

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 18 年度

分担研究報告書

組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究

分担研究者 渡邊 敬浩

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

組換えDNA技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究

主任研究者	遠藤 明	(財)食品薬品安全センター 理事長
分担研究者	渡邊敬浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部 主任研究官
協力研究者	米谷民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品部長
協力研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品部第三室長
協力研究者	大島赴夫	(財)食品薬品安全センター 食品衛生事業部長
協力研究者	笠間菊子	(財)食品薬品安全センター 研究員
協力研究者	鈴木達也	(財)食品薬品安全センター 研究員
協力研究者	井上雪乃	(財)食品薬品安全センター 研究員

研究要旨

安全性審査を終了した遺伝子組換え(GM)大豆(Roundup Ready Soy: RRS)を対象とした定量分析法として、real-time PCRの原理を応用した定量PCR法が、厚生労働省および農林水産省によって示されている。この分析法の開発および妥当性の検証には、由来の明らかな特定品種の大豆穀粒を粉砕し調製した各種試料が使用された。一方で、栽培されている大豆の品種は1000種を超えていると言われる。これら大豆の生物学的多様性を考慮し、品種、産地、産年度等の定量値への影響について明らかにすることは、本分析法の正しい運用と得られる定量値の正確な理解に通じ、組換えDNA技術応用食品検査の信頼性確保の上で重要であると考えられた。そこで本研究においては、規定量のRRSを含む混合試料を異なる10品種の非遺伝子組換え(non-GM)大豆をマトリクスとして調製し、得られた分析結果の比較検討を行うことにより、non-GM大豆品種の定量値への影響を評価した。さらに明確な影響が認められた場合には、その要因について明らかにすることを試みた。

RRS粉体試料を重量換算で1.0%または5.0%になるよう混合した混合粉体試料およびRRS粉体試料、各種non-GM大豆粉体試料のそれぞれから抽出したDNAを、重量換算で1.0%または5.0%となるよう混合した混合DNA試料を調製し、定量PCR法により分析した。また、DNAの定量は、抽出操作によって得られるDNAを含む溶液に、DNAと同様に260nmの吸光を有するDNA以外の物質の存在が示唆されたため、特異的な蛍光試薬を用いる方法により行った。

検討の結果、混合粉体試料から得られた定量値は、全ての試料を通じて真値(粉体重量混合率)に比べ高い値であった。一方、混合DNA試料を分析することにより得られた定量値と真値(DNA重量混合率)との差異は非常に小さかった。これらの結果から、抽出の際に生じる品種ごとのDNA収量の差が、混合粉体試料の定量値に影響を与える一つの要因であると考えられた。

A. 研究目的

平成 13 年 3 月に公布された、「食品衛生法施行規則および乳および乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令」(厚生労働省令第 23 号)ならびに、「乳を原材料とする加工食品に係る表示の基準を定める件」(厚生労働省告示第 71 号)等により、遺伝子組換え(GM)食品の表示が法的に義務化された。当該表示制度においては、1) 安全性審査を終了した GM 作物を原材料として用い、その含量が原材料の上位 3 品目に入り、かつ 5%以上の場合、「遺伝子組換え」の旨を表示、2) 安全性審査を終了した GM 作物を含む可能性があり、分別生産流通管理 (Identity Preserved Handling; IP ハンドリング)が行われていない場合は、「遺伝子組換え不分別」の旨を表示することが義務付けられている。また、非遺伝子組換え(non-GM)作物を原材料として使用した場合の表示については、「遺伝子組換えでない」旨の表示を行うことが可能であるが、任意である。また、IP ハンドリングが行われた non-GM 大豆およびトウモロコシに関しては、「遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について(通知)」(平成 13 年 3 月 19 日改正 12 総合第 1115 号)において、意図せざる混入について、「非遺伝子組換え大豆の場合で遺伝子組換え大豆の混入率が 5%以下であること又は非遺伝子組換えトウモロコシの場合で遺伝子組換えトウモロコシの混入率が 5%以下であることとする。」と示されている。

上述の GM 食品に係わる施策が適切かつ的確に実施されていることは、提出資料の審査や記録の確認などの社会的検証法によって確認されるとともに、GM 食品であることを同定・定量するための科学技術(検知法)を主とする科学的検

証法によって確認される。そのために必要となる検知法を体系としてまとめた検査方法が、食品衛生法の所管省庁である厚生労働省および、JAS 法の所管省庁である農林水産省により示されている(平成 13 年 3 月 27 日、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 4 月 1 日、「JAS 分析ハンドブック(遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル)」。これら検査方法には、安全性審査を終了し、適切な表示を行った上で国内流通することが可能な GM 大豆(Roundup Ready Soy: RRS)を対象とした定量分析法として、real-time Polymerase Chain Reaction(real-time PCR)を応用した定量 PCR 法が示されている。本方法は栗原らによって報告されているとおり、RRS を特異的に定量分析可能な方法であり、その妥当性についても多機関検証試験によって確認されている。分析法の開発および妥当性の検証には、由来の明らかな試料を使用することが前提となる。栗原らによって報告された結果も、産年度および品種が特定された non-GM 大豆ならびに RRS を用いて調製された試料により得られている。しかし、栽培されている大豆の品種は 1000 種を超えると言われており、これらの品種、産地、産年度等の分析結果への影響について検討することは、本分析法の正しい運用と得られる定量値を正確に理解する上で重要であると考えられた。つまり、本定量 PCR 法においては、RRS 由来の DNA のみではなく、RRS が混入するマトリクスとなる non-GM 大豆由来の DNA も共に分析対象物となるため、大豆品種による成分組成や遺伝的背景の異なり、産地、産年度などの違いが分析結果に影響を与える可能性が考えられる。このため、仮に分析結果がそれら、いわば対象とな

る大豆の生物学的影響を受ける場合には、その大きさを評価した上で定量値を取り扱うことが、運用上は必要だと思われる。

本研究においては、RRS の混入するマトリクスとなる non-GM 大豆品種の差異が、定量 PCR 法より得られる定量値に及ぼす影響について評価することを目的に、異なる non-GM 大豆 10 品種(国産 5 品種および外国産 5 品種)をマトリクスとし、規定量の RRS を含む混合試料から得られた分析結果を比較するとともに、分析結果に差異を生じる要因を明らかにするための検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 試料

安全性審査を終了した遺伝子組換え(GM)大豆であるラウンドアップレディー大豆(Roundup Ready Soy; RRS)は、厚生労働省医薬食品局食品安全部を通じ、米国モンサント株式会社より入手した。非遺伝子組換え(non-GM)大豆 10 品種(国産大豆 5 品種; タンレイ、ミヤギシロメ、あやこがね、スズユタカ、リュウホウ、アメリカ産大豆 3 品種; IA3006、AG270、Vinton81、ならびにカナダ産大豆 2 品種; PS-36、SO880) は国内の商事会社を通じて入手した。

B-2. 試料の調製

1) 混合粉体試料

混合粉体試料とは、RRS および non-GM 大豆各品種をおのおの粉体として調製した後に、厳密に重量を測定した上で、意図した重量混合率(w/w%)となるよう人為的に混合させ、調製した試料である。RRS および non-GM 大豆 10 品種(国産 5 品種および外国産 5 品種)はまず初めに、6 mm のメッシュサイズのスクリーンを取り付けた高速遠心粉碎機を用いて粗粉碎し、次いでスクリーンのメ

ッシュサイズを 500 μm に変え、細粉碎した。細粉碎後、試料の水分含量を一定にすることを目的に、凍結乾燥処理を 24 時間行い、RRS 粉体試料および各品種 non-GM 大豆粉体試料を調製した。本研究において用いた DNA 抽出法に供する初期試料量が 2.0 g であるため、その 1.0 あるいは 5.0%の重量に相当する RRS 粉体試料を正確に秤量したのち、各品種 non-GM 大豆粉体試料を加え、全量を 2.0 g とすることで混合粉体試料を調製した。なお、粉碎や混合等の操作を行う試料を 1 日 1 品種に限定するなどし、混合粉体試料調製の全行程を通じて、コンタミネーションの予防には十分に注意した。

