

謝 辞

本稿で紹介した内容は、著者らが行ってきた研究の一部が含まれている。これらの研究の遂行にご協力とご指導を賜りました諸先生方に御礼申し上げます。なお本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金および農林水産技術会議委託研究「遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保研究」によった。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 龜山 浩. 食品衛生学—「食の安全」の科学, 菊川清見, 那須正夫編. 東京, 南江堂, 2004, p. 283-298. (ISBN: 9784524401970)
- 2) Hino, A., Akiyama, H., Kuribara, H. Current detection methods for genetically modified crops. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **50**, 107-114 (2003).
- 3) Matsuoka, T., Kuribara, H., Suefuji, H., Miura, H., Kusakabe, Y., Akiyama, H., Goda, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH 351. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, 197-201 (2001).
- 4) Akiyama, H., Sakata, K., Spiegelhalter, F., Furui, S., Nakashima, A., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory validation of an event-specific real time polymerase chain reaction detection method for genetically modified DAS 59132, maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science)*, **51**, 65-70 (2010).
- 5) Watanabe, T., Tokishita, S., Spiegelhalter, F., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Matsuda, R., Futo, S., Akiyama, H., and Maitani, T. Development and evaluation of event-specific qualitative PCR methods for genetically modified Bt 10 maize. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1274-1279 (2007).
- 6) Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A., Toyoda, M. Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, 231-236 (2001).
- 7) Yamaguchi, A., Shimizu, K., Mishima, T., Aoki, N., Hattori, H., Sato, H., Ueda, N., Watanabe, T., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T. Detection method for genetically modified papaya using duplex PCR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 146-150 (2006).
- 8) Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T. A histochemical method using a substrate of beta-glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **45**, 19-24 (2004).
- 9) Watanabe, T., Shiramasa, Y., Furui, S., Kitta, K., Minegishi, Y., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of qualitative detection methods for unapproved genetically modified rice (LLRice). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, 170-178 (2007).
- 10) Akiyama, H., Sasaki, N., Sakata, K., Ohmori, K., Toyota, A., Kikuchi, Y., Watanabe, T., Furui, S., Kitta, K., Maitani, T. Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5942-5947 (2007).
- 11) Nakamura, K., Akiyama, H., Yamada, C., Satoh, R., Makiyama, D., Sakata, K., Kawakami, H., Mano, J., Kitta, K., Teshima, R. Novel method to detect a construct-specific sequence of the acetolactate synthase gene in genetically-modified flax CDC Triffid (FP967). *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 532-534 (2010).
- 12) Akiyama, H., Watanabe, T., Kikuchi, H., Sakata, K., Tokishita, S., Hayashi, Y., Hino, A., Teshima, R., Sawada, J., Maitani, T. Development and evaluation of qualitative detection methods for unapproved genetically modified rice (LLRice). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 111-114 (2006).
- 13) Akiyama, H., Goda, Y., Aoyagi, Y., Watanabe, T., Wakui, C., Chiba, R., Toyoda, M., Maitani, T. A comparative study of real-time PCR method and ELISA method for detection of recombinant DNA from genetically modified soybean as soybean grain and defatted soybean. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, **10**, 73-77 (2003).
- 14) Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirao, T., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *J. AOAC Int.*, **85**, 1077-1089 (2002).
- 15) Shindo, Y., Kuribara, H., Matsuoka, T., Futo, S., Sawada, C., Shono, J., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. *J. AOAC Int.*, **85**, 1119-1126 (2002).
- 16) Hubner, P., Waiblinger, H. U., Pietsch, K., Brodmann, P. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J. AOAC Int.*, **84**, 1855-1864 (2001).
- 17) Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F., Brignon, P. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 5261-5266 (1999).
- 18) Suzuki, T. mRNA expression analysis by real-time polymerase chain reaction (PCR) technique. *Bunseki*, **1**, 11-17 (2008).
- 19) Kodama, T., Kuribara, H., Minegishi, Y., Futo, S., Watai, M., Sawada, C., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Teshima, R., Furui, S., Hino, A., Kitta, K. Evaluation of modified PCR quantitation of genetically modified maize and soybean using reference molecules: Interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **92**, 223-233 (2009).
- 20) Oguchi, T., Onishi, M., Minegishi, Y., Kurosawa, Y., Kasahara, M., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S.,

- Furui, S., Hino, A., Kitta, K. Development of quantitative duplex real-time PCR method for screening analysis of genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 117-125 (2009).
- 21) Goda, Y., Kakihara, Y., Akiyama, H., Matsuoka, T., Hino, A., Toyoda, M. Detection of unexpected recombinant DNA in maize grain. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 74-79 (2002).
- 22) Akiyama, H., Watanabe, T., Wakabayashi, K., Nakade, S., Yasui, S., Sakata, K., Chiba, R., Spiegelhalter, F., Hino, A., Maitani, T. Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Anal. Chem.*, **77**, 7421-7428 (2005).
- 23) Akiyama, H., Sakata, K., Kondo, K., Tanaka, A., Liu, S. M., Oguchi, T., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Teshima, R. Individual detection of genetically modified maize varieties in non-identity-preserved maize samples. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1977-1983 (2008).
- 24) Onishi, M., Matsuoka, T., Kodama, T., Kashiwaba, K., Futo, S., Akiyama, H., Maitani, T., Furui, S., Oguchi, T., Hino, A. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 9713-9721 (2005).
- 25) Oguchi, T., Onishi, M., Mano, J., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Furui, S., Kitta, K. Development of multiplex PCR method for simultaneous detection of four events of genetically modified maize: DAS-59122-7, MIR 604, MON 863 and MON 88017. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hygiene and Safety Science)*, **51**, 92-100 (2010).
- 26) Akiyama, H., Nakamura, F., Yamada, C., Nakamura, K., Nakajima, O., Kawakami, H., Harikai, N., Furui, S., Kitta, K., Teshima, R. A screening method for the detection of the 35S promoter and the nopaline synthase terminator in genetically modified organisms in a real-time multiplex polymerase chain reaction using high-resolution melting-curve analysis. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1824-1829 (2009).
- 27) Mano, J., Shigemitsu, N., Futo, S., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A., Furui, S., Kitta, K. Real-time PCR array as a universal platform for the detection of genetically modified crops and its application in identifying unapproved genetically modified crops in Japan. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 26-37 (2009).

