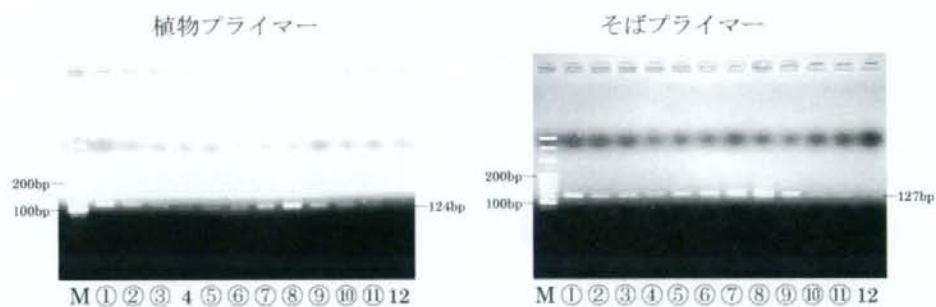
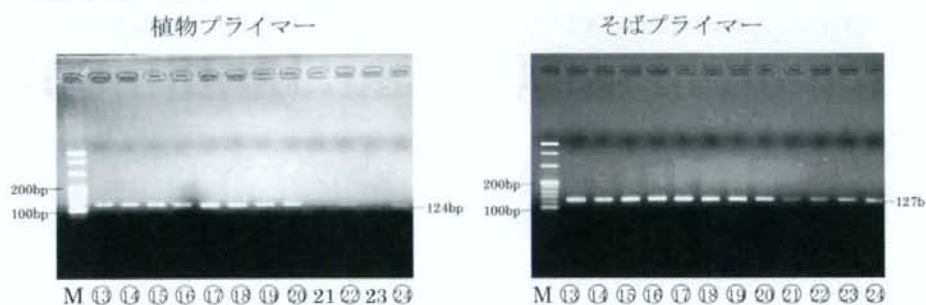


図 1-4 そば添加試料の確認試験結果

そば添加カボチャペースト



そば添加あずきあん



番号を○で囲んだものは予定長のバンドが確認できたもの

M : 20bp DNA Ladder

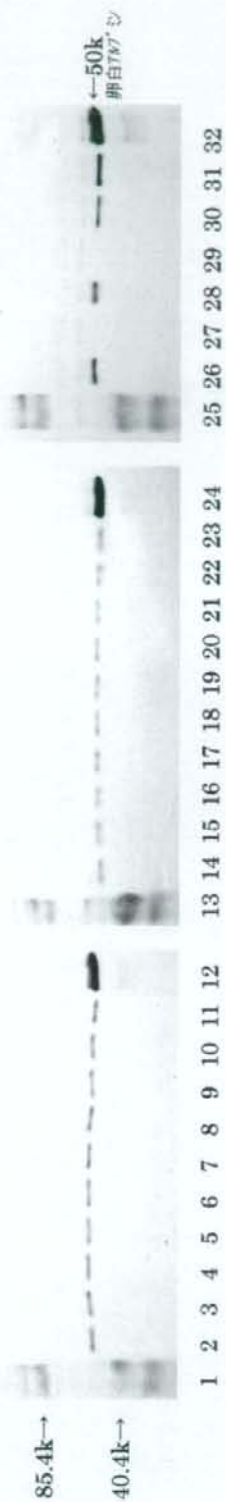
1~4, 13~16 : DNeasy Plant Mini kit による抽出 DNA

5~8, 17~20 : Genomic-Tip 20/G による抽出 DNA

9~12, 21~24 : CTAB 法による抽出 DNA

図 2-1 卵添加試料のウエスタンブロットによる確認試験結果
(卵ウエスタンブロットキット検体希釈液により抽出した試料)