混合粉体試料調製時の秤量誤差範囲は、混合率 1.0%の試料(1%粉体試料)に関し、non-GM 大豆については 1.979~1.981 g、RRS については 0.0195~0.0210 g とした。同様に、混合率 5.0%の試料(5%粉体試料)に関し、non-GM 大豆については 1.899~1.901 g、RRS については 0.099~0.102 g とした。このような秤量誤差を加味した場合の重量混合率は、1.0%粉体試料について 0.98~1.05%、5%の粉体試料について 4.95~5.10%と算出される。

2) 混合 DNA 試料

混合 DNA 試料とは、RRS 粉体試料および、各品種 non-GM 大豆粉体試料から個別に DNA(RRS 由来 DNA および non-GM 大豆由来 DNA)を抽出し、DNA の重量として意図した重量混合率(w/w%)となるよう人為的に混合させ調製した試料である。微量 DNA の取り扱いによる誤差を小さくすることを目的に、RRS 由来 DNA は 1%混合 DNA 試料(1%DNA 試料)調製時には 5.0 ng/ μL 、5%混合 DNA 試料(5%DNA 試料)調製時には 20 ng/ μL の濃度に調製した上で

使用し、最終的には 20 ng/ μ L の濃度の混合 DNA 試料を 300 μ L(全量)調製した。より具体的には、1%DNA 試料を調製する場合には RRS 由来 DNA の溶液 (5 ng/ μ L)を 12 μ L 分取し、これに 5940 ng の non-GM 大豆由来 DNA(濃度は品種により 22~51 ng/ μ L と異なる)を加え、その後、混合 DNA 溶液の濃度が 20 ng/ μ L となるように希釈することで調製した。また、5%DNA 試料を調製する場合には、RRS 由来 DNA 溶液(20 ng/ μ L)を 15 μ L 分取し、これに 5700 ng の non-GM 大豆由来 DNA を加え、その後、混合 DNA 溶液の濃度を 20 ng/ μ L となるように希釈することで調製した。

B-3. DNA 抽出

混合粉体試料からの DNA 抽出法としては、食安発 0629002 号 2.2.1 項に記載の GM quicker 法もしくは、DNeasy[®]Plant Mini Kit を用いた方法を、2.0 g の初期試料からの DNA 抽出が可能となるよう改変して用いた。混合 DNA 試料を調製する目的において、RRS 粉体試料あるいは各品種 non-GM 大豆粉体試料から DNA を抽出する場合には、上記改変 GM quicker 法にさらに若干の変更を加え、用いた。なお、混合粉体試料からの DNA 抽出は 3 点併行で行った。

B-4. DNA 濃度測定

吸光度による DNA 濃度の測定(吸光度測定法)を行う場合には、抽出した DNA 試料原液の吸光度を 200~320 nm の波長域で測定し、260 nm の吸光値に基づき、DNA の濃度を算出した。また、O.D.260/280 nm ならびに 260/230 nm の比を求めることにより精製度の確認を行った。

DNA 特異的な蛍光試薬(PicoGreen[®])を用いて DNA 濃度の測定(蛍光測定法)を行う場合には、

Quant-iT[™] Pico Green[®] dsDNA Reagent に付属の TE 緩衝液を用いて Pico Green Reagent を 200 倍希釈することにより、測定用蛍光試薬を調製した。一方で、検量線を作製するため、付属の λ ファージ由来の DNA 濃度を 1000、500、100、25、10、5 pg/ μ L の 6 点に希釈した(スタンダード DNA)。スタンダード DNA あるいは DNA 試料原液を TE 緩衝液(pH8.0)を用いて 100 倍に希釈した後、試験液と測定用蛍光試薬を等量で十分に混合した。混合液は遮光、室温条件下で 5 分間静置した後、微量蛍光光度計を用いて測定した。励起光は 480 nm、測定する蛍光波長は 520 nm とし、絶対検量線法により DNA 濃度を算出した。

B-5. 電気泳動

Non-GM 大豆 10 品種および、RRS の計 11 試料からそれぞれ抽出された DNA をアガロースゲル電気泳動により分離した。電気泳動時には、2.0%(w/v)の濃度で調製したアガロースゲル(6cm \times 11cm)を用いた。また、サイズマーカーには λ -EcoT14 I digest を用いた。1 試料あたり 500 ng の DNA を Loading Buffer と十分に混合した後、各ウェルにアプライし、100 V 定圧で約 30 分間泳動した。泳動終了後のゲルはエチジウムブロミド溶液中(500 ng/mL)で 20 分間染色し、その後水中で 20 分間脱色した。脱色後のゲルを UV 照射装置上で画像解析した。

B-6. 定量 PCR 法

食安発第 0629002 号 3.1.2 項に記載された定量 PCR 法に準拠した。すなわち、RRS 定量値および RRS 内標比は、RRS オリゴヌクレオチドセットと LeI オリゴヌクレオチドセットを組み合わせ、GM ダイブプラスミドセット-ColEI/TE をキャリブレーションスタンダードとして用いる定量 PCR 法

により測定されたコピー数に基づき算出した。

なお、定量 PCR 機器には ABI PRISM 7700 を用いた。

C.D. 研究結果および考察

C.D.-1. 抽出 DNA の電気泳動

10 品種の non-GM 大豆および、RRS 粉体試料から改変 GM quicker 法を用いて DNA を抽出し、アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。その結果、全品種において 19 kbp 以上の明瞭なバンドが観察されるとともに、そのバンドから低分子方向にむけて薄い帯をひくスミアが観察された(Fig. 1)。また、品種間で電気泳動像を比較した場合、バンドの強度ならびにスミアの程度に明確な差異は認められなかった。抽出法等の影響により分解せず、植物組織から高分子ゲノミック DNA が抽出された場合には、23 kbp 以上の長さのバンドが観察されることから、本研究において用いた抽出法により、品種を区別することなく大豆粉体試料から高分子のゲノミック DNA を抽出することが可能であることが明らかになった。また、ゲノミック DNA の integrity(構造の完全性)は、PCR の結果に影響を及ぼす要因の一つと考えられ、分解による低分子化がその指標である。Fig. 1 に示した結果からは、各品種の大豆から抽出されたゲノミック DNA の integrity に明確な差異は認められず、よって、real-time PCR に影響を及ぼすことなく、内在性遺伝子、RRS 特異的 DNA 配列を正しく測定することが可能であると考えられた。

C.D.-2. 内標比の測定

食安発 0629002 号ならびに JAS 分析試験ハンドブックに採用されている real-time PCR を応用した GM 作物を対象とした定量分析法(定量 PCR 法)においては、対象とした作物に内在している遺伝子(内在性遺伝子)のコピー数と組換え DNA 配列(各種 GM 作物に特異的な DNA 配列)のコピー数を実験的に測定し、以下の式に代入することにより、試験対象試料

中の GM 作物の混入率を算出する。GM 作物混入率(%)=(組換え DNA 配列のコピー数/内在性遺伝子のコピー数)/内標比×100。この GM 作物混入率を算出するための計算式において、係数として用いられる内標比は、純粋な GM 作物(100%)から抽出した DNA を対象に real-time PCR を実施し、得られた内在性遺伝子と組換え DNA 配列のコピー数の比(組換え DNA 配列のコピー数)/(内在性遺伝子のコピー数)として規定されている。内標比は理論的には各 GM 作物系統に固有であり、常に一定の値を示すと考えられる。しかし実際には、試験に使用する DNA 抽出法、定量系(プライマー対とプローブの組み合わせ)、定量 PCR 機器による実験的な影響を受けることが知られている。本研究においては、定量系ならびに定量 PCR 機器(ABI PRISM 7700)に関しては食安発 0629002 号に記載された方法に準拠したが、DNA 抽出法は上記通知に記載の方法(GM quicker 法)を改変して用いた。このため、改変 GM quicker 法により純粋な RRS 試料(100% RRS 粉体試料)から抽出した DNA を対象に real-time PCR を実施し、内標比を算出した。その結果、3 回繰り返し試験により得られた測定値(内在性遺伝子および組換え DNA 配列のコピー数)のばらつきは小さく、これら測定値に基づき算出された内標比は 0.97 であった(Table 1)。本研究で RRS 混入率を算出する場合には 0.97 を内標比として使用した。

