

表5 共同試験測定結果(試料3)

モリナガ FASPEK 卵 測定キット

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
6	3	4.77	0.19	3.98	0.36	-1.30
9	3	4.79	0.12	2.51	0.23	-1.22
8	3	4.91	0.12	2.44	0.23	-0.78
7	3	4.95	0.15	3.03	0.30	-0.63
1	3	5.06	0.13	2.57	0.23	-0.22
10	3	5.14	0.47	9.14	0.89	0.07
4	3	5.21	0.08	1.54	0.14	0.33
3	3	5.37	0.21	3.91	0.39	0.93
5	3	5.43	0.37	6.81	0.70	1.15
2	3	5.57	0.42	7.54	0.76	1.67

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	5.12	0.27	5.27	5.66	4.58
R	10	0.42	0.26	—	1.09	—

FASTKIT エライザ Ver. II 卵

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
9	3	4.64	0.03	0.65	0.05	-1.40
8	3	4.73	0.20	4.23	0.40	-1.19
3	3	4.78	0.05	1.05	0.10	-1.07
1	3	5.03	0.24	4.77	0.48	-0.49
10	3	5.11	0.17	3.33	0.33	-0.30
5	3	5.47	0.14	2.56	0.26	0.53
4	3	5.52	0.07	1.27	0.13	0.65
7	3	5.58	0.10	1.79	0.20	0.79
6	3	5.61	0.22	3.92	0.44	0.86
2	3	5.88	0.25	4.25	0.48	1.49

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	5.24	0.43	8.21	6.10	4.38
R	10	0.29	0.16	—	0.74	—

表6 共同試験測定結果(試料5)

モリナガ FASPEK 卵 測定キット

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
9	3	8.54	0.20	2.34	0.38	-1.47
8	3	8.62	0.18	2.09	0.36	-1.36
6	3	9.40	0.36	3.83	0.64	-0.32
4	3	9.44	0.08	0.85	0.15	-0.27
7	3	9.56	0.38	3.97	0.69	-0.11
3	3	9.59	0.30	3.13	0.57	-0.07
1	3	9.63	0.14	1.45	0.28	-0.01
5	3	10.08	0.02	0.20	0.04	0.59
10	3	10.73	0.22	2.05	0.44	1.45
2	3	10.77	0.27	2.51	0.50	1.51

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	9.64	0.75	7.78	11.14	8.14
R	10	0.41	0.21	—	1.04	—

FASTKIT エライザ Ver. II 卵

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
3	3	7.82	0.26	3.32	0.51	-2.12
8	3	9.54	0.23	2.41	0.43	-0.88
1	3	10.11	0.18	1.78	0.34	-0.46
9	3	10.24	0.08	0.78	0.15	-0.37
7	3	10.76	0.14	1.30	0.25	0.01
5	3	11.26	0.36	3.20	0.67	0.37
10	3	11.55	0.05	0.43	0.10	0.58
6	3	11.66	0.46	3.95	0.91	0.66
4	3	12.15	0.16	1.32	0.31	1.01
2	3	12.43	0.29	2.33	0.58	1.22

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	10.75	1.38	12.84	13.51	7.99
R	10	0.43	0.25	—	1.09	—

表7 共同試験測定結果(試料6)

モリナガ FASPEK 卵 測定キット

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
7	3	4.36	0.17	3.90	0.29	-1.43
8	3	4.39	0.12	2.73	0.21	-1.32
9	3	4.55	0.12	2.64	0.23	-0.75
4	3	4.61	0.22	4.77	0.44	-0.54
6	3	4.70	0.35	7.45	0.63	-0.21
3	3	4.88	0.38	7.79	0.69	0.43
1	3	4.94	0.04	0.81	0.08	0.64
10	3	4.96	0.24	4.84	0.46	0.71
5	3	5.08	0.18	3.54	0.35	1.14
2	3	5.16	0.34	6.59	0.67	1.43

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	4.76	0.28	5.88	5.32	4.20
R	10	0.41	0.21	—	1.04	—

FASTKIT エライザ Ver. II 卵

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
3	3	4.16	0.12	2.88	0.23	-1.73
1	3	4.68	0.03	0.64	0.05	-0.96
8	3	4.79	0.12	2.51	0.23	-0.79
9	3	4.90	0.13	2.65	0.23	-0.63
7	3	5.32	0.28	5.26	0.50	0.00
4	3	5.56	0.14	2.52	0.27	0.36
10	3	5.68	0.09	1.58	0.18	0.54
5	3	5.79	0.04	0.69	0.07	0.70
6	3	5.99	0.02	0.33	0.04	1.00
2	3	6.30	0.26	4.13	0.46	1.46

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	5.32	0.67	12.59	6.66	3.98
R	10	0.23	0.16	—	0.58	—

表8 共同試験測定結果(試料7)

モリナガ FASPEK 卵 測定キット

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
9	3	7.25	0.09	1.24	0.18	-1.39
8	3	7.42	0.14	1.89	0.26	-1.14
4	3	7.45	0.12	1.61	0.23	-1.10
3	3	7.82	0.10	1.28	0.20	-0.57
7	3	8.19	0.23	2.81	0.45	-0.03
1	3	8.48	0.06	0.71	0.10	0.39
5	3	8.56	0.11	1.29	0.21	0.51
10	3	8.81	0.11	1.25	0.21	0.87
6	3	8.95	0.28	3.13	0.52	1.07
2	3	9.18	0.25	2.72	0.50	1.41

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	8.21	0.69	8.40	9.59	6.83
R	10	0.29	0.15	—	0.74	—

FASTKIT エライザ Ver. II 卵

機関番号	繰り返し数	Xbar	S.D.	RSD(%)	R	Z
3	3	4.41	0.07	1.59	0.14	-2.47
8	3	7.13	0.06	0.84	0.11	-0.69
9	3	7.57	0.25	3.30	0.49	-0.41
1	3	8.50	0.15	1.76	0.28	0.20
7	3	8.54	0.14	1.64	0.24	0.23
5	3	8.74	0.15	1.72	0.29	0.36
4	3	8.95	0.21	2.35	0.37	0.50
10	3	9.00	0.14	1.56	0.25	0.53
2	3	9.46	0.02	0.21	0.04	0.83
6	3	9.59	0.11	1.15	0.21	0.92

	データ数	平均値 (CL)	標準偏差	RSD(%)	上部管理 限界(UCL)	下部管理 限界(LCL)
Xbar	10	8.19	1.53	18.68	11.25	5.13
R	10	0.24	0.13	—	0.62	—

