

II 調査試料調製と均一性確認

1 調査試料の調製法

試験対象として選定した安全性審査が終了していないGMトウモロコシのStarlink[®] (CBH351, 以下CBHと略), GMジャガイモのNewLeaf Plus[®] (RBMT 21-350系統, Russet Burbank種, 以下NL-Pと略), GMジャガイモNewLeaf Y[®] (SEMT 15-15系統, Shepody種, 以下NL-Yと略), および疑似混入試料調製時のマトリッ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(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(現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。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。

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 μ m(トウモロコシ), あるいは200 μ m(ジャガイモ)以下となるよう粉碎し, その後, GM試料の混入率が重量換算で0.1, 1.0, 0%となるようトウモロコシ試料, ジャガイモ試料のそれぞれについて混合した。混合法は, Trapmannら⁶⁾ならびに栗原ら⁷⁾が報告しているGMトウモロコシの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マトリックス(non-GM試料)とGM試料を正確に秤量し全量を50g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, 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3回行った。混合操作後の試料を粉碎器で再度粉碎した後, 凍結乾燥処理した。疑似混入試料調製後, 均一性試験を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)で行った。また, 安定性試験は, 国立衛研において調製し測定した各試料を-20℃の条件で1カ月間保存後, 再度測定することで実施した。

2 調査試験の実施

均一性の確認された試料2g(トウモロコシ)または200mg(ジャガイモ)を, それぞれ50mL容遠沈管または15mL容遠沈管に正確に秤量分注し, 乱数表を用い同一試料2本を1組として無作為に番号を付した上で試験検体とし, 盲検独立並行試験として参加機関に送付した。なお, 試料名称および1機関当たりの試料数および内容は以下の通りである。トウモロコシ: 試料名称; トウモロコシ粉碎物, 試料数; 3組6試料, 内容; 0.1%, 1.0% CBHおよび0%それぞれ2試料, ジャガイモ: 試料名称; ジャガイモ凍結乾燥粉末, 試料数; 5組10試料, 内容; 0.1%, 1.0% NL-P, 0.1%, 1.0% NL-Yおよび0%それぞれ2試料, また, 試料送付時には, 諸注意事項を含む実施要領, 平成13年食発第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名, 使用したDNA抽出法, プライマーのメーカーおよびグレード, 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320nm)と収量, さらに各種プライマー対を用いたPCRにおいて遺伝子増幅バンドが検出されたか否かアガロースゲル電気泳動の写真を添えて試料ごとに記載の上, 1組2試料の検査結果から厚生労働省通知「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」^{3,4)}に従って組ごとにGM含有の有無およ

び含有するGMの種類結果を判定し、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 Agricultural Chemists(AOAC)のマニュアル⁹⁾を参考にした。

Ⅲ 調査試料の確認結果と調査成績

1 各種調査試料検体の均一性の確認

トウモロコシおよびジャガイモ各疑似混入試料を対象とした均一性試験結果のアガロースゲル電気泳動像を、図1～3に示す。試験は、それぞれの試料についてn=3でDNA抽出、PCR増幅を行い実施した。CBHを対象とした試験においては、図1に示すように、対照プライマーを用いた試験で0,0.1,1.0%試料ともほぼ均一な濃さの増幅バンドが得られた。さらに検出用、確認用両プライマー対を用いた試験では、0.1%疑似混入試料での増幅バンドに濃淡は認められるものの0.1%,1.0%試料のすべてにおいて、それぞれの増幅バンドが得られた。したがって試験に供したすべて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。NL-P, NL-Yを対象とした試験では、対照プライマーを用いた試験ではすべての試料について得られた増幅バンドの濃淡に明確な差が認められなかった。また図2に示すように、NL-Pの検出用、確認用両プライマー対を用いた試験では、0.1%,1.0%試料のすべてにおいて、それぞれ対応する増幅バンドが得られた。さらに図3に示すように、NL-Yの検出用、確認用両プライマー対を用いた試験では、0.1%,1.0%試料のすべてにおいて、それぞれ対応する増幅バンドが得られた。したがってジャガイモ試料においても試験に供したすべての試料において均一性が確認できたものと考えられた。

しかしNL-P検出用プライマー対と確認用プラ

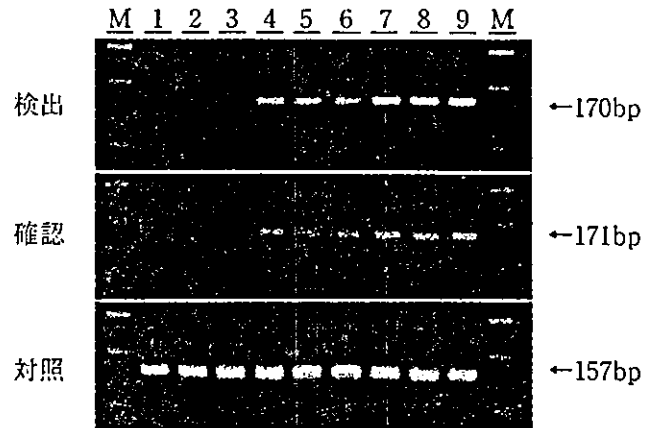


図1 CBH351トウモロコシ検体の均一性試験
1-3: 0% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
4-6: 0.1% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
7-9: 1.0% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
M: 標準DNAラダー

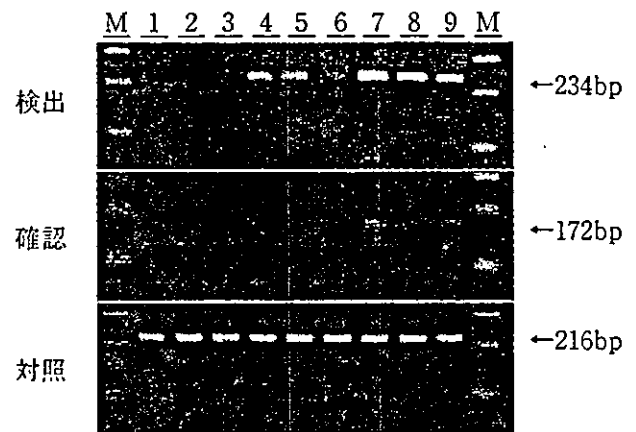


図2 NewLeaf Plusジャガイモ検体の均一性試験
1-3: 0% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
4-6: 0.1% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
7-9: 1.0% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
M: 標準DNAラダー

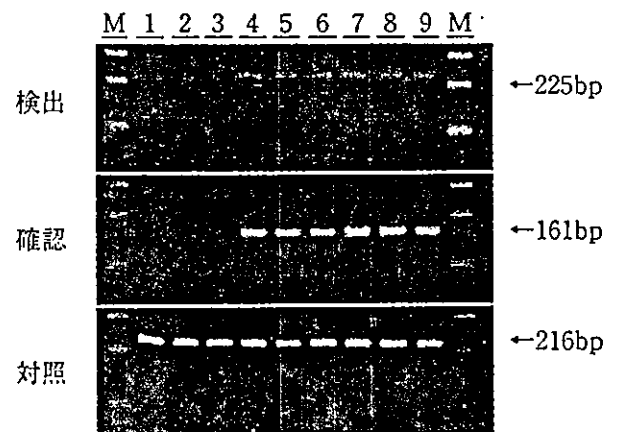


図3 NewLeaf Yジャガイモ検体の均一性試験
1-3: 0% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
4-6: 0.1% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
7-9: 1.0% 試料から抽出されたDNAのPCR増幅産物
M: 標準DNAラダー

表1 トウモロコシ検体の各機関における吸光度比およびDNA濃度(シリカゲル膜タイプキット法)

		O. D. 260/280			DNA 濃度 (ng/μL)		
		Non G	0.1 %	1 %	Non G	0.1 %	1 %
A	抽出 A	1.780	1.780	1.730	70.5	77.5	98.0
	抽出 B	1.720	1.760	1.700	76.5	72.0	81.5
B	抽出 A	1.785	1.730	1.692	108.0	109.0	112.5
	抽出 B	1.800	1.797	1.730	85.5	106.0	86.5
C	抽出 A	1.569	1.818	1.808	215.0	120.0	151.0
	抽出 B	1.783	1.824	1.769	140.0	114.0	141.5
D	抽出 A	1.591	1.536	1.618	122.5	137.5	123.0
	抽出 B	1.612	1.513	1.543	133.0	121.0	142.0
E	抽出 A	1.638	1.673	1.683	116.0	133.0	120.0
	抽出 B	1.671	1.679	1.669	122.0	71.0	141.0
F	抽出 A	1.890	2.000	1.840	49.0	45.1	56.9
	抽出 B	1.760	1.890	1.740	69.5	62.7	63.6
G	抽出 A	1.670	1.660	1.630	110.0	125.0	116.0
	抽出 B	1.620	1.640	1.660	121.0	122.0	105.0
I	抽出 A	1.830	1.830	1.830	162.0	115.5	105.0
	抽出 B	1.850	1.860	1.860	112.0	103.0	97.5
J	抽出 A	1.720	1.770	1.730	171.7	151.2	139.1
	抽出 B	1.770	1.730	1.770	154.1	155.7	155.7
L	抽出 A	1.789	1.771	1.768	127.0	135.5	148.5
	抽出 B	1.806	1.779	1.750	130.0	132.5	157.5
M	抽出 A	1.715	1.709	1.721	165.5	149.5	163.5
	抽出 B	1.722	1.729	1.676	145.5	153.0	171.0
平均値		1.731	1.749	1.724	123.0	114.2	121.6

