

がないことが確認されたことから、共同試験に使用する試料として必要な均一性ならびに安定性が確認されたものと判断した(Table 2およびTable 3)。

## 2. 共同試験結果の解析

### 2-1. *SSIb*測定値、DNAの収量、質およびそれらのばらつき

定量PCR法において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(*SSIb*)の測定値と、各GMトウモロコシ系統に共通もしくは特異的に含まれる組換えDNA配列の測定値をリアルタイムPCRによりそれぞれ測定し、得られた測定値の比に換算係数(内標比)の逆数を乗じて算出される。また、試料およびDNA抽出法が一定であった場合には、*SSIb*測定値は基本的に一定の値を示すと考えられることから、DNAの収量と質、およびそれらのばらつきとあわせ、*SSIb*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、精度管理上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有効である。

そこで、GA21Hから分取された9検体についてDNA収量、質およびそれらのばらつきと、*SSIb*測定値のばらつきについて解析した。その結果、DNA収量のばらつきについては、機関1、11および19におけるR.S.D.が25%を越えており、これら3機関を除いた30機関のR.S.D.の平均(11.57%)に比べ明らかに大きな値を示した(Table 4)。また、*SSIb*測定値のばらつきについては、機関1、4、11、19および24におけるR.S.D.が25%を越えており、これら5機関を除いた28機関のR.S.D.の平均(12.19%)に比べ明らかに大きな値を示した(Fig.10)。機関1、11および19に関しては、DNA収量と*SSIb*測定値のばらつきの両方において問題が認められたことから、DNA抽出操作あるいは、DNA収量を算出するために使用する吸光度を測定する際に問題が生じており、それらを原因として*SSIb*測定値がばらついたものと考えられた。また、上記3機関のうち機関1および11に関しては、DNA収量以外にも、DNAの質を評価するための吸光度比のうち260/230 nmにおいて、明確なばらつきが認められており(Table 4)、このことからDNA抽出操作あるいは吸光度測定操作に問題があったことが示唆される。さらに、DNA収量および*SSIb*測定値のばらつきの点からは問題とはならなかったが、CTAB法をDNA抽出法として採用した5機関中、前述の機関11を含む4機関から報告された吸光度比および*SSIb*測定値のいずれかに、mini法を採用した機関から報告された値に比べ、低い値が認められた。この結果は、CTAB法の特徴としてDNAの精製が不十分になりやすいことに加え、mini法に比べ操作が煩雑であることが原因ではないかと考えられた。特に、260/230 nm および*SSIb*測定値の低下に関しては、CTAB緩衝液中に含まれる物質のうち、EDTAが230 nm付近に強い吸収を有するため、これが残存した場合は260/230 nm の低下が生じ、また、260 nmの吸収が干渉を受けるためDNAの質量が高く見積もられ、その結果として*SSIb*測定値の低下が生じる可能性があるのではないかと考えられる。このため、CTAB法を使用する機関においては、230 nmの吸光度やDNA収量のばらつきを指標とし、定量PCR法に供するのに適した

DNAを安定して抽出可能とするため、十分操作に習熟することが望ましいと考えられた。機関24に関しては、DNA収量、質およびそれらのばらつきと*SSIb*測定値のばらつきに相関性が認められず、PCR試薬調製操作の手技的なばらつきあるいはPCR機器におけるシグナル検出のばらつきが示唆される。また、機関4に関しては、*SSIb*測定値のばらつきを解析するために使用した9検体のデータ中、1検体のデータが異常であったことが大きなばらつきの原因であり、前述の機関に認められるような系統的な問題ではないと考えられた。

### 2-2. 測定値の取り扱いに認められた問題

データ・クリーニングの結果、機関28から報告された全ての混入率が基準を逸脱した。その原因については前述の通り、各定量法を用いて得られた測定値を基に混入率を算出するにあたり、誤った算出方法を用いたためであった。正しい算出方法により再計算された混入率が精度管理上問題のない値であったことから、分析精度に問題がないことは確認された。しかしながら、最終的な報告および判断が混入率をもって行われることを鑑みると、データの確認体制についての見直しが必要ではないかと考えられた。

### 2-3. 管理限界を上回った各機関における問題点

前述の機関28を除く全32機関から報告された混入率を対象に行った統計解析の結果、複数の機関に問題が認められた。以下、問題が認められた機関につき、その原因を考察する。

機関12に関しては、全試験を通じ、計7項目でZスコアが2以上となった(Fig.1、2、3、5、6、8およびFig.9)。さらに、4項目でRが管理限界を超えており、併行再現性も不良であると考えられた(Fig.1、3、7およびFig.9)。機関12からの報告を詳細に検討したところ、解析操作上用いられるThreshold line (Th. line) がnon template control (NTC) と交差する、検量線の相関係数が0.990を下回るなどの問題が認められた。Th. line とNTCが交差する原因については、手技の誤り、試薬およびPCR機器の不良など幾つかの原因が考えられ、特定することは出来ないが、試験としての異常が推測される。このため、JAS分析試験ハンドブックにおいては試験の棄却基準の一つとされている。また、検量線の相関係数が0.990を下回った場合については、食安発第0628001号においても試験結果を棄却することが明示されている。また、公定分析法に規定されている定量PCR用のプレートならびにフタを使用していないことも報告されており、これらの逸脱が分析結果に重大な影響を与えている可能性も示唆された(プレートではなく8連のチューブを使用した旨報告されており、材質による反応系、および定量PCR機器の光学系への影響が考えられる)。以上のことから、機関12については、手技の習熟および試験法の理解が不十分であることが原因となり、不正確な分析結果が報告されたものと考えられた。なお、定量PCRのフタに関しては、機関13からも同様の報告があったが、分析結果には問題が認められなかった。しかし、検証された方法である公

定分析法からは逸脱しているため、修正することが望ましいと考えられる。

機関11および18からは、GA21LおよびGA21Hスクリーニング試験について、機関15からはGA21Hスクリーニング試験について、いずれもCaM混入率に関しZ-スコアが管理限界を超える結果が報告された(Fig.1およびFig.4)。また、機関18に関しては、GA21Lより得られた総GMトウモロコシ混入率についてもZ-スコアが管理限界を超えていた(Fig.3)。これらの機関はいずれもDNA抽出法にCTAB法を採用しており、定量PCRに供したDNAの質や、PCR組成液に規定量のDNAを添加出来なかったこと等が混入率に影響を与えた可能性が考えられた。しかし一方で、機関18ではすべての試験項目において、全32機関の平均値に比べ高めの混入率が算出される傾向が認められ、またそれらのばらつきも小さいことから、PCR用試薬もしくは定量PCR機器の精度、あるいはDNA抽出法自体に系統誤差が含まれている可能性も考えられる。

機関19からはGA21Lスクリーニング試験について、GA21混入率のZ-スコアが管理限界を超える値が報告された(Fig.2)。また、GA21Hスクリーニング試験におけるGA21混入率、ならびに総GMトウモロコシ混入率についてはRが管理限界を上回った(Fig.5およびFig.6)。機関19については先に言及したとおり、DNA収量およびSSIIb測定値のばらつきが大きいことが明らかになっている。さらに、DNA収量ならびにSSIIb測定値の解析に供した9検体について、検体ごとにDNA収量とSSIIb測定値の相関性について検討した結果、概してDNA収量の少ない検体ほどSSIIb測定値が高い傾向が認められ、この結果からも抽出DNAの吸光度測定に問題がある可能性が考えられた。

さらに機関20、21および29においては、GA21H系統定量試験におけるMON810混入率、機関25においては、GA21Lスクリーニング試験におけるGA21混入率および総GMトウモロコシ混入率、機関31においては、GA21Hスクリーニング試験におけるGA21混入率に関し、Z-スコアが管理限界を超えていた(Fig.2、3、5およびFig.7)。しかし、これらの機関については、報告された各測定値および調査項目からその原因について考察することが出来なかった。

また、前述の機関以外にも、機関番号3、4、24、29および31から報告された混入率に、Rの管理限界を超える結果が含まれていた(Fig.2、5、7およびFig.8)。これらのばらつきの要因について、報告された各測定値および調査項目からは明らかにすることができなかった。しかし、栗原らの報告<sup>19)</sup>によれば、GMトウモロコシを対象とした定量PCR法により得られる混入率の室内再現性(R.S.D.r)は、対象とするGMトウモロコシ系統およびその濃度によって変動はあるものの、概して20%程度であることが示されている。全32機関から報告された混入率についてR.S.D.rを算出したところ、Rが管理限界を超えた機関のうち機関3、12、24を除く機関に関しては、他機関にくらべて大きめではあるが、R.S.D.rは20%程度であることが明らかになった。Rは、併行試験された複数検体から得られた混入率の最大値と最小値の差であるため、簡

