

HPLCによる食品中メトプレンの分析法

(平成18年2月17日受理)

齋藤 勲*¹ 上野英二*^{1,†} 大島晴美*¹ 松本 浩*¹
 佐々木久美子*² 米谷民雄*²

Analytical Method of Methoprene in Foods Using HPLC

Isao SAITO*¹, Eiji UENO*^{1,†}, Harumi OSHIMA*¹, Hiroshi MATSUMOTO*¹,
 Kumiko SASAKI*² and Tamio MAITANI*²

(*¹ Aichi Prefectural Institute of Public Health: 7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku,
 Nagoya 462-8576, Japan; *² National Institute of Health Science: 1-18-1,
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; [†] Corresponding author)

We studied the determination of methoprene in foods by high-performance liquid chromatography (HPLC). The sample was extracted with acetonitrile and the extract was salted out by adding sodium chloride, allowing the acetonitrile layer to separate. The acetonitrile solution was washed with hexane saturated with acetonitrile, cleaned up on a Florisil column and determined by HPLC. The recovery of methoprene from spiked samples was 74.6–82.8%. In an evaluation of this method by 6 analytical laboratories, mean recoveries from spiked samples ranged from 79.4% to 84.6%. Repeatability relative standard deviation values were 2.3–8.8% and reproducibility relative standard deviation values were 8.8–23.6%. The detection limits were 0.001–0.02 µg/g and below the detection limit of the Notified Analytical Method.

(Received February 17, 2006)

Key words: メトプレン methoprene; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 食品 food

緒言

メトプレン Methoprene (Fig. 1) は、幼若ホルモン Juvenile Hormone (JH) の研究から開発された昆虫成長制御剤 (IGR) である。日本では農薬として登録されていないが、蚊、ハエの幼虫防除を目的に衛生害虫駆除用として使用されている¹⁾。食品衛生法の残留基準は、玄米、小麦、大麦、ライ麦、とうもろこし、そばなどの穀類に 5.0 ppm、らっかせいに 2.0 ppm、マッシュルームに 0.2 ppm が設定されている。厚生労働省よりメトプレン試験法として、試料からアセトニトリル抽出後、塩化ナトリウムと水

を加えて石油エーテルで再抽出し、5% 含水フロリジルカラム、次いで 6% 含水アルミナカラムで精製して GC-FID で定量する方法²⁾が通知されている。しかし、この方法は他の農薬の試験法と比較して、フロリジル (25 g) とアルミナ (70 g) をそれぞれ用いたカラム精製を行うこと、定量方法に唯一 GC-FID を用いるなど複雑な面がある。また、GC-FID を用いない分析法として、Chamberlain は、肥料中メトプレンをアセトニトリルで抽出し、ヘキサンに転溶後、フロリジルカラムで精製して HPLC で測定する方法³⁾、田宮らは、米中メトプレンをヘキサンで抽出し、還流蒸留装置を用いて再抽出後、フロリジルカートリッジカラムで精製して HPLC で測定する方法⁴⁾、遠藤らは、穀類中メトプレンをアセトンで抽出し、ヘキサンに転溶後、多孔性珪藻土カラムで脱脂、次いでフロリジルカートリッジカラムで精製して HPLC で測定する方法⁵⁾を報告している。また、Hill らは、ELISA を用いた分析法⁶⁾を報告している。

今回著者らは、メトプレン試験法²⁾の見直しを目的として、精製法の簡易化、GC-FID に比べて汎用され、操作も簡便な HPLC を用いる分析法の検討を行い、試料からア

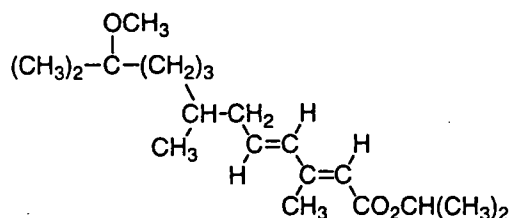


Fig. 1. Structure of methoprene

[†] 連絡先

*¹ 愛知県衛生研究所: 〒462-8576 名古屋市北区辻町流 7-6

*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 遠藤友紀子, 今泉則子, 渋谷 隆, 前川吉明, 日本食品衛生学会第 67 回学術講演会講演要旨集, p. 34 (1994).

セトニトリルで抽出し、塩析により水層を分離後、アセトニトリル層をヘキサンで洗浄、次いでフロリジル (5 g) カラムで精製して HPLC で定量する方法を開発し、数種類の農作物について添加回収試験を行ったところ、満足すべき結果が得られた。さらに、確立した分析法に従って、6 機関による共同評価試験を行ったところ、良好な評価結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は市販の農作物 7 種 (小麦, 大麦, とうもろこし, そば, 玄米, らっかせいおよびマッシュルーム) を用いた。

2. 試薬および標準品

試薬は和光純薬工業(株)の残留農薬試験用を用いた。メトブレン標準品は林純薬工業(株)の残留農薬試験用を用い、20 mg をアセトン 20 mL に溶解して 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 標準原液を調製した。添加回収試験用の標準溶液は標準原液をアセトンで希釈した 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を、検量線作成用には標準原液をメタノールで適宜希釈した溶液を用いた。

ケイソウ土は和光純薬工業(株)のセライト 545 を用い、フロリジルは和光純薬工業(株)のフロリジル PR を 130°C で 12 時間以上加熱後、デシケーター中で放冷して用いた。

3. 装置および測定条件

HPLC: (株)島津製作所製の LC-10AD ポンプ, CTO-10A カラムオーブンおよび SPD-10AV 検出器, 信和化工(株)製の STR ODS-II カラム (4.6 mm i.d. \times 150 mm, 5 μm), カラム温度 40°C, 移動相メタノール-水 (90:10), 流速 0.8 mL/min, 測定波長 265 nm。

GC/MS: (株)島津製作所製の GCMS-QP5000, J&W Scientific 社製の DB-1 カラム (0.25 mm i.d. \times 30 m, 0.25 μm), カラム温度プログラム 60°C (1 min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 200°C \rightarrow 5°C/min \rightarrow 300°C (5 min), 注入口温度 250°C, インターフェイス温度 300°C, キャリヤーガスヘリウム, キャリヤーガス流量 1 mL/min, 注入量: 1 μL , 測定モード SIM (m/z 153, 111, 73)。

共同評価試験は、同等のカラムおよび条件を用いて行った。

4. 試験操作

a. 抽出

細切した試料 10 g (マッシュルームは 20 g) を量り採り、穀類の場合は水 20 g を加えて 2 時間放置後、アセトニトリル 100 mL を加えてホモジナイザーでかくはん抽出した。ろ過助剤としてケイソウ土を加えて吸引ろ過後、残渣はさらにアセトニトリル 50 mL で抽出し、ろ過した。ろ液を合わせ、塩化ナトリウム 7 g を加えて振とう後、分離した水層を捨てた。アセトニトリル層をアセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL で洗浄し、ヘキサン層と一部