イマー対の結果を比較すると、確認用プライマーにおける増幅バンドの濃さが薄く、検出用プライマー対と確認用プライマー対とで増幅効率が異なることが示唆された。また、NL-Pを対象とした試験結果とは逆に、図3に示すように、NL-Yを対象とした試験では、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。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。

2 調査結果における抽出DNA収量および精製度

トウモロコシ検体について、各機関におけるDNA抽出液の吸光度比(O.D.260nm/O.D.280nm)、およびそのDNA濃度についての結果を表1に示す。それぞれトウモロコシ検体を対象にシリカゲル膜タイプキット法を用いた機関のみの結果である。トウモロコシ検体からのDNA抽出の結果は各機関で大差なく、良好な精製度および収量を示した。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が、2法の分析結果

表2 ジャガイモ検体の各機関における吸光度比およびDNA濃度(シリカゲル膜タイプキット法)

		O. D. 260/280					DNA濃度(ng/μL)抽出				
		Non G	PLUS 0.1%	PLUS 1%	Y 0.1%	Y 1%	Non G	PLUS 0.1%	PLUS 1%	Y 0.1%	Y 1%
A	抽出 A	1.830	1.810	1.630	1.780	1.620	68.5	81.5	65.0	70.5	69.5
	抽出 B	1.820	1.780	1.720	1.710	1.800	87.5	80.0	73.0	70.0	59.5
B	抽出 A	1.691	1.373	1.612	1.613	1.695	68.5	57.0	54.0	50.0	50.0
	抽出 B	1.704	1.507	1.500	1.606	1.396	60.5	53.5	54.0	53.0	63.5
C	抽出 A	1.541	1.600	1.711	1.663	1.687	65.5	56.0	77.0	79.0	70.0
	抽出 B	1.824	1.720	1.710	1.682	1.750	83.0	70.5	53.0	74.0	45.5
D	抽出 A	1.583	1.508	1.521	1.537	1.670	91.0	96.5	106.5	83.0	88.5
	抽出 B	1.436	1.427	1.634	1.411	1.552	72.5	83.5	76.0	79.0	104.0
E	抽出 A	1.738	1.671	1.709	1.676	1.659	53.0	66.0	47.0	62.0	73.0
	抽出 B	1.696	1.306	1.771	1.672	1.678	59.0	64.0	43.0	54.0	50.0
F	抽出 A	1.730	1.710	1.770	1.630	1.540	142.0	85.5	102.1	104.5	129.5
	抽出 B	1.790	1.790	1.760	1.830	1.800	77.0	73.7	69.7	59.6	63.1
G	抽出 A	1.530	1.470	1.520	1.460	1.470	59.0	62.0	61.0	51.0	61.0
	抽出 B	1.500	1.550	1.480	1.490	1.490	52.0	54.0	50.0	61.0	45.0
H	抽出 A	1.090	0.970	1.090	-0.230	1.100	50.3	35.0	49.8	-3.000	42.0
	抽出 B	1.090	1.000	0.980	1.130	1.150	49.8	36.5	36.8	40.5	48.5
I	抽出 A	1.850	1.850	1.840	1.810	1.860	111.0	95.5	90.0	109.5	103.0
	抽出 B	1.850	1.850	1.800	1.880	1.860	100.0	82.5	116.0	82.5	72.5
J	抽出 A	1.710	1.770	1.830	1.760	1.780	97.7	89.2	87.8	70.9	78.5
	抽出 B	1.740	1.760	1.810	1.840	1.700	114.2	80.3	100.4	92.8	89.5
K	抽出 A	1.676	1.622	1.634	1.644	1.743	57.0	73.0	67.0	74.0	61.0
	抽出 B	1.733	1.774	1.688	1.667	1.667	52.0	55.0	54.0	60.0	70.0
L	抽出 A	1.672	1.979	1.650	1.837	1.804	163.0	94.0	115.5	118.5	138.0
	抽出 B	1.921	1.837	1.696	1.832	1.713	121.0	118.5	97.5	114.5	137.0
M	抽出 A	1.763	1.765	1.718	1.768	1.737	100.5	75.0	73.0	72.5	82.5
	抽出 B	1.757	1.745	1.744	1.756	1.724	97.5	82.0	78.5	75.5	100.0
N	抽出 A	1.680	1.790	1.670	1.780	1.760	48.0	51.0	37.5	48.0	55.5
	抽出 B	1.680	1.700	1.690	1.690	1.750	48.0	51.0	33.0	40.5	42.0
平均値		1.665	1.630	1.639	1.672	1.648	80.3	71.5	70.3	72.2	74.7

に大きな差は認められなかった。

表2には、ジャガイモ検体について、各機関におけるDNA抽出液の吸光度比、およびそのDNA濃度についての結果を示す。ジャガイモからのDNA抽出法はシリカゲル膜タイプキットを用いた方法のみが指定されており、当該抽出法を用いたDNA抽出の結果は1機関(機関H)を除き機関間で大差がなく、良好な精製度および収量であった。またNL-PとNL-Yの各検体間で明確な差違は認められなかった。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、精製度とも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。これはジャガイモ試料中に存在するデンプンならびに他の多糖類等によりDNA抽出が阻害されたためと推察された。

3 トウモロコシ検体における試験の調査成績

表3に示すように、トウモロコシ試料を対象と

表5 各機関ごとの判定の正答率

実施機関	トウモロコシ正答率(%)	ジャガイモ正答率(%)
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

表6 トウモロコシ検体のDNA抽出法、プライマーおよびPCR増幅装置の種類

試料のDNA抽出法	PCR増幅装置および増幅条件							
	CTAB法	シリカゲル膜タイプキット法	プライマー			PCR増幅装置		型式
			メーカー名	グレード	メーカー名			
			脱塩	カートリッジ精製	HPLC精製			
A	-	○	アマシャムファルマシアバイオテック	○	-	-	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System9700
B	-	○	アマシャムファルマシアバイオテック	○	-	-	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System9700
C	-	○	北海道システム・サイエンス	-	-	○	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System2400
D	-	○	ファスマック	○	-	○	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System9600
E	-	○	グライナージャパン	-	○	-	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System9700
F	-	○	ニッポンジーン(GMO用)	-	-	?	宝酒造	TP240
G	-	○	宝酒造	-	○	-	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System2400
H	○	-	インビトロジェン	○	-	-	宝酒造	TP3000
I	-	○	東亜合成	-	○	-	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System9700
J	-	○	ニッポンジーン	-	○	-	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System9700
K	○	-	アマシャムファルマシアバイオテック	-	○	-	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp9700
L	-	○	ファスマック・ニッポンジーン(GMO用)	○	-	?	アプライドバイオシステムズジャパン	GeneAmp PCR System9700
M	-	○	ニッポンジーン(GMO用)	-	-	?	宝酒造	TP3000
N	○	-	北海道システム・サイエンス	-	○	-	アプライドバイオシステムズジャパン	PCR System9700

全機関で正しくNL-Y陽性と判定された。しかし、NL-Y0.1%疑似混入試料については1機関2試料についてNL-Y検出用プライマー対で増幅産物が検出されず、最終的に1機関で誤ってNL-Y陰性

と判定された。さらにNL-Y0.1%疑似混入試料についてNL-P検出用プライマー対を用いた試験で1機関2試料において増幅産物が確認された。しかし、続くNL-P確認用プライマー対を用いた試

表3 トウモロコシ検体の個別測定結果

プライマーの種類		測定試料					
		Non G		CBH 351			
				0.1%		1%	
+	-	+	-	+	-		
対照	Zein	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28
CBH 検出	CaM-Cry9C	4/28	24/28	28/28	0/28	28/28	0/28
CBH 確認	Cry9C-35Ster	2/4	2/4	28/28	0/28	28/28	0/28

表4 ジャガイモ検体の個別測定結果

プライマーの種類		測定試料									
		Non G		NewLeaf Plus				NewLeaf Y			
				0.1%		1%		0.1%		1%	
+	-	+	-	+	-	+	-	+	-		
対照	PSS	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28
Plus 検出	p-FMV-PLRV	2/28	26/28	28/28	0/28	28/28	0/28	2/28	26/28	0/28	28/28
Plus 確認	PLRV5-PLRV3	0/2	2/2	21/28	7/28	28/28	0/28	0/2	2/2	-	-
Y 検出	p-FMV-PVY	0/28	28/28	0/28	28/28	0/28	28/28	26/28	2/28	27/28	1/28
Y 確認	PVY5-PVY3	-	-	-	-	-	-	26/26	0/26	27/27	0/27

した試験の結果、全試料で対照プライマー対を用いた試験で増幅産物が確認された。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%疑似混入試料(non-GM検体)については、28検体中4検体においてCBH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、続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。

4 ジャガイモ検体を対象とした試験

表4に示すように、ジャガイモ試料を対象とした試験の結果、全試料について対照プライマー対を用いた試験で増幅産物が確認された。0%疑似混入試料(non-GM)についてNL-Y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た試料はなかったが、NL-P検出用プライマー対を用いた試験で1機関2試料について増幅産物が確認され

た。しかしこれら2試料についてNY-P確認用プライマー対を用いた試験を行ったところ増幅産物は検出されず、最終的に全機関でNL-PおよびNL-Y陰性と正しく判定された。

NL-P 1.0%疑似混入試料については、28試料すべてで検出用プライマー対および確認用プライマー対で増幅産物が確認され、全機関で正しくNL-P陽性と判定された。しかしながら、NL-P 0.1%疑似混入試料については、NL-P検出用プライマー対では28試料すべてで増幅産物が確認されていたにもかかわらず、NL-P確認用プライマー対では4機関7試料で増幅産物が検出されず、最終的に3機関で誤ってNL-P陰性と判定された。なお、NL-P 0.1, 1.0%疑似混入試料ではともに、NL-Y検出用プライマー対で増幅産物が確認された試料はなかった。