C.D.-3. 混合粉体試料を用いた検討

1) 改変 GM quicker 法による DNA の抽出

RRS を 1.0%または、5.0%(w/w)の割合で含む 10 品種の non-GM 大豆をマトリクスとした混合粉体試料(1.0%粉体試料および 5%粉体試料)から、改変 GM quicker 法を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA の質が、定量 PCR 法により得られる定量値に影響を与えるため、DNA 濃度を求めることに加え、DNA の質を評価することを目的に 200~320 nm の波長域で吸光度を測定した(吸光度測定法)。評価に当たっては、タンパク質残存の指標として

O.D.260/280 nm の比、糖類残存の指標として O.D.260/230 nm の比を使用し、それぞれの値が 1.8、2.0 以上であれば良好な精製が行われたと判断した。吸光度測定の結果、O.D.260/280 nm の比については、1.0%粉体試料のうち IA3006 とタンレイをマトリクスとする試料について、基準とした 1.8 を若干下回る結果(いずれも 1.7 以上)であった。しかし、それ以外の品種をマトリクスとした試料からは 1.8 を超える結果が得られており、タンパク質に関しては総じて良好な精製が行われたものと考えられた。これに対し、O.D.260/230 nm の比は、1.0%粉体試料のうち IA3006、あやこがね、タンレイをマトリクスとした試料について、また、5.0%粉体試料のうち IA3006、タンレイをマトリクスとした試料について、基準とした 2.0 を下回る結果であった(Table 2-1)。特に、IA3006 およびタンレイをマトリクスとして使用した場合には、RRS 粉体試料の混合率に関わらず基準を下回る結果が得られており、これらの品種からは O.D.260/230 nm の比を低下させる要因を除去することが難しいことが示唆された。また、基準を超えたその他の試料については、これまでに報告されている他の DNA 抽出法に比べ、O.D.260/230 nm の比が大きくなる傾向が認められたが、これは DNA 抽出緩衝液に含まれる物質など、DNA 抽出法に固有の要因があるためではないかと推測された。

吸光値(260 nm)に基づき算出した DNA 濃度は、1.0%粉体試料についてはあやこがね、5.0%粉体試料については SO880 をマトリクスとして調製された試料に関して最大となり、それぞれ 144.1 ng/μL および 101.9 ng/μL であった。一方、DNA 濃度が最小となった試料は AG270 をマトリクスとした 1.0%粉体試料および、Vinton81 をマトリクスとした 5.0%粉体試料であり、それぞれの DNA 濃度は 43.3 ng/μL、41.9 ng/μL であった。特に、あやこがねならびに SO880 に関しては、RRS の混合率に関わらず、他の品種よりも DNA の濃度が高い傾向が認められており、品種としての特性であることが示

唆された。さらに RRS の混合率を区別せず、各品種計 6 点の粉体試料から得られた DNA の濃度の平均値を品種代表値として用い、品種間での DNA 濃度のばらつき(Relative Standard Deviation; R.S.D.)を計算した結果、そのばらつきは 30.0%を上回っていた。これに対し、同一品種の混合粉体試料から併行抽出した 3 点間での DNA 濃度のばらつきは、実験的要因が疑われるリュウホウ(1.0%粉体試料)、SO880(5.0%粉体試料)およびあやこがね(5.0%粉体試料)を除き、20.0%を下回った。さらに、併行抽出された 3 点間でのばらつきに比べ、品種間でのばらつきが大きかったことから、マトリクスに使用した大豆の品種によって DNA の収量が変動する可能性が示唆された。

吸光度測定法により求められた DNA 濃度は、O.D.260 nm の吸収波長を持つ DNA 以外の物質や、DNA の分解に伴うモル吸光係数の変化の影響を受けると考えられるため、より正確な DNA 濃度を算出することを目的に、PicoGreen[®]を用い、蛍光による測定(蛍光測定法)を試みた。PicoGreen[®]は 2 本鎖 DNA に特異的なインターカラーターであり、これから放射される蛍光の強度は 2 本鎖 DNA の量に依存するため、より正確な 2 本鎖 DNA 量の測定が可能となる。Table 2-2 に示したとおり、蛍光測定法により求められた DNA 濃度は、吸光度測定法により求められた DNA 濃度に比べ、一般的に低くなる傾向が認められた。特に、吸光度測定法により得られた結果から、DNA 収量が高い品種であると考えられた SO880 およびあやこがねについては、両方法により得られた DNA 濃度の差異が顕著に大きかった。また、吸光度測定法の場合と同様に、RRS の混合率を区別せず、各品種 6 点の粉体試料から得られた DNA の濃度の平均値を品種代表値として用い、品種間での DNA 濃度のばらつきを計算した結果、そのばらつきは 16.4%であり、吸光度測定法により得られたばらつきを大幅に下回った。蛍光測定法においては、λファージ由来の DNA を用い、質量に基づく希釈系

列として検量線を作製するため、その影響についても考慮する必要があるが、上記の結果は、大豆粉体試料から改変 GM quicker 法を用いて得られる DNA 試料原液には、DNA 以外にも O.D.260 nm の吸光値に影響を与える物質が含まれ、その量が品種によって変動する可能性を強く示唆している。先述の通り、定量 PCR 法により算出される GM 作物混入率は、内在性遺伝子のコピー数と組換え DNA 配列のコピー数との比に基づく相対定量値であるため、定量 PCR に供される DNA 量の変動することによる定量値への影響は大きくないと考えられる。しかし、DNA 質量に基づき混合試料を調製する場合、得られる定量値は、混合する DNA の濃度をいかに正確に測定し、目的とした比率で混合するかにより、大きな影響を受ける。よって、本研究において DNA 重量として混合率を規定した試料(DNA 混合試料)の調製および、定量 PCR を行う場合(DNA 抽出法に mini 法を用いた場合を除く)には、蛍光測定法により測定した DNA 濃度を採用することにした。

2) 定量 PCR 法による定量

1.0%および 5.0%混合粉体試料を対象に、それぞれ抽出・調製した DNA 試料液を用いて定量 PCR 法を実施した。その結果、対象とした全試料から得られた定量値は、混合粉体試料調製時に規定した RRS 粉体の重量混合率に比べ、高い値で算出された(Fig. 2A および B)。また、RRS 粉体の重量混合率を真値とした場合、真値と定量値との差異(Bias)は、リュウホウをマトリクスとした場合(1.0%粉体試料)に最大となり、152.8%であった。さらに、bias の大きさはマトリクスとした non-GM 大豆の品種に関わらず一定して正の方向にかかっており(常に定量値が真値を上回る)また、RRS の混合率に関わらず同品種の non-GM 大豆では、その大きさが同程度になる傾向が認められた(Fig. 3)。

混合粉体試料を対象に得られた定量値が、試料の調製時に規定した RRS 粉体試料の重量混合率に比べ高値として算出され、かつ

bias に品種依存的な傾向が認められたことの原因としては、使用した大豆試料に含まれる水分やその他の成分の組成比など、試料に由来する要因と、DNA 抽出法あるいは定量 PCR 法の手法に依存した要因に大別されると考えられた。