洗浄により生成する水層を捨てた後、アセトニトリル層を 40°C 以下で減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル 30 mL に溶解し、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、ろ過後、無水硫酸ナトリウムを酢酸エチル 10 mL で 2 回洗浄し、ろ過した。抽出液は 40°C 以下で減圧濃縮後、残渣をヘキサン 5 mL に溶解した。

b. 精製

内径 15 mm, 長さ 30 cm のクロマト管にフロリジル 5 g をエーテル-ヘキサン (1:19) で湿式充てんし、無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層した。このカラムに a. の抽出で得られた試料溶液を負荷した後、エーテル-ヘキサン (1:19) 40 mL で洗浄し、エーテル-ヘキサン (3:17) 80 mL で溶出した。溶出液は 40°C 以下で減圧濃縮し、残渣をメタノールで 2 mL に定容して HPLC 用の試験溶液とした。

c. 定量

3. の装置および測定条件に示した HPLC 条件で、メトブレンの標準溶液を用いて保持時間約 7 分のピークを測定してピーク面積法により検量線を作成した。試験溶液についても同様に操作し、標準溶液で作成した検量線を用いて、試料中のメトブレン濃度を求めた。

5. 添加回収試験

添加回収試験用の標準溶液 1 mL (マッシュルームは 2 mL) を添加 (添加濃度 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$) し、1 時間後に抽出を開始した。

6. 共同実験による分析法の評価

共同実験は IUPAC のプロトコール⁶⁾を参考にして、6 分析機関で、玄米、小麦、そば、らっかせいおよびマッシュルームの 5 農作物についてメトブレンの添加回収試験を行った。試料は各機関がそれぞれ購入したものを用い、5. の添加回収試験に示した方法でメトブレン標準品を添加して行った。各農作物について得られた 12 個 (6 分析機関 \times 2 個) の回収率を AOAC のコロボラティブスタディーガイドライン⁷⁾に従って解析し、農作物ごとに回収率の平均値、併行再現性および室内再現性を求めた。再現性評価の基準として Horwitz の式 ($\text{RSD}_R, \% = 2C^{-0.1505}$, C は質量分率)⁸⁾を用いた。

結果および考察

1. 抽出および脱脂法

近年、食品中残留農薬の多成分分析では、アセトニトリルで抽出後、塩化ナトリウムを加えて塩析により水層を分離し、アセトニトリル層を減圧濃縮して次の精製操作を行うアセトニトリル抽出・水層分離法が一般化している^{9),10)}。また、厚生労働省より通知される個別試験法などでは、アセトンによる抽出を原則としているが、メトブレンについてはアセトニトリル抽出法を採用している²⁾。穀類、豆類からの抽出では、アセトニトリルはアセトンに比べて脂質成分の抽出が少なく脱脂操作を簡略化することが可能と考えられたことから、今回、アセトニトリル抽出・水層分離法を採用した。しかし、らっかせい、玄米などで

は脂質成分が少なからず抽出され、脂質成分の影響によるフロリジルカラムにおけるメトプレンの溶出挙動のばらつきなども予想されたことから、少量のヘキサンでアセトニトリル層を洗浄する操作を検討した。メトプレンのアセトニトリル/ヘキサン分配率は0.43と高いことから、アセトニトリル層150 mLに対して、アセトニトリル飽和ヘキサン20 mLで1回洗浄したところ、メトプレンのアセトニトリル層への残存率は $88.6 \pm 2.5\%$ と良好であったので、このアセトニトリル飽和ヘキサンによる脱脂操作を加えた。

2. フロリジルカラムによる精製法

従来の試験法では、フロリジル25 gを充てんしたカラム、次いでアルミナ70 gを充てんしたカラムを用いて2段階の精製を行う。また、溶出溶媒としてエーテル/石油エーテル混液を合計で900 mLと大量に使用することから、今回、フロリジル5 gを充てんしたカラムを用いてメトプレンの精製効果を検討した。フロリジル(5 g)カラムにメトペン標準品を負荷し、エーテル/ヘキサン混液での溶出挙動を検討した。エーテル-ヘキサン(1:19)、エーテル-ヘキサン(3:17)、次いでエーテル-ヘキサン(3:7)の各50 mLで順次溶出したところ、それぞれ0%、78%、22%のメトペンが溶出したことからエーテル-ヘキサン(3:17)での溶出が可能と考えられた。そこで、エーテル-ヘキサン(1:19)40 mLで洗浄後、エーテル-ヘキサン(3:17)の20 mLずつで順次溶出したところ、0~20 mLの画分に0%、20~40 mLの画分に69%、40~60 mLの画分に31%が溶出したことから、試験法としては溶出のばらつきを考慮してエーテル-ヘキサン(3:17)80 mLで溶出することとした。

3. HPLCによる定量

これまでに報告されているHPLC条件は、田宮ら⁴⁾: ODSカラム(4.6 mm i.d.×250 mm)、移動相アセトニトリル-水(9:1)、流速1 mL/min、測定波長254 nm、溶出時間約15分、遠藤ら¹⁾: ODSカラム(4.6 mm i.d.×150 mm)、移動相メタノール-水(9:1)、流速1 mL/min、測

定波長267 nm、溶出時間約5分である。ODSカラムは、長さが250 mmのものも使用されているが、より低い使用カラム圧となり汎用されている150 mmのものでも十分に分離可能であったことから、実験方法に示した150 mmのものを採用した。溶出溶媒はメタノール-水(9:1)を用い、検出波長は265 nmとした。

4. 添加回収試験

添加回収試験の結果をTable 1に示した。小麦など7種類の試料からの平均回収率は、74.6~82.8%と良好であり、また、農作物由来の不飽和脂肪酸などによる妨害も見られなかった。Fig. 2にメトプレンの標準溶液、メトペン標準品を添加した玄米の試験溶液、および玄米のブランク試験溶液のクロマトグラムを示した。

5. GC/MSによる確認

メトプレンの大気圧イオン化LC/MSにおける測定感度が低かったことから検出された場合の確認手段として、HPLC用の試験溶液をヘキサンに置換してGC/MS(SIMモード)で測定する方法を検討した。実験方法に示したGC/MS条件で、 m/z 153, 111, 73のフラグメントイオンをモニターすることにより、とうもろこしを除いて良好なクロマトグラムが得られた。とうもろこしは、ヘキサンに置換した試験溶液を中性アルミナカートリッジ(Waters社, Sep-Pak Alumina N)に負荷した後、エーテル-ヘキサン(3:17)20 mLで溶出する精製を追加することで良

Table 1. Recoveries of Spiked Methoprene from Foods

Sample	Recovery, % ^{a)}			
	1	2	3	Mean±RSD, %
Wheat	82.1	71.9	76.3	76.3±6.7
Barley	77.0	79.9	75.6	77.0±2.8
Corn	74.0	78.1	77.0	77.0±2.8
Buckwheat	73.6	79.4	84.5	79.4±6.9
Brown rice	82.8	90.3	82.6	82.8±5.3
Peanut	77.3	72.2	74.6	74.6±3.4
Mushroom	79.2	86.8	81.8	81.8±4.7

^{a)} Samples were spiked with 0.2 µg/g of methoprene.