便にばらつきを判断することが可能であるが、本研究において実施した共同試験の結果からは、Rにより分析結果のばらつきを直接評価することが難しい場合があることが示唆された。また、本研究における管理限界は各機関から報告された値の総平均±2S.D.として設定したが、この場合、全参加機関数の5%に相当する数の機関が必ず管理限界を超える結果になるため、分析法としてのばらつきを加味した上で分析精度の管理を行うのであれば、共同試験の結果として得られたばらつきを試験用試料の認証値に付与することで管理限界を設定するという方法も、方策のひとつとして検討すべきであると考えられる。

## V まとめ

遺伝子組換えトウモロコシ(GA21ならびにMON810系統)を対象とした外部精度管理を目的に、試験的に実施した共同試験の結果、データの確認体制に不備のある機関がみられた。また、手技の習熟および試験法の理解が不十分であることに起因すると考えられる不正確な結果を報告した機関があった。また精度管理上の管理限界を超えた機関から報告された分析値を詳細に解析した結果、DNA収量、質およびそれらのばらつき、またSSIIb測定値のばらつきが明らかとなり、DNA抽出操作の不安定さ、吸光度測定およびPCR組成液の調製操作の不正確さが分析結果に重大な影響を与える要因であることが強く示唆された。その他として、分析結果のばらつきの評価法および管理限界の設定法に関して、分析法そのものが有するばらつきを加味することについて、今後検討していく必要があると考えられた。

## VI 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。

## VII 文献

- 1) James C., Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. ISAAA: Ithaca, NY, No.32 (2004).
- 2) Hino A., Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience. Toxic. Pathology., 30, 126-128 (2000).
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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).
- 6) 厚生労働省医薬食品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).
  - 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17年5月17日,食発第0517001号(2005).
  - 8) 食品衛生法施行規則(昭和23年厚生省令第23号).
  - 9) 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).
  - 10) 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).
  - 11) 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).
  - 12) 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)*, 46, 270-276 (2005).
  - 13) 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).
  - 14) 独立行政法人 農林水産消費技術センター:JAS分析試験ハンドブック“遺伝子組み換え食品検査・分析マニュアル 改訂第2版”(2002).
  - 15) Thompson, M., Wood, R., International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.* 76, 926-939 (1993).
  - 16) Horwitz, W. ed., “Official methods of analysis of AOAC International” 17th Ed., Gaithersburg, MD, AOAC International, Appendix D, pp 2-11 (ISBN 0-935584-67-6).
  - 17) 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(4),J-325-332(1998), 40(4),J-325-331(1999), 41(3),J-238-242(2000), 41(5),J-316-322(2000).
  - 18) Watanabe, T., Kasama, K., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T., Examination of a system for laboratory-performance study of quantitative PCR methods to analyze an approved genetically modified maize(Mon810 line). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, in press.
  - 19) Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirano, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A., Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.* 85, 1077-1089 (2002).

## 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

(2006年4月17日受付)

(2006年6月30日受理)

渡邊敬浩<sup>a)</sup>、時下祥子<sup>a)</sup>、菊地博之<sup>a)</sup>、坂田こずえ<sup>a)</sup>、日野明寛<sup>b)</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) (独)食品総合研究所

### Comparative study of four methods to extract genomic DNA for quantification of genetically modified maize by a real-time polymerase chain reaction

(Received April 17, 2006)

(Accepted June 30, 2006)

Takahiro Watanabe<sup>a)</sup>, Shoko Tokishita<sup>a)</sup>, Hiroyuki Kikuchi<sup>a)</sup>,  
Kozue Sakata<sup>a)</sup>, Akihiro Hino<sup>b)</sup>, Hiroshi Akiyama<sup>a)</sup>, Tamio Maitani<sup>a)</sup>

a) National Institute of Health Sciences

b) National Food Research Institute

#### Abstract

A method based on the real-time polymerase chain reaction (PCR) has been developed as the Japanese official standard method for the quantitative analysis of approved genetically modified (GM) maize by the Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLW) and the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries (MAFF). MHLW also defines three methods to extract genomic DNA used as analytes in the real-time PCR method. These three DNA extraction methods include a method using a silica-gel membrane kit (mini method), a silica-based resin type kit (WIZARD method), and the method using a buffer containing cetyltrimethylammonium bromide (CTAB method). On the other hand, the DNA extraction method using a larger size silica-gel membrane kit (MAXI method), which was employed in collaborative studies to evaluate the performance of the real-time PCR method, has been identified by MAFF for the same purpose. However, the influence of the DNA extraction methods on the GM maize quantitative value using the real-time PCR method has not been demonstrated. Therefore, genomic DNA was extracted from the mixed flour-sample containing a known amount of MON810 and GA21 line, according to four different DNA extraction methods, and analyzed by the real-time PCR method with the aim of examining the influence of the extraction methods on the GM maize quantitative value.

**Keywords :** DNA抽出法、遺伝子組換えトウモロコシ、定量PCR、検査方法

DNA extraction method, genetically modified maize, quantitative polymerase chain reaction, testing method

#### 1 緒言

厚生労働省は、「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、一部改正:平成17年5月17日、食安発第0517001号)<sup>1), 2)</sup>を通知し、遺伝子組換え(GM)食品に関する検査方法(通知法)を定めた。本通知法において、安全性審査を終了したGMトウモロコシの定量分析法として、定量PCR法が定められている。また定量PCR法における直接の分析対象物質となるDNAを抽出・精製する方法については、3種の方法(シリカゲル膜タイプキット法;

mini法、シリカベースレジスタタイプキット法;WIZARD法、セチルトリメチルアンモニウムブロミド法;CTAB法)が併記されている。一方で、国立医薬品食品衛生研究所ならびに(独)食品総合研究所が中心となり実施した、定量PCR法の妥当性確認試験においては、上記3種のDNA抽出法とは異なる方法(シリカゲル膜タイプキット法;MAXI法)がDNA抽出法として採用された。このため、定量PCR法によりGMトウモロコシの含有率(定量値)を算出する際に使用される換算係数(内標比;内在性遺伝子とGM作物に特異的なDNA配列のコピー数の比)には、MAXI法により抽出されたDNA試

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

料を用いた共同試験の結果として得られた実測値が規定されている。またMAXI法は、(独)農林水産消費技術センターにより監修されているJAS分析試験ハンドブック<sup>3)</sup>において、定量PCR法に供するDNAを抽出・精製するための方法として示されている。これらのことを背景に、安全性審査を終了したGMトウモロコシを対象とした定量分析を行う場合には、試験者はまず、通知法あるいはJAS分析試験ハンドブックのいずれに従うかによって、MAXI法もしくは、それ以外の3種のDNA抽出法を選択する。また、通知法に従う場合には、3種のDNA抽出法と定量PCR法との組み合わせに試験法上の制限がされていないことから、いずれかのDNA抽出法を任意に選択する。このため、事実上、試験者は4種のDNA抽出法を任意に選択することが可能である。しかし、これらDNA抽出法の違いが分析結果に与える影響についてはこれまでに明らかにされていない。

本研究においては、異なる方法を用いて抽出されたDNAが、定量PCR法により得られるGMトウモロコシの定量値に与える影響について明らかにすることを目的とし、各DNA抽出法を用いて抽出されたDNAの質ならびに収量、DNA分解の程度、さらに定量PCR法により得られる定量値について詳細な比較解析を行った。

## 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、米国の商社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  $\mu\text{m}$ のスクリーンを取り付けた高速遠心式粉碎器を用いて粉碎した。均一に粉碎した各種トウモロコシ試料を凍結乾燥処理した後、GA21ならびにMON810系統の粉碎試料はそれぞれ、100%GMトウモロコシ試料(GA21試料およびMON810試料)として用いた。また、Non-GMトウモロコシ試料を粉碎および凍結乾燥処理して調製し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。なお、これら擬似混入試料は小分け試料とした後に、平成16年度に実施した外部精度管理試験において配付した試料であり、その均一性、 $-20^{\circ}\text{C}$ の条件で保存した場合の定量値の安定性が確認されている<sup>4)</sup>。

### 2. 試薬

DNAの抽出精製にはmini法として、QIAGEN社製DNeasy Plant Mini Kit、MAXI法としてQIAGEN社製DNeasy Plant Maxi Kit、WIZARD法としてPromega社製Wizard DNA Clean-

up system、また、CTAB法としてセチルトリメチルアンモニウムブロミドを含む各種試薬を用いた。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

各種試料の粉碎および混合には、ZM 100(Retch社製)を使用した。試料からのDNA抽出・精製および濃度測定には、以下の機器を使用した。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装置には、ABI PRISM<sup>®</sup> 7700(ABI社製)を使用した。