NL-Y 1.0%疑似混入試料については、1試料を除く27試料でNL-Y検出用プライマー対およびNL-Y確認用プライマー対で増幅産物が確認され、

表7 アガロースゲル電気泳動条件

	アガロースゲル電気泳動条件						
	電気泳動装置				染色方法		
	型式	メーカー名	ゲル濃度	泳動時間	前染め	後染め 染色時間	後染め 脱色時間
A	Gel Mate	東洋紡績	2%	35分	-	20分	3分
B	Gel Mate	東洋紡績	2%	45~50分	-	30分	30分
C	Mupid	アドバンスバイオ	2%	20分	○	-	-
D	Mupid-21	アドバンスバイオ	3%	40分	-	30分	10分
E	Mupid-21	アドバンスバイオ	1.5%	25分	○	-	-
F	Mupid	アドバンスバイオ	2%	30分	-	10分	10分
G	i-Mupid j	アドバンスバイオ	2%	40分	-	15分	5分
H	Mupid-21	アドバンスバイオ	3%	100V25分	-	1時間	水道水でゆすぐ程度
I	Mupid	アドバンスバイオ	3%	40分	-	40分	水道水にて洗浄のみ
J	Mupid-3	アドバンスバイオ	2%	20~30分	-	15分	0分
K	Mupid II	アドバンスバイオ	2.5%	約30分	○	-	-
L	Mupid-3	アドバンスバイオ	2%	15分	○	-	-
M	Mupid-21	アドバンスバイオ	2%	40分	-	30分	なし
N	Mupid-21	アドバンスバイオ	2.5%	約30分	-	約5分	約15分

表8 ゲルイメージ解析装置の種類

	ゲルイメージ解析			
	ゲルイメージ解析装置		インスタントカメラ	
	型式	メーカー名	型式	メーカー名
A	AE-6911CX	アトー	-	-
B	Printgraph/Image Saver AE-6905C	アトー	-	-
C	-	-	DS-300	フナコシ
D	Bio Doc-It System	UVP LABORATORY PRODUCTS		
E	-	-	DS-300L	フナコシ
F	-	-	DS-300	フナコシ
G	FAS-Ⅲ	東洋紡績	-	-
H	Epi-Light UV FA1100	アイシンコスモス研究所	-	-
I	-	-	RB67SD	MAMIYA
J	EDAS120	Kodak	-	-
K	プリントグラフ AE-6911CX	アトー	-	-
L	AE-6905H	アトー	-	-
M	-	-	M-085	コスモバイオ
N	Epi-Light UV FA500	アイシンコスモス研究所	-	-

験においては増幅産物が検出されず、この試料については最終的にNL-P陰性と正しく判定された。なお、NL-Y 1.0%疑似混入試料では、NL-P検出プライマー対で増幅産物が確認された試料はなかった。

5 調査項目のまとめおよび考察

機関ごとの判定の正答率を表5に、またアンケート結果をまとめ、トウモロコシ検体のDNA抽出法、プライマーおよびPCR増幅装置の種類を表6

表9 実験区域および測定機器の共用の有無

	実験区域				遠心機			ピペット類			PCR装置	電気泳動装置	ゲルイメージ解析装置
	抽出操作	PCR反応液調製	電気泳動	ゲルイメージ解析	マイクロチューブ用	15 mL遠心管用	50 mL遠心管用	DNA抽出用	PCR用	電気泳動用			
A	独立	独立	共用	共用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用
B	独立	独立	共用	共用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用
C	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用
D	独立	独立	独立	独立	専用	共用	共用	専用	専用	専用	共用	共用	専用
E	共用	共用	独立	独立	専用	共用	共用	専用	専用	専用	専用	専用	共用
F	共用	共用	共用	共用	専用	共用	共用	専用	専用	専用	専用	専用	専用
G	共用	共用	独立	独立	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	共用
H	共用	共用	独立	独立	専用	なし	専用	専用	専用	専用	専用	専用	共用
I	独立	独立	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用
J	独立	独立	共用	共用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用
K	共用	共用	共用	共用	専用	共用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用
L	独立	独立	独立	独立	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用	専用
M	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用	共用
N	共用	共用	独立	独立	共用	共用	共用	専用	専用	専用	専用	専用	共用

に、アガロースゲル電気泳動条件を表7に、ゲルイメージ解析装置の種類を表8に、実験区域および測定機器の共用の有無を表9に示した。

トウモロコシ0%試料において判定が誤って陽性となった機関(機関I)についてアンケート調査結果を調べたところ、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、器具の他の試験との共有があることが明らかとなった。このことから、誤って陽性と判定された原因は、検査実施環境やピペット類等を共用することによるコンタミネーションにあると考えられ、定性PCR法において正しい結果を得るためには、検査実施環境の区分化ならびに機器、器具類の占有化が必須と考えられた。

一方ジャガイモ試料においてnon-GM検体ならびにNL-Y 0.1%疑似混入試料についてNL-P検出

用プライマー対を用いた試験で、同一機関(機関L)のそれぞれ2試料について誤って増幅バンドが検出された。しかし、確認用プライマー対により増幅バンドが得られていないことおよび調査結果では検査実施環境の区分化やピペット類等の占有は行われていることから、電気泳動時に他試料の増幅産物がコンタミネーションして検出された可能性が高いものと考えられた。NL-P 0.1%疑似混入試料については、NL-P 検出用プライマー対では28試料すべてで増幅産物が確認されていたにもかかわらず、NL-P 確認用プライマー対では4機関7試料で増幅産物が検出されず、最終的に3機関で誤って陰性と判定された。これらの判定は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を反映した結果に起因していると考えられた。また陰性とした3機関のうち、0.1% NL-Yでも誤って陰性と判定1機関

(機関J)は、表7より電気泳動後のエチジウムブロミドによる染色時間がそれ15分と、検査方法に示されている時間に比べ明らかに短く、また染色後の脱染色操作も十分でないことが明らかであった。したがってこの機関では電気泳動において遺伝子増幅産物の染色が不適切であったため、増幅産物を可視化することができなかつた可能性が推察された。以上の考察から、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、判定に影響を与えることから、通知法に沿った操作を行うことの重要性が示された。

またNL-Y 1.0%疑似混入試料において陰性と判定された1試料については、本来は実施の必要のないNL-Y確認用プライマーを用いたPCRが実施

され、その結果、増幅産物が確認されていたことから、PCRまたは電気泳動操作において何らかの誤りがあったのではないかと推察された。

IV ま と め

今回の試験では国立医薬品食品研究所で調製した疑似混入試料を14の協力機関に一斉に配布し、同時期に分析を行った。各機関で得られた分析結果を集計解析したところ、トウモロコシ、ジャガイモ試料ともおおむね添加GM試料にそれぞれ対応した正しい判定が得られた。これらの結果から、当該検査方法について外部精度管理の実施が可能であると判断された。さらに、同時に調査した検査条件に関するアンケート結果を考慮すると、当該検査の実施に際しては、検査区域、使用機器な

第9回国際食品素材/添加物展・会議

ifia JAPAN 2004

2004年5月26日(水)~28日(金) 東京ビッグサイト 西1・2ホール

食品新時代の幕開け

— パワー全開! フードテクノロジー —

「食の安心科学ゾーン」

ifiaは食の安全・安心を徹底的に科学します

ifiaでは様々な食品の安心を妨げる問題を解決できる場として「食の安心科学ゾーン」を常設しております。

ゾーン内には食品の安心を守る各企業の展示に加え、セッションコーナーを設置。また食の安心科学フォーラムを併催し、コーナーを盛り上げます。

出展社募集中

¥499,000/小間 (3m×3m基礎装飾付)

お
お
申
問
込
み
せ

- 食品化学新聞社 (担当: 今立、芳中)
Tel 03-3238-7828 Fax 03-3238-7898
- E. J. クラウス&アソシエート日本支社 (担当: 横井、香塚) 〒102-0074 千代田区九段南2-2-5 九段ビル
Tel 03-5212-7071 Fax 03-5212-6091

〒101-0051 千代田区神田神保町3-2-8 昭文館ビル
e-mail: monthly_fc@foodchemicalnews.co.jp

〒102-0074 千代田区九段南2-2-5 九段ビル
e-mail: bamba@ejk-japan.co.jp

らびに器具の専有化が重要であり、加えて検査条件の適正化により検査機関間に認められるばらつき
の低減が可能と考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、食品衛生外部精度管理調査研究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当時厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課の各担当官殿に深謝いたします。なお本研究は、平成13年度厚生労働科学研究補助金により実施しました。ま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。

参 考 文 献

- 1) 厚生省告示第232号“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“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食発第110号“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
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第158号“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
- 5) 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: 食品衛生学雑誌, 44, 281-288(2003)
- 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, 1077-1089(2002)
- 8) Thompson, M., Wood, R.; International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories, *J. AOAC Int.*, 76, 926-939(1993)
- 9) Official methods of analysis of AOAC international(2000) 17th Ed., AOAC international, Gaithersburg, MD, Appendix D, pp 2-11

Highlighted paper selected by Editor-in-chief

New Qualitative Detection Methods of Genetically Modified Potatoes

Takahiro WATANABE,^{*a} Hideo KURIBARA,^{b,i} Takashi MISHIMA,^c Hiroyuki KIKUCHI,^a Misao KUBO,^b Takashi KODAMA,^{b,i} Satoshi FUTO,^d Kikuko KASAMA,^e Akie TOYOTA,^f Masanori NOUNO,^g Ayako SAITA,^g Kunihiko TAKAHASHI,^h Akihiro HINO,^j Hiroshi AKIYAMA,^a and Tamio MAITANI^a

^aNational Institute of Health Sciences; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; ^bCenter for Food Quality, Labeling and Consumer Services; 2-1 Shintoshin, Chuo-ku, Saitama, Saitama 330-9731, Japan; ^cJapan Food Research Laboratories; 2-3 Bunkyo, Chitose, Hokkaido 066-0052, Japan; ^dFASMAC Co., Ltd.; 5-1-3 Midorigaoka, Atsugi, Kanagawa 243-0041, Japan; ^eHatano Research Institute, Food and Drug Safety Center; 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan; ^fHiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environment; 1-6-29 Minami-cho, Minami-ku, Hiroshima 734-0007, Japan; ^gCenter for Inspection of Imported Foods and Infectious Diseases Yokohama Quarantine Station; 107-8 Nagahama, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0011, Japan; ^hSaitama Prefectural Institute of Public Health; 639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama 338-0824, Japan; ⁱand ^jNational Food Research Institute; 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan.

