

その栽培面積を急速に増加させている<sup>1)</sup>。このような世界的動向を背景に、食品の相当部分を輸入に依存している我が国においては、GM食品が今後ますます不可逆的に、国民の食生活に浸透していくものと考えられる。しかし一方では、新たな技術を用いて開発されこれまでの食経験もないことから、特にその安全性に対する国民の関心が高く、また科学的にも検証すべき課題が山積している<sup>2)</sup>。そのため厚生労働省では、平成12年には厚生省告示232号<sup>3)</sup>、233号<sup>4)</sup>により食品衛生法に基づくGM食品の安全性審査を義務づけ、平成13年3月からは、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<sup>5)</sup>)により、GM食品の表示を義務化した。また表示の義務化に関連し、厚生労働省では、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成13年3月27日、食発第110号<sup>6)</sup>)を医薬局食品保健部長通知し、GM食品の公的検査方法を各国に先駆けて定めた。当該検査方法はその後の安全性審査の進捗状況および検知技術の改良に合わせて改訂作業が進められ、平成17年9月現在では、医薬食品局食品安全部長通知された改訂版(平成17年5月17日、食安発第0517001号<sup>7)</sup>)が最新である。

「食の安全」が大きな関心事となった昨今においては、分析値に高い信頼性が求められている。またこれに関連し食品衛生法施行規則<sup>8)</sup>には、食品分析に従事する各検査機関に対し、検査精度を適正に保つことが定められている。このため、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試験は、各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、向上に非常に有用であると考えられる。GM食品に関しても、CSL(Central Science Laboratory: Executive agency of the UK government department for environment food and rural affairs)やUSDA/GIPSA(United States Department of Agriculture/Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration)といった海外機関により組織された外部精度管理試験が実施されているが、結果のみが得られる内容となっており、仮にばらつきが認められた場合、原因を究明し除去するためには多大な労力を要する。さらに、GM食品検査方法の多くに採用されているpolymerase chain reaction(PCR)を応用した各種分析法については、応用事例の蓄積が十分であるとは言えず、結果にばらつきを生じる原因についても、依然として不明な点が多く残されている。

著者らは平成13年度以降、種々のGM食品分析法を対象とした外部精度管理試験を実施するために、配布試料の調製法、また、管理試験において重要な項目についての検討を行ってきた<sup>9)~12)</sup>。さらには、試験的に実施した共同試験により得られた調査項目の集計および分析値の詳細な解析を通じて、結果にばらつきを生じる種々の要因について明らかにしてきた。本研究では、新たな精度管理項目とし

て、安全性審査を終了したGMトウモロコシ(Mon810系統)を対象とした定量PCR法を初めて設定し検討を行った。すなわち、配布試料の調製方法ならびに均一性や安定性といった配布試料に求められる妥当性について検討するとともに、27機関による共同試験を試験的に実施し、ばらつきの程度を把握したうえで、その要因について詳細な解析を行った。また共同試験に先立ち、操作の簡便化と結果の安定性向上を目的に食安発第1113001号<sup>13)</sup>2.2.1.2.項に記載のシリカゲル膜タイプキット法に改良を加えたため、その結果についても併せて報告する。なお、共同試験に参加した機関が、シリカゲル膜タイプキット法をDNA抽出法として採用する際には改良後の方法に従うことと規定した。

## 実験方法

### 1. 試料

GMトウモロコシ・Mon810試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じ、米国モンサント社より入手した。また、非混入試料および疑似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え(Non-GM)トウモロコシ試料(アメリカ産トウモロコシ)は、米国の商會社を通じて入手した。入手したすべてのトウモロコシ試料を500 $\mu$ mのスクリーンを取り付けた高速遠心式粉碎机を用いて粉碎した。Non-GMトウモロコシ試料については粉碎後、GMトウモロコシの混入がないことを確認するため定量PCR法を用いた分析を行ったが、0.35%程度のGMトウモロコシの混入が認められたため、低濃度試料(M810L)として扱うことにした。また、M810Lをマトリクスとし、これにMon810試料を重量換算で5.0%となるよう混入させた試料を高濃度試料(M810H)とした。M810Hの混合は、栗原らの報告<sup>14)</sup>に一部変更を加えて以下のように行った。まず、均一に粉碎した試料を凍結乾燥処理した。その後、上記重量比となるようM810LとMon810試料粉碎物を正確にひょう量し全量を1kgとして、プラスチック製の袋に量り採った。袋中で十分な混合を行った後に小分けにし、ふるいにかけて、再びすべての試料を集めた後に袋中で混合を繰り返した。混合操作後の試料を粉碎机により粉碎した後、再度上記の混合操作を行った試料をM810Hとした。試料調製後、M810Lを7g、M810Hを20gとなるよう、それぞれ25mL容遠沈管、50mL容遠沈管50本にひょう量分注し小分け試料とし、試験に供するまでの期間は-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 2. 試薬

均一性試験、DNA抽出法の検討など著者らが実施した試験には以下の試薬を使用した。DNAの抽出精製にはQIAGEN社製DNeasy Plant Mini Kit(シリカゲル膜タイプキット)を用いた。PCRにはTaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ:ABI社製)、トウモロコシ内在性DNA SSIibオリゴヌクレオチドセット、組換えDNA P35S-1オリゴヌクレオチド

セット, GM トウモロコシ系統別 DNA M810-2 オリゴヌクレオチドセット, GM トウモロコシ系統別 DNA GA21-3 オリゴヌクレオチドセット, GM トウモロコシプラスミドセット-CoIE1/TE (オリゴヌクレオチドおよびプラスミドはすべて(株)ニッポンジーン社製)を用いた。水は(株)ニッポンジーン社製遺伝子工学用を用いた。他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

### 3. 機器

均一性試験, DNA 抽出法の検討など著者らが実施した試験に使用した機器は以下のとおり。高速遠心式粉碎・混合機: ZM 100 (Retch 社製), 恒温槽: ドライサーモユニット DTU-1B (タイテック社製), 冷却遠心機: Avanti HP25 (Beckman 社製), 卓上遠心機: KR-1000 (フナコシ社製), タッチミキサー: MT-51 (ヤマト社製), 分光光度計: ND-1000 (NanoDrop Technologies 社製), 定量 PCR 機器: 安定性試験には ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 (ABI 社製), その他の試験には ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 (ABI 社製)。

### 4. DNA 抽出法

#### (1) 均一性試験および安定性試験

均一性試験および安定性試験においては, 実施時に最新であった食安発第 1113001 号 2.2.1.2. 項に記載のシリカゲル膜タイプキット法 (通知 mini 法) を用いて DNA を抽出した。

#### (2) 通知 mini 法の改良

通知 mini 法に操作の簡便化と結果の安定性向上を目的に改良を加え, 「改良 mini 法」とした。通知 mini 法においては, DNA をカラムから溶出する際には蒸留水 (Distilled water: DW) を用い, その後, イソプロパノール沈殿操作によって DNA を濃縮し, さらに TE 緩衝液に再溶解する。一方, 改良 mini 法においては, カラムからの DNA 溶出に TE 緩衝液を用いるため, イソプロパノール沈殿操作以降の操作を必要としない。改良 mini 法の改良点に該当する操作の内容は以下のとおりである。「Mini spin column をキットの遠沈管に移し, あらかじめ 65°C に温めておいた TE 緩衝液 70  $\mu$ L を加え 5 分間静置した後, 10,000 $\times g$  以上の条件で 1 分間遠心し DNA を溶出した。再度 TE 緩衝液添加以後の操作を繰り返し行い, 得られた溶出液を合わせ, DNA 試料原液とした。」

#### (3) 共同試験

共同試験においては, 食安発第 1113001 号に記載された 3 種の DNA 抽出法 (シリカベースレジソタイプキット法, CTAB 法, シリカゲル膜タイプキット法) を採用可能であったが, 共同試験にあたり送付したマニュアルには, シリカゲル膜タイプキット法としては改良 mini 法のみを記載し, 同法を採用する場合には改良 mini 法に従うものと規定した。

### 5. 定量 PCR 法

食安発第 1113001 号に記載の条件を遵守した。なお, 本稿において Mon810 系統特異的定量法 (Mon810 定量

法), GA21 系統特異的定量法 (GA21 定量法) および CaM 定量法とは, GM トウモロコシに含まれる各 DNA 配列を特異的に測定するための M810-2 オリゴヌクレオチドセット, GA21-3 オリゴヌクレオチドセット, P35S-1 オリゴヌクレオチドセットのそれぞれと, トウモロコシの内在性遺伝子 (Starch synthase IIb をコードする遺伝子: *SSIIB*) を測定するための SSIIB-3 オリゴヌクレオチドセット, および共通のキャリブレーションスタンダードとなる GM トウモロコシプラスミドセットを組み合わせ用いる定量 PCR 法を意味する。

### 6. 均一性試験

M810L および M810H のそれぞれに対し, 50 本の小分け試料の 12% に相当する 6 本の小分け試料を使用して, 均一性確認試験を実施した。各小分け試料から 2 g のトウモロコシ検体をひょう量分取し, 前述の「通知 mini 法」に従い DNA を抽出した。20 ng/ $\mu$ L の濃度に調製した抽出 DNA を定量 PCR 法における DNA 試料液とし, 分析を行った。CaM および Mon810 定量法の両法を用い, また, 2 回の繰返し測定を行うことで GM トウモロコシ (特定しない) 混入率 (CaM 混入率) ならびに Mon810 混入率を算出した。得られた混入率は一元配置の分散分析により解析した。なお, 共同試験の試験スキームにおいては GA21 定量法を用いた試験も行うこととしたが, これを用いて試験した結果, 検量線の最低濃度により理論的に規定される絶対的定量下限値 (absolute limit of quantification:  $^{abs}LOQ_{method}$ ) 以下のシグナルが検出されたのみであったため, 解析を行わなかった。なお, 検討に使用した ABI PRISM 7700 の場合,  $^{abs}LOQ_{method}$  は 20 コピーである。

### 7. 安定性試験

試料送付直前, M810L および M810H の各小分け試料 4 本から 2 g のトウモロコシ検体を秤量分取し, 前述の「通知 mini 法」に従い DNA を抽出した後, 定量 PCR 法による分析を行い, CaM ならびに Mon810 混入率を算出した。また, 上記試験に用いた小分け試料 4 本を -20°C で共同試験期間として設定した約 1 か月間保存した後にも同様の方法にて試験を行い, 混入率を算出した。保存前後で得られた混入率について Student *t* 検定により解析した。

### 8. 参加機関における試験スキーム

共同試験における試験スキームは, 食安発第 1113001 号 3.2.1. 項に記載された「安全性審査済み GM トウモロコシを対象とした定量 PCR」をもとに作成した。以下, 試験スキームを示す。「スクリーニング試験として, M810L ならびに M810H から 3 点の検体をひょう量し, DNA を抽出する。抽出された 3 点の DNA 試料液に対し, CaM ならびに GA21 定量法を用いた試験を行い, それぞれ算出される混入率の合算値を求める。その結果, GM トウモロコシ (系統は区別せず) の混入率が 4.5% を超えた試料に関しては, 系統特異的定量試験として新たに

6点の検体からDNAを抽出し(スクリーニング試験と合わせて計9点の検体), Mon810ならびにGA21定量法を用いた試験を実施する。4.5%を超えた試料におけるGMトウモロコシ混入率は, Mon810ならびにGA21混入率の合算値とする。」また, 本試験スキームを試験マニュアル中に明記した。

### 9. 試験の実施

均一性の確認されたM810LならびにM810Hの小分け試料各1本をドライアイスとともに包装後, 参加各機関に送付し, 到着後は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存するよう指示した。検体送付時には, 諸注意事項を含む実施要領, 食安発第1113001号に準じ作成した試験マニュアル, 調査項目ならびに試験結果についての報告方法を規定した各種報告様式を同送した。