### 4. DNA抽出法

MON810試料、GA21試料、GA21LおよびGA21Hの計4種の試料を共通の試料として用い、mini法、WIZARD法、CTAB法およびMAXI法を用いてDNAを抽出・精製した。各DNA抽出法は、食安発第0517001号もしくはJAS分析試験ハンドブックに記載されている方法に従った。MAXI法を用いた場合には、各試料について、1点あたり1gとなるように秤量分取した小分け試料6点(計24点)からDNAを抽出した。その他のDNA抽出法を用いた場合には、GA21LおよびGA21Hに関しては6点ずつ、MON810試料ならびにGA21試料に関しては3点ずつ、計18点の小分け試料からDNAを抽出した。

また、抽出したDNAの吸光度を200 nmから320 nmの波長域で連続的に測定し、O.D. 230 nm、260 nm、280 nmでの吸光値から260 nm/280 nmおよび260 nm/230 nmの比を求めらることで精製度の確認を行った。また、O.D. 260 nmの吸光値1を50 ng/ $\mu\text{L}$  DNAとしてDNA濃度を算出した。

### 5. 電気泳動

各試料、各DNA抽出法の組み合わせにより抽出された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0.7%の濃度で調製したアガロースゲル(6 cm $\times$ 11 cm)を用い、マーカーとして $\lambda$ -HindIII digestを用いた。20 ng/ $\mu\text{L}$ の濃度に調製した各DNA試料液15  $\mu\text{L}$ とLoading Buffer 2  $\mu\text{L}$ をよく混合させた後、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(150 ng/mL)で30分間染色し、その後、水中で30分間脱染色した。脱染色後のゲルをUV照射装置上で画像解析した。

## 6. 定量PCR法

食安発第0517001号に記載の方法に準拠した。すなわち、CaM定量値およびCaM内標比は、P35S-1オリゴヌクレオチドセットとSSIIb-3オリゴヌクレオチドセット、GA21定量値およびGA21内標比は、GA21-3オリゴヌクレオチドセットとSSIIb-3オリゴヌクレオチドセットをそれぞれ組み合わせ、GMトウモロコシプラスミドセットを共通の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、GA21LおよびGA21Hについては、MAXI法を用いた場合、抽出されたDNA試料に対して繰り返し2回測定し、それ以外のDNA抽出法を用いた場合には、1回の測定を行った。内標比を測定することを目的とした場合には、MAXI法については2回、それ以外のDNA抽出法については3回の測定を行った。

## 7. 統計解析

MAXI法により得られた結果と、その他のDNA抽出法により得られた結果との有意差検定として、各種統計解析を行った。

まず、GA21LおよびGA21Hと各DNA抽出法の組み合わせにより得られた定量値のそれぞれについて正規性を確認した。正規性が確認されなかった一群の定量値に関しては、マン・ホイットニーU検定により有意差を検定した。正規性の確認された一群の定量値に関しては、MAXI法と他のDNA抽出法との間で分散分析を行い、等分散を確認した後に、Student t検定を用いて有意差を検定した。

## III 結果および考察

### 1. DNAの収量、質およびそれらのばらつきの比較

本研究において対象とした4種のDNA抽出法のそれぞれ

を用いて抽出されるDNAの収量、質およびそれらのばらつきについて明らかにするため、各抽出法を用いてMON810試料、GA21試料、GA21LおよびGA21HのそれぞれからDNAを抽出し、測定した吸光値に基づき収量の算出および純度検定を行った。各抽出法を通して同数の小分け試料を用いたことから、GA21LならびにGA21Hをあわせて計12点の試料として扱い、抽出法別DNA収量の平均値を算出した。その結果、MAXI法によるDNAの平均収量は 43.21  $\mu\text{g}$ で最も高く、これに対し、CTAB法でのDNA収量が2.81  $\mu\text{g}$ で最低であった。また、mini法、WIZARD法を用いた場合のDNAの平均収量はそれぞれ19.36  $\mu\text{g}$ および13.16  $\mu\text{g}$ であった (Table 1)。

上記の通り、異なるDNA抽出法を用いることによりDNAの収量が異なることが明らかとなったが、その主たる原因は各DNA抽出法に含まれる縮分操作であると考えられる。MAXI法では1gの試料から縮分操作を行うことなくDNAを抽出する。これに対し、CTAB法、mini法、WIZARD法のいずれにおいても、2gの試料を対象に抽出を開始するものの、抽出緩衝液を添加し均一化した混合液の一部を分取し、それ以降の操作を行うという縮分操作が規定されている。CTAB法、mini法、WIZARD法の縮分率はそれぞれ1/75、1/13.27、1/40であり、おおよそDNAの収量と相関していると考えられた。また、実際の検査に際しては、試料によっては複数系統のGMトウモロコシが含まれており、系統別の定量値を算出するために繰り返し測定を行う必要が生じる場合も考えられる。このような場合には、収量の少ない抽出法を採用することで、DNA試料が不足する可能性が予測された。

DNA収量のばらつきに関しては、CTAB法を用いてGA21試料から抽出を行った場合に、相対標準偏差 (Relative Standard Deviation; R.S.D.) が30%程度の高いばらつきを示したが、その結果を除けばDNA抽出法および試料の種類によらずR.S.D.は20%を下回っており、安定した量のDNAが抽出されていると判断された。

Table 1. Quality and yield of DNA extracted from the samples using the four official DNA extraction methods

Method	Sample	Number of test portions	DNA ( $\mu\text{g}$ )	R.S.D. (%)	Ratio	
					260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
MAXI	GA21L	6	43.28 $\pm$ 4.07	9.41	1.84 $\pm$ 0.00	2.14 $\pm$ 0.03
	GA21H	6	43.13 $\pm$ 1.64	3.81	1.84 $\pm$ 0.00	2.16 $\pm$ 0.02
	GA21	6	33.58 $\pm$ 6.75	20.09	1.86 $\pm$ 0.00	2.25 $\pm$ 0.03
	MON810	6	35.93 $\pm$ 2.09	5.82	1.87 $\pm$ 0.01	2.29 $\pm$ 0.02
mini	GA21L	6	19.03 $\pm$ 1.63	8.57	1.83 $\pm$ 0.01	2.03 $\pm$ 0.02
	GA21H	6	19.69 $\pm$ 2.98	15.13	1.84 $\pm$ 0.14	2.03 $\pm$ 0.06
	GA21	3	18.22 $\pm$ 0.67	3.65	1.83 $\pm$ 0.02	2.29 $\pm$ 0.02
	MON810	3	17.15 $\pm$ 0.28	1.63	1.81 $\pm$ 0.00	2.36 $\pm$ 0.03
CTAB	GA21L	6	2.80 $\pm$ 0.10	3.63	1.81 $\pm$ 0.02	1.66 $\pm$ 0.06
	GA21H	6	2.81 $\pm$ 0.26	9.35	1.81 $\pm$ 0.01	1.65 $\pm$ 0.10
	GA21	3	2.05 $\pm$ 0.67	32.47	1.88 $\pm$ 0.06	1.42 $\pm$ 0.18
	MON810	3	2.30 $\pm$ 0.31	13.58	1.87 $\pm$ 0.01	1.58 $\pm$ 0.06
WIZARD	GA21L	6	12.91 $\pm$ 0.54	4.20	1.78 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.14
	GA21H	6	13.41 $\pm$ 0.30	2.22	1.80 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.04
	GA21	3	14.37 $\pm$ 0.25	1.75	1.80 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.04
	MON810	3	16.08 $\pm$ 0.41	2.53	1.81 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.04

Data represent means  $\pm$  S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

DNAの質について考察するために実施した純度検定においては、O.D. 260 nm / 280 nm、260 nm / 230 nmの比を求め、それぞれの値が1.8、2.0以上であることを良好な精製が行われたことの判断基準とした。Table 1に示したとおり、タンパク質残存の指標となる O.D. 260 nm / 280 nm比に関しては、すべてのDNA抽出法と試料の組み合わせにおいて基準を下回ることがなかったのに対し、糖類等の残存の指標とされる O.D. 260 nm / 230 nm比に関してはCTAB法およびWIZARD法を用いた場合に、すべての試料から得られたDNAについて基準を下回った。CTAB法に関しては、抽出緩衝液中に含まれるEDTAが230 nm付近に強い吸光を有するため、これが残存した場合にO.D. 260 nm / 230 nm比が低下することが指摘されている<sup>4)</sup>。またWIZARD法に関しては、抽出緩衝液に含まれるグアニジン化合物が230 nmに吸光を有することが知られており、これが残存したため、O.D. 260 nm / 230 nm比が低下したものと考えられた。