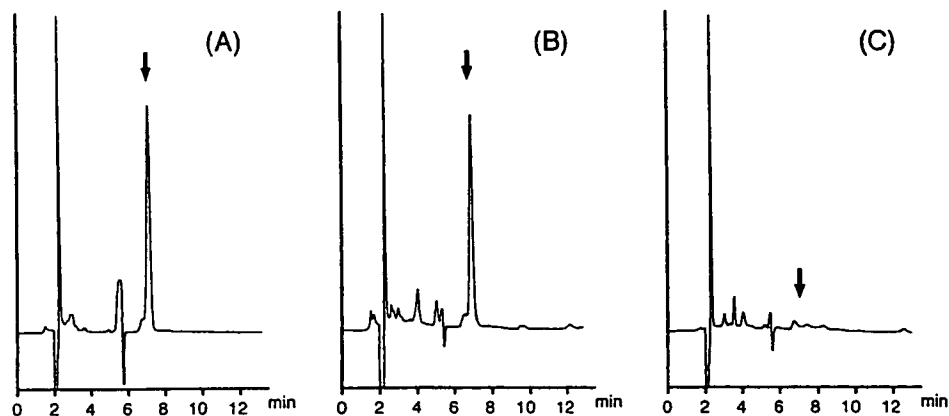


Fig. 2. HPLC chromatograms of (A) methoprene standard (1 µg/mL), (B) brown rice fortified with methoprene (0.2 µg/g), (C) blank brown rice

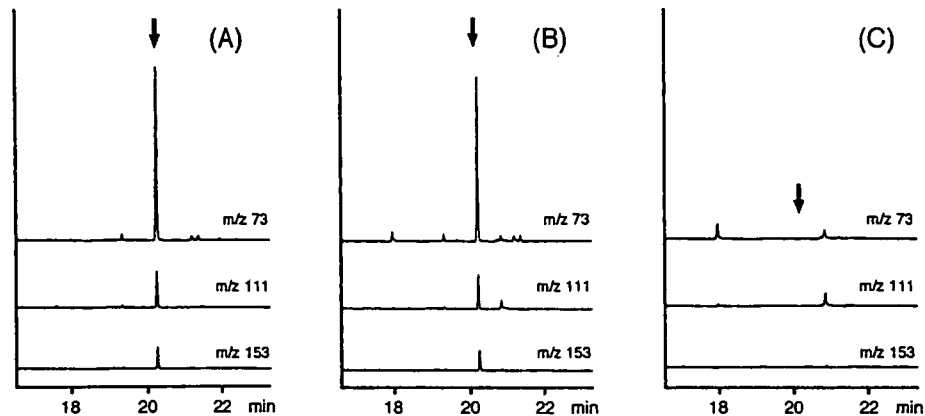


Fig. 3. GC/MS (SIM) chromatograms of (A) methoprene standard (1 µg/mL), (B) brown rice fortified with methoprene (0.2 µg/g), (C) blank brown rice

Table 2. Interlaboratory Trial Results of Recovery Test Conducted by 6 Laboratories

Laboratory	Recovery, % ^{a)}									
	Brown rice		Wheat		Buckwheat		Peanut		Mushroom	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
A	71.6	72.3	69.6	93.6	77.0	70.6	74.1	71.1	77.8	74.2
B	85.4	82.9	86.6	82.4	95.0	95.6	74.0	71.4	85.9	90.6
C	81.1	81.4	76.0	74.6	80.4	78.9	72.9	74.0	72.4	75.9
D	83.9	77.3	76.8	81.3	81.0	80.7	73.5	72.0	79.5	78.5
E	78.0	86.5	86.6	84.3	77.2	73.1	69.4	65.7	87.8	93.2
F	100.0	94.0	85.0	88.0	67.5	81.5	115.9	118.7	95.2	103.6
Mean	82.9		82.1		79.9		79.4		84.6	
Repeatability (RSD _r , %)	4.4		8.8		5.8		2.3		4.2	
Reproducibility (RSD _R , %)	10.3		8.8		10.9		23.6		12.0	
HORRAT value ^{b)}	0.52		0.44		0.55		1.18		0.60	

^{a)} Samples were spiked with 0.2 µg/g of methoprene.

^{b)} HORRAT values are the observed RSD_r, %/RSD_R, % calculated from the Horwitz equation, $RSD_r, \% = 2C^{-0.1505}$, C = the estimated concentration.

好きなクロマトグラムが得られた。Fig. 3 にメトプレンの標準溶液、メトペン標準品を添加した玄米の試験溶液、および玄米のブランク試験溶液の SIM クロマトグラムを示した。

6. 本分析法の共同評価試験

本分析法の信頼性を確認する目的から、6 か所の試験検査機関で添加回収試験を実施し、回収率とそれらの平均値、併行再現性の相対標準偏差 (RSD_r, %), 室間再現性の相対標準偏差 (RSD_R, %) および室間再現精度は食品試料の種類や分析法にかかわらず濃度の変数になっていることが報告されていることから⁸⁾, HORRAT 値 (Horwitz の式から予測した添加濃度 0.2 µg/g レベルの分析における標準的な RSD_R (20%) と実測値から求めた RSD_R の比)⁷⁾ を Table 2 に示した。玄米など 5 種類の試料からの平均回収率は、79.4% (らっかせい) ~ 84.6% (マッシュルーム) と満足すべき結果であった。標準溶液のクロマトグラムから S/N 比が 3 を示す農薬量を求めて得られた検出限界は、0.001 ~ 0.02 µg/g であり、いずれの機関でも要求

される検出限界 0.02 µg/g²⁾ を満たしていた。

併行再現性 RSD_r は、2.3% (らっかせい) ~ 8.8% (小麦) であった。室間再現性 RSD_R は、8.8% (小麦) ~ 23.6% (らっかせい) であった。らっかせいで 23.6% と高かったのは、5 機関が 70% 前後の回収率であったのに対して 1 機関が 117% と高い回収率であったためである。HORRAT 値は、らっかせいを除いて 1.0 未満と室間再現性は良好であった。また、1 機関で高い回収率となったらっかせいの併行再現性は良好であった。以上から、本分析法の妥当性が確認された。

まとめ

食品中に残留するメトペンについて、従来の試験法の見直しを検討した。アセトニトリルで抽出し、塩析により水層を分離後、少量のヘキサンで洗浄、次いでフロリジルカラムで精製して HPLC で測定する分析法を検討したところ、7 種類の農作物について良好な回収率が得られた。さらに、共同実験による分析法評価の結果、その妥当性が

確認された。

謝 辞

本研究は厚生労働省医薬食品局食品保健部（現・食品安全部）の汎用農薬分析調査研究費により実施した。共同実験による分析法の評価は食品衛生指定検査機関協会（現・食品衛生登録検査機関協会）・技術検討委員会（残留農薬作業部会）の協力で実施した。ご協力いただいた食品衛生指定検査機関協会、（社）東京都食品衛生協会、（財）日本穀物検定協会、（財）東京顕微鏡院、（財）広島県環境保健協会、（財）食品環境検査協会および（社）日本油料検定協会の諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 農薬残留分析法研究班編“最新農薬の残留分析法”東京、中央法規出版、1995、p. 420-422. (ISBN 4-8058-1321-0)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”別添一試験法—151. メトプレンの試験法、平成17年1月24日、食安第0124001号(2005).
- 3) Chamberlain, S. J., Determination of methoprene in poultry manure by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **110**, 879-880 (1985).
- 4) Tamiya, M., Kashiwabara, F., Watanabe, Y., Ando, T., Tsutsumi, T., Norizuki, H., Minamisawa, M., Hisai, S., Development of an analytical method for methoprene in rice by HPLC. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **35**, 593-598 (1994).
- 5) Hill, A. S., Mew, J. V., Yin, C. M., Ferguson, B. S., Skeritt, J. H., Determination of the insect growth regulator methoprene in wheat grain and milling fractions using an enzyme immunoassay. *J. Agric. Food. Chem.*, **39**, 1,882-1,886 (1991).
- 6) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int. Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 17 ed., volume II, Gaithersburg, MD, USA (2003).
- 8) Horwitz, W., Kamps, L. R., Boyer, K. W., Quality control. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J. AOAC*, **63**, 1,344-1,354 (1980).
- 9) Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H., Multiresidue analysis of pesticides in foods using acetonitrile extraction, GPC and mini-column cleanup, and dual-column GC-ECD. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 178-187 (2000).
- 10) Nemoto, S., Sasaki, K., Eto, S., Saito, I., Sakai, H., Takahashi, T., Tonogai, Y., Nagayama, T., Hori, S., Maekawa, Y., Toyoda, M., Multi-residue determination of 110 pesticides in agricultural products by GC/MS (SIM). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **41**, 233-241 (2000).

Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of benzophenone and its derivatives in water sample

Migaku Kawaguchi^a, Rie Ito^a, Naoyuki Endo^a, Norihiro Sakui^{a,b},
Noriya Okanouchi^a, Koichi Saito^a, Nobutake Sato^c,
Takuya Shiozaki^c, Hiroyuki Nakazawa^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

^b Yokogawa Analytical Systems Inc., Hachioji Site, 9-1 Takakura-cho,
Hachioji-shi, Tokyo 192-0033, Japan

^c Department of Environmental Science, Division of Environmental Measurement,
Japan Environmental Sanitation Center, 10-6 Yotsuyakami-cho,
Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-0828, Japan

Received 14 July 2005; received in revised form 26 August 2005; accepted 30 August 2005

Available online 2 November 2005

Abstract

A simple and highly sensitive method called stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption (TD)-gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), which is used for the determination of trace amounts of benzophenone (BP) and its derivatives, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3) and 2-hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenone (BP-10), in river water samples, is described. A stir bar coated with polydimethylsiloxane (PDMS) is added to a 10 ml water sample and stirring is carried out for 120 min at room temperature (25 °C) in a vial. Then, the PDMS stir bar is subjected to TD-GC-MS. The detection limit is 0.5–1 pg ml⁻¹ for BPs. The method shows good linearity and the correlation coefficients are higher than 0.997 for all the analytes. The average recoveries of the BPs are equal to or higher than 98.5% (R.S.D.: 1.5–5.1%). This simple, accurate, sensitive and selective analytical method may be used in the determination of trace amounts of BPs in river water samples.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Benzophenone; Water sample; Stir bar sorptive extraction (SBSE); Thermal desorption (TD); Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

1. Introduction

Benzophenone (BP) and its derivatives are the most commonly used sunscreen agents in cosmetics. However, various studies have revealed the estrogenic activity of BPs [1–3]. Therefore, BPs are considered to be endocrine disrupting chemicals (EDCs). To evaluate the potential risks of BPs, their determination requires highly sensitive and reliable methods. In the present study, we focused on the combined determination of BP, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (oxybenzone, BP-3) and 2-hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenone (BP-10).

Several analytical methods for the determination of BPs in water and cosmetic samples have been reported, including liquid chromatography (LC) with UV detection, diode array detection (DAD) and mass spectrometry (MS) [4–8]. However, LC has low resolution and is frequently affected by the sample matrix. On the other hand, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was initially used for the determination of BPs [8–11].

Such sample preparation as online continuous liquid-liquid extraction (LLE) [9] and solid-phase extraction (SPE) [7,8] have been developed for the determination of BPs. However, LLE requires large volumes of organic solvents and additional concentration steps. On the other hand, although SPE requires small volumes of organic solvents, the manual version is tedious and time-consuming. Recently, solid-phase micro extraction

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5498 5763; fax: +81 3 5498 5062.
E-mail address: nakazawa@hoshi.ac.jp (H. Nakazawa).

(SPME) has been successfully used for the determination of BPs in water and urine samples [10,11]. However, the sensitivity of the above methods remains low. Because SPME with polydimethylsiloxane (PDMS) is by nature an equilibration technique that is based on the partitioning of an analyte between the stationary phase and the aqueous sample, the enrichment is dependent on the distribution coefficients of the analyte in the two phases. Therefore, the water/PDMS phase ratio is very important for sorptive extraction. The limited enrichment on the SPME fiber is mainly due to the volume of the PDMS phase (typically 0.5 μl or less), and increasing the volume of PDMS relative to the aqueous matrix is expected to markedly increase the enrichment of the analyte. Recently, a new sorptive extraction technique that uses a stir bar coated with PDMS was developed [12] and is known as stir bar sorptive extraction (SBSE). Its main advantages are high sensitivity and wide application range that includes volatile aromatics, halogenated solvents, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), pesticides, preservatives, odor compounds and organotin compounds [12–18]. In addition, we have reported the determination of several EDCs in water samples and human biological samples [19–26].

The aim of this study was to determine trace amounts of BPs in water samples by the SBSE and TD-GC-MS method, which is simple, accurate and highly sensitive. The developed method was applied to river water samples.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Benzophenone (BP) of environmental analytical grade and BP-d₁₀ as internal standard were purchased from Kanto Chemical Inc. (Tokyo, Japan). 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (oxybenzone, BP-3) was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 2-Hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenone (BP-10) was purchased from Lancaster Synthesis (Morecambe, England). The chemical structures are shown in Fig. 1. The other reagents were purchased from Wako Pure Chemical Inc. (Osaka, Japan). The water purification system used was a Milli-Q gradient A 10 with an EDS polisher (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock solutions (1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of BP, BP-3 and BP-10 standards were prepared by methanol. More than six-point calibrations (2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 and 5000 pg ml^{-1}) were prepared by the addition of purified water

and performed daily for all samples with the internal standards by using the SBSE method.

2.2. Instrumentation

TD was performed with a Gerstel TDS 2 thermodesorption system equipped with a Gerstel TDS A autosampler and a Gerstel Cooled Injection System (CIS) 4 programmable temperature vaporization (PTV) inlet. GC-MS was performed with an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with a 5973N mass-selective detector with an ultra ion source (Agilent Technologies).

Stir bars coated with a 0.5 mm-thick PDMS layer (24 μl ; Twister™: a magnetic stirring rod is placed inside a glass jacket and coated with PDMS) were obtained from Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Germany). The stir bars were conditioned for 1 h at 300 °C in a flow of helium. Then, the stir bars were kept in new 2 ml vials until immediately prior to use. The stir bars could be used more than 50 times with appropriate re-conditioning (the stir bars were conditioned for 1 h at 300 °C in a flow of helium). For the extraction, a 20 ml headspace vial from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) was used.

2.3. TD-GC-MS conditions

The TDS 2 temperature was programmed to increase from 20 °C (held for 1 min) to 250 °C (held for 5 min) at 60 °C min^{-1} . The desorbed compounds were cryofocused in the CIS 4 at –150 °C. After the desorption, the CIS 4 temperature was programmed to increase from –150 to 300 °C (held for 10 min) at 12 °C s^{-1} to inject the trapped compounds into the analytical column. Once an analyte is trapped by means of temperature control, the entire quantity is subjected to GC-MS. Injection was performed in the solvent vent mode. The separations were conducted on a DB-5ms fused silica column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, J&W Scientific, Agilent Technologies). The oven temperature was programmed to increase from 60 to 300 °C (held for 4 min) at 15 °C min^{-1} . Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.2 ml min^{-1} . The mass spectrometer was operated in the selected ion-monitoring (SIM) mode with electron ionization (ionization voltage: 70 eV).

2.4. Water samples

River water was sampled from two sites (points A and B) at Tama River, Tokyo, Japan. All samples were stored at 4 °C prior to use.