未承認遺伝子組換え食品の検査法

Detection Methods of Unauthorized Genetically Modified Foods

国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部

穂山 浩

National Institute of Health Sciences
Division of Novel Foods and
Immunochemistry

Hiroshi AKIYAMA

I はじめに

遺伝子組換え(GM)食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められ、国際的な基準作りが進められた。近年ではGM食品の開発や実用化は、米国、カナダ、中国を中心に世界各国で急速に広がっている。GM植物のみならず、GM魚を代表とするGM動物の開発も行われ、実用化されつつある。

2001年からわが国では食品衛生法により、GM食品の安全性審査が義務付けられている、しかしながら、多種多様なGM植物・生物が各国で開発されている現状では、意図せずに未審査のGM植物・生物が食品として国内に流入、流通するおそれがある。したがって未承認のGM食品への混入は未然に防ぐことが求められている。これに関連し、医薬食品局食品安全部長通知として「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(2001年3月27日食発第110号：2008年6月18日最終改正)でGM食品の検査方法を定めた。緊急性の高

い未承認GM食品の検査法は、医薬食品局食品安全部監視安全課長通知で示されてきた。

本稿では2008年以降に新しく通知された未承認GM食品の検査法を中心に紹介する。

II 安全性未審査のGM食品の検査法(総論)

2010年9月現在、「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(2001年3月27日食発第110号)に示されている安全性未審査のGM食品の検査法は、トウモロコシとしてCBH351系統(害虫抵抗性)¹⁾、DAS59132系統(除草剤耐性)²⁾、Bt10系統(害虫抵抗性)³⁾が検査対象となっている。

また2009年までは安全性審査が継続中であったハワイ産抗ウイルスパパイヤ(55-1系統)は定性PCR法^{4,5)}と組織染色法⁶⁾を検査法として採用している。そのほか食品安全部監視安全課長通知として、米国産長粒種米LLコメ(LL601系統)⁷⁾、中国産害虫抵抗性Btコメ(Bt63系統およびNNBt

表1 未承認GM食品の検査法

作物	系統名	方法	検査法
トウモロコシ	CBH351; スターリンク	ラテラルフロー法	食品安全部長通知
トウモロコシ加工品	CBH351; スターリンク	定性PCR法	食品安全部長通知 ¹⁾
トウモロコシ	Bt10	定性PCR法	食品安全部長通知 ³⁾
	DAS59132	リアルタイム定性PCR法	食品安全部長通知 ²⁾
パパイヤ	55-1	定性PCR法	食品安全部長通知 ^{4,5)}
		組織免疫染色法 (GUS試験法)	食品安全部長通知 ⁶⁾
コメ	米国産LLコメ	リアルタイム定性PCR法	監視安全課長通知 ⁷⁾
	中国産Btコメ	ラテラルフロー法	監視安全課長通知 ¹⁰⁾
コメ加工品	中国産Btコメ	定性PCR法 リアルタイム定性PCR法	監視安全課長通知 ⁸⁾
ナタネ	RT73 <i>B. rapa</i>	リアルタイム定性PCR法 (end-point解析)	監視安全課長通知
亜麻	FP967	リアルタイム定性PCR法	監視安全課長通知 ⁹⁾

系統)⁸⁾、カナダ産GMアマ(FP967系統)⁹⁾、カナダ産GMナタネ(RT73 *Brassica rapa*系統)が検査対象になっている。表1に各検査法を示す。

1 定性PCR法およびリアルタイム定性PCR法

定性PCR法の場合、鋳型となるゲノムDNAの抽出はPCR検出を可能にするのに重要である。ゲノムDNAと複合体を形成しやすいセチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)等を利用した方法や市販のDNA抽出用のキット(シリカゲル膜タイプ法、イオン交換カラム法)を用いる方法が規定されている。

PCR反応を行う際には、コントロールとして対象作物に必ず含まれる内在性遺伝子のDNA配

列のPCR(大豆であれば*le1*遺伝子等、トウモロコシであれば*Zein*、*SSI1b*遺伝子等)を行う必要がある。PCR反応後、反応液はアガロース電気泳動したものをエチジウムブロマイドで蛍光染色し、紫外線照射下において画解析機器等で写真撮影する。設計したプライマー対に挟まれたDNAの長さとも一致するバンドが検出される。違反の際の社会的な影響を考慮して、異なった標的領域を認識するプライマー対2種類(検出と確認)を用いて試験し、両方検出されれば陽性と判断する。リアルタイム定性PCR法は、近年リアルタイムPCR機器の普及により、広く応用されるようになっている。指数関数的な増幅曲線の有無で陽性あるいは陰性と判断できるため、アガロースゲル電気泳動を行う必要がなく、多検体を特異的、迅速、か

つ簡易に判定することが可能である。

2 組換えタンパク質を検知する方法

組換えタンパク質を検知する定性検知法としては、ラテラルフロー法¹⁰⁾、組織化学染色法等⁶⁾が採用されている。ラテラルフロー法については、すでにいくつかのキットが販売されている。定性PCR法と比較して、ラテラルフロー法および組織化学染色法は簡便であるが、感度は比較的低い。

Ⅲ 穀物ごとの未承認GM食品の検査法(各論)

1 未承認GMトウモロコシ (CBH351, Bt10, DAS59132)

米国産害虫抵抗性GMトウモロコシ(CBH351系統; スターリンク)の検査法はラテラルフロー法および定性PCR¹⁾が「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(2001年3月27日食発第110号)に示されている。害虫抵抗性GMトウモロコシ(Bt10系統)の検査法³⁾に関しては食発第110号を一部改正し、Bt10系統検査法を追加した(2005年5月17日食安発第0517001号)。CBH351系統およびBt10系統の定性PCR法は、シリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)でDNAを抽出し(図1)、挿入遺伝子の特異的な領域で異なった2種類のプライマー対(検出と確認)を用いて検知する定性PCR法により行う。

米国産除草剤耐性GMトウモロコシ(DAS59132系統; E32)²⁾害虫抵抗性のタンパク質cry34Ab1とcry35Ab1の遺伝子および除草剤耐性PATタンパク質の遺伝子を導入したGMトウモロコシである。E32は安全性審査が終了しているGMトウモロコシDAS59122系統に導入されたものと同一のDNA配列を用いている。2008年2