調査項目としては, GM食品検査全般についての経験年数, GM食品各検査の品目, 分析法別検査実績, 検査実施環境および実験機器, 器具共用の有無, 各種機器のメーカー, 採用したDNA抽出法, 使用試薬のロットを取り上げ, 検査全般にわたって詳細な調査が行えるよう配慮した。試験結果については, 抽出されたDNAの吸光度(230, 260, 280ならびに320 nm)と収量, 各種定量法を用いて作成される検量線の精度, 標的DNA配列の測定値(コピー数)およびそれらを元に算出されるGMトウモロコシ混入率を報告するものとした。これら試験方法の作成に当たってはThompsonらによる報告<sup>15)</sup>ならびにAssociation of Official Analytical Chemists (AOAC) Internationalのマニュアル<sup>16)</sup>を参考にした。共同試験の実施期間は平成15年2月1日から3月5日までとした。

### 10. 試験結果の回収ならびに解析

返送された試験結果のうち, CaMおよびMon810混入率について, 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, Zスコアの算出, Xbar-R管理図の作成を行った。なお, Zスコアの算出においては各機関の平均値(Xbar)の平均を使用し, またXbarの管理限界は総平均 $\pm 2$  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<sup>17)</sup>を参照した。また, 参加各機関はABI PRISM™ 5700, 7700, 7000, 7900HT96および384 well(いずれもABI社製), Roche LightCycler System

(LC; ロシュ社製)のいずれかの定量PCR機器を用いて測定を行ったが, 統計処理の結果から, 使用した機種依存的に混入率に差が生じた可能性が考えられた。他機種との差が大きな測定値を報告した機種がLCであったことから, これを使用した機関から報告された混入率を除外し, ABI社製定量PCR機器を使用した機関から報告された混入率のみについて, 別途同様の統計処理を行った。統計解析の結果, 管理限界を超える混入率が認められた場合には, その原因について考察した。その際には, 分析値に加え, 調査項目に対する返答を参考にした。

## 結 果

### 1. 均一性ならびに安定性試験

M810LおよびM810Hの均一性について検討するため, 各試料につき6本の小分け試料を対象に, CaMならびにMon810定量法の2定量法を用い, それぞれ2回の繰返し測定を行った。各小分け試料から得られた測定値に基づき算出された混入率の平均値(各試料におけるCaMならびにMon810混入率)は, 以下のとおりである。M810Lを対象とした場合, CaM混入率: 0.35%, Mon810混入率: 0.35%, Mon810Hを対象とした場合, CaM混入率: 5.68%, Mon810混入率: 5.45%(Table 1)。また, 各小分け試料から得られたCaMおよびM810混入率をロジット変換した後, それぞれを一元配置の分散分析により解析した結果, いずれの試料に関しても, 混入率のF比は有意水準( $p=0.05$ )を下回った(Table 2)。

共同試験期間として設定した1か月間, 規定した $-20^{\circ}\text{C}$ の条件で保存した場合の試料の安定性について検討した。上記条件下で保存する直前(共同試験開始直前)と, 約1か月間保存した後(試験終了直後)に, 各小分け試料4本を対象にCaMならびにMon810定量法を用いて分析を行った。保存の前後に得られた混入率について, Student *t*検定により解析した結果, 試料, 定量法の違いによらず有意水準( $p=0.05$ )での有意な差は認められなかった(Table 3)。

### 2. DNA抽出法の改良

共同試験に先立ち, 操作の簡便化と結果の安定性向上を目的に, 食安1113001号記載のシリカゲル膜タイプキット法(通知mini法)の改良法(改良mini法)について

Table 1. Results of Homogeneity Study

Method	Sample	Number of measurements	Run 1		Run 2		Total	
			Amount (%)	R.S.D. (%)	Amount (%)	R.S.D. (%)	Amount (%)	R.S.D. (%)
CaM	M810L	6	0.38 $\pm$ 0.05	13.2	0.33 $\pm$ 0.05	15.2	0.35 $\pm$ 0.06	17.1
	M810H	6	6.11 $\pm$ 0.49	8.0	5.26 $\pm$ 0.34	6.5	5.68 $\pm$ 0.60	12.0
Mon810	M810L	6	0.38 $\pm$ 0.04	10.5	0.32 $\pm$ 0.07	21.9	0.35 $\pm$ 0.05	14.3
	M810H	6	5.02 $\pm$ 0.47	9.4	5.37 $\pm$ 0.37	6.3	5.45 $\pm$ 0.60	11.0

Data represent means  $\pm$  S.D.

Table 2. Results of One-way Analysis of Variance on Homogeneity Study

Method	Sample	Source of variation	df	Sum of squares	Mean square	F	Critical value of F (p=0.05)
CaM	M810L	Between samples	5	0.032	0.0064	1.9637	4.3874
		Analytical	6	0.020	0.0033		
	M810H	Between samples	5	0.044	0.0088	3.6200	4.3874
		Analytical	6	0.015	0.0024		
Mon810	M810L	Between samples	5	0.038	0.0076	1.4462	4.3874
		Analytical	6	0.032	0.0053		
	M810H	Between samples	5	0.025	0.0051	1.7766	4.3874
		Analytical	6	0.017	0.0028		

Table 3. Results of Stability Study

Method	Number of measurements	Sample	Amount (%)		Recovery (%)
			Before	After	
CaM	4	M810L	0.42±0.02	0.43±0.05	102.38
	4	M810H	5.66±0.16	5.39±0.19	95.23
Mon810	4	M810L	0.35±0.08	0.26±0.04	74.29
	4	M810H	4.67±0.32	4.68±0.19	100.21

Data represent means ±S.D.

Table 4. Quality and Yield of DNA Extracted from the Samples with the Modified Silica-gel Membrane Method, and the GM Maize Representation in the DNAs

Sample	DNA extraction method	Ratio		DNA (μg)	Amount (%)	
		260 nm/280 nm	260 nm/ 230 nm		CaM	Mon810
M810L	mini	1.80±0.02	1.97±0.06	9.38±1.97	0.38±0.05	0.37±0.04
	modified mini	1.81±0.01	2.00±0.05	16.79±0.92*	0.37±0.04	0.30±0.08
M810H	mini	1.82±0.01	1.95±0.07	12.67±1.35	6.11±0.49	5.02±0.47
	modified mini	1.82±0.01	2.27±0.04*	21.35±0.41*	6.48±0.41	5.15±0.34

Data represent means ±S.D. (n=6).

The asterisks indicate significant difference from each value obtained from the same sample using the mini method.

検討した。M810L および M810H 各試料につき 6 本の小分け試料を対象に、上記 2 種の mini 法を用いて DNA 抽出を行い、それぞれの抽出 DNA の吸光度比 (O.D. 260 nm/280 nm, 260/230 nm) および収量について算出した後、Student *t* 検定により解析した。また、それぞれの抽出 DNA を対象に定量 PCR 法を用いた分析を行い、得られた CaM および Mon810 混入率についても同様の統計解析を行った。Table 4 に示したとおり、O.D. 260 nm/280 nm 比に関しては有意水準 ( $p=0.05$ ) での有意な差は認められなかったが、O.D. 260 nm/230 nm 比および DNA の収量に関しては有意差が認められた。特に改良 mini 法を用いた場合の DNA の収量は、通知 mini 法を用いた場合に比べて増加した。また、CaM ならびに Mon810 混入率に関しては、有意差が認められなかった (Table 4)。

### 3. 共同試験結果の解析

#### (1) DNA 抽出

抽出 DNA について、質ならびに収量、およびそれらのばらつきについて検討するため、M810H から分取された計 9 点の検体を対象に実施された DNA 抽出の結果について解析した。共同試験全体として、22 機関がシリカゲル膜タイプキット法を、4 機関が CTAB 法を採用し、シリカベースレジンを採用した機関は 1 機関のみであった。Table 5 に示したとおり、同一の DNA 抽出法を採用している機関間においても平均収量の大小が認められており、調査項目に記載を求めた遠心機器、吸光度測定装置などの使用機器、また、遠心、加温などの処理条件が系統的な差を生じる要因となっている可能性が考えられた。さらに、抽出法間で DNA 収量について比較した結果、シリカゲル膜タイプキット法による平均収量 ( $19.65 \pm 5.42 \mu\text{g}$ ) が CTAB 法による平均収量 ( $6.24 \pm 6.11 \mu\text{g}$ ) に比べ 3 倍程度高いことが明らかとなった。また検体間におけるばらつきには、両法に明確な差は認められなかった。しかしなが

Table 5. Quality and Yield of DNA Extracted Using Three DNA Extraction Methods

Method	Laboratory	DNA ( $\mu$ g)	R.S.D. (%)	Ratio		
				260 nm/280 nm	260 nm/230 nm	
Silica-gel membrane type kit	1	29.29 $\pm$ 7.08	24.18	1.74 $\pm$ 0.05	2.05 $\pm$ 0.12	
	2	25.56 $\pm$ 1.19	4.67	1.80 $\pm$ 0.12	1.93 $\pm$ 0.18	
	3	22.41 $\pm$ 0.98	4.36	2.08 $\pm$ 0.06	1.79 $\pm$ 0.01	
	4	15.58 $\pm$ 3.93	25.20	2.50 $\pm$ 0.58	1.82 $\pm$ 0.18	
	5	22.19 $\pm$ 2.16	9.71	1.68 $\pm$ 0.08	1.92 $\pm$ 0.16	
	6	20.42 $\pm$ 1.33	6.50	1.75 $\pm$ 0.01	2.07 $\pm$ 0.16	
	7	13.32 $\pm$ 2.98	22.36	1.61 $\pm$ 0.01	2.04 $\pm$ 0.07	
	8	23.68 $\pm$ 3.65	15.43	1.83 $\pm$ 0.17	2.05 $\pm$ 0.30	
	9	13.33 $\pm$ 0.73	5.47	1.72 $\pm$ 0.01	1.87 $\pm$ 0.03	
	10	14.08 $\pm$ 3.15	22.40	1.80 $\pm$ 0.01	2.28 $\pm$ 0.04	
	11	24.78 $\pm$ 1.66	6.71	1.73 $\pm$ 0.03	1.87 $\pm$ 0.14	
	12	12.93 $\pm$ 3.83	29.64	2.35 $\pm$ 0.46	no data	
	13	14.08 $\pm$ 4.22	30.00	1.97 $\pm$ 0.11	1.80 $\pm$ 0.04	
	14	21.93 $\pm$ 1.60	7.28	1.77 $\pm$ 0.02	2.13 $\pm$ 0.11	
	15	20.07 $\pm$ 2.49	12.43	1.76 $\pm$ 0.05	1.51 $\pm$ 0.55	
	18	23.40 $\pm$ 1.03	4.42	1.79 $\pm$ 0.02	2.14 $\pm$ 0.15	
	19	9.43 $\pm$ 1.79	18.97	1.87 $\pm$ 0.01	1.80 $\pm$ 0.08	
	20	16.03 $\pm$ 1.56	9.73	1.86 $\pm$ 0.03	2.12 $\pm$ 0.06	
	22	15.81 $\pm$ 1.58	10.01	1.91 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.52	
	23	23.97 $\pm$ 2.50	10.42	1.78 $\pm$ 0.01	1.95 $\pm$ 0.61	
	24	25.34 $\pm$ 1.26	4.98	1.79 $\pm$ 0.01	2.07 $\pm$ 0.07	
	25	24.60 $\pm$ 1.54	6.25	1.80 $\pm$ 0.03	2.07 $\pm$ 0.15	
	CTAB	16	3.34 $\pm$ 0.43	12.87	2.02 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.05
		21	3.18 $\pm$ 0.10	3.06	1.81 $\pm$ 0.06	2.47 $\pm$ 0.73
		26	3.04 $\pm$ 0.41	13.55	1.75 $\pm$ 0.03	no data
27		15.40 $\pm$ 1.20	7.77	1.74 $\pm$ 0.02	1.02 $\pm$ 0.02	
Silica based-resin type kit	17	55.60 $\pm$ 5.84	10.50	1.81 $\pm$ 0.01	2.03 $\pm$ 0.18	

Data represent means  $\pm$ S.D. (The data obtained from nine test portions for M810H were calculated.)