## 2. 抽出DNAの分子量分布

抽出されたDNAが極度に分解し低分子化していた場合、定量PCR法における鋳型となり得ず、内在性遺伝子もしくはGM作物特異的DNA配列を正しく計測することができなると考えられる<sup>5)</sup>。このため、各抽出法により抽出されたDNA試料中に含まれるDNAの分子量分布について明らかにするため、電気泳動法により分離し確認した。その結果、23 kbp付近のバンドを中心に、低分子方向にむけて薄い帯をひく、いわゆるスメア状の電気泳動像がすべての抽出法および試料の組み合わせにおいて観察された。また、GA21LおよびGA21Hにおいて特に顕著であるが、WIZARD法により抽出したDNA試料を分離した場合には、その他の抽出法により抽出したDNA試料を分離した場合に比べ、スメアな像がわずかに濃く染色されていた。この結果は、WIZARD法を用いてDNAを抽出した場合、他の抽出法に比べてDNAの低分子化が進みやすい傾向があることを示唆している。しか

し、極端に低分子化したDNAのみが観察されるといった明確な差は認められなかった (Fig. 1)。

植物組織からインタクトな高分子量ゲノミックDNAの抽出を試みた場合、Fig. 1にみられるように、DNAサイズマーカーで観察されるところの23 kbp以上の長さのバンドが強く観察され、様々な分子量に分解したDNAの存在を示す、スメアな像は観察されない<sup>6)</sup>。検討を行ったいずれのDNA抽出法を用いた場合にもスメアな像が観察されたことは、これらの抽出法を用いて抽出されたDNA試料に含まれるDNAが部分的に分解し、断片化が生じていることを示唆している。しかし、前述のとおり、特定のDNA抽出法によって顕著に低分子化したDNAが観察されるといったことがなかったことから、各DNA抽出法によって抽出されるDNAの分子量分布の点において、定量PCR法の結果に重大な影響を与える要因は認められないと考えられた。

## 3. 内在性遺伝子のコピー数比較

### (1) 同一のDNA抽出法を用いて調製された複数のDNA試料間に認められたばらつき

定量PCR法を用いる場合、GMトウモロコシの定量値は、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 (コピー数) と GMトウモロコシに含まれる組換えDNA配列のコピー数の比を求め、これに換算係数 (内標比) の逆数を乗じて算出される。この分析法において、同一試料から同一のDNA抽出法を用いて抽出されたDNA試料から計測される *SSI1b* コピー数は、基本的には安定して一定の値を示すと考えられる。また、理論的には規定質量のDNAに含まれる内在性遺伝子のコピー数は一定であるため、計測されるコピー数にDNA抽出法による差異は生じないことが期待される。そこで、抽出法ごとに6点の独立したGA21HからDNAを併行抽出し、得られた6点のDNA試料を対象に、*SSI1b* コピー数を計測し比較した。その結果、抽出法ごとに抽出された各6点のDNA試料から計測されたコピー数のばらつきは

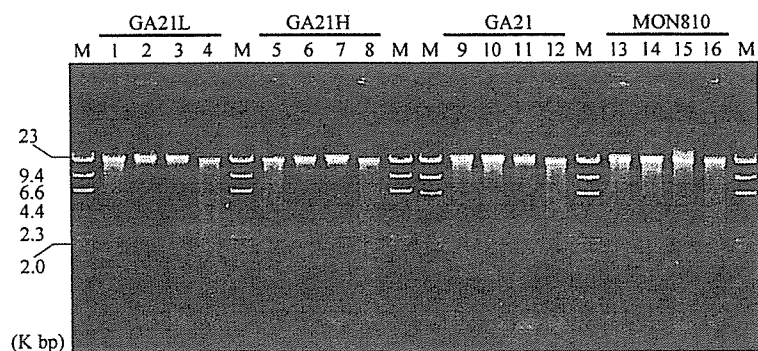


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNAs extracted from four powder samples including GA21H\*, GA21L\*\*, GA21 and MON810. Lane M, molecular marker  $\lambda$  *HindIII*; lanes 1, 5, 9 and 13, DNAs extracted using the maxi method; lanes 2, 6, 10 and 14, DNAs extracted using the mini method; lanes 3, 7, 11 and 15, DNAs extracted using the CTAB method; lanes 4, 8, 12 and 16, DNAs extracted using the WIZARD method.

\*GA21H is the mixed powder sample containing 5% GA21 and 1% MON810 line.

\*\*GA21L is the mixed powder sample each containing GA21 and MON810 line in 1% concentration.

MAXI法、mini法、CTAB法、WIZARD法についてそれぞれのR.S.D.が3.25、11.48、8.05、13.02%であった(Table 2)。この結果は、平成16年度のGMトウモロコシを対象とした外部精度管理の結果から解析された28機関で認められたばらつきの平均値(R.S.D.として12.19%)<sup>4)</sup>と同等、もしくはそれ以下であり、いずれの抽出法を用いても、併行再現性よく *SSIb* コピー数を計測可能なDNA試料を抽出できることが示唆された。

(2) 異なるDNA抽出法を用いて得られたコピー数の比較  
先述の通り、同一のDNA抽出法を用いて調製された複数点のDNA試料間での *SSIb* コピー数のばらつきは十分に小さな値を示し、各DNA抽出法の併行再現性が良好であることが示唆された。次に、異なるDNA抽出法により得られるコピー数の大きさについて比較することを目的に解析を行った。その結果、MAXI法、mini法、CTAB法、WIZARD法により得られたコピー数の平均±S.D.はそれぞれ34464±1120、26426±3035、28314±2281、23908±3112コピーであり、最大コピー数と最小コピー数の差は約15000コピーであった(Table 2)。Table 2にまとめたデータは、先述の通り、6点の独立したGA21Hから特定のDNA抽出法により併行抽出された6点のDNA試料を1セット(定量PCR機器で同時に計測する1組)とし、セットごとに異なるラン(PCRから測定値を得るまでの一連の操作)を実施することで得られたコピー数の平均±S.D.である。このため、特定のセットとしてPCRに供された各DNA試料は、反応温度の制御や蛍光シグナル計測の感度等、PCR機器の精度の影響を一様に受けていると考えられる。また、蛍光シグナル強度からコピー数への変換にも、同一のキャリブレーションスタンダードが用いられるため、特定のセットに含まれる6点のDNA試料間での併行再現性を評価することが可能であった。これに対し、異なるセットとして計測されたコピー数は、上述のPCR機器の精度および、キャリブレーションスタンダードが異なることの影響を受けていると考えられる(キャリブレーションスタンダードはランが異なるごとに新たに調製する)。このため、DNA抽出法間でデータを比較する場合には、ランが異なることによる影響(ラン間差)についても考慮しなければならぬ。そこで、定量PCR法で得られる測定値のラン間差について考察するため、Table 2にまとめたデータの内、6点の独立したDNA試料で構成されるセットについて、ランを2回実施して得られた計12点分のコピー数の平均±S.D.として示したMAXI法の結果をランごとに分割し、比較した。その結果、コピー数の平均±S.D.は1回目のランで34387±1224、

2回目のランで34541±1118であり、その平均値の差は154コピーであった。詳細には、ランの回数を増やし明らかにすべきと考えるが、少なくとも上記の結果からすれば、同一のDNA抽出法により抽出されたDNA試料から計測されるコピー数のラン間での差は、異なるDNA抽出法間で比較した場合に得られたコピー数の差の10分の1程度の大きさであった。これらの結果より、異なるDNA抽出法間に認められた *SSIb* コピー数の差へのラン間差の寄与率は非常に小さいと考えられ、DNA抽出法が異なることが定量PCR法により得られる *SSIb* コピー数に差を生じる原因として強く示唆される。

DNA抽出法が異なることにより計測される *SSIb* コピー数の大きさに差を生じる原因としては、Fig. 1に示した電気泳動の結果からは判断することのできないDNA分子の状態、PCRに影響を及ぼす未知の不純物などが影響を与えているのかもしれない。特に、DNAの質量を260 nmの吸光度測定値に基づき換算しているため、特定のDNA抽出法に特徴的に260 nmの吸光値に影響を与える不純物が残存する場合には、DNA質量の算出が不正確となり、PCRに供されるDNA質量に誤差が生じ、これによって *SSIb* コピー数が増減することが考えられる。しかし、一連のDNA抽出操作の結果として計測されるDNAの質量と質、コピー数の関係については、不明な点が多く、今後明らかにすべき課題の一つである。また、GMトウモロコシの定量値は *SSIb* コピー数と組換えDNA配列のコピー数比に基づき算出されるため、この2つのコピー数とともに同じ傾向をもって変動した場合には、定量値は変動しない(PCRに供されるDNA質量に誤差が生じた場合などがこれにあたる)。よって、DNA抽出法が異なることで計測される *SSIb* コピー数に差が認められることと、DNA抽出法が異なることでGMトウモロコシの定量値に差が認められることは必ずしも同義ではない。