表9 共同試験結果のデルタソフト*による再計算結果

モリナガ FASPEK 卵 測定キット

機関番号	試料2		試料3		試料5		試料6		試料7	
	報告データ	再計算*	報告データ	再計算	報告データ	再計算	報告データ	再計算	報告データ	再計算
1	9.13	9.12	5.06	5.03	9.63	9.61	4.94	4.92	8.48	8.46
2	11.08	11.16	5.57	5.53	10.77	10.85	5.16	5.11	9.18	9.24
3	10.03	11.30	5.37	5.94	9.59	10.86	4.88	5.30	7.82	8.95
4	10.14	10.12	5.21	5.24	9.44	9.45	4.61	4.63	7.45	7.51
5	10.77	10.78	5.43	5.43	10.08	10.08	5.08	5.08	8.56	8.56
6	9.90	9.89	4.77	4.76	9.40	9.40	4.70	4.69	8.95	8.94
7	10.64	10.71	4.95	4.91	9.56	9.61	4.36	4.30	8.19	8.21
8	8.51	9.63	4.91	5.30	8.62	9.75	4.39	4.64	7.42	8.40
9	9.39	10.61	4.79	5.26	8.54	9.74	4.55	4.95	7.25	8.30
10	10.22	10.22	5.14	5.14	10.73	10.73	4.96	4.96	8.81	8.81

FASTKIT エライザ Ver. II 卵

機関番号	試料2		試料3		試料5		試料6		試料7	
	報告データ	再計算	報告データ	再計算	報告データ	再計算	報告データ	再計算	報告データ	再計算
1	10.68	10.72	5.03	5.02	10.11	10.14	4.68	4.68	8.50	8.52
2	11.37	11.52	5.88	5.83	12.43	12.60	6.30	6.27	9.46	9.55
3	8.97	9.27	4.78	4.95	7.82	8.14	4.16	4.28	4.41	4.55
4	11.81	11.57	5.52	5.60	12.15	11.88	5.56	5.65	8.95	8.97
5	10.39	10.39	5.47	5.47	11.26	11.26	5.79	5.79	8.74	8.74
6	10.90	10.92	5.61	5.61	11.66	11.68	5.99	5.99	9.59	9.60
7	10.99	11.16	5.58	5.55	10.76	10.93	5.32	5.29	8.54	8.63
8	8.80	9.88	4.73	5.08	9.54	10.65	4.79	5.16	7.13	8.03
9	9.05	10.12	4.64	5.00	10.24	11.29	4.90	5.34	7.57	8.54
10	9.73	9.74	5.11	5.11	11.55	11.56	5.68	5.68	9.00	9.01

*: DeltaSoft JV version 1.80 使用

表10 使用したマイクロプレートリーダーおよびソフトウェア

機関 番号	マイクロプレートリーダー	計算ソフトウェア	
	型式	ソフトウェア名	近似曲線作成に使用した関数
1	MTP-450	KF500	4係数 Logistic
2	マルチスキャンJX	Acent Software Ver2.6	4 parameter logistic
3	680	マイクロプレートマネージャー	4係数
4	μ Quant	KC4	polynomial regression Degree 4
5	Foodmark	特定原材料 測定プログラム	4 Parameter logistic (Cook-Wilkenson)
6	VERSA max	SOFT max pro	4-paramater
7	DSX4	Revelation DSX	4係数Logistic
8	550	マイクロプレートマネージャー	Logistic 4PL
9	550	マイクロプレートマネージャー	Logistic 4PL
10	MFA-RR01	特定原材料測定 プログラム	4Paeamemeter logistic

表11 特定原材料検査実績

機関 番号	検査機関の 特定原材料 検査業務の 経過年数	ELISA法								確認試験						
		卵	乳	小麦	そば	落花生	えび・かに	ELISA計	卵	乳	ウェスタンブ ロット計	小麦	そば	落花生	えび・かに	PCR計
1	7年3ヶ月	52	52	0	52	0	0	156	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5年2ヶ月	8	16	8	8	16	0	56	0	0	0	0	0	0	0	
3	6年0ヶ月	20	20	0	0	0	40	40	8	3	11	0	0	0	0	
4	6年3ヶ月	31	16	56	0	8	111	111	1	0	1	2	0	0	2	
5	4年7ヶ月	5	5	3	0	0	25	25	12	12	24	1	0	0	4	
6	5年6ヶ月	0	0	0	20	0	20	20	0	0	0	0	1	0	1	
7	6年8ヶ月	244	339	220	103	104	1153	1153	15	8	23	18	4	1	23	
8	6年6ヶ月	276	148	116	138	112	944	944	0	0	0	0	0	0	0	
9	9年3ヶ月	125	87	74	94	93	537	537	1	9	10	2	0	0	2	
10	6年8ヶ月	284	420	262	190	160	1447	1447	5	9	14	21	1	1	35	
	計	1045	1103	739	605	493	504	4489	42	41	83	44	6	2	67	

表12 牛乳試料均一性試験結果

基材 および 添加量*	モリナガ FASPEK 牛乳 測定キット				FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳			
	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	回収率 (%)	一元配置による分散分析 分散比 判定 (<3.02)	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	回収率 (%)	一元配置による分散分析 分散比 判定 (<3.02)
ハンバーグ 11.4 $\mu\text{g/g}$	10.27	3.7	90.2	0.62 均一	8.28	3.0	72.6	0.45 均一
カボチャペースト 11.4 $\mu\text{g/g}$	11.55	2.8	101.5	0.14 均一	10.72	4.8	94.2	0.39 均一

*: 2-D Quant Kit による測定値

表13 牛乳試料の安定性試験結果

基材 および 添加量*	モリナガ FASPEK 牛乳測定キット				FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳				
	保存前(A)		16W後(B)		保存前(A)		16W後(B)		
	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	測定値の 平均 ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)	
ハンババーグ 0 $\mu\text{g/g}$	—	—	0.00	—	—	—	<0.313**	—	—
ハンババーグ 11.4 $\mu\text{g/g}$	10.27	3.7	11.47	4.3	8.28	3.0	10.13	3.3	122.4
カボチャペースト 0 $\mu\text{g/g}$	—	—	0.03	—	—	—	<0.313	—	—
カボチャペースト 11.4 $\mu\text{g/g}$	11.55	2.8	12.23	3.7	10.72	4.8	12.03	3.7	112.2

*: 2-D Quant Kit による測定値

** : FASTKIT エライザ Ver. II 牛乳の検出下限

図1 共同試験結果の Xbar-R 管理図(試料2)

