair.

I) によって試験されており、それゆえ当該機関からの報告は擬陽性となる。検査実施環境、使用機器ならびに器具などの使用状況、遺伝子組換え食品以外の微生物などを対象とした試験との共用の有無についてのアンケート調査の結果、機関Iにおいては電気泳動ならびにゲルイメージ解析を実施する検査実施環境や、遠心機、ピペット類、PCR装置といった広範な使用機器、器具の共有があることが明らかとなった。このことから、擬陽性を生じた原因は、検査実施環境やピペット類などを共有することによるコンタミネーションにあると考えられた。PCR法はその反応に標的塩基配列の指数関数的増幅過程が含まれているため、ごく微量であってもその反応の鑄型となりうるDNAがコンタミネーションを起こすことにより試験結果に大きな影響を及ぼす。本研究において対象とした定性PCR法に限らず、PCR法を用いたGM食品を対象とした試験において正確な試験結果を得るためには、検査実施環境ならびに機器、器具類をGM食品PCR法に特化させ、またさらには、各操作段階に応じて専有化を図ることが望ましいと考えられた。特に検査実施環境については、遺伝子組換え食品の検査に限っても、被検試料粉体、鑄型

DNA、そしてPCR増幅産物によるコンタミネーションが考えられるため、これらを予防するために明確な区分を設けることが肝要だと考えられる。

4. ジャガイモ検体を対象とした試験

Table 2に示すように、ジャガイモ検体を対象とした試験の結果においても、0%試料ならびにNewLeaf Y 0.1%疑似混入試料についてNewLeaf Plus検出用プライマー対を用いた試験の結果、それぞれ2検体において増幅産物が検出された。この結果も、前述のトウモロコシの結果について考察した原因と同様に、検査実施環境やピペット類などの共有によるコンタミネーションに原因があるものと推察された。なお、当該検体についてはNewLeaf Plus確認用プライマー対を用いた試験においては増幅産物が検出されなかったため、陰性判定とされていた。検出用プライマー対により増幅産物が得られ、確認用プライマー対によっては得られなかったという結果は、コンタミネーションの原因として通常考えられる被検試料の粉体や鑄型DNAに加え、検出用プライマー対により増幅された産物が原因である可能性が高いことを示唆している。

一方、NewLeaf Plus 1.0%疑似混入試料については、

Table 3. Percentage of Correct Results for All Test Samples in Laboratory-performance Studies

Laboratory	Percentage of correct results	
	Maize sample	Potato sample
A	100	100
B	100	100
C	100	100
D	100	100
E	100	100
F	100	100
G	100	100
H	100	100
I	66.7	100
J	100	60
K	100	80
L	100	80
M	100	100
N	100	100

Table 3: The percentage is decreased by false-negative or false-positive results.

28 検体すべてが正しく陽性と判定された。しかしながら、0.1% 疑似混入試料については、NewLeaf Plus において 7 検体、NewLeaf Y において 2 検体がそれぞれ陰性と判定された。また NewLeaf Y については 1.0% 疑似混入試料においても 1 検体が陰性と判定された (Table 2)。これら擬陰性判定は NewLeaf Plus の場合には確認用プライマー対、NewLeaf Y の場合には検出用プライマー対を用いた試験において増幅産物が検出されなかったことによるものであり、先に考察した検出用プライマー対と確認用プライマー対における増幅効率の差異を反映した結果と考えている。特に Fig. 1 に認められるように、NewLeaf Plus 確認用プライマー対を用いて 0.1% 疑似混入試料を対象とした試験を行った場合に得られる増幅バンドは、本論文中に記載されたすべての増幅バンドの中で最も薄い。このことは NewLeaf Plus 確認用プライマー対における増幅効率が NewLeaf Y 検出用プライマー対に比べても低く、NewLeaf Plus における誤判定件数が高かった主要原因ではないかと推察される。さらには、これら増幅効率の差異に加え、0.1% という検知下限値に近い混入率の検体を対象とする場合には、擬陰性判定が下される危険性が高いことも示唆された。

また、Table 3 に示すように、陰性判定を下した機関は 3 機関に限定されていた。回収したアンケート調査から、これら 3 機関においては電気泳動時間ならびに泳動後のエチジウムブロミドによる染色時間がそれぞれ 15 分程度と、検査方法に示されている時間に比べ明らかに短いこ

と、さらに、染色後の脱染色操作を行っていないことが明らかとなった。定性 PCR 法においては電気泳動時に分子量マーカーを同時に泳動し、これとの比較によって増幅産物のサイズを推定し、特異的な増幅が行われていることの確認とする。しかし、泳動時間が短い場合、この比較を正確に行うことができず、分子量による確認を行うことが困難となる。また、増幅産物の量が少ない場合には染色時間が短いことにより、十分に染色されず、またさらには脱染色操作を行わないことにより、バックグラウンドとの区別が付きにくくなることが考えられる。上記の調査結果は、遺伝子増幅産物の分離が不十分でかつ染色が不適切であったため、増幅産物を正確に可視化することができず、誤判定を下した可能性が高いことを示唆しているものと推察された。以上の結果ならびに考察から、当検査方法を用いて 0.1% 混入率付近の検体を検査した場合、電気泳動条件や染色条件が要因となり、判定が変動することが示唆された。