ら機関別に見ると、相対標準偏差 (R.S.D.) が 25% を超え、明らかにばらつきが大きいと判断される機関 (機関 4, 12, 13) が認められており、この収量のばらつきの原因については、調査項目に記載を求めた DNA 抽出試薬のロットとの間に明確な相関が認められなかったことから、遠心上清の分離など、手技の習熟や操作上の誤差が原因となった可能性が高いと考えられた。

## (2) 定量 PCR 法

スクリーニング試験の結果において、GA21 定量法により得られた測定値 (コピー数) が検量線の最低濃度 (ABI 社製定量 PCR 機器: 7900 HT 384 well において 16 コピー、その他機種において 20 コピー、Roche 社製 LC: 40 コピー) を上回った機関はなかった。また系統特異的定量試験の結果において、GA21 測定値が検量線の最低濃度を上回った機関は、1 機関の 1 測定のみであった。このため、スクリーニング試験の場合は、CaM 混入率について、また系統特異的定量試験の場合は、Mon810 混入率についてのみ解析を行った。

M810L における CaM 混入率について解析を行い、Fig. 1 に Xbar-R 管理図および Z-スコアを示した。解析にあたり、CaM 混入率を報告していない機関が 4 機関認められたため (機関 6, 17, 21, 26)、これら機関について

データを精査した結果、CaM 測定値が、検量線の最低濃度を下回っていることが明らかになった。これら機関から報告された結果については、絶対的定量下限 ( $^{abs}LOQ_{method}$ ) を測定値が満たしておらず、この測定値に基づいて算出される混入率の信頼性を確保することができないため、解析から除外した。前述の 4 機関を除く 23 機関から報告された CaM 混入率の平均  $\pm$  S.D. は、0.33  $\pm$  0.06% であり、Xbar および R ともに管理限界を超えた機関はなかった。また、使用された定量 PCR 機器の機種に依存して混入率が変動するような傾向は認められなかった。さらに Z-スコア上の管理限界を超えた機関も認められなかった (Fig. 1)。

次に M810H における CaM および Mon810 混入率について解析を行った。M810H を対象とした試験においては、測定値が  $^{abs}LOQ_{method}$  に満たない機関は認められなかった。Fig. 2 に、M810H における CaM 混入率について、Xbar-R 管理図および Z-スコアを示した。M810H について報告された CaM 混入率の平均  $\pm$  S.D. は、5.79  $\pm$  1.48% であった。また、LC を使用した機関 (機関 6, 19) から報告された混入率は、他の定量 PCR 機器を使用した機関から報告された混入率に比べ、著しく高い傾向が認められ、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えていた

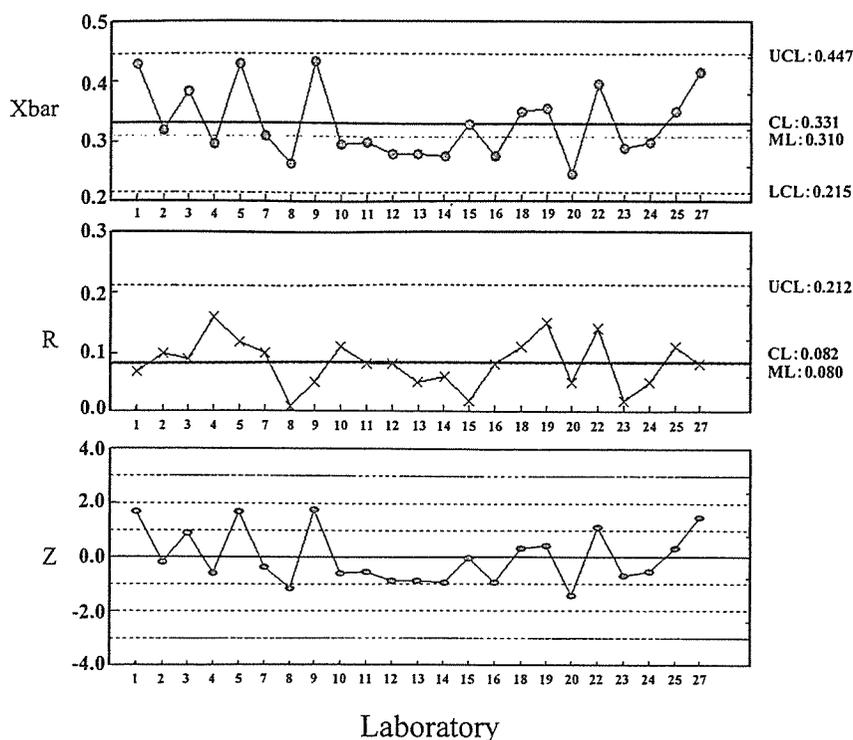


Fig. 1. Xbar, R chart and Z-score for CaM amount in M810L samples

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ●) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. Abbreviations; UCL: Upper control limit, CL: Central limit (Mean), LCL: Lower control limit, ML: Median

(Fig. 2). M810H における Mon810 混入率の平均  $\pm$  S.D. は、 $5.75 \pm 1.31\%$  であった。また先述した CaM 混入率と同様に、Mon810 混入率についても、LC を使用した機関のうち 1 機関 (機関 19) から報告された混入率が、著しく高い傾向が認められ、Xbar, R および Z-スコアが管理限界を超えていた (Fig. 3)。また上記機関以外にも、R が管理限界を超えた機関が 2 機関認められた。

前述のとおり、参加機関から報告されたすべての混入率について解析した結果、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関において使用されていた定量 PCR 機器が、いずれも LC であったため、定量 PCR 機器の機種依存的に混入率に差が生じている可能性が考えられた。このため、当該機関から報告された混入率を除いたデータについても解析を行った。

LC を使用した機関を除く 25 機関 (以下 LC を除く機関とする) から報告された M810H における CaM 混入率の平均  $\pm$  S.D. は、 $5.40 \pm 0.57\%$  であった。また、Fig. 4 に示したように、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 1 機関あり、この機関においては R の管理限界も上回っていた。CaM 混入率と同様に、Mon810 混入率についても解析した結果、各機関から報告された Mon810 混入率の平均  $\pm$  S.D. は  $5.46 \pm 0.59\%$  であった。また Fig. 5 に示すように、Z-スコア、Xbar が管理限界を超え

る混入率を報告した機関が 1 機関、R が管理限界を超える混入率を報告した機関が 2 機関認められた。

#### 考察

##### (1) 試料の妥当性

調製した各試料から得られた混入率について解析した結果、M810H は M810L に対し重量換算で 5.0% となるよう Mon810 試料を混合して調製した試料であるが、同試料から得られた混入率は、CaM 混入率として 5.68%、Mon810 混入率として 5.45% であった。M810L における CaM、Mon810 混入率がそれぞれ 0.35% であったことから、実測される混入率としても、重量混合比率に照らして妥当な結果が得られる試料であると考えられた (Table 1)。また、一元配置の分散分析の結果、 $F$  比は有意水準を下回り、試料の均一性が確認された (Table 2)。さらに、試験マニュアルに規定した期間、規定した保存条件で保存した場合、その前後に得られるそれぞれの混入率に有意な変動が認められなかったことから、試料の安定性が確認された (Table 3)。

##### (2) シリカゲル膜タイプキット法の改良

本研究で検討したシリカゲル膜タイプキット法の改良法 (改良 mini 法) においては、シリカゲル膜カラムに吸着させた DNA を直接 TE 緩衝液で溶出する。この改良によ

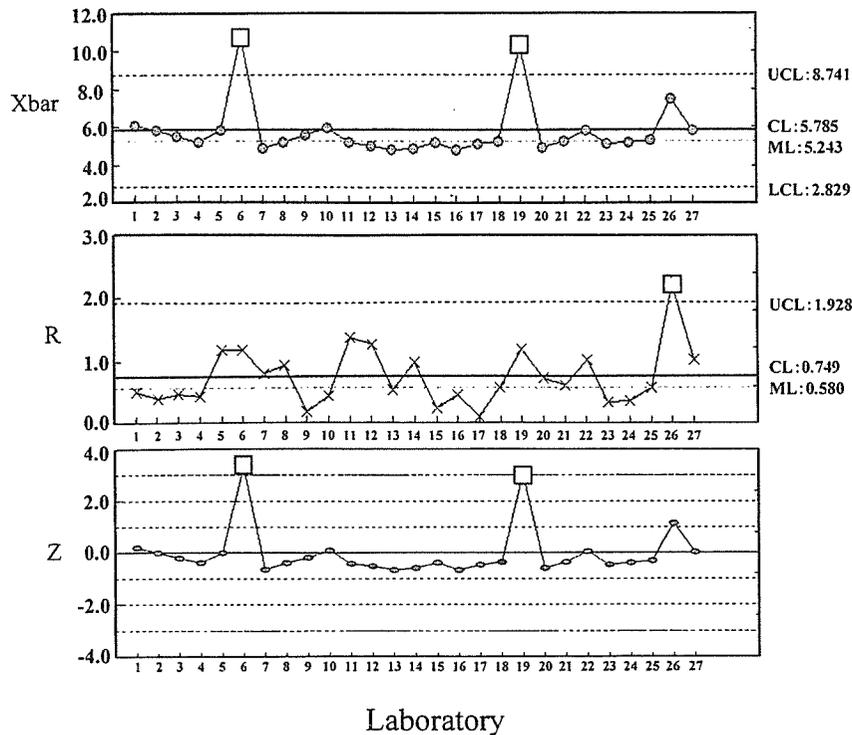


Fig. 2. Xbar, R chart and Z-score for CaM amount in M810H samples

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ●) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1.

り、食発 1113001 号に記載の方法（通知 mini 法）と比較した場合、DNA をカラムから溶出した後に行うアルコール沈殿操作が不要となり、簡便化と収量の安定化が達成できるものと考えられた。また、通知 mini 法では DNA 沈殿の溶解に一晩の静置が必要であったが、これも不要となることから、試験時間も大幅に短縮される。M810L および M810H 各試料から得られた、通知 mini 法ならびに改良 mini 法の結果について解析したところ、M810H から得られた O.D. 260 nm/230 nm、および両試料から得られた DNA 収量に有意差が認められた。O.D. 260 nm/230 nm については、改良 mini 法で若干の上昇が認められたが、M810H についてのみであり、明確な結論は得られなかった。これに対し、収量は、M810L、M810H ともに改良 mini 法で 150% 以上の増加が認められており、また抽出点間でのばらつきについても小さくなっている (Table 4)。さらに、それぞれの抽出 DNA を対象に得られた CaM および Mon810 混入率には、有意差が認められなかった (Table 4)。これらの結果から、改良 mini 法は簡便化、収量の安定化、また操作時間の短縮に有効であると判断され、食安発 0628001 号（平成 16 年 6 月 28 日）<sup>18)</sup> によって厚生労働省より通知された。

### (3) 定量下限

M810L から得られた CaM 混入率について解析した結果、Xbar-R 管理図および Z-スコアが管理限界を超えた機関は認められなかった。しかし、CaM 測定値が  $absLOQ_{method}$  を満たさなかった機関が 4 機関あり、統計解析に含めることができなかった。これら機関から報告されたデータならびに調査項目について詳細に解析した結果、測定値が  $absLOQ_{method}$  に満たなかった要因には以下の 4 つが考えられた。1) 採用した DNA 抽出法依存的な要因。2) 定量 PCR 機器に依存した要因。3) 試験実施者の操作上の誤差に依存した要因。4) 上記 1)~3) の複合要因。上記 4 機関中、機関 6 は定量 PCR 機器に LC を使用しており、LC の試験法上、 $absLOQ_{method}$  が ABI 社製の PCR 機器に比べて高く（40 コピー）なることが結果に影響を与えている可能性も考えられた。機関 6 以外の 3 機関においては、DNA 抽出法にシリカゲル膜タイプキット法以外の方法（CTAB 法：機関 21 および 26、シリカベースレジソタイプキット法：機関 17）が採用されていた。

