

ion or an $M+4$ ion. The detection limits (pg/g fat) of the respective analytes were as follows: 0.6 for 4-5CDD/Fs, 1.5 for 6-7CDD/Fs, 3.0 for OCDD/F and non-ortho PCBs. The toxic equivalent quantity (TEQ) was calculated using the international toxic equivalence factor (I-TEF) (NATO/CCMS, 1988) for PCDDs and PCDFs, and Ahlborg TEF (Ahlborg et al., 1994) for non-ortho PCBs.

2.4. GC-ECD measurement

HCB and other OCPs were subjected to GC-ECD using an HP5890 Series II (Agilent) equipped with a capillary DB-5.625 column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) with helium as the carrier gas at a linear velocity of 35 cm/s in the splitless injection mode (1 μ l). The GC program was as follows: 70 °C (1 min) to 150 °C (0 min) at 20 °C/min and subsequently at 3 °C/min to 270 °C, then maintained for 10 min at 270 °C. The injector temperature was 200 °C and the detector temperature was held at 300 °C. Quantification of the OCPs was carried out using the absolute standard curve method. The detection limit of these OCPs in milk fat was 1 ng/g.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). The potential correlations between the residual levels of the OCPs and the dioxin congeners in human milk fat were tested using the Pearson analysis. The statistical test for significant difference was set at 1%.

3. Results and discussion

3.1. Behavior of HCB and other OCPs in preprocessing operation for dioxin measurement

In Japan, it is generally difficult to sample extra milk from the same human for dioxin and HCB measurement because human milk is a valuable food for babies. Therefore, the behavior of HCB and other OCPs in the preprocessing operation for dioxin measurement was examined in order to develop a systematic method for analyzing dioxins and HCB.

The preprocessing operation currently in wide use for the measurement of dioxin in human milk involves fat extraction, washing with sulfuric acid, and chromatography on a silica gel column, an alumina column and an activated carbon/silica gel column. Then, the behavior of HCB and other OCPs in each preprocessing operation was examined. In the silica gel column, HCB and most of the OCPs were eluted in the first fraction (hex-

ane, 120 ml) except heptachlor epoxide, δ -HCH and part of β -HCH. Then, we attempted to elute the remaining pesticides by adding 10% DCM/hexane (60 ml) to the silica gel column. As a result, heptachlor epoxide and δ -HCH as well as the remaining β -HCH were eluted in this second fraction. In the alumina column, HCB, o,p' -DDE and p,p' -DDE were eluted in the first fraction (2% DCM/hexane, 60 ml). However, OCPs other than β -HCH were eluted neither in the first fraction nor in the second fraction (60% DCM/hexane, 100 ml). On the other hand, in the activated carbon/silica gel column, all the OCPs were eluted in the 25% DCM/hexane (60 ml) fraction.

From the above-mentioned results, the fractionation of HCB and other OCPs is shown in the flowchart of Fig. 1. It was found that HCB and such pesticides as o,p' -DDE, p,p' -DDE, heptachlor epoxide, β -HCH and δ -HCH could be systematically analyzed with dioxins when they were subjected to the preprocessing operation for dioxin measurement. However, o,p' -DDE, p,p' -DDE and δ -HCH were omitted from the analysis because in the preliminary experiments of the recovery study, δ -HCH showed low recovery, which was caused by the increased solubility of δ -HCH in the fat-sulfuric acid phase in the process of sulfuric acid decomposition

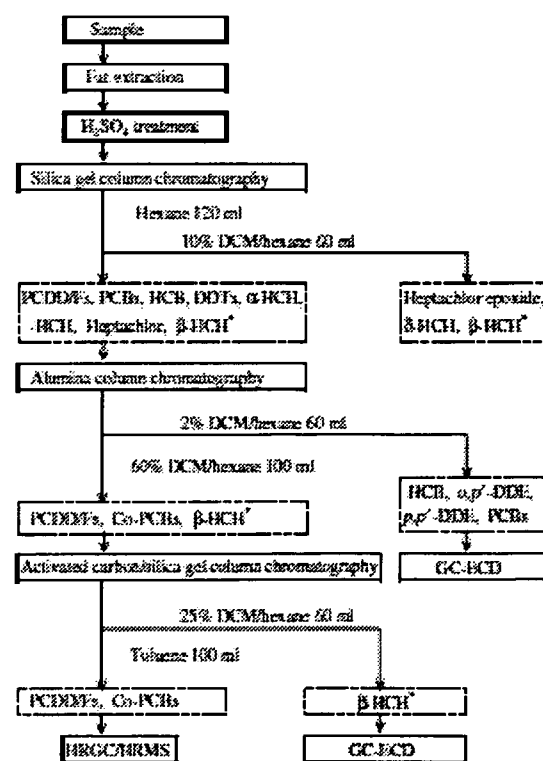


Fig. 1. Flowchart of systematic analysis of dioxins, hexachlorobenzene and other organochlorine pesticides in human milk.

(Waliszewski and Szymczynski, 1982), whereas *p,p'*-DDE showed high recovery exceeding 100%, which was assumed to be caused by the dehydrochlorination of *p,p'*-DDT (Hill and Smart, 1981).

3.2. Recovery study and HCB pollution level in human milk

Bovine milk samples fortified with 10 ng/g each of HCB, heptachlor epoxide and β -HCH were used for the recovery study, because human milk was a valuable food for babies and it was difficult to obtain extra samples. Table 1 summarizes the recoveries of the OCPs. The overall mean recoveries ranged from 60.3% to 70.5% and the standard deviations (SDs) were less than 9%. The recovery of β -HCH was calculated by taking the summation of the recovery from the silica gel column and that from the activated carbon/silica gel column, as shown in Fig. 1.

Table 2 lists the residual levels of dioxins and OCPs in 100 human milk samples. The residual level of HCB was 4.1 to 91.8 ng/g fat (mean: 33.9 ng/g fat). Heptachlor epoxide and β -HCH were also found in all the samples. These data suggested that the human milk had been polluted by these persistent organochlorine contaminants.

