

遺伝子組換え食品中のNPTIIタンパク質検出用ELISA法の構築

(2005年7月7日受付)

(2005年11月5日受理)

佐々木 和生^{a)}、梅津博紀^{a)}、山田晃世^{b)}、鎌田博^{c)}、小関良宏^{b)}

a) 青森大学薬学部

b) 東京農工大学工学部

c) 筑波大学遺伝子実験センター

キーワード: 遺伝子組換え食品、ネオマイシンホストランスフェラーゼII(NPTII)、酵素免疫測定法

概 要

ネオマイシンホストランスフェラーゼII(NPTII)タンパク質を特異的に検出するELISAシステムを組換え大腸菌で大量発現したNPTIIタンパク質に対する抗体を使用して構築した。このシステムを用いることで、遺伝子組換えタバコで発現しているNPTIIタンパク質を定性的に検出することができた。一方、遺伝子組換えしていないタバコ、ダイズ、トウモロコシ、ジャガイモでは非特異的な検出は認められなかった。これらの結果から、本研究で構築したELISAシステムは、遺伝子組換え食品中のNPTIIタンパク質のモニタリングに適用可能であることが示唆される。

Quantitative Detection System for Maize Sample Containing Combined-Trait Genetically Modified Maize

Hiroshi Akiyama,^{*,†,‡} Takahiro Watanabe,^{†,‡} Kaoru Wakabayashi,[†] Shinsuke Nakade,[§] Shuji Yasui,[§] Kozue Sakata,[†] Ryoko Chiba,^{||} Frank Spiegelhalter,[⊥] Akihiro Hino,[#] and Tamio Maitani[†]

National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, Yasui Kikai Corporation, 2-2-13, Nakano-cho, Miyakojima-ku, Osaka 534-0027, Japan, Showa Pharmaceutical University, 3-3165, Higashitamagawagakuen, Machida, Tokyo 194-8543, Japan, GeneScan USA, Inc., 2315 North Causeway Boulevard, Suite 200, Metairie, Louisiana 70001, and National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Various countries have established regulations that stipulate the labeling of agricultural commodities, feed, and food products that contain or are made from genetically modified (GM) material or that contain adventitious GM material in amounts that exceed certain threshold levels. While regulations in some countries refer to GM material on a weight per weight (w/w) percentage, the currently applied detection methods do not directly measure the w/w percentage of the GM material. Depending on the particular method and the sample matrix it is applied to, the conversion of analytical results to a w/w percentage is challenging or not possible. The first rapid PCR system for GM maize detection on a single kernel basis has been developed. The equipment for the grinding of individual kernels and a silica membrane-based 96-well DNA extraction kit were both significantly revised and optimized for this particular purpose, respectively. We developed a multiplex real-time PCR method for the rapid quantification of GM DNA sequences in the obtained DNA solutions. In addition, a multiplex qualitative PCR detection method allows for the simultaneous detection of different GM maize traits in each kernel and thereby for identification of individual kernels that contain a combination of two or more GM traits. Especially for grain samples that potentially contain combined-trait GM maize kernels, the proposed methods can deliver informative results in a rapid, precise, and reliable manner.

Genetically modified organisms (GMO) are products of recombinant DNA technology, which can result in improved functional properties. In the past two decades, tremendous advances have been achieved in genetically modified (GM) crop species including maize. The production of GM crops, especially

maize and soybean, has increased in the United States over the past several years.¹ Recently, the production of combined-trait products (stacks) of GM maize, in which two or more different characteristic traits were inserted, has also increased in the United States due to their enhanced production efficiency. The stack varieties of GM maize are actually bred by crossing a plant containing one transgene with individuals harboring another transgene to introduce sequentially new transgenes into the plant.

In some countries, the acceptance of GM foods by consumers is still controversial, and concerns about their safety persist among public opinion. In many countries, the labeling of grains, feedstuff, and foodstuff is mandatory if the GMO content exceeds a certain level of approved GM varieties. For instance, the European Union, Japan and Korea have set threshold values of 0.9, 5, and 3%, respectively, of GMO material in a nongenetically modified (non-GM) background as the basis for labeling.^{2–4} The enforcement of these threshold values has created a demand for the development of reliable GMO analysis methods.

Most of the developed analytical methods for determining the GMO content in foods are based on the polymerase chain reaction (PCR) due to its sensitivity, specificity, and applicability for the analysis of complex food matrixes.^{5–18} Furthermore, many real-time PCR systems have been developed to identify and quantify GM maize, GM soybeans, and GM varieties of other agricultural

* Corresponding author. Tel: +81-3-3700-9397. Fax: +81-3-3707-6950. E-mail: akiyama@nihs.go.jp.

[†] National Institute of Health Sciences.

[‡] These authors contributed equally to this work.

[§] Yasui Kikai Corp.

^{||} Showa Pharmaceutical University.

[⊥] GeneScan USA, Inc.

[#] National Food Research Institute.

- (1) James, C. Global status of commercialized transgenic crops: ISAAA Briefs. 2003.
- (2) Commission Regulation (EC) 49/2000 of January 10, 2000. *Official J. Eur. Communities* 2000; Vol. L6, pp 13–14.
- (3) Notification 79 of March 15, 2000, Department of Food Safety, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.
- (4) Notification 2000-31 of April 22, 2000, Ministry of Agriculture and Forestry of Korea.
- (5) Hardegger, M.; Brodmann, P.; Herrmann, A. *Eur. Food Res. Technol.* 1999, 209, 83–87.
- (6) Jankiewicz, A.; Broll, H.; Zagon, J. *Eur. Food Res. Technol.* 1999, 209, 77–82.
- (7) Vollenhofer, S.; Burg, K.; Schmidt, J.; Kroath, H. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 5038–5043.
- (8) Hupfer, C.; Hotzel, H.; Sachse, K.; Engel, K. H. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1998, 206, 203–207.
- (9) Matsuoka, T.; Kawashima, Y.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Sebata, T.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 1999, 40, 149–157.
- (10) Matsuoka, T.; Kawashima, Y.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 2000, 41, 137–143.

commodities.^{19–26} Real-time PCR systems are based on the use of fluorescent markers that monitor the formation of the PCR product during each cycle of the reaction. Most commonly, GMO quantification by quantitative real-time PCR methods is calculated from the ratio of the target GMO DNA versus DNA from the respective target plant species.

Since the analyte of these methods is DNA, the immediate results reflect, for example, the ratio of two DNA targets in the sample. Nevertheless, the unit of the reported results should ideally be equivalent to the weight per weight (w/w) percentage of the GM material in the sample. For example, it would preferably reflect the number of GM maize kernels relative to the total number of maize kernels.

Although levels of adventitious commingling of GM materials into a non-GM background for the labeling system refer to GM material on a w/w percentage, the currently applicable detection methods do not directly measure the w/w percentage of GM material. The GM percentages calculated using current quantitative PCR methods are calculated by converting relative copy numbers between a specific recombinant DNA (rDNA) sequence and a taxon-specific DNA sequence into a w/w percentage using appropriate reference materials. The GMO percentage in a maize sample containing the combined-trait GM maize as determined by the currently available methodology is prone to be overestimated as compared to the actual w/w percentage of GM maize in the sample because the relative copy numbers are calculated on a haploid basis. A combined-trait GM maize kernel contains the same traits as the two separate GM maize kernels from both

individual parent GM lines. Once kernels in a grain sample have been homogenized to perform the analysis with a subsample of the homogenate, combined-trait GM kernels cannot be differentiated from separate kernels of the parent lines. This restriction is intrinsic to the sample homogenization and applies entirely irrespective of the subsequent detection methodology and target analyte. For instance, it applies to the 35S screening quantification by real-time PCR as much as it applies to the detection of biotechnology proteins by immunoassays. Only the analysis of individual maize kernels in a sample can reveal the presence of stacked maize products. In the presence of combined-trait GM maize kernels, a single-kernel analysis is also a prerequisite for determination of the GMO percentage on a w/w or kernel/kernel basis. However, the analysis of individual maize kernels has been thought to be time-consuming and not feasible for samples with hundreds of kernels.

In the present study, we developed the first rapid and simple detection system that delivers informative results by single-kernel analysis of grain samples that could potentially contain combined-trait GM maize kernels.

EXPERIMENTAL SECTION

Maize Samples. Non-GM maize grain was obtained from the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) in Japan. Maize seed from MON810, GA21, and a stacked trait product (MON810 × GA21) were kindly provided by the Monsanto Co. (St. Louis, MO) for the positive controls of the GM maize.

Oligonucleotide Primers and Probes. Sets of primer pairs and Taq-Man probes for the construct-specific and universal GM quantification were consistent with those described in our previous paper.^{20,21} All the sets of primer pairs were purchased from Fasmac Co., Ltd. (Kanagawa, Japan), and the Taq-Man probes (p35S-Taq, GA21-Taq, SSIIB-Taq) for the detection of the cauliflower mosaic virus 35s promoter sequence (p35S), GA21 specific sequence, and maize starch synthase IIb gene sequence (SSIIB) are labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) and 6-carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA) at the 5' and 3' ends, respectively, and were also purchased from Fasmac Co., Ltd. In the Japanese official standard real-time PCR methods,^{20,21,27} the SSIIB 3 system (SSIIB 3-5' and SSIIB 3-3' with SSIIB-Taq) were used as the primers and probe for the quantification of the taxon-specific gene encoding SSIIB, p35S-1 system (P35S 1-5' and P35S 1-3' with P35S-Taq) and GA21-3 system (GA21 3-5' and GA21 3-3' with GA21-Taq) are used for the screening method. The target sequence of p35S-1 system to detect the 35S promoter region derived from cauliflower mosaic virus is widely found in the rDNA of almost all GM events with the exception of GA21, and the GA21-3 system was designed to detect the construct specific sequence GM maize event GA21. The total quantification value obtained p35S-1 and GA21-3 systems is deemed as the estimated total amount of GM maize events.²⁷ In the multiplex real-time PCR method developed in this study, the SSIIB-TaqV, which is labeled with VIC and TAMRA at the 5' and 3' ends, was newly synthesized by Applied Biosystems (AB; St. Louis, MO) and used as a probe for the detection of the SSIIB instead of SSIIB-Taq. The SSIIB-TaqV sequence is 5'-VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'.²²

(27) Notification 0517001, 2004, Department of Food Safety, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

- (11) Matsuoka, T.; Kuribara, H.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 2001, 42, 24–32.
- (12) Matsuoka, T.; Kuribara, H.; Takubo, K.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.; Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2100–2109.
- (13) Akiyama, H.; Sugimoto, K.; Matsumoto, M.; Işuzugawa, K.; Shibuya, M.; Goda, Y.; Toyoda, M. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 2002, 43, 24–29.
- (14) Akiyama, H.; Watanabe, T.; Wakui, C.; Chiba, Y.; Shibuya, M.; Goda, Y.; Toyoda, M. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 2002, 43, 301–305.
- (15) Watanabe, T.; Kasama, K.; Wakui, C.; Shibuya, M.; Matsuki, A.; Akiyama, H.; Maitani, T. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 2003, 44, 281–288.
- (16) Watanabe, T.; Kuribara, H.; Mishima, T.; Kikuchi, H.; Kodama, T.; Futo, S.; Kasama, K.; Toyota, A.; Nouno, M.; Saita, A.; Takahashi, K.; Hino, A.; Akiyama, H.; Maitani, T.; Kubo, M. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 1333–1339.
- (17) Studer, E.; Rhyner, C.; Luthy, J.; Hubner, P. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1998, 207, 207–213.
- (18) Hupfer, C.; Hotzel, H.; Sachse, K.; Moreano, F.; Engel, K. H. *Eur. Food Res. Technol.* 2000, 212, 95–99.
- (19) Vaitilingom, M.; Pijnenburg, H.; Gendre, F.; Brignon, P. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 5261–5266.
- (20) Kuribara, H.; Shindo, Y.; Matsuoka, T.; Takubo, K.; Futo, S.; Aoki, N.; Hiraio, T.; Akiyama, H.; Goda, Y.; Toyoda, M.; Hino, A. *AOAC Int.* 2002, 85, 1077–1089.
- (21) Shindo, Y.; Kuribara, H.; Matsuoka, T.; Futo, S.; Sawada, C.; Shono, J.; Akiyama, H.; Goda, Y.; Toyoda, M.; Hino, A. *J. AOAC Int.* 2002, 85, 1119–1126.
- (22) Yoshimura, T.; Kuribara, H.; Matsuoka, T.; Kodama, T.; Shigematsu, M.; Watanabe, T.; Akiyama, H.; Maitani, T.; Furui, S.; Hino, A. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 2052–2059.
- (23) Hubner, P.; Waiblinger, H. U.; Pietsch, K.; Brodmann, P. *J. AOAC Int.* 2001, 84, 1855–1864.
- (24) Hubner, P.; Studer, E.; Luthy, J. *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 1137–1138.
- (25) Lipp, M.; Brodmann, P.; Pietsch, K.; Pauwels, J.; Anklam, E.; Borchers, T.; Braunschweiger, G.; Busch, U.; Eklund, E.; Eriksen, F. D.; Fagan, J.; Fellingner, A.; Gaugitsch, H.; Hayes, D.; Hertel, C.; Hortner, H.; Joudrier, P.; Kruse, L.; Meyer, R.; Miraglia, M.; Muller, W.; Philipp, P.; Popping, B.; Rentsch, R.; Wurtz, A.; et al. *J. AOAC Int.* 1999, 82, 923–928.
- (26) Huang, H. Y.; Pan, T. M. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 3264–3268.