### (4) 内在性遺伝子 (*SSI1b*) 測定値の解析 1 (DNA 抽出法依存的な *SSI1b* 測定値の差異とそのばらつき; 定量下限への影響)

GM トウモロコシの混入率は、トウモロコシに普遍的に含まれる内在性遺伝子 (*SSI1b*) の測定値と GM トウモロコ

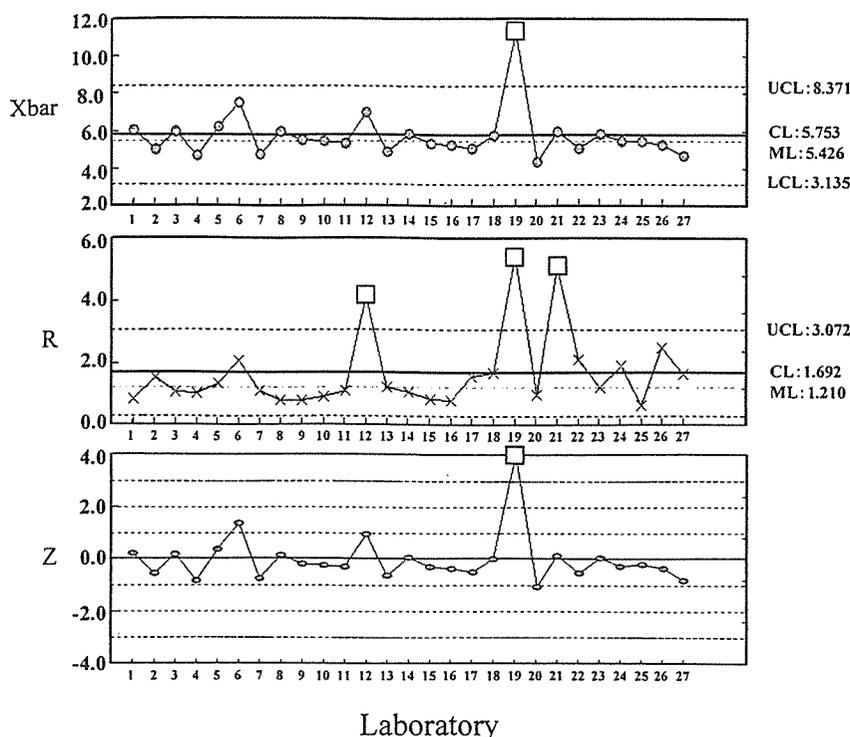


Fig. 3. Xbar, R chart and Z-score for Mon810 amount in M810H samples

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ●) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm 2$  S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1.

シに含まれる組換え DNA 配列の測定値の比を求め、これに換算係数 (内標比) を乗じて算出されるため、どのような GM トウモロコシ系統を対象とした定量分析を行う場合においても、必ず *SSI7b* の測定を同時に行う。また、同一試料から、同一の DNA 抽出法を用いて抽出された DNA 試料から測定される *SSI7b* 測定値は、基本的には、安定して一定の値を示すと考えられる。これらのことから、*SSI7b* 測定値の大きさやそのばらつきを指標とした解析を行うことは、GM トウモロコシ定量分析により問題のある結果が得られた場合、その要因を明らかにする上で重要であると考えた。そこで、系統特異的定量試験のうち Mon810 混入率を算出するための試験結果から、9 検体の DNA 試料液について得られた *SSI7b* 測定値を抽出し、平均値を算出した (Fig. 6)。その結果、*SSI7b* 測定値の平均は、シリカゲル膜タイプキット法を採用した 22 機関の平均  $\pm$  S.D. が  $34599.8 \pm 7386.7$  コピー、CTAB 法を採用した 4 機関の平均  $\pm$  S.D. が  $22461.8 \pm 6856.4$  コピーであった。また、シリカベースレジソタイプキット法を採用した 1 機関の *SSI7b* 測定値の平均  $\pm$  S.D. は  $31333.3 \pm 3937.1$  コピーであった。さらに、同一試料に由来する複数の検体間に認められる *SSI7b* 測定値のばらつきについて明らかにすることを目的に、先に平均値を算出した 9 検体の *SSI7b* 測定値の R.S.D. を求め機関ごとに示した

(Table 6)。その結果、全機関から報告された *SSI7b* 測定値の R.S.D. が 17% であったのに対し、M810L を対象とした試験において CaM 測定値が  $^{abs}LOQ_{method}$  を下回った機関のうち、CTAB 法を採用した機関 21 および 26 から報告された *SSI7b* 測定値の R.S.D. は、それぞれ 68.5%、66.2% であり、明らかに大きな値を示した。これらの解析結果から、CTAB 法を DNA 抽出法に採用した場合には、得られる測定値が他の方法に比べて小さくなることに加え、上記 2 機関においては抽出操作のばらつきあるいは DNA 濃度測定の不備が原因となり、それらの複合的な結果として、CaM 測定値が  $^{abs}LOQ_{method}$  を下回ったのではないかと推測された。また、機関 17 も同様に M810L を対象とした試験において CaM 測定値が  $^{abs}LOQ_{method}$  を下回っていたが、同じ DNA 抽出法を採用している機関がほかにないため、データの比較から考察することができなかった。

#### (5) 内在性遺伝子 (*SSI7b*) 測定値の解析 2 (*SSI7b* 測定値のラン間再現性; LC に認められた問題)

M810H を対象とした試験においては、LC を定量 PCR 機器として使用した機関から報告された CaM, Mon810 混入率のいずれもが、Xbar および Z-スコアにおいて管理限界を超えていた。その要因を明らかにするため、同一検体の測定試験を繰り返し行った場合の *SSI7b* 測定値のばら

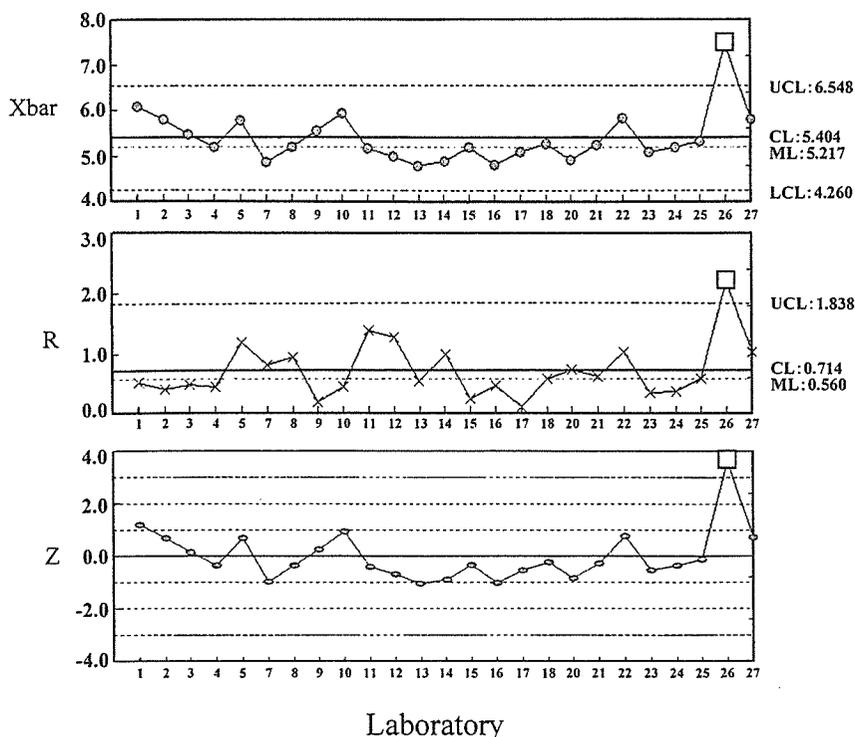


Fig. 4. Xbar, R chart and Z-score for CaM amount in M810H samples (except for the values reported from laboratories in which a LightCycler was used)

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ●) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm 2$  S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1.

つき (ラン間再現性) に関して, M810H から抽出された DNA 試料のうち同一の DNA 試料液を用いて行われた CaM ならびに GA21 混入率 (スクリーニング試験), および Mon810 混入率 (系統特異的試験) を分析するための計 3 回のランについて, 各機関から報告された測定値のうち *SSIb* 測定値を抽出し, R.S.D. を求め比較した. その結果, Table 6 に示したように, LC におけるラン間再現性は, 各抽出 DNA について, 機関 6 においては 56.8%, 53.8%, 48.5% (R.S.D. の平均; 53.0%), 機関 19 においては 40.3%, 38.5%, 28.9% (同平均; 35.9%) であった. これに対し, ABI 社製定量 PCR 機器を使用した機関のうち機関 26 を除く機関でのラン間再現性は  $7.4 \pm 3.8\%$  であった. これらの結果から, LC により得られる測定値のラン間再現性が低い傾向が示唆された.

しかしラン間再現性が低いということのみでは, LC 使用機関から報告された混入率が, 真値と大きく異なっていた結果を十分に説明することができない. そこで, LC 使用機関から分析に供した DNA 試料液を回収し, 国立衛研において再分析した. 回収した 5 検体分の DNA 試料液における CaM 混入率を分析することを目的に 3 回の繰返し測定を実施した結果, 5 検体における *SSIb* 測定値の R.S.D. の平均は 7.9%, また, CaM 混入率の平均値  $\pm$  S.D.

は  $4.93 \pm 0.60\%$  であり, その他の機関から報告された値に比べて, 著しい差異は認められなかった. また, 操作方法については担当者への聞き取り調査を行ったが, 特別な問題を見つけることができなかった. これらの結果は, 参加機関が使用した定量 PCR 試薬あるいは機器に起因する要因がラン間再現性, さらに算出される混入率に影響を与えたことを示唆するものと考えられた. なお, ABI 社製定量 PCR 機器を用いた機関から報告された *SSIb* 測定値の R.S.D. の平均値を算出する際に除外した機関 26 においては, 通知法とは異なり PCR プレートのフタにキャップを使用した旨報告されており, 測定値も他の機関と同一に解析することができない大きな異常を示していたため, 抽出 DNA にも大きな問題が含まれていると考えられた. また, 規定された測定方法, 測定回数に従わなかった機関 (機関 3, 13, 21, 24) から報告された測定値についても, ラン間再現性の解析は行わなかった.

#### (6) その他の機関で認められた問題

LC を除く機関について解析した結果, 前述の機関 26 から報告された M810H における CaM 混入率については, Xbar および Z-スコアが管理限界を超え, さらに R 管理図においても管理限界を上回っていた. また, Mon 810 混入率の解析結果においては, Xbar および Z-スコア

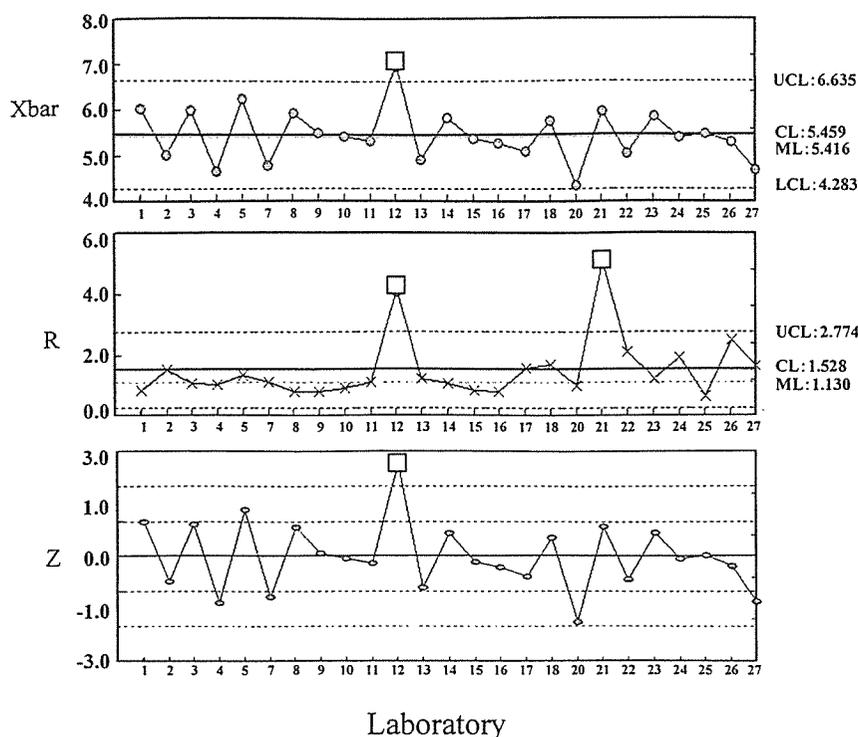


Fig. 5. Xbar, R chart and Z-score for Mon810 amount in M810H samples (except for the values reported from laboratories in which a LightCycler was used)

Individual data are represented as a closed circle (in Xbar chart and Z-score; ●) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines in the Xbar chart and R chart. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. Data outside the upper or lower control limit are represented by a square (□).