3.3. Correlation analysis

We have previously reported the correlation between the residual levels of dioxin congeners in human milk and TEQ (Takekuma et al., 2004). In addition, there was also a study of the correlation between OCPs (except HCB) and dioxin TEQ (Nakagawa et al., 1999). However HCB was not dealt with in both of those studies. In this study, Pearson's correlation coefficients between the residual levels of OCPs and each dioxin congener in human milk were examined using data of the 100 samples. HCB showed significant positive correlations ($p < 0.01$) with most of the dioxin congeners; on the other hand, heptachlor epoxide and β -HCH showed poor correlations with the dioxin congeners (Table 3). In addition, highly significant positive correlations were

Table 1
Recoveries of HCB and other organochlorine pesticides from bovine milk

	Added (ng/g)	Recovery (%) ^a	SD
HCB	10	68.1	7.9
Heptachlor epoxide	10	60.3	7.8
β -HCH ^b	10	70.5	8.8

^a Average of four replicates.

^b The recovery of β -HCH was calculated by taking the summation of two fractions.

Table 2
Residual levels of dioxin congeners, HCB and other organochlorine pesticides in human milk

Dioxin & OCP	Mean	Min	Max	SD
	(pg/g fat; n = 100)			
2,3,7,8-TCDD	1.5	0.0	3.8	0.8
1,2,3,7,8-PeCDD	6.3	2.9	12.2	2.1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	2.0	0.0	4.7	1.2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	19.3	9.3	42.8	6.3
1,2,3,7,8,9-HxCDD	3.9	0.0	11.5	2.2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	11.0	0.0	26.5	5.1
OCDD	73.6	27.1	266.1	43.6
2,3,7,8-TCDF	0.7	0.0	2.3	0.5
1,2,3,7,8-PeCDF	0.5	0.0	2.4	0.4
2,3,4,7,8-PeCDF	13.3	5.4	26.7	4.5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	4.6	0.0	9.7	1.8
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5.5	2.6	12.0	1.9
2,3,4,6,7,8-HxCDF	3.3	0.0	7.7	1.6
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.0	0.0	0.0	0.0
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	2.3	0.0	8.1	1.4
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.0	0.0	0.0	0.0
OCDF	0.0	0.0	0.5	0.1
3,3',4,4'-TeCB (#77)	6.5	0.0	25.7	4.3
3,3',4,4',5-PeCB (#126)	59.5	20.4	196.2	28.4
3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	36.6	0.0	93.9	15.4
HCB (ng/g fat)	33.9	4.1	91.8	16.3
Heptachlor epoxide (ng/g fat)	7.4	1.4	22.1	4.0
β -HCH (ng/g fat)	62.7	8.1	610.3	81.2

Table 3
Correlation between dioxin congeners and HCB, Heptachlor epoxide and β -HCH in human milk

Dioxin isomer	HCB	Heptachlor epoxide	β -HCH
	Pearson's correlation coefficient (n = 100, $\alpha = 0.01$)		
2,3,7,8-TCDD	0.471*	(0.240)	(0.225)
1,2,3,7,8-PeCDD	0.531*	0.335*	0.306*
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.334*	(0.168)	(0.217)
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.469*	0.287*	0.399*
1,2,3,7,8,9-HxCDD	(0.176)	0.322*	(0.199)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.405*	0.275*	(0.210)
OCDD	(0.204)	0.263*	(0.232)
2,3,7,8-TCDF	0.279*	(0.101)	(0.075)
1,2,3,7,8-PeCDF	0.300*	(0.096)	(0.078)
2,3,4,7,8-PeCDF	0.498*	0.390*	0.260*
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.348*	(0.161)	(0.092)
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.415*	(0.251)	(0.132)
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.418*	0.288*	(0.188)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	(0.187)	(-0.111)	(-0.057)
3,3',4,4'-TeCB	(0.204)	(0.127)	(0.015)
3,3',4,4',5-PeCB	0.427*	(0.256)	(0.156)
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.437*	(0.245)	(0.087)
Σ Total (TEQ)	0.533*	0.351*	0.263*

The data in parentheses are not significant ($p > 0.01$).

* Significant ($p < 0.01$).

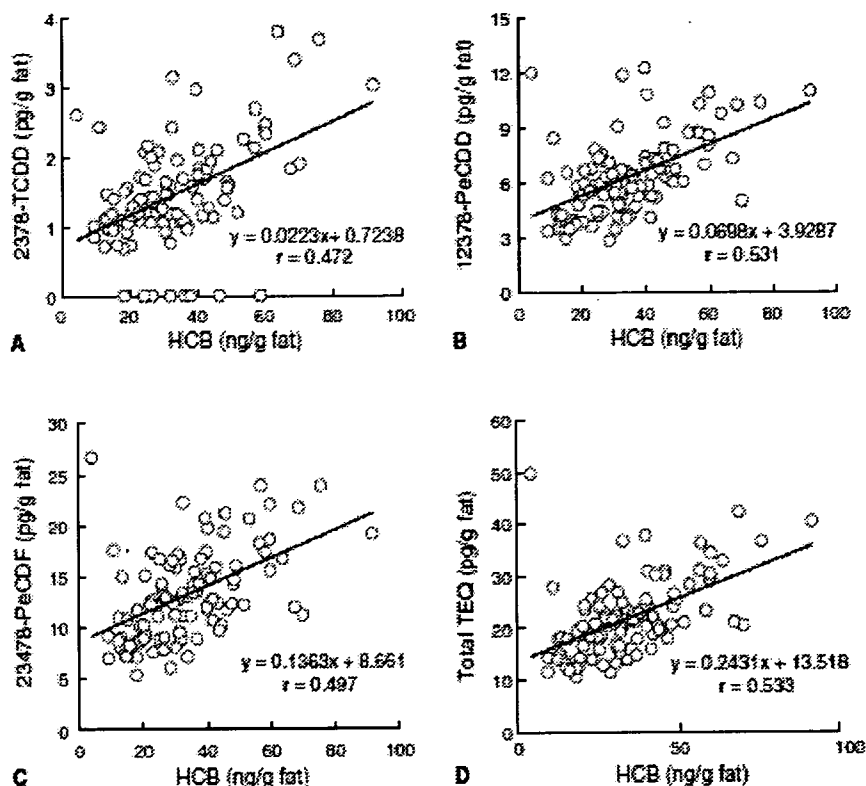


Fig. 2. Scatter plots of HCB and major dioxin congeners: Correlations between (A) HCB and 2378-TCDD, (B) HCB and 12378-PeCDD, (C) HCB and 23478-PeCDF, and (D) HCB and Total TEQ.

found between HCB and dioxin congeners having high TEFs, such as 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD and 2,3,4,7,8-PeCDF (Fig. 2A–C). These results suggest that the exposure route and the cumulative exposure to HCB of the human body throughout a lifetime are similar to those of the dioxins.