C.D.-4. 定量値に影響を与える要因の検討

1) 粉体試料の水分含量

試料の水分含量については、マトリクスとして使用した non-GM 大豆粉体の水分含量が RRS に対して高い場合、RRS 試料に由来する DNA が定量 PCR 法に供される DNA 試料液中に多く含まれる一因になるため、真値(粉体重量混合率)に比べ高値の定量値が算出されると考えられる。しかし、各大豆粉体試料の調製時に凍結乾燥処理を行ったことに加え、カールフィッシャー法により各大豆粉体試料中の水分含量を測定した結果からは、RRS 粉体試料の水分含量が他の non-GM 大豆粉体試料のすべてに比べ高いことが明らかとなった(Table 3)。このため、粉体試料の水分含量が定量値に影響を及ぼす要因であるとは考えることができなかった。

2) 他の DNA 抽出法を用いた検討

DNA 抽出法や real-time PCR が定量値に影響を与えるその仕方としては、内在性遺伝子と組換え DNA 配列の PCR 増幅の効率に異なる大きさの影響を及ぼす物質の残存や、real-time PCR により増幅される対象 DNA 配列の抽出効率に差を生じることなどが考えられる。そこで、まず他の DNA 抽出法(DNeasy® Plant Mini Kit を用いた方法:改変 mini 法)を用いて同一の混合粉体試料から DNA を抽出し得られた定量値と、改変 GM quicker 法を用いて得られた定量値との比較による評価を試みた。また先に述べたとおり、RRS 粉体試料の混合率によらず、混合粉体試料を対象に得られた定量値と真値との bias の大きさには品種依存性が認められたことから、5.0%粉体試料のみを用いた。

5.0%混合粉体試料から改変 mini 法を用い

て DNA を抽出し、吸光度測定法により吸光値を測定した。その結果、全試料ともに、O.D.260/280 nm の比については 1.8、O.D.260/230 nm の比については 2.0 を上回っており、良好な精製が行われたものと判断された。また、DNA 収量を算出した結果、同一試料から併行抽出した抽出点(n=3)間の収量のばらつき(R.S.D.)は 11.0%であり、良好な抽出操作が行われたと判断された。さらに、品種間での DNA 収量の R.S.D.は 12.0%であり、改変 GM quicker 法により得られた結果に比べ小さかった。蛍光検出法により得られた DNA 濃度は、改変 GM quicker 法を用いて抽出した DNA の濃度と同様に、O.D.260 nm の吸光値に基づき算出された DNA 濃度に比較して減少した(Table 4)。これらの結果は、先にも考察したとおり、改変 GM quicker 法あるいは改変 mini 法により得られる DNA を含む溶液(DNA 試料原液)には、DNA 以外にも O.D.260 nm の吸光値に影響を与える物質が含まれており、特に改変 GM quicker 法を用いた場合には、品種依存的にその物質の量の変動する可能性を示唆していると考えられる。

蛍光測定法により得られた DNA 濃度の一部が、定量 PCR 法に規定されている添加 DNA 濃度に満たない濃度であったため、改変 mini 法により抽出された DNA に限り、260 nm の吸光値から算出した DNA 濃度に基づき DNA 試料液を調製し、定量 PCR に供した。その結果、mini 法により抽出した DNA を鋳型 DNA とした場合にも、全ての試料から真値(粉体重量混合率)に比べ高めの定量値が得られた。また、定量値と真値との差異(bias)についても、改変 GM quicker 法を DNA 抽出法に用いた場合と同様の大きさであり、さらに non-GM 大豆の品種と bias の大きさについての相関性も概ね維持されていた(Fig. 4A および B) これらの結果から、少なくとも改変 GM quicker 法を mini 法と比較する限りは、定量 PCR 法により得られる定量値に影響を与える要因が DNA 抽出法に含まれているとは考えることができな

かった。ただし、改変 GM quicker 法と mini 法は、ともにシリカ膜への DNA の吸着を基本原理とする DNA 抽出法であるため、定量値に影響を与える要因がこの基本原理を共通項としている可能性は否定することができない。つまり、先述した PCR 増幅の効率に影響を与える物質の残存や、対象 DNA 配列の抽出効率の違い等が両 DNA 抽出法において共通して生じていた場合には、本研究において用いた両方法の比較により、DNA 抽出法による定量値への影響を評価することができない。よって、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)を使用する抽出法(CTAB 法)や、イオン交換タイプのカラムを使用する方法等、他の DNA 抽出法についても今後、検討する必要があると考えられる。

C.D.-5. 混合 DNA 試料を用いた検討

先述のとおり、改変 GM quicker 法と mini 法のそれぞれにより得られた定量値を比較した結果からは、定量値と真値(粉体重量混合率)との差異を生じる要因を明らかにすることができなかった。しかし、RRS 粉体試料および、non-GM 大豆粉体試料に含まれる DNA 量もしくは、それぞれから抽出される DNA 量が粉体重量混合率に一致していない可能性について、さらに検討が必要であると考えられた。そこで、各品種の non-GM 大豆試料および RRS 試料から個別に DNA を抽出し、DNA 重量として混合率を規定した混合 DNA 試料(1%ならびに 5%混合 DNA 試料)を調製し、これらを対象として定量 PCR 法を実施した。

まず、粉体試料の調製に用いた non-GM 大豆各品種および、RRS の 100%粉体試料から改変 GM quicker 法を用いて DNA を抽出した(n=10)。抽出された各種 DNA の吸光値を測定した結果、O.D.260/280 nm の比は全試料において 1.8 を上回り、また、O.D.260/230 nm の比は、ミヤギシロメ、あやこがねおよび、リュウホウ(1.8~1.9)を除き、2.0 を上回った。さらに、260 nm の吸光値に基づき DNA 濃度を算出した結果、併行抽出した 10 点間での濃度のばらつき

(R.S.D.)が20%を上回る試料が多数の品種において認められ、また、品種間でのばらつきは40.0%を超えていた。これに対し、蛍光測定法により求められたDNA濃度については、全ての品種において併行抽出した10点間でのばらつきは20%を下回り、品種間でのばらつきも30.8%まで減少した(Table 5-1 および2)。これらの結果からも、吸光値に基づきDNA濃度を算出した場合には、O.D.260 nmに吸光を有するDNA以外の物質が、算出されるDNA濃度およびそのばらつきに影響を与えること、さらには、その影響の大きさには品種依存性が認められることが確認された。また、蛍光測定法を用いてDNAを特異的に測定した場合にも、併行抽出された10点間に比べ、品種間におけるDNA濃度のばらつきが大きいという結果は、各品種から得られるDNAの収量が異なることを強く示唆しているものと考えられた。

次いで10品種のnon-GM大豆から抽出したDNAをマトリクスとし、これらにRRSから抽出したDNAを、DNA重量比として0%、1.0%、あるいは5.0%含むように調製した試料(混合DNA試料)を対象とした定量PCR法を実施し、定量値を得た。その結果、0% DNA試料の全てにおいてRRSは検知されなかった(結果は示していない。)1.0% DNA試料から得られた定量値の最大は、 $1.13 \pm 0.04\%$ (あやこがね試料)、最小は $0.91 \pm 0.04\%$ (SO880 試料)、また、5.0% DNA試料から得られた定量値の最大は、 $5.38 \pm 0.36\%$ (IA3006 試料)、最小は $4.45 \pm 0.17\%$ (PS-36 試料)であった(Fig. 5A およびB)。さらに、DNA重量混合率を真値とし、定量PCR法により得られた定量値との差異(bias)を算出した結果、全ての試料を通じての最大値が-12.9% (5%PS-36 試料)であり、またその大きさと方向(正あるいは負のバイアスを生じるか)には明確な品種依存性は認められなかった(Fig. 6)。以上の結果より、各大豆試料よりDNAを個別に抽出した後、DNA重量比としてRRSを混合した場合には、混合率に合致した定量値が得られ、またそのばらつきの大きさは定量PCR