Determination of GMO Amount Using Japanese Official Standard Real-Time PCR Methods. The percentage of GMO in the grinding model test sample was determined using the Japanese official standard real-time PCR methods^{20,21,27} after sufficiently grinding the model test sample kernels (See the method in on-line Supporting Information.). The ratios of the copy number of the transgenic gene and the taxon-specific gene in each genuine seed of a representative variety of the GM event were calculated using the following formula-1 and defined as the conversion factor (C_f).²⁰⁻²² The GMO amounts (%) are calculated using the following defined C_f and formula-2. The C_f for MON810 and GA21 were 0.39 and 2.01, respectively.²⁷

Formula-1: $C_f = (\text{copies of the transgenic gene in the DNA extracted from GM seeds}) / (\text{copies of the taxon-specific gene in the DNA extracted from GM seeds})$.

Formula-2: $\text{GMO amount (\%)} = (\text{copies of the transgenic gene in the DNA extracted from an unknown sample} \times 100) / (\text{copies of the taxon-specific gene in the DNA extracted from an unknown sample} \times C_f)$.

Evaluation of Purity and Concentration of Extracts. The DNA concentration was measured by UV absorption at 260 nm, while the DNA purity was evaluated on the basis of the UV absorption ratios of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} . (All the samples showed an A_{260}/A_{280} ratio ranging from 1.6 to 1.9 and an A_{260}/A_{230} ratio ranging from 1.8 to 2.0.)

Grinding of Individual Single Maize Kernel. We individually ground the maize kernels using a Multi-Beads Shocker (model MB601NIHS, Yasui Kikai Co. Osaka, Japan) with an improved tube, which was developed in this study. The grinding of individual single maize seeds was performed using the Multi-Beads Shocker with the new tube holder (type SH-123) at 2500 rpm for 1 min and repeated for 1 min after the tube holder was reversed. To remove the powders and broken pieces of the other kernels, the kernels were washed with 1% sodium dodecyl sulfate, rinsed three times with distilled water (DW) and dried at 40 °C for 40 min in the incubation box before grinding the kernels as described above. The modified Multi-Beads Shocker with the new tube holder (model MB601NIHS), modified sample tube (ST-0350MZ), and disruption medium (metal corn) (MC0316MZ) in this study is commercially available from Yasui Kikai Co. (website: <http://www.yasuikikai.co.jp/>)

DNA Extraction from Each Maize Kernel Using DNeasy 96 Plant Kit. We modified the volume of the several extraction buffers for use and the procedure in the DNeasy 96 Plant kit protocol to simultaneously extract the maize genomic DNA from the finely ground individual powders. The modified points are as follows. Buffer AP1 (preheated to 65 °C) and RNase A (final concentration, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were combined to make a working solution. One milliliter of the working solution was directly added to each modified sample tube containing the ground maize powder described in the previous section. The tubes were capped and incubated for 30 min at 65 °C (inverted 10 times at intervals of 10 min). A 170- μL aliquot of buffer AP2 solution was then added to each solution. The tubes were sealed to avoid leakage during shaking. The tubes were next incubated for 30 min at -20 °C, and then centrifuged for 20 min at 3000 rpm using Metalfuge (MBG100, Yasui Kikai Co.). A 400- μL aliquot of each supernatant was then carefully transferred to new microtubes (LF tube;

Prescribe Genomics Co., Tsukuba, Japan). The microtubes were centrifuged for 5 min at 12 000 rpm. After transfer of the solution to the DNeasy 96 plate and aspiration, 800 μL of buffer AW was carefully added to each sample. The washing was repeated three times. A 800- μL aliquot of 100% ethanol was then added to each sample. For the elution of DNA from each well of the DNeasy 96 plate, 75 μL of DW (preheated to 65 °C) was added to each well. The plate was resealed and incubated for 5 min at room temperature and aspirated until each DNeasy membrane was dry. The elution was repeated twice. The entire protocol can be seen in the on-line Supporting Information.

Multiplex Real-Time PCR Conditions. The amplification curves of the target sequence was monitored using a fluorescent dye, which was labeled for the designed oligonucleotide probes, using the ABI PRISM 7900HT sequence detection system (AB). The reaction volume of 25 μL contained 2.5 μL of the sample genomic DNA solution, 12.5 μL of Universal Master Mix (AB), 0.5 μM primer pair, and 0.2 μM probe (except for the case of p35S, 0.1 μM probe). The reaction conditions were made for the following PCR step-cycle program: 2 min at 50 °C, and 95 °C for 10 min and 45 cycles, 30 s at 95 °C, and 1 min 30 s at 59 °C.

If the amplification curves for the GMO detection or taxon gene detection were clearly observed after 15 cycles, we considered the sample as positive. If the amplification curve for the GMO detection or taxon gene detection was not observed after 15 cycles, we considered the sample as negative.

In this study, the GM Maize Detection Plasmid Set-ColE1/TE -(Nippon Gene Co., Tokyo, Japan) was used as the positive control. This plasmid set contained six concentrations (including the ColE1 plasmid as nontemplate control) of the reference plasmid pMul5, which is inserted into all the amplification products of p35S, GA21, and SSIIb, diluted with the TE buffer (pH 8.0) including 5 ng/ μL ColE1 plasmid.^{20,21} The ColE1 plasmid contained none of the amplification products of p35S, GA21, and SSIIb. The positive controls were prepared using the two concentrations of the plasmid set such as 250 000 and 1500 copies/plate. In the negative control, the ColE1 plasmid was also used as the nontemplate control for the analysis. In the reaction plate, the real-time PCR was performed in duplicate using two reaction vessels for NTC as the negative control and positive control (two concentrations of the plasmid set). The other 90 reaction vessels were individually examined for the genomic DNA samples extracted from single maize kernels.

Multiplex Qualitative PCR Conditions. Multiplex qualitative PCR detection was performed according to our previously reported method with some modifications.¹¹ The reaction mixture for the 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 MgCl_2 , 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 5' and 3' primers, and 0.625 unit of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA). The reactions were buffered with PCR buffer II (AB) and amplified in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; AB) according to the following PCR step-cycle program: preincubation 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.

In addition, after PCR amplification, agarose gel electrophoresis of the PCR product was carried out according to previous

Table 1. Overestimation of GMO Amounts Using the Conventional Real-Time PCR Methods in the Sample Containing the Stacked-Trait Product^a

	contents of GM maize	
	mean (%)	SD ^b
stack (MON810xGA21)	15.1	1.0
MON810 and GA21	12.2	0.3
MON810	5.9	0.4
GA21	6.1	1.3

^a All experiments were performed three times. In this experiments, the SSI1b 3' (SSI1b 3'-5' and SSI1b 3'-3' with SSI1b-Taq) were used for quantification of the taxon-specific sequences, and P35S-1 (P35S 1-5' and P35S 1-3' with P35S-Taq) for the detection of MON810 and GA21-3 (GA21 3-5' and GA21 3-3' with GA21-Taq) were used for the quantification of the transgenic specific sequences in the GM maize sample. ^b SD standard deviation.

studies.¹¹⁻¹⁴ The amplification products (7.5 μ L) 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 gel electrophoresis, the gel was stained in DW containing 0.5 μ g/mL ethidium bromide for 30 min and then washed in DW for 30 min. The gel was photographed using a Chemi-lumi Image Analyzer with the Diana system as the analytical software (Raytest, Straubenhardt, Germany).

RESULTS

Overestimation of GMO Content in Samples of Combined-Trait Products Using Real-Time PCR Method. A model test sample containing 180 kernels was prepared using 9 kernels of a variety of stack GM maize (YieldGard Corn Borer with Roundup Ready corn 1; MON810 x GA21 (YieldGard, Roundup Ready, and GA21 are registered trademarks of Monsanto Technology LLC. MON810 x GA21 was obtained from the Monsanto Co.) and 171 kernels of non-GM maize. The percentage of GMO in the model test sample was determined using the Japanese official standard real-time PCR methods^{20,21,27} after sufficiently grinding the model test sample kernels. As shown in Table 1, the value was determined to be ~15.1% though the value should be closer to 5% on a weight per weight basis. A second 180-kernel test sample was prepared using 9 kernels of MON810, 9 kernels of GA21, and 162 kernels of non-GM maize. The percent GMO of this sample was determined to be 12.2%. These results clearly suggested that the GMO level determined using the conventional real-time PCR methods could be overestimated in the sample containing the stack variety. This is because the GMO percentage is calculated on the haploid basis, which is defined by the formulas as described in our previous reports and in the Experimental Section.^{20,27}

Grinding of Individual Maize Kernel. To rapidly grind maize kernels into a fine powder, we made several modifications to the grinder (Multi-Beads Shocker).²⁸ The program for the Multi-Beads Shocker was upgraded so that the maximum speed of the instrument could reach 2500 rpm. The diameter of the chamber

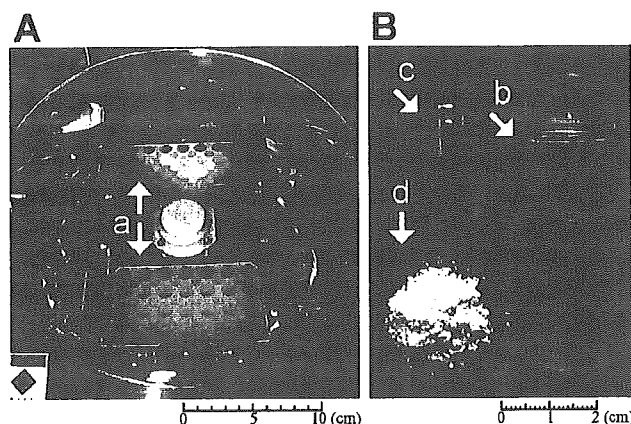


Figure 1. Newly designed Multi-Beads Shocker (A) and sample tube with metal corn (B). Multi-Beads Shocker was redesigned, and tubes and metal corn were modified to improve the efficiency as described in the text. (A) Inside the chamber of Multi-Beads Shocker; (B) sample tube with metal corn; (a) sample holder, (b) tube, (c) metal corn, and (d) ground maize after disruption.

was widened to 340 mm for easy handling of the sample holder (Figure 1A). In addition, we redesigned the sample holder, sample tube, and disruption medium (metal corn) for better performance. The safety plate for the sample tubes was modified so that it could be secured using a torque wrench for high-speed operation (Figure 1A). A new sample holder was made to accommodate a 24-well plate for the convenience of handling a large number of samples (Figure 1A-a). The sample holder was made of a synthetic resin (plastic) in place of metal so that the instrument could be operated at a higher speed (Figure 1A-a). The diameter of the sample tube was changed from 10.5 to 12 mm so that an individual kernel was easily placed in the tube (Figure 1B-b). Furthermore, the shape of the metal corn was rounded at the both ends as shown in Figure 1B-c in order to prevent them from adhering to the inner cap and also to increase the grinding efficiency. The structure of the inner cap was also changed to a round shape, and an O-ring was placed in the tube cap to prevent sample leakage (Figure 1B-b). When 48 kernels were ground in this remodeled equipment, all the kernels were uniformly ground into a fine powder in 2 min with a high efficiency regardless of their size and shape (Figure 1B-d).