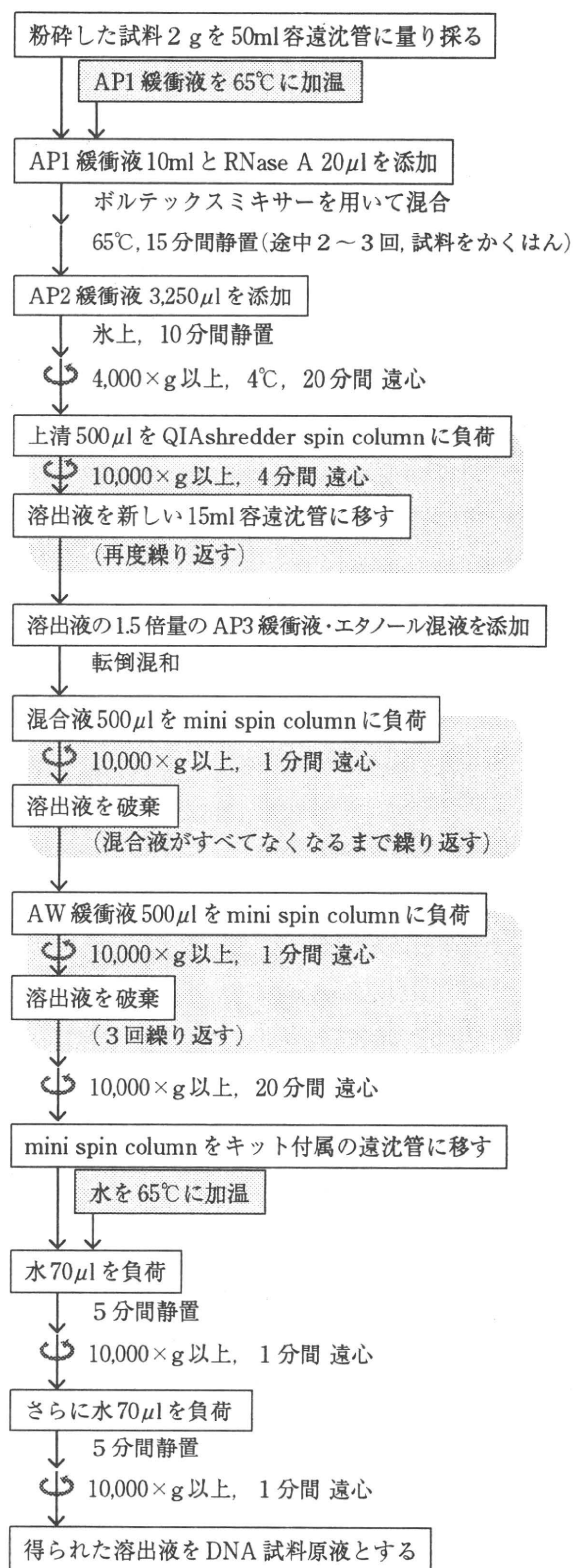


図1 トウモロコシDNA抽出法

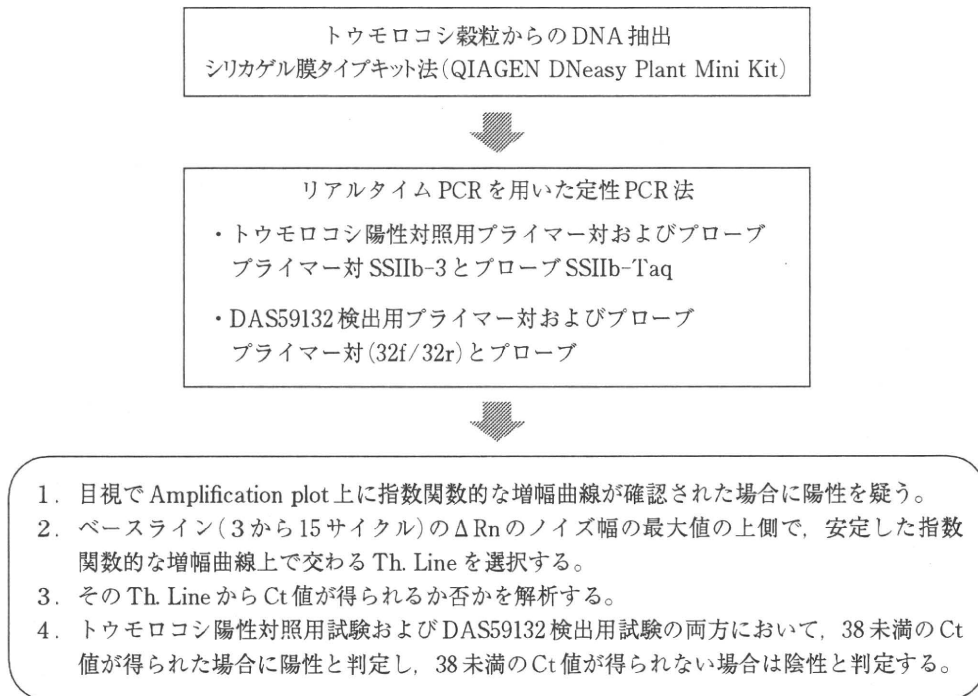


図2 GMトウモロコシ(DAS59132)検査法の流れ

月22日にE32の種子が販売・作付けされていたことが米国政府より公表された。厚生労働省はその公表を受け、同3月7日に「安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ(DAS59132)の暫定検査法について」(食安監発第0307005号, 同6月18日食発第110号に追加)を通知した。検査法の流れを図2に示す。

Bt10検査法と同様にシリカゲル膜タイプキット法(QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit)でDNAを抽出し(図1), リアルタイム定性PCR法で検出することになっている。リアルタイム定性PCR法では、指数関数的な増幅曲線が得られるか否かで陽性または陰性が判断される。目視で指数関数的な増幅曲線が観察されれば、陽性と疑い、ベースライン(3から15サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Th. Line を選択する。その後、40サイクル繰り返しのPCRにおいてCt値が38未満

で得られた場合、陽性と判定する。陽性と判定された場合は、multicomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認することになっている(図3)。

2 未承認GMコメ(米国産LLコメ, 中国産Btコメ)

米国産除草剤耐性GMコメ(LL rice 62系統, LL rice 601系統)の検査法⁷⁾は「米国産米(長粒種)及びその加工品の取扱いについて」(2006年9月15日食安輸発第0915002号)に通知されている。DNA抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker 2 変法)を用いて、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法により検出する。また中国産害虫抵抗性GMコメ(Shanyou 63系統, Kemingdao系統)⁸⁾加工品の検査法につ

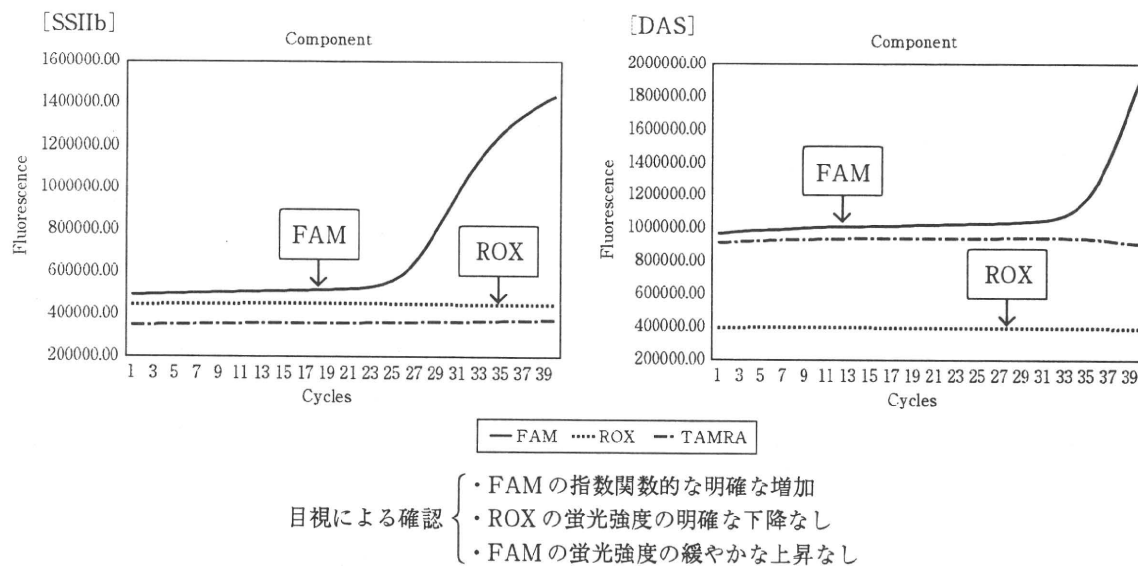


図3 DAS59132検査法のmulticomponent解析

いては、「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(2007年1月26日食安監発第0126005号、最終改正2007年2月20日食安監発第0220001号)が通知されている。DNA抽出精製はシリカゲル膜タイプキット法(NIPPON GENE GM quicker 2変法)を用い、定性PCR法で検出し、リアルタイムPCRを用いた定性PCR法により確認する。

3 未承認GMナタネ(カナダ産 RT73 *Brassica rapa* 系統)

除草剤耐性の遺伝子組換え(GM)ナタネであるRT73 *Brassica rapa*(RT73 *B. rapa*)は、わが国において安全性審査が終了した除草剤耐性RT73 *Brassica napus*(RT73 *B. napus*)と非遺伝子組換え(non-GM)ナタネ(*B. rapa*)との交配によって作出されたGMナタネである。2004～05年度にかけてカナダの市場にRT73 *B. rapa*が流通していたという報告があることから、わが国にもRT73 *B. rapa*が輸入されている可能性が考えられた。RT73 *B. rapa*の導入されている遺伝的形質はRT73 *B. napus*と同一であるが、亜種間交