に原理的に含まれるばらつきの範囲内であると考えられた。

C.D.-6. 定量値のDNA収量による補正

これまでに示したとおり、DNA混合試料を対象に得られた定量値とDNA重量混合率との一致の程度が良好であったため、個別に抽出・精製されたDNA溶液中には、定量PCRを介して定量値に影響を与える因子は含まれていないと考えられた。一方で、各品種から抽出されるDNAの収量が品種依存的に変動していたことを示す結果(Table 2.4 および5)からは、定量PCRに供されるDNA試料液中でのnon-GM大豆由来のDNAとRRS由来のDNAの量比が粉体混合率との間に差異を生じ、その結果、粉体混合率と定量値との間にbiasが生じたのではないかと考えられた。そこで、蛍光測定法により測定したDNA濃度(Table 5-2)に基づき、DNA収量による定量値の補正を試みた。補正には(1)~(3)の仮定に基づき誘導される、以下の式を用いた。

$$M = 1/((1/m-1) \times (Y/X) + 1)$$

$$(1) \quad m = R/L \times 1/n$$

$$(2) \quad maX + mbY = bY$$

$$(3) \quad a = ((1-m)/m) \times (Y/X) \times b$$

a; non-GM大豆粉体重量、b; RRS粉体重量、X; non-GM大豆粉体からのDNA量、Y; RRS粉体からのDNA量、L; 内在性遺伝子のコピー数、R; 組換えDNA配列のコピー数、n; 内標比、 $b/(a+b)=M$; 真の混合率、m; 定量値。

その結果、約半数の試料に関しては、補正後の定量値(補正定量値)と真値(重量混合率)とのbiasは、30.0%まで減少した(Table 6)。特に、SO880試料に関しては、補正定量値と真値とにほぼ差が認められない結果となった。しかし一方では、減少は認められるものの依然として補正定量値と真値とのbiasが30.0%以上となる試料も認められた。また、スズユタカおよび、タンレイをマトリクスとした5%混合粉体試料については、補正により若干、biasが大きくなった。これらの結果から、品種依存的なDNA収

量の差以外にも定量値に影響を与える要因が存在することが示唆された。

E. 結論

遺伝子組換え大豆(RRS)を対象とした定量PCR法により得られる定量値に、RRSが混入する際のマトリクスとなる non-GM 大豆の品種が及ぼす影響について明らかにする事を目的に、検討を行った。その結果、検討に使用した10種の non-GM 大豆品種の全てにおいて、大きさは異なるものの、得られる定量値が RRS の粉体重量混合率と比べ、高い値となることが明らかになった。また、本研究において使用した DNA 抽出法による影響を完全に否定することはできないが、各大豆品種から抽出される DNA の収量に明らかな差異が認められた。さらに、DNA 重量の比として RRS 混合率を規定し調製した試料(DNA 混合試料)を測定し得られた定量値は、規定した混合率に一致した。

これらの結果から、定量 PCR 法により得られる定量値が、粉体重量混合率と比べ高めの値となったことの要因の一つとして、粉体重量と、定量 PCR 法の直接の分析対象物質である DNA 重量との間で混合率が保持されていない可能性が考えられた。しかし一方で、DNA の収量を考慮してもなお、定量値と粉体重量混合率との間に大きな差が認められる試料(品種)の存在も明らかとなった。

今後、本研究において示唆された可能性についてより明らかにするためには、試料とする大豆品種を増やすとともに、基本原理を異にする DNA 抽出法を複数用いるなどして、さらに検討することが必要である。しかし、根本的な問題として、大豆に含まれる DNA の量が品種依存的に変動している場合には、DNA 収量が既知の標準試料を未知試料に混合し分析するなどし、未知試料においてマトリクスとなる大豆の DNA 収量が定量値に与える影響を評価した上で判断することが必要だと考えられた。またさらには、本研究において明らかにしたような影響を受けることのない分析法として、穀粒を一粒ずつ試験し、規定粒数あたりの RRS

粒数をもって定量を行う方法などの適用についても考慮すべきと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

渡邊敬浩, 笠間菊子, 菊地博之, 鈴木達也, 時下祥子, 坂田こずえ, 松木容彦, 日野明寛, 穠山浩, 米谷民雄: 遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験. 食品衛生学雑誌, 47(1) 15-27 (2006)

渡邊敬浩, 時下祥子, 笠間菊子, 鈴木達也, 大島赴夫, 菊地博之, 日野明寛, 穠山浩, 米谷民雄: 遺伝子組換えトウモロコシ(GA21 ならびに MON810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験. 食品化学学会誌, 13(1) 18-28 (2006)

渡邊敬浩, 時下祥子, 菊地博之, 坂田こずえ, 日野明寛, 穠山浩, 米谷民雄: 定量 PCR 法による遺伝子組換えトウモロコシの定量分析に適用される 4 種の DNA 抽出法の比較検討. 食品化学学会誌, 13(2) 63-71 (2006)

2. 学会発表

井上雪乃, 笠間菊子, 大島赴夫, 渡邊敬浩, 穠山浩, 米谷民雄: 遺伝子組換え食品定量検査における調製試料混合率と定量値の差について. 日本食品衛生学会第 92 回学術講演会 (2006 年 10 月 26~27 日; 愛知県)

渡邊敬浩, 時下祥子, 菊地博之, 大島赴夫, 笠間菊子, 鈴木達也, 井上雪乃, 日野明寛, 穠山浩, 米谷民雄: 遺伝子組換えトウモロコシ(Bt11, GA21, および Mon810 系統) 定量検査法の外部精度管理について. 第 43 回全国衛生化学技術協議会年会 (2006 年 11 月 1~2 日; 鳥取県)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

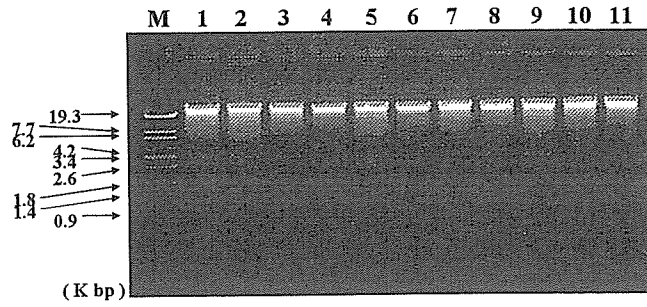


Fig. 1 各品種の大豆粉体試料から抽出したDNAの電気泳動

M: λ -EcoT14I digest 1:AG270 2:PS-36 3:Vinton81 4:IA3006
 5:SO880 6:タンレイ 7:リュウホウ 8:スズユタカ 9:あやこがね
 10:ミヤギシロメ 11:RRS

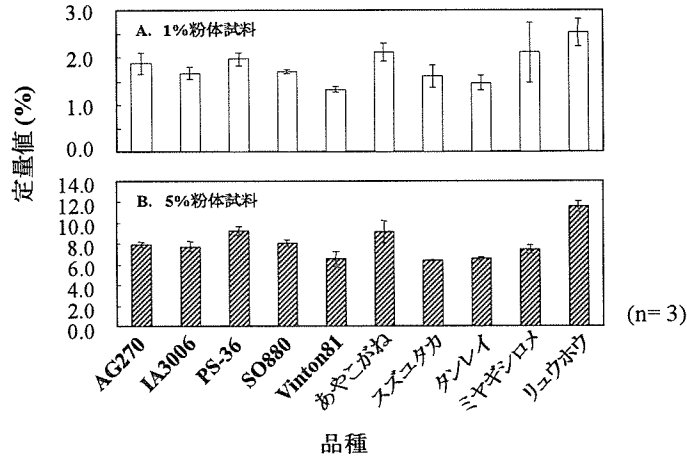


Fig. 2 1%及び5%粉体試料の定量 (改変GM quicker法)