3.4. Overall toxicity evaluation of dioxins and HCB

According to a recent study of the Ah receptor binding activity of HCB, the toxicity value (TEF) of HCB is reported to be corresponding to 0.0001 (Van Birgelen, 1998). This value is as low as those of OCDD and OCDF, and is in the same range as that of mono-ortho PCBs. However, it has been reported that the residual level of HCB is higher than that of PCDD/Fs in human milk. When HCB toxicity was calculated using the proposed temporary TEF (0.0001) in the experimental results shown in Table 2, the TEQ of HCB in human milk was 0.41 to 9.2 pg TEQ/g fat (mean: 3.4 pg TEQ/g fat, $n = 100$). There was an increase of approximately 16% (average value) when these results were summed with the TEQ (calculated using I-TEF) of dioxins. On

the basis of these results, overall toxicity evaluation with the inclusion of HCB is seemed to be necessary for dioxin toxicity evaluation in human milk.

4. Conclusion

A systematic method for analyzing dioxins, HCB, heptachlor epoxide and β -HCH was developed using fractions derived from the preprocessing operation for dioxin measurement.

Pearson's analysis revealed a significant correlation between HCB and high-TEF PCDD/Fs congeners. The accumulation behavior of HCB in the living body and its exposure route were assumed to be similar to those of dioxins.

Acknowledgments

This work was supported in part by Health Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Ahlborg, U.G., Becking, G.C., Birnbaum, L.S., Brower, A., Derks, H.J.G.M., Feeley, M., Golar, G., Hanberg, A., Larsen, J.C., Liem, A.K.D., Safe, S.H., Schlatter, C., Wara, F., Younes, M., Ygjanheikki, E., 1994. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Report on a WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. *Chemosphere* 28, 1049–1067.
- Cabral, J.R., Shabik, P., Möllner, T., Raitano, F., 1977. Carcinogenic activity of hexachlorobenzene in hamsters. *Nature* 269, 510–511.
- Foster, W.G., Martincit, C., Yaginias, A., McMahon, A., Lecavalier, P., 1995. The effects of hexachlorobenzene on circulating levels of adrenal steroids in the ovariectomized rat. *J. Biochem. Toxicol.* 10, 129–135.
- Hahn, M.E., Goldstein, J.A., Linko, P., Gasiewicz, T.A., 1989. Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. Evidence that hexachlorobenzene is a weak Ah receptor agonist. *Arch. Biochem. Biophys.* 270, 344–355.
- Hill, A.R., Smart, N.A., 1981. Dehydrochlorination of some organochlorine pesticides in freeze-dried egg and egg fat during storage. *J. Agric. Food Chem.* 29, 675–677.
- Jarrell, J., Goemen, A., Foster, W., Brant, R., Chan, S., Sevek, M., 1998. Evaluation of reproductive outcomes in women inadvertently exposed to hexachlorobenzene in south-eastern Turkey in the 1950s. *Reprod. Toxicol.* 12, 469–476.
- Khara, K.S., 1974. Teratogenicity and dominant lethal studies on hexachlorobenzene in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* 12, 471–477.
- Nakagawa, R., Hirakawa, H., Iida, T., Matsueda, T., Nagayama, J., 1999. Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. *J. AOAC Int.* 82, 716–724.
- NATO/CMS, 1988. International toxicity equivalence factor (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report Number 176, August 1988, NATO, Committee on Challenges of Modern Society.
- Peters, H.A., Goemen, A., Cripps, D.J., Bryan, G.T., Dogramaci, I., 1982. Epidemiology of hexachlorobenzene-induced porphyria in Turkey: Clinical and laboratory follow-up after 25 years. *Arch. Neurol.* 39, 744–749.
- Polder, A., Becher, G., Savinova, T.N., Sklare, J.U., 1998. Dioxins, PCBs and some chlorinated pesticides in human milk from the Kola Peninsula, Russia. *Chemosphere* 37, 1795–1806.
- Quirroz, M.L., Bincioletto, C., Perlingeiro, R.C., Quadros, M.R., Souza, C.A., 1998. Immunoglobulin levels in workers exposed to hexachlorobenzene. *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 172–175.
- Sakai, S., Hirai, Y., Takatsuki, H., 2000. Environmental emissions and their sources of hexachlorobenzene (HCB). *Waste Manage. Res.* 12, 349–362.
- Takekuma, M., Saito, K., Ogawa, M., Matsumoto, R., Kobayashi, S., 2004. Levels of PCDDs, PCDFs and co-PCBs in human milk in Suitama, Japan, and epidemiological research. *Chemosphere* 54, 127–135.
- Van Birgelen, A.P.J.M., 1988. Hexachlorobenzene as a possible major contributor to the dioxin activity of human milk. *Environ. Health Perspect.* 106, 683–688.
- Waliszewski, S.M., Szymczyński, G.A., 1982. Simple, low-cost method for determination of selected chlorinated pesticides in fat samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65, 677–679.

ノート

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

(平成16年8月18日受理)

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

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

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

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

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

(Received June 18, 2004)

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

緒 言

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

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

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

¹⁾ 通知文

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野宮 1-18-1

^{*2} 財団法人 食品薬品安全センター-寿野研究所: 〒257-8523 神奈川県藤沢市落合 729-5

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

著者らはこれまでに、GM トウモロコシならびにジャガイモの定性検査法を対象とした外部精度管理方法の検討について報告した⁶⁾。本研究では、食安発第 0628001 号⁸⁾に記載の GM パパイア定性検査法を対象とし、GUS (β -glucuronidase) 法、ならびに定性 PCR 法の 2 法について外部精度管理試験を実施したので報告する。