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1.

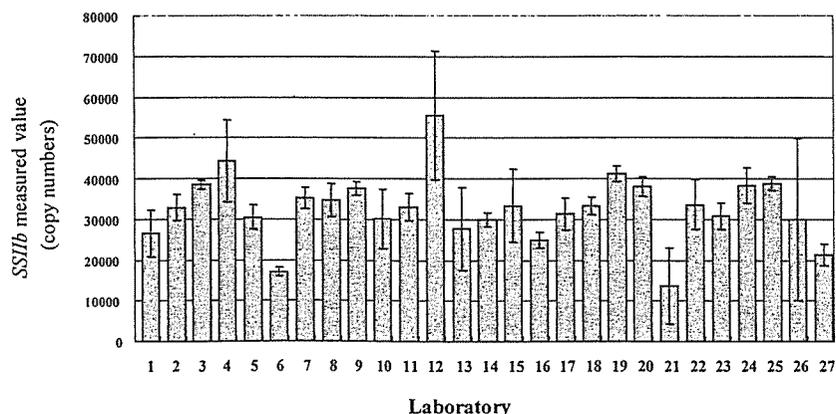


Fig. 6. *SSIIb* measured values obtained from 9 test portions, derived by dividing M810H samples

The CTAB method and a silica-based resin type kit was used in Laboratories 16, 21, 26, 27 and 17, respectively. The other laboratories extracted DNA using a silica-gel membrane type kit. Data represent means  $\pm$  S.D. ( $n=9$ ).

ア上の管理限界を機関 12 が、また、R 管理図上の管理限界を機関 12 および機関 21 が超えていた。これら 2 機関について DNA 抽出の結果をみると、Table 5 に示したとおり、機関 12 については同一の DNA 抽出法を採用した他機関に比べ、比較的収量が少なく (M810H から抽出された 9 点の検体の平均が 12.93  $\mu$ g)、また、検体間では

らつきが大きいこと (R.S.D. が 29.64%) が観察されており、また、機関 21 については収量の平均およびばらつきに問題は認められなかったものの、DNA の質を示す O.D. 260 nm/230 nm の値が同法を採用した他機関に比べて、大きな値 (O.D. 260/230 値の平均が 2.47) を示した。このように、LC を定量 PCR 機器として使用した機関を除

Table 6. Dispersion of *SSI**b*** Measured Values Obtained from the M810H DNA Samples with Quantitative PCR Method

Laboratory	DNA extraction method*	R.S.D. (%) for <i>SSI<b>b</b></i> measured values obtained from three independent measurements for each test portion				R.S.D. (%) for <i>SSI<b>b</b></i> measured values in 9 test portions for M810H***
		Test portion			Average**	
		1	2	3		
1	A	5.6	4.7	6.2	5.5	21.5
2	A	3.7	7.1	3.2	4.7	10.0
3	A		one measurement		not calculated	2.8
4	A	4.5	9.4	9.5	7.8	22.8
5	A	3.0	7.0	7.6	5.9	9.9
6	A	56.8	53.8	48.5	53.0	16.4
7	A	23.6	24.4	10.7	19.6	7.3
8	A	5.9	10.3	7.2	7.8	11.5
9	A	4.5	5.3	6.2	5.3	4.2
10	A	4.6	10.4	2.6	5.9	24.3
11	A	6.7	6.3	5.3	6.1	10.3
12	A	8.3	14.3	12.0	11.5	28.6
13	A		two measurements		not calculated	37.1
14	A	5.3	3.8	2.1	3.7	5.5
15	A	0.9	4.4	7.2	4.2	26.9
16	B	5.7	14.5	6.3	8.8	7.9
17	C	8.8	6.3	9.8	8.3	12.6
18	A	4.7	6.7	9.4	6.9	6.6
19	A	40.3	38.5	28.9	35.9	36.0
20	A	5.7	7.0	2.8	5.2	6.4
21	B		two measurements		not calculated	68.5
22	A	8.8	15.4	11.0	11.7	18.1
23	A	1.8	2.7	2.3	2.3	10.5
24	A		two measurements		not calculated	11.4
25	A	5.2	6.7	6.9	6.3	4.3
26	B	99.2	87.1	92.5	92.9	66.2
27	B	6.1	18.1	5.0	9.7	12.0

\* DNA extraction method, A: Silica-gel membrane type kit, B: CTAB method, C: Silica-based resin type kit

\*\* The averages were calculated from the R.S.D. (%) for *SSI**b*** measured values obtained from three test portions for M810H. The independent measurement was repeated three times for each test portion. The average means the repeatability of quantitative PCR measurement in each laboratory.

\*\*\* The nine *SSI**b*** measured values, which were obtained from nine test portions for M810H, were used for calculation of the R.S.D. (%) for *SSI**b*** measured value in each laboratory. The R.S.D. (%) indicates the repeatability of DNA extraction method.

The R.S.D. (%) was 17%, calculating from 243 *SSI**b*** measured values reported from all laboratories.

いた解析の結果 (Fig. 4, 5), DNA 試料の収量, 質, あるいはそれらのばらつきにおける 1 つ以上の問題が指摘された。また, 機関 21 ならびに 26 については先に考察したとおり, 9 検体の抽出 DNA 試料液間で得られる *SSI**b*** 測定値のばらつきが大きいことから, 定量 PCR 法に供された DNA 試料液に含まれる問題を指摘することが可能であると考え (Table 6)。一方, 機関 12 の R.S.D. の平均は 28.6% であり, 若干高めではあるものの, 他機関との顕著な差は認められなかった。しかし, 調査項目に記載を求めた試験日を考慮すると, DNA の収量および質に日差変動が認められた。また, 測定された *SSI**b*** 測定値の平均も他の機関に比べ高めの傾向が認められる (Fig. 6)。これらの点から, DNA 抽出法の習熟が不十分であるために起こる抽出間誤差, DNA 濃度測定, および定量 PCR に供する反応液の調製の不確かさが複合要因となって混入率に影響を与えたものと推察された。

以上のように, LC を除く機関を対象とした解析におい

て Xbar-R 管理図および Z-スコアで管理限界を上回る定量値を報告した機関に関しては, DNA 試料の収量, 質, あるいはそれらのばらつきにおける 1 つ以上の問題が認められた。また DNA 抽出法別に見ると, CTAB 法を使用した 4 機関のうち 2 機関が管理限界を超えており, いずれの機関についても DNA 試料の質が定量 PCR に影響した可能性が考えられた。しかし, CTAB 法を採用した残り 2 機関の結果からは定量 PCR 法により得られた測定値も含め, 問題は認められていない。CTAB 法はシリカゲル膜タイプキット法に比べ操作が煩雑なため, 定量 PCR 法に適した DNA を抽出するにはより熟練を要する。このため, 今回管理限界を上回った参加機関においては, CTAB 法を用いた DNA 抽出の経験が不十分, あるいは正確な操作を習得できていない可能性が考えられた。

#### まとめ

遺伝子組換えトウモロコシを対象とした外部精度管理試

験を実施した結果, M810L を対象とした CaM 定量法を用いた試験において, 測定値を得ることができない機関が認められた。また, M810H を対象とした試験において, LC を使用した 2 機関からともに, Xbar および Z-スコアが管理限界を大きく超える結果が報告されており, 算出される混入率が定量 PCR 機種依存的に異なる可能性が示唆された。その原因として, 報告された測定値からはラン間誤差が大きいことが明らかにされ, また, PCR 試薬あるいは機器に起因する問題がラン間再現性, さらには算出される混入率に影響を与えた可能性が, 追跡調査によって示唆された。LC を使用した機関以外に問題の認められた機関に関しては, 報告様式に規定した各種分析値および調査項目の返答内容を精査した結果, すべての機関において抽出 DNA の収量, 質またはそれらのばらつきのうちの 1 つ以上に問題が認められており, これらが主原因となって混入率が影響を受けたものと推察された。また, 上述の各種要因について考察を行うに当たり, *SSIIb* 測定値を指標とし, 測定値のばらつきを明確にすることが大変有効であった。さらに, 本共同試験に併せて改良されたシリカゲル膜タイプキット法を用いることで, より簡便かつ短時間で, 高収量の DNA を抽出することが可能であった。

#### 謝 辞

本研究は, 食品等試験検査費および厚生労働科学研究費補助金 (食品安全性確保研究事業) 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

- James, C., Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. *ISAAA: Ithaca, NY*, No. 32 (2004).
- Hino, A., Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience. *Toxic. Pathology*, 30, 126-128 (2000).
- 厚生省告示第 232 号 (2000) “食品, 添加物等の規格基準の一部改正” 平成 12 年 5 月 1 日。
- 厚生省告示第 233 号 (2000) “組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続き” 平成 12 年 5 月 1 日。
- 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)。
- 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)。
- 厚生労働省医薬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 17 年 5 月 17 日, 食発第 0517001 号 (2005)。
- 食品衛生法施行規則 (昭和 23 年厚生省令第 23 号)。
- Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Shibuya, M., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 44, 281-288 (2003)。
- Kikuchi, H., Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified papaya (55-1). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 46, 21-27 (2005)。
- 穂山 浩, 渡邊敬浩, 笠間菊子, 松木容彦, 米谷民雄: “食品衛生外部精度管理調査研究の概要 (第 1 報) 遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) および遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Plus and NewLeaf Y) の検知用試料の作製と調査成績について”。*食品衛生研究*, 54 (4) 25-35 (2004)。
- Kasama, K., Watanabe, T., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the Japanese official notified methods to detect genetically modified soybeans (Roundup Ready Soybean 40-3-2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, in press.
- 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)。
- Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirano, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A., Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, 85, 1,077-1,089 (2002)。
- Thompson, M., Wood, R., International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.*, 76, 926-939 (1993)。
- Horwitz, W. ed., “Official methods of analysis of AOAC International” 17th Ed., Gaithersburg, MD, AOAC International, Appendix D, 2000, p. 2-11. (ISBN 0-935584-7-6)
- 大隅 昇: “精度管理における統計的データ解析” *食品衛生学会誌*, 39, J-325-J-332 (1998); 40, J-325-J-331; (1999), 41, J-238-J-242 (2000); 41, J-316-J-322 (2000)。
- 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 16 年 6 月 28 日, 食発第 0628001 号 (2004)。

## 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

(2005年11月28日受付)

(2006年3月4日受理)

渡邊敬浩<sup>a)</sup>、時下祥子<sup>a)</sup>、笠間菊子<sup>b)</sup>、鈴木達也<sup>b)</sup>、大島赴夫<sup>b)</sup>、菊地博之<sup>a)</sup>、日野明寛<sup>c)</sup>、穂山浩<sup>a)</sup>、米谷民雄<sup>a)</sup>

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) (財)食品薬品安全センター秦野研究所

c) (独)食品総合研究所

### Laboratory-performance Study of Quantitative PCR Methods to Analyze Approved Genetically Modified Maize (GA21 and MON810 lines)

(Received November 28, 2005)

(Accepted March 4, 2006)

Takahiro Watanabe<sup>a)</sup>, Shoko Tokishita<sup>a)</sup>, Kikuko Kasama<sup>b)</sup>, Tatsuya Suzuki<sup>b)</sup>, Yukio Ohshima<sup>b)</sup>,  
Hiroyuki Kikuchi<sup>a)</sup>, Akihiro Hino<sup>c)</sup>, Hiroshi Akiyama<sup>a)</sup>, Tamio Maitani<sup>a)</sup>

a) National Institute of Health Sciences

b) Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

c) National Food Research Institute

#### Abstract

To ensure the reliability of the results obtained by the GMOs analytical methods, analysts must maintain and improve their technical abilities. Moreover, it is very important to reveal the factors affecting the analytical results for technical improvements. In this study, a laboratory-performance study was carried out to investigate factors affecting the analytical results obtained by the quantitative PCR method to analyze the approved genetically modified maize (GA21 and MON810 lines). After examination of the homogeneity and stability of the prepared test samples, the samples were provided to the 33 laboratories participating in this collaborative study. The provided samples consist of two test materials, GA21L (including each GA21 and MON810 line in 1% concentration) and GA21H (including 5% GA21 and 1% MON810 line). The data were collected from all the laboratories and statistically analyzed. In a few laboratories which reported the error test values, the DNA quality was low or the yield was unstable. Furthermore, the value measured for the taxon-specific gene was also unstable. These results suggest that technical improvement may be needed for these laboratories regarding the DNA extraction and/or preparation step of the PCR reagents.