Received June 1, 2004; accepted June 12, 2004; published online June 15, 2004

In Japan, 8 lines of genetically modified (GM) potato (2 lines of NewLeaf[®] potato; NL, 3 lines of NewLeaf Plus[®] potato; NLP, and 3 lines of NewLeaf Y[®] potato; NLY) have already been authorized as safe for use in foods and feeds. We have developed polymerase chain reaction (PCR) methods for the qualitative detection of the GM potatoes for the screening and the identification of NL, NLP and NLY. The gene encoding uridine diphosphate (UDP)-glucose pyrophosphorylase (UGPase) was used as a taxon specific gene. We designed the primer pair to detect the cryIIIA genes as a screening method for GM potatoes because the gene should be inserted in all 8 lines of the GM potatoes. For identification of NL, NLP and NLY, we further designed three specific primer pairs for the different recombinant DNAs (r-DNA) specifically introduced into NL, NLP, or NLY. In addition, to identify the 3 lines of NLY that have been introduced with the same r-DNA, the three line-specific primer pairs for the border sequence between the r-DNA and genomic DNA of NLY 3 lines were designed. Six lines of GM potato used as the test material were specifically identified using the each primer pair under the same PCR condition. The detection limits of all the GM potatoes should be approximately 0.1%. Furthermore, the specificity and reproducibility of the methods were confirmed in a six-laboratory collaborative study.

Key words genetically modified potato; detection method; NewLeaf; NewLeaf Plus; NewLeaf Y; uridine diphosphate (UDP)-glucose pyrophosphorylase (UGPase)

Many kinds of genetically modified (GM) crops, which include GM soy, maize, rapeseed, cotton and potato, have already been developed and the cultivated acreage of these crops has continued to grow year by year. It was reported that the global area of GM crops for 2003 was 67.7 million hectares with a growth rate of 15% compared to that in 2002. This growth is estimated to rapidly increase, since the planting has been spread all over the world in addition to the nations such as United States (U.S.) and Canada.¹⁾ On the other hand, public concern has been raised in terms of food safety and environmental effects of the GM crops. Especially, consumers are concerned about the negative effects of GM food on their health by their consumption and scientific information has been strongly required.²⁾ Therefore, many governments have now been considering regulations for the use and implementing a labeling system for GM crops as food and feed. Thus, new labeling systems have been introduced for GM foods in the European Union (EU), Australia, Korea, Japan and other countries.

The commercialization of fifty-five lines of safety-assessed GM crops including soy, maize, potato, rapeseed, cotton and sugar beet, have already been approved by the Ministry of Health, Labour and Welfare (HMLW) in Japan. To monitor the labeling system, it is necessary to develop reliable and practical methods for the detection and identification of GM crops. The polymerase chain reaction (PCR) is one of the widely used systems for the quantitative or quali-

tative detection of GM crops and we also have previously reported PCR methods for the detection of GM soy, maize, papaya and potatoes.^{3–10)}

The tetraploid cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is one of the world's four major crops and an important feed-stuff, but it is easily infected by many kinds of pests and pathogens.¹¹⁾ Therefore, molecular biology techniques has been attempted to improve the potato varieties which ended with the breeding of GM potatoes commercialized by the Monsanto Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). In Japan, two lines of NewLeaf[®] potato (NL), three lines of NewLeaf Plus[®] potato (NLP) and three lines of NewLeaf Y[®] potato (NLY) have been approved by HMLW for human food consumption by July 2003. The information provided by the Monsanto Co. showed that (a) two lines of NL (Bt-6 and SPBT02-05 line) were transformed with the same plasmid vector, PV-STBT02, which contains cryIIIA derived from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, providing of the trait of Colorado potato beetle (CPB) resistance, (b) three lines of NLY (RBMT15-101, SEMT15-15 and SEMT15-02 line) were transformed with the same plasmid vector, PV-STBT02, which contains cryIIIA, Potato virus Y coat protein (PVYcp) gene providing of the traits of CPB and PVY resistance, (c) two of three lines of NLP (RBMT21-129 and RBMT21-350 line) were transformed with the same plasmid vector, PV-STMT21, which contains cryIIIA, the potato leaf roll virus replicase (PLRVrep) gene, providing of the traits of CPB and PLRV

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: tawata@nihs.go.jp

resistance, and (d) the other one (RBMT22-82) was transformed with the plasmid vector, PV-STMT22, which contains cryIIIA, PLRVrep, and CP4-epsps genes, providing of the traits of CPB, PLRV resistance and herbicide tolerance, respectively. The detection methods based on PCR for GM potatoes have been reported.^{9,10,12} To verify the labeling and identify of the lines, however, further reliable and practicable detection methods for the GM potatoes are required.

In the present study, we designed seven primer pairs for screening, construct-specific, and line-specific detection and developed the condition of PCR to perform the test under the same conditions using all the primer pairs. To design the line-specific primer pairs, we focused on the junction sequences between the recombinant DNA (r-DNA) and potato genomic DNA as the target sequence to distinguish the specific one from the GM lines that was transformed with the same plasmid vector. The specificities and sensitivities were examined using reference materials provided by the Monsanto Company. The specificity and reproducibility of the methods were then confirmed by an inter-laboratory study.

MATERIALS AND METHODS

Reference Potato Materials and Other Crops Freeze-dried powder of six lines of GM potato (NL potatoes; Bt-6 and SPBT02-05, NLP potato; RBMT21-350, NLY potatoes; RBMT15-101, SEMT15-02 and SEMT15-15 line) and three varieties of non-GM potato (Shepody, Russet Burbank and Superior), which were conventional varieties used for the transformation, were kindly provided by the Monsanto Co. through the Department of Food Safety, Pharmaceutical and Food Safety Bureau of MHLW. Japanese conventional potato varieties (Dansyaku and May queen), egg plant (*Solanum melongena*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), maize (*Zea mays*), soy (*Glycine max*) and wheat (*Triticum aestivum*) were purchased from a local market.

Preparation of Test Samples Dehydrated Japanese conventional potatoes, the provided powders of the non-GM potato varieties and GM potatoes were ground with the 0.2 mm sieve ring using an Ultra-Centrifugal Mill ZM100 (Retsch GmbH, Haan Germany) and freeze-dried for 24 h using an FD-81 freeze dryer (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan). To evaluate our screening and construct-specific methods, three mixing levels of the potato-powder samples containing 0, 0.1 and 1.0% of each NL-Bt-6, NLP-RBMT21-350, and NLY-SEMT15-15 lines were prepared, according to a previous study.¹³ In this study, we selected the Bt-6, RBMT21-350, and SEMT15-15 lines as the representative line for each NL, NLP and NLY by referring to the acreage in the U.S. in 2000 and 2001. Six mixing levels of potato-genomic DNA samples containing 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, and 5.0% of each SEMT15-15, SEMT15-02, and RBMT15-101 line were also prepared to evaluate our line-specific methods. Because the amount of the three lines of NLY, which was provided by Monsanto, was not enough to prepare the powder samples, the genomic DNA samples were used for the evaluation. For the preparation of both the powder and genomic DNA samples, Dansyaku was used as a non-GM material. Other crops were also well ground by the Ultra-Centrifugal Mill ZM100 or Grindomix GM 100 (Retsch) and used for the test samples.

Extraction and Purification of Genomic DNA Genomic DNAs were extracted from soy and maize using a silica-gel membrane-type kit (DNeasy Plant Maxi; QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to a previous study.⁶ Genomic DNAs were extracted from the other crops including potatoes using a silica-gel membrane-type kit (DNeasy Plant Mini; QIAGEN) according to a previous study.⁹ The DNA concentration in the solutions was determined by measuring the UV absorption at 260 nm using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE). The purity of the extracted DNA was evaluated using the ratio of 260/280 nm and the ratio was between 1.7 and 2.0 for most of the test samples. The extracted DNA was diluted with an appropriate volume of DW to a final concentration of 10 ng/ μ l, and stored at -20°C until used. These DNA samples were used for the subsequent PCR analysis.

Oligonucleotide Primers Eight primer pairs, in which the primer pair to detect a potato taxon specific gene was included, were designed for the qualitative detection of the GM potatoes (Table 1). The primer pair UGPase 01-5'/UGPase 01-3' to detect a gene encoding uridine diphosphate (UDP)-glucose pyrophosphorylase (UGPase) that was reported as a single copy gene of potato,¹⁴ was designed on the first exon by referring to GenBank Accession No. U20345 which generated a 111 bp amplified fragment.