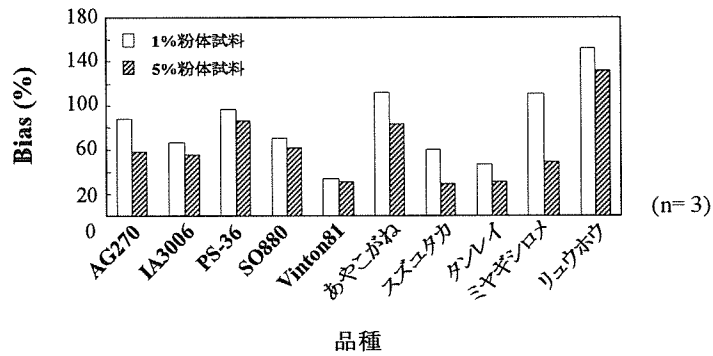


Fig. 3 粉体試料の定量 (改変 GM quicker法 ; バイアス)

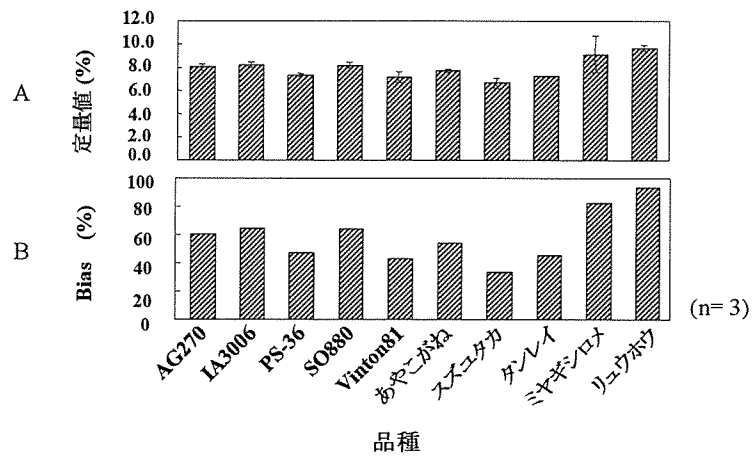


Fig. 4 5%粉体試料の定量 (mini 法)

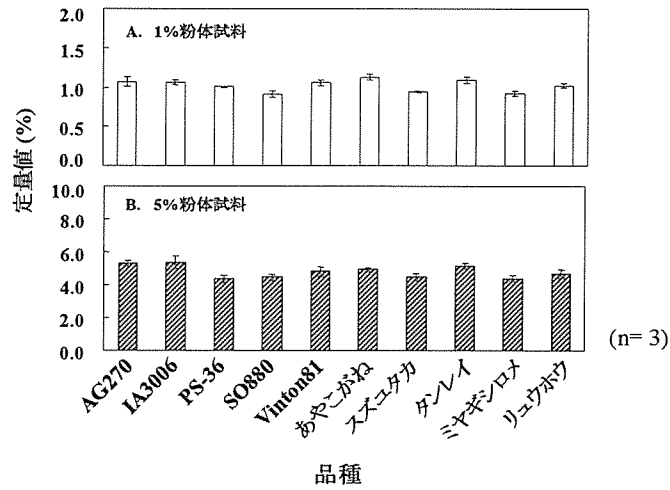


Fig. 5 1%及び5%DNA試料の定量 (GM quicker 法)

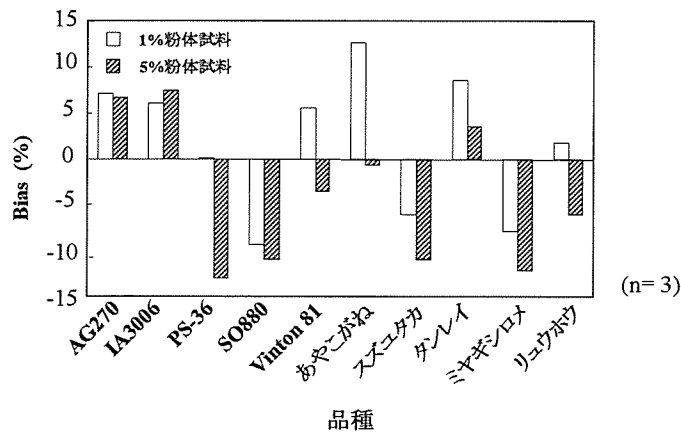


Fig. 6 DNA試料の定量 (GM quicker 法; バイアス)

Table 1 GM大豆 (RRS) の内標比の算出

試験	内在性遺伝子コピー数	組換えDNA配列コピー数	内標比
1回目	81190.6	79579.1	0.98
2回目	77677.2	75601.4	0.97
3回目	78735.5	75248.6	0.96
Average	79201	76810	0.97
S.D.	1802	2405	0.01
R.S.D.(%)	2	3	1

100%RRS粉体試料より改変GM quicker法を用いてDNAを抽出し (n=6)、定量PCRを3回繰り返し行い、得られた測定結果の平均値として内標比を算出した。
R.S.D. (Relative Standard Deviation) : 相対標準偏差

Table 2-1 混合粉体試料から抽出されたDNAの測定 1 (吸光度測定法)

大豆品種	DNA濃度 (ng/μL)	R.S.D. (%)	Ratio			
			260 / 280 nm	R.S.D. (%)	260 / 230 nm	R.S.D. (%)
AG270	43.3 ± 2.1	4.8	1.9 ± 0.1	3.6	3.1 ± 0.2	4.8
IA3006	56.0 ± 3.8	6.8	1.7 ± 0.0	1.9	1.4 ± 0.0	1.9
PS-36	54.4 ± 8.6	16.0	1.9 ± 0.0	0.8	3.0 ± 0.2	8.0
SO880	99.4 ± 9.8	9.9	1.9 ± 0.0	0.8	2.1 ± 0.2	7.0
Vinton81	43.5 ± 2.6	6.1	1.9 ± 0.0	0.0	3.0 ± 0.3	9.0
あやこがね	144.1 ± 26.0	19.0	1.9 ± 0.0	0.6	1.7 ± 0.0	0.3
スズユタカ	52.2 ± 3.1	6.0	1.9 ± 0.0	2.3	3.2 ± 0.2	7.2
タンレイ	48.5 ± 4.5	9.3	1.7 ± 0.1	3.0	1.3 ± 0.1	3.7
ミヤギシロメ	56.5 ± 8.9	16.0	2.0 ± 0.0	1.5	2.6 ± 0.2	8.9
リュウホウ	52.6 ± 23.0	44.0	1.9 ± 0.0	1.6	3.1 ± 0.8	27.0
AG270	54.6 ± 8.7	16.0	1.9 ± 0.0	0.3	3.2 ± 0.3	8.7
IA3006	53.0 ± 4.7	8.9	1.8 ± 0.1	4.8	1.8 ± 0.9	47.0
PS-36	49.2 ± 9.7	20.0	1.9 ± 0.0	1.7	2.9 ± 0.4	14.0
SO880	101.9 ± 66.4	65.0	1.9 ± 0.0	0.3	2.4 ± 0.4	16.0
Vinton81	41.9 ± 2.4	5.6	1.9 ± 0.0	2.2	3.2 ± 0.2	5.0
あやこがね	85.0 ± 21.0	25.0	1.9 ± 0.1	2.8	2.2 ± 0.3	11.0
スズユタカ	59.5 ± 6.3	11.0	1.9 ± 0.0	1.1	2.9 ± 0.1	3.8
タンレイ	50.7 ± 6.2	12.0	1.8 ± 0.1	6.8	1.9 ± 1.1	58.0
ミヤギシロメ	78.5 ± 15.5	20.0	1.9 ± 0.0	0.5	2.2 ± 0.3	13.0
リュウホウ	46.9 ± 3.1	6.5	1.9 ± 0.0	1.8	3.3 ± 0.1	1.5

Data represent means ± S.D. (n=3)

R.S.D. (Relative Standard Deviation); 相対標準偏差

RRSを1%または5% (w/w) の割合で含む10品種のnon-GM大豆をマトリクスとした混合粉体試料から、改変GM quicker法を用いてDNAを抽出し、抽出し、得られたDNA試料原液の吸光度を200 ~ 320 nmの波長域で測定した。