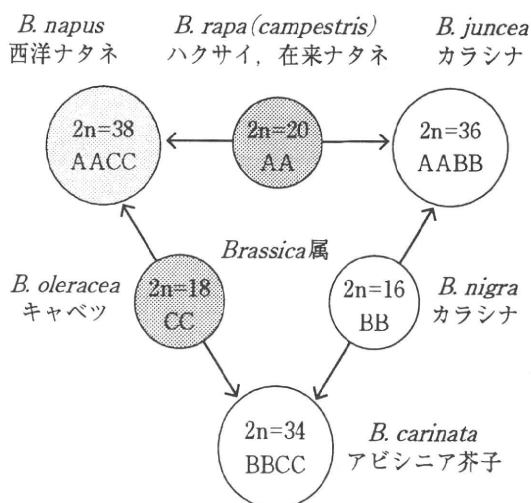


図4 アブラナ属(*Brassica*属)のゲノム構成

雑種であるために安全性未審査のGMナタネであり、国内に流通させてはならない。RT73 *B. rapa*に導入されている遺伝的形質は、安全性が承認されているRT73 *B. napus*と同一だが亜種間交雑種であることから(図4)、*B. rapa*と*B. napus*の識別検知とRT73特異的検知領域を同時に検出する必要があった。本検査法は「カナダ産RT73 *B. rapa*ナタネ検査法」(2009年9月14日食安監発

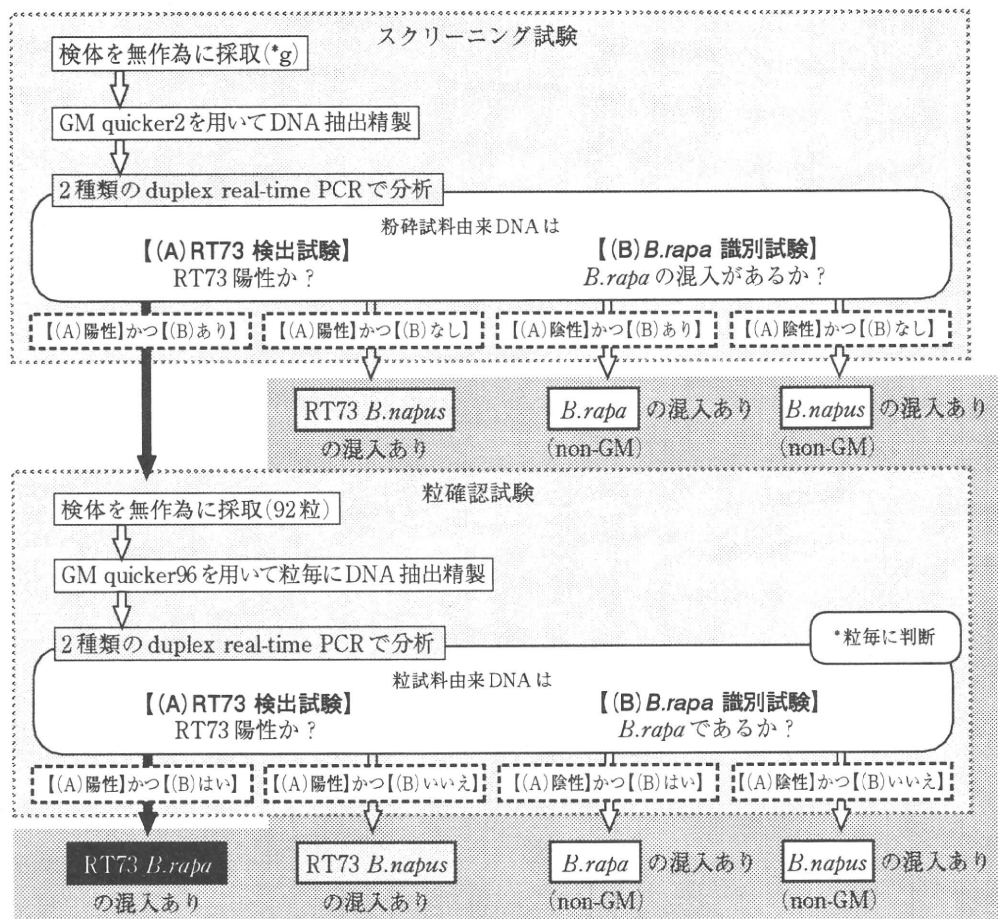


図5 RT73 *B. rapa*検査法の流れ

表2 RT73 *B. rapa*検査法のプライマー対とプローブ

検出用途	プライマー・プローブ	配列
B. rapa ACCg8 検出用	Brapa-ACCg8F	GGTTATATACGGCTTTGTGGTTGC
	Brapa-ACCg8R	AACATCAGGCTGTCCAAGAAAGAT
	Brapa-ACCg8	VIC-CTATGTCTGAGGAATTATAA-NFQ-MGB
B. napus BnC1 検出用	B. napus BnC1-969F	GAAGCTCTCCTTCGTGGCTAAA
	B. napus BnC1-1043R	TCACGAATTTGAATCTCGATACTCA
	B. napus BnC1-994T	FAM-ACGTGAATCTGATTTTGA-NFQ-MGB
RT73 検出用	RT73 primer 1	CCATATTGACCATCATACTCATTGCT
	RT73 primer 2	GCTTATACGAAGGCAAGAAAAGGA
	RT73 probe	FAM-TTCCCGGACATGAAGATCATCCTCCT-TAMRA
FatA 検出用	FatA primer 1	GGTCTCTCAGCAAGTGGGTGAT
	FatA primer 2	TCGTCCCGAACTTCATCTGTAA
	FatA probe	VIC-ATGAACCAAGACACAAGCGGCTTCA-TAMRA