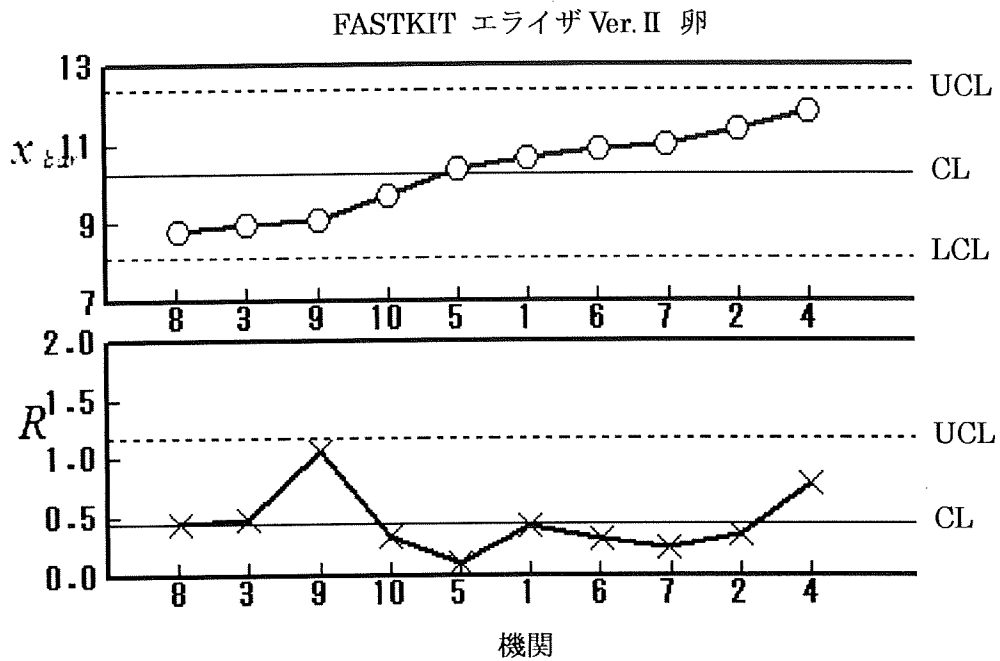
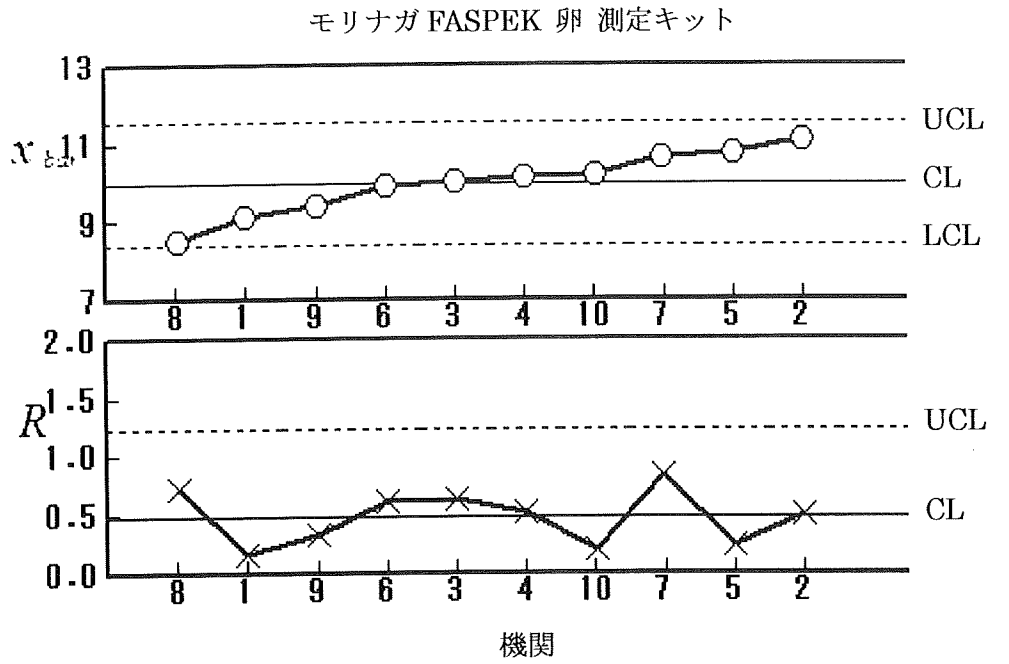


図2 共同試験結果の Xbar-R 管理図(試料3)

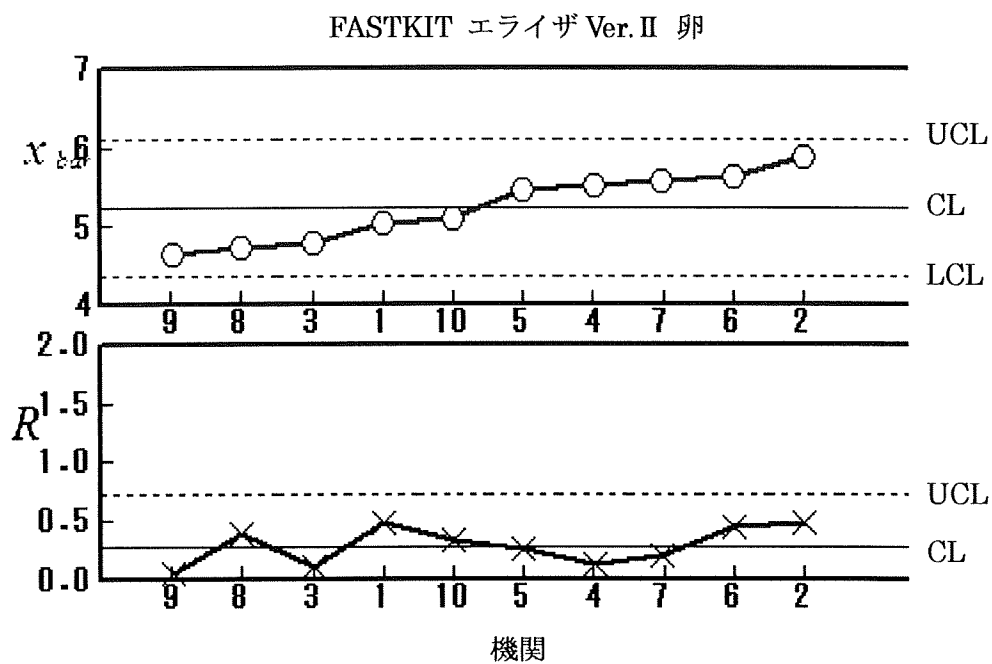
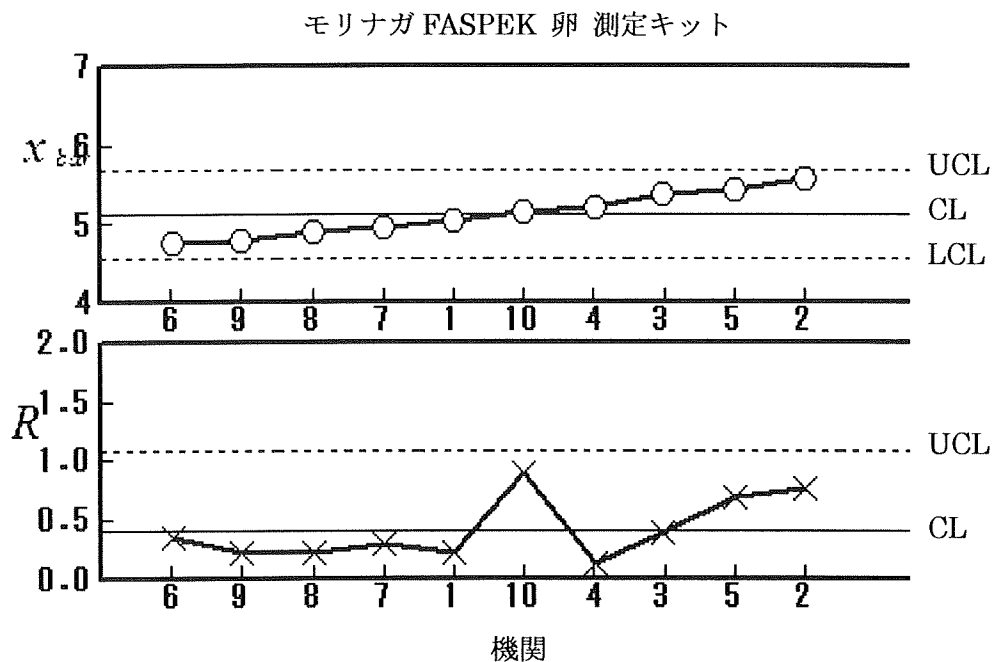