実験方法

1. 試料

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

2. 試薬

GUS 活性を検出するための基質としては、和光純薬工業(株)製の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide-cyclohexyl ammonium salt を用いた。DNA の抽出精製には、Qiagen 社製シリカゲル膜タイプキット (DNeasy Plant Mini Kit) を用いた。DNA ポリメラーゼとしては Applied Biosystems (株) 製の AmpliTaq™ Gold を、dNTP、10×PCR buffer II ならびに塩化マグネシウムは、AmpliTaq™ Gold に付属のものを用いた。アガロースは宝酒造(株)製 LO3「TAKARA」を用いた。DNA マーカーは宝酒造(株)製 100 bp ラダーを用いた。水は日本ミリポア(株)製 Milli-Q Synthesis A10 で精製した超純水を 120℃、20 分の条件でオートクレープ滅菌したものを用いた。他の試薬はすべて市販特級品を用いた。なお、上記試薬類は、送付検体の確認試験、および安定性試験を実施した機関が使用したものを記載した。

3. 機器

粉碎機: ミキサーミル MM 200 (Retsch 社製)、恒温槽: ドライサーモユニット DTU-1B (タイテック(株)製)、冷却遠心機: Avanti HP25 (Beckman 社製)、卓上遠心機: KR-1000 (フナコシ(株)製)、タッチミキサー: MT-51 (ヤマト(株)製)、分光光度計: Gene Quant II (Pharmacia Biotech 社製)、サーマルサイクラー: GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems(株)製)、電気泳動装置: Mupid- α (アドバンス(株)製)、ゲルイメージ解析装置: Diana システム (Raytest 社製)。なお、上記機器類は、送付検体の確認試験、お

び安定性試験を実施した機関が使用したものを記載した。

4. 試料の調製

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

5. GUS 試験法

食安発第 0628001 号⁸⁾に記載の条件を遵守した。

6. DNA 溶液の調製

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

7. プライマー

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

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

8. PCR 条件

食安発第 0628001 号⁹⁾に記載の条件を遵守した。

9. 試験の実施

本外部精度管理試験に参加した機関は合計 23 機関であった。定性 PCR 法に参加した 21 機関に対しては、GM および Non-GM パパイヤ果肉部小分け試料各 2 検体を blind duplicate として送付した。また、GUS 法に参加した 13 機関については、GM および Non-GM パパイヤ種子小分け試料各 2 検体をそれぞれ blind duplicate として送付した。また、検体送付時には、試験結果および調査項目の記入方法を規定した各種報告書様式、試験の実施期間を規定した実施要領、および食安発第 0628001 号⁹⁾に準じて作成した厚生労働省通知準拠マニュアルを送付した。なお、調査項目には、GM 食品検査の経験年数および検査実績、測定機器の共用の有無、各種測定機器のメーカー、採用した DNA 抽出法、プライマーの合成法ならびにグレード、電気泳動条件、インキュベーション条件、染色方法など、検査全般にわたり詳細な調査が行えるよう配慮した。

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

結果および考察

1. 送付検体の確認試験

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

Table 1. Results of Confirmative Test with GUS Assay

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

+: positive, -: negative

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

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

Table 2. Results of Confirmative Test with Qualitative PCR Method

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

* Number positive/Number of sample

PCR was performed with three primer pairs described above.

Table 3. Results of Stability Test with GUS Assay

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

+: positive, -: negative

Seed for tests was stored at 4°C

Table 4. Results of Stability Test with Qualitative PCR Method

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

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

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

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

2. 送付検体の安定性試験

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

3. DNA 収量および精製度

食安発第 0628001 号⁹⁾には、パパイヤからの DNA 抽出

Table 5. Yield and Quality of DNA in Sample Solution Extracted from Papaya Samples with Silica-membrane Type Kit

Laboratory	DNA conc. (ng/ μ L)	Ratio*	
		260/280	260/230
A	3.1 \pm 1.3	1.55 \pm 0.56	0.54 \pm 0.11
B	6.8 \pm 1.3	1.45 \pm 0.15	11.63 \pm 11.39
C	19.5 \pm 4.0	1.17 \pm 0.08	—
D	13.2 \pm 7.1	1.52 \pm 0.41	—
E	9.0 \pm 3.1	1.90 \pm 0.08	—
F	9.4 \pm 3.5	1.28 \pm 0.05	0.70 \pm 0.17
G	16.9 \pm 2.8	1.72 \pm 0.08	1.40 \pm 1.45
H	24.8 \pm 8.9	1.32 \pm 0.03	-3.71 \pm 4.64
I	7.0 \pm 1.9	1.33 \pm 0.13	-1.88 \pm 3.55
J	16.2 \pm 3.9	1.30 \pm 0.02	0.80 \pm 0.08
K	—	—	—
L	11.6 \pm 5.4	1.32 \pm 0.07	2.00 \pm 9.09
M	10.0 \pm 2.4	1.37 \pm 0.08	0.38 \pm 0.06
N	11.0 \pm 3.0	1.67 \pm 0.14	0.52 \pm 0.22
O	33.4 \pm 5.5	1.16 \pm 0.03	13.29 \pm 22.07
P	33.2 \pm 16.2	1.14 \pm 0.04	2.21 \pm 1.19
Q	15.1 \pm 3.0	1.73 \pm 0.18	—
R	22.2 \pm 19.4	1.48 \pm 0.28	0.25 \pm 1.37
Average	15.1 \pm 11.0	1.49 \pm 0.30	2.26 \pm 8.53

—: no data

*: Ratio of UV absorption at 260 nm to that at 280 nm or 230 nm

Table 6. Yield and Quality of DNA in Sample Solution Extracted from Papaya Samples with the CTAB Method

Laboratory	DNA conc. (ng/ μ L)	Ratio*	
		260/280	260/230
S	18.9 \pm 2.5	1.82 \pm 0.10	1.09 \pm 0.35
T	19.1 \pm 2.5	1.73 \pm 0.03	—
U	20.4 \pm 24.5	1.56 \pm 0.33	—
Average	19.4 \pm 13.7	1.70 \pm 0.22	1.09 \pm 0.35

—: no data

*: See the footnote to Table 5.