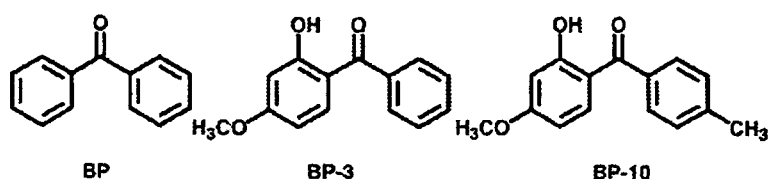


Fig. 1. Chemical structures of BPs.

2.5. Sample preparation

A 10 ml river water sample and an internal standard were added into a 20 ml headspace vial. A stir bar was added and the vial was crimped with a Teflon-coated silicone septum cap. SBSE was performed at room temperature for 0–180 min while stirring at 1000 rpm. After the extraction, the stir bar was easily removed, rinsed with purified water, dried with lint-free tissue and placed inside a glass TD tube. The TD tube was placed inside the TD system where the stir bar was thermally desorbed and subjected to GC-MS thereafter.

3. Results and discussion

3.1. Theoretical recovery

Table 1 shows $\log K_{o/w}$ and the theoretical recoveries of the compounds investigated in this work. The $K_{o/w}$ values were calculated with the log P predictor, which is available from Interactive Analysis Inc. (Bedford, MA, USA). Theoretical recovery was calculated with the following equations:

$$\text{Theoretical recovery} = \frac{K_{o/w}/\beta}{1 + K_{o/w}/\beta} = \frac{1}{\beta/K_{o/w} + 1}$$

Table 1
 $\log K_{o/w}$ and theoretical recoveries of BPs by SBSE

Compound	$\log K_{o/w}$ ^a	Theoretical recovery ^b (%)
BP	3.16	77.6
BP-3	3.79	93.7
BP-10	4.33	98.1

^a $\log K_{o/w}$ values for all compounds as calculated with "Interactive Analysis log P predictor", as well as calculated recoveries.

^b Sample volume 10 ml; phase ratio $\beta = 417$.

where $\beta = V_w/V_{PDMS}$, V_{PDMS} being the volume of PDMS and V_w the volume of water. The theoretical recoveries by SBSE were calculated on the basis of a 10 ml sample volume and a stir bar with a phase thickness of 500 μm (24 μl of PDMS). Bicchi et al. have reported on importance of β [27]. An increase of β requires the decrease of recovery and long extraction time. The β calculated from the condition used by present method was 417. Moreover, because the theoretical recoveries of the BPs were equal to or higher than 77.6%, the extraction by SBSE was considered to have high recovery.

3.2. Optimization of GC-MS conditions

In the mass analysis of standard solutions using electron impact ionization (EI)-MS, m/z 105, 227 and 241 were observed as the main peaks of BP, BP-3 and BP-10, respectively. For the internal standard, BP-d₁₀, its main peak was detected at m/z 110 (Fig. 2). However, in the measurement of BP and BP-d₁₀ in the river water sample, the monitoring ions at m/z 105 and 110, respectively, could not be completely dissociated from the other peaks and therefore, the monitoring ions were set at m/z 182 and 192, respectively.

3.3. Optimization of TD conditions

The important parameters affecting TD from the PDMS stir bar were the TD temperature and the hold time. To optimize the TD temperature and the hold time, 5 ng ml⁻¹ standard solutions of the BPs were used. The TD temperature profiles (150–275 °C) of the BPs in 10 ml standard solutions that were subjected to SBSE were determined by TD-GC-MS when the TD hold time was set at 5 min, and are shown in Fig. 3. The BPs were completely desorbed after the temperature reached approximately 250 °C. On the other hand, the TD hold time profiles (0–10 min)

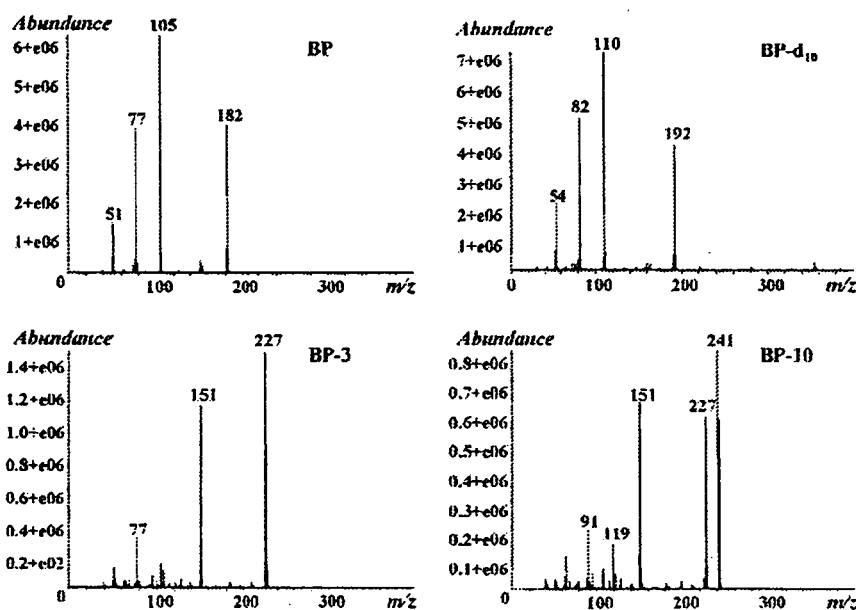


Fig. 2. Mass spectra of BPs.

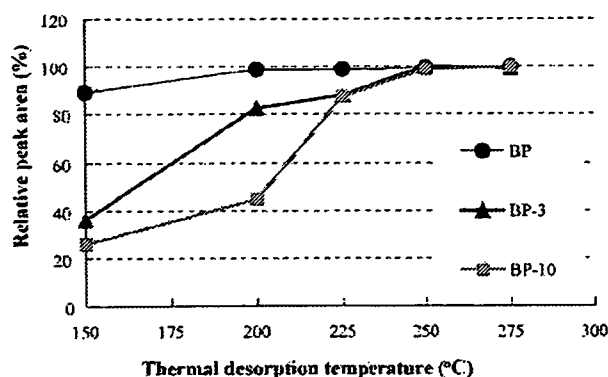


Fig. 3. Optimum TD temperature for analysis of BPs by SBSE and TD-GC-MS method. The optimum TD temperature was examined in the range of 150–275 °C.

of the BPs in 10 ml standard solutions that were subjected to SBSE were determined by TD-GC-MS when the TD temperature was set at 250 °C, and are shown in Fig. 4. The BPs were completely desorbed after approximately 5 min. Therefore, the optimum TD temperature and hold time were set at 250 °C and 5 min, respectively.

3.4. Optimization of SBSE conditions

One important parameter affecting SBSE was the extraction time. Moreover, it has been reported that the impact of water/PDMS phase ratio, volume of PDMS, and sampling time on recovery were important [27]. To optimize the extraction time, 5 ng ml⁻¹ standard solutions of the BPs were used. The extraction time profiles (0–180 min) of the BPs in 10 ml standard solutions that were subjected to SBSE were determined by TD-GC-MS, and are shown in Fig. 5. The BPs reached equilibrium after approximately 120 min. Therefore, this condition was used for the determination of BPs in water samples.