#### 4. 通知記載の内標比を用いて算出されたGMトウモロコシ定量値の比較

DNA抽出法の異なりによるGMトウモロコシ定量値への影響を評価するため、擬似混入試料(GA21LおよびGA21H)を対象とし、CaMならびにGA21定量値を算出し、得られた定量値のばらつき(R.S.D.)および差について比較した。その結果、各試料、定量PCR法、およびDNA抽出法の組み合わせによって得られたそれぞれの定量値のばらつき(R.S.D.)は、最大でも13.3%であり、DNA抽出法と定量PCR法の組み合わせによらず、同一試料内での併行再現性は良好であること

Table 2. Copy numbers measured for taxon-specific gene (*SSIb*) in the DNA extracted using the four extraction methods

Sample	DNA extraction method	Number of measurements	Repeat number of measurements	Copy number of <i>SSIb</i>	R.S.D. (%)
GA21 H	MAXI	6	2	34464±1120	3.25
	mini	6	1	26426±3035	11.48
	CTAB	6	1	28314±2281	8.05
	WIZARD	6	1	23908±3112	13.02

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation



が明らかになった (Table 3)。

MAXI法は、通知記載の内標比を計測するための共同試験および、定量PCR法の妥当性検証試験に採用されたDNA抽出法であるため<sup>7)</sup>、本研究で検討した4種のDNA抽出法の中で最も検証の進められているDNA抽出法であると考えられる。そこで、MAXI法により得られた各定量値と、その他のDNA抽出法により得られた定量値のうち対応する定量値とを比較し、その差をバイアスとして算出した。その結果、WIZARD法とMAXI法により得られた各定量値のバイアスは、すべての試料と定量PCR法の組み合わせを通して、±10%以内であった。これに対し、mini法およびCTAB法のそれぞれと、MAXI法により得られた各定量値のバイアスは、試料および定量PCR法の組み合わせによって大きさに差が認められるが、最小が12.2%、最大が33.9%であった (Table 3)。さらに、3種のDNA抽出法により得られた各定量値と、それぞれに対応するMAXI法により得られた定量値との間で有意差検定を行った結果、mini法およびCTAB法で得られた

すべての定量値とMAXI法で得られた定量値との間に、信頼区間95%での有意差が認められた (Table 4)。

### 5. DNA抽出法別内標比の計測と定量値の再計算

mini法およびCTAB法により得られた定量値とMAXI法により得られた定量値とのバイアスが比較的大きく、かつ、試料と定量PCR法の組み合わせのすべてを通じて高値であった結果は、mini法およびCTAB法により得られる定量値に系統誤差が含まれていることを示唆している。Table 3に示したすべての定量値は、通知に記載された内標比を用いて算出しており、先述のとおり、この内標比はMAXI法により抽出されたDNA試料を対象に計測された換算係数である。このため、mini法とCTAB法により抽出されたDNAを対象として計測される内標比が、MAXI法により抽出されたDNAを対象として計測される内標比とは異なっていた場合、系統誤差を生じる最大の要因になり得るのではないかと考えられた。そこで、疑似混入試料調製時に添加した100%GMトウ

Table 3. GMO amount calculated using the conversion factors defined in the official standard methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	GMO Amount (%)	R.S.D. (%)	Bias (%)
CaM	GA21L	MAXI	12	1.58±0.20	12.7	
		mini	6	1.95±0.19	9.8	23.7
		CTAB	6	2.05±0.19	9.1	30.2
		WIZARD	6	1.61±0.21	13.3	2.4
	GA21H	MAXI	12	1.61±0.16	9.8	
		mini	6	1.99±0.20	9.9	24.0
		CTAB	6	2.15±0.19	8.7	33.9
		WIZARD	6	1.65±0.15	9.2	2.6
GA21	GA21L	MAXI	12	1.34±0.09	6.4	
		mini	5	1.56±0.09	5.6	16.5
		CTAB	6	1.50±0.15	9.8	12.2
		WIZARD	6	1.35±0.08	6.1	0.9
	GA21H	MAXI	12	6.38±0.35	5.5	
		mini	6	7.44±0.28	3.8	16.5
		CTAB	6	7.63±0.50	6.6	19.6
		WIZARD	6	5.95±0.38	6.4	-6.8

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

Table 4. Statistical analysis for GMO amount measured in the DNA extracted using the four different extraction methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	F	Critical value of F (p=0.05)	t value	Critical value of t (p=0.05)	U	Critical value of U (Lower, p=0.05)
CaM	GA21 L	mini	6	1.099	4.704	3.778	2.120		
		CTAB	6	1.158	4.704	4.856	2.120		
		WIZARD	6	0.879	4.704	0.368	2.120		
	GA21 H	mini	6	0.641	4.704	4.499	2.120		
		CTAB	6	0.711	4.704	6.505	2.120		
		WIZARD	6	1.093	4.704	0.532	2.120		
GA21	GA21 L	mini	5	0.978	5.936	4.805	2.131		
		CTAB	6	0.341	4.704	2.991	2.120		
		WIZARD	6	1.099	4.704	0.295	2.120		
	GA21 H	mini	6	1.592	4.704	6.339	2.120		
		CTAB	6	0.497	4.704			4	14
		WIZARD	6	0.853	4.704	2.385	2.120		

GMO amount was calculated with the conversion factors defined in the Japanese official standard methods.

モロコシ試料 (MON810ならびにGA21試料) からmini法およびCTAB法を用いて抽出したDNA試料を用いて内標比を計測した。また、測定に使用した定量PCR機器の影響により、厳密には通知記載の内標比とは異なる内標比が計測される可能性が考えられたため、MAXI法により100%GMトウモロコシ試料から抽出したDNA試料についても、同様に内標比を測定した。その結果、通知記載のCaM内標比が0.39であるのに対し、測定されたCaM内標比の平均±S.D.はMAXI法で $0.42 \pm 0.02$ 、mini法で $0.45 \pm 0.01$ 、CTAB法で $0.44 \pm 0.04$ であった。一方、通知記載のGA21内標比が2.01であるのに対し、測定されたGA21内標比の平均±S.D.はMAXI法で $2.18 \pm 0.06$ 、mini法で $2.25 \pm 0.10$ 、CTAB法で $2.25 \pm 0.10$ であった (Table

5)。ついで、測定された内標比および、Table 3にまとめた定量値を算出するために計測した測定値(コピー数)に基づき定量値を再計算した結果、すべての試料および定量PCR法の組み合わせにおいて、mini法およびCTAB法により得られた各定量値と、対応するMAXI法により得られた各定量値とのバイアスは再計算前に比べて小さくなり、最小が8.2%、最大が27.9%であった (Table 6)。しかし、再計算された定量値についてMAXI法とmini法、あるいはCTAB法の間で有意差検定を行った結果、最もバイアスの小さかったGA21LからCTAB法を用いて抽出したDNA試料について算出されたGA21定量値を除き、依然として信頼区間95%での有意差が認められた (Table 7)。

Table 5. Conversion factors measured in the DNA extracted using the three different methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements		Conversion factor	R.S.D. (%)
			Samples	Runs		
CaM	Mon810	MAXI	6	2	$0.42 \pm 0.02$	5.7
		mini	3	3	$0.45 \pm 0.01$	3.1
		CTAB	3	3	$0.44 \pm 0.04$	8.1
GA21	GA21	MAXI	6	2	$2.18 \pm 0.06$	2.6
		mini	3	3	$2.25 \pm 0.10$	4.3
		CTAB	3	3	$2.25 \pm 0.10$	4.3

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

Table 6. Re-calculation of GMO amount using the conversion factors specified for the three DNA extraction methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	GMO Amount (%)	R.S.D. (%)	Bias (%)
CaM	GA21L	MAXI	12	$1.46 \pm 0.19$	12.7	
		mini	6	$1.69 \pm 0.17$	9.8	15.5
		CTAB	6	$1.82 \pm 0.17$	9.1	24.3
	GA21H	MAXI	12	$1.49 \pm 0.15$	9.8	
		mini	6	$1.73 \pm 0.17$	9.9	15.7
		CTAB	6	$1.91 \pm 0.17$	8.7	27.9
GA21	GA21L	MAXI	12	$1.23 \pm 0.08$	6.4	
		mini	5	$1.39 \pm 0.08$	5.6	12.9
		CTAB	6	$1.33 \pm 0.13$	9.8	8.2
	GA21H	MAXI	12	$5.88 \pm 0.33$	5.5	
		mini	6	$6.64 \pm 0.25$	3.8	12.9
		CTAB	6	$6.79 \pm 0.45$	6.6	15.4

Data represent means ± S.D.