**Keywords** : 遺伝子組換えトウモロコシ、ポリメラーゼ連鎖反応、検査方法、外部精度管理

genetically modified maize, polymerase chain reaction, testing method, laboratory-performance study

#### 1 緒言

近年のバイオテクノロジーの急速な進展に伴い、その基幹技術ともいえる遺伝子組換え技術が作物育種に応用されるようになった。本技術を応用し開発された作物は遺伝子組換え(GM)作物と呼ばれ、これまでに数十種が商業栽培されており、現在も新たな作物の開発が精力的に進められている。本格的な商業栽培が開始された1990年代後半以降、GM作物の栽培面積は、米国、カナダといった農業先進国を

中心に、中国、ブラジルなど新たな国での栽培開始と併せて、全世界的に増加している<sup>1)</sup>。食糧自給率が40%程度である我が国においては、今後不可逆的にGM作物を原材料とする食品(GM食品)が食生活に浸透していくものと考えられている一方、食経験のない新たな食品に対する国民の不安は払拭されていない<sup>2)</sup>。

GM食品の我が国における流通は、厚生労働省が所管する食品衛生法に基づき、食品安全委員会において安全性に問題が認められないと評価された後に認可され、流通する際

連絡先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 渡邊敬浩

Corresponding author: Takahiro Watanabe, National Institute of Health Sciences,  
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

には表示が義務づけられている<sup>3)~5)</sup>。これに関連し、GM食品を対象とした検査方法として、「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、食発第110号<sup>6)</sup>)が医薬局食品保健部長通知されており、公定分析法によるモニタリング調査が世界各国に先駆けて行われている。当該検査方法はその後の安全性審査の進捗状況および検知技術の改良にあわせて改訂作業が進められ、平成17年現在では、医薬食品局食品安全部長通知された改訂版(平成17年5月17日、食安発第0517001号<sup>7)</sup>)が最新のものである。

上記検査方法により得られる分析結果の信頼性を確保するためには、食品衛生法施行規則<sup>8)</sup>にも定められているとおり、食品分析に従事する各検査機関における分析精度が適正に保たれていることが重要である。そのためには、外部精度管理試験を通して、各分析者が自己の技術水準を把握した上で、検査技術の維持、向上に努めることが有効であると考えられる。我々は平成13年度以降、種々のGM食品分析法を対象とした外部精度管理試験を実施するために、配布試料の調製法、また、精度管理により管理されるべき重要な項目について検討を行ってきた<sup>9)~12)</sup>。さらには、試験的に実施した共同試験により得られた調査項目の集計および分析値の詳細な解析を通じて、結果にばらつきを生じる種々の要因について明らかにしてきた。本研究では、新たな精度管理項目として安全性審査を終了したGMトウモロコシ(GA21ならびにMON810系統)を対象とした定量PCR法をはじめ設定し検討を行った。すなわち、配付試料の調製方法ならびに妥当性について検討した後、33機関による共同試験を試験的に実施し、ばらつきの程度を把握した上で、その要因について詳細な解析を行ったのでその結果について以下に報告する。

## II 実験方法

### 1. 試料

GMトウモロコシ(GA21ならびにMON810系統)試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じ、米国モンサント社より入手した。また、擬似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え(non-GM)トウモロコシ試料(米国産トウモロコシ)は、米国の商事会社を通じて入手した。入手した全てのトウモロコシ試料を500 $\mu$ mのスクリーンを取り付けた高速遠心式粉砕器を用いて粉砕した。Non-GMトウモロコシ試料については粉砕後、定量PCR法を用いた分析を行い、0.4%程度のGMトウモロコシの混入(MON810系統)を確認した上で、マトリクス試料として用いた。マトリクス試料に対し、GA21ならびにMON810試料を重量換算でそれぞれ1.0%となるよう混合した試料を低濃度試料(GA21L)、GA21試料を5.0%、MON810試料を1.0%となるよう混合した試料を高濃度試料(GA21H)とした。各GMトウモロコシを含む試料の混合は以下の通り行った。まず、均一に粉砕した各種トウモロコシ試料を凍結乾燥処理した。その後、上記重量比となるようマトリクス試料とGA21ならびに

MON810試料を正確に秤量し、全量を1.5 kgとしてプラスチック製の袋に量り採った。袋中で十分な混合を行った後、篩にかけ、再び袋中で混合を繰り返した。この混合操作は合計2回行った。混合操作後の試料を再度、粉砕器により粉砕した後、混ぜ合わせ、それぞれをGA21LおよびGA21Hとした。試料調製後、GA21Lを7 g、GA21Hを20 gとなるよう、それぞれ25 mL容遠沈管、50 mL容遠沈管60本に秤量分注し小分け試料とし、試験に供するまでの期間は-20℃で保存した。

### 2. 試薬

均一性試験など著者らが実施した試験には、以下の試薬を使用した。DNAの抽出精製にはQIAGEN社製DNeasy Plant Mini KitもしくはQIAGEN社製DNeasy Plant Maxi Kit(シリカゲル膜タイプキット)を用いた。PCRにはTaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix(アプライドバイオシステムズ:ABI社製)、トウモロコシ内在性DNA SSI**I**bオリゴヌクレオチドセット、組換えDNA P35S-1オリゴヌクレオチドセット、GMトウモロコシ系統別DNA M810-2オリゴヌクレオチドセット、GMトウモロコシ系統別DNA GA21-3オリゴヌクレオチドセット、GMトウモロコシプラスミドセット-ColE1/TE(オリゴヌクレオチドおよびプラスミドは全て(株)ニッポンジーン社製)を用いた。水は(株)ニッポンジーン社製遺伝子工学用を用いた。他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

### 3. 装置

均一性試験など著者らが実施した試験には、以下の機器を使用した。高速遠心式粉砕・混合機:ZM 100 (Retch社製)、恒温槽:ドライサーモユニットDTU-1B(タイテック社製)、冷却遠心機:Avantii HP25(Beckman社製)、卓上遠心機:KR-1000(フナコシ社製)、タッチミキサー:MT-51(ヤマト社製)、分光光度計:ND-1000(NanoDrop Technologies社製)、定量PCR機器:安定性試験:ABI PRISM<sup>®</sup> 7000(ABI社製)、その他の試験:ABI PRISM<sup>®</sup> 7700(ABI社製)。

### 4. DNA抽出法

均一性試験および安定性試験においては、実施時に最新であった食安発第0628001号<sup>13)</sup> 2.2.1.2.項に記載のシリカゲル膜タイプキット法(mini法)もしくはJAS分析試験ハンドブック<sup>14)</sup>記載のシリカゲル膜タイプキット法(maxi法)を用いて、DNAを抽出した。

### 5. 定量PCR

食安発第0628001号(平成16年6月28日)に記載の条件を遵守した。本稿においてMON810系統特異的定量法(MON810定量法)、GA21系統特異的定量法(GA21定量法)およびCauliflower mosaic virus 35S プロモーター(CaM)定量法とは、M810-2オリゴヌクレオチドセット、GA21-3オリゴヌクレオチドセット、P35S-1オリゴヌクレオチドセットのそれぞれとトウモロコシの内在性遺伝子(Starch synthase II bをコードする遺伝子:SSI**b**)を測定するためのSSI**b**-3オリゴヌクレオチドセット、および共通のキャリアレーションスタン

ダードとなるGMトウモロコシプラスミドセットを組み合わせて用いる定量PCR法を意味する。

## 6. 均一性試験

GA21LおよびGA21Hのそれぞれに対し、60本の小分け試料の10%に相当する6本の小分け試料を使用して、均一性確認試験を実施した。各小分け試料から2gのトウモロコシ検体を秤量分取し、JAS分析試験ハンドブック記載のmaxi法を用いてDNAを抽出した。濃度を調整した抽出DNAを定量PCR法におけるDNA試料液とし、分析を行った。CaM、MON810およびGA21定量法の3法を用い、また、2回の繰り返し測定を行うことでCaM、MON810ならびにGA21混入率を算出した。得られた混入率はロジット変換後、一元配置の分散分析により解析した。

## 7. 安定性試験

試料送付直前にGA21LおよびGA21Hの各小分け試料6本から2gのトウモロコシ検体を秤量分取し、食安発第0628001号2.2.1.2.項に記載のmini法に従いDNAを抽出した後、定量PCR法による分析を行い、CaM、MON810ならびにGA21混入率を算出した。また、上記試験に用いた小分け試料6本を-20℃で共同試験期間として設定した約1ヶ月間保存した後にも同様の方法にて分析を行い、混入率を算出した。保存前後で得られた混入率のそれぞれについてまずF検定を行い、等分散が確認された場合にはStudent t検定、確認されなかった場合にはAspin-Welch t検定により解析した。

## 8. 参加機関における試験スキーム

食安発第0628001号3.2.1.項「安全性審査済みGMトウモロコシを対象とした定量PCR」に記載されている定量PCR法のうち、MON810定量法とGA21定量法はそれぞれ対応するGMトウモロコシ系統のみを特異的に分析するための方法である。これらに対し、CaM定量法は、安全性審査済みGMトウモロコシ系統のうちGA21系統を除くすべての系統にCaM配列が導入されていることから、それらの系統を区別せずに分析するための方法である。

スクリーニング試験実施の観点から、上記通知では、まずCaM定量法とGA21定量法により、GMトウモロコシの系統を区別せず分析することが規定されている。また、CaM混入率の算出に使用する換算係数(内標比)には、GMトウモロコシの意図しない混入を最大に評価する目的から、CaM配列の導入数が最小であるMON810系統から得られた内標比の使用が指示されている。先述の通り、スクリーニング試験により得られる分析結果はGMトウモロコシ系統を区別しない混入率となる。このため、その値が4.5%を超えた場合には、同試料を対象として、各GMトウモロコシ系統特異的定量PCR法により対応するGMトウモロコシ系統個別の混入率を求め、それらの合算値によって安全性審査済みGMトウモロコシの混入量について最終的に判定する。共同試験における試験スキームは、前述のような通知の意図にはずれることがないよう留意し作成した。以下、試験スキームを

す。

「スクリーニング試験として、GA21LならびにGA21Hから3点の検体を秤量し、DNAを抽出する。抽出された3点のDNA試料液に対し、CaMならびにGA21定量法を用いた試験を行い、それぞれ算出される混入率の合算値を求める。その結果、GMトウモロコシ(系統は区別せず)の混入率が4.5%を超えた試料に関しては、系統特異的定量試験として新たに6点の検体からDNAを抽出し(スクリーニング試験と合わせて計9点の検体)、MON810ならびにGA21定量法を用いた試験を実施する。4.5%を超えた試料におけるGMトウモロコシ混入率は、MON810ならびにGA21混入率の合算値とする。」また、本試験スキームを試験マニュアル中に明記した。

## 9. 試験の実施

均一性の確認されたGA21LならびにGA21Hの小分け試料各1本をドライアイスと共に包装後、参加各機関に送付し、到着後は-20℃で保存するよう指示した。検体送付時には、諸注意事項を含む実施要領、食安発第0628001号に準じ作成した試験マニュアル、調査項目ならびに試験結果についての報告方法を規定した各種報告様式を同送した。

調査項目としては、GM食品検査全般についての経験年数、GM食品各検査の品目、分析別検査実績、検査実施環境および実験機器、器具共有の有無、各種機器のメーカー、採用したDNA抽出法、各操作手順に関して公定分析法からの逸脱点、使用試薬のロットを取り上げ、検査全般にわたって詳細な調査が行えるよう配慮した。試験結果については、抽出されたDNAの吸光度(230、260、280ならびに320 nm)と収量、各種定量法を用いて作成された検量線の精度、標的DNA配列の測定値(コピー数)およびそれらを元に算出されたGMトウモロコシ混入率を報告するものとした。これら試験方法の作成に当たってはThompsonらによる報告<sup>15)</sup>ならびにAssociation of Official Analytical Chemists (AOAC) Internationalのマニュアル<sup>16)</sup>を参考にした。共同試験の実施期間は、平成16年1月26日から2月28日までとした。