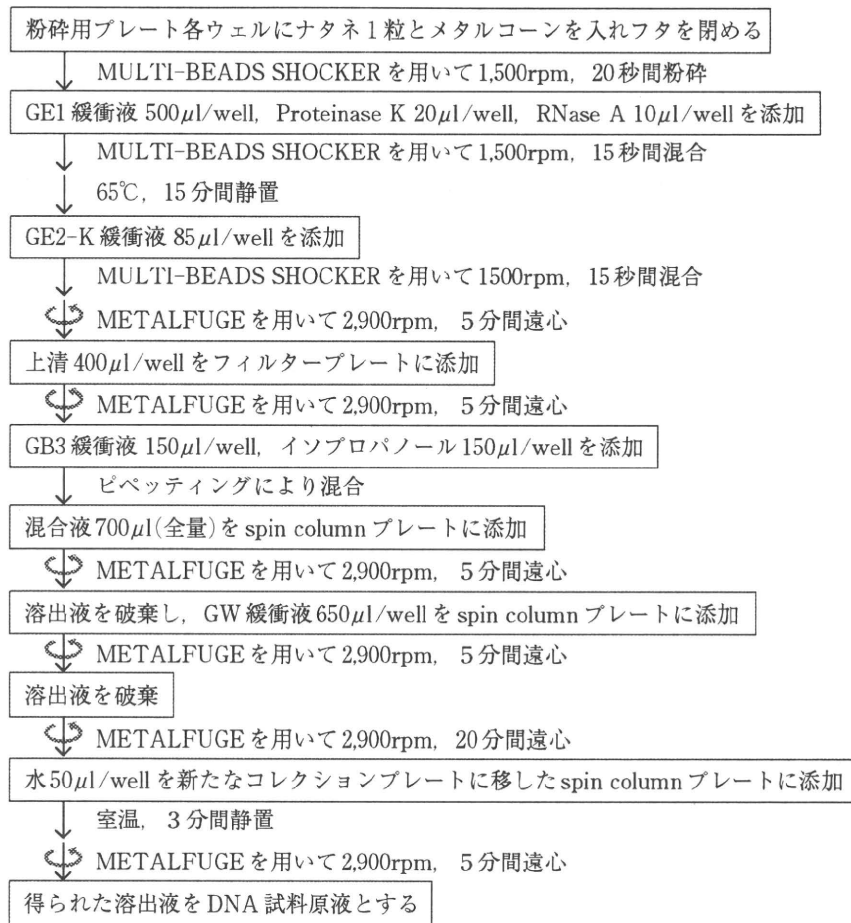


図6 ナタネ1粒DNA抽出法のフローチャート

090914号)で示された。検査法の流れを図5に示す。また検査法に用いるプライマー対とプローブを表2に示す。検体の粉砕試料を用いたスクリーニング検査により、*B. rapa*の混入とRT73が検出された場合、同検体の粒試料から無作為に採取した92粒を用いて粒確認検査を行う。

スクリーニング検査は、粉砕試料を用いて*B. rapa*識別試験とRT73検出試験の2種類の試験を行う。*B. rapa*識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料液のACCg8(VIC)の蛍光強度と*B. napus* Positive ControlのACCg8(VIC)の蛍光強度との比が2.04以上(ABI PRISM™ 7900)、1.40以上(ABI 7500)の場合、*B. rapa*が混入している

と判断する。さらに、RT73検出試験について、RT73検出用プローブ(FAM)を用いた試験で38未満のCt値が得られたウェルが1ウェルでもある場合にRT73陽性と判定する。スクリーニング検査において*B. rapa*の混入とRT73の増幅が確認された場合、同検体の粒試料から無作為に92粒を採取し、各粒ごとにDNA抽出を行い(図6)、各DNA試料原液を対象に、スクリーニング検査と同様の*B. rapa*識別試験とRT73検出試験の2種類の試験を行う。*B. rapa*識別試験のEnd-point解析結果で、DNA試料原液のACCg8(VIC)の蛍光強度と*B. napus* Positive ControlのACCg8(VIC)の蛍光強度との比が2.63以上(ABI PRISM™