図3 共同試験結果の Xbar-R 管理図(試料5)

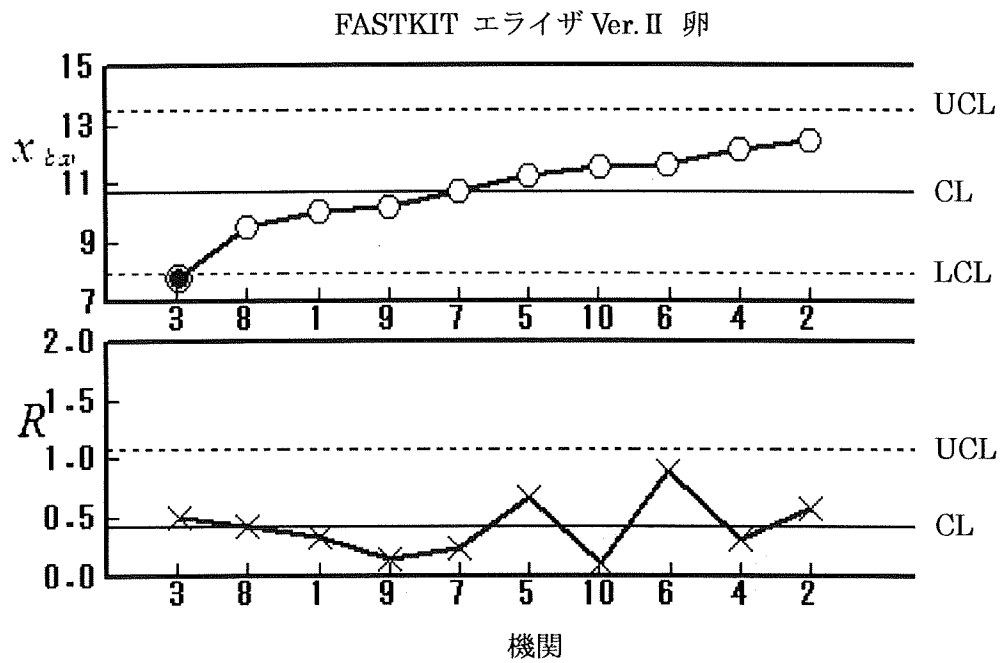
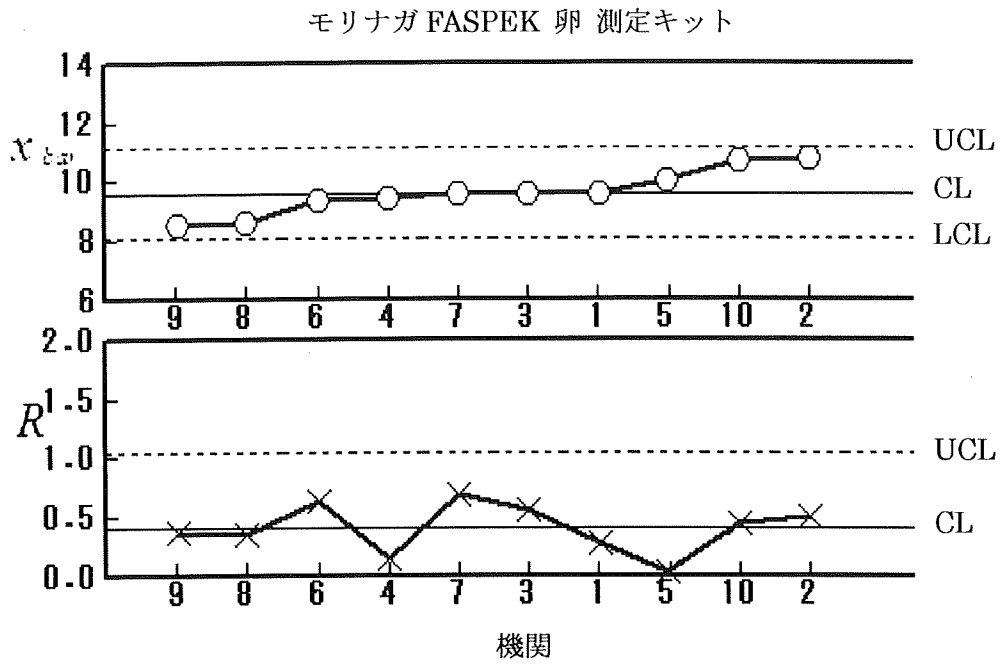


図4 共同試験結果の Xbar-R 管理図(試料6)