R.S.D.: Relative Standard Deviation

Table 7. Statistical analysis for the re-calculated GMO amount using the conversion factors specified for the three DNA extraction methods

Quantitative PCR method	Sample	DNA extraction method	Number of measurements	F	Critical value of F (p=0.05)	t value	Critical value of t (p=0.05)	U	Critical value of U (Lower, p=0.05)
CaM	GA21 L	mini	6	1.262	4.704	2.512	2.120		
		CTAB	6	1.271	4.704	3.956	2.120		
	GA21 H	mini	6	0.736	4.704	3.030	2.120		
		CTAB	6	0.780	4.704	5.434	2.120		
GA21	GA21 L	mini	5	1.042	5.936	3.780	2.131		
		CTAB	6	0.367	4.704	2.056	2.120		
	GA21 H	mini	6	1.695	4.704	4.982	2.120		
		CTAB	6					6	14

The GMO amount was re-calculated using the conversion factors which was measured in this study for the DNA extracted by the three DNA extraction methods. For the conversion factor specified for the DNA extraction methods, see Table 5.

## 6. 定量値の評価手法

Table 3に示したとおり、通知記載の内標比を換算係数として用いた場合、mini法、CTAB法により得られる定量値はMAXI法により得られる定量値に対し12.2%~33.9%のバイアスを示し、一般的な統計解析手法に従って評価した場合、有意差が認められた(Table 4)。また、Table 6に示したとおり、DNA抽出法に固有の値として内標比を新たに計測し、その値を用いて定量値を再計算した場合、通知記載の内標比を用いた場合に比べ観察されるバイアスが小さくなった。これらの結果は、DNA抽出法に応じて内標比が変動し、DNA抽出法に依らない共通の内標比を換算係数として用いることによる誤差が系統的に生じる可能性を示唆している。しかしTable 7に示したとおり、DNA抽出法に固有の内標比を用いてもなお、一般的な統計解析手法により評価した場合には有意差が認められた。検査法の準用について鑑みた場合、DNA抽出法に固有の内標比を規定することは実際的ではない。むしろ定量PCR法により得られる定量値の評価を行うという目的に特化した評価基準を設定する必要があるのではないかと考えられた。すなわち、本研究において使用したStudent t検定や、U検定といった一般的な統計解析手法およびそこで設定される有意水準と、定量PCR法により得られる定量値の差異を評価すべき方法および水準とが合致しておらず、 $\alpha$  過誤が起きているのではないかと考えられる。

定量PCR法において、特定のDNA配列を計測するための基本原理であるPCRには、酵素反応による高度な増幅過程が含まれる。このため、他の理化学的な分析方法により得られる計測値に比べ、温度や阻害物質などの要因変動による初期DNA配列計測値への影響が少なくないと考えられる。さらに、直接の分析対象物質であるDNAは、分子量や化学修飾の状態が異なるヘテロジニアスな物質群として調製される。これらの点から考えれば、本研究で検討したDNA抽出法を含む分析法自体の影響はもちろんのこと、試料については特に、品種、産地、生育状態、保存期間などにより試料中の成分さらには、DNAそのものが大きく変化する可能性が考えられるため、今後、十分な検討を行うべき課題であると思われる。実際に本研究で調製したGA21LならびにGA21Hは、それぞれ重量混合比として1%ずつのMON810試料とGA21試料、1%のMON810試料と5%のGA21試料を含む疑似混入試料として調製したが、均一であることは確認されたものの、重量混合比を真値とした場合、いずれのDNA抽出法を用いても妥当であると評価しうる定量値は得られていない。さらに、非常に困難ではあるが、分析方法、試料、分析者等の複数の要因が組み合わされた場合の影響についても知見を蓄積し、これらの影響を不確かさとして加味した上で評価可能な手法を開発していくことが望ましいと思われる。また、現在可能な方策の一つとしては、これまでに我々が試験的に実施してきた外部精度管理試験の結果や、定量PCR法の妥当性検証試験の結果から、定量値のばらつきやバイアスについての情報を抽出し、それらの解析を通じて、新たな評価基準の設定、不確かさを加味した評価手法の開

発が可能ではないかと考える。

定量PCR法により得られる定量値を対象とした実際的な評価手法の開発が進められることにより、新たに開発される定量PCR法の妥当性をより適切に評価すること、また外部精度管理試験においてより適正な管理を行うことが可能となり、ひいては定量PCR法という分析方法の信頼性がさらに向上することが期待される。

## V まとめ

DNA抽出法が定量PCR法により得られるGMトウモロコシ定量値に与える影響について明らかにすることを目的に、公定分析法に規定されている4種のDNA抽出法について、DNAの質、収量、DNA分解の程度、およびGMトウモロコシ定量値について詳細な解析を行った。その結果、CTAB法とWIZARD法において、DNAの質の評価基準とされる吸光度比のうち、260 nm/230 nm比が顕著に低下することが示された。また、DNAの収量に関しては、4種のDNA抽出法の間ではばらつきに差は認められなかったが、CTAB法を用いた場合の平均収量が明らかに少なくなることが示された。さらに、電気泳動により分離し得られた像から判断する限り、DNA分解の程度に明確な差は認められなかった。

MAXI法により得られた定量値を比較中心として、一般的な統計解析手法により有意差を検定した結果、mini法ならびにCTAB法を用いて得られる定量値との間に有意差が認められた。定量値の算出に使用される換算係数である内標比がDNA抽出法ごとに変動し、定量値に影響を与える可能性が考えられたため、各DNA抽出法により調製したDNAごとに内標比を計測し、それらを用いて定量値を再解析した。しかし、再解析された定量値を検定してもなお、一般的な統計解析手法を用いた場合には有意差が認められた。これらの結果から、DNA抽出法が異なることによる定量値への影響を評価するためには、それに特化した評価手法が必要ではないかと考えられた。さらに、本研究で検討したDNA抽出法を含む分析方法の全体、試料、分析者等複数の要因が定量値に与える影響を不確かさとして加味した上で評価手法を開発していくことが、新たに開発される定量PCR法の妥当性をより適切に評価するため、また外部精度管理試験においてより適正な管理をおこなうためには必要であると考えられた。

## VI 謝辞

本研究は、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)により実施した。

## VII 文献

- 1) 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, 食第110号(2001)

- 2) 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17年5月17日, 食発第0517001号(2005)
- 3) 独立行政法人 農林水産消費技術センター: JAS分析試験ハンドブック“遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 改訂第2版”(2002)
- 4) Watanabe T., Tokishita S., Kasama K., Suzuki T., Ohshima Y., Kikuchi H., Hino A., Akiyama H., Maitani T.: Laboratory-performance Study of Quantitative PCR Methods to Analyze Approved Genetically Modified Maize (GA21 and MON810 lines), *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food. Chem.)*, 13(1), 18-28 (2006)
- 5) Yoshimura T., Kuribara H., Matsuoka T., Kodama T., Shigematsu M., Watanabe T., Akiyama H., Maitani T., Furui S., Hino A.: Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2052-2059 (2005)
- 6) Watanabe T., Teranishi K., Minegishi Y., Furui S., Hino A., Takeda M., Akiyama H., Maitani T.: The effective conditions of the heat-treatment by autoclaving to avoid the contamination on GMO detection using PCR methods, *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food. Chem.)*, 12(1), 28-34 (2005)
- 7) Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirano T., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A.: Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean, *J. AOAC Int.* 85, 1077-1089 (2002)

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

研究成果に関する刊行物

学会発表

# 農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の 精度管理に関する研究（第1報）

○住本建夫<sup>1</sup>、織田 肇<sup>1</sup>、岩上正藏<sup>1</sup>、田中之雄<sup>1</sup>、村田 弘<sup>1</sup>、  
起橋雅浩<sup>1</sup>、高取 聡<sup>1</sup>、北川陽子<sup>1</sup>、岡本 葉<sup>1</sup>、酒井 洋<sup>2</sup>、  
上野英二<sup>3</sup>、田中敏嗣<sup>4</sup>、宇野正清<sup>5</sup>、宇治田正則<sup>6</sup>、佐々木珠生<sup>7</sup>、  
堤 泰造<sup>8</sup>、衛藤修一<sup>9</sup>

(<sup>1</sup>大阪府立公衆衛生研究所、<sup>2</sup>新潟県保健環境科学研究所、<sup>3</sup>愛知県衛生研究所、  
<sup>4</sup>神戸市環境保健研究所、<sup>5</sup>奈良県保健環境研究センター、<sup>6</sup>和歌山市衛生研究所、  
<sup>7</sup>広島市衛生研究所、<sup>8</sup>徳島県保健環境センター、<sup>9</sup>北九州市環境科学研究所)

## A. 目的

農薬等のポジティブリスト制(平成18年5月29日施行)の施行に伴い、多くの検査項目についての確な検査が要求され、その検査結果の信頼性確保が重要な課題となっている。現在、各検査機関では厚生労働省の示す個別分析法や一斉試験法に準拠した試験法や独自の検査標準作業書(SOP)を作成し、その試験法の真度、精度及び定量限界は各検査機関の判断により、検査を行っているのが現状である。そして内部精度管理により、検査の信頼性を確保しているが、その方法として、既知の農薬を既知の濃度添加し、その回収率により判定するのが一般的である。そのため、回収率にフレが認められた場合、真値に近づけるように修正され、SOPの評価が正確でない場合がある。そこで、当所も含め9機関の地方衛生研究所の参加協力を得て、従来から重要性が指摘されている外部精度管理試験を用い、各検査機関のSOPの評価と信頼性確保のための要因等について検討を行うことを目的とした。