法として、シリカゲル膜タイプキット法、ならびにCTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロミド) 法が併記されている。定性PCR法を用いた試験に参加した全21機関中、3機関がCTAB法によりDNA抽出を行っていた。両抽出法により得られたDNA収量ならびに、O.D. 260/280 nm, O.D. 260/230 nmを基準とした精製度の結果をTable 5, 6に示す。機関Kからは分光光度計の不具合を理由に報告が得られなかった。また、230, 320 nmにおけるO.D.の記載を報告様式中に要求したが、通知ではこれらO.D.の測定義務が課されていないことを理由に、複数機関からの報告が得られなかった。抽出法別にDNA平均収量、平均精製度を算出した結果、シリカゲル膜タイプキット法では、DNA平均収量が15.1 \pm 11.0 ng/ μ L, O.D. 260/280 nm, O.D. 260/230 nmを指標とした平均精製度は、それぞれ1.45 \pm 0.30, 2.26 \pm 8.53であった。また、CTAB法においては、それぞれ、19.4 \pm 13.7 ng/ μ L, 1.70 \pm 0.22, 1.09 \pm 0.35であった。両抽出法間におけるDNA平均収量ならびに精製度に関し、明確な差異は認められなかった。しかし、抽出操作が煩雑であり、実験者の手技的要因が結果に反映されやすいとされるCTAB法が

けでなく、比較的操作が簡便であるシリカゲル膜タイプキット法においても、DNA収量、精製度ともに大きなばらつきが観察された。この要因として、検体の凍結乾燥処理、または、粉砕処理が不十分であることによる粉砕物の粒径の不均一性、および組織内に多量類を多量に含有しているという検体の特性に起因しているものと考えられた。

4. GUS法

Table 7にGUS法による試験結果を機関別に示す。すべての機関において、GM, Non-GM検体それぞれ2検体ずつ、計4検体すべてが正しく判定された。また、GMパパイヤの種におけるGUS発現率の平均値は、73.7%であり、ほぼ理論値と同等と判断される結果が得られた。また、Non-GM検体においては、すべての検体でGUS活性は観察されず、遺伝性は認められなかった。

5. 定性PCR法

Table 8に定性PCR法による試験結果を機関別に示す。各機関に送付したGM検体およびNon-GM検体それぞれ2検体ずつ、計4検体すべてが正しく判定された。しかし、Non-GM検体を対象とした試験において、検出用プライマー対を用いた場合に増幅バンドが検出され、確認試

Table 7. Results of Laboratory-performance Study with GUS Assay

Sample	Laboratory	Number of embryos tested**	Number of embryos that turned blue**	GUS-expression (%)	Decision
Non-GM papaya	K	12	0	0	-
	L	12	0	0	-
	M	12	0	0	-
	N	12	0	0	-
	O	12	0	0	-
	P	12	0	0	-
	Q	12	0	0	-
	R	12	0	0	-
	S	12	0	0	-
	T	12	0	0	-
	U	12	0	0	-
	V	12	0	0	-
	W	12	0	0	-
	Average	12	0	0	
GM-papaya	K	12	7.5	62.5	+
	L	12	6.0	50.0	+
	M	12	6.0	50.0	+
	N	12	9.5	79.2	+
	O	12	8.0	66.7	+
	P	12	9.5	79.2	+
	Q	12	8.5	70.8	+
	R	12	10.0	83.3	+
	S	12	10.0	83.3	+
	T	12	10.0	83.3	+
	U	12	9.0	75.0	+
	V	12	9.5	79.2	+
	W	12	9.5	79.2	+
	Average	12	8.8	73.7	

+: positive, -: negative

*: Average of two samples

Table 8. Results of Laboratory-performance Study with Qualitative PCR Method

Primers	Non-GM papaya		GM-papaya	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Control papain-5', papain-3'	21/21*	0/21	21/21	0/21
Detection NosC-5', CaMVN-3'	1**/21	20/21	21/21	0/21
Identification CaM 3-5', GUS n-3'	0/1	1/1	21/21	0/21

*: Number positive/Number of sample

**: false-positive

First PCR was performed with the control and detection primer pairs.

When the result was positive, a second PCR was performed with the identification primer pairs.

験を実施したが増幅バンドが検出されず、最終判定を陰性とした例が1機関・1検体のみ認められた。提出された電気泳動の画像解析写真を確認したところ、予定増幅バンド長と同一と判断される位置にバンドが確認された。この原因として、非特異的増幅バンドの検出、または他のGMパパイヤ検体からのコンタミネーションの2点が考えられる。他の機関からは、非特異的増幅バンドが予定バンド長である207 bp付近に観察されたという報告はされていないことから、検体の凍結乾燥、粉砕処理、DNA抽出操作、または、PCR反応液調製時におけるGM検体の混入によるものであると推察される。さらに、疑陽性の認められた機関から提出されたアンケート調査を詳細に精査した

ところ、本試験に使用した機器、試薬などの試験環境全般に関しては、他の機関から報告されているものと明確な差異は認められなかった。しかしながら、当該検査機関における試験実施者のGM食品検査の経験年数が1年未満と報告されており、他の機関の試験実施者に比べ比較的に短いことが認められた。よって、上述の疑陽性は、実験操作の不慣れによるコンタミネーションが原因と考えられ、精度の高い試験結果を得るためには、実験操作に習熟している担当者が試験を行う必要があると示唆された。

結 論

GMパパイヤを検査対象とし、23の参加機関に共通未

知試料を配布し、外部精度管理試験を実施した。本試験において、送付した検体はすべて生鮮品であることから、輸送時における試料の劣質、各参加機関において使用する機器、試薬の差異など、外部精度管理試験を行ううえで、いくつかの懸念点が考えられた。しかしながら、各機関から報告された分析結果を集計し詳細に解析したところ、送付試料のすべてが予想された結果と一致した。また、一部予想しない結果が得られた事例についても、他機関から報告された詳細な試験結果と比較すること、および同時に実施した検査法の全般にわたるアンケート調査結果から、その要因を推定することが可能であった。

文 献

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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)。
- 4) 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)。
- 5) 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(一部改正)”平成13年3月25日、食発第153号(2001)。
- 6) 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(一部改正)”平成14年4月30日、食発第0430001号(2002)。
- 7) 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(一部改正)”平成15年11月13日、食発第1113001号(2003)。
- 8) 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(一部改正)”平成16年6月28日、食発第0628001号(2004)。
- 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) Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T. A histochemical method using a substrate of β -glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 45, 15-24 (2004).