Table 2-2 混合粉体試料から抽出されたDNAの測定2 (蛍光測定法)

大豆品種	1%		5%	
	DNA濃度 (ng/μL)	R.S.D. (%)	DNA濃度 (ng/μL)	R.S.D. (%)
AG270	39.6 ± 0.3	0.8	49.5 ± 9.5	19.0
IA3006	36.6 ± 7.0	3.8	38.6 ± 5.2	2.7
PS-36	47.9 ± 6.1	13.0	35.9 ± 2.7	7.4
SO880	61.8 ± 13.0	21.0	51.2 ± 8.3	16.0
Vinton81	37.1 ± 2.8	7.4	35.7 ± 3.3	9.3
あやこがね	42.1 ± 7.3	17.0	46.0 ± 1.3	2.8
スズユタカ	46.0 ± 3.2	7.0	53.2 ± 8.0	15.0
タンレイ	31.1 ± 4.8	3.1	36.3 ± 9.3	5.1
ミヤギシロメ	37.5 ± 13.0	35.0	45.4 ± 2.7	5.9
リュウホウ	37.0 ± 9.6	26.0	35.3 ± 3.2	9.0

Data represent means ± S.D. (n=3)

R.S.D. (Relative Standard Deviation) : 相対標準偏差

RRSを1%または5% (w/w) の割合で含む10品種のnon-GM大豆をマトリクスとした混合粉体試料から、GM quicker法を用いてDNAを抽出し、得られたDNA試料原液を蛍光測定法で測定した。

Table 3 non-GM大豆及びRRS粉体試料の水分含量 (%)

大豆品種	測定1	測定2	Average
AG270	2.61	2.62	2.61
IA3006	1.78	1.71	1.75
PS-36	2.09	2.06	2.07
SO880	2.15	2.15	2.15
Vinton81	2.54	2.62	2.58
あやこがね	1.97	2.10	2.03
スズユタカ	2.19	2.27	2.23
タンレイ	3.15	3.01	3.08
ミヤギシロメ	1.78	1.83	1.81
リュウホウ	2.24	2.27	2.25
RRS	4.98	4.91	4.95

各大豆粉体試料の水分含量をカールフィッシャー電量滴定法により測定した。

Table 4 5.0%粉体試料から抽出されたDNAの測定 (mini法)

大豆品種	DNA濃度 (ng/μL)	R.S.D. (%)	吸光度測定法				蛍光測定法	
			Ratio		DNA濃度 (ng/μL)	R.S.D. (%)		
			260/280 nm	R.S.D. (%)			260/230 nm	R.S.D. (%)
AG270	109.8 ± 3.7	3.4	1.9 ± 0.03	1.5	1.9 ± 0.07	3.4	22.0 ± 1.1	5.1
IA3006	120 ± 4.6	3.8	1.9 ± 0.01	0.3	2.1 ± 0.04	1.7	20.8 ± 0.7	3.5
PS-36	108 ± 5.9	5.0	1.9 ± 0.02	1.1	2.1 ± 0.07	3.6	19.2 ± 1.2	6.2
SO880	97.5 ± 1.9	1.9	1.9 ± 0.02	0.8	2.1 ± 0.05	2.2	16.7 ± 1.0	5.8
Vinton81	115.2 ± 4.6	4.0	1.9 ± 0.02	1.1	2.1 ± 0.05	2.2	18.8 ± 0.6	3.3
あやこがね	80.2 ± 4.2	5.2	1.9 ± 0.01	0.6	1.8 ± 0.03	1.4	11.9 ± 0.3	2.3
スズユタカ	99.3 ± 1.0	1.0	1.9 ± 0.02	0.8	1.9 ± 0.06	3.0	25.8 ± 0.5	1.8
タンレイ	94.9 ± 8.3	8.8	1.9 ± 0.01	0.6	1.8 ± 0.02	0.8	19.2 ± 3.5	18.4
ミヤギシロメ	100.1 ± 3.5	3.5	1.9 ± 0.01	0.5	1.9 ± 0.05	2.5	19.6 ± 1.5	7.4
リュウホウ	90.3 ± 1.5	1.7	1.9 ± 0.01	0.5	1.8 ± 0.04	2.1	20.4 ± 1.6	7.8

Data represent means ± S.D. (n=3)

R.S.D. (Relative Standard Deviation): 相対標準偏差

RRSを5%(w/w)の割合で含む10品種のnon-GM大豆をマトリクスとした混合粉体試料から、mini法を用いてDNAを抽出し、得られたDNA試料原液を吸光度測定法及び蛍光測定法で測定した。

Table 5-1 non-GM大豆及びRRS粉体試料から抽出されたDNAの測定1 (吸光度測定法)

大豆品種	DNA濃度 (ng/μL) ¹	DNA濃度 (ng/μL) ²	R.S.D. (%)	吸光度			
				Ratio		260/230 nm	R.S.D. (%)
				260/280 nm	R.S.D. (%)		
AG270	42.6	39.77 ± 5.04	12.7	1.8 ± 0.06	3.0	2.0 ± 0.16	7.6
IA3006	29.3	29.90 ± 2.96	9.9	1.9 ± 0.04	2.5	2.4 ± 0.13	6.4
PS-36	41.5	38.44 ± 5.22	13.0	1.8 ± 0.03	2.7	2.4 ± 0.22	10.6
SO880	39.3	38.56 ± 7.61	19.7	1.9 ± 0.06	3.5	2.3 ± 0.30	14.4
Vinton 81	45.0	41.19 ± 19.79	48.1	1.8 ± 0.05	1.5	2.4 ± 0.23	8.3
あやこがね	91.1	88.87 ± 18.90	21.3	1.8 ± 0.2	0.9	1.9 ± 0.16	8.7
スズユタカ	29.7	28.52 ± 8.80	30.9	1.8 ± 0.12	6.1	3.3 ± 0.28	12.2
タンレイ	29.8	30.41 ± 9.28	30.5	1.9 ± 0.07	4.0	2.6 ± 0.23	9.9
ミヤギシロメ	75.2	72.17 ± 16.10	22.3	1.9 ± 0.03	1.5	1.9 ± 0.18	9.3
リュウホウ	73.1	69.93 ± 25.17	36.0	1.9 ± 0.03	0.0	1.8 ± 0.30	0.2
RRS	66.9	66.97 ± 20.34	30.4	1.9 ± 0.02	0.9	2.2 ± 0.23	10.6

各品種とも100%の大豆粉体試料からDNAを抽出し、吸光度測定法により測定した。

*1 併行抽出した試料(n=10)から得られたDNA試料原液の混合液のDNA濃度

*2 DNA試料原液(n=10)から得られたDNA濃度の平均値及びS.D.

Table 5-2 non-GM大豆及びRRS粉体試料から抽出されたDNAの測定2 (蛍光測定法)

大豆品種	蛍光強度		
	DNA濃度 (ng/μL)* ¹	DNA濃度 (ng/μL)* ²	R.S.D. (%)
AG270	34.07	42.95 ± 4.02	9.4
IA3006	22.90	20.09 ± 2.06	10.3
PS-36	35.14	37.12 ± 4.47	12.0
SO880	30.17	26.88 ± 2.42	9.0
Vinton 81	27.37	25.63 ± 3.54	13.8
あやこがね	48.03	47.58 ± 2.53	5.3
スズユタカ	24.20	26.19 ± 5.10	19.5
タンレイ	24.58	21.40 ± 3.05	14.2
ミヤギシロメ	51.29	53.97 ± 3.89	7.2
リュウホウ	39.35	37.50 ± 5.44	14.5
RRS	51.60	46.74 ± 5.10	10.9

各品種とも100%の大豆粉体試料からDNAを抽出し、蛍光測定法により測定した。

*1 併行抽出した試料(n=10)から得られたDNA試料原液の混合液のDNA濃度

*2 DNA試料原液(n=10)から得られたDNA濃度の平均値及びS.D.