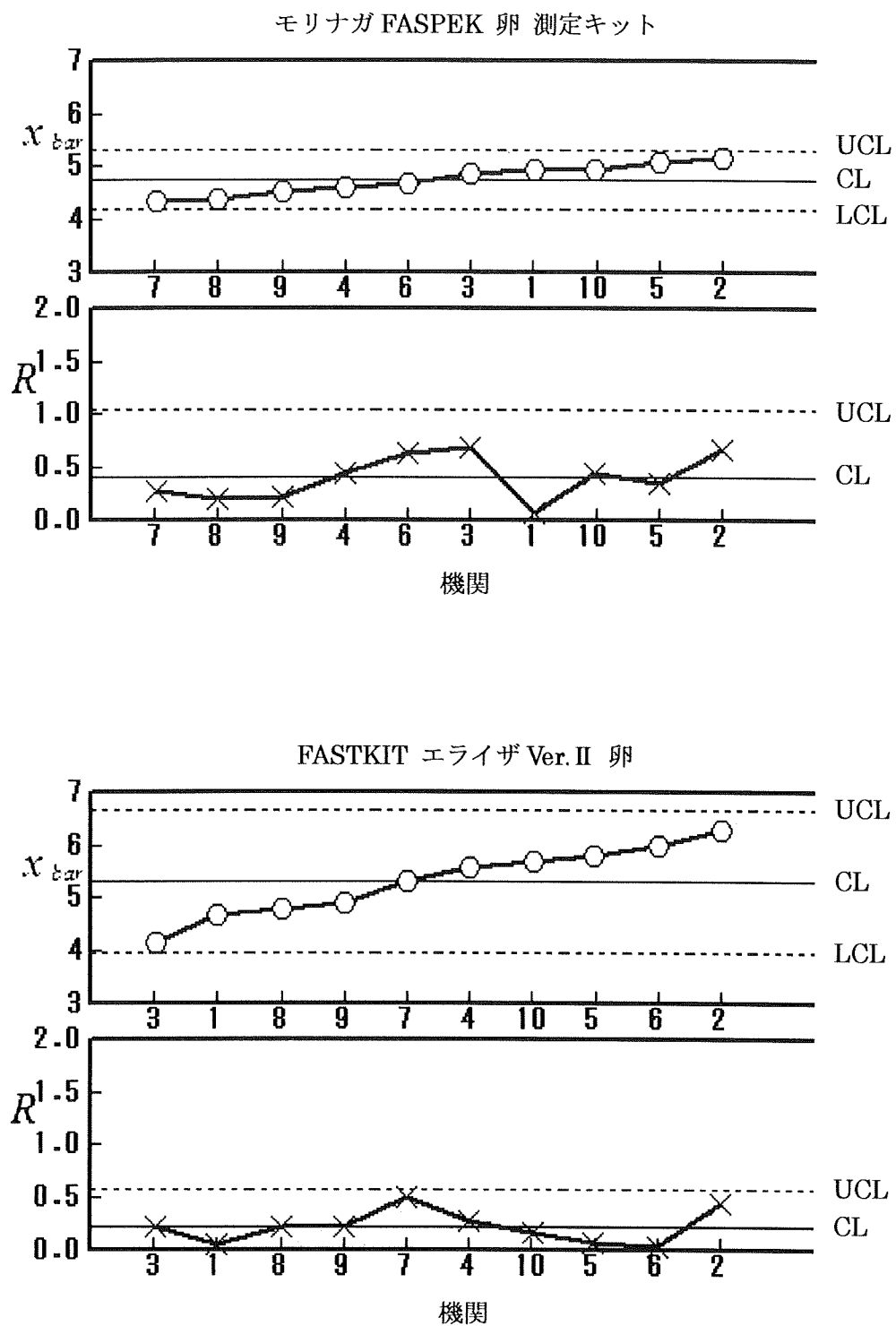


図5 共同試験結果の Xbar-R 管理図(試料7)