報 文

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

(平成 17 年 6 月 24 日受理)

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

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

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

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

To investigate important factors affecting the analytical results, a laboratory-performance study was attempted for the Japanese official methods to detect genetically modified (GM) soybeans (40-3-2). Test samples containing 0.1 and 5% GM soya powder in non-GM soya powder was prepared. A set of 3 test samples was sent to the participating laboratories along with the protocol. The data were collected from all laboratories and statistically analyzed. In the real-time PCR detection method, the average values of the GM 1% and 5% samples were both much lower than the spiked value because the laboratories using a silica-membrane DNA extraction method underestimated the GM value. On the other hand, the laboratories using other extraction methods, such as the CTAB method obtained values close to the spiked value. These results suggest that use of the silica-membrane DNA extraction method may result in underestimation of the GM content in the real-time PCR method. In the ELISA method, the average value of 5% spiked samples appears to be slightly higher than the fortified value. But, overall, it was considered that reported values were close to the spiked level.

(Received June 24, 2005)

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

緒 言

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

号)¹⁾において、遺伝子組換え (GM) 食品の表示が法的に義務化された。これは原材料にダイズ、トウモロコシ、なたね、ばれいしょ、綿実、てんまい (その後追加) を含む、その含量が原材料の上位 3 品目に入りかつ 5% 以上の食品に適用される。対象となる食品が安全性審査済みの GM 作物を含む場合には「遺伝子組換え」の、安全性審査済みの GM 作物を含む可能性があり、分別生産流通管理が行われていない原材料を含む場合には「遺伝子組換え不分別」の表示が義務づけられた。一方、対象となる食品でも、分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え (non-GM) の原材料を使用した場合には表示義務はなく、任意表示とされている。しかし、分別生産流通管理が適切

連絡先

^{*1} 財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5

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

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

^{*} 現在所: (社)日本食品衛生協会食品衛生研究所 〒194-0035 東京都町田市忠生 2-5-47

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

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

実験方法

1. 精度管理試料の調製

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

2. 参加機関における測定

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

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

3. 均一性試験および安定性試験

(1) 測定試料

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

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

(2) DNA 抽出

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

(3) 定量 PCR

定量 PCR は、定量 PCR 装置に ABI PRISM 7700、定量 PCR 試薬に TaqMan Universal PCR Master Mix (以上アプライドバイオシステムズ(株))、ダイズ内在性 DNA Lel オリゴヌクレオチドセット、GM ダイズ (RRS) 系統別 DNA RRS オリゴヌクレオチドセット、GM ダイズ (RRS) プラスミドセット-ColE1/TE- (以上(株)ニッポンジーン)を使用し、「食安発第 0618001 号」3.1.2 定量 PCR 法の項に従って実施した。

(4) ELISA 法

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

4. 参加機関における測定

参加機関での外部精度管理試験の実施期間は、定量

PCR法、ELISA法とも2003年6月23日から7月25日とした。

(1) 定量PCR法

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

(2) ELISA法

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

5. 外部精度管理結果の集計

測定値の統計解析は食品薬品安全センターが担当した。各参加機関から返送された分析結果を試料別に定量PCR法とELISA法のそれぞれについてまとめ、統計解析ソフトウェアJUSE-QCAS（(株)日本科学技術研修所）を用いて統計処理を行い、各種統計量および α -スコアの算出を行った。なお、 α -スコアの算出においては、指定値(assigned value)の代用として総平均(各機関の平均値(Xbar)の平均)を使用し、またXbarの管理限界は総平均 ± 2 S.D.とした(α -スコアの絶対値2に相当)。統計解析の詳細については大綱の報告³⁾に従った。

結果

1. 均一性および安定性試験結果

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

0.05)を下回り、均一性が確認された。ELISA法による均一性試験は各濃度6試料についてそれぞれ1回のみ測定を行った。その結果Table 1に示したように0%試料はいずれも検出限界以下であった。また、1%および5%試料の相対標準偏差はそれぞれ5.38%、7.56%であった。

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

なお、均一性試験および安定性試験開始前および終了後における定量PCR法による測定値は順に0.57%、0.53%、0.73%(以上1%試料)、3.87%、3.20%、3.81%(以上5%試料)といずれも重量混合比を下回った。一方、ELISA法による測定値はいずれも重量混合比とほぼ等しいかまたは上回る結果であった。

2. 外部精度管理結果

(1) 定量PCR法

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

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

Sample	Quantitative PCR (n=12)		ELISA (n=6)	
	Concentration (%)	F ¹⁾	Concentration (%)	RSD (%)
0%	0		<0.14 ²⁾	
1%	0.57 \pm 0.15	1.0962	0.93 \pm 0.05	5.38
5%	3.87 \pm 0.56	2.4795	3.83 \pm 0.44	7.55

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

²⁾ Minimum detection limit: 0.14

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

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

¹⁾ Minimum detection limit: 0.14

Table 3. Yield and Quality of DNA Extracted from Samples

Laboratory	Method	DNA (μ g)	Ratio	
			260 nm/280 nm	260 nm/230 nm
1	A	2.48 \pm 0.84	1.73 \pm 0.06	1.92 \pm 0.37
3	A	6.76 \pm 1.74	1.91 \pm 0.05	no data
5	A	4.65 \pm 1.03	1.74 \pm 0.19	2.82 \pm 0.59
6	A	4.85 \pm 1.03	1.90 \pm 0.08	0.24 \pm 0.05
8	A	7.53 \pm 1.95	1.37 \pm 0.11	1.43 \pm 0.15
9	A	5.20 \pm 2.43	1.48 \pm 0.13	0.73 \pm 0.18
10	A	3.82 \pm 1.12	1.70 \pm 0.15	2.37 \pm 0.64
11	A	9.45 \pm 3.37	1.85 \pm 0.09	8.86 \pm 18.02
12	A	13.04 \pm 3.69	3.07 \pm 0.49	0.95 \pm 0.09
16	A	2.37 \pm 0.90	1.78 \pm 0.10	1.81 \pm 0.25
17	A	4.31 \pm 0.75	1.13 \pm 0.04	1.25 \pm 0.06
18	A	3.60 \pm 1.16	1.88 \pm 0.06	2.01 \pm 0.11
21	A	3.37 \pm 1.25	1.85 \pm 0.08	3.60 \pm 0.43
24	A	4.64 \pm 0.68	1.90 \pm 0.03	2.27 \pm 0.14
26	A	5.42 \pm 3.05	1.81 \pm 0.03	1.32 \pm 0.24
27	A	2.84 \pm 1.06	1.79 \pm 0.05	2.41 \pm 0.32
28	A	5.58 \pm 0.69	1.83 \pm 0.03	2.30 \pm 0.30
30	A	2.92 \pm 0.62	1.73 \pm 0.04	no data
19	B	5.06 \pm 1.30	2.17 \pm 0.22	0.86 \pm 0.11
22	B	7.87 \pm 2.33	1.75 \pm 0.07	0.73 \pm 0.16
31	B	63.17 \pm 4.95	1.84 \pm 0.01	no data
30	C	30.75 \pm 8.10	1.90 \pm 0.05	0.82 \pm 0.13