The cryIIIA gene from *Bacillus thuringiensis* should be introduced into all 8 lines of the GM potatoes conferring resistance to the CPB pest.¹⁵ The primer pair CryIIIA 01-5'/CryIIIA 01-3' to detect this gene as screening for the GM potatoes was designed by referring to GenBank Accession No. X70979 in order to generate a 117 bp amplified fragment. To specifically detect NL, the NL construct-specific primer pair NL 01-5'/NL 01-3' was designed in the junction between the enhanced 35S promoter (e-p-35S) and cryIIIA by referring to GenBank Accession No. AF078810 (e-p-35S), and the primer pair generated an amplified fragment of 113 bp. In previous studies,⁹ p-FMV02-5'/PLRV 01-3' had been designed in the junction between e-p-35S and cryIIIA for the construct-specific detection of NLP and generated a 234 bp amplification fragment. Moreover, p-FMV05-5'/PVY 02-3' had been designed in the junction between the 35S promoter sequence of the figwort mosaic virus (P-FMV) and PVYcp for the construct-specific detection of NLY and generated a 225 bp amplified fragment.¹⁰ NLP and NLY were specifically detected using these two primer pairs, respectively, but the efficiencies of the PCR should be low because the amplified fragments were weakly detected in the potato-powder samples containing 0.1% of both the NLP and NLY.¹³ In this study, we aimed to develop more reliable and practical detection methods by re-designing the primer pairs for the construct-specific detection of NLP and NLY. The primer pairs NLP 01-5'/NLP 01-3' and NLY 01-5'/NLY 01-3' were designed in the internal sequences of the PCR products generated by the primer pairs, p-FMV02-5'/PLRV 01-3' and p-FMV05-5'/PVY 02-3', to increase the PCR efficiencies while keeping the specificities. These primer pairs generate a 125 bp and 123 bp of amplified fragments, respectively.

To identify three lines of NLY that have been transformed with the same plasmid vector, the NLY line-specific primers (NLY15-01-5'/NLY15-01-3'; NLY15-15 line specific,

NLY02-01-5'/NLY02-01-3'; NLY15-02 line specific and NLY101-01-5'/NLY101-01-3'; NLY15-101 line specific) were designed in each of the border sequences between r-DNA and the genomic DNA by referring to the DNA sequence information described in the safety assessment document submitted from the developer. These primer pairs generate 164 bp, 86 bp and 150 bp amplified fragments, respectively. The locations of each targeted sequence are shown in Fig. 1.

The primers were synthesized and purified on a reversed-phase column by FASMAC Co., Ltd., (Atsugi, Japan), then diluted with an appropriate volume of DW to a final concentration of 50 μmol/l, and stored at -20 °C until used. The sequences of the designed oligonucleotides in this study are listed in Table 1.

PCR Conditions The reaction mixture for PCR was prepared in a PCR reaction tube. The reaction volume of 25 μl contained 25 ng of genomic DNA, 0.2 mmol/l dNTP,

1.5 mmol/l MgCl₂, 0.5 μmol/l of 5' and 3' primers and 0.625-units AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.). The reactions were buffered with PCR buffer II (Applied Biosystems) and amplified in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) according to the following PCR step-cycle program: pre-incubation at 95 °C for 10 min, denaturation at 95 °C for 0.5 min, annealing at 60 °C for 0.5 min, and extension at 72 °C for 0.5 min. The cycle was repeated 40 times followed by a final extension at 72 °C for 7 min.

Agarose Gel Electrophoresis After PCR amplification, agarose gel electrophoresis of the PCR product was carried out according to previous studies.^{5,9)} The amplification products (7.5 μl) of each specific PCR were submitted for electrophoresis at a constant voltage (100 V) on a 3% TAKARA L03 agarose gel (TAKARA Co., Ltd., Tokyo, Japan) in the TAE (40 mmol/l Tris-HCl, 40 mmol/l acetic acid, and 1 mmol/l EDTA, pH 8.0) buffer solution. After electrophore-

Table 1. List of Primers

Name	Sequence (5'→3')	Specificity	Amplicon
A: UGPase 01-5' UGPase 01-3'	5'-CTC TCC ATA CTC TCT GCT CCT CG-3' 5'-CGG CAT CAG CAG GAG AAA G-3'	Potato <i>UGPase</i> /sense Potato <i>UGPase</i> /anti-sense	Potato 111 bp
B: CryIIIA 01-5' CryIIIA 01-3'	5'-GAA AGC CTA CAA GCT GCA ATC TG-3' 5'-TCA GGT GTC ACG TAG ATA GTA G-3'	<i>CryIIIA</i> /sense <i>CryIIIA</i> /anti-sense	<i>CryIIIA</i> 117 bp
C: NL 01-5' NL 01-3'	5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TC-3' 5'-CGG TGT TGT TGT CTG CAG TCA-3'	p35S/sense <i>CryIIIA</i> /anti-sense	NeaLeaf 113 bp
D: NLP 01-5' NLP 01-3'	5'-CCC ATT TGA AGG ACA CAG AAA CA-3' 5'-AGC GGC ATA TGC GGT AAA TC-3'	pFMV- <i>GmHsp</i> /sense <i>PLRV-rep</i> /anti-sense	NewLeaf Plus 125 bp
E: NLY 01-5' NLY 01-3'	5'-CAA AAT CCC AGT ATC AAA ATT CTT-3' 5'-TGG TTT TGT ATC TTT CTT GTT GCT TC-3'	<i>GmHsp</i> /sense <i>PVY-cp</i> /anti-sense	NewLeaf Y (3 lines) 123 bp
F: NLY15-01-5' NLY15-01-3'	5'-AAC GCT GCG GAC ATC TAA ATT CA-3' 5'-TAC CGT TAC CAC TAG CTA CAC T-3'	pNOS/sense Potato genomic DNA/anti-sense	NewLeaf Y (SEMT15-15) 164 bp
G: NLY02-01-5' NLY02-01-3'	5'-TGA AAT TCG ACT AAT TAC AAG TTG A-3' 5'-GCA TCG ATC GTG AAG TTT CTC AT-3'	Potato genomic DNA/sense pNOS/anti-sense	NewLeaf Y (SEMT15-02) 86 bp
H: NLY101-01-5' NLY101-01-3'	5'-ATG GCT CGT ACC TTG TTG ATT G-3' 5'-AGG TCA AAG TTA AAA TGA AAC ATG-3'	pFMV/sense Potato genomic DNA/anti-sense	NewLeaf Y (RBMT15-101) 150 bp

A; for confirmation of validity of the DNA extracted from potato for PCR, B; for screening detection of GM potatoes, C; for detection of NL, D; for detection of NLP, E; for detection of NLY, F; for identification of NLY-SEMT15-15 line, G; for identification of NLY-SEMT15-02 line, H; for identification of NLY-RBMT15-101 line.

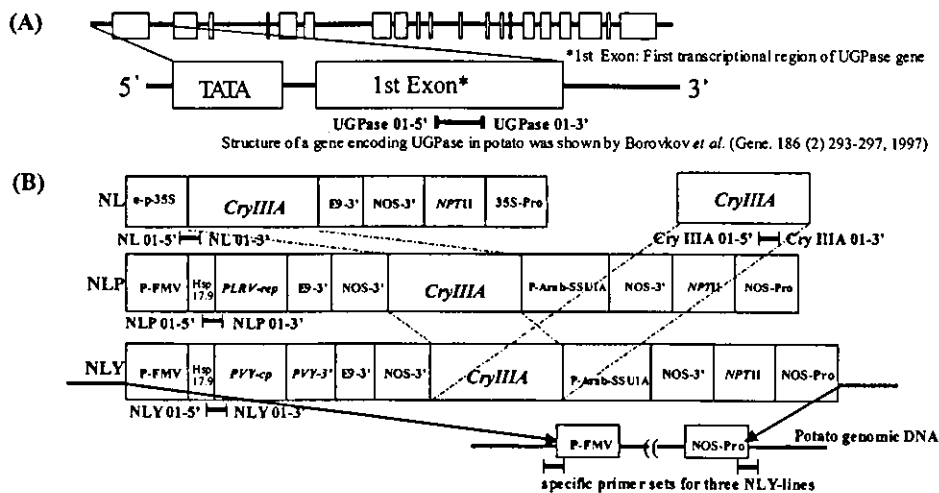


Fig. 1. Schematic Diagrams of PCR Primers Designed for Three Kinds of Genetically Modified Potatoes

(A) The structure of a gene encoding UGPase is shown. The primer pair was designed on the first exon of UGPase. (B) Schematic representation of recombinant DNA (r-DNA) introduced into three kinds of genetically modified potatoes (NL, NLP and NLY). The primer pairs were designed in the junction between the integrated r-DNA and potato genomic DNA for the specific detection of the 3 lines of NLY. Further information on the location of primers is shown in Table 1.

sis, the gel was stained in DW containing 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide for 30 min and then washed in DW for 30 min. The gel was photographed using a Chemi-lumi Image Analyzer (Chemi-lumi Image Analyzer with "Diana" system as the analytical software, Raytest, Germany).