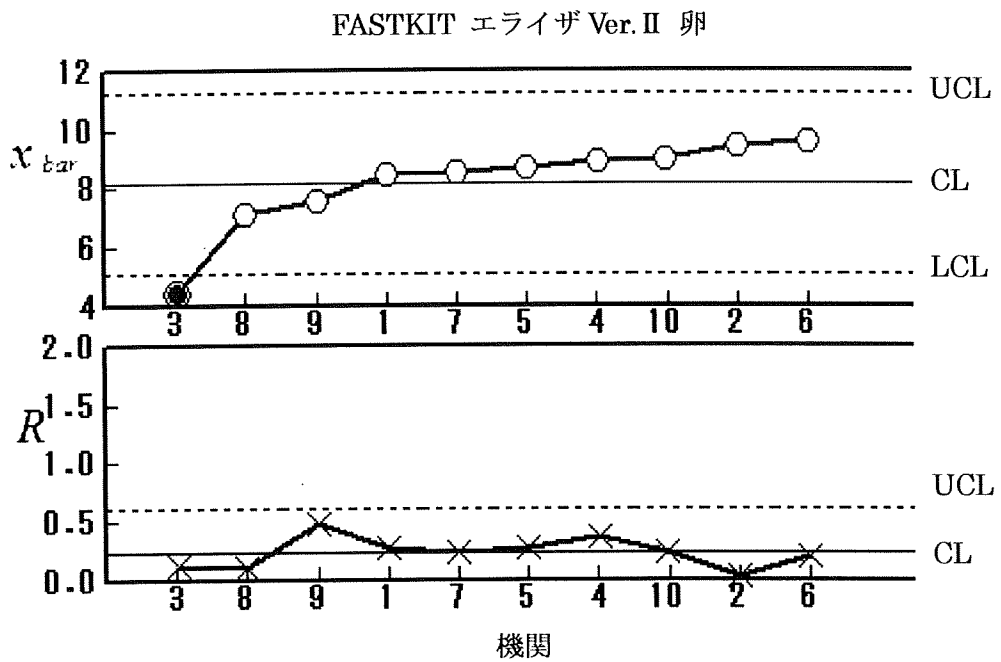
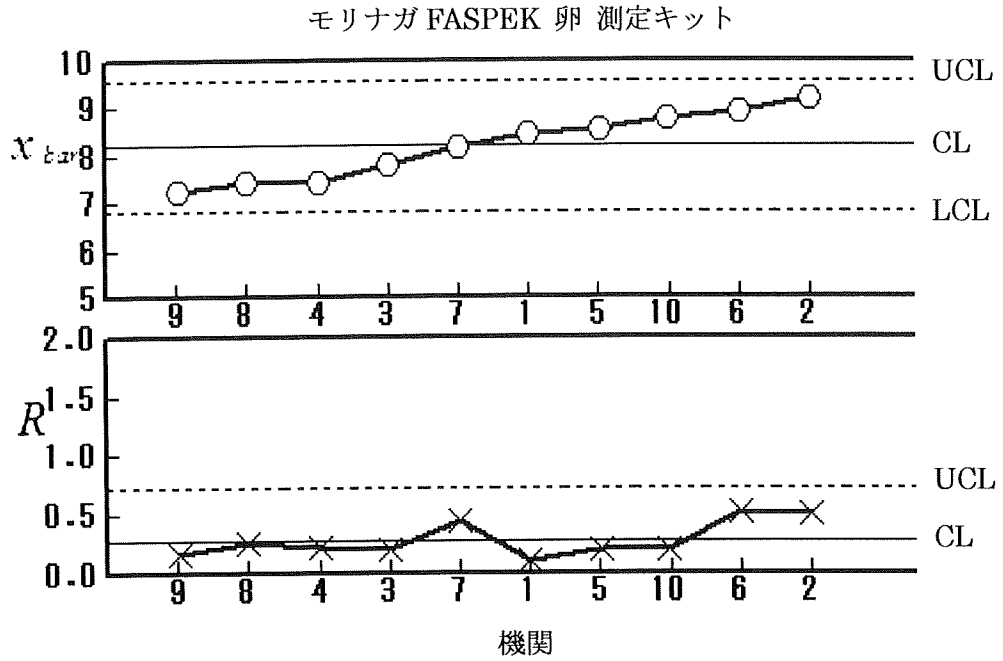
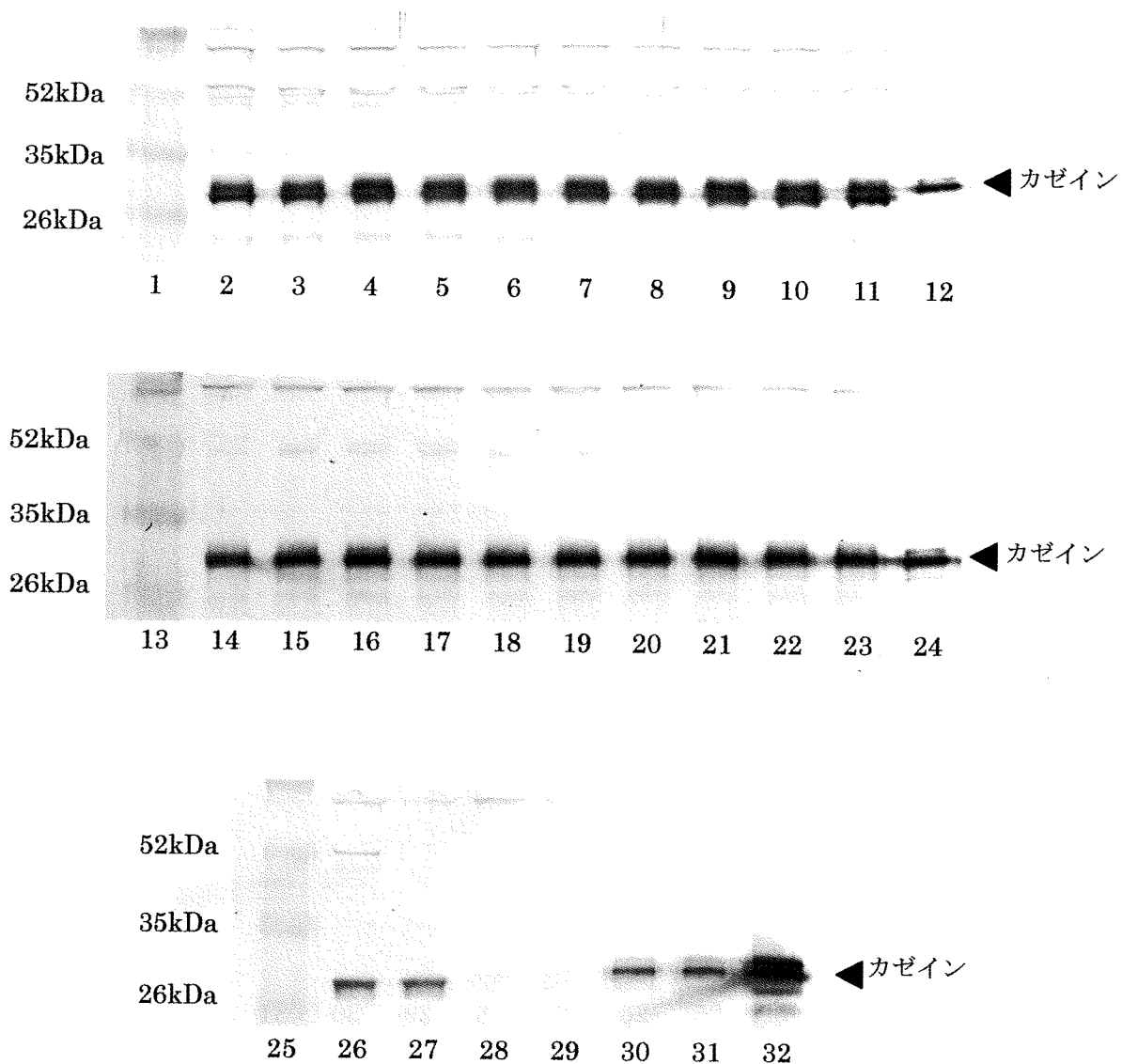
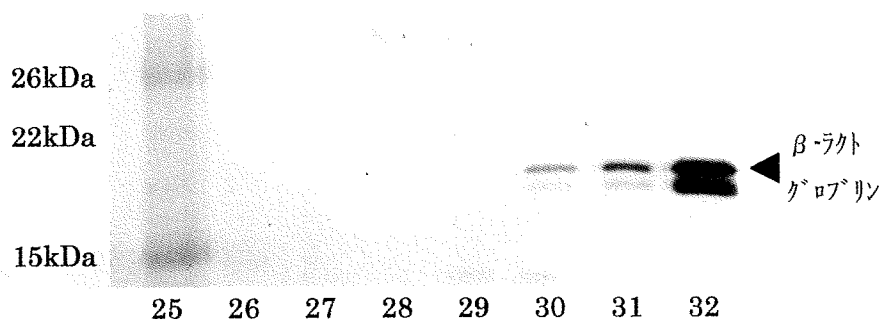
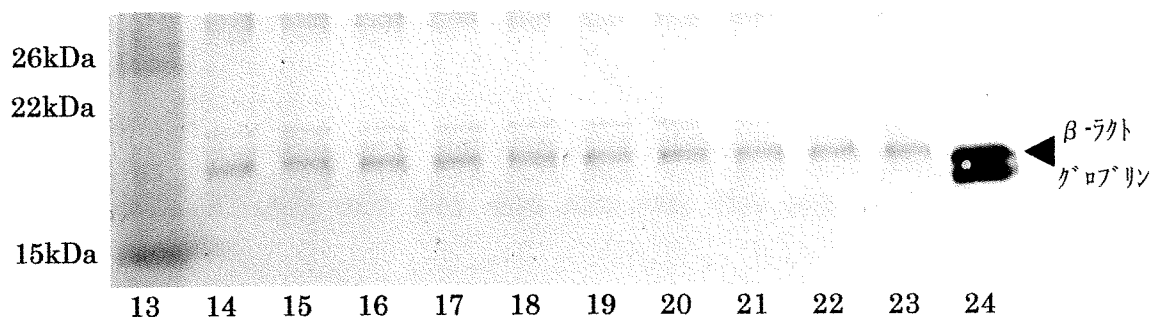
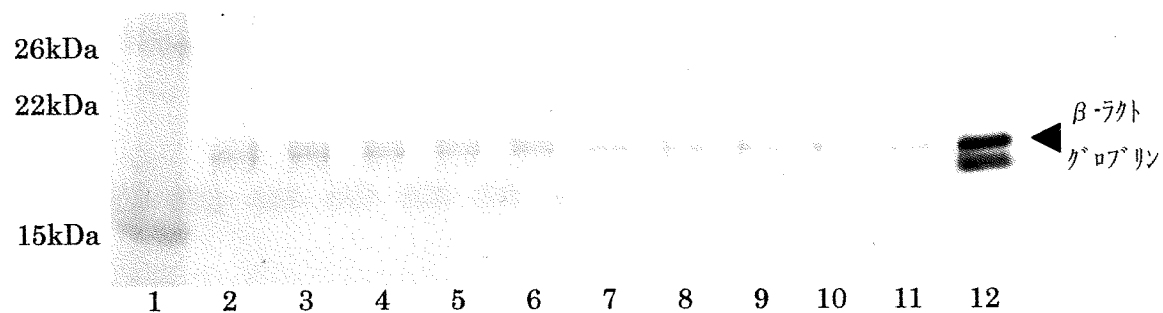