Table 6 定量PCR法により得られた定量値のDNA収量に基づく補正

大豆品種	補正前		補正後		
	定量値 (%)	Bias	定量値 (%)	Bias	
1%	AG270	1.9 ± 0.2	88.0	1.3 ± 0.2	25.1
	IA3006	1.7 ± 0.1	66.7	0.7 ± 0.1	-25.2
	PS36	2.0 ± 0.1	97.2	1.4 ± 0.1	35.3
	SO880	1.7 ± 0.0	70.6	1.0 ± 0.0	0.5
	Vinton81	1.3 ± 0.1	33.5	0.7 ± 0.0	-28.7
	あやこがね	2.1 ± 0.2	111.7	2.0 ± 0.2	97.3
	スズユタカ	1.6 ± 0.2	60.6	0.8 ± 0.1	-24.0
	タンレイ	1.5 ± 0.2	46.5	0.7 ± 0.1	-29.6
	ミヤギシロメ	2.1 ± 0.6	111.1	2.1 ± 0.6	110.1
	リュウホウ	2.5 ± 0.3	152.8	1.9 ± 0.2	94.1
5%	AG270	7.9 ± 0.3	58.5	5.4 ± 0.2	7.7
	IA3006	7.8 ± 0.5	55.3	3.6 ± 0.2	-27.9
	PS36	9.3 ± 0.4	85.8	6.5 ± 0.3	30.6
	SO880	8.1 ± 0.3	61.7	4.9 ± 0.2	-2.0
	Vinton81	6.6 ± 0.8	30.9	3.6 ± 0.4	-28.3
	あやこがね	9.2 ± 1.0	83.5	8.6 ± 1.0	71.9
	スズユタカ	6.4 ± 0.1	28.3	3.1 ± 0.1	-37.6
	タンレイ	6.5 ± 0.1	30.6	3.2 ± 0.1	-35.5
	ミヤギシロメ	7.4 ± 0.4	48.3	7.4 ± 0.4	47.6
	リュウホウ	11.6 ± 0.5	131.9	9.1 ± 0.4	82.1

Data represent means ± S.D.

R.S.D. (Relative Standard Deviation) : 相対標準偏差

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 18 年度

分担研究報告書

貝毒検査の外部精度管理用適正調査試料の作製と
信頼性確保に関する研究

分担研究者 町井 研士

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

貝毒検査の外部精度管理用適正調査試料の作製と信頼性確保に関する研究

主任研究者 遠藤 明 (財)食品薬品安全センター 理事長
分担研究者 町井 研士 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部第2室 室長
協力研究者 大島 赴夫 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 部長
川崎 勝 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

下痢性貝毒調査用試料として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸をホタテホモジネートに添付する方法を検討しているが、吸着オカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧された。また、外部精度管理調査を多数の検査施設に対して行う上での問題点の確認、ノウハウの蓄積が望まれている。そこで、昨年度までに、蛍光 HPLC 法によるオカダ酸の測定を用い、濾紙吸着オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温条件で調査し、冷蔵及び冷凍条件下では3週間程度なら比較的安定であることが明らかになり、外部精度管理用サンプルとして使用の可能性が示唆されたが、オカダ酸の安定性が危惧された。そこで今年度はオカダ酸の保存条件の検討と加熱に対する耐性を調査して、オカダ酸の安定保存の基礎データを取得した。

遮光バイヤルにアセトン溶液で密栓又は吸着したオカダ酸は冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも6ヶ月間安定であることが明らかとなり、一方、オカダ酸は加熱処理により回収率の低下を招くが、通常的外部精度管理における輸送、分析操作で負荷されると予想される程度の熱に対しては安定である事が明らかとなった。以上の結果よりオカダ酸が遮光バイヤル中で比較的安定保存できる事が判明したので、今後のリファレンスマテリアル作製に大きく寄与すると考えられる。しかし、前回濾紙に吸着したオカダ酸の回収率の経時的低下傾向が観察されたので、今後はオカダ酸の熱分解以外の要因(濾紙への吸着等)も考慮に入れて精度管理用リファレンスマテリアルの作製を検討しなければならないことが明らかとなった。また、今回加熱時間と温度の相関に関する基礎的知見が得られたので、今後オカダ酸の熱分解の予測の可能性が示唆された。

生鮮海産物ホモジネートを多数の検査機関に配布した時の問題点の基礎的検討をするために実際に配布される予想量の 1/3 程度(15 サンプル)を作製し信頼のおける2機関と当研究所の合計3機関で各 n=5 ずつ貝毒検査を行い問題点の確認を行った。

今後は毒性の評価をより正確に行うために、LC-MS 等による活性成分の多成分同時分析法を導入することも不可欠である。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査は現在、理化学的検査調査として、食品添加物、重金属、残留農薬、残留動物用医薬品が行われ、細菌学的検査調査として一般細菌数、細菌同定について行われている。

一方、貝毒検査については大規模な外部精度管理調査が実施されていない。貝毒検査については、食品マトリックスが生鮮海産物のため、大量入手、保管等に特別な注意が必要で、さらに、指標とするアッセイが動物実験を用いているために煩雑な予備検討が予想された。国内では麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査については国立医薬品食品衛生研究所で対Eu輸出ホタテ検査機関に対して小規模に実施している。そこで特に作業が複雑で組織的に実施する上で問題点が多いと考えられた下痢性貝毒試料の作製から始める事とした。

下痢性貝毒の主要原因物質としてオカダ酸が挙げられる。外部精度管理用の下痢性貝毒検査試料(リファレンスマテリアル)作製において、リファレンスマテリアルを安定して供給するためには、現状では生鮮サンプルと混和せず市販のオカダ酸を毒性が現れると予想される濃度で別に添付する方法が最適であると考えている。しかし、その際に生じる問題点として、オカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧される。そこでオカダ酸の外部精度管理調査実施時に安定して供給するための基礎的データを得るために、オカダ酸の安定性(回収率)を様々な保存条件下、経時的に追跡調査を実施し、更にオカダ酸の熱に対する耐性を検討するために加熱試験を行った。

B. 研究方法

1)下痢性貝毒検査調査

下痢性貝毒については公定法の安元バイオアッセイ法を用いて予め陰性を確認した試料に、24時間以内での致死量の和光純薬製オカダ酸標準品をバイアル底に付着又は、濾紙ディスクに吸着後バイアルに密封した。それを予め凍結してある陰性試料中に挿入し冷凍保存した。陽性サンプルと陰性サンプルの相違はバイアルに付着したオカダ酸の有無ないし濾紙ディスクに吸着したオカダ酸の有無によるものである。濾紙ディスク法では、バイアルより濾紙ディスクを取り出して試料に加える操作が必要になる。作製した中の一定数の陽性サンプルと陰性サンプルをマウスアッセイにより定性後各検査施設に冷凍輸送した。

2)濾紙吸着オカダ酸の蛍光HPLCによるオカダ酸の測定

2-a)試薬

蛍光化試薬:フナコン製9-anthryl-diazomethane (ADAM)試薬を用いた。反応用に0.1% ADAM MeOH溶液を調製した。

溶剤:アセトンは和光純薬製の試薬特級品を用いた。MeOH、MeCN、は和光純薬製HPLCグレードを用いた。CHCl₃ 5000は和光純薬製を用いた。

オカダ酸標準品:Okadaic acid は和光純薬製生化学用を用いた。

内部標準物質:docosanoic acid (C10:0) はGLサイエンス社製を用い10 μg/mLの濃度になるようにCHCl₃に溶解した。

2-b)オカダ酸吸着濾紙ディスクの作製

オカダ酸標準品をアセトンに溶解し、φ13 mm の whatman AA disc 又は東洋濾紙製抗生物質検定用ペーパーディスク厚手8