卵白アルブミン抗体による検出

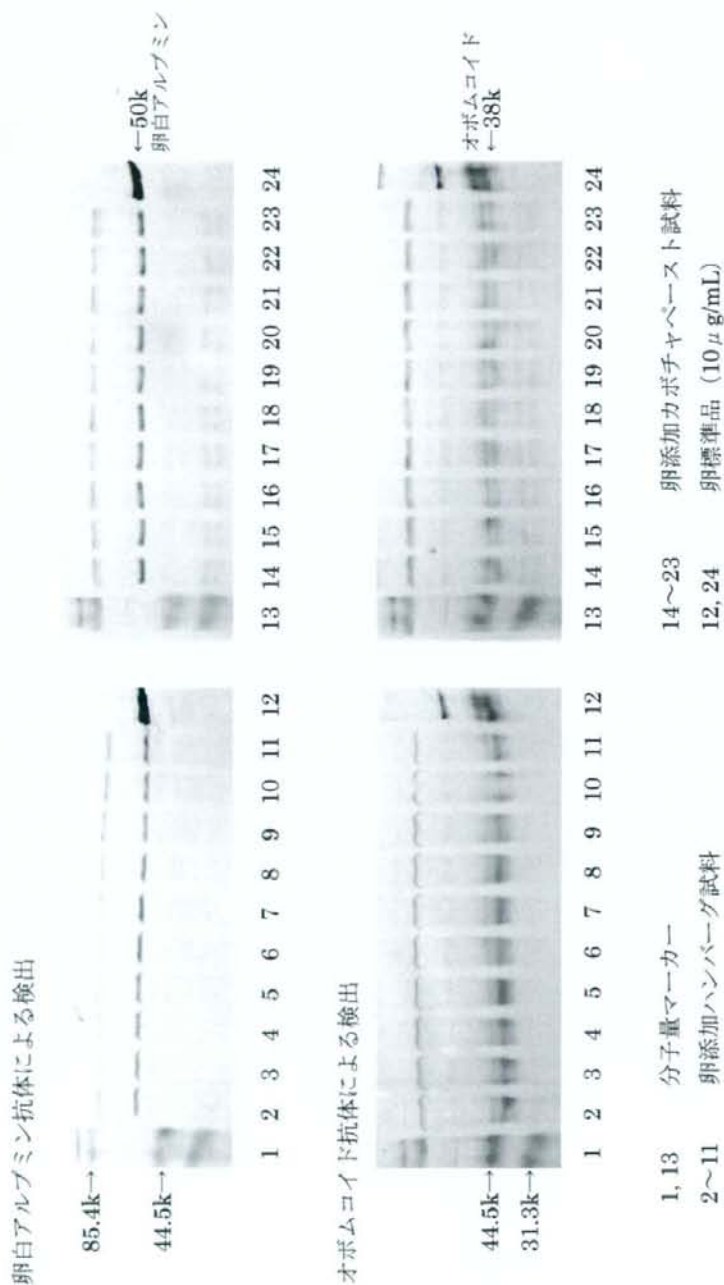


オボムコイド抗体による検出



- | | | | |
|-----------|---------------|------------|------------------|
| 1, 13, 25 | 分子量マーカー | 29 | カボチヤベースト試料ブランク |
| 2~11, 26 | 卵添加ハンバーグ試料 | 30 | 卵標準品 (0.5 μg/mL) |
| 14~23, 28 | 卵添加カボチヤベースト試料 | 31 | 卵標準品 (1 μg/mL) |
| 27 | ハンバーグ試料ブランク | 12, 24, 32 | 卵標準品 (10 μg/mL) |

図 2-2 卵添加試料のウエスタンプロットによる確認試験結果
(ELISA キットの検体抽出液により抽出した試料)



検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査における適正調査試料作製と
信頼性確保に関する研究（その 4）

一 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究 一

主任研究者	小島 幸一	（財）食品薬品安全センター 所長
分担研究者	大島 赴夫	（財）食品薬品安全センター 食品衛生事業部長
協力研究者	樋山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 室長
	笠間 菊子	（財）食品薬品安全センター 研究員
	井上 雪乃	（財）食品薬品安全センター 研究員

研究要旨

中国産安全性未審査遺伝子組換え米を対象とした外部精度管理調査の試料として、DNA 抽出操作の信頼性確認を目的としたコメ加工品粉碎物試料と、定性 PCR およびリアルタイム PCR による遺伝子組換えコメ検出操作の信頼性確認を目的とした DNA 溶液試料のそれぞれを作製することとし、調査試料の作製方法を検討した。DNA 溶液試料を作製するため、使用するコメ加工品、コメ加工品からの DNA 抽出方法、定性 PCR およびリアルタイム PCR の各検出系における検出下限について検討した。定性 PCR では Cry1Ac 検出用および Bt10 確認用は 5 コピー、Bt コメ検出用は 165 コピーが、リアルタイム PCR では 63Bt コメ検出用は 750 コピー、NNBt コメ検出用は 80 コピーが、検出下限と考えられた。この結果を基に作製した試料を用いた外部精度管理調査の測定結果から、検出下限の検討結果の妥当性が示され、精度管理調査に適した調査試料が作製できたと考えられた。

また、調査試料作製の過程で、コメ加工品によっては DNA がほとんど抽出されないものやコメ内在性遺伝子（SPS 遺伝子）が検出できないものがあること、抽出法により DNA 収量が違ってくることが明らかになった。そのため、より多くのコメ加工品から PCR 反応に必要な濃度の DNA を抽出し、SPS 遺伝子の検出率を向上させることを目的として、15 種類のコメ加工品を使用して DNA 抽出方法を検討した。Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples（APPENDIX A 法）は、SPS 遺伝子の検出率に関しては GM quicker2（通知法）と同等であったが、抽出 DNA の収量は平均して高く、GM quicker2（通知法）で十分な量の DNA が得られなかった加工品からの DNA 収量を増やすことが可能になった。したがって、コメ加工品からの DNA 抽出方法として有効な方法のひとつであると考えられた。

A. 研究の目的

遺伝子組換え食品検査は、測定する対象物が極微量であることが多く、さらに検査結果が社会に与える影響が大きいことから、信頼性の高い分析結果が求められる。このため、平成13年より遺伝子組換え食品検査に関する外部精度管理調査を実施している。

このたび、平成19年1月26日付けのプレスリリース「安全性未審査の中国産遺伝子組換え米混入事例について」を受け、中国産安全性未審査遺伝子組換え米を対象として外部精度管理調査を実施することになった。しかし、中国産安全性未審査遺伝子組換え米は入手不可能であるため、これまでとは違う方法で精度管理調査試料を作製する必要が生じた。すなわち、これまででは遺伝子組換えでない試料および遺伝子組換え試料の粉碎物を、重量ベースで混合した粉末の試料として作製し、配布してきたため、結果としてDNA抽出操作の信頼性と定性PCRおよびリアルタイムPCRによる組換えDNA検出操作の信頼性について同時に確認できていた。しかし、中国産安全性未審査遺伝子組換え米については、これらの操作の信頼性を同時に確認できる粉末試料が作製できないため、DNA抽出操作の信頼性確認を目的としたコメ加工品試料と、定性PCRおよびリアルタイムPCRによる遺伝子組換えコメ検出操作の信頼性確認を目的としたDNA溶液試料のそれぞれを作製することとし、調査試料の作製方法を検討した。

また、調査試料作製の検討過程で、コメ加工品によってはDNAがほとんど抽出されないものやコメ内在性遺伝子であるSPS遺伝子が検出できないものがあること、抽出法によりDNA収量が違ってくることがわかった。そのため、より多くのコメ加工品か

らPCRに必要な濃度のDNAを抽出し、組換え遺伝子検出の前提であるSPS遺伝子の検出率を向上させ、検出不能の判定となる検体の減少を目的として、コメ加工品からのDNA抽出方法についても検討を行った。