## B. 方法

### 1. 実施日程

年2回行った、ラウンド1は平成17年9月14日から10月11日、ラウンド2は平成17年11月22日から12月13日で実施した。

### 2. 添加農薬

研究協力9機関が実施している農薬検査項目はのべ197種類、そのうち共通する農薬が23種類であった。ラウンド1では23種類のうちから10種類を、ラウンド2では23種類全部を添加農薬指定リストとし、その中から3あるいは4種類の農薬を添加した。

### 3. 精度管理用試料の調製

精度管理用食材は、均質で大量に必要なことから、トマトジュースと野菜ジュースは市販品を、レッドピーマンとジャガイモは、業務用の冷凍磨砕マイクロペースト状食材

(12-16kg)を試料として用いた。添加農薬は和光純薬製残留農薬試験用を使用し、表1に示す添加農薬の種類及び設定濃度になるように農薬混合アセトン溶液を調製し、添加した。この農薬添加試料と農薬無添加の対照試料を冷凍後、各研究協力機関に冷凍宅配便で送付した。

送付した試料の均質性については精度管理用試料15個から無作為に5個の容器を選び、それぞれ2回採取して測定を行った。また、添加農薬の安定性については試料を送付してから1ヶ月後に各食品5試料を測定し、添加濃度が変動しないことを確認した。

### 4. 検査方法

各機関の農薬検査標準作業書に従って5回試行の実施を求めた。

### 5. 結果の集計と評価方法

各機関から報告された定量値について、各々の検査項目毎に有意水準5%で異常値の棄却検定を行った後、基本統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、 $\bar{X}$ -R管理図、zスコアを求め、機関内変動と機関間変動について客観的評価を行った。

## C. 結果及び考察

### 1. 精度管理用試料の均質性及び安定性

調製した試料は設定添加量の92%-112%の定量値が得られ、試料調製方法の妥当性が確認された。試料の均質性は5試料から得られた定量値の一元配置分散分析の結果により確認した。試料を-20℃で1ヶ月間保存した場合にも定量値に大きな変動がなく、少なくとも検査期間(2-3週間)内の添加農薬の安定性は確認された。均質な市販品や冷凍磨砕マイクロペースト状食材の使用と業務用ミキサー等の導入により、試料調製の方法を確立することができた。

### 2. 外部精度管理試験の結果

各機関からの5回測定値の平均値について、異常値の有無の検定(有意水準5%)を行ったが、棄却された値はなかった。全機関が添加された農薬の種類をすべて正しく検出した。各検査項目の全体の平均値は良好な結果が得られたが、品質管理などに用いられている Xbar-R管理図による方法と各機関における検査精度の相対的な判定に有効な zスコアによる方法で評価したところ、適正域に入っていない機関が認められた。特に、Xbar 管理図で70-120%に入っていない機関が表1の通り、野菜ジュースのクロルピリホス、シベルメトリンを除いて多く認められた。R管理図及び zスコアにおいては、1機関が適正域に入っていないことが認められた。各機関が4食品の14農薬について定量値を提出したが、Xbar-R管理図、zスコアによる評価ですべて「十分管理されている」と評価される機関が2機関あった。

### 3. 要因分析

精度の違いを生じる要因を知るために、アンケート調査及び SOP からの主な項目を投入し、データの絞込みや分類による探索的データ分析(ビジュアルデータマイニング: 視覚化データ処理技術)の手法を用いて精度の傾向を調べたところ、アセトニトリルの抽出回数や最終検液量・検量線濃度など GC への負荷の程度等が関与して精度に影響を及ぼしていた。つまり、各機関の SOP の違いと精度の違いとは関連しており、すべて適正であった機関における試験法は食品の農薬検査に推奨できる試験法と言える。これらの機関による研修や使用している SOP を参考にすることで精度管理の向上に大きく寄与できるものと思われた。

## D. まとめ

1. 9 地方衛生研究所による共同外部精度試験を、各参加機関の SOP による検査法で実施した。精度管理用試料はのべ14種類の農薬を添加した食品4種類を用い、5回の測定値を求めた。
2. 精度管理用試料を調製し、添加農薬濃度の妥当性、均質性および安定性について検討を行い、適正な試料を参加機関に提供した。
3. 全機関が添加された農薬の種類をすべて正しく検出した。5回測定値の平均値について、異常値の有無の検定を行ったが、棄却された値はなかった。各検査項目の全体の平均値は良好な結果が得られたが、Xbar-R管理図による方法と検査精度の相対的な判定に有効な zスコアによる方法で評価したところ、各検査項目で、Xbar-R管理図および zスコアで適正域に入っていない機関が認められた。
4. 探索的データ分析(ビジュアルデータマイニング)による要因解析の結果、アセトニトリルによる抽出回数、夾雑物除去方法、検量線濃度幅等各機関の SOP の違いが精度に影響していると考えられた。
5. 内部精度管理では得られない各機関の SOP の偏りや測定値の傾向が外部精度管理調査を実施したことにより得られた。

## E. 謝辞

本研究は平成17年度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)により行った。

表1 結果の集計

調製試料	添加農薬名	設定濃度 (ppm)	調製時の平均値 ±標準偏差	9機関の平均値 ±標準偏差	Xbar 管理図 「良好」判定数	R管理図 「良好」判定数	zスコア 「良好」判定数
トマトジュース	ダイアジノン	0.1	0.100±0.001	0.087±0.026	5	8	9
	クロルピリホス	0.4	0.413±0.006	0.360±0.070	7	8	9
	フェニトロチオン	0.25	0.273±0.006	0.256±0.065	5	8	9
レッドピーマン	ダイアジノン	0.1	0.099±0.004	0.090±0.023	6	9	9
	ジメトエート	0.4	0.445±0.019	0.441±0.118	5	9	9
	シベルメトリン	0.8	0.812±0.035	0.748±0.267	7	9	9
野菜ジュース	ジメトエート	0.4	0.387±0.023	0.423±0.069	8	8	9
	クロルピリホス	0.4	0.391±0.018	0.355±0.070	9	9	8
	EPN	0.1	0.097±0.008	0.087±0.014	8	8	9
	シベルメトリン	0.5	0.521±0.045	0.449±0.087	9	9	8
ジャガイモ	クロルピリホス	0.2	0.205±0.011	0.170±0.032	8	9	8
	マラチオン	0.1	0.112±0.005	0.085±0.029	8	8	8
	プロチオホス	0.1	0.109±0.006	0.076±0.015	5	9	9
	フェンバレレート	0.05	0.045±0.009	0.048±0.027	5	8	8

## QuEChERS 法を活用した残留農薬分析法の検討

○高取 聡、起橋雅浩、北川陽子、岡本 葉、柿本幸子、  
村田 弘、住本建夫、田中之雄  
大阪府立公衆衛生研究所

### 【はじめに】

食品衛生法の一部が改正され、残留農薬の分野では、ポジティブリスト制が導入された。これに伴って多数の項目について広範囲に分析することが求められている。限られた時間と労力でこの要求に対応するためには、簡便で迅速な一斉分析法が有効である。我々は、QuEChERS 法を活用した簡易分析法の検討を行ってきた (1-3)。本法の特徴は、ポリプロピレン (PP) 製遠心管中でアセトニトリル抽出ならび塩析・脱水を行い、遠心分離によって迅速に抽出液を得ることである。これによって、分析に要する時間ならびに労力等の軽減に成功している。昨年の本研究会では、GC/MS 及び GC-FPD を用いた分析法を報告した。今回、LC/MS/MS を用いた分析法を検討したので報告する。

### 【試薬等】

標準品は、和光純薬、関東化学、林純薬、Riedel de Haen 及び Dr. Ehrenstrofer G.m.b.H. より購入した。標準品は、アセトンまたはメタノールに溶解し、1,000 ppm 溶液を作成し、適宜、混和して用いた。アセトニトリル、トルエン、メタノール、アセトン及び塩化ナトリウムは、残留農薬分析用 (和光純薬) を用いた。無水硫酸マグネシウムは、特級 (和光純薬) を用いた。精製用カラムには、Spelclean ENVI-CarbII/PSA (500/500 mg; SPELCO) 及び Spelclean ENVI-18 (500 mg; SPELCO) を用いた。抽出用遠心管として BLUE MAX 50 mL ポリプロピレンコニカルチューブ (Becton Dickinson) を用いた。ホモジナイザーは、Polytoron PT10 (KINEMATICA) を用いた。遠心分離機は、Himac SCR 20B (日立製作所) を用いた。