DNA Extraction from Each Maize Kernel Using DNeasy 96 Plant Kit. To simultaneously extract the maize genomic DNA from the finely ground individual powders described above, we applied the 96-well extraction kits and developed suitable extraction conditions. First, we examined the silica membrane-type kit (DNeasy 96 Plant Kit, Qiagen) and magnet-type kit (Wizard Magnetic 96 DNA Plant System, Promega). The silica membrane-based method appeared to be significantly better than the magnetic-type method in terms of the content and quality of the extracted genomic DNA. We then modified the volume of the several extraction buffers for use and the procedure in the DNeasy 96 Plant Kit as described in the Experimental Section.

To investigate the yield and quality of the genomic DNA individually extracted from the maize kernels, we evaluated the concentration and purity of the genomic DNA from 12 maize kernels. As shown in Table 2, the yields from the individual maize kernels in all the products ranged from 104.5 to 125.0 ng/ μ L with

(28) Katou, Y.; Kanoh, Y.; Bando, M.; Noguchi, H.; Tanaka, H.; Ashikari, T.; Sugimoto, K.; Shirahige, K. *Nature* 2003, 424, 1078-1083.

Table 2. Yield and Quality of Genomic DNA in Four Kinds of Maize Using the Modified Extraction Method^a

	non-GM		MON810		GA21		stack (MON810×GA21)		total	
	mean	RSD (%)	mean	RSD (%)	mean	RSD (%)	mean	RSD (%)	mean	RSD (%)
DNA conc (ng/μL)	123	15.1	125	8.8	104.5	10.5	115.7	12.3	117	13.6
260/280 ratio	1.77	1.18	1.75	0.59	1.77	1.06	1.75	0.57	1.76	0.99
260/230 ratio	1.94	5.94	1.86	3.65	1.89	3.89	1.9	2.84	1.9	4.39

^a Each value represents the mean and relative standard deviation (RSD (%)) of 12 kernel determinants. The UV absorption ratios of 260 nm/280 nm and 260 nm/230 nm ratios represent A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} , respectively, of genomic DNA individually extracted from maize kernel samples.

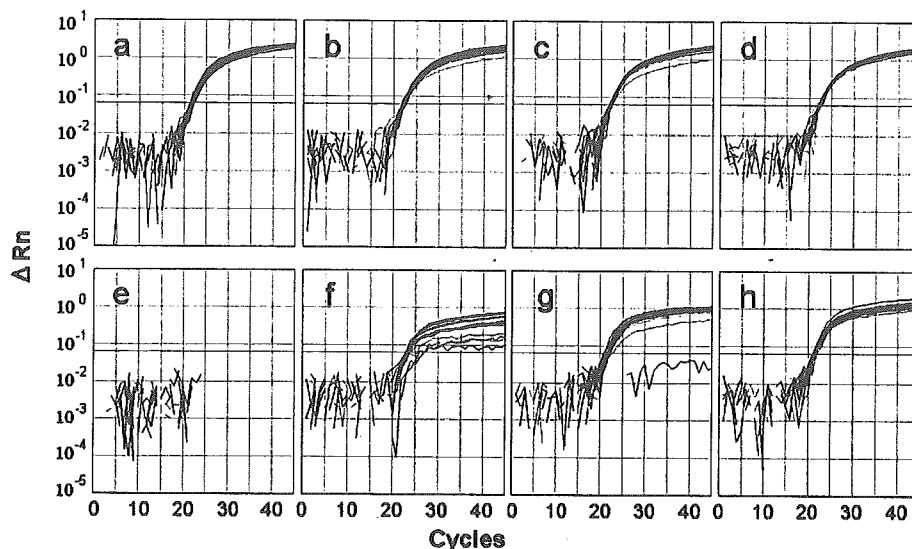


Figure 2. Amplification curves of the 12 genomic DNA solutions per one kind of maize (total of 48 test solutions) using the multiplex real-time PCR method. (a) SSIIB detection of non-GM maize, (b) SSIIB detection of MON810 maize, (c) SSIIB detection of GA21 maize, (d) SSIIB detection of stacked maize (MON810 × GA21), (e) p35S detection and GA21 specific detection of non-GM maize, (f) p35S detection of MON810 maize, (g) specific detection of GA21 maize, and (h) p35S and GA21 specific detection of stacked maize (MON810 × GA21).

an average of 117.0 ng/μL. All of the GM and non-GM maize varieties had A_{260}/A_{280} ratios between 1.6 and 1.9.

Multiplex Real-Time PCR Qualitative Detection of Genomic DNA from GM Maize Kernel. To identify the extracted genomic DNA from the GM maize kernels, the development of the multiplex real-time PCR method was evaluated. The cauliflower mosaic virus p35S was introduced into maize products MON810, Bt11, T25, and Event 176, but not introduced into GA21.^{10,11} Therefore, the two sets of primer and probe for both the p35S detection and GA21 specific detection were considered to be mixed in one reaction tube to detect the genomic DNA from the GM maize kernel. In addition, to check the validity of the extracted genomic DNA for PCR, the set of primer pair and probe for the detection of the SSIIB, which is a the maize taxon-specific gene, would be considered to be added to one tube and simultaneously detected. However, as described in a previous paper, P35S-Taq, GA21-Taq, and SSIIB-Taq were labeled with FAM dye.^{20,21} Therefore, we redesigned the SSIIB probe labeled with VIC dye (SSIIB-TaqV) and then used this probe.

With three pairs of primers (p35S-1, GA21-3, SSIIB-3) and three probes (p35S-Taq, GA21-Taq, SSIIB-TaqV) in one reaction, the interaction among the primers and probes appeared to cause a decrease in the PCR efficiency. The efficiency of SSIIB amplification was more significantly affected than the other two (data not

shown). Therefore, we increased the concentration of the SSIIB primers (SSIIB-3) and probe (SSIIB-TaqV) higher than those of the other two primer pairs and probes and also increased the time from 1 to 1 min 30 s as the annealing step.

As expected, the amplification curves of both p35S-Taq and GA21-Taq labeled with the FAM dye were successfully observed and the amplification curves of SSIIB-TaqV labeled with the VIC dye were also simultaneously detected. These results suggested that detection of target DNA sequences from the GM maize kernels and confirmation of the validity of the extracted genomic DNA for PCR can be simultaneously performed in one run. Furthermore, we examined whether the amplification curves of SSIIB and those of p35S and GA21 could be consistently observed in 12 genomic DNA solutions extracted from non-GM, MON 810, GA21, and a stack variety of MON810 × GA21 maize kernels. As shown in Figure 2, we confirmed that all the amplification curves of SSIIB and those of p35S and GA21 can be obtained in all the relevant events of the examined maize under the developed multiplex real-time PCR conditions irrespective of a stacked GM event trait or single GM event trait.

In addition, we examined the end-point analysis of the stack maize product and reference plasmids using the developed multiplex real-time PCR method. As shown in Figure 3, the genomic DNA from MON810 × GA21 can be clearly identified

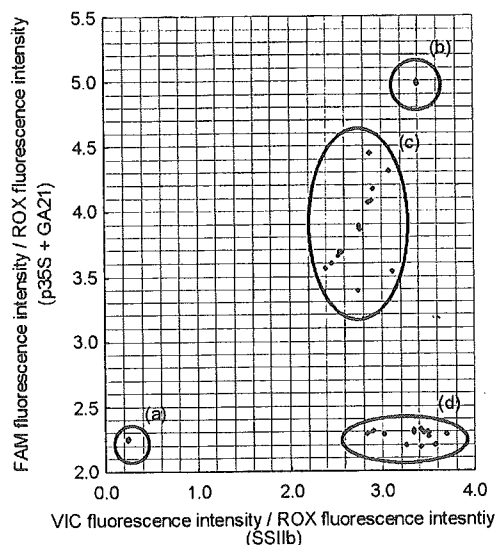


Figure 3. End-point analysis of the stacked GM maize sample, non-GM sample and reference plasmids using the multiplex real-time PCR. (a) nontemplate control (ColE1 plasmid) as a negative control, (b) amplification of 250 000 copies of reference plasmid as a positive control, (c) amplification of genomic DNA from stacked maize kernels (MON810 × GA21), (d) amplification of genomic DNA from non-GM maize kernels. The GM Maize Detection Plasmid Set–ColE1/TE (Nippon Gene Co.) was used as the positive control and the negative control. This plasmid set contained six concentrations (including the ColE1 plasmid as nontemplate control) of the reference plasmid pMul5, which is inserted into all the amplification products of p35S, GA21, and SSI1b, diluted with the TE buffer (pH 8.0) including 5 ng/μL ColE1 plasmid. The ColE1 plasmid contained none of the amplification products of p35S, GA21, and SSI1b. In a negative control, the ColE1 plasmid was also used as the nontemplate control for the analysis. In the reaction plate, the multiplex real-time PCR was performed in duplicate using six reaction vessels for the negative control and positive control (two concentrations of the plasmid set). The other 90 reaction vessels were individually examined for the genomic DNA samples extracted from single maize kernels.

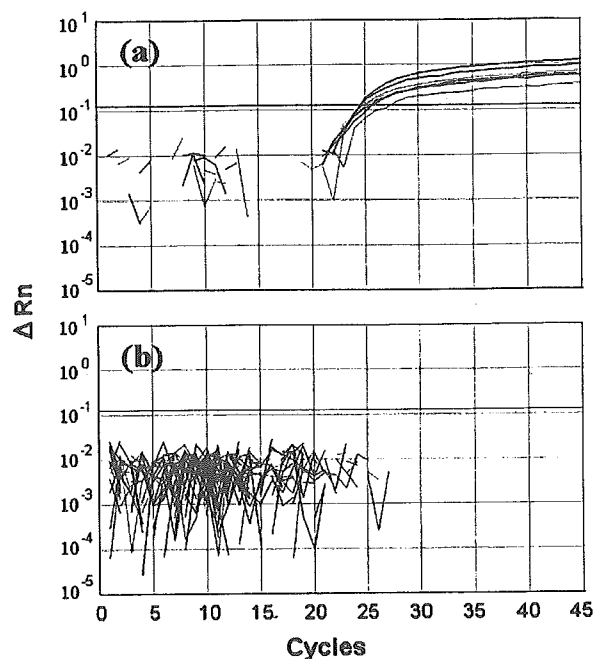


Figure 4. Typical amplification curves of the model test sample containing the MON810 maize seeds using the multiplex real-time PCR. (a) Typical amplification curves of the MON810 maize seeds in the model test sample, (b) Typical amplification curves of the non-GM maize grains in the model test sample.

from those of the non-GM maize samples and reference plasmids using the end-point analysis of the developed multiplex real-time PCR method as a complement confirmation.