B. 研究方法

1. DNA抽出

コメ加工品からのDNA抽出には、以下のキットおよびプロトコルを使用した。

1. GM quicker2 (ニッポンジーン) は、通知のプロトコルに従った。
2. Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (CARTAGEN) は付属の手順書に記載された2種類の手法、すなわち通常のプロトコルと APPENDIX A 法 (Modified Protocol for Low DNA Samples) に従った。
3. DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) は、JAS 分析試験ハンドブック (独立行政法人 農林水産消費技術センター) に記載されたトウモロコシからのDNA抽出方法に従った。

なお、いずれの抽出においても、遠心分離には多用途小形遠心機 CF16RX (日立工機)、恒温槽には DryThermoUnit DTU-2B (TAITEC)、吸光度測定には Gene Quant pro (GEヘルスケアバイオサイエンス) を使用した。

2. 定性PCR

定性PCRは通知に従い、陽性対照用 (SPSF および SPSR)、Cry1Ac 検出用 (AC-3F および AC-3R)、Bt コメ検出用 (Oscry1Ac-F および OsNOS-R2)、Bt コメ確認用 (actACS3F および actACS3R) の各プライマー対 (以上ニッポンジーンまたは北海道システムサイエンス株式会社) および、AmpliTag Gold™

(Applied Biosystems) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) により実施した。定性 PCR の増幅物は ultraPURE™ Agarose-1000 (Invitrogen)、50×TAE (遺伝子工学研究用、ニッポンジーン) により作製した 3%アガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid α (ADVANCE) を使用してアガロースゲル電気泳動を行った。なお、エチジウムブロミド染色は前染色により実施し、サイズマーカーには 20bp DNA Ladder (TAKARA)、画像解析にはプリントグラフ (ATTO) を使用した。

3. リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は通知に従い、コメ陽性対照用試験はコメ陽性対照用プライマー対 (SPSF および SPSR) およびコメ陽性対照用プローブ (SPS-Taq、FAM dye)、Bt コメ検出用試験は最終確認 Bt コメ検出用プライマー対 (T51-SF および OsNOS-R2)、63Bt コメ検出用プローブ (GM63-Taq、FAM dye) および NNbt コメ検出用プローブ (NGMr-Taq、VIC dye) を、マスターミックスには TaqMan Universal PCR Master Mix を使用して実施した。なお、リアルタイム PCR 装置には 7900HT リアルタイム PCR システム 96 ウェル (以上いずれも Applied Biosystems) を使用した。リアルタイム PCR の結果は Th. Line を 0.1 から 0.2 として解析した後、マルチコンポーネント解析を行い、検出対象の蛍光色素の 50 サイクル時点での Rn を 10 サイクル時点の Rn で除した値を算出し、1.5 以上となった反応を陽性とした。

4. 外部精度管理調査試料調製の予備検討

4.1 コメ加工品試料の検討

神奈川県内で購入した、タイ産ピーフン 2 種、台湾産ピーフン 2 種および上新粉 2 種の計 6 種のコメ加工品を使用した。GM

quicker2 (通知法) を用いて DNA を抽出し、陽性対照用プライマー対による定性 PCR を実施した。このうち、陽性対照用プライマー対による増幅が確認できたものについて、さらに Cry1Ac 検出用、Bt コメ検出用および Bt コメ確認用プライマー対による定性 PCR を行い、中国産安全性未審査遺伝子組換え米の混入および非特異的な増幅バンドの有無について確認した。

4.2 コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討

1 に記載の 3 種類の DNA 抽出キットを使用し 4 種類の抽出方法で、上新粉 B から DNA を抽出した。それぞれの抽出液について DNA 収量、O. D. 260 と O. D. 280 の吸光度比、および紫外吸収スペクトルを比較検討した。また、陽性対照用プライマー対を使用した定性 PCR も行い、SPS 遺伝子検出の可否を確認した。

4.3 定性 PCR 用 DNA 溶液の検討

上新粉 B から Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を使用して DNA を抽出し、10ng/μL のコメ DNA 溶液を調製した。このコメ DNA 溶液を用いて陽性対照プラスミド溶液 (GM コメ Bt コメ陽性コントロールプラスミド、ニッポンジーン) を 2 倍から 16000 倍まで段階希釈した溶液について定性 PCR を n=16 で行い、陽性対照用プライマー対による増幅の確認および Cry1Ac 検出用、Bt コメ検出用、Bt コメ確認用プライマー対による増幅バンドの検出下限を検討した。

4.4 リアルタイム PCR 用 DNA 溶液の検討

4.3 と同様にして調製した 10ng/μL のコメ DNA 溶液で、陽性対照プラスミド溶液 (GM コメ Bt コメ最終確認検査用陽性コントロールプラスミド、ニッポンジーン) を段階

希釈した溶液についてリアルタイム PCR を $n=8$ で行い、コメ陽性対照用試験における 1.5 倍以上の増幅の確認、および Bt コメ検出用試験における 63Bt コメおよび NNbt コメのそれぞれについて検出下限を検討した。

5. 外部精度管理調査結果のまとめ

外部精度管理調査の結果は、コメ加工品粉砕物試料の DNA 抽出および定性 PCR 結果、定性 PCR 用 DNA 溶液試料の定性 PCR 結果、リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料のリアルタイム PCR 結果のそれぞれに分けてまとめた。

6. コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討

6.1 使用したコメ加工品

4.1 で使用したコメ加工品 6 種類に加え、神奈川県内で購入した国産コメ 1 種類、タイ産ビーフン 2 種類、タイ産ライスペーパー 1 種類、ベトナム産ビーフン 3 種類、ベトナム産ライスペーパー 1 種類、国産中華おこげ 1 種類を準備し、合計 15 種類のコメ加工品を使用した。上新粉はそのまま、それ以外の試料はそれぞれ孔径 1.0mm のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200 で粉砕しコメ加工品粉砕物試料とした。