3.5. Figures of merit of SBSE and TD-GC-MS for determination of BPs

The calculated detection limits (LODs) of the BPs were 0.5–1 pg ml⁻¹ for SBSE and TD-GC-MS, with the signal to

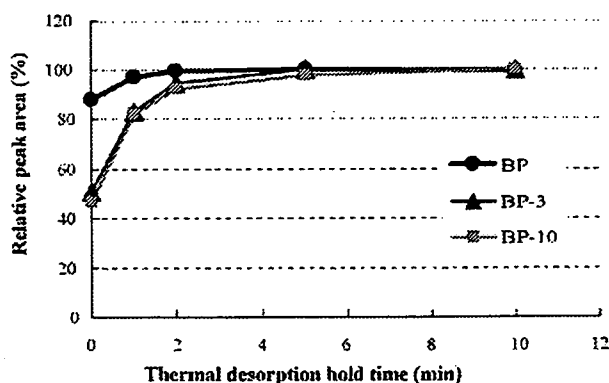


Fig. 4. Optimum TD hold time for analysis of BPs by SBSE and TD-GC-MS method. The optimum TD hold time was examined in the range of 0–10 min.

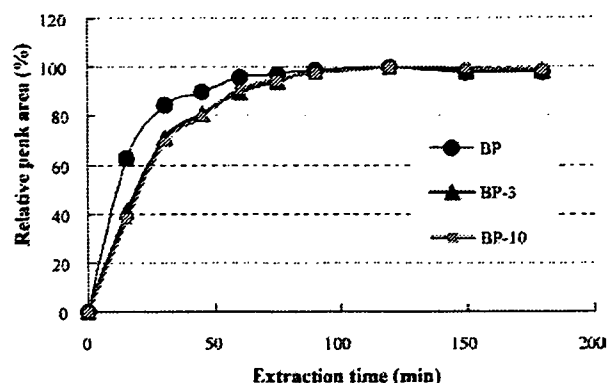


Fig. 5. Optimum extraction time for analysis of BPs by SBSE. A PDMS-coated stir bar was added to 10 ml of standard solution (5.0 ng ml⁻¹) and stirring was commenced for 0–180 min at room temperature (25 °C) in a glass vial. The PDMS stir bar was then subjected to TD-GC-MS.

noise (S/N) ratio being 3. In addition, the limits of quantification (LOQs) of the BPs when S/N > 10 were 2–5 pg ml⁻¹. The method showed good linearity over the calibration range (2 or 5–5000 pg ml⁻¹) and the correlation coefficients (*r*) were higher than 0.997 for all the analytes. The figures of merit of the present method are summarized in Table 2. A comparison of the present SBSE method with the SPE [7,8] and SPME [10,11] methods used in previous studies was performed. The SBSE method was superior to the SPME method in terms of sensitivity. In addition, the SBSE method was applicable to a small volume of sample compared to the SPE method.

The recovery and precision of the method were assessed by replicate analysis (*n* = 6) of river water samples fortified at 100 and 1000 pg ml⁻¹ levels. The non-spiked and spiked samples were subjected to SBSE and TD-GC-MS. The recovery was calculated by subtracting the results for the non-spiked samples from those for the spiked samples. The results were obtained by using calibration curves obtained from standard solutions with the internal standard. The recovery and precision were 98.5–114.8% (R.S.D.: 1.5–5.1%) for the river water samples (Table 3). Therefore, the method enables the precise determination of standards and may be applicable to the determination of trace amounts of BPs in river water samples.

3.6. Determination of BPs in river water samples

A total of two river water samples were analyzed for BPs using the present method and the results are shown in Table 4.

Table 2
Figures of merit of SBSE and TD-GC-MS

Compound	LOD (pg ml ⁻¹) ^a	LOQ (pg ml ⁻¹) ^b	Range (pg ml ⁻¹)	Correlation coefficient (<i>r</i>)
BP	0.5	2	2–5000	0.999
BP-3	1	5	5–5000	0.998
BP-10	1	5	5–5000	0.997

^a LOD: limit of detection (S/N = 3).

^b LOQ: limit of quantification (S/N > 10).

Table 3
Recoveries of BPs in river water samples

Compound	Amount spiked			
	100 pg ml ⁻¹		1000 pg ml ⁻¹	
	Recovery (%)	R.S.D. (%) ^a	Recovery (%)	R.S.D. (%)
BP	98.5	1.6	99.3	2.2
BP-3	110.0	4.2	114.2	1.5
BP-10	114.8	5.1	113.5	2.4

^a The recoveries and precision were also examined by replicate analysis ($n = 6$) of river water samples.

In the Tama River water samples, 21.0–22.8 pg ml⁻¹ BP and 8.9–12.9 pg ml⁻¹ BP-3 were detected by the present method. On the other hand, BP-10 was not detected in all river water samples. Typical SIM chromatograms of the river water sample (point A) are shown in Fig. 6. SBSE and TD-GC-MS enabled

Table 4
Concentrations of BPs in river water samples

Compound	River water (pg ml)	
	A	B
BP	22.8	21.0
BP-3	12.9	8.9
BP-10	N.D.	N.D.

N.D. indicates not detected.

the successful determination of trace amounts of BPs in the river water sample. The BP levels in the river water samples were very low and could not be quantified by SPME-GC-MS [10, 11]. However, the combination of SBSE and the TD-GC-MS method led to the successful determination of trace amounts of BPs in a small volume of water sample (10 ml).

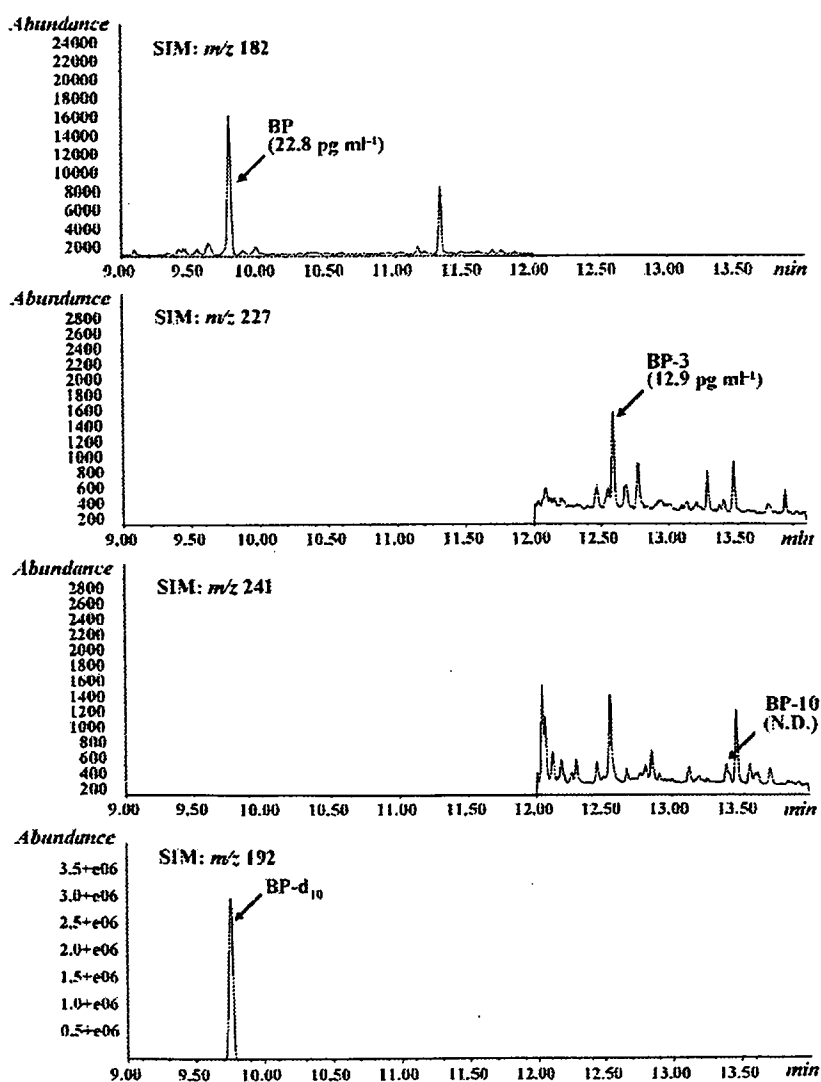


Fig. 6. SIM chromatograms of BPs and internal standard in river water sample (A).