Verification of Proposed Detection Method for a Stacked Maize Product. The detection method developed for stacked maize products was used to detect the three types of 5% model test samples containing 9 kernels of transgenic maize seeds (MON810 or GA21 or MON810 × GA21) and 171 kernels of non-GM maize. As expected, we detected the target DNA sequence derived from the respective GM maize (9 kernels) in the three types of 5% model test samples based on the amplification curves. We showed the typical amplification curves of the p35S system for MON810 seeds and non-GM maize samples in Figure 4, and the end-point analysis result of the model test sample containing the MON810 maize seeds as a complement confirmation in Figure 5. As shown in Figure 4, when the amplification curves were clearly observed after 15 cycles, we can denote the sample as GM positive (Figure 4a). In contrast, when the amplification curve was not observed after 15 cycles, we can denote the sample as GM negative (Figure 4b). Therefore, we set up the clearness of the amplification curves after 15 cycles of the real-time PCR as the threshold for the discrimination of GM or non-GM maize kernel.

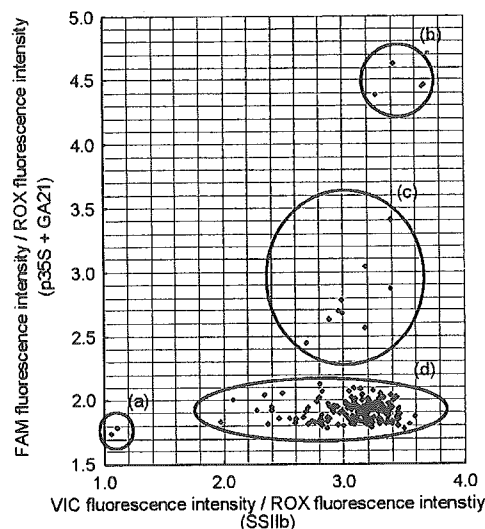


Figure 5. End-point analysis of the model test sample. (a) nontemplate control as a negative control, (b) amplification of 250 000 copies of standard plasmid as a positive control, (c) amplification of genomic DNA from MON810 maize seeds, and (d) amplification of genomic DNA from non-GM maize kernels. All the conditions were as in Figure 3.

Confirmation of Stacked Maize Kernel Using Multiplex Qualitative PCR Detection. Finally, we identified whether the genomic DNA from each kernel contains the stacked traits or a single trait using the multiplex qualitative PCR detection method published in a previous report.¹¹ As shown in Figure 6, each GM trait was identified as expected. For MON810 × GA21, the two amplification bands for MON810 and GA21 were simultaneously detected by the agarose gel electrophoresis analysis in one extraction.

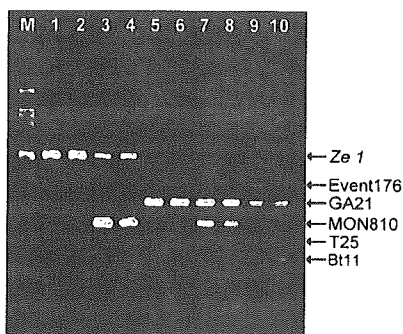


Figure 6. Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified from genomic DNA extracted from individual maize kernels. Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. *Ze1* represents the amplification product from maize taxon-specific gene, *zein* gene. Event 176, GA21, MON810, T25, and Bt11 represent the PCR amplification product from each GM line, respectively. Lanes 1 and 2: amplification of genomic DNA from non-GM maize kernel. Lanes 3 and 4: amplification of genomic DNA from MON810 kernel. Lanes 5 and 6: amplification of genomic DNA from GA21 kernel. Lanes 7 and 8: amplification of genomic DNA from MON810 × GA21 kernel. Lanes 9 and 10: amplification of the mixed genomic DNA of five lines (event 176, GA21, MON810, T25, and Bt11). M: 100-bp ladder size standard.

DISCUSSION

After the introduction of new labeling system for GM foods in Japan and other countries, many food industries in the countries have been obliged to switch to non-GM materials largely to meet demand from retailers and GMO are excluded from the market except for special products, such as edible oil and animal feed. To monitor the commingling level of GMO in non-GM materials controlled by an identity-preserved handling system, the screening system using the combination of quantification systems for the p35S region and GA21 specific region is the most practical method at the first step for the maize grains in the United States and Canada. A possibility, however, which the relative GMO amount measured from the copy numbers of SSIIb and GM target sequences is not consistent with the actual GMO mixing ratio (%) in grains, would arise by development of stacked maize products.

Several GM maize events have been authorized for import into Japan. The GM traits include resistance to feeding damage by the European corn borer (event 176 and Bt11 from Syngenta (formerly Novartis Seeds), MON810 from Monsanto Co.), resistance to corn rootworm (e.g., MON863 from Monsanto Co.), tolerance to the herbicide phosphinothricin (PPT) (e.g., T25 from Bayer Crop Science), resistance to the European corn borer, tolerance to PPT (TC1507 from Pioneer Hi-Bred International Inc., Mycogen Seeds/Dow Agro Sciences LLC), and tolerance to the herbicide glyphosate (e.g., GA21 and NK603, Monsanto Co.). Furthermore, six stacked maize products (MON863 × NK603, MON810 × GA21, MON810 × T25, TC1507 × NK603, MON863 × MON810, MON863 × MON810 × NK603) have already been authorized in Japan. All the authorized GM maize events have p35S except for the GA21. Then, if the stacked GM maize variety is included in the grains, the measured percent GMO might be overestimated by the doubly quantified target sequences. The percent GM could be expressed on a kernel basis, which is based on discrimination of GM or non-GM for single kernels or on a haploid basis as described in the Results.

We have described the first rapid detection system for the amount of GMO in a sample containing a GM stacked maize product. We first improved the grinding equipment and the tube for grinding some maize kernels in terms of the tube size and the inconsistent fineness of the ground maize powder. We improved the sample tube shape as well as the disruption medium (metal corncobs) and sample holder in order to grind, irrespective of the maize kernel size. Furthermore, we improved the performance of the blender by enhancing the durability of the equipment and by replacing the motor with a high-speed one. Using this improved equipment and tube, we confirmed that 48 individual maize kernels could be ground in a few minutes. In addition, we examined the genomic DNA extraction step for a single ground maize powder. We optimized a rapid extraction method using the modified silica membrane-based 96-plate extraction kits. Although we examined the magnetic-based 96-plate extraction kit, the silica membrane-based method performed better than the magnetic-based method in terms of the content and quality of the extracted genomic DNA (data not shown).

We also developed a multiplex real-time PCR method for the rapid qualitative detection of the genomic DNA extracted from a maize kernel. This developed method can individually discriminate a stacked or single GM trait of GM maize kernels authorized in Japan and simultaneously evaluate the quality of the extracted genomic DNA for PCR in one run. We can discriminate GM or non-GM kernels by the amplification curves from the multiplex real-time PCR as shown in Figure 2 and Figure 4 irrespective of the stacked GM event trait or single GM event trait. The endpoint analyses as in Figures 3 and 5 could give supplemental information for the judgment. Furthermore, we confirmed that it can be determined as to whether the genomic DNA from each kernel contains the stacked traits or a single trait using the multiplex qualitative PCR detection method published in a previous report.¹¹ The multiplex real-time PCR detection method may be applicable for the detection of all authorized GM maize kernels because this method can qualitatively detect both p35S and GA21. The detection system we have developed is also applicable to other combined-trait maize products. For example, Monsanto's triple stack maize product (YieldGard Plus with Roundup Ready, MON863 × MON810 × NK603), which incorporates *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxins for corn borer and rootworm and tolerance to glyphosate, should be detectable. In addition, this detection system could be applicable for the detection of other GM crops such as wheat and soybeans.

We consider that it can clearly discriminate GM or non-GM kernel using the judgment system, though a false positive might occur. Therefore, for only the positive samples, it would be necessary to confirm the results using a multiplex qualitative PCR detection as in Figure 6. In addition, since the multiplex real-time PCR would be very sensitive, carryover contamination from one kernel to another during the grinding process and the DNA extraction step might occur. Therefore, we considered that the grinding process and the DNA extraction step should be carefully performed. Furthermore, we would also improve the experimental conditions of multiplex real-time PCR to clearly discriminate GM and non-GM kernels in future.

Many quantitative methods for GMO analyses have been developed.⁶ Undoubtedly, the most widely used methods are

based on PCR and, more particularly, the quantitative real-time PCR.⁷ GMO quantification in mixed food samples using these quantitative real-time PCR methods is based on the calculation using the ratio of GMO (copies of the recombinant DNA sequence) versus the plant species-specific DNA content (copies of the taxon-specific gene), calculated on a haploid basis. The calculated value is converted into a percent GMO content (weight to weight). This conversion is based on the assumption that there is a direct 1:1 relationship between the endogenous gene and the GM gene. However, there are many biological factors that can affect this 1:1 relationship, such as GM gene copy number, DNA degradation, DNA endoreduplication, outcrossing versus inbreeding, and variability in the genome.²⁹ Therefore, it is necessary to attempt to convert the GMO content using the conversion factor such as the value defined by formula-1 in the Japanese current official method.^{20,21} In addition, as we have already described, the GMO content of maize samples containing a stacked-trait maize product could be overestimated using the conventional real-time PCR if the definition of the threshold values for the labeling regulation are on a weight per weight basis.

In the consideration of the feasibility of testing individual maize kernels, for example, when GMO mixing percent is clearly less than the threshold levels that each country have set up, it would be attained by the measurement of the conventional real-time PCR method using p35S-1 and GA21-3 systems. Therefore, we assume that it should be a reasonable way to determine the GMO content using the combination of the grinding maize sample and the conventional real-time PCR method as a screening method. The individual maize grain testing using the method system developed in this report would be applied only when GMO mixing percent larger than around or over the threshold levels is measured by the conventional real-time PCR method. It will be necessary to clarify acceptable uncertainty in consideration of the level of a risk and method applicability by statistical approach in order to consider how many grains to inspect. It will be a practical way to determine percent GMO using the conventional real-time PCR

method as a screening monitor at the first step and the individual maize kernel testing for ~200 grains using the detection system developed in the present study. In Japan, we have already been monitoring the GMO labeling at the quarantine inspection centers using the real-time PCR method. If a sample's GMO content was over 5%, the material's labeling would be corrected by Ministry guidance. Therefore, the definition of threshold values is very important and remains controversial in Japan. However, we believe that the application of single-kernel testing should be considered from the viewpoint of traceability.

CONCLUSION

We have successfully developed a simple detection system that delivers informative results by the single-kernel analysis of grain samples that could potentially contain combined-trait GM maize kernels. The present detection method system is a novel, rapid, precise, and reliable technique for the quantitative analysis of GM samples containing stacked-trait products. Approximately 180 maize kernels can be individually detected within a couple of days. This proposed method system could accurately monitor the labeling system in a reliable manner and can be useful for governmental regulation.

ACKNOWLEDGMENT

We are very grateful to the Monsanto Co., USA, for providing the reference materials. We thank Dr. Markus Lipp and Mr. Hiroo Wakimori for providing useful suggestions and editorial advice. This study was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review July 12, 2005. Accepted September 8, 2005.

AC051236U

(29) Lipp, M.; Shillito, R.; Giroux, R.; Spiegelhalter, F.; Charlton, S.; Pinerio, D.; Song, P. *J. AOAC Int.* 2005, 88, 136–155.