6.2 コメ加工品からの DNA 抽出および定性 PCR

コメ加工品から、GM quicker2 (通知法) および Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) のそれぞれの方法を使用して DNA を抽出し、収量および O.D. 260 と O.D. 280 の吸光度比を比較した。また、陽性対照用プライマー対による定性 PCR を行い、SPS 遺伝子検出の可否を確認した。

C. D. 結果および考察

1. 外部精度管理調査

1.1 外部精度管理調査に使用するコメ加工品の検討

外部精度管理調査に使用するコメ加工品を選ぶ条件として、検査目的の遺伝子混入が無いこと、コメ内在性遺伝子 (SPS 遺伝子) が検出されること、および定性 PCR で検査目的遺伝子の増幅物に近い易動度の非特異的な増幅バンドがないことの 3 点が必要である。また、DNA 溶液試料の作製にはマトリックスとして使用する DNA、すなわち遺伝子組換え米を含まないコメ DNA 溶液が大量に必要である。したがって、抽出の際に試料の前処理が容易であること、および抽出される DNA 量が多いことも条件とした。

原材料表示にコメを使用した旨の記載があるコメ加工品 6 種類 (タイ産ビーフン 2 種、台湾産ビーフン 2 種および上新粉 2 種) から、DNA 収量を調べるため、GM quicker2 (通知法) を使用して DNA を抽出した。収量には大きな差があり、タイ産ビーフン A は 2.4 μ g、タイ産ビーフン B は 0.1 μ g、台湾産ビーフン A は 0.6 μ g、台湾産ビーフン B は 0.4 μ g、上新粉 A は 2.8 μ g、上新粉 B は 3.4 μ g であった (表 1)。

次に、得られた DNA 溶液について、SPS 遺伝子の検出の可否を確認するため、コメ陽性対照用プライマー対による定性 PCR を行った。SPS 遺伝子が検出されることが、組換え DNA 検知のための必須の条件であるが、定性 PCR の結果、台湾産ビーフン B 以外の DNA は SPS 遺伝子の増幅バンドが検出できた。(図 1-A)。

続いて、Cry1Ac 検出用 (図 1-B)、Bt コメ検出用 (図 1-C)、Bt コメ確認用 (図 1-D) プライマー対による定性 PCR を行い、中国産安全性未審査遺伝子組換え米の混入につ

いて調べた。いずれの DNA 溶液も、これらのプライマー対で予定長の増幅バンドは検出されなかったため、混入はないと考えられた。しかし、上新粉 A は Bt コメ検出用、Bt コメ確認用プライマー対による PCR で非特異的な増幅バンドが見られ、特に Bt コメ確認用プライマー対では目的の遺伝子と紛らわしい易動度であった。タイ産ビーフン A と上新粉 B においても非特異的な増幅バンドが見られたが、いずれも目的遺伝子の増幅バンドとは易動度が異なっていた。

以上の検討の結果から、タイ産ビーフン B と台湾産ビーフン A は抽出量の、台湾産ビーフン B は抽出量および SPS 遺伝子不検出の、上新粉 A は非特異的な増幅バンド検出の観点から、外部精度管理調査試料の原料としては不適切であると考えた。残るタイ産ビーフン A と上新粉 B のうち、実際に中国産遺伝子組換え米混入事例があり、上新粉に比べて加工度が高いビーフンが DNA 抽出操作の信頼性確認用の試料として適当であると考え、タイ産ビーフン A をコメ加工品粉砕物試料として用いることとした。また、前処理をせずにそのまま DNA 抽出に使用できる上新粉 B を、定性 PCR 用およびリアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料の調製に用いるコメ DNA 溶液の抽出原料として使用することとした。

1. 2 コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討

定性 PCR 用およびリアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料は、陽性対照プラスミド溶液をコメ加工品から抽出したコメ DNA 溶液で希釈して作製するため、多量のコメ DNA 溶液が必要になる。そこで、コメ DNA を効率的に準備するため、通知の方法に加え、市販されている他の DNA 抽出キットの使用も

含めて、抽出方法を検討することにした。

上新粉 B から DNA を GM quicker2 (通知法)、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (通常のプロトコールと APPENDIX A 法)、および DNeasy Plant Maxi Kit の、3 種類の DNA 抽出キットの計 4 種類の方法で抽出し、DNA 収量および O. D. 260 と O. D. 280 の吸光度比を求めた (表 2)。4 つの方法のうち、1 回の操作で 1 つのカラムから得られる DNA 量は、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) が $9.7\mu\text{g}$ と最も多く、抽出効率が良かったが、抽出 DNA の質や精製度の指標となる O. D. 260 と O. D. 280 の吸光度比は 1.64~1.74 であり、通知に記載されている推奨範囲 (1.7~2.0) から少し外れていることが分かった。このため Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) で抽出した DNA 溶液について、紫外吸収スペクトル測定および陽性対照用プライマー対を使用した定性 PCR を行い、GM quicker2 (通知法) で抽出した DNA 溶液による結果と比較検討した。その結果、いずれの DNA 溶液でも、紫外吸収スペクトルは 230nm 付近で極小、260nm 付近で極大となり、違いは見られなかった (図 2)。また、陽性対照用プライマー対を使用した定性 PCR では、GM quicker2 (通知法) で抽出した DNA と同様に、並行して実施した 8 試行全てで SPS 遺伝子の増幅バンドが確認できたため、PCR 反応の阻害物質等の混入も無いと考えられた (図 3)。

以上の結果から Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) による抽出 DNA は GM quicker2 (通知法) で抽出した DNA と、質および精製度が同等であると判断し、DNA 溶液試料を調製するためのコメ DNA の抽出には Genomic DNA

Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を使用することとした。

1. 3 定性 PCR、リアルタイム PCR の検出下限

コメ加工品粉砕物試料は陰性試料であるため、市販の陽性対照プラスミド溶液を使用して、陽性試料を作製することにした。市販の陽性対照プラスミド溶液は、定性 PCR 用とリアルタイム PCR 用の 2 種類があり、それぞれ DNA 配列の異なるプラスミドの溶液であるため、指定の検査法以外では使用できない。そのため、外部精度管理調査の DNA 溶液試料は、定性 PCR 用とリアルタイム PCR 用の 2 種類を別々に調製することとした。

外部精度管理調査は、確実に陽性となる高濃度条件だけでなく、検出限界付近の低濃度条件における判定の正確さを確認することも目的のひとつである。そのため、高濃度試料と低濃度試料の 2 種類を配布することとし、陽性対照プラスミド溶液の希釈率を決定するため、定性 PCR およびリアルタイム PCR における検出下限のコピー数を調べた。

定性 PCR では、Cry1Ac 検出用、Bt コメ検出用および Bt コメ確認用の各プライマー対を用いて 16 並行で行った PCR 反応が全て陽性となる 1 反応あたりの陽性対照プラスミドのコピー数を検討し、結果を図 4 に示した。Cry1Ac 検出用プライマー対では、5 コピーの DNA 溶液は全ての反応で増幅バンドが認められたが、2.5 コピーでは 2 反応で確認できなかった (図 4-A)。Bt コメ検出用プライマー対では、165 コピーの DNA 溶液は全ての反応で増幅バンドが認められたが、80 コピーでは 3 反応で確認できなかった (図 4-B)。Bt コメ確認用プライマー対で

は、5 コピーの DNA 溶液は全ての反応で増幅バンドが認められたが、2.5 コピーでは 5 反応で確認できなかった (図 4-C)。この結果、Cry1Ac 検出用プライマー対は 5 コピー、Bt コメ検出用プライマー対は 165 コピー、および Bt コメ確認用プライマー対は 5 コピーが、検出下限と考えられた (表 3)。

以上の結果から、全てのプライマー対による増幅バンドが期待できる 170 コピーを高濃度定性 PCR 用 DNA 溶液試料、Cry1Ac 検出用と Bt コメ確認用の 2 種類のプライマー対による増幅バンドが期待できる 8.5 コピーを低濃度定性 PCR 用 DNA 溶液試料とした (表 4)。

リアルタイム PCR については、Bt コメ検出用試験の Duplex PCR を 16 並行で行い、63Bt コメ検出用プローブと NNbt コメ検出用プローブのそれぞれの結果についてマルチコンポーネント解析し、全ての反応で 1.5 倍以上の増幅が確認できるコピー数を検討した (表 5)。63Bt コメ検出用プローブは、750 コピーの DNA 溶液では全ての反応で 1.5 倍以上の増幅が見られたが、336 コピーの DNA 溶液では 5 反応が 1.5 倍未満だった。NNbt コメ検出用プローブでは、80 コピーの DNA 溶液では全ての反応で 1.5 倍以上の増幅が見られたが、40 コピーの DNA 溶液では 2 反応が 1.5 倍未満だった。この結果、63Bt コメ検出用プローブは 750 コピー、NNbt コメ検出用プローブは 80 コピーが、検出下限と考えられた (表 6)。

以上の結果から、両方のプローブで 1.5 倍以上の増幅が期待できる 1500 コピーを高濃度リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料、少なくとも NNbt コメ検出用のプローブについては全ての反応で 1.5 倍以上の増幅が期待できる 300 コピーを低濃度リアルタイム

ム PCR 用 DNA 溶液試料とした (表 4)。

1. 4 外部精度管理調査の結果

定性 PCR 結果についての報告をまとめて表 7 に示した。なお、参加機関では 1 つの DNA 溶液試料につき 2 並行で PCR を実施した。

高濃度定性 PCR 用 DNA 溶液試料は、参加した 33 機関全てで Bt コメ陽性試料と判定された。プライマー対ごとでは、Cry1Ac 検出用および Bt コメ確認用の 1 測定を除き、いずれのプライマー対による PCR でも全て予定長の増幅バンドが確認された。

低濃度定性 PCR 用 DNA 溶液試料についても、参加した 33 機関全てで Bt コメ陽性試料と判定された。プライマー対ごとでは、Bt コメ確認用プライマー対による PCR で予定長の増幅バンドが検出されたのは、66 反応中 62 反応であったが、2 反応とも増幅バンドが確認できなかった機関はなかった。Bt コメ検出用プライマー対で予定長の増幅バンドが見られたのは、66 反応中 18 反応のみであった。Cry1Ac 検出用プライマー対による PCR では、いずれも全ても予定長の増幅バンドが認められた。

リアルタイム PCR の結果についての報告をまとめて、表 8 に示した。なお、参加機関では 1 つの DNA 溶液につき、そのままの濃度 (原液) と、これを 1/2 濃度に希釈したものの 2 濃度について、それぞれ 2 並行、合計 4 反応でリアルタイム PCR を実施した。

高濃度リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料は、参加した 33 機関全てで Bt コメ陽性と判定された。プローブ別でも、63Bt コメ検出用および NNBt コメ検出用のプローブのいずれも原液と 1/2 濃度全てで、1.5 倍以上の増幅が確認された。

低濃度リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料

も、33 機関全てで Bt コメ陽性と判定された。プローブごとでは、63Bt コメ検出用プローブでは、原液では 66 反応中 3 反応で、1/2 濃度では 4 反応で 1.5 倍未満であった。しかし原液と 1/2 濃度の計 4 反応の全てを 1.5 倍未満と報告した機関はなかった。一方、NNBt コメ検出用プローブでは、原液、1/2 濃度のいずれも 66 反応全てで 1.5 倍以上の増幅が確認された。

定性 PCR 用およびリアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料においては、高濃度試料は全ての検出系で陽性となること、低濃度試料はいずれかの検出系で陰性となっても最終的な判定は陽性となることを想定し、濃度を設定した。外部精度管理調査を実施したところ、想定どおりの結果が得られたため、調査に適した濃度の試料を作製できたことが分かった。それとともに、定性 PCR およびリアルタイム PCR のいずれにおいても、検討した検出下限の妥当性が確認された。

2. コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討

2.1 DNA 収量

1.1、1.2 の検討で、コメ加工品の種類および抽出法によって DNA 収量が異なることが分かった。通知の方法では DNA 収量が少ないものが多かったため、1.2 の検討で 1 カラムあたりの DNA 収量が最も多かった Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて 15 種類のコメ加工品から DNA を抽出し、GM quicker2 (通知法) を用いて抽出した DNA による結果と比較した。

15 種類のコメ加工品からの DNA 収量を平均すると GM quicker2 (通知法) は 4.03 μ g、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) は 5.23 μ g であり、ほとんど違いはなかったが、コメ加工品ご

とに DNA 収量を比較すると、大きく異なることが分かった (表 9)。

GM quicker2 (通知法) で抽出した DNA 溶液の濃度は、PCR に用いる濃度の 10ng/ μ L 未満のものもあったが、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) は、15 種類全てで 10ng/ μ L 以上の濃度が確保された。

コメ加工品ごとに DNA 収量を比較すると、タイ産ビーフン A、タイ産ビーフン C、タイ産ビーフン D、ベトナム産ビーフン B および中華おこげの 5 種類は GM quicker2 (通知法) を用いると、より高収量であった。その他の 10 種類のコメ加工品は Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いると、より高収量で、特に、ライスペーパーからの DNA 収量は GM quicker2 (通知法) よりもかなり高かった。

以上の 2 つの抽出法で DNA 収量が大きく違った加工品のうち、中華おこげは、その他のコメ加工品とは異なり、もち米と大豆油から作られている。もち米は、デンプンのほぼ 100% が、より粘性の強いアミロペクチンである。そのため、収量の高かった GM quicker2 (通知法) は粘性の強い加工品からの DNA 抽出に優れている可能性が考えられた。

以上の結果、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を使用することにより、GM quicker2 (通知法) では十分な量の DNA を得られなかった加工品からの DNA 収量を増加できる場合があることが明らかになった。また、コメ加工品ごとに、より高収量の DNA が得られるキットが異なることが示されたため、検査対象に適したキットを選択することにより、より

多くの加工品から遺伝子組換え食品の検出が可能になるものと考えられた。

2.2 陽性対照プライマー対による定性 PCR

2.1 で抽出した DNA について陽性対照プライマー対による PCR を行い、SPS 遺伝子の検出の可否を調べた (図 5)。

台湾産ビーフン B は GM quicker2 (通知法)、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) の抽出液ともに SPS 遺伝子は検出できなかった。台湾産ビーフン B の DNA 収量は、いずれの抽出法でも少なかったが、原材料表示から、米、コーンスターチ、小麦粉、乳化剤、増粘剤としての CMC を含んでおり、添加物の種類が今回検討した 15 種類の中では最も多いことが明らかになった。このため、抽出される DNA の量および総 DNA に占めるコメ DNA の割合が少なく、その結果 SPS 遺伝子が検出できなかった可能性が考えられた。

ベトナム産ライスペーパーも、いずれの抽出法を用いた場合も SPS 遺伝子が検出できなかった。このうち GM quicker2 (通知法) は DNA 収量が極めて低く、O. D. 260 は検出限界以下であった。そのため、PCR 反応に十分な濃度の DNA が抽出できないことが、SPS 遺伝子の検出が不可能だった原因のひとつであると考えられた。しかし Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) では DNA 収量は低いものの、PCR 反応に十分な DNA 濃度が得られたにもかかわらず、SPS 遺伝子が検出できなかった。このため、ベトナム産ライスペーパーにおける SPS 遺伝子の不検出は DNA 収量以外の加工過程での DNA の切断等、他の原因があると考えられた。

この他の試料は、いずれのキットを使用

して抽出した DNA を用いても、SPS 遺伝子を検出することができた。

Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて抽出した DNA は、定性 PCR における SPS 遺伝子の検出に関しては、GM quicker2 (通知法) を使用した場合と同等であることが明らかになった。しかし、抽出 DNA の収量は平均して高く、GM quicker2 (通知法) で吸光度測定に十分な量の DNA が抽出できなかった加工品からでも、吸光度測定ができる量の DNA 抽出が可能であった。したがって、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) は、コメ加工品からの DNA 抽出方法として有効な方法のひとつであると考えられた。

E. 結論

1. 外部精度管理調査

中国産安全性未審査遺伝子組換え米を検査対象とした外部精度管理調査において、調査試料を DNA 抽出操作の信頼性の確認を目的としたコメ加工品粉砕物試料と、定性 PCR 法およびリアルタイム PCR 法による遺伝子組換えコメ検出操作の信頼性の確認を目的とした DNA 溶液試料のそれぞれにすることとし、調査試料の作製方法を検討した。DNA 溶液試料を作製するための DNA 抽出に用いる遺伝子組換え米を含まないコメ加工品の選定、DNA 抽出方法の検討および各検出系における検出下限のコピー数の検討を行い、その結果から外部精度管理調査試料を作製した。

外部精度管理調査参加 33 機関からの報告は想定したとおりの結果であったため、検討した検出下限の妥当性が示され、精度管理調査に適した調査試料が作製できたと

考えられた。

2. コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討

より多くのコメ加工品から PCR 反応に必要な濃度の DNA を抽出し、SPS 遺伝子の検出率を向上させることを目的として、DNA 抽出方法の検討を行った。15 種類のコメ加工品を対象とし、GM quicker2 (通知法) と Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて DNA を抽出し、収量および SPS 遺伝子検出の可否を検討した。