Inter-Laboratory Studies Inter-laboratory studies, in which 6 laboratories participated, were organized by the National Institute of Health and Sciences (NIHS) to verify the detection methods. We prepared 24 separate tubes containing 200 mg test-samples for two Japanese varieties, and the 6 lines of GM potato described above. The homogeneities of the samples were confirmed by the methods using specific primer pairs with the 3 tubes selected randomly for each sample at the NIHS. The blind samples were designed as a pair of blind duplicates including 0 and 100% NL-Bt-6, NL-SPBT02-05, NLP-RBMT21-350, NLY-RBMT15-101, NLY-SEMT15-02, and NLY-SEMT15-15. The blank samples, two Japanese conventional varieties, were used to confirm whether the tests were performed correctly without false-positive results. A total of 16 tubes containing blind samples, a solution of 8 primer pairs (5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ each), and the experimental protocol were supplied to the 6 labs from the NIHS.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of the Validity of Extracted DNA for PCR

To avoid a false-negative result, it is important to confirm the validity of the extracted DNA for PCR. Therefore, the primer pair, UGPase 01-5'/UGPase 01-3', was designed as the analytical control to evaluate the validity of the potato DNA for PCR. We performed the PCR with DNAs extracted from 11 kinds of potatoes including the GM and non-GM potatoes to examine the conservation of the UGPase gene among the potato varieties. As shown in Fig. 2A, all of the potato DNAs generated a 111-bp amplified fragment with almost the same intensity, whereas no fragments were amplified from the tomato, egg plant, maize, wheat and soy DNAs. These results suggested that PCR using the primer pair should specifically detect the DNA extracted from potato. The method to identify the potato DNA has been reported by Jaccoud *et al.*¹²⁾ They designed the primer pairs to detect the patatine gene which is encoded by a multigene family. In their method, however, the amplified fragments were generated from the potato, tomato and tobacco using the primer pair for identification of the patatine gene. In contrast, we showed that PCR using the designed primer pair, UGPase 01-5'/UGPase 01-3', generated no amplified fragments in the tomato and egg plant which belong to the Solanaceae taxonomic family (Fig. 2A, lanes 13 and 14). These results suggest that potato DNA should be more stably detected with high specificity and the validity of the extracted potato DNA for PCR would be assessed by PCR using the UGPase 01-5'/UGPase 01-3' primer pair.

Specificity of Screening Method for the Detection of GM Potatoes Screening methods for the detection of the GM crops including soy and maize have already been reported.^{5,16)} The DNA sequences of the 35S promoter and the terminator sequence of the nopaline synthase gene from *Agrobacterium tumefaciens* (NOS terminator), which were commonly and frequently used to regulate the expression of a gene in the various GM crops, were selected to design the

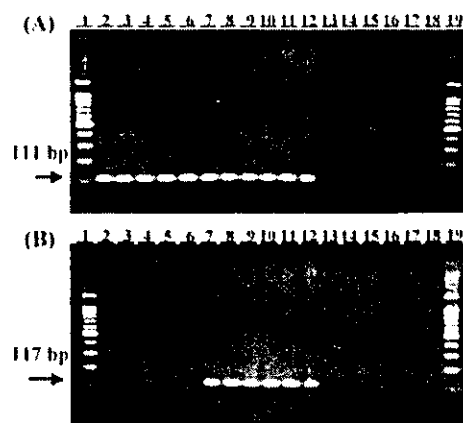


Fig. 2. Specificity of Potato and GM Potato Specific Primer Pairs

Arrowheads indicate the expected PCR amplified fragments. The primer pairs UGPase 01-5'/UGPase 01-3' (A) and CryIIIA 01-5'/CryIIIA 01-3' (B). Lanes 1 and 19, 100-bp ladder size standard; lane 2, non-GM potato (Russet Burbank); lane 3, non-GM potato (Superior); lane 4, non-GM potato (Shepody); lane 5, non-GM potato (Dan-syaku); lane 6, non-GM potato (May queen); lane 7, NL (SPBT02-05); lane 8, NL (Bt-6); lane 9, NLP (RBMT21-350); lane 10, NLY (SEMT15-15); lane 11, NLY (RBMT15-101); lane 12, NLY (SEMT15-02); lane 13, tomato; lane 14, egg plant; lane 15, maize; lane 16, soy; lane 17, wheat; lane 18, negative control (no template DNA).

primer pairs for the screening detection. The primer pair designed for the sequence of the NOS terminator could be used to detect GM potatoes for the screening purpose because the DNA sequence of the NOS terminator was commonly introduced in the NL, NLP and NLY (Fig. 1). However, the GM potatoes and the other GM crops, such as GM maize and GM soybean, should be undistinguishable using the primer pair for the NOS terminator because GM maize and GM soybean could generally contain the NOS terminator. On the other hand, a gene encoding cryIIIA should be introduced into all lines of NL, NLP and NLY and it has not been reported that the cryIIIA gene was introduced in the other GM crops. Therefore, the CryIIIA 01-5'/CryIIIA 01-3' primer pair was designed on the cryIIIA gene for the screening detection of the GM potatoes. An amplified fragment (117 bp) was specifically detected from all 6 lines of GM potato used in this study (Fig. 2B). In contrast, no amplified product was detected when the DNAs extracted from tomato, egg plant, maize, wheat, soy, and non-GM potatoes were used as the template DNA. Two lines of NLP (RBMT21-129 and RBMT22-82) were not provided from the developer and could not be used for this study, but the same results would be expected, because the same target sequence should be introduced into the two lines according to the information described in the safety assessment document.

Specificity of Construct-Specific Methods for NL, NLP and NLY In NL, the e-p-35S sequence¹⁷⁾ is used to regulate the expression of the cryIIIA gene, whereas the riblose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit *ats1A* promoter (P-Arab-SSU1A)¹⁸⁾ is used to control the cryIIIA gene expression in NLP and NLY. Therefore, the construct-specific primer pair, NL 01-5'/NL 01-3', was designed in the junction between e-p-35S and cryIIIA to specifically detect NL. As shown in Fig. 3A, two lines of NL, which were transformed with the same plasmid vector PV-STBT02, generated 113 bp amplified fragments by PCR. On the other hand, no fragment was detected in any DNAs including the non-GM and other GM potatoes. These results suggest that the 2 lines of NL should be specifically detected using the NL 01-5'/NL 01-3'

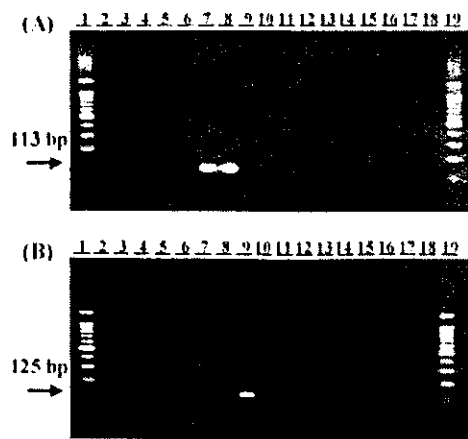


Fig. 3. Specificity of NL and NLP Construct-Specific Primer Pairs

Arrowheads indicate the expected PCR amplified fragments. The primer pairs NL 01-5'/NL 01-3' (A) and NLP 01-5'/NLP 01-3' (B). See footnotes for Fig. 2.

primer pair.

NLP and NLY contain the 35S promoter sequence of the Figwort mosaic virus (P-FMV),¹⁹⁾ and P-FMV regulates the expression of PLRVrep in NLP and that of PVYcp in NLY. If the primer pairs were designed in the gene encoding PLRVrep or PVYcp for the detection of NLP and NLY, false-positive results might be obtained in the potatoes infected by the viruses. To avoid the false-positive results that might be caused in such samples, primer pairs were designed in the specific sequence available only at the junction region derived from different organisms. Therefore, the region between the leader sequence of heatshock protein isolated from *Glycine max* (Hsp 17.9)²⁰⁾ and the sequence of the PLRVrep was selected to design the NLP construct-specific primer pair, NLP 01-5'/NLP 01-3'. To design the NLY construct-specific primer pair, NLY 01-5'/NLY 01-3', the region between Hsp 17.9 and PVYcp was selected as the target sequence. An amplified fragment (125 bp) was obtained from only NLP using the primer pair, NLP 01-5'/NLP 01-3' (Fig. 3B). Furthermore, an amplified fragment (123 bp) was generated from only 3 lines of NLY during the specificity examination of the primer pair, NLY 01-5'/NLY 01-3' (Fig. 4A). For assessment of the screening method, two lines of NLP could not be used for the examination, but the same results would be obtained because the same target sequence should be introduced into the other two lines of NLP.

Specificity of Line-Specific Methods for NLY In Japan, two lines of NLY (NLY-SEMT15-15 and RBMT15-101 line) were approved in April 2003 and the NLY-SEMT15-02 line was approved in July 2003. Therefore, it was necessary to identify the unapproved NLY-SEMT15-02 line until the safety assessment was finished. As shown in Figs. 3A and 4A, the same size PCR-amplified fragment was obtained from the three lines of NLY, which were transformed with the same plasmid vector, using the construct-specific methods. To identify the three lines, the specific region of each NLY should be selected to design the primer pair. Therefore, the border sequences between the r-DNA and potato genomic DNAs were selected as the NLY line-specific region. The NLY line-specific primers, NLY15-01-5'/NLY15-01-3', NLY02-01-5'/NLY02-01-3' and NLY101-01-5'/NLY101-01-3', were specifically designed on the NLY15-15, NLY15-02 and

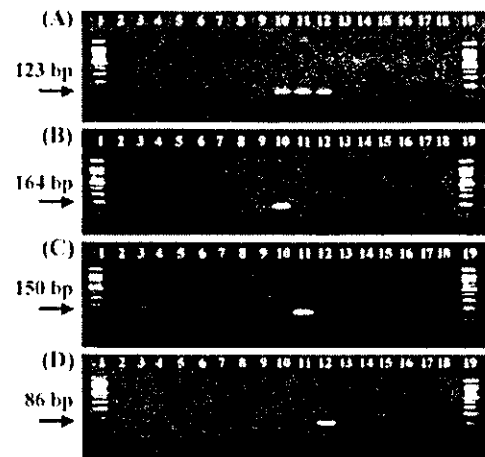


Fig. 4. Specificity of NLY Construct- and Line-Specific Primer Pairs

Arrowheads indicate the expected PCR amplified fragments. The primer pairs NLY 01-5'/NLY 01-3' (A), NLY15 01-5'/NLY15 01-3' (B), NLY101 01-5'/NLY101 01-3' (C) and NLY02 01-5'/NLY02 01-3' (D). See footnotes for Fig. 2.