報 文

遺伝子組換えダイズ（ラウンドアップ・レディー・大豆 40-3-2 系統） の定量検査法の外部精度管理試験

(平成 17 年 6 月 24 日受理)

笠間 菊子*¹ 渡邊 敬浩*² 鈴木 達也*¹ 菊地 博之*² 時下 祥子*² 坂田 こそえ*²
松木 容彦*^{1, a} 日野 明寛*³ 穂山 浩*^{2, †} 米谷 民雄*¹

Laboratory-performance Study of the Quantitative Detection Method for Genetically Modified Soybeans (Roundup Ready Soybeans 40-3-2)

Kikuko KASAMA*¹, Takahiro WATANABE*², Hiroyuki KIKUCHI*², Tatsuya SUZUKI*¹,
Shoko TOKISHITA*², Kozue SAKATA*², Akihiko MATSUKI*^{1, a}, Akihiro HINO*³,
Hiroshi AKIYAMA*^{2, †} and Tamio MAITANI*²

(*¹Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center: 729-5, Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan; *²National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; *³National Food Research Institute: 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan; ^aPresent Address: Institute of Food Hygiene, Japan Food Hygiene Association: 2-5-47, Tadao, Machida-shi, Tokyo 194-0035, Japan; † Corresponding author)

To investigate important factors affecting the analytical results, a laboratory-performance study was attempted for the Japanese official methods to detect genetically modified (GM) soybeans (40-3-2). Test samples containing 0, 1 and 5% GM soya powder in non-GM soya powder was prepared. A set of 3 test samples was sent to the participating laboratories along with the protocol. The data were collected from all laboratories and statistically analyzed. In the real-time PCR detection method, the average values of the GM 1% and 5% samples were both much lower than the spiked value because the laboratories using a silica-membrane DNA extraction method underestimated the GM value. On the other hand, the laboratories using other extraction methods, such as the CTAB method obtained values close to the spiked value. These results suggest that use of the silica-membrane DNA extraction method may result in underestimation of the GM content in the real-time PCR method. In the ELISA method, the average value of 5% spiked samples appears to be slightly higher than the fortified value. But, overall, it was considered that reported values were close to the spiked level.

(Received June 24, 2005)

Key words: 遺伝子組換えダイズ genetically modified soybean; 検査方法 detection method; ポリ
メラゼ連鎖反応 PCR; 外部精度管理試験 laboratory-performance study

緒 言

平成 13 年 3 月の厚生労働省医薬局食品保健部長通知「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正」(平成 13 年 3 月 15 日, 食発第 79

号)において, 遺伝子組換え (GM) 食品の表示が法的に義務化された。これは原材料にダイズ, トウモロコシ, なたね, ばれいしょ, 綿実, てんさい (その後追加) を含み, その含量が原材料の上位 3 品目に入りかつ 5% 以上の食品に適用される。対象となる食品が安全性審査済みの GM 作物を含む場合には「遺伝子組換え」の, 安全性審査済みの GM 作物を含む可能性があり, 分別生産流通管理が行われていない原材料を含む場合には「遺伝子組換え不分別」の表示が義務づけられた。一方, 対象となる食品でも, 分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え (non-GM) の原材料を使用した場合には表示義務はなく, 任意表示とされている。しかし, 分別生産流通管理が適切

† 連絡先

*¹ 財団法人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

*² 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

*³ 独立行政法人食品総合研究所: 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

^a 現住所: (社)日本食品衛生協会食品衛生研究所 〒194-0035 東京都町田市忠生 2-5-47

に行われた場合でも GM 作物は一定の割合で混入する可能性があり、この割合は意図せざる混入として 5% が目安とされている。したがって non-GM 作物について分別生産流通管理が適切に行われているか否かを検証する指標として GM 作物の混入率を定量することが必要となった。これに伴い厚生労働省は、医薬局食品保健部長通知として「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(平成 13 年 3 月 27 日, 食安発第 110 号)²⁾ を通知し、GM 食品の検査法を定めた。

食品衛生法施行規則³⁾には食品分析に従事する各検査機関に対して検査の精度を適正に保つことが定められており、各機関で共通の未知試料を同時期に分析し解析を行う外部精度管理は、それぞれの参加機関における検査水準の把握および検査技術の維持、向上に有用であると考え、本研究では、通知法改正版(平成 15 年 6 月 18 日, 食安発第 0618001 号, 以下「食安発第 0618001 号」とする)⁴⁾ に従い遺伝子組換えダイズ(ラウンドアップ・レディー・大豆 40-3-2 系統)の定量に関する外部精度管理(ELISA 法および定量 PCR 法)を試験的に実施し、精度管理試料の均一性試験、安定性試験、および協力参加機関より収集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程度ならびにその要因について詳細な検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 精度管理試料の調製

精度管理試料の調製は国立医薬品食品衛生研究所(以下国立衛研とする)で行った。遺伝子組換えダイズ(ラウンドアップ・レディー・大豆 40-3-2 系統, 以下 GM ダイズとする)は厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課を通じモンサント株式会社より、また非遺伝子組換えダイズ(1998 年度アメリカオハイオ産ダイズ, 以下 non-GM ダイズとする)は(独)食品総合研究所を通じ入手した。GM ダイズおよび non-GM ダイズは互いに汚染しないよう注意しながら、それぞれ遠心式粉砕機 ZM100 ((株)Retch, 500 μ m スクリーンを使用)で粉砕し、次いで凍結乾燥機 FD-81 (東京理科機械(株))を用いて凍結乾燥した。このうち non-GM ダイズ粉を 0% 精度管理試料とした。また、GM ダイズ粉および non-GM ダイズ粉をそれぞれ 1 対 99, 5 対 95 の割合でプラスチック製の袋にひょう取した。これを袋中で十分に混合後、ふるいにかけて、再び袋中で混合する操作を計 3 回繰り返した。さらに混合試料を遠心式粉砕機 ZM100 で再度粉砕し、それぞれ 1% および 5% 精度管理試料とした。

2. 参加機関における測定

精度管理試料の分注および送付は食品薬品安全センターにて行われた。0%, 1% および 5% 試料をそれぞれ定量 PCR 法用には約 6.5 g, ELISA 法には約 2.0 g ずつ小分けして分注し、送付まで -20°C で保存した。外部精度管理参加機関には各濃度それぞれ 1 本の試料に加え、調査項

目および試験結果記入用の報告書書式、「食安発第 0618001 号」に準拠したマニュアルならびに DNA 抽出法を後述 3 (2) のように改変したマニュアルを送付した。なお、試料はドライアイスとともに送付し、到着後は -20°C で保存するよう指示した。

3. 均一性試験および安定性試験

(1) 測定試料

均一性試験は分注後の外部精度管理試料から無作為に選んだ各濃度 6 試料について、定量 PCR 法および ELISA 法で実施した。なお定量 PCR 法は(独)食品総合研究所で、ELISA 法は国立衛研で実施した。

安定性試験は外部精度管理期間における安定性を検討するため試料送付日の直前および約 1 か月後にあたるデータ回収期限日の直後に、各濃度 $n=4$ でサンプリングを行い、定量 PCR 法、ELISA 法の両法を用いて国立衛研にて各濃度の試料に関して実施した。なお、安定性試験の試料は -20°C で保存した。

(2) DNA 抽出

DNA 抽出は DNeasy Plant Mini キット ((株)キアゲン)を使用し、シリカゲル膜タイプキット法により行った。しかし、「食安発第 0618001 号」2.2.1.2 シリカゲル膜タイプキット法の項に従って、QIAshredder spin column からの溶出液に AP3 緩衝液・エタノール混液を加えると沈殿が生じ、以後の抽出操作に支障をきたすことが判明した。このため、通知法を以下のように変更して実施した。すなわち、上記の沈殿が発生する原因と思われるきょう雑物質の影響を低減するために、AP1 緩衝液の添加量を 10 mL から 20 mL にし、それに伴い、AP2 緩衝液の添加量を 3.25 mL から 6.5 mL に変更した。また、DNA 試料原液の濃度を高くするため、TE 緩衝液の添加量を 100 μ L から 50 μ L に変更した。その他の操作は通知法に従って実施した。

(3) 定量 PCR

定量 PCR は、定量 PCR 装置に ABI PRISM 7700, 定量 PCR 試薬に TaqMan Universal PCR Master Mix (以上アプライドバイオシステムズ(株)), ダイズ内在性 DNA Lel オリゴヌクレオチドセット, GM ダイズ (RRS) 系統別 DNA RRS オリゴヌクレオチドセット, GM ダイズ (RRS) プラスミドセット-CoIE1/TE- (以上(株)ニッポンジーン)を使用し、「食安発第 0618001 号」3.1.2 定量 PCR 法の項に従って実施した。

(4) ELISA 法

ELISA 法は〈GMO〉ダイズキットおよび〈GMO〉ダイズキット定量用参照標準セット全粒粉用 (以上アヅマックス(株)), 吸光度測定にマイクロプレートリーダー Emax (日本モレキュラーデバイス(株))を使用し、「食安発第 0618001 号」3.1.1 ELISA 法の項に従って実施した。

4. 参加機関における測定

参加機関での外部精度管理試験の実施期間は、定量

PCR法, ELISA法とも2003年6月23日から7月25日とした。

(1) 定量PCR法

各参加機関は、「食安発第0618001号」3.1.2 定量PCR法の項に従い, 0%, 1%, 5%試料のそれぞれからDNAをCTAB法, シリカゲル膜タイプキット法, シリカベースレジソタイプキット法のいずれかを用いて3試行で抽出し, ABI PRISM 5700, ABI PRISM 7700, ABI PRISM 7900, ABI PRISM 7000 (以上アプライドバイオシステムズ(株)), LightCycler System (ロシュ・ダイアグノスティックス(株))のいずれかを使用して遺伝子組換えダイズの混入率を測定した。なお, シリカゲル膜タイプキット法によるDNA抽出については, 3. 均一性試験および安定性試験のDNA抽出の項での変更を反映したマニュアルを別途送付し, これに従って実施するよう依頼した。

(2) ELISA法

各参加機関は、「食安発第0618001号」3.1.1 ELISA法の項に従い, 0%, 1%, 5%試料を〈GMO〉ダイズキットのSoya Assay緩衝液でそれぞれ3試行で抽出した液およびこれを10倍希釈した液を試料溶液とし, 遺伝子組換えダイズの混入率を測定した。

5. 外部精度管理結果の集計

測定値の統計解析は食品薬品安全センターが担当した。各参加機関から返送された分析結果を試料別に定量PCR法とELISA法のそれぞれについてまとめ, 統計解析ソフトウェアJUSE-QCAS ((株)日本科学技術研修所)を用いて統計処理を行い, 各種統計量および z -スコアの算出を行った。なお, z -スコアの算出においては, 指定値(assigned value)の代用として総平均(各機関の平均値(\bar{X})の平均)を使用し, また \bar{X} の管理限界は総平均 ± 2 S.D.とした(z -スコアの絶対値2に相当)。統計解析の詳細については大隅の報告⁵⁾に従った。

結 果

1. 均一性および安定性試験結果

定量PCR法による均一性試験は各濃度6試料についてそれぞれ2回の計12回測定を行った。その結果, Table 1に示したように0%試料ではいずれも遺伝子組換えダイズは検出されず, 均一性が確認された。また, 1%および5%試料の測定値をロジット変換後それぞれ一元配置による分散分析を行った結果, いずれも F 比は有意水準($p=$

0.05)を下回り, 均一性が確認された。ELISA法による均一性試験は各濃度6試料についてそれぞれ1回のみ測定を行った。その結果Table 1に示したように0%試料はいずれも検出限界以下であった。また, 1%および5%試料の相対標準偏差はそれぞれ5.38%, 7.55%であった。

安定性試験のサンプリングは, 各々の試料につき試料送付日直前およびデータ回収期限日直後の2回行い, 試験期間中の試料の保存は約 -20°C で行った。結果はTable 2に示したが, 0%試料では開始前および試験終了後のいずれも定量PCR法では遺伝子組換えダイズは検出されず, ELISA法では検出限界以下であった。開始前の測定値の平均を100として求めた終了後の相対値は定量PCR法では135.8(1%試料), 119.1(5%試料), ELISA法では112.9(1%試料), 108.9(5%試料)と, 定量PCR法およびELISA法とも試験終了時の測定値が開始前の測定値を上回っていた。

なお, 均一性試験および安定性試験開始前および終了後における定量PCR法による測定値は順に0.57%, 0.53%, 0.72%(以上1%試料), 3.87%, 3.20%, 3.81%(以上5%試料)といずれも重量混合比を下回った。一方, ELISA法による測定値はいずれも重量混合比とほぼ等しいかまたは上回る結果であった。