### 【装置】 タンデム型質量分析器付高速液体クロマトグラフ (LC/MS/MS)

LC: 1100 Series (Agilent)

カラム: ASCENTIS C18, 2.1 x 100 mm, 3  $\mu$ m (SPELCO)

移動相: (A) 0.1% ギ酸水溶液 (B) 0.1% ギ酸含有メタノール溶液

グラジエント (B) 20→95% (12 min; linear) →95% (8 min, Hold)



流速：200  $\mu$ L/min

カラム温度：40°C

注入量：5.0  $\mu$ L

MS/MS: API 3000 (Applied Biosystems)

インターフェイス/モード：ESI/ポジティブ

キャピラリー電圧/温度：4000 V/450°C

測定条件の最適化は、各標準溶液を 0.1%ギ酸含有 50%メタノール溶液で 0.1~0.5 ppm になるように希釈したものをインフュージョンで導入し、Analyst™ 1.3.2 で最適化した。分析及び定量は、Multiple Reaction Monitoring で行った。

#### 【方法】

【野菜・果実】フードプロセッサーで均一化した試料 10 g を PP 製チューブに採取し、アセトニトリル 20 mL を加えて、ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した。これに予め秤量しておいた塩化ナトリウム 1 g 及び無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて直ちに 1 分間振とう攪拌した。次に遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) を行い、およそ 16~18 mL のアセトニトリル相を得た。このアセトニトリル相 8.0 mL をアセトニトリル/トルエン (3/1) 混液 30 mL でコンディショニングした ENVI-Carb II/PSA (500/500 mg; グラファイトカーボンブラック/PSA 積層カラム) に負荷し、アセトニトリル/トルエン (3:1) 混液 30 mL で溶出した。負荷した際の通過液及び溶出液を 100 mL ナス型フラスコに捕集し、減圧濃縮した (40°C 以下)。窒素気流下で乾固後、メタノールで溶解し、2.0 mL に定容した。これを MilliQ 水で 4 倍に希釈して試験液とした (スキーム 1)。

【穀類】フードプロセッサーまたはミルで均一化した試料 5.0 g を PP 製チューブに採取し、MilliQ 水 5.0 mL を加えて室温で 30 分間放置した。これにアセトニトリル 20 mL を加えて、ホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した。次に塩化ナトリウム 1 g 及び無水硫酸マグネシウム 4 g を加えて直ちに 1 分間振とう攪拌した。続いて遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) を行い、およそ 12~16 mL のアセトニトリル相を得た。脂質を除くため、C18 カラムを精製過程に追加した。すなわち、アセトニトリル 10 mL でコンディショニングした ENVI-18 (500 mg) 及びアセトニトリル/トルエン (3/1) 混液 30 mL でコンディショニングした ENVI-Carb II/PSA (500/500 mg) を連結して使用した。このカラムにアセトニトリル相 10 mL を負荷し、はじめにアセトニトリル 10 mL で溶出した。次に上位に連結していた ENVI-18 を除き、ENVI-Carb II/PSA をアセトニトリル/トルエン (3/1) 混液 30 mL で溶出した。負荷した際の通過液及び溶出液を 100 mL ナス型フラスコに捕集し、減圧濃縮した

(40 °C以下)。窒素気流下で乾固後、1.25 mL のメタノールで溶解し、MilliQ 水で 5.0 mL に定容して試験液とした (スキーム 2)。

【添加回収試験】

PP 製チューブに採取した試料に下記の分析対象農薬 (107 種類) を 0.020 または 0.10 ppm になるように添加し、30 分間放置した後、分析を開始した。

Acephate	Acetamipride	Acetochlor	Alachlor
Aldicarb	Allethrin	Atrazine	Azoxystrobin
Bendiocarb	Benfuresate	Bensulide	Benzyladenine
Bitertanol	Bromobutide	Bupirimate	Buprofezin
Cafenstrole	Carbary	Carbofuran	Carfentrazone-ethyl
Chlorpropham	Clethodim	Clomeprop	Cumyluron
Cyanazin	Cycloxydim	Cyflufenamide	Cyhalofop-butyl
Daimuron	Dichlorvos	Diethofencarb	Difenoconazole
Diflubenzuron	Diflufenican	Dimepiperate	Dimethametryn
Dimethoate	Dimethomorph	Diphenamide	Esprocarb
Ethiofencarb	Ethofumesate	Etobenzanid	Fenalimol
Fenbuconazole	Fenobucarb	Fenoxaprop-ethyl	Fenoxycarb
Fenpropimorph	Flufenoxuron	Flusilazole	Furathiocarb
Hexaconazole	Hexaflumuron	Imazalil	Imibenconazole
Inabenfide	Indanofan	Iprodione	Iprovalicarb
Isoprocarb	Isoprothiolane	Isoxathion	Lufenuron
Mefenacet	Mepanipyrim	Metalaxyl	Methabenzthiazuron
Methamidophos	Methomyl	Metolcarb	Molinate
Monocrotophos	Napropamide	Omethoate	Oxamyl
Pacrobutrazole	Penconazole	Pencycuron	Pentoxazone
Phenmedipham	Phoxim	Pirimicarb	Pretilachlor
Prochloraz	Procymidone	Propamocarb	Propiconazole
Propoxur	Propyzamide	Pyriproxyfen	Pyroquilon
Quinoclamine	Quizalofop-ethyl	Tebfenpyrad	Tebuconazole
Tebufenozide	Teflubenzuron	Thenylchlor	Thiabendazole
Thiacropride	Thiobencarb	Triadimefon	Triadimenol
Tri-allate	Trichlamide	Triflumizole	

### 【定量】

ブランク抽出液を添加した検量線を用いて定量した。すなわち、分析対象農薬のメタノール溶液とブランク抽出液(メタノール溶液)とを1:1で混和した後、MilliQ水で4倍希釈して検量線の作成に用いた。

### 【結果及び考察】

野菜または果実(ほうれん草、キャベツ、ジャガイモ、オレンジ、リンゴ)及び穀類(玄米及び大豆)を用いて添加回収試験を行った結果の概要を表1及び2に示した。

#### (野菜・果実)

評価対象とした107種類の農薬のうち、0.020 ppmの添加回収試験で82-94種類の農薬で各作物中からの平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。また、0.10 ppmの添加回収試験で89-100種類の農薬で各作物中からの平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。

#### (穀類)

評価対象とした107種類の農薬のうち、0.020 ppmの添加回収試験で玄米では89種類、大豆では68種類の農薬で平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。また、0.10 ppmの添加回収試験で玄米では93種類、大豆では99種類の農薬で平均回収率が、70~120% (RSD <20%)となった。

### 【結論】

QuEChERS法を活用した分析法を用いて代表的な野菜・果実ならびに穀類に対する添加回収試験を実施した。その結果、68-100種類の農薬に対して0.020-0.10 ppmの範囲で良好な回収率を得た。本法について、均一化した試料からLC/MS/MS分析に供する試験液の調製に要する時間は、10検体程度につき、およそ2-3時間であった。前回報告した、GC/MS及びGC-FPDを用いた分析系と組み合わせることによって、広範囲な試料に対して適用できる、簡便かつ迅速な一斉分析法を構築できるものと期待される。

### 【文献等】

- (1) 起橋ら、第27回農薬残留分析研究会講演要旨集 115 (2004)
- (2) 起橋ら、第28回農薬残留分析研究会講演要旨集 90 (2005)
- (3) Okihashi, M, *et al.*, *J. Pestic. Sci.*, **30**, 368 (2005)

表 1. 野菜果実 5 作物における添加回収試験結果の概要 (n = 5)

\*: 括弧内の数値は、RSD が 20% を越える農薬数

作物名	添加濃度 (ppm)	< 70%*	70-120%*	< 120%*
ほうれん草	0.020	3 (2)	91 (1)	3 (7)
	0.10	3 (4)	89 (5)	3 (3)
キャベツ	0.020	1 (5)	89 (9)	4 (0)
	0.10	3 (1)	100 (0)	3 (0)
ジャガイモ	0.020	12 (9)	82 (2)	3 (7)
	0.10	4 (5)	95 (1)	1 (1)
オレンジ	0.020	6 (5)	89 (6)	1 (0)
	0.10	1 (4)	99 (2)	1 (0)
リンゴ	0.020	4 (5)	94 (3)	1 (0)
	0.10	3 (2)	99 (1)	2 (0)

表 2. 穀類 2 作物における添加回収試験結果の概要 (n = 5)

\*: 括弧内の数値は、RSD が 20% を越える農薬数

作物名	添加濃度 (ppm)	< 70%*	70-120%*	< 120%*
玄米	0.020	6 (5)	89 (2)	3 (2)
	0.10	2 (5)	93 (1)	3 (3)
大豆	0.020	27 (6)	68 (5)	1 (0)
	0.10	2 (6)	99 (0)	0 (0)