## 10. 試験結果の回収ならびに解析

返送された試験結果のうち、CaM、MON810およびGA21混入率ならびにそれらの合算値について、統計解析ソフトウェアJUSE-QCAS(㈱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、Zスコアの算出、Xbar-R管理図の作成を行った。なお、Zスコアの算出においては各機関の平均値(Xbar)の平均を使用し、またXbarの管理限界は総平均±2S.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<sup>17)</sup>を参照した。また、参加各機関から報告された混入率の中に他機関に比べ逸脱の明らかな値が含まれていた場合、正確な統計解析が行えなくなるため事前にデータ・クリーニングを行い、総平均±3S.D.の範囲を超えた混入率については、以降の統計処理から除外した。

統計解析の結果、管理限界を超える混入率が認められた場合には、その原因について考察した。その際には、分析値に加え調査項目に対する返答を参考にした。

### III 結果

#### 1. 試料の均一性

GA21LおよびGA21Hの均一性について検討するため、各試料につき6本の小分け試料を対象に、CaM、MON810およびGA21定量法の3定量法を用い、それぞれ2回の繰り返し測定を行った。各小分け試料から得られた測定値に基づき算出された混入率の平均値(各試料におけるCaM、MON810ならびにGA21混入率)は、以下の通りである。GA21Lを対象とした場合、CaM混入率:1.58%、MON810混入率:1.67%、GA21混入率:1.42%。GA21Hを対象とした場合、CaM混入率:1.61%、MON810混入率:1.85%、GA21混入率:6.38%(Table 1)。また、各小分け試料から得られたCaM、MON810およびGA21混入率をロジット変換した後、それぞれを一元配置の

分散分析により解析した結果、いずれの試料に関しても、混入率のF比は有意水準( $p=0.05$ )を下回った(Table 2)。

#### 2. 試料の安定性

共同試験期間として設定した期間において、規定した $-20^{\circ}\text{C}$ の条件で保存した場合の試料の安定性について検討した。上記条件下で保存する直前(共同試験開始直前)と、約1ヶ月間保存した後(試験終了直後)に、各小分け試料6本を対象にCaM、MON810ならびにGA21定量法を用いて分析を行った。保存の前後に得られた混入率についてF検定を行い、等分散が確認された場合にはStudent t検定、確認されなかった場合にはAspin-Welch t検定により解析した結果、試料、定量法の違いに依らず有意水準 $p=0.05$ での有意な差は認められなかった(Table 3)。

Table 1 Results of Homogeneity Study

Method	Sample	Number of measurements	Run 1		Run 2		Total	
			Amount (%)	R.S.D. (%)	Amount (%)	R.S.D. (%)	Amount (%)	R.S.D. (%)
CaM	GA21L	6	1.72±0.17	10.0	1.43±0.09	6.0	1.58±0.20	12.7
	GA21H	6	1.50±0.14	9.5	1.71±0.09	5.3	1.61±0.16	9.8
MON810	GA21L	6	1.58±0.14	10.5	1.76±0.10	5.7	1.67±0.14	8.5
	GA21H	6	1.71±0.09	5.0	1.99±0.20	10.2	1.85±0.21	11.0
GA21	GA21L	6	1.35±0.10	1.8	1.42±0.38	20.6	1.42±0.21	14.6
	GA21H	6	6.68±0.20	3.0	6.08±0.17	2.8	6.38±0.35	5.5

Data represent means ± S.D.

Table 2 Results of One-way Analysis of Variance on Homogeneity Study

Method	Samples	Source of variation	df	Sum of squares	Mean square	F	Critical value of F ( $p=0.05$ )
CaM	GA21L	Between samples	5	0.007	0.0014	0.3322	4.3874
		Analytical	6	0.026	0.0043		
	GA21H	Between samples	5	0.005	0.0010	0.3469	4.3874
		Analytical	6	0.017	0.0029		
MON810	GA21L	Between samples	5	0.004	0.0009	0.4614	4.3874
		Analytical	6	0.011	0.0018		
	GA21H	Between samples	5	0.008	0.0016	0.5499	4.3874
		Analytical	6	0.018	0.0029		
GA21	GA21L	Between samples	5	0.024	0.0047	2.0464	4.3874
		Analytical	6	0.014	0.0023		
	GA21H	Between samples	5	0.001	0.0001	0.1173	4.3874
		Analytical	6	0.007	0.0011		

Table 3 Results of Stability Study

Method	Samples	Amount (%)		F	Critical value of F ( $p=0.05$ )	Student t	Aspin-Welch t	Critical value of t (95% confidence level)
		Before	After					
CaM	GA21L	1.91±0.22	1.96±0.23	1.145	5.050	0.386	1.922	2.228
	GA21H	1.90±0.09	1.88±0.15	2.867	5.050	0.355		2.228
MON810	GA21L	1.70±0.19	1.78±0.15	1.687	5.050	0.791	1.922	2.228
	GA21H	1.84±0.12	1.74±0.05	5.706	5.050	1.922		2.365
GA21	GA21L	1.48±0.11	1.38±0.18	2.883	5.050	1.262	1.922	2.228
	GA21H	7.14±0.37	7.39±0.23	2.52	5.050	1.381		2.228

Data represent means ± S.D. (n=6)

### 3. 共同試験結果の解析

#### (1) DNA抽出

DNA抽出法の違いによるDNA収量、質およびそれらのばらつきについて検討するため、GA21Hから分取した9検体について、参加機関から報告された測定値を集計した(Table 4)。DNA抽出法として全33機関中28機関がシリカゲル膜タイプキット法(mini法)を、5機関がCTAB法を採用しており、食安発第0628001号に記載されている3種のDNA抽出法のうちシリカベースレジソタイプキット法を採用した機関はなかった。DNA収量およびそのばらつきを解析した結果、CTAB法を採用した5機関のうち、機関5および30は、同法を採用した他の3機関でのDNA収量の平均±S.D.( $2.62 \pm 0.59 \mu\text{g}$ )に比べ、明らかにDNA収量が大きいたことが明らかとなったが、調査項目を精査した結果、機関5ではポリエチレングリコールを用いた沈殿操作を加える、また機関30においてはホモジナイズに乳鉢を使用するなど、公定分析法からの逸脱が確認され、それら改変操作に起因する結果であ

ると考えられた。また、mini法を使用した28機関でのDNA収量の平均±S.D.は $22.85 \pm 7.71 \mu\text{g}$ であり、平成15年にわれわれが実施した共同試験調査<sup>18)</sup>において得られたDNA収量の平均±S.D. ( $19.65 \pm 6.11 \mu\text{g}$ )と同程度であると考えられた。さらに9検体間でのDNA収量のばらつきについてより明確にすることを目的に相対標準偏差(R.S.D.)について解析した結果、全33機関でのばらつきの平均(機関別に報告された収量に対するR.S.D.の平均)が14.66%であったのに対し、機関1、11および19でのばらつきが、それぞれ62.39、25.50、48.94%と大きな値を示した。

#### (2) 報告された混入率の統計解析

##### (2)-1. データ・クリーニング

各機関で算出された混入率を対象に、全機関から報告された混入率の平均±3S.D.を基準としてデータ・クリーニングを行った結果、機関28から報告された全混入率が基準を超えることが明らかになった。このため、機関28を混入率に

Table 4 Quality and yield of DNA extracted using two DNA extraction methods

Method	Laboratory	DNA ( $\mu\text{g}$ )	R.S.D. (%)	Ratio		
				260nm/280nm	260nm/230nm	
Silica-gel membrane	1	26.19±16.34	62.39	1.80±0.01	2.65±1.20	
	2	27.19±1.38	5.08	1.82±0.02	1.91±0.06	
	3	18.51±3.74	20.21	1.87±0.02	1.77±0.08	
	4	23.26±1.36	5.85	1.68±0.04	2.08±0.25	
	6	23.96±1.74	7.26	1.67±0.10	2.05±0.17	
	7	14.93±0.73	4.89	1.74±0.13	2.14±0.07	
	8	23.22±3.45	14.86	1.69±0.17	2.32±0.68	
	9	15.54±0.61	3.93	1.74±0.02	1.93±0.05	
	10	20.08±3.81	18.97	1.80±0.02	2.08±0.08	
	12	17.38±2.70	15.54	1.68±0.03	1.78±0.18	
	13	23.38±1.48	6.33	1.74±0.02	2.27±0.21	
	14	19.37±1.32	6.81	1.79±0.04	2.22±0.08	
	16	18.44±0.97	5.26	1.74±0.02	1.93±0.06	
	17	16.94±3.41	20.13	2.05±0.28	2.39±0.35	
	19	25.03±12.25	48.94	1.85±0.04	1.69±0.18	
	20	23.01±1.28	5.56	1.77±0.02	2.12±0.06	
	21	24.08±2.30	9.55	1.87±0.01	2.40±0.09	
	22	27.77±2.84	10.23	1.80±0.09	1.45±0.36	
	23	23.90±0.57	2.38	1.86±0.01	2.20±0.12	
	24	43.78±8.20	18.73	1.81±0.03	1.95±0.13	
	25	15.76±3.33	21.13	1.90±0.12	1.89±0.98	
	26	22.19±3.63	16.36	1.80±0.00	2.28±0.06	
	27	31.84±5.91	18.56	1.81±0.02	2.67±0.42	
	28	24.68±2.01	8.14	1.78±0.04	2.10±0.13	
	29	13.18±2.61	19.80	1.76±0.02	1.93±0.03	
	31	29.19±2.84	9.73	1.88±0.04	2.30±0.13	
	32	28.17±2.78	9.87	1.75±0.02	1.97±0.05	
	33	18.84±4.64	24.63	1.80±0.09	2.09±0.37	
	CTAB	5	217.62±18.02	8.28	1.88±0.01	2.13±0.10
		11	3.02±0.77	25.50	1.58±0.10	2.22±2.42
		15	2.21±0.31	14.03	1.62±0.04	1.38±0.08
		18	2.63±0.28	10.65	1.86±0.13	1.91±0.70
		30	17.62±0.76	4.31	1.75±0.02	1.03±0.01

Data represent means ± S.D. (The data obtained from nine test portions for GA21H were calculated.)

ついでに解析対象外とし、残りの32機関から報告された混入率について統計解析を行った。なお、機関28から報告された混入率が逸脱した値であったことの原因として、混入率算出方法の誤用が明らかになった。そのため、別途報告された測定値を正しい算出方法に従い再計算をしたところ、GA21Lを対象としたスクリーニング試験(GA21Lスクリーニング試験)におけるCaMおよびGA21混入率の平均±S.D.は、それぞれ $1.64 \pm 0.09$ および $1.11 \pm 0.10\%$ 、GA21Hを対象としたスクリーニング試験(GA21Hスクリーニング試験)におけるCaMおよびGA21混入率の平均±S.D.は、それぞれ $1.65 \pm 0.38$ および $5.42 \pm 0.45\%$ 、GA21Hを対象とした系統特異的定量試験(GA21H系統定量試験)におけるMON810およびGA21混入率の平均±S.D.は、それぞれ $1.36 \pm 0.11$ および $5.70 \pm 0.38\%$ であった。これら再計算された混入率と他機関から報告された混入率とを合わせ、全33機関として統計処理を行い、各種統計量、Z-スコアの算出、Xbar-R管理図の作成を行った結果、機関28から報告された混入率に精度管理上の逸脱は認められなかった。しかし、データの取り扱いに関する不備として他機関から報告された分析結果と同一に扱うべきではないとの判断から、以下に結果として示す統計処理には含めなかった。

## (2)-2. GA21Lスクリーニング試験

GA21LにおけるCaMおよびGA21混入率について解析し、Z-スコアおよびXbar-R管理図を示した(Fig.1~3)。Fig.1およびFig.2に示されるように、32機関から報告されたGA21LにおけるCaMおよびGA21混入率の平均±S.D.は、それぞれ $1.75 \pm 0.28$ および $1.43 \pm 0.23\%$ であった。さらに、CaM混入率とGA21混入率の合算値(総GMトウモロコシ混入率)の平均