図6 牛乳添加試料のウエスタンブロットによる確認試験結果
 —カゼイン抗体による検出—



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

図7 牛乳添加試料のウエスタンブロットによる確認試験結果
 - β -ラクトグロブリン抗体による検出 -



- | | |
|------------|------------------------|
| 1, 13, 25 | カゼイン |
| 2~11 | 牛乳添加ハンバーグ試料 |
| 14~23 | 牛乳添加カボチャペースト試料 |
| 26, 27 | ハンバーグ試料ブランク |
| 28, 29 | カボチャペースト試料ブランク |
| 30 | 牛乳標準品 (0.5 μ g/mL) |
| 31 | 牛乳標準品 (1 μ g/mL) |
| 12, 24, 32 | 牛乳標準品 (10 μ g/mL) |

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)

— 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究 —

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	穂山 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
	小熊 恭代	(財)食品薬品安全センター 研究員

研究要旨

Bt10 および DAS59132 トウモロコシを検査対象とした外部精度管理の調査試料を作製するため、検出下限の検討を行った。Bt10 においては Bt10 陽性コントロールプラスミドを段階希釈し、Bt10 検出用および Bt10 確認用試験を実施した結果、両試験とも 4000 倍希釈までは実施した全測定で予定長の増幅物が検出された。DAS59132 においては DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液を段階希釈し、DAS59132 検出用試験を実施した結果、2000 倍希釈 (0.05%) まで実施した全測定で Ct 値が 38 未満となる指数関数的増幅を認めた。これら検出下限の検討結果および穂山らの報告に基づいて 5 種の調査試料を作製し、外部精度管理調査を行った。外部精度管理調査の結果、Bt10 陽性コントロールプラスミドの 4000 倍希釈液では 1 機関を除く全機関で、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液の 2000 倍希釈液では全機関で陽性の結果が得られ、検出下限の妥当性が確認できた。

外部精度管理調査の結果、Bt10 陽性コントロールプラスミドの 4000 倍希釈液の測定で、Bt10 を検出しなかった機関は通知とは異なる PCR 酵素を使用していたことが判明した。このため、PCR 酵素が測定結果におよぼす影響について検討した結果、当該機関はホットスタート酵素を使用しなかったため誤った結果を報告したことが明らかになった。一方、DAS59132 検出用試験では増幅曲線の収束位置が低い機関が認められたため、反応液のプライマー・プローブの濃度を变化させた場合とリアルタイム PCR 装置の蛍光感度を調整した場合の影響について検討した。その結果、プライマー・プローブ濃度の影響が大きかった。

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。

平成 19 年度遺伝子組換え食品検査の外部精度管理において実施した「参加機関における平成 19 年度遺伝子組換え食品検査実績」において、検査実績のある機関数がサイズに次いで多かったのは、安全性未確認の遺伝子組換えトウモロコシであった。現在、安全性未確認の遺伝子組換えトウモロコシで通知による検査方法が定められているのは、CBH351 トウモロコシ、Bt10 トウモロコシおよび平成 20 年 6 月 18 日に新たに検査方法が定められた DAS59132 トウモロコシの 3 品種である。CBH351 トウモロコシを対象とした外部精度管理調査は平成 13 年度に実施済みであるため、今回は Bt10 トウモロコシおよび DAS59132 トウモロコシを検査対象として外部精度管理調査を実施することとなった。しかし、調査予定のトウモロコシのうち DAS59132 トウモロコシは、粉末は入手できたものの検査の成否を確認するための陽性対照プラスミドが市販されていない。一方、Bt10 トウモロコシは陽性対照プラスミドは市販されているものの、粉末については入手不能であった。

これらの問題点を考慮した結果、前回の遺伝子組換え米に続き、粉末試料、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。加えて、DAS59132 陽性対照プラスミドに代わる陽性対照の作製も行った。また、外部精度管理調査における各参加機関の報告書を検討した結果、定性 PCR の酵素、リアルタイム PCR のプライマー・プローブの濃度、リアルタイム PCR 装置における蛍光感度の調整

等の測定条件が検査結果に影響を与えた可能性が疑われた。このため、これらの測定条件が検査結果に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1. 使用材料

外部精度管理試料および DAS59132 陽性対照の作製には、DAS59132 トウモロコシ、nonGM トウモロコシおよび GM トウモロコシ系統別 DNA Bt10 陽性コントロールプラスミド(ニッポンジーン)を使用した。

2. DNA 抽出

nonGM トウモロコシおよび DAS59132 トウモロコシからの DNA 抽出には、DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN)を使用し、JAS 分析試験ハンドブック(独立行政法人 農林水産消費センター)に従って操作した。抽出した DNA は 10 ng/ μ L に調製後、以下の検討および精度管理試料の調製に使用した。

なお、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。

3. Bt10 検出下限の検討

3.1 Bt10 陽性対照プラスミドの希釈

nonGM トウモロコシから抽出した DNA 溶液を用いて Bt10 陽性コントロールプラスミドを段階希釈した液について以下に示す方法で Bt10 を $n=8$ または $n=16$ で測定し、検出下限を検討した。

3.2 定性 PCR による Bt10 の測定

Bt10 の測定は、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)」(食安発第 0618001 号、平成 20 年 6 月 18 日、以下通知と記載する)に従い、陽性対照用(Zein n-5'および Zein

n-3`), Bt10 検出用 (JSF5 および JSR5) および Bt10 確認用 (Bt10LS-5` および Bt10LS-3`) (以上ニッポンジーン) の各プライマー対および、AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) により実施した。PCR 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 2% アガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid 2plus (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 20 bp DNA Ladder (Takara Bio)、画像解析にはプリントグラフ (ATTO) を使用した。