2. 外部精度管理結果

(1) 定量PCR法

Table 3に参加機関のDNA収量, および260 nm/280 nm, 260 nm/230 nmの吸光度比をDNA抽出法ごとにまとめて示した。DNA抽出に, シリカゲル膜タイプキット法を用いた機関数は18, CTAB法は3, シリカベースレジソタイプキット法は1であった。DNA収量に関してはNo. 31の機関, 吸光度比に関してはNo. 12の機関を除

Table 1. Results of Homogeneity Study Conducted by Quantitative PCR and ELISA

Sample	Quantitative PCR ($n=12$)		ELISA ($n=6$)	
	Concentration (%)	$F^{1)}$	Concentration (%)	RSD (%)
0%	0		<0.14 ²⁾	
1%	0.57 \pm 0.15	1.0962	0.93 \pm 0.05	5.38
5%	3.87 \pm 0.55	2.4795	5.83 \pm 0.44	7.55

¹⁾ Critical value of F ($p=0.05$): 4.3874

²⁾ Minimum detection limit: 0.14

Table 2. Results of Stability Study Conducted by Quantitative PCR and ELISA

Sample	Number of trials	Quantitative PCR			ELISA		
		Before (%)	After (%)	Relative value	Before (%)	After (%)	Relative value
0%	4	0	0		<0.14 ¹⁾	<0.14 ¹⁾	
1%	4	0.53 \pm 0.05	0.72 \pm 0.12	135.8	1.01 \pm 0.10	1.14 \pm 0.07	112.9
5%	4	3.20 \pm 0.27	3.81 \pm 0.26	119.1	5.70 \pm 0.10	6.21 \pm 0.23	108.9

¹⁾ Minimum detection limit: 0.14

Table 3. Yield and Quality of DNA Extracted from Samples

Laboratory	Method	DNA (μg)	Ratio	
			260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
1	A	2.48 \pm 0.84	1.73 \pm 0.06	1.92 \pm 0.37
3	A	6.76 \pm 1.74	1.91 \pm 0.05	no data
5	A	4.66 \pm 1.03	1.74 \pm 0.19	2.82 \pm 0.59
6	A	4.85 \pm 1.03	1.90 \pm 0.08	0.24 \pm 0.05
8	A	7.53 \pm 1.95	1.37 \pm 0.11	1.42 \pm 0.15
9	A	5.20 \pm 2.43	1.48 \pm 0.13	0.73 \pm 0.18
10	A	3.82 \pm 1.12	1.70 \pm 0.15	2.37 \pm 0.64
11	A	9.45 \pm 3.37	1.85 \pm 0.09	8.86 \pm 18.02
12	A	13.04 \pm 3.69	3.07 \pm 0.49	0.95 \pm 0.09
16	A	2.37 \pm 0.90	1.78 \pm 0.10	1.81 \pm 0.25
17	A	4.31 \pm 0.75	1.13 \pm 0.04	1.25 \pm 0.06
18	A	3.60 \pm 1.16	1.88 \pm 0.06	2.01 \pm 0.11
21	A	3.37 \pm 1.25	1.85 \pm 0.08	2.60 \pm 0.43
24	A	4.64 \pm 0.68	1.90 \pm 0.03	2.27 \pm 0.14
26	A	5.42 \pm 3.05	1.81 \pm 0.03	1.22 \pm 0.24
27	A	2.84 \pm 1.06	1.79 \pm 0.05	2.41 \pm 0.32
28	A	5.58 \pm 0.69	1.83 \pm 0.03	2.30 \pm 0.30
30	A	2.92 \pm 0.62	1.73 \pm 0.04	no data
19	B	5.06 \pm 1.20	2.17 \pm 0.22	0.86 \pm 0.11
22	B	7.87 \pm 2.33	1.75 \pm 0.07	0.73 \pm 0.16
31	B	63.17 \pm 4.95	1.84 \pm 0.01	no data
20	C	30.75 \pm 8.10	1.90 \pm 0.05	0.82 \pm 0.13

A: Silica-gel membrane type kit

B: CTAB method

C: Silica-based resin type kit

き、各機関の測定値の間には特に大きな差はないと思われた。No. 31の機関では、DNA抽出の際に乳鉢を用いて抽出効率を向上させる工夫をしたため、他の機関よりDNA収量が高かったと推察された。またNo. 12の機関では、シリカゲル膜タイプキット法の最後の段階でイソプロピルアルコール沈殿を行うが、その操作を行っていないことが後に判明した。そのため260 nm/280 nmの吸光度比が他の機関に比べ高かったと推察された。

Table 4に定量PCR法の外部精度管理結果を示した。なお、0%試料の各機関の測定値の平均は、1機関を除いてすべて0%であったため、統計解析は行わなかった。

全参加機関の報告値から求めた総平均 \pm S.D.は1%試料で0.696 \pm 0.175、5%試料で3.759 \pm 0.671であった。Xbarが上部管理限界を超えた機関は1%試料、5%試料ともそれぞれ2機関、Rが管理限界を超えた機関は1%試料で2機関、5%試料で1機関あった。しかし、5%試料でXbarが上部管理限界を超えた2機関のXbarはそれぞれ5.215、5.640とむしろ混合重量比およびELISA法による測定値に近い値であった。これらの機関はDNA抽出にCTAB法およびシリカベースレジントタイプキット法を用いており、考察に記したようにこれらの抽出法を使用した場合、シリカゲル膜タイプキット法を用いた測定値よりも高値を示すものと考えられた。このためDNA抽出にシリカゲル膜タイプキット法を用いた機関とそれ以外の抽出法を用いた機関に分けて再度統計解析を行うこととした。

その結果、シリカゲル膜タイプキット法を用いた参加機関のみから得られた総平均 \pm S.D.は1%試料で0.659 \pm 0.157、5%試料で3.533 \pm 0.386であった。また、Xbarの上部管理限界を超えた機関が1%試料で1機関、Rが管理限界を超えた機関が1%試料で2機関、5%試料で1機関あった。一方、シリカゲル膜タイプキット法以外のDNA抽出法を用いた4機関の総平均 \pm S.D.は1%試料で0.865 \pm 0.166、5%試料で4.778 \pm 0.791であったが、例数が少ないため統計解析は行わなかった。

(2) ELISA法

Table 5にELISA法を実施した17機関の外部精度管理結果を示した。なお、0%試料の測定値は、全機関でキットの測定限界以下であったため統計解析は行わなかった。ELISA法による1%試料および5%試料の総平均 \pm S.D.はそれぞれ1.058 \pm 0.136、5.658 \pm 1.033であった。また、1%試料でXbarの上部管理限界を超えた機関が1機関、5%試料でRが管理限界を超えた機関が1機関あった。

考 察

1. 均一性試験および安定性試験

作製した外部精度管理試料は定量PCR法で実施した均一性試験では、統計学的に均一性が確認された。ELISA法による均一性試験は一元配置による解析ができないため、RSDを計算し〈GMO〉ダイズキットのプレート内再

Table 4. Results of Laboratory-performance Study for Quantitative PCR

Laboratory	DNA extraction method ²⁾	DNA 0%	Test sample (GMO content, %)							
			1%				5%			
			Xbar	R	z-Score ¹⁾	z-Score ²⁾	Xbar	R	z-Score ¹⁾	z-Score ²⁾
1	A	0	0.870	0.269	0.994	1.345	3.753	0.661	-0.009	0.570
3	A	0	0.774	0.252	0.444	0.732	4.140	0.639	0.567	1.572
5	A	0	0.794	0.150	0.558	0.860	4.080	1.539	0.478	1.418
6	A	0	0.606	0.004	-0.514	-0.334	3.718	1.420	-0.061	0.480
8	A	0	0.494	0.340	-1.153	-1.046	3.713	0.915	-0.069	0.466
9	A	0	1.087	0.770	2.229	2.721	3.983	0.224	0.334	1.167
10	A	0	0.599	0.105	-0.557	-0.383	3.163	0.338	-0.888	-0.959
11	A	0	0.484	0.120	-1.214	-1.114	3.136	0.562	-0.928	-1.028
12	A	0	0.562	0.125	-0.769	-0.618	3.093	0.847	-0.992	-1.139
16	A	0	0.724	0.607	0.156	0.412	2.907	0.563	-1.269	-1.622
17	A	0	0.760	0.082	0.362	0.641	3.723	0.387	-0.054	0.491
18	A	0	0.484	0.102	-1.214	-1.114	3.617	1.180	-0.212	0.217
19	B	0	0.708	0.045	0.069		3.918	0.119	0.236	
20	C	0	0.964	0.117	1.531		5.640	0.390	2.801	
21	A	0	0.575	0.073	-0.694	-0.535	3.037	1.113	-1.076	-1.286
22	B	0	0.736	0.271	0.229		4.334	0.635	0.857	
24	A	0	0.624	0.135	-0.415	-0.224	3.883	0.379	0.184	0.906
26	A	trace	0.559	0.436	-0.784	-0.635	3.057	4.092	-1.045	-1.233
27	A	0	0.735	0.239	0.221	0.484	3.652	0.534	-0.159	0.309
28	A	0	0.583	0.139	-0.649	-0.485	3.411	2.194	-0.518	-0.315
30	A	0	0.548	0.131	-0.849	-0.707	3.528	1.056	-0.344	-0.012
31	B	0	1.050	0.072	2.020		5.215	0.624	2.168	
Statistics ¹⁾		n	22	22	22		22	22		
		CL		0.696	0.208		3.759	0.928		
		S.D.		0.175			0.671			
		C.V.		0.252			0.179			
		UCL		1.046	0.537		0.537	2.389		
		LCL		0.346			2.417			
Statistics ²⁾		n		18	18		18	18		
		CL		0.659	0.227		3.533	1.036		
		S.D.		0.157			0.386			
		C.V.		0.239			0.109			
		UCL		0.973	0.584		4.305	2.667		
		LCL		0.345			2.761			

n: Number of laboratories, CL: Central limit (Mean), UCL: Upper control limit, LCL: Lower control limit

¹⁾ The statistics are based on all the data.

²⁾ The statistics are based on the data obtained using silica-gel membrane type kits for DNA extraction.

³⁾ DNA extraction method, A; Silica-gel membrane type kit, B; CTAB method, C; Silica-based resin type kit

現性と比較することとした。均一性試験のRSDは1%試料が5.38%、5%試料(10倍希釈で測定のため、実測濃度は0.5%付近)が7.55%で、いずれも<GMO>ダイズキット取扱説明書^{*1}の1.25%濃度におけるプレート内再現性のRSD 8.9%を下回っており、均一性が確認されたものと考えた。

定量PCR法およびELISA法による安定性試験の結果、開始前の測定値の平均を100として求めた終了後の相対値は、定量PCR法では135.8(1%試料)、119.1(5%試料)、ELISA法では112.9(1%試料)、108.9(5%試料)と、定量PCR法およびELISA法とも試験終了時の測定値が開始前の測定値を上回っていた。安定性試験の測定値

*1 Strategic Diagnostics Inc.: Food Ingredient Testing Soya Kit User's Guide, Rev. 111799, Ver. 2.0

は試料の安定性だけでなく、測定法自体のプレート間再現性、日間再現性などの誤差も含んでいると考えられる。現在のところこれらに関する情報がないため、安定性試験の結果を評価することはできなかった。安定性試験については今後これらの情報を収集した上で、サンプリングの方法、データの評価法について検討する必要があるものと考えられた。

2. 定量PCR法

各参加機関への遺伝子組換えダイズ外部精度管理試料の配布に先立って均一性試験を実施した際、「食安発第0618001号」2.2.1.2 シリカゲル膜タイプキット法の項に従って通知法どおりに操作すると、操作の途中で沈殿を生じ、以後の抽出操作に支障をきたすことが判明した。このためDNA抽出法を一部変更して均一性試験および安定性