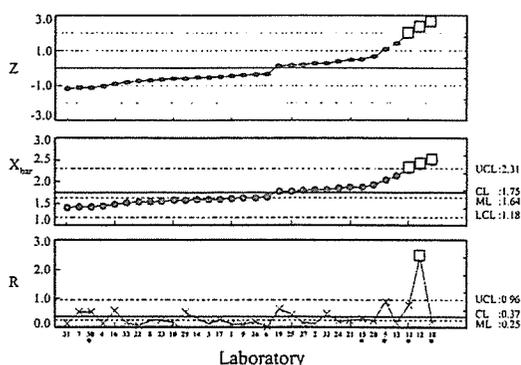


Fig. 1. Z-score, Xbar and R chart for CaM amount in three test portions of GA21L samples measured as screening trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean ± 2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; UCL: Upper control limit, CL: Central limit (Mean), LCL: Lower control limit, ML: Median

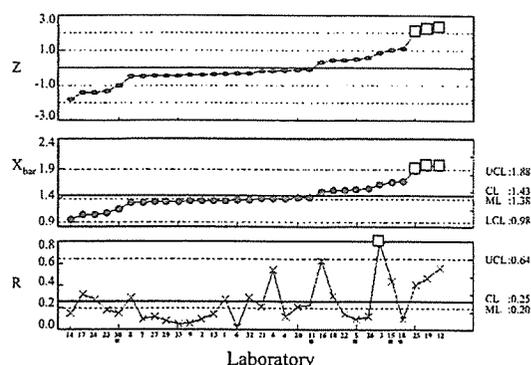


Fig. 2. Z-score, Xbar and R chart for GA21 amount in three test portions of GA21L samples measured as screening trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean ± 2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

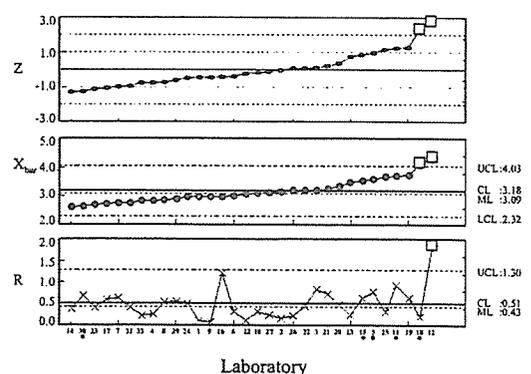


Fig. 3. Z-score, Xbar and R chart for total GM maize amount in three test portions of GA21L samples measured as screening trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean ± 2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

±S.D.は $3.18 \pm 0.43\%$ であった(Fig.3)。また、XbarおよびZ-スコアの管理限界を超えた機関がCaMおよびGA21混入率についてそれぞれ3機関、総GMトウモロコシ混入率について2機関、Rが管理限界を超えた機関がそれぞれの項目につき1機関ずつあった(Fig.1~3)。

## (2)-3. GA21Hスクリーニング試験

GA21HにおけるCaMおよびGA21混入率について解析し、ZスコアおよびXbar-R管理図を示した(Fig.4~6)。Fig.4およびFig.5に示されるように、GA21HにおけるCaM混入率およびGA21混入率の平均±S.D.は、それぞれ $1.69 \pm 0.27$ および $6.62 \pm 0.96$ であった。さらに、総GMトウモロコシ混入率の平均±S.D.は $8.31 \pm 1.04\%$ であった(Fig.6)。また、XbarおよびZスコアが管理限界を超えた機関がCaM混入率について3機関、GA21混入率について2機関、総GMトウモロコシ混入

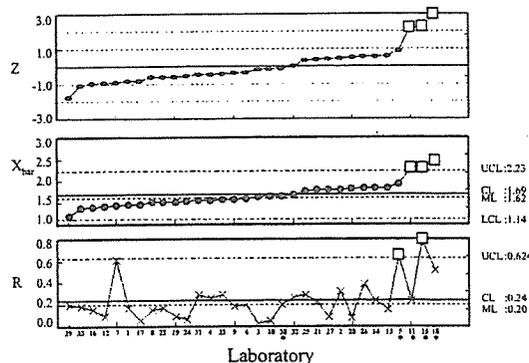


Fig. 4. Z-score, Xbar and R chart for CaM amount in three test portions of GA21H samples measured as screening trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

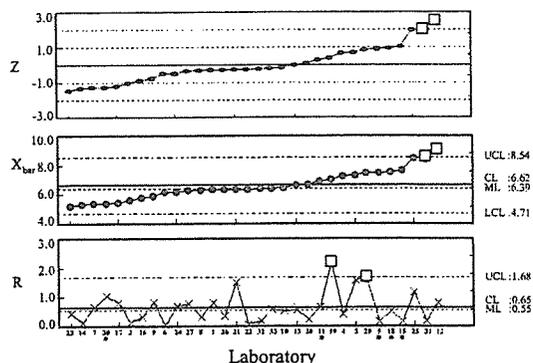


Fig. 5. Z-score, Xbar and R chart for GA21 amount in three test portions of GA21H samples measured as screening trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

率について1機関あった。さらに、Rが管理限界を超えた機関がCaMおよびGA21混入率についてそれぞれ2機関、総GMトウモロコシ混入率について1機関認められた(Fig.4~6)。

## (2)-4. GA21H系統定量試験

GA21HにおけるMON810およびGA21混入率について解析し、ZスコアおよびXbar-R管理図を示した(Fig.7~9)。Fig.7およびFig.8に示されるように、MON810およびGA21混入率の平均±S.D.は、それぞれ $1.75 \pm 0.29$ および $6.51 \pm 0.76\%$ で

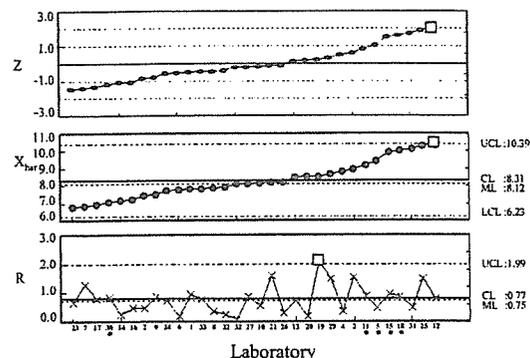


Fig. 6. Z-score, Xbar and R chart for total GM maize amount in three test portions of GA21H samples measured as screening trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

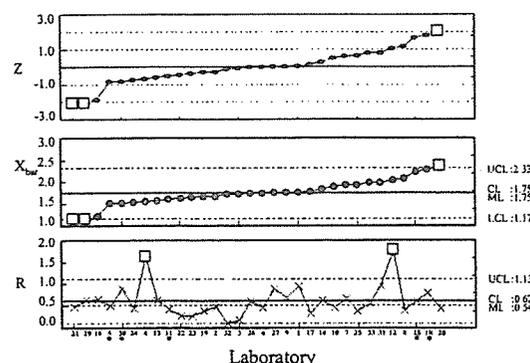


Fig. 7. Z-score, Xbar and R chart for MON810 amount in nine test portions of GA21H samples measured as line specific quantification trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs. Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

あった。さらに、MON810混入率とGA21混入率の合算値(総GMトウモロコシ系統混入率)の平均±S.D.は $8.27 \pm 0.90\%$ であった(Fig.9)。また、XbarおよびZスコアが管理限界を超えた機関がMON810混入率について3機関、GA21および総GMトウモロコシ系統混入率についてそれぞれ2機関あった。さらに、Rが管理限界を超えた機関がMON810およびGA21混入率についてそれぞれ2機関、総GMトウモロコシ系統混入率について3機関認められた(Fig.7~9)。

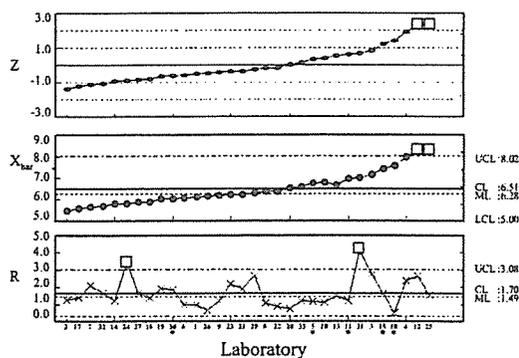


Fig. 8. Z-score, Xbar and R chart for GA21 amount in nine test portions of GA21H samples measured as line specific quantification trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

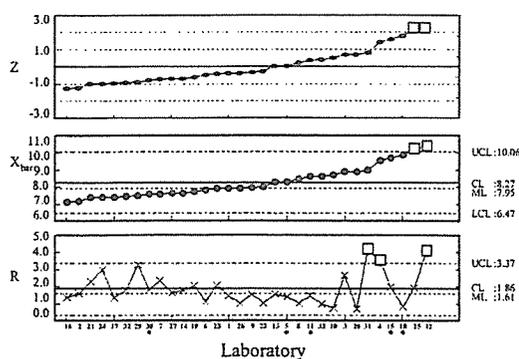


Fig. 9. Z-score, Xbar and R chart for total GM maize amount in nine test portions of GA21H samples measured as line specific quantification trial

Individual data are represented as a circle (in Xbar chart and Z-score; ○) or a cross (in R chart; ×). The mean (central limit) of each value is illustrated as bold horizontal lines. Upper and lower control limits are represented as mean  $\pm$  2 S.D. The data, which are over the upper or lower control limit, is represented as a square (□).

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

### (3) *SSIb*測定値(コピー数)のばらつき

GA21Hを対象にMON810混入率を算出するために行われた試験の結果から、9検体のDNA試料液について得られた*SSIb*測定値を抽出し、その平均値およびR.S.D.を算出した。その結果、全32機関での*SSIb*測定値の平均±S.D.は $31451.74 \pm 13656.95$ コピー、mini法を採用した27機関での平均±S.D.は $33654.39 \pm 13414.41$ コピー、CTAB法を採用した5機関での平均±S.D.は $19557.41 \pm 7441.65$ コピーであった。また、*SSIb*測定値のばらつきについて機関別にみると、機関1、4、11、19および24におけるR.S.D.が、それぞれ73.33、64.45、37.40、85.10、および58.93%であり、上記5機関を除く28機関のそれぞれで得られたR.S.D.の平均値(12.19%)を大きく上回った(Fig.10)。

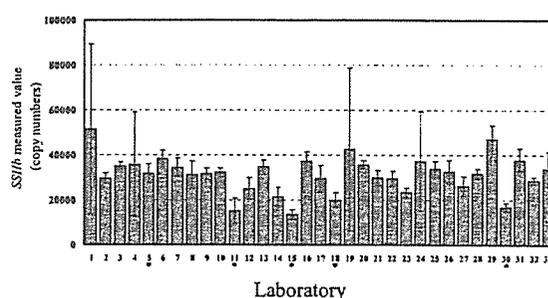


Fig. 10. *SSIb*-measured values obtained from nine test portions, which were derived from GA21 H samples

\* indicates the laboratories in which CTAB method was used to extract DNAs.

Data represent means  $\pm$  S.D. (n=9)

## IV 考察

### 1. 試料の妥当性

GA21LおよびGA21Hを調製するためのマトリクスとして使用したnon-GMトウモロコシ試料粉砕物から、6点の検体を分取し抽出したDNA試料液を用いてCaM、MON810およびGA21混入率を分析した結果、それぞれの平均±S.D.は $0.39 \pm 0.01$ 、 $0.40 \pm 0.06$ 、および $0.10 \pm 0.03\%$ であった。このマトリクス試料に対し、GA21LではGA21およびMON810試料をともに1.0%、GA21HではGA21試料を5.0%、MON810試料を1.0% (w/w)の割合で含有するように調製を行った。しかし、Table 1に示したとおり、調製した試料より得られた各混入率は、マトリクス試料から得られた混入率を勘案してもなお、すべての試料において重量混合比に比べ高い値を示した。重量混合比に対し実測した混入率が高い値を示した要因としては、トウモロコシ品種の差に起因し、混合した試料間で単位重量あたりの水分等の成分組成率が異なっていた可能性などが考えられるが、明確な原因は不明である。しかし、一元配置の分散分析の結果としてF比が有意水準を下回り、かつ共同試験期間、規定した保存条件で保存した場合、保存の前後に得られるそれぞれの混入率に有意な変動