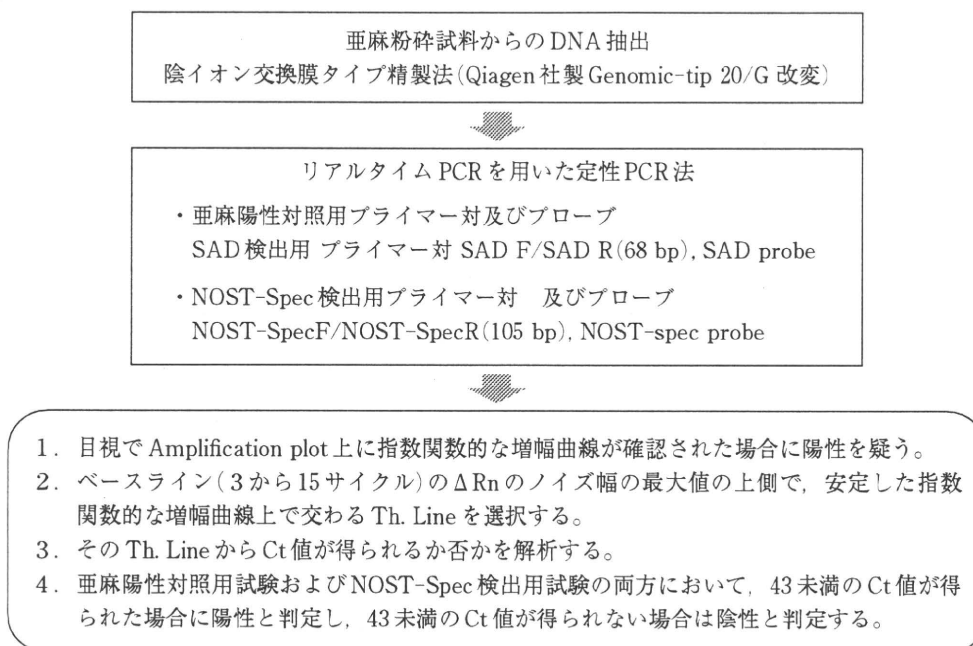


図7 GM亜麻 CDC Triffid (FP967) の検査法の流れ

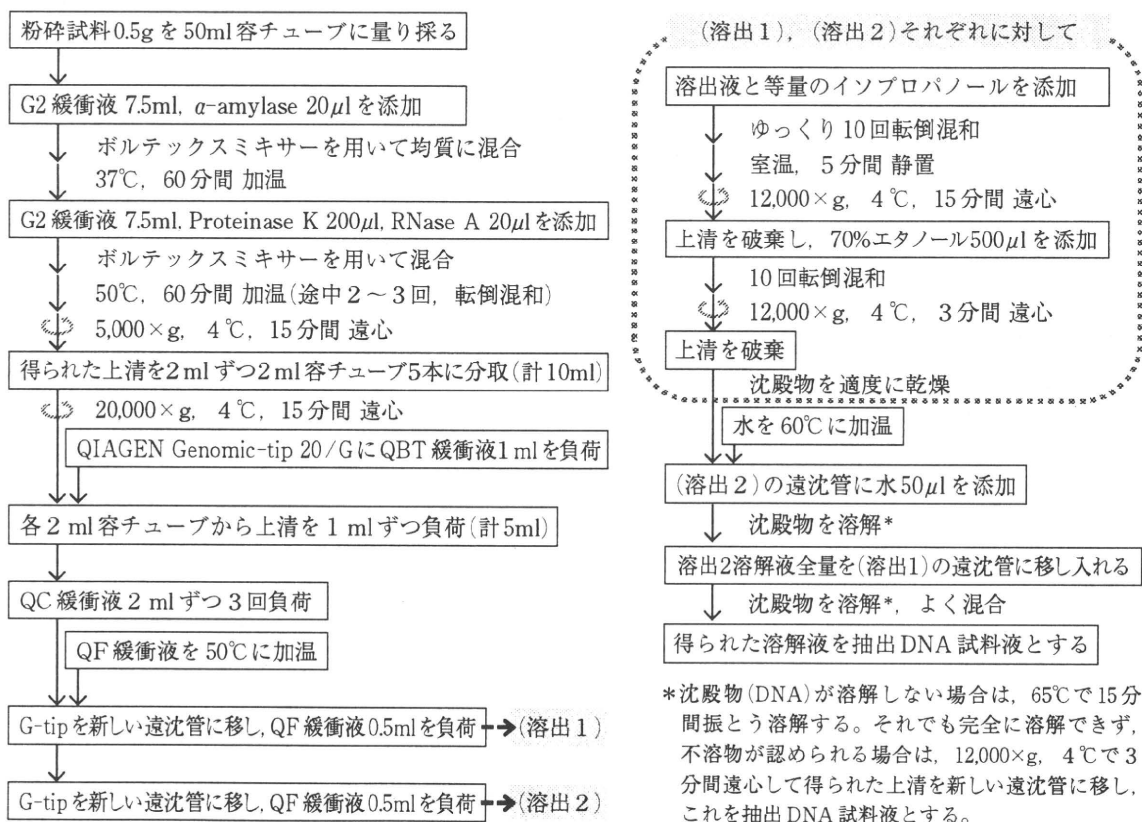


図8 GM亜麻 CDC Triffid (FP967) 検査法の DNA 抽出操作

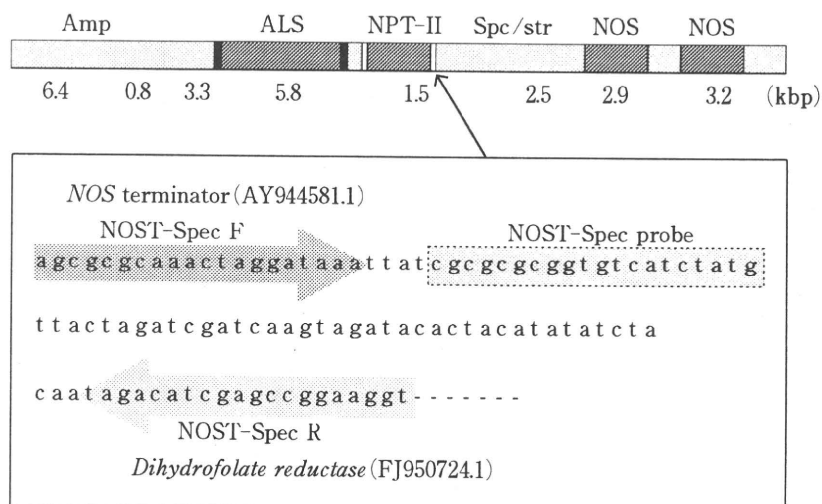


図9 GM亜麻CDC Triffid(FP967)の構造と検出部位

7900), 1.69以上(ABI 7500)で, BnC1(FAM)の蛍光強度と *B. napus* Positive Controlの蛍光強度の比が0.28以下(ABI PRISM™ 7900), 0.35以下(ABI 7500)の場合, そのDNA試料原液は *B. rapa* であると判断し, 同DNA試料原液のRT73の検出を確認する。さらに, RT73検出試験について, RT73検出用プローブ(FAM)を用いた試験で38未満のCt値が得られた場合はRT73陽性と判定する。粒確認試験の *B. rapa* 識別試験において *B. rapa* と判断され, かつRT73検出試験においてRT73陽性と判断されたDNA試料原液が1検体でもある場合は, 同検体はRT73 *B. rapa* 陽性と判定する。

4 未承認GM亜麻(カナダ産FP967)

カナダにおいてGM亜麻CDC Triffid(FP967)は, スルフォニルウレア除草剤耐性の目的で開発された。2009年9月8日, EU食品・飼料緊急警告システム(RASFF)は, EU未承認のカナダ産FP967がドイツのシリアルやパンなどの食品に混入していたことを発表した。FP967は, わが国において未審査であるため, 「安全性未審査の遺

伝子組換え亜麻(FP967)の暫定検査法について」(2009年10月27日食安監発1027第2, 3号,)が通知された。検査法の流れを図7に示す。亜麻穀粒からのDNA抽出法にはイオン交換膜タイプ法(Qiagen社製Genomic-tip 20/G改変)(図8)を用い, リアルタイム定性PCR法により検出する方法である(図9)。

IV 今後の動向と課題

多種多様なGM植物・生物が各国で開発されている現状では, 今後も意図せずに未承認GM植物・生物が食品として国内に流入, 流通するおそれがあることから, 国際的なGM植物・生物の開発情報を収集し, 新たな未承認GM食品を迅速に発見・解析する方法を開発することが望まれる。

また未承認GM食品の流通を可能な限り水際で止めるには, 新しい検知技術を導入し, 簡易, 迅速, 高感度な検査法の確立が急務と考えられる。

謝辞

なお本研究は, 厚生労働科学研究費補助金によった。

参 考 文 献

- 1) 松岡 猛, 栗原秀夫, 末藤晴子, 三浦裕仁, 日下部裕子, 穂山 裕, 合田幸広, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛: 遺伝子組換えトウモロコシCBH351系統からの組換え遺伝子の検知法, 食衛誌, **42**, 197-201(2001)
- 2) Akiyama H., Sakata K., Spiegelhalter F., Furui S., Nakashima A., Kitta K., Teshima R.: Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real Time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 Maize, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **51**, 65-70(2010)
- 3) Watanabe T., Tokishita S., Spiegelhalter F., Furui S., Kitta K., Hino A., Matsuda R., Futo S., Akiyama H., Maitani T.: Development and Evaluation of Event-Specific Qualitative PCR Methods for Genetically Modified Bt10 Maize, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1274-1279(2006)
- 4) 合田幸広, 浅野卓哉, 渋谷雅明, 日野明寛, 豊田正武: 遺伝子組換えパパイヤからの組み換え遺伝子の検知, 食衛誌, **42**, 231-236(2001)
- 5) Yamaguchi A., Shimizu K., Mishima T., Aoki N., Hattori H., Sato H., Ueda N., Watanabe T., Hino A., Akiyama H., Maitani T.: Detection method for genetically modified papaya using duplex PCR (Original). *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**, 146-150(2006)
- 6) Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T.: A Histochemical Method Using a Substrate of β -Glucuronidase for Detection of Genetically Modified Papaya, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **45**, 19-24(2004)
- 7) 渡邊敬浩, 白政優子, 古井 聡, 橋田和美, 峯岸恭孝, 穂山 浩, 米谷民雄: 安全性未審査遺伝子組換えコメ(LL rice)を対象とした検知技術の開発と評価, 食衛誌, **48**, 170-178(2007)
- 8) Akiyama H., Sasaki N., Sakata K., Ohmori K., Toyota A., Kikuchi Y., Watanabe T., Furui S., Kitta K., Maitani T.: Indicated Detection of Two Unapproved Transgenic Rice Lines Contaminating Vermicelli Products, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5942-5947(2007)
- 9) Nakamura K., Akiyama H., Yamada C., Satoh R., Makiyama D., Sakata K., Kawakami H., Mano J., Kitta K., Teshima R.: Novel Method to Detect a Construct-specific Sequence of the Acetolactate Synthase Gene in Genetically-modified Flax CDC Triffid (FP967), *Biol Pharm Bull.*, **33**, 532-534(2010)
- 10) Akiyama H., Watanabe T., Kikuchi H., Sakata K., Tokishita S., Hayashi Y., Hino A., Teshima R., Sawada J., Maitani T.: A Detection Method of CryIAC Protein for Identifying Genetically Modified Rice Using the Lateral Flow Strip Assay, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **47**, 111-114(2006)

天地 45mm

Report

Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real Time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 Maize

(Received September 16, 2009)

Hiroshi AKIYAMA^{1,*}, Kozue SAKATA¹, Frank SPIEGELHALTER², Satoshi FURUI³,
Akie NAKASHIMA⁴, Kazumi KITTA³ and Reiko TESHIMA¹

¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

²Eurofins GeneScan, Inc.: 2315 N. Causeway Blvd., Metairie, LA 70001, USA;

³National Food Research Institute: 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan;

⁴Hiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environment: 1-6-29 Minami-machi, Minami-ku, Hiroshima 734-0007, Japan; * Corresponding author

A real-time polymerase chain reaction (PCR) method specific for genetically modified (GM) maize event DAS59132 (E32) was adapted for qualitative detection of low level presence of E32. The method was validated by a collaborative trial with eight participating Japanese laboratories. Sensitivity was assessed with three different samples of corn flour fortified to 0%, 0.05% and 0.1% (w/w) E32 respectively. In addition, a 0.01% E32 DNA solution was used. The detection limit with DNA solution was estimated to be approximately 0.01%. In conclusion, the results of the study confirmed this real-time PCR method as a reliable tool for qualitative detection of E32 maize.