Table 5. Results of Laboratory-performance Study for ELISA

Laboratory	0%	1%			5%		
		Xbar	R	z-Score	Xbar	R	z-Score
1	ND	1.047	0.219	-0.080	5.607	0.980	-0.050
2	ND	1.123	0.044	0.480	5.580	0.330	-0.076
4	ND	1.293	0.280	1.736	6.600	0.400	0.912
6	ND	0.899	0.159	-1.164	5.343	1.900	-0.305
7	ND	1.066	0.128	0.065	5.927	0.710	0.260
13	ND	0.883	0.168	-1.284	5.563	0.580	-0.092
14	ND	1.349	0.153	2.148	7.617	0.220	1.896
15	ND	0.999	0.138	-0.430	7.040	0.520	1.338
17	ND	0.987	0.094	-0.519	5.670	0.240	0.011
23	ND	1.163	0.196	0.777	3.823	4.790	-1.777
25	ND	0.829	0.229	-1.681	3.820	0.640	-1.780
29	ND	1.104	0.070	0.345	5.423	0.570	-0.228
30	ND	0.988	0.084	-0.511	4.090	1.070	-1.519
32	ND	1.110	0.022	0.384	6.400	0.730	0.718
33	ND	0.968	0.074	-0.656	5.893	2.360	0.227
34	ND	1.040	0.348	-0.129	6.260	0.690	0.583
35	ND	1.128	0.128	0.519	5.537	0.870	-0.118
n	17	17	17		17	17	
CL		1.058	0.149		5.658	1.035	
S.D.		0.136			1.033		
C.V.		0.129			0.183		
UCL		1.330	0.384		7.724	2.666	
LCL		0.786			3.592		

Abbreviations: See the footnotes of Table 4

Table 6. Comparison of Quantitative PCR Results between DNA Extraction Methods

Extraction method	Number of trials	1% Sample		5% Sample	
		Concentration (%)	Recovery (%)	Concentration (%)	Recovery (%)
Silica-gel membrane type kit	5	0.72±0.12	72.0	3.81±0.26	76.2
CTAB method	3	0.86±0.08	86.0	4.74±0.53	94.8

試験1回目(試料送付日の直前)を実施し、各参加機関での測定の際にも改変した方法で実施するよう依頼した。シリカゲル膜タイプキット法で通知法どおり操作できなかった原因としては、今回使用したダイズが通知法の検討を行ったダイズとは収穫年度などが異なることから、DNA抽出に影響するきょう雑物の含量の違いにより、通知法検討時の結果が再現できなかった可能性が考えられた。一方、改変したシリカゲル膜タイプキット法により抽出したDNAを用いて定量PCRを実施すると、混合重量比およびELISA法に比べて定量値が低くなる傾向が観察された。今回、抽出法の変更は急遽行ったため、他の抽出法とのバリデーションは前もって実施できなかった。安定性試験2回目(データ回収期限日の直後)の実施時に、国立衛研において改変したシリカゲル膜タイプキット法に加えCTAB法によりDNAを抽出し、定量PCR法による測定値を検討した結果、改変したシリカゲル膜タイプキット法を抽出法に用いた場合、定量PCRの測定値がCTAB

法に比べて低くなることが判明した(Table 6)。

Thompsonら⁶⁾のプロトコールには測定法により測定値に差が生ずることが明らかな場合、指定値を測定法別に設定して解析する方法が記されている。これに基づいて、定量PCRの結果をDNA抽出法により区別して統計解析をやり直した。その結果、シリカゲル膜タイプキット法を用いた機関のみの解析でXbarが管理限界を超えたのは1%試料の1機関のみであった。この測定データはRも管理限界を超えており3測定のうち1測定が高値であったことにより平均値が影響を受けたものと考えられた。このほかにも1%試料でRが管理限界を超えた機関が1機関あった。これら2機関については報告書を詳細に検討したがDNA抽出、定量PCRとも特に問題は見当たらず、測定値がばらついた原因は考察できなかった。さらに5%試料でRが管理限界を超えた機関が1機関あり、その測定データは3測定のRSDが72%と他の機関に比べて著しく大きかった。この機関の抽出DNAは260 nm/230

nmの吸光度比が他機関に比べ小さく、DNAの精製が不十分であった可能性があるほか、定量PCRでNTCの増幅、および0%試料の測定で0以外の測定値を報告していることから、コンタミネーションの可能性も考えられた。

DNA抽出法にCTAB法を使用した機関については例数が少ないため統計解析を行わなかったが、1%試料、5%試料とも3測定のデータに大きなばらつきはなく、またいずれの測定値も混合重量比に比較的近いことから、問題となる機関はないものと考えられた。

以上のように定量PCR法では、DNA抽出法別に統計処理を行うことにより参加機関の測定精度を推定することはできたが、改変シリカゲル膜タイプキット法によりDNA抽出を行うと実際の混入率よりも測定値が低くなることが明らかとなった。

この結果を考慮して2.2.1 トウモロコシ及びダイズ穀粒からのDNA抽出精製、2.2.1.2 シリカゲル膜タイプキット法の項に「トウモロコシのみ適用可能」の旨を追記し、ダイズのDNA抽出法からシリカゲル膜タイプキット法を除いた通知法改正版（平成15年11月13日、食安発第1113001号）⁷⁾を厚生労働省から通知した。

2004年、Peanoらは、4種類のDNA抽出キット法を定性分析・定量分析両面から検討し、シリカゲル膜タイプキット法は、ほかに検討された抽出法に比べ、抽出されたDNA量が少なく、また抽出されたDNAが短く切断されていることを明らかにしている⁸⁾。このことから、通知で示されていたシリカゲル膜タイプキット法がダイズの定量分析法には適していない可能性が示唆された。

3: ELISA法

ELISA法において1%試料のXbarが上部管理限界を超えた1機関は5%試料の測定値も他機関に比べ高めに報告した。この機関の検量線の吸光度のCVは他機関に比べて大きいことから、検量線の傾きがずれたことにより測定値が高めにシフトした可能性が考えられた。このほかに5%試料でRが管理限界を超えた機関があったが、その測定データは3測定のうち1測定が1.31と著しく低く、抽出液を希釈する際に何らかの操作ミスがあったのではないかと推測された。

結 論

GMダイズを含む外部精度管理調査において安定性試験、均一性試験および参加機関の測定値を検討した結果、シリカゲル膜タイプキット法を用いてDNA抽出を行った

場合、定量PCRの測定値が低くなる傾向が明らかとなった。このため各参加機関からの測定値の解析はELISA法、シリカゲル膜タイプキット法抽出による定量PCR法、そしてその他の抽出法による定量PCR法の3種類に分けて実施した。その結果、大部分の参加機関についてはzスコア、Xbar-Rによる解析が可能となり、検査水準がある程度把握できたものと考えられた。しかし、その他の抽出法による定量PCR法での参加機関は例数が少ないため評価ができなかった。

また、本研究を進める過程で、シリカゲル膜タイプキット法抽出による定量PCR法の測定値の信頼性に疑問が生じたため通知法の改正を行い、ダイズのDNA抽出法からシリカゲル膜タイプキット法を除いた。

謝 辞

本研究は、平成14年度厚生労働省食品等試験検査費および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) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正”平成13年3月15日、食発第79号(2001).
- 2) 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).
- 3) 食品衛生法施行規則(昭和23年厚生省令第23号)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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15年6月18日、食発第0618001号(2003).
- 5) 大隅 昇, 精度管理における統計的データ解析, 食品衛生学雑誌, **39**, J-325-J-332(1998); **40**, J-325-J-331(1999); **41**, J-238-J-242(2000); **41**, J-316-J-322(2000).
- 6) Thompson, M., Wood, R., International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. J. AOAC Int., **76**, 926-939(1993).
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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15年11月13日、食発第1113001号(2003).
- 8) Peano, C., Samson, M. C., Palmijer, L., Gulli, M., Marmiroli, N., Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. J. Agric. Food Chem., **50**, 6,962-6,968(2004).

ノート

遺伝子組換えパパイヤ (55-1) 定性検査法を対象とした 外部精度管理試験結果の解析

(平成 16 年 6 月 18 日受理)

菊地博之*¹ 渡邊敬浩*¹ 笠間菊子*² 和久井千世子*¹
松木容彦*² 穂山 浩*^{1,†} 米谷民雄*¹

Laboratory-performance Study of the Notified Methods to Detect Genetically Modified Papaya (55-1)

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

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501,
Japan; *²Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center: 729-5, Ochiai,
Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan; † Corresponding author)

To investigate important factors affecting the reliability of the analytical results, proficiency tests were attempted for the histochemical method (GUS method) and the qualitative PCR method (PCR method) to detect genetically modified papaya (55-1) in the Japanese official method. The test samples were distributed to twenty-three laboratories that participated in the study and were examined according to the protocol. All the data collected from participating laboratories were statistically analyzed. In the PCR method, one negative sample was detected as positive using detection primers in one laboratory, though the sample was negative when checked using confirmation primers. Contamination might have occurred in the step of the preparation of the PCR sample solution using detection primers. In the GUS method, all the test samples were identified as expected. Thus, all the laboratories reported correct results overall.

(Received June 18, 2004)

Key words: 遺伝子組換えパパイヤ genetically modified papaya; 検査方法 detection method; ポリ
メラーゼ連鎖反応 PCR; GUS 法 GUS assay; 外部精度管理 laboratory-performance study

緒 言

近年、バイオテクノロジーを応用した遺伝子組換え (GM) 食品の開発が世界的に進められており、我が国においても、ダイズ、トウモロコシなどの GM 作物および、それらを原料とする加工食品が流通するようになった。厚生労働省では、平成 3 年 5 月より、食品衛生調査会において、「組換え DNA 技術応用食品の安全性評価指針」に沿った GM 食品の評価を開発者が実施しているかどうかについて、個別に確認を行ってきた。また、平成 12 年 5 月に公布された厚生省告示第 232 号¹⁾、233 号²⁾により、食品衛生法における食品、添加物等の規格基準が一部改正され、安全性審査が終了していない GM 食品が国内で流通しないよう、安全性審査が法的に義務づけられた。これ

により、平成 13 年 4 月以降、安全性審査の終了していない GM 食品は輸入、販売などが法的に禁止されることとなった。これとともに、平成 13 年 3 月の厚生労働省医薬局食品保健部長通知「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正」(平成 13 年 3 月 15 日、食発第 79 号³⁾)において、GM 食品の表示制度についても法的に義務化された。

これに関連し、厚生労働省では、医薬局食品保健部長通知として「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(平成 13 年 3 月 27 日、食安発第 110 号⁴⁾)を通知し、GM 食品の検査法を定めた。当該通知は、GM 食品の安全性審査の状況、および検査技術の改良などに合わせて、数回の改正が行われ^{5)~7)}、平成 16 年 8 月現在では、医薬食品局食品安全部長通知された改正版(平成 16 年 6 月 28 日、食安発第 0628001 号⁸⁾)が最新となっている。本検査法に従い検査を行った結果、安全性審査が終了していない GM 食品が定性的に検知された場合は、廃棄命令、回収命令、輸入食品の本国への積戻し命令などの行政処分

† 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賀 1-18-1

*² 財団法人 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

の対象となる。そのため、本検査法の測定値の品質あるいは正当性を保証するためには、分析法の精度管理あるいは品質管理が不可欠であると考えられる。食品分析に従事する諸検査機関が、厚生労働省通知法に従い共通未知試料を同一時期に分析し、得られた結果の解析を通じて検査機関に認められるデータのばらつきを評価し、検査水準を把握すること、また参加機関の検査担当者が自己の技術を客観的に認識し、検査技術の維持、向上を図ることは非常に重要である。

著者らはこれまでに、GM トウモロコシならびにジャガイモの定性検査法を対象とした外部精度管理方法の検討について報告した⁹⁾。本研究では、食安発第 0628001 号⁸⁾に記載の GM パパイア定性検査法を対象とし、GUS (β -glucuronidase) 法、ならびに定性 PCR 法の 2 法について外部精度管理試験を実施したので報告する。

実験方法

1. 試料

試験対象として選定した安全性審査の終了していないハワイ産 GM パパイア (55-1)、および非遺伝子組換え (Non-GM) パパイアは、厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課を通じてダイヤモンドスター(株)から購入したものを使用した。