4. Conclusions

The determination of trace amounts of BPs in river water samples using SBSE and TD-GC-MS was described. The proposed method has many practical advantages, including a small sample volume (10 ml) and simplicity of extraction; it is also solvent-free and has high sensitivity. The detection limits for BPs were of sub pg ml^{-1} level. In addition, the present method showed good linearity and high correlation coefficients using the internal standard. The recovery was high (98.5–114.8%) and the precision was good (R.S.D.: 1.5–5.1%) for the river water samples fortified at 100 and 1000 pg ml^{-1} levels. This simple, accurate and highly sensitive method is expected to have potential applications in various aqueous samples.

Acknowledgments

This study was supported by Health Sciences Research grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, Research Fellowships of the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists, Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, The Hoshi University Otani Research Grant, and Showa Shell Sekiyu Foundation for Promotion of Environmental Research.

References

- [1] D. Miller, B.B. Wheals, N. Beresford, J.P. Sumpter, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 133.
- [2] M. Schlumpf, B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, W. Lichtensteiger, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 239.
- [3] S. Takatori, Y. Kitagawa, H. Oda, G. Miwa, J. Nishikawa, T. Nishihara, H. Nakazawa, S. Hori, *J. Health Sci.* 49 (2003) 91.
- [4] S.C. Rastogi, G.H. Jensen, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 311.
- [5] A. Chisvert, M.C. Pascual-Mari, A. Salvador, *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 207.
- [6] D.J. Schakel, D. Kalsbeek, K. Boer, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 127.
- [7] M. Castillo, M.F. Alpendurada, D. Barceló, *J. Mass Spectr.* 32 (1997) 1100.
- [8] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 289.
- [9] M.A. Soliman, J.A. Pedersen, I.H. (Mel) Suffet, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 223.
- [10] T. Felix, B.J. Hall, J.S. Brodbelt, *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 195.
- [11] J. Salafranca, C. Domeño, C. Fernández, C. Nerin, *Anal. Chim. Acta* 477 (2003) 257.
- [12] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
- [13] B. Tienpont, F. David, C. Bicchi, P. Sandra, *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 577.
- [14] P. Popp, C. Bauer, L. Weinrich, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 1.
- [15] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, *Analyst* 126 (2001) 1652.
- [16] D. Benanou, F. Acobas, M.R. de Roubin, F. David, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 69.
- [17] J. Vercauteren, C. Pérez, C. Devos, P. Sandra, F. Vanhaecke, L. Moens, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1509.
- [18] P. Popp, C. Bauer, A. Paschke, L. Montero, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 307.
- [19] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 217.
- [20] M. Kawaguchi, K. Inoue, N. Sakui, R. Ito, S. Izumi, T. Makino, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 119.
- [21] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 41.
- [22] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 19.
- [23] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Inoue, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 1.
- [24] M. Kawaguchi, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 23.
- [25] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 57.
- [26] M. Kawaguchi, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, S. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 820 (2005) 49.
- [27] C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1650.

遺伝子組換えトウモロコシ(GA21ならびにMON810系統)の定量PCR法 を対象とした外部精度管理試験

(2005年11月28日受付)

(2006年3月4日受理)

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

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) (財)食品薬品安全センター秦野研究所

c) (独)食品総合研究所

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

(Received November 28, 2005)

(Accepted March 4, 2006)

Takahiro Watanabe^{a)}, Shoko Tokishita^{a)}, Kikuko Kasama^{b)}, Tatsuya Suzuki^{b)}, Yukio Ohshima^{b)},
Hiroyuki Kikuchi^{a)}, Akihiro Hino^{c)}, Hiroshi Akiyama^{a)}, Tamio Maitani^{a)}

a) National Institute of Health Sciences

b) Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

c) National Food Research Institute

Abstract

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

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

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

1 緒言

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

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

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

には表示が義務づけられている^{3)~5)}。これに関連し、GM食品を対象とした検査方法として、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成13年3月27日、食発第110号⁶⁾)が医薬局食品保健部長通知されており、公定分析法によるモニタリング調査が世界各国に先駆けて行われている。当該検査方法はその後の安全性審査の進捗状況および検知技術の改良にあわせて改訂作業が進められ、平成17年現在では、医薬食品局食品安全部長通知された改訂版(平成17年5月17日、食安発第0517001号⁷⁾)が最新のものである。

上記検査方法により得られる分析結果の信頼性を確保するためには、食品衛生法施行規則⁸⁾にも定められているとおり、食品分析に従事する各検査機関における分析精度が適正に保たれていることが重要である。そのためには、外部精度管理試験を通して、各分析者が自己の技術水準を把握した上で、検査技術の維持、向上に努めることが有効であると考えられる。我々は平成13年度以降、種々のGM食品分析法を対象とした外部精度管理試験を実施するために、配布試料の調製法、また、精度管理により管理されるべき重要な項目について検討を行ってきた^{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(GA21ならびにMON810系統)を対象とした定量PCR法をはじめ設定し検討を行った。すなわち、配付試料の調製方法ならびに妥当性について検討した後、33機関による共同試験を試験的に実施し、ばらつきの程度を把握した上で、その要因について詳細な解析を行ったのでその結果について以下に報告する。

II 実験方法

1. 試料

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

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

2. 試薬

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

3. 装置

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

4. DNA抽出法

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

5. 定量PCR

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

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

6. 均一性試験

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

7. 安定性試験

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

8. 参加機関における試験スキーム

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

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

す。

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

9. 試験の実施

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

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

10. 試験結果の回収ならびに解析

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

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

III 結果

1. 試料の均一性

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

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

2. 試料の安定性

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

Table 1 Results of Homogeneity Study

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

Data represent means ± S.D.

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

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

Table 3 Results of Stability Study

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

Data represent means ± S.D. (n=6)

3. 共同試験結果の解析

(1) DNA抽出

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

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

(2) 報告された混入率の統計解析

(2)-1. データ・クリーニング

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

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

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

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

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

(2)-2. GA21Lスクリーニング試験

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

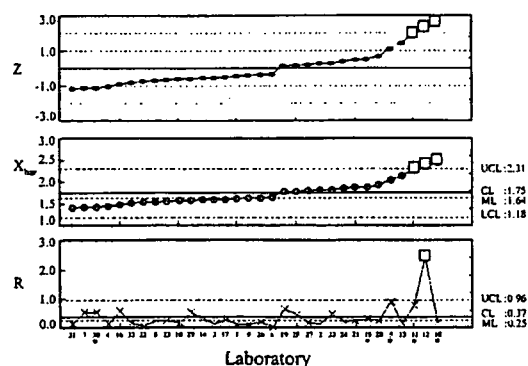


Fig. 1. Z-score, Xbar and R chart for CaM amount in three test portions of GA21L samples measured as screening trial