Key words: genetically modified maize; recombinant DNA; real time PCR; detection method; DAS59132

Introduction

Many types of genetically modified organisms (GMOs) have been introduced over the past decade or so, and the number of commercially available bio-engineered or genetically modified (GM) crops is increasing rapidly¹.

GM crops and their products have been authorized for food and/or feed use by many countries based on their respective criteria for safety assessment. In the European Union for example, the authorization and use of GM food and feed is governed by regulations (EC) No. 1829/2003 and (EC) No. 1830/2003^{2,3}. Japan implemented a mandatory safety assessment of GM foods and processed foods containing GM ingredients. Since April 1, 2001, any GM food that has not been authorized is prohibited from import or sale in Japan. Therefore, Japan requires detection methods for regulated and unauthorized GM crops and products. Previously, we reported the development of qualitative detection methods for GM products unauthorized in Japan, such as certain GM maize lines, GM potatoes (NewLeaf Plus, NewLeaf Y), GM papayas (Line 55-1 or its derivatives) and GM rice lines ('LibertyLink' rice and Chinese Bt rice lines)⁴⁻¹⁷.

In 2008, Dow AgroSciences LLC has voluntarily retrieved from US channels of distribution certain hybrid corn seed potentially containing adventitious, low levels of a regulated biotechnology maize event,

DAS59132, also referred to as event 32 or E32. Dow AgroSciences LLC, advised and cooperated with U.S. regulatory authorities in this matter. The situation creates no human, animal or environmental safety concerns, because the Bt proteins produced in the E32 maize are identical to those found in biotech hybrid maize sold commercially and deemed safe. However, under Japanese, Korean and EU regulations the E32 maize is unauthorized and the potential low level presence of E32 could require monitoring before import.

In the present study, we describe the results of an inter-laboratory study of an event-specific real-time PCR method to identify E32 maize. The experiments were conducted at eight laboratories in Japan.

Materials and Methods

Maize (zea mays) materials

Coarsely milled samples of E32 maize seed and non-GM maize seed were kindly provided by Dow AgroSciences LLC.

Preparation of the test samples

The E32 maize seeds and non-GM maize seeds were ground separately in an Ultra-Centrifugal Mill ZM100 (Retsch GmbH, Haan Germany) using a 0.5 mm sieve ring.

Two portions of the resulting non-GM maize flour sample were fortified with the E32 maize flour at 0.05% (w/w) and 0.1% E32, respectively, and were mixed well.

Since it did not necessarily seem practical to prepare a homogeneous fine flour mixture fortified with 0.01% E32. DNA extracted from the 0.05% E32 sample was diluted 1:5 with DNA extracted from non-GM maize, resulting in a 0.01% E32 DNA solution.

Samples were stored at -20°C until further use.

DNA extraction

Genomic DNAs were extracted from the flour samples using a silica-gel membrane-type kit (DNeasy Plant Mini; QIAGEN, Hilden, Germany) with modifications to the kit manual as described previously^{7i, 8i, 15i}. The DNA concentration was determined by measuring the UV absorption at 260 nm using an ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE). The purity of the extracted DNA was evaluated based on the ratio of absorbance at 260/280 nm, and the ratio was between 1.7 and 2.0. The extracted DNA was diluted with an appropriate volume of distilled water to a final concentration of 10 ng/mL and stored at -20°C until further use. These DNA samples were used for the subsequent PCR analysis.

Real-time PCR assay procedure

Real-time PCR assay was performed using an ABI PRISMTM 7900 Sequence Detection System instrument (AP7900) (Applied Biosystems), ABI PRISMTM 7500 Sequence Detection System instrument (AP7500) (Applied Biosystems) and ABI PRISMTM 7700 Sequence Detection System instrument (AP7700) (Applied Biosystems). According to the information provided by Agrigenetics, Inc., the 32f/32r primer pair amplifies a DNA sequence across a junction between genomic maize DNA sequence and the recombinant DNA sequences present in E32 maize. For fluorescence real-time PCR, the primer pair is to be used with the FAM dye-labeled E32 probe (Table 1). The reaction volume of 25 μL contained 2.5 μL of sample DNA solution, 12.5 μL of Universal Master Mix[®] (Applied Biosystems), 0.4 μM of 32f and 32r primers, and 0.2 μM 32 probe. The PCR program was as follows: 2 min at 50°C , and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min 30 sec at 60°C . The primers and probes were synthesized and purified on a reversed-phase column by FASMAC Co., Ltd. (Atsugi,

Japan), diluted with an appropriate volume of distilled water to a final concentration of 60 mmol/L, and then stored at -20°C until further use.

The SSIIb-3 system (SSIIb 3-5' and SSIIb 3-3' with SSIIb-Taq) was used for real-time PCR detection of the taxon specific gene encoding the maize starch synthase IIb gene sequence (SSIIb) as described previously^{17i, 18i}.

Data analysis

Typically, the baseline was set to cycles 3 through 15. The ΔRn threshold for plotting Ct values was set to 0.1–0.5 during exponential amplification.

Reactions with a Ct value of less than 38 and exponential amplification plots were scored positive for E32, since both three ΔRn values of the cycle number (35, 36, 37) before the Ct value and of the cycle number (38, 39, 40) after the Ct value around the detection limit should be required to verify the exponential amplification in a 40 cycle run. If a Ct value could not be obtained, the reaction was scored negative for E32. The reactions with a Ct value of less than 38, but without exponential amplification as judged by visual inspection of the respective ΔRn plots and multi component plots were scored negative.

Homogeneity tests of the test materials

Before dispatch to the laboratories, the homogeneity of the test samples was verified by the National Institute of Health Sciences (NIHS) according to the procedure described in the International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of Analytical Laboratories¹⁹ⁱ, except that the number of test samples was 10. As duplicate reactions for each test sample were tested, twenty reactions in total were analyzed using AP 7500. The obtained Ct values of the real-time PCR analyses were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA).

Inter-laboratory study

The inter-laboratory study, conducted with the participation of eight laboratories, was organized by NIHS. Non-GM maize flour, maize flour fortified with 0.05 and 0.1% (w/w) E32 maize and 0.01% E32 DNA solution were used as the four test samples. Each lab received as

Table 1. Primer and probe sequences of the real-time PCR system used in the present study

Name	Oligonucleotide sequence (5'-3')										
For the event-specific detection of E32 maize											
Primer	32f	CCC	CAA	TGT	GTT	ATT	AAG	TTG	TCT	AAG	
	32r	GGT	GAA	TGT	CGC	CGT	GTG	T			
Probe	32 probe	FAM-CAA	TTT	GTT	TAC	ACC	AGA	GGC	CGA	CAC	G-TAMRA
For the detection of taxon-specific <i>SSIIb</i> gene (SSIIb) for maize											
Primer	SSIIb 3-5'	CCA	ATC	CTT	TGA	CAT	CTG	CTC	C		
	SSIIb 3-3'	GAT	CAG	CTT	TGG	GTC	CGG	A			
Probe	SSIIb-Taq	FAM-AGC	AAA	AAA	AGA	GCG	CTG	CAA-TAMRA			

blind samples 2 tubes with 2 g of each of the three flour samples and 2 tubes containing 30 μ L of the 0.01% E32 DNA solution. Thus, 64 blind samples in total were distributed and analyzed in the inter-laboratory study. The duplicate reactions for each sample were conducted in a real-time PCR assay. The participating laboratories also received aliquots of the oligonucleotides, other reaction components and the experimental protocol from the NIHS. We referred to the guidelines for collaborative study to determine the general procedure of the inter-laboratory study²⁰.