2. 試薬

GUS 活性を検出するための基質としては、和光純薬工業(株)製の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide-cyclohexyl ammonium salt を用いた。DNA の抽出精製には、Qiagen 社製シリカゲル膜タイプキット (DNeasy Plant Mini Kit) を用いた。DNA ポリメラーゼとしては Applied Biosystems (株) 製の AmpliTaq™ Gold を、dNTP、10×PCR buffer II 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。アガロースは宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」を用いた。DNA マーカーは宝酒造(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°C、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特級品を用いた。なお、上記試薬類は、送付検体の確認試験、および安定性試験を実施した機関が使用したものを記載した。

3. 機器

粉碎機: ミキサーミル MM200 (Retsch 社製)、恒温槽: ドライサーモユニット DTU-1B (タイテック(株)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 (Applied Biosystems(株)製)、電気泳動装置: Mupid- α (アドバンス(株)製)、ゲルイメージ解析装置: Diana システム (Raytest 社製)。なお、上記機器類は、送付検体の確認試験、およ

び安定性試験を実施した機関が使用したものを記載した。

4. 試料の調製

入手した GM および Non-GM パパイアをそれぞれ果肉部と種子に分別した。果肉部はビニールバックに約 100 g を量り採り、真空処理を行ったものを小分け試料とした。また、種子については、約 2 g を 50 mL 遠沈管に量り採り、小分け試料として用いた。果肉部および種子はともに、送付あるいは試験に供するまで 4°C で保存した。また、入手したパパイアのすべてに、組換え体、非組換え体の別を示す表示がなされていたが、この内容を担保することを目的とし確認試験を行った。すなわち、本研究において、検体として配布した全パパイアにつき、果肉部および種子の一部をサンプリングし、食安発第 0628001 号⁸⁾に記載の方法 (種子については GUS 法、果肉部については定性 PCR 法) に従い分析を行った。さらに、外部精度管理試験実施期間中に検体の変質が生じていないことを確認するため、以下の方法を用いて安定性試験を行った。GM および Non-GM パパイア各 1 個を前述した方法に従い果肉部および種子に分別した後、4°C の条件で保存した。種子については保存第 0 日、3 日、9 日および 16 日目に GUS 法を用いて、果肉部については保存第 0 日、3 日、7 日および 14 日目に凍結乾燥処理を行った後、定性 PCR 法を用いて試験した。また、上述した確認試験および安定性試験は、食品薬品安全センター秦野研究所にて行った。

5. GUS 試験法

食安発第 0628001 号⁸⁾に記載の条件を遵守した。

6. DNA 溶液の調製

GM および Non-GM パパイアの果肉部を検体とし、食安発第 0628001 号⁸⁾に記載の方法を一部変更して、DNA 溶液の調製を行った。本通知に記載の方法においては、DNA 試料原液を TE 緩衝液にて 10 倍希釈し、吸光度 (O.D.) の測定を行うものと規定されているが、本外部精度管理試験では、予想される DNA 抽出量、ならびに各参加機関が所有する分光光度計の測定精度を考慮し、5 倍希釈とすることとした。希釈後、230、260、280 および 320 nm における O.D. を分光光度計を用いて測定した。また、O.D. 260 nm の値 1 を 50 ng/ μ L DNA と規定し DNA 濃度を算出した。さらに、抽出された DNA の質の評価を行うために O.D. 260/280 nm を算出し、DNA の精製度の確認を行った。本吸光度比が 1.7~2.0 のとき良好な精製が行われたものと判断した。

7. プライマー

食安発第 0628001 号⁸⁾に記載のプライマー対を使用した。GM パパイアには、papaya ringspot virus (PRSV) の外被タンパク質をコードした遺伝子、GUS 遺伝子、cauliflower mosaic virus 35S promoter (CaMV35S) 配列、nopaline synthase terminator (NOS) 配列が導入されている。上記導入配列中、CaMV35S 配列と NOS 配列の境界領域に設計された検出用 (NosC-5', CaMVN-3')、および CaMV35S 配列と GUS 遺伝子の境界領域に設計された

確認用 (CaM 3-5', GUS n-3') プライマー対を用いた試験を行った。本プライマー対により得られる PCR 増幅バンド長は、それぞれ 207 bp, 250 bp である。また、パパイヤゲノムに内在するパパイイン遺伝子内に設計された対照用 (papain-5', papain-3') プライマー対を陽性対象とした試験も同時に行った。本プライマー対により増幅される PCR 増幅バンド長は 211 bp である。

8. PCR 条件

食安発第 0628001 号⁸⁾に記載の条件を遵守した。

9. 試験の実施

本外部精度管理試験に参加した機関は合計 23 機関であった。定性 PCR 法に参加した 21 機関に対しては、GM および Non-GM パパイヤ果肉部小分け試料各 2 検体を blind duplicate として送付した。また、GUS 法に参加した 13 機関については、GM および Non-GM パパイヤ種子小分け試料各 2 検体をそれぞれ blind duplicate として送付した。また、検体送付時には、試験結果および調査項目の記入方法を規定した各種報告書様式、試験の実施期間を規定した実施要領、および食安発第 0628001 号⁸⁾に準じ作成した厚生労働省通知準拠マニュアルを送付した。なお、調査項目には、GM 食品検査の経験年月数および検査実績、測定機器の共用の有無、各種測定機器のメーカー、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、インキュベーション条件、染色方法など、検査全般にわたり詳細な調査が行えるよう配慮した。

また、試験結果については、試験に供した胚の数および青色を呈した胚の数、DNA 抽出液の O.D. (230, 260, 280, 320 nm) および DNA 収量、さらに各種プライマー対を用いた際に予定バンド長の増幅産物が観察されたか否かを記載のうえ、結果の判定をした。各機関での試験終了後、返送された試験結果について集計を行った。これら試験方法の作成にあたっては渡邊らによる報告⁹⁾を参考にした。

結果および考察

1. 送付検体の確認試験

本外部精度管理試験において、検体として送付したパパイヤ果肉部および種子について、組換え体、非組換え体の種別が正しくなされていることを確認するために、試料とした GM および Non-GM パパイヤ各 11 個体につき、その一部をサンプリングし、厚生労働省通知準拠マニュアルに従い検証を行った。GUS 法を用いた試験結果を Table 1 に示す。GM パパイヤの種子を試験対象とし、本法を用いた場合、理論的には試験に供した胚の約 75% が GUS 活性を発現し、青色を呈するものと考えられるが、本試験では種子を無作為に選出していることから、GUS 発現率 (%) が 30% 以上であった場合に陽性と判定した¹⁰⁾。その結果、GM パパイヤと表示された 11 検体については、いずれの検体からも 30% 以上の割合で GUS 発現率が観察され、これによりすべてが GM パパイヤであると確認された。一方、Non-GM パパイヤと表示された 11 検体につ

Table 1. Results of Confirmative Test with GUS Assay

Sample	Sample No.	Number of embryos tested	Number of embryos that turned blue	GUS-expression (%) [*]	Decision
Non-GM papaya	N1	12	0	0	-
	N2	12	0	0	-
	N3	12	0	0	-
	N4	12	0	0	-
	N5	12	0	0	-
	N6	12	0	0	-
	N7	12	0	0	-
	N8	12	0	0	-
	N9	12	0	0	-
	N10	12	0	0	-
	N11	12	0	0	-
	Average		12	0	0
GM papaya	G1	12	11.0	91.7	+
	G2	12	10.0	83.3	+
	G3	12	9.0	75.0	+
	G4	12	9.0	75.0	+
	G5	12	10.0	83.3	+
	G6	12	6.0	50.0	+
	G7	12	9.0	75.0	+
	G8	12	9.0	75.0	+
	G9	12	9.0	75.0	+
	G10	12	5.0	41.7	+
	G11	12	9.0	75.0	+
	Average		12	8.7	72.7

+ : positive, - : negative

*: The percentage of embryos expressing GUS (GUS-expression) was calculated using the following formula

$$\text{GUS-expression (\%)} = (\text{number of embryos that turned blue} / 12) \times 100$$

Table 2. Results of Confirmative Test with Qualitative PCR Method

	Primers	Non-GM papaya		GM-papaya	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Control	papain-5', papain-3'	22/22*	0/22	22/22	0/22
Detection	NosC-5', CaMVN-3'	0/22	0/22	22/22	0/22
Identification	CaM 3-5', GUS n-3'	0/22	0/22	22/22	0/22

*: Number positive/Number of sample

PCR was performed with three primer pairs described above.

Table 3. Results of Stability Test with GUS Assay

Sample	Non-GM papaya				GM papaya			
	0	3	9	16	0	3	9	16
Preservation period (day)	0	3	9	16	0	3	9	16
Number of embryos tested	12	12	12	12	12	12	12	12
Number of embryos that turned blue	0	0	0	0	11	10	8	9
GUS-expression (%)	0	0	0	0	91.7	83.3	66.7	75.0
Decision	-	-	-	-	+	+	+	+

+: positive, -: negative

Seed for tests was stored at 4°C

Table 4. Results of Stability Test with Qualitative PCR Method

Sample	Non-GM papaya								GM papaya							
	0		3		7		14		0		3		7		14	
Extraction No.	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Control primer pairs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Detection primer pairs	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Identification primer pairs	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Decision	Negative		Negative		Negative		Negative		Positive		Positive		Positive		Positive	

いてはいずれの検体からも GUS 活性は検出されず、すべて Non-GM パパイヤであることが確認された。

また、定性 PCR 法による確認試験は、GM, Non-GM パパイヤ果肉部各 11 検体を duplicate とし、各 22 検体を対象に実施した。各検体を 10 mm 程度に切り分け、-20°C 下 24 時間予備凍結を行った。凍結後、試料の水分が完全に除去されるまで凍結乾燥を行った。試料が十分に乾燥したことを確認した後、粉碎機を使用し、十分に均一化を図ったものを DNA 抽出用試料とした。この際、シリカゲル膜タイプキット法を DNA 抽出法として採用した。その結果、DNA 平均収量として、 $9.3 \pm 3.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ が得られたが、規定濃度 ($10 \text{ ng}/\mu\text{L}$) を下回った検体についてはそのまま、上回った検体については規定濃度に調製した後、対照用、検出用、確認用の各プライマー対を用いて PCR を行い、目的の増幅バンドが特異的に検出されるか否かを検討した。Table 2 に示すように、GM パパイヤと表示された 22 検体のすべてから、対照用、検出用、確認用いずれのプライマー対を用いた場合にも予定長の PCR 増幅バンドが検出され、これにより、すべての試料が GM パパイヤと判定された。また、Non-GM パパイヤと表示された 22 検体を対象とした場合には、いずれの試料からも対

照用プライマー対を用いた場合にのみ予定長の PCR 増幅バンドが検出され、検出用、確認用のプライマー対を用いた場合には PCR 増幅バンドは検出されなかった。この結果から、すべての試料が、Non-GM パパイヤであることを確認した。

2. 送付検体の安定性試験

入手した試料のうち、GM および Non-GM パパイヤの各 1 個を無作為に選出し、果肉部と種子とに分別した後、4°C の条件下で保存した。一定の保存期間 (0 日, 3 日, 9 日, 16 日) ごとに試料を採取し、確認試験と同様の方法により試料を分析し、外部精度管理試験実施中の試料の安定性について確認した。GUS 法を用いた分析結果を Table 3 に示す。その結果、種子を 4°C で保存した場合には、保存後 16 日が経過しても GM パパイヤ特異的に 30% 以上の割合で GUS 発現率が認められた。この結果から、保存条件が 4°C であった場合、少なくとも 16 日間は判定に影響を及ぼす変質は起きないことが示唆された。また、定性 PCR 法を用いた試験においても、GUS 法によって得られた結果を支持する結果が得られた (Table 4)。

3. DNA 収量および精製度

食安発第 0628001 号⁸⁾には、パパイヤからの DNA 抽出