GM quicker2 (通知法) では PCR に用いる DNA 濃度である 10ng/μL に満たない DNA 収量の加工品が 4 種類あったが、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) では全て 10ng/μL 以上の DNA 収量であった。また 15 種類のうち 10 種類は Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いた方がより高い収量が得られ、GM quicker2 (通知法) で十分な抽出 DNA が得られなかったコメ加工品からも、PCR に必要な濃度の DNA を抽出することが可能であった。

SPS 遺伝子の検出に関しては、今回検討した 15 種類のコメ加工品では、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて抽出した DNA と、GM quicker2 (通知法) を用いて抽出した DNA は、同等であることが分かった。

したがって、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) は、コメ加工品からの DNA 抽出方法として有効な方法のひとつであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

井上雪乃, 笠間菊子, 鈴木達也, 大島赴夫,
穂山浩, 中島治, 手島玲子: 中国産安全性
未審査遺伝子組換え米を対象とした外部精
度管理調査における試料作製の検討, 第96
回日本食品衛生学会学術講演会(2008年9
月, 神戸)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 外部精度管理調査試料の検討:DNA 収量

コメ加工品	DNA 収量 ($\mu\text{g}/\text{カラム}$)
タイ産ビーフン A	2.4
タイ産ビーフン B	0.1
台湾産ビーフン A	0.6
台湾産ビーフン B	0.4
上新粉 A	2.8
上新粉 B	3.4

表 2 外部精度管理調査の検討:各種 DNA 抽出キットによる DNA 収量

DNA 抽出キット名 (抽出方法)	DNA 収量 ($\mu\text{g}/\text{カラム}$)	O.D.260/O.D.280
GM quicker2 (通知法)	4.9	1.77~1.82
Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (通常の抽出法)	3.7	1.59~1.97
Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法)	9.7	1.64~1.74
DNeasy Plant Maxi Kit (JAS 分析試験ハンドブック)	0.04	1.76~1.88

表 3 外部性精度管理調査の検討: 定性 PCR における検出下限

プライマー対	陽性対照プラスミドのコピー数 (コピー/反応)
Cry1Ac 検出用	5
Bt コメ検出用	165
Bt コメ確認用	5

表 4 外部性精度管理調査の検討: 調査試料の濃度条件

検査法	高濃度試料 (コピー/反応)	低濃度試料 (コピー/反応)
定性 PCR	170	8.5
リアルタイム PCR	1500	300

表 5 外部精度管理調査の検討:検出下限の検討ーリアルタイム PCRー

陽性対照プラスミドの コピー数 (コピー/反応)	63Bt コメ検出用		NNBt コメ検出用	
	陽性 反応数 ⁽¹⁾	検出率 ⁽²⁾	陽性 反応数 ⁽¹⁾	検出率 ⁽²⁾
750	16	+	16	+
336	11	-	16	+
168	11	-	16	+
80	10	-	16	+
40	6	-	14	-
20	5	-	14	-

(1) 16 並行で実施したリアルタイム PCR におけるマルチコンポーネント解析の結果、1.5 倍以上の増幅が確認できた反応数。

(2) 全ての反応で 1.5 倍以上の増幅が確認できた場合は+、1 反応でも 1.5 未満の場合は-とした。

表 6 外部性精度管理調査の検討:リアルタイム PCR における検出下限

検出プローブ	陽性対照プラスミドのコピー数 (コピー/反応)
63Bt 検出用	750
NNBt 検出用	80

表 7 外部精度管理調査の結果—定性 PCR—

プライマー対	低濃度試料 (8.5 コピー/反応)			高濃度試料 (170 コピー/反応)		
	陽性 反応数 ⁽¹⁾	検出した 機関数 ⁽²⁾	陽性判定 の機関数	陽性 反応数 ⁽¹⁾	検出した 機関数 ⁽²⁾	陽性判定 の機関数
陽性対照用	66	33	33	66	33	33
Cry1Ac 検出用	66	33		65	33	
Bt コメ検出用	18	13		66	33	
Bt コメ確認用	62	33		65	33	

(1) 33 機関におけるそれぞれプライマーごとの 66 反応のうち増幅バンド確認を報告した反応数

(2) 少なくとも 1 つの反応において増幅バンド確認を報告した機関数

表 8 外部精度管理調査の結果—リアルタイム PCR—

検出プローブ	低濃度試料 (300 コピー/反応)			高濃度試料 (1500 コピー/反応)		
	陽性 反応数 ⁽¹⁾	検出した 機関数 ⁽²⁾	陽性判定 の機関数	陽性 反応数 ⁽¹⁾	検出した 機関数 ⁽²⁾	陽性判定 の機関数
陽性対照用	66	33	33	66	33	33
63Bt 検出用	原液 63 1/2 62	33		原液 66 1/2 66	33	
NNBt 検出用	原液 66 1/2 66	33		原液 66 1/2 66	33	