Table 2. Homogeneity test results of the samples

	Mean Ct	RSD % ^{a)}	n	F-ratio	Fcrit
0.05%	31.5	0.84	10	0.98	3.02
0.1%	33.6	1.11	10	1.38	3.02

Homogeneity test was carried out using AP7500 instruments.

a) RSD%: calculated from Ss (SD of sampling) and Sa (SD of analysis)

b) Fcrit: Critical F value

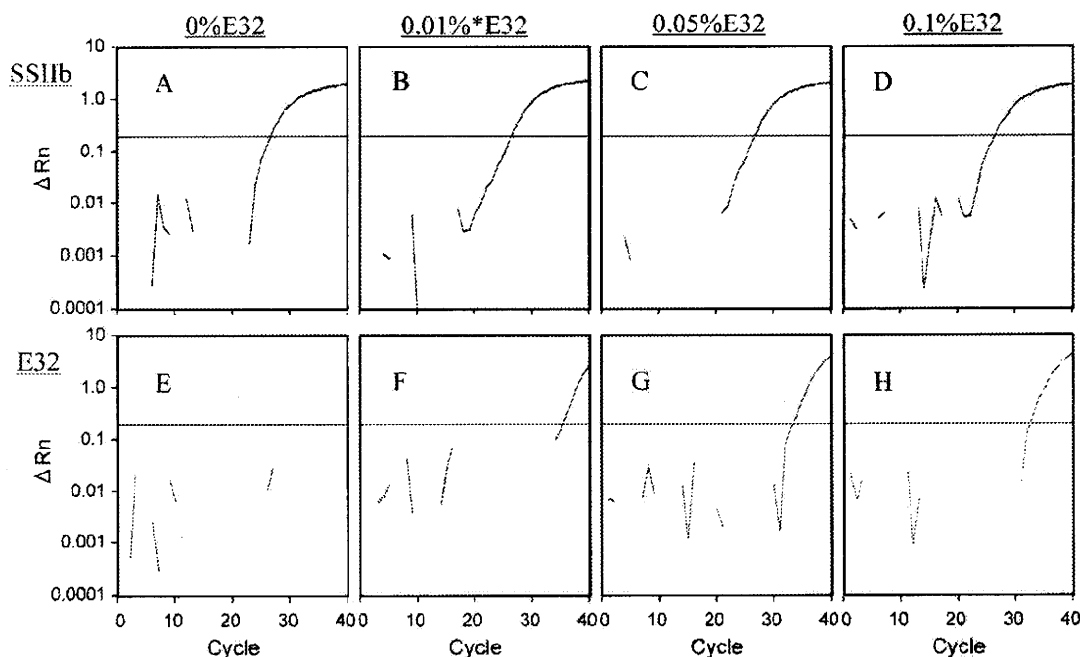


Fig. 1. Representative amplification plot curves of all the samples, obtained on AP7900 instruments

A: SSIIB detection for 0% E32 maize sample (non-GM), B: SSIIB detection for 0.01% E32 DNA solution, C: SSIIB detection for 0.05% E32 maize sample, D: SSIIB detection for 0.1% E32 maize sample, E: event-specific detection for 0% E32 maize sample (non-GM), F: event-specific detection for 0.01% E32 DNA solution, G: event-specific detection for 0.05% E32 maize sample, H: event-specific detection for 0.1% E32 maize sample.

Table 3. Summary of the results of all unknown samples

Real-time PCR instrument	Laboratory	Primer pair and probe	SSIIB 3-5'/SSIIB 3-3'/SSIIB-Taq				32f/32r/32 probe									
			Content %	0%	0.01%*	0.05%	0.10%	0%	0.01%*	0.05%	0.10%					
7900	A		+/+ ^{c)} / +/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/- ^{b)} / -/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	B		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	C		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
7500	D		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	E		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
7700	F		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	G		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
	H		+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

a) +: positive reaction

b) -: negative reaction

c) +/+, +/- and -/- show the results in duplicate reactions for each sample.

* 0.01% means 0.01% E32 DNA solution.

Results and Discussion

In-house validation and homogeneity of the test materials

We assessed the reliability of this detection method for E32 maize using mixed known samples fortified with E32 and three different types of real-time PCR instruments, AP7900, AP7700 and AP7500.

First, we confirmed that all three different types of real-time PCR instruments used in the study showed the characteristics expected for PCR amplification plots with pure E32 positive control samples (data not shown). Figure 1 shows examples of AP7900 amplification plots of all the samples used in the study. As anticipated, the SSIIb was detected in all samples, while

the E32 target sequence was detected in all samples except the non-GM maize sample. This suggests that the relative limit of detection (LOD) is approximately 0.01% in 20 ng of genomic DNA.

In terms of homogeneity of the fortified samples, Table 2 shows the average Ct value, the relative standard deviation (RSD) calculated from s_s (SD of sampling) and s_a (SD of analysis) as well as the F -ratios. The F -ratios of the homogeneity test at 0.05% and 0.1% were 1.1 and 0.98, respectively. The critical value of F was 3.02. Therefore, we concluded that the homogeneity of both test samples was acceptable for the inter-laboratory evaluation, because both F -ratios were lower than the critical F .

Table 4. Analysis of the results of inter-laboratory study

A	Primer pair and probe	SSIIb 3-5'/SSIIb 3-3'/SSIIb-Taq			
	No. of laboratories	8			
	No. of laboratories that have been evaluated	8			
	No. of samples/laboratory	8			
	No. of total samples	64			
	No. of total reactions	128			
	No. of accepted reactions	128			
	No. of samples containing target detection material	64			
	Target detection material content (w/w) %	0%	0.01%*	0.05%	0.10%
	No. of reactions	32	32	32	32
	No. of positive reactions	32	32	32	32
	No. of negative reactions	0	0	0	0
	Positive reaction ratio, %	100	100	100	100
	False-negative, %	0	0	0	0
B	Primer pair and probe	32f/32r/32 probe			
	No. of laboratories	8			
	No. of laboratories that have been evaluated	8			
	No. of samples/laboratory	8			
	No. of total samples	64			
	No. of total reactions	128			
	No. of accepted reactions	128			
	No. of samples containing target detection material	48			
	Target detection material content (w/w) %	0%	0.01% ^a *	0.05% ^b	0.10%
	No. of reactions	32	32	32	32
	No. of positive reactions	0	31	32	32
	No. of negative reactions	32	1	0	0
	Positive reaction ratio, %	0	96.9	100	100
	False-negative, %	0	3.1	0	0

A: detection of the SSIIb

B: event-specific detection of E32 maize

* 0.01% means 0.01% E32 DNA solution

Inter-laboratory study

Eight laboratories took part in the inter-laboratory study. The laboratories have the three different real-time PCR instruments. Three laboratories have AP7700 instruments, another three laboratories have AP7900 instruments and the other two laboratories used AP 7500. Table 3 shows a summary of the results of all unknown samples and Table 4 shows an analysis of the results of the inter-laboratory study. The positive reaction rate and