まとめ

遺伝子組換え食品定性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、0% 試料ならびに疑似混入試料を調製し、共通未知試料として 14 の協力機関に配布し、同一時期に分析を依頼した。また、その際得られた情報に基づき、結果のばらつきを解析した。各機関で得られた分析データを詳細に解析した結果は、配布試料の内容および均一性試験の結果から予想された結果とおおむね一致した。さらに、予想されなかった結果が得られた事例に関しては、本試験と同時に実施した多項目にわたるアンケート調査から、検査実施環境、使用機器ならびに器具の専有化、電気泳動条件、染色条件といった検査方法に含まれる諸条件に不備があったことに起因する結果であることが推察された。参加各機関において得られる結果を客観的に比較し、さらには検査結果の均一化に寄与する問題を指摘することが可能であったことから、当該検査方法に対する外部精度管理方法の一例を示すことができたと考えられる。特に、試験に加えてアンケートを実施することは、検査に携わるすべての機関に有益な情報を与えることになるため、方法として非常に有効であると考えられる。

当該検査方法を用いた検査の結果に基づき、我が国においては遺伝子組換え食品の規制が行われているため、当該検査方法が正しく準用されていることを確認するためにも、外部精度管理方法を確立することは重要である。また、継続的に外部精度管理を実施し、客観的な評価に基づき試験機関が長期的に評価され、さらなる改善を進めていくことは大切であると考えられる。

謝辞

本研究は、平成 13 年度厚生労働科学研究補助金により実施した。本研究にご協力いただいた検査機関諸氏に深謝

いたします。

文 献

- 1) 厚生省告示第232号(2000)“食品、添加物等の規格基準の一部改正”平成12年5月1日。
- 2) 厚生省告示第233号(2000)“組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き”平成12年5月1日。
- 3) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“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(2001)。
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)”平成13年5月25日、食発第158号(2001)。
- 5) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)”平成14年4月30日、食発第0430001号(2001)。
- 6) Trapmann, S., Schimmel, H., Kramer, G. N., Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms. *J. AOAC Int.*, **85**, 775-779 (2002).
- 7) Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirano, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A., Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, **85**, 1,077-1,089 (2002).
- 8) Thompson, M., Wood, R., International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.*, **76**, 926-939 (1993).
- 9) Horwitz, W. ed., “Official methods of analysis of AOAC International” 17th Ed., Gaithersburg, MD, AOAC International, 2000, Appendix D, p. 2-11 (ISBN 0-935584-67-6)

食品衛生外部精度管理調査研究の概要

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

An Outline of External Quality Assessment Research for Food Hygiene (First Report)
On the Preparation of Test Sample and the Investigation Results for Detection of Genetically Modified Maize (CBH351) and Potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y)

国立医薬品食品衛生研究所*¹
財団法人食品薬品安全センター秦野研究所*²

穂山 浩*¹, 渡邊敬浩*¹, 笠間菊子*²,
松木容彦*², 米谷民雄*¹

National Institute of Health Sciences *¹
Hatano Research Institute, Food and Drug
Safety Center *²

Hiroshi AKIYAMA *¹, Takahiro WATANABE *¹,
Kikuko KASAMA *², Yasuhiko MATSUKI *²,
and Tamiō MAITANI *¹

I はじめに

近年、遺伝子組換え(GM)食品の開発が急速に進んでおり、わが国においてもダイズ、トウモロコシ、ジャガイモ等のGM食品ならびにそれらを原料とする加工食品が流通するようになってきている。わが国においては平成12年の厚生省告示第232号ならびに第233号により、安全性の確認されていない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、平成13年4月以降、GM食品の安全性審査ならびに表示を法的に義務付けた^{1,2)}。さらに、流通ならびに表示の科学的検証を行うため、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」^{3,4)}を通知し、GM食品の検査方法を定めている。この検査方法により安全性審査の終了していないGM食品が定性的に検知された場合は、積戻しあるいは廃棄の対象となる。そのため、当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り、精度管理が不可欠であると考えられる。

精度管理は「内部精度管理」と「外部精度管理(技能試験)」に分類され、前者は機関内での精度の均一化を目的とし、後者は機関間での均一化を目的とする。一般に機関間にみられる試験結果のばらつきは機関内でのばらつきに比べ大きい。したがって外部精度管理調査を実施することにより、一定の検査方法における機関間のばらつきの程度ならびにその要因を把握すること、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。

GM食品検査法の外部精度管理調査に関しては、検査法が分子生物学的技術を要するために、食品衛生外部精度管理調査事業としてではなく、調査研究的な要素を含んだ形態で平成13年度より実施されている⁵⁾。

本稿では平成13年度に実施したGMジャガイモおよびトウモロコシの定性検査法における外部精度管理試験調査研究の内容を紹介し、分析結果の相互比較を通じて、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。