(1) 33 機関におけるそれぞれのプローブごとの 66 反応のうち 1.5 倍以上の増幅を報告した反応数

(2) 少なくとも 1 つの反応において 1.5 倍以上の増幅の確認を報告した機関数

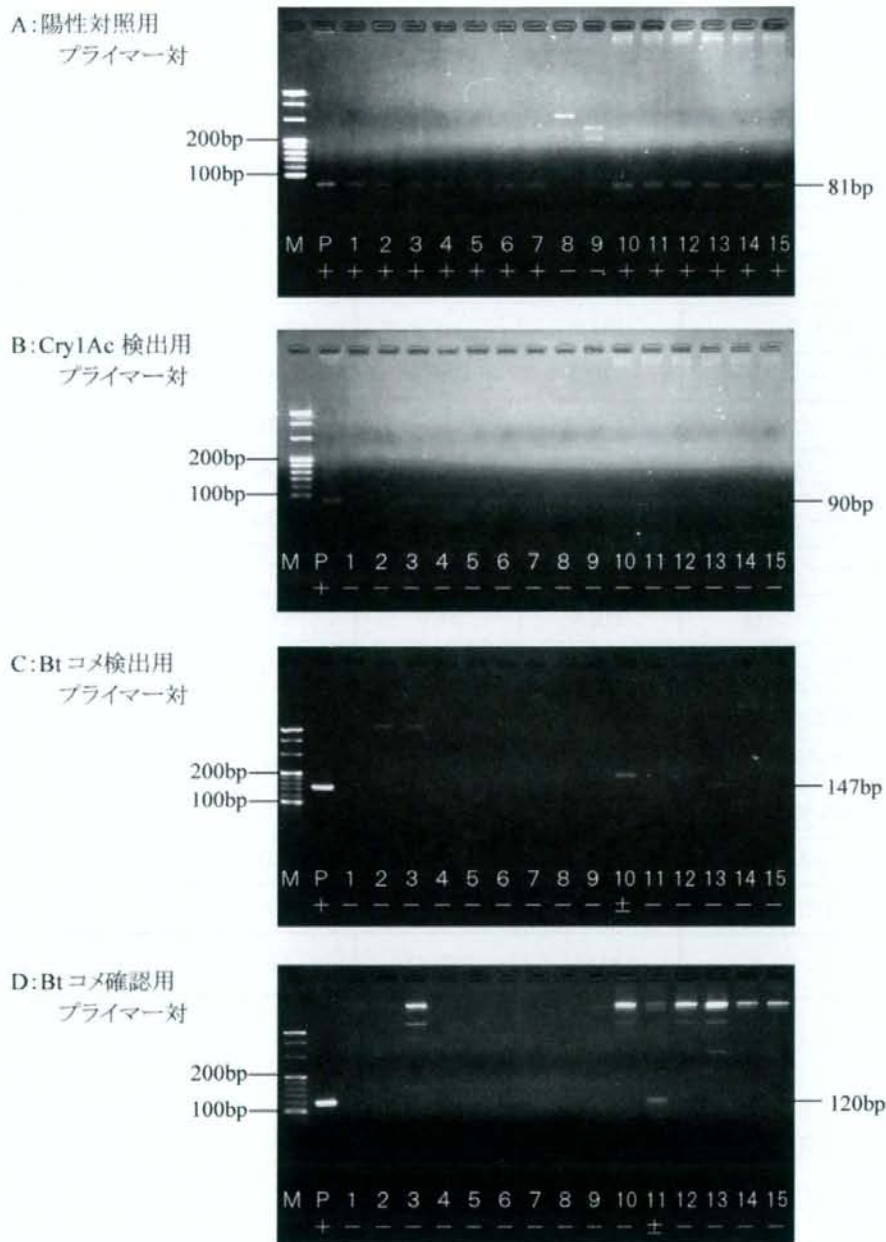
表9 コメ加工品粉砕物からの DNA 収量

試料名	抽出 DNA 濃度 (ng/μL)		DNA 収量 (μg)	
	GM quicker 2	APPENDIX A ⁽¹⁾	GM quicker 2	APPENDIX A ⁽¹⁾
コメ	70.0	130.5	3.50	6.53
上新粉 A	97.2	112.3	4.86	5.62
上新粉 B	103.5	196.0	5.18	9.80
台湾産ビーフン A	7.0 ⁽²⁾	20.0	0.35	1.00
台湾産ビーフン B	2.0 ⁽²⁾	13.0	0.10	0.65
タイ産ビーフン A	67.5	48.5	3.38	2.43
タイ産ビーフン B	4.0 ⁽²⁾	24.0	0.20	1.20
タイ産ビーフン C	171.0	82.0	8.55	4.10
タイ産ビーフン D	118.5	66.0	5.93	3.30
ベトナム産ビーフン A	30.0	152.0	1.50	7.60
ベトナム産ビーフン B	334.5	116.5	16.73	5.83
ベトナム産ビーフン C	32.5	159.0	1.63	7.95
タイ産ライスペーパー	10.0	368.0	0.50	18.40
ベトナム産ライスペーパー	N.D. ⁽²⁾	23.0	N.D.	1.15
中華おこげ	160.5	59.0	8.03	2.95
平均	80.55	104.65	4.03	5.23

(1) Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法)

(2) 網掛けは抽出 DNA 濃度が定性 PCR に用いる濃度 (10ng/μL) 未満のもの

図1 外部精度管理調査試料の検討: 定性 PCR 増幅物の電気泳動像

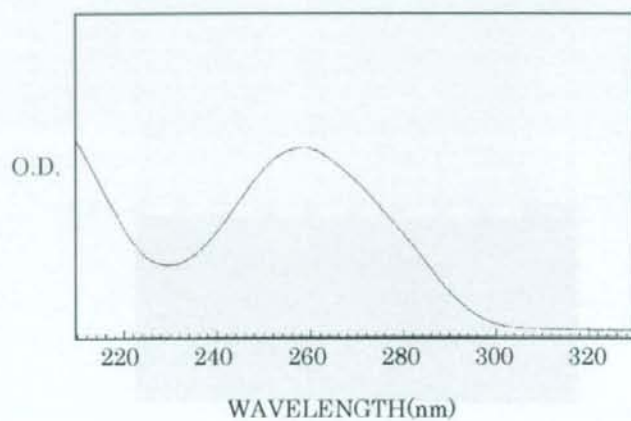


M:分子量マーカー、P:陽性対照プラスミド溶液、1, 2, 3:タイ産ビーフン A、4, 5:タイ産ビーフン B、6, 7:台湾産ビーフン A、8, 9:台湾産ビーフン B、10, 11, 12:上新粉 A、13, 14, 15:上新粉 B

+ 目的の増幅バンドが確認された反応 - 目的の増幅バンドが確認されなかった反応
± 目的のバンドと紛らわしい易動度の増幅バンドが確認された反応

図2 外部精度管理調査の検討:紫外吸収スペクトルの比較

A. GM quicker2



B. Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法)