NLY15-101 line, respectively, and PCR using the corresponding primer pairs generated a 164 bp, 86 bp and 150 bp of amplified fragment from the specific lines, respectively (Figs. 4B, C, D). These results suggested that the border sequence between the integrated r-DNA and plant genomic DNA should be critical for examining the line-specific detection methods. The line-specific methods for GM potatoes have not been reported yet, though the line-specific methods for other GM crops have been reported.^{21,22)} When some GM crops, which contain the same r-DNA, might be bred in the near future, these findings will help to develop the detection method with high specificity and reliability.

Sensitivities of the Methods We examined the sensitivities of the screening and construct-specific detection methods with the potato-powder mixing samples containing 0, 0.1 and 1.0% of the NL-Bt-6, NLP-RBBT21-350 and NLY-SEMT15-15 line, respectively. Twenty-five ng of extracted genomic DNAs from the samples were amplified by PCR, and all of the target sequences were clearly detected in the 0.1% and 1.0% powder samples (Fig. 5A). It has been reported that the amount of unreplicated haploid genome (*i.e.*, the 1C value) of potato is 0.88 pg.²³⁾ On the basis of the 1C value, 28.4 copies of the haploid GM potato genome were calculated to be present in the reaction tube prepared for a 0.1% potato-powder sample, since 25 pg of genomic DNA derived from each GM potato should be contained in the reaction tube. Furthermore, one or more copies of the target sequences are presented in each tetraploid genome of the NL-Bt-6, NLP-RBBT21-350 and NLY-SEMT15-15 line according to the information provided by Monsanto. Therefore, at least, 7.1 copies of the target sequences should be contained in the reaction tube. Theoretically, a copy of the target sequence could be amplified by PCR. In fact, the specific amplified fragments were detected in the 0.05% samples prepared by twice diluting the DNAs extracted from the 0.1% powder samples with non-GM potato DNA (data not shown). The potato-powder samples with a concentration less than 0.1% were not used for the examination since it was difficult to correctly prepare the samples. However, GM-potatoes might be detected in the lower concentrated samples using screening and construct-specific detection methods. We further ex-

amined the sensitivity of the NLY line-specific detection methods using potato-DNA samples containing 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0% DNAs extracted from the three lines of NLY. As shown in Fig. 5B, by using the NLY-SEMT15-15 and RBMT15-101 line-specific methods, the specific amplified fragments were detected in the 0.05% sample. On the other hand, the specific amplified fragment for the NLY-SEMT15-02 was detected in the 0.5% sample. These results suggested that the detection limits of NLY-SEMT15-15, RBMT15-101 should be 0.05%, whereas the detection limit

of the NLY-SEMT15-02 line-specific method was 0.5%. The sensitivity of the PCR methods would be affected by various factors including the copy numbers of the target sequence, physical character of the primer pair and PCR conditions. For the line-specific methods, the copy number should not be correlated with the sensitivity because a single target sequence is presented in each line. To increase the sensitivity of the NLY-SEMT15-02 line-specific method, we would have to increase the amount of DNA used for the template, to change the PCR condition suitable for the method, or to redesign the primer pair.

Inter-laboratory Study To confirm the specificity and reproducibility of the methods, we conducted inter-laboratory studies using 100% pure non-GM and GM potato-powder materials as blind samples. The blind samples were prepared as blind duplicates including two Japanese conventional varieties and 6 lines of GM potatoes (NL-Bt-6, NL-SPBT02-05, NLP-RBMT21-350, NLY-RBMT15-101, NLY-SEMT15-15 and NLY-SEMT15-02). All participants received the protocol, primer solutions, and 16 blind-sample tubes containing different potato powders. Six laboratories participated in the studies and analyzed a total of 96 samples. The methodology of the experiment was designed as described below. For the screening of the GM potato, a first PCR was performed to detect the potato taxon specific gene and cryIIIA gene. When the screening result was positive, a second PCR was performed to identify NL. If the sample was NL-negative, a third PCR was performed to identify NLY. A fourth PCR was performed for the NLY positive samples to identify the line of NLY. On the other hand, the NLY negative-samples was identified as NLP by performing an NLP construct-specific PCR. Typical results reported by a participant are shown in Table 2. The results showed that the test was correctly performed following the designed flow of the experiment, and no false-negative and -positive results were

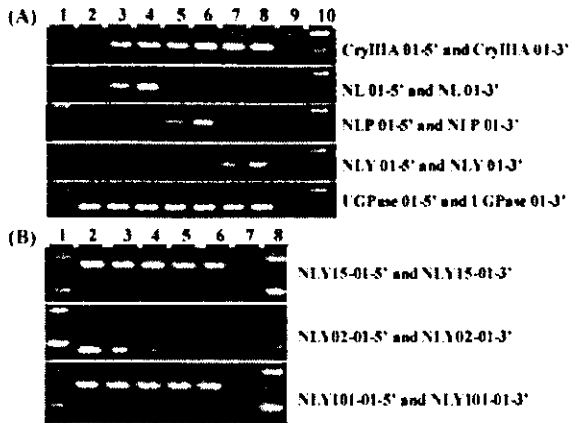


Fig. 5. Sensitivity of the PCR Methods Using the Specific Primer Pairs

Genomic DNAs extracted from the mixed samples of potato powder containing the 0.1 or 1.0% of some GM potatoes (A) or mixed samples of genomic DNAs containing various amounts of genomic DNAs extracted from some GM potatoes (B) were amplified. (A) Lanes 1 and 10, 100- and 200-bp size standard bands of ladder marker; lane 2, non-GM potato; lanes 3 and 4, potato containing 0.1 or 1.0% of NL; lanes 5 and 6, potato containing 0.1 or 1.0% of NLP; lanes 7 and 8, potato containing 0.1 or 1.0% of NLY; lane 9, negative control (no template DNA). (B) Lanes 1 and 8, 100 and 200 bp size standard bands of ladder marker; lanes 2 to 7, genomic DNAs containing 5.0, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05% of genomic DNAs extracted from NLY-SEMT15-15, SEMT15-02, or RBMT 15-101, respectively; lane 7, negative control (DNA extracted from non-GM potato was used as template).

Table 2. Typical Results of Inter-laboratory Study

Targets	Primer sets	Sample															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
UGPase	UGPase 01-5' UGPase 01-3'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CryIIIA	CryIIIA 01-5' CryIIIA 01-3'	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
NL	NL 01-5' NL 01-3'	+	-	-	-	-	/	/	+	/	+	-	-	/	+	-	-
NLP	NLP 01-5' NLP 01-3'	/	+	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/
NLY	NLY 01-5' NLY 01-3'	/	-	+	+	+	/	/	/	/	-	+	/	/	+	+	
SEMT 15-02	NLY02-01-5' NLY02-01-3'	/	/	+	-	-	/	/	/	/	/	-	/	/	+	-	
SEMT 15-15	NLY15-01-5' NLY15-01-3'	/	/	-	+	-	/	/	/	/	/	-	/	/	-	+	
RBMT 15-101	NLY101-01-5' NLY101-01-3'	/	/	-	-	+	/	/	/	/	/	+	/	/	-	-	
Judgments		NL	NLP	15-02	15-15	15-101	Negative	Negative	NL	Negative	NL	NLP	15-101	Negative	NL	15-02	15-15

+; positive, -; negative, /; no test shown. A first PCR was performed with UGPase 01-5'/UGPase 01-3' and CryIIIA 01-5'/CryIIIA 01-3'. When the result was positive, a second PCR was performed with NL 01-5'/NL 01-3'. If the PCR product was not obtained from the second PCR, a third PCR was performed with NLY 01-5'/NLY 01-3'. A fourth PCR was performed for the NLY-positive samples with NLY15 01-5'/NLY15 01-3', NLY101 01-5'/NLY101 01-3' and NLY02 01-5'/NLY02 01-3', respectively. On the other hand, the NLY-negative samples were identified by the PCR with NLP 01-5'/NLP 01-3'. Two Japanese conventional cultivars were judged as negative.

Table 3. Judgments and Percentage of Correct Results for All Test Samples in Inter-laboratory Study

Laboratory	Judgement						
	NL	NLP	NLP15-15	NLY15-02	NLY15-101	Dansyaku	Mayqueen
I	+++++/++++	++/++	-+/-++	++/++	++/++	-/-/-	-/-/-
II	+++++/++++	++/++	-+/-++	++/++	++/++	-/-/-	-/-/-
III	+++++/++++	++/++	-+/-++	++/++	++/++	-/-/-	-/-/-
IV	+++++/++++	++/++	-+/-++	++/++	++/++	-/-/-	-/-/-
V	+++++/++++	++/++	-+/-++	++/++	++/++	-/-/-	-/-/-
VI	+++++/++++	++/++	-+/-++	++/++	++/++	-/-/-	-/-/-
Percentage of correct results	100	100	100	100	100	100	100

+++++: both of two positive samples were judged correctly, -/-/-: both of two negative samples were judged correctly. For NL, ++++++ showed that all of four positive samples were judged correctly, because NL samples were included the two lines of NL as blind duplicates, which can not be identified using the construct-specific method.

reported. In all results reported from the six laboratories, specific amplified fragments were completely detected in all test samples and no misjudgments were reported from any laboratories (Table 3). These results suggest that the proposed methods should be specific and reproducible for the detection of each line of GM potatoes.