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

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

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

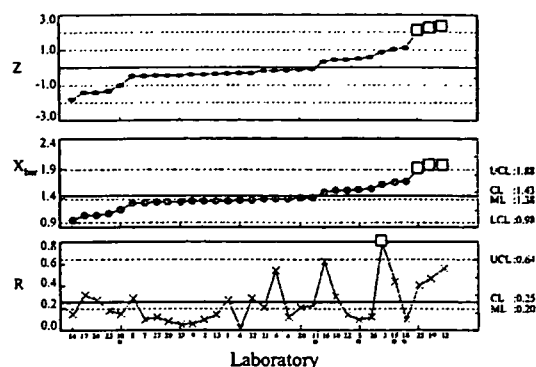


Fig. 2. Z-score, Xbar and R chart for GA21 amount in three test portions of GA21L samples measured as screening trial

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

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

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

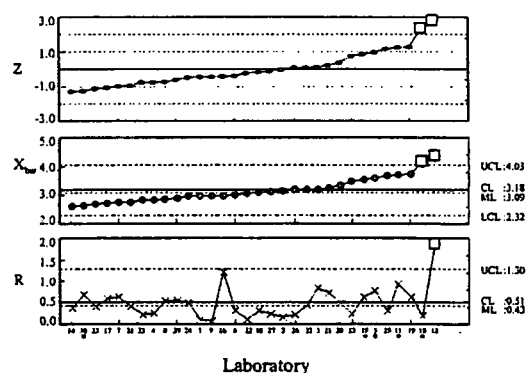


Fig. 3. Z-score, Xbar and R chart for total GM maize amount in three test portions of GA21L samples measured as screening trial

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

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

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

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

(2)-3. GA21Hスクリーニング試験

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

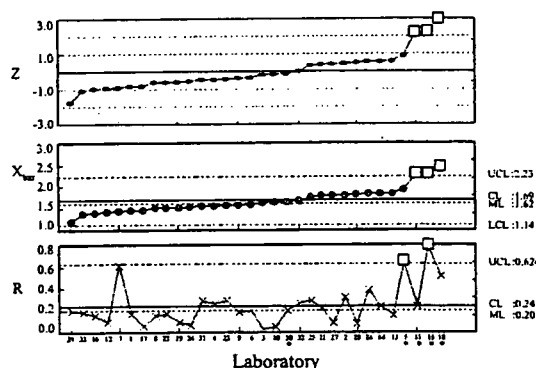


Fig. 4. Z-score, Xbar and R chart for CaM amount in three test portions of GA21H samples measured as screening trial

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

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

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

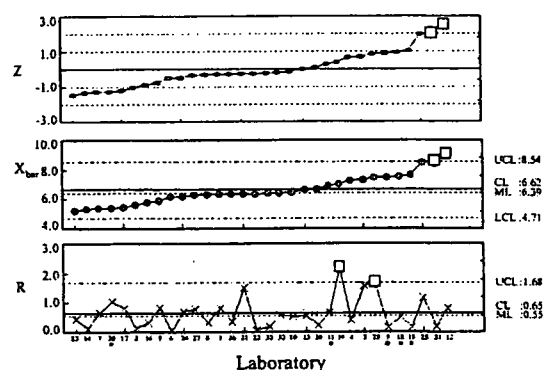


Fig. 5. Z-score, Xbar and R chart for GA21 amount in three test portions of GA21H samples measured as screening trial

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

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

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

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

(2)-4. GA21H系統定量試験

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

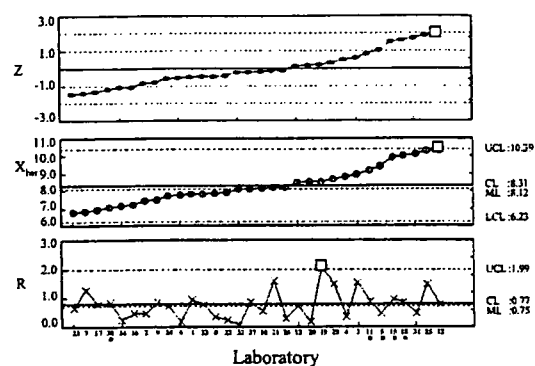


Fig. 6. Z-score, Xbar and R chart for total GM maize amount in three test portions of GA21H samples measured as screening trial

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

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

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

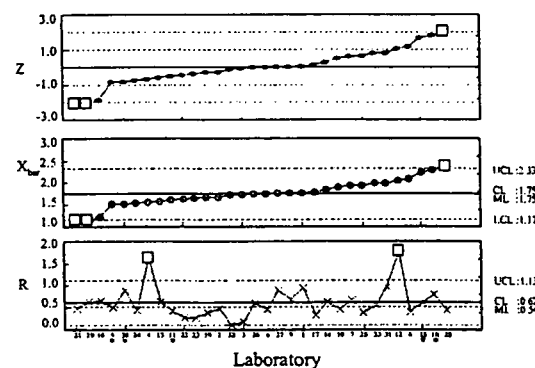


Fig. 7. Z-score, Xbar and R chart for MON810 amount in nine test portions of GA21H samples measured as line specific quantification trial

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

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

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

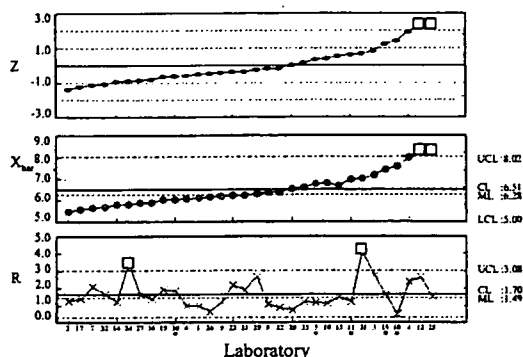


Fig. 8. Z-score, Xbar and R chart for GA21 amount in nine test portions of GA21H samples measured as line specific quantification trial

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

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

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

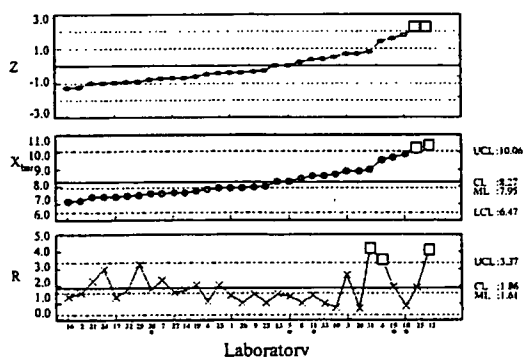


Fig. 9. Z-score, Xbar and R chart for total GM maize amount in nine test portions of GA21H samples measured as line specific quantification trial

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

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

Abbreviations; See the footnote of Fig. 1

(3) SSI**b**測定値(コピー数)のばらつき

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

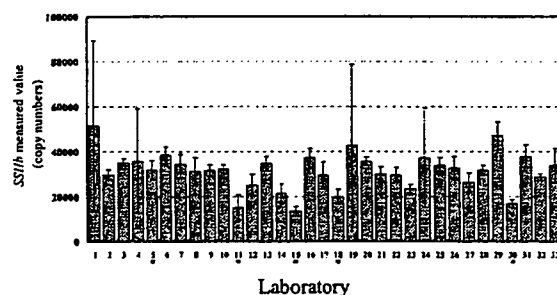


Fig. 10. SSI**b**-measured values obtained from nine test portions, which were derived from GA21 H samples

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

Data represent means ± S.D. (n=9)

IV 考察

1. 試料の妥当性

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

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