A: Silica-gel membrane type kit

B: CTAB method

C: Silica-based resin type kit

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

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

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

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

(2) ELISA法

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

考 察

1. 均一性試験および安定性試験

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

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

Laboratory	DNA extraction method ²⁾	Test sample (GMO content, %)	Test sample (GMO content, %)								
			0%	1%				5%			
				Xbar	R	z-Score ¹⁾	z-Score ³⁾	Xbar	R	z-Score ¹⁾	z-Score ⁴⁾
1	A	0	0.870	0.269	0.994	1.345	3.753	0.661	-0.009	0.570	
3	A	0	0.774	0.252	0.444	0.732	4.140	0.639	0.567	1.572	
5	A	0	0.794	0.150	0.558	0.860	4.080	1.539	0.478	1.418	
6	A	0	0.606	0.604	-0.514	-0.354	3.718	1.430	-0.061	0.480	
8	A	0	0.494	0.340	-1.153	-1.046	3.713	0.915	-0.069	0.466	
9	A	0	1.087	0.770	2.229	2.721	3.983	0.224	0.324	1.167	
10	A	0	0.599	0.105	-0.557	-0.383	3.163	0.338	-0.888	-0.959	
11	A	0	0.484	0.150	-1.214	-1.114	3.136	0.562	-0.928	-1.028	
12	A	0	0.562	0.125	-0.769	-0.618	3.093	0.847	-0.992	-1.139	
16	A	0	0.734	0.607	0.156	0.412	2.907	0.563	-1.269	-1.622	
17	A	0	0.760	0.082	0.962	0.641	3.723	0.387	-0.054	0.491	
18	A	0	0.484	0.102	-1.214	-1.114	3.617	1.180	-0.212	0.217	
19	B	0	0.708	0.045	0.069		3.918	0.119	0.236		
20	C	0	0.964	0.117	1.531		5.640	0.390	2.801		
21	A	0	0.575	0.073	-0.694	-0.535	3.037	1.113	-1.076	-1.286	
22	B	0	0.736	0.271	0.229		4.334	0.635	0.857		
24	A	0	0.624	0.135	-0.415	-0.224	3.883	0.373	0.184	0.906	
26	A	trace	0.559	0.436	-0.784	-0.635	3.057	4.092	-1.045	-1.233	
27	A	0	0.735	0.239	0.221	0.484	3.652	0.534	-0.159	0.309	
28	A	0	0.583	0.139	-0.649	-0.485	3.411	2.194	-0.518	-0.315	
30	A	0	0.548	0.131	-0.849	-0.707	3.528	1.058	-0.344	-0.012	
31	B	0	1.050	0.072	2.020		5.215	0.624	2.168		
Statistics ¹⁾			n	22	22	22	22	22			
			CL	0.696	0.208		3.753	0.928			
			S.D.	0.175			0.671				
			C.V.	0.252			0.179				
			UCL	1.046	0.537		0.537	2.389			
			LCL	0.346			2.417				
Statistics ²⁾			n	18	18		18	18			
			CL	0.659	0.227		3.533	1.036			
			S.D.	0.157			0.386				
			C.V.	0.239			0.109				
			UCL	0.973	0.584		4.305	2.667			
			LCL	0.345			2.761				

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

¹⁾ The statistics are based on all the data.

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

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

現性と比較することとした。均一性試験のRSDは1%試料が5.38%、5%試料(10倍希釈で測定のため、実測濃度は0.5%付近)が7.56%で、いずれも<GMO>ダイズキット取扱説明書^{*)}の1.25%濃度におけるプレート内再現性のRSD 8.9%を下回っており、均一性が確認されたものと考えた。

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

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

2. 定量PCR法

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

^{*)} Strategic Diagnostics Inc. Food Ingredient Testing Soy Kit User's Guide, Rev. 111799, Ver. 2.0

Table 5. Results of Laboratory-performance Study for ELISA

Laboratory	0%	1%			5%		
		Xbar	R	z-Score	Xbar	R	z-Score
1	ND	1.047	0.219	-0.080	5.607	0.980	-0.050
2	ND	1.123	0.044	0.480	5.580	0.330	-0.076
4	ND	1.293	0.280	1.736	6.600	0.400	0.912
6	ND	0.899	0.159	-1.164	5.343	1.900	-0.305
7	ND	1.066	0.128	0.065	5.927	0.710	0.260
13	ND	0.883	0.168	-1.284	5.563	0.560	-0.092
14	ND	1.349	0.153	2.148	7.617	0.220	1.896
15	ND	0.999	0.138	-0.430	7.040	0.520	1.338
17	ND	0.987	0.094	-0.519	5.670	0.240	0.011
23	ND	1.163	0.195	0.777	3.823	4.790	-1.777
25	ND	0.829	0.229	-1.681	3.820	0.640	-1.780
29	ND	1.104	0.070	0.346	5.423	0.570	-0.228
30	ND	0.988	0.084	-0.511	4.090	1.070	-1.519
32	ND	1.110	0.022	0.384	6.400	0.730	0.718
33	ND	0.968	0.074	-0.656	5.893	2.360	0.227
34	ND	1.040	0.348	-0.129	6.260	0.690	0.583
35	ND	1.128	0.128	0.519	5.537	0.870	-0.118
n	17	17	17		17	17	
CL		1.058	0.149		5.658	1.035	
S.D.		0.136			1.033		
C.V.		0.129			0.183		
UCL		1.330	0.384		7.724	2.666	
LCL		0.786			3.592		