4. DAS59132 検出下限の検討

4.1 DAS59132 トウモロコシ抽出 DNA の希釈

DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液を nonGM トウモロコシ DNA 溶液を用いて段階希釈した液について n=12 でリアルタイム PCR による DAS59132 検出用試験を行い、検出下限を検討した。

4.2 リアルタイム PCR による DAS59132 の測定

DAS59132 の測定は通知に従い、DAS59132 検出用プライマー対 (32f および 32r) および DAS59132 検出用プローブ (以上 Applied Biosystems)、マスターミックスには TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用して実施した。なお、リアルタイム PCR 装置には ABI PRISM™ 7900HT (Applied Biosystems) を使用した。リアルタイム PCR の結果は、まず Amplification plot を確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Th. Line をベースライン (3 サイクルから 15 サイクル) のノイズ幅より上側の ΔRn 0.2~0.5 の間に設定した。次に Th. Line と増幅曲線が交わる Ct 値を求め、38 未満の Ct 値が得られた場合に陽性と

判定した。

5. DAS59132 陽性コントロールの調製

DAS59132 トウモロコシから抽出した DNA 溶液を GMO 共通 No Template Control-ColE1/TE (ニッポンジーン) を用いて 20 倍希釈したものおよびこれを水で 10 倍希釈した液を作製した。これらの液について、4.2 に従い n=10 で DAS59132 検出用試験を行い、Ct 値が 38 未満となる指数関数的な増幅が得られるか検討した。

6. 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、試料ごとに Bt10 の測定、DAS59132 の測定のそれぞれに分けてまとめた。

7. 外部精度管理調査結果に影響を与えたと考えられる測定条件の検証

7.1 定性 PCR

外部精度管理調査において PCR 酵素の変更が検査結果に影響をおよぼした可能性が考えられたため 3.2 の Bt10 の測定において、以下に示す PCR 酵素を使用して測定を実施した。すなわち、AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase の代わりに、Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)、TaKaRa Ex Taq® (通常品)、TaKaRa Ex Taq® (Hot Start Version) (以上 Takara Bio) のいずれかを用いて Bt10 陽性試料 (試料 1) を測定し、AmpliTaq Gold™ を用いたときの結果と比較した。

7.2 リアルタイム PCR

5. で調製した DAS59132 陽性コントロールについてプライマー・プローブ濃度を変更して DAS59132 を測定し、増幅曲線を検討した。

さらにリアルタイム PCR 装置 (ABI PRISM™ 7900HT) の蛍光感度の調整の影響を検討するため蛍光感度調整後に 4.1 と同様の測定を行い、4.1 の結果と比較した。

C. 結果および考察

1. 外部精度管理試料の調製

nonGM トウモロコシ DNA 溶液を用いて Bt10 陽性コントロールプラスミドを段階希釈した液について、Bt10 検出用試験および確認用試験を実施した。その結果、4000 倍希釈では Bt10 検出用、Bt10 確認用試験における測定の中で予定長の増幅物が確認できたが、8000 倍希釈ではいずれの試験系でも増幅物が確認できない測定が認められた(図 1 および表 1)。以上の結果から、Bt10 陽性コントロールプラスミドの検出下限は 4000 倍希釈と考えられた。なお、これをコピー数に換算すると 4.2 コピー/反応液であった。

穂山ら(第 45 回全国化学技術協議会講演要旨集, 2008)は、DAS59132 試験法の多機関バリデーションの中でトウモロコシ粉末試料では DAS59132 トウモロコシの含量が重量混合比で 0.05%の試料まで全機関で陽性と判定されたことを報告している。しかし、DAS59132 トウモロコシおよび nonGM トウモロコシの抽出 DNA 溶液を混合して作製した 0.01% (10000 倍希釈) DNA 溶液試料では、一部の機関で Ct 値が 38 以上となる測定があったことを報告している。このため、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液を nonGM トウモロコシ DNA 溶液を用いて段階希釈した液について検出下限を検討することとし、リアルタイム PCR による DAS59132 検出用試験を行った。その結果、DAS59132 トウモロコシの含量に換算して 0.05% (2000 倍希釈) までは実施した全ての測定で 38 未満の Ct 値が得られる指数関数的な増幅が認められたが、0.025% (4000 倍希釈) では Ct 値が 38 以上となる測定も認められた(表 2)。以上の結果から、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液の検出下限は 0.05%と考えられた。ちなみに、DAS59132 発現カセットが 1 ゲノムあたり 1 個挿入されていると仮定すると、検出下限のコピー

数は別途測定したトウモロコシ内在性 SSIIb のコピー数と希釈率から約 6.2 コピー/反応液となる。

DAS59132 検出下限の検討結果を踏まえ、DAS59132 トウモロコシ DNA 溶液を GMO 共通 No Template Control-ColE1/TE (ニッポンジーン)を用いて 20 倍希釈して DAS59132 陽性コントロールを作製した。DAS59132 陽性コントロールの希釈媒体は DAS59132 検出下限で使用したのとは異なるため、別途 DAS59132 の検出を検討した。すなわち、DAS59132 陽性コントロールおよび参加機関での希釈を想定しこれを水で 10 倍希釈した液について、4.2 に従って DAS59132 検出用試験を実施した。その結果、全測定で Ct 値が 38 未満となる指数関数的な増幅が得られ、DAS59132 陽性コントロールおよびその 10 倍希釈液が陽性対照として使用できることが明らかになった。(表 3)

以上 Bt10 の検出下限および DAS59132 の検出下限の検討結果に基づいて DNA 溶液試料を、さらに穂山らの報告に基づいてトウモロコシ粉末試料を調製し、これらを用いて外部精度管理調査を実施した。外部精度管理試料の詳細は表 4 に示した。

参加機関から報告された Bt10 の測定結果をまとめて表 5 に示した。Bt10 陽性対照用試験では 1 測定を除き、いずれの試料も全ての測定で予定長の増幅物が確認された。いずれも Bt10 陰性試料である試料 A、試料 B、試料 2 および試料 3 の Bt10 検出用試験では、試料 A で 1 測定、試料 B で 2 測定、試料 3 の 2 測定の計 5 測定で予定長の増幅物が誤って検出された。しかしこれを受けて実施した Bt10 確認用プライマー試験では、予定長の増幅物が検出された測定はなく、いずれの試料も全参加機関で Bt10 陰性と判定された。Bt10 陽性試料である試料 1 の Bt10 検出用試験による増幅では、全測定で予