In summary, detection methods using PCR were developed for screening and identifying eight lines of GM potato approved in Japan for human consumption. The highly specific PCR methods reported in this study are simple and useful for identifying GM potatoes.

Acknowledgment We are very grateful to the Monsanto Co., U.S.A., for providing us the 6 lines of GM potato reference materials.

This study was supported in part by a grant from the MHLW of Japan.

REFERENCES

- 1) James C., *IS-444*: Ithaca, NY, No. 30 (2003).
- 2) Hino A., *Toxic Pathology*, **30**, 126–128 (2000).
- 3) Matsuoka T., Kawashima Y., Miura H., Kusakabe Y., Isshiki K., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A., *J. Food Hyg. Soc. Jan.*, **41**, 137–143 (2000).
- 4) Matsuoka T., Kuribara H., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Isshiki K., Toyoda M., Hino A., *J. Food Hyg. Soc. Jan.*, **42**, 28–32 (2001).
- 5) Matsuoka T., Kuribara H., Takubo K., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Isshiki K., Toyoda M., Hino A., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2100–2109 (2002).
- 6) Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirano T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A., *J. AOAC Int.*, **85**, 1077–1089 (2002).
- 7) Shindo Y., Kuribara H., Matsuoka T., Futo S., Sawada C., Shono J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A., *J. AOAC Int.*, **85**, 1119–1126 (2002).
- 8) Goda Y., Asano Y., Shibuya M., Hino A., Toyoda M., *J. Food Hyg. Soc. Jan.*, **42**, 231–236 (2001).
- 9) Akiyama H., Sugimoto K., Matsumoto M., Isuzugawa K., Shibuya M., Goda Y., Toyoda M., *J. Food Hyg. Soc. Jan.*, **43**, 24–29 (2002).
- 10) Akiyama H., Watanabe T., Wakui C., Tiba Y., Shibuya M., Goda Y., Toyoda M., *J. Food Hyg. Soc. Jan.*, **43**, 301–305 (2002).
- 11) Salomon-Blacburn R. M., Barker H., *Heredity*, **86**, 17–35 (2001).
- 12) Jaccoud E., Höhne M., Meyer R., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 550–557 (2003).
- 13) Watanabe T., Kasama K., Wakui C., Shibuya M., Matsumoto M., Akiyama H., Maitani T., *J. Food Hyg. Soc. Jan.*, **44**, 281–288 (2003).
- 14) Borovkov A. Y., McClellan P. E., Secor G. A., *Gene*, **186**, 293–297 (1997).
- 15) Perlack F. J., Stone T. B., Muskopf Y. M., Petersen L. J., Parker G. B., McPherson S. A., Wyman J., Love S., Reed G., Biever D., Fischhoff D. A., *Plant Mol. Biol.*, **22**, 312–321 (1993).
- 16) Vollenhofer S., Burg K., Schmidt J., Kroath H., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5038–5043 (1999).
- 17) Fischhoff D. A., Fuchs R. L., Lavrik P. B., McPherson S. A., Perlack F. J., U.S. Patent 5495071 (1996).
- 18) Wong E. Y., Hironaka C. M., Fischhoff D. A., *Plant Mol. Biol.*, **20**, 81–93 (1992).
- 19) Richins R. D., Scholthof H. B., Shepherd R. J., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 8451–8466 (1987).
- 20) Raschke E., Baumann G., Scholl F., *J. Mol. Biol.*, **199**, 549–557 (1988).
- 21) Berdal K. G., Holst-Jensen A., *Eur. Food Res. Technol.*, **213**, 432–438 (2001).
- 22) Holck A., Väitilingom M., Didierjean L., Rudi K., *Eur. Food Res. Technol.*, **214**, 449–453 (2002).
- 23) Bennett M. D., Leitch I. J., *Ann. Bot. (London)*, **80**, 169–196 (1997).

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

研究成果に関する刊行物

(平成14～16年度)

学会

母乳中ダイオキシンの酵素免疫測定法の開発

○斉藤貢一¹, 石塚昌宏², 菅原幸雄², 小川政彦¹, 竹熊美貴子¹, 浦辺研一¹, 中澤裕之³, 松木容彦⁴ (¹埼玉衛研, ²コスモ石油, ³星薬大, ⁴食薬安全セ)

【目的】高感度かつ簡便・迅速なダイオキシンの酵素免疫測定法(ELISA)を開発するために,主に母乳を対象としたクリーンアップ法を検討し,更に,GC/MS法との比較を行って,ヒト試料における毒性評価法としての有用性についても検討した。

【方法】公定法に準じてヒト母乳から脂肪を抽出した後,市販のディスポーザブルタイプの多層シリカゲルカートリッジとアルミナ固相抽出カートリッジを連結させたカラムに脂肪を負荷し,ヘキサンで溶出後,連結カートリッジを分離し,アルミナカートリッジを60%ジクロロメタン/ヘキサンで溶出した。Triton X-100を添加し,窒素パージにより溶媒を留去した後,DMSOを加えて再溶解し,ELISA用試験溶液とした。ELISAによる測定は既報*に準じて行った。

【結果および考察】多層シリカゲルカートリッジとアルミナカートリッジとの連結カラムを用いることにより,ダイオキシン類(PCDD/Fs,ノンオルト Co-PCBs)のクリーンアップ操作が容易に行えるようになり,且つその精製効果もより良好となった。また,実試料(母乳)を対象としてELISAとGC/MS法とを比較検討したところ,両者の測定データには良好な相関があることが認められ,母乳中ダイオキシンの毒性評価法としての実用性が確認された。

* : Y. Sugawara et al., Chemosphere 46 (2002) 1471-1476

ベビーフード中ダイオキシン類の分析および摂取量評価

斉藤貢一¹, 大村厚子², 竹熊美貴子², 伊藤里恵¹, 井之上浩一¹, 松木容彦³, 中澤裕之¹

¹星薬科大学・薬品分析化学教室, ²埼玉県衛生研究所・生体影響担当, ³(社)日本食品衛生協会・食品衛生研究所

【目的】 乳幼児が食品から摂取するダイオキシン量を評価するために、いわゆるベビーフードのモデル食品群を提案した。更に、実際に市販されているベビーフードの各食品群におけるダイオキシン類残留分析を行うと共に、ダイオキシン類摂取量の新たな評価法を考案して、乳幼児が市販ベビーフードから摂取するダイオキシン類の摂取量評価を試みた。

【方法】 ベビーフードを大まかに6種類の食品群(菓子, 野菜, フルーツ, 魚, 肉, 乳製品)に分類してそれぞれのダイオキシン分析を行い、総摂取量の推定量を検討した。ダイオキシン分析は、公定法(食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法暫定ガイドライン)に準じて行い、毒性等量(TEQ)の算出に際してはWHO-TEF(1998)を用いた。体重当たりの摂取量算出に際しては、調査対象としたベビーフードの適用月齢が5~10ヶ月(平均7.5ヶ月)であったこと、また、7.5ヶ月の乳幼児の体重がおよそ8kgであったことから、これを基準として適用した。

【結果】 乳幼児(月齢7.5ヶ月)の体重当たりの1日摂取量は、0.061 pg TEQ/kgbw /day (ND=0で算出) および1.2 pg TEQ/kgbw /day (ND=定量下限値×1/2で算出)となった。この値は我が国がダイオキシン摂取量に対して定めた耐容1日摂取量(TDI: Tolerable Daily Intake)の4pgを十分に下回っていたことから、市販ベビーフードからのダイオキシン摂取量は直ちに問題になる量ではないと考えられる。

Assessment of dietary intake of dioxins from commercial baby foods

Koichi SAITO¹, Atsuko OHMURA², Mikiko TAKEKUMA², Rie ITO¹, Koichi INOUE¹, Yasuhiko MATSUKI³ and Hiroyuki NAKAZAWA¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, Japan

²Biological Effect Research Group, Saitama Institute of Public Health, Japan

³Institute of Food Hygiene, Japan Food Hygiene Association, Japan

As for the assessment of dietary intake of dioxins from baby foods, we proposed a model food group of the baby foods. We analyzed dioxins which contaminated in commercial baby foods, and we also designed an original method for the evaluation of the intake amount of baby foods. Furthermore, assessment of dietary intake of dioxins from commercial baby foods was attempted. The baby foods were roughly classified in six food groups (cake, vegetable, fruit, fish, meat, and dairy products), and each group was analyzed, followed by estimation of the total amount of dioxins. The dioxin analysis was carried out based on the Japanese official method. When the amount of intake per each body weight was calculated, the weight of a baby was assumed to be 8kg. Because the average age of babies for the baby foods was 7.5 months old (5-10 months) and, the weight of the baby of 7.5 months old was reported to be about 8kg. The amount of the daily intake of dioxins for a baby (7.5 months old) was 0.061 pg TEQ/kg bw /day (ND = 0) or 1.2 pg TEQ/kg bw /day (ND = LOQ × 1/2). These values were below the amount of TDI (Tolerable Daily Intake: 4 pg TEQ/kg bw /day) which is regulated in Japan. Therefore, we think that the amount of the daily dioxin intake from commercial baby foods is not a serious problem at present.