Abbreviations: See the footnotes of Table 4

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

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

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

法に比べて低くなることが判明した(Table 6)。

Thompsonら⁹⁾のプロトコールには測定法により測定値に差が生ずることが明らかな場合、指定値を測定法別に設定して解析する方法が記されている。これに基づいて、定量PCRの結果をDNA抽出法により区別して統計解析をやり直した。その結果、シリカゲル膜タイプキット法を用いた機関のみの解析でXbarが管理限界を超えたのは1%試料の1機関のみであった。この測定データはRも管理限界を超えており3測定のうち1測定が高値であったことにより平均値が影響を受けたものと考えられた。このほかにも1%試料でRが管理限界を超えた機関が1機関あった。これら2機関については報告書を詳細に検討したがDNA抽出、定量PCRとも特に問題は見当たらず、測定値がばらついた原因は考察できなかった。さらに5%試料でRが管理限界を超えた機関が1機関あり、その測定データは3測定のRSDが72%と他の機関に比べて著しく大きかった。この機関の抽出DNAは260 nm/230

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

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

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

この結果を考慮して 2.2.1 トウモロコシ及びダイズ穀粒からの DNA 抽出精製、2.2.1.2 シリカゲル膜タイプキット法の項に「トウモロコシのみ適用可能」の旨を追記し、ダイズの DNA 抽出法からシリカゲル膜タイプキット法を除いた通知法改正版（平成 15 年 11 月 13 日、食安発第 1113001 号）⁹⁾ を厚生労働省から通知した。

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

3. ELISA 法

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

結 論

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

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

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

謝 辞

本研究は、平成 14 年度厚生労働省食品等試験検査費および厚生労働科学研究補助金により実施した。本研究にご協力いただいた検査機関諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬品食品保健部長通知「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部改正」平成 13 年 3 月 15 日、食発第 79 号 (2001)。
- 2) 厚生労働省医薬品食品保健部長通知「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」平成 13 年 3 月 27 日、食発第 110 号 (2001)。
- 3) 食品衛生法施行規則 (昭和 23 年厚生省令第 23 号)
- 4) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)」平成 15 年 6 月 18 日、食発第 0618001 号 (2003)。
- 5) 大崎 昇、精度管理における統計的データ解析、食品衛生学雑誌、39、J-325-J-332 (1998); 40、J-325-J-331 (1999); 41、J-238-J-242 (2000); 41、J-316-J-322 (2000)。
- 6) Thompson, M., Wood, R., International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. J. AOAC Int., 76, 926-939 (1993)。
- 7) 厚生労働省医薬品食品局食品安全部長通知「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)」平成 15 年 11 月 13 日、食発第 1113001 号 (2003)。
- 8) Peano, C., Samson, M. C., Palmier, L., Gulli, M., Marmiroli, N., Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. J. Agric. Food Chem., 50, 6, 962-968 (2004)。

報 文

遺伝子組換えトウモロコシ (Mon810 系統) の定量 PCR 法を
対象とした外部精度管理試験

(平成 17 年 9 月 8 日受理)

渡邊 敬浩^{*1,†} 笠間 菊子^{*2} 菊地 博之^{*1} 鈴木 達也^{*2} 時下 祥子^{*1}
坂田 こずえ^{*1} 松本 容彦^{*2,*} 日野 明寛^{*3}
穂山 浩^{*1} 米谷 民雄^{*1}Laboratory-performance Study of Quantitative PCR
Methods to Analyze an Approved Genetically Modified Maize
(Mon810 Line)Takahiro WATANABE^{*1,†}, Kikuko KASAMA^{*2}, Hiroyuki KIKUCHI^{*1}, Tatsuya SUZUKI^{*2},
Shoko TOKISHITA^{*1}, Kozue SAKATA^{*1}, Akihiko MATSUKI^{*2,*}, Akihiro HINO^{*3},
Hiroshi AKIYAMA^{*1} and Tamio MAITANI^{*1}

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

A laboratory-performance study was carried out to investigate factors affecting the reliability of the quantitative PCR method to analyze an approved genetically modified (GM) maize (Mon810 line).

Test maize powdered samples were prepared as blind samples containing a high (assigned value; 5.45%) or low (assigned value; 0.36%) concentration of the Mon810 line. After confirmation of their homogeneity, they were provided to 27 laboratories participating in the collaborative study. The data were collected from all laboratories and statistically analyzed. Two laboratories, which used a Roche LightCycler (LC), reported significantly high test values. A further examination showed that the LC method is greatly affected by the equipment itself or PCR reagents, resulting in poor repeatability. On the other hand, some laboratories, which used ABI quantitative PCR equipment, reported erroneous test values. In these laboratories, the errors appeared to have been due to inadequate quality and/or yield of DNA. To identify factors affecting the test values, analysis of the measured values for the taxon-specific gene will be useful. Furthermore, the modified silica-gel membrane DNA extraction method made it possible to extract the required amounts of DNA more easily and in a shorter time than before.

(Received September 8, 2005)

Key words: 遺伝子組換えトウモロコシ genetically modified maize; ポリメラーゼ連鎖反応 PCR; DNA 抽出法 DNA extraction method; 検査方法 detection method; 外部精度管理 laboratory-performance study

結 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活用され

るようになった。その結果開発された作物は遺伝子組換え (GM) 作物と呼ばれ、1990 年代後半に米国、カナダといった農業先進国において商業栽培が開始されて以降、東南アジアや南米などが栽培開始国に加わったことに伴い、

† 連絡先

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

^{*2} 財団法人 食品薬品安全センター 豊野研究所: 〒257-8523 神奈川県横浜野市 729-5

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

* 現住所: (社)日本食品衛生協会 食品衛生研究所: 〒194-0036 東京都町田市忠生 2-5-47

その栽培面積を急速に増加させている¹⁾。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²⁾。そのため厚生労働省では、平成12年には厚生省告示232号³⁾、233号⁴⁾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⁵⁾)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⁶⁾)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⁷⁾)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る。またこれに関連し食品衛生法施行規則⁸⁾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⁹⁻¹²⁾。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¹³⁾ 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、米園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、米園の商事会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 μ 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、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¹⁴⁾に一部改変を加えて以下のように行った。まず、均一に粉砕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試料粉砕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砕器により粉砕した後、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容速沈管、50mL容速沈管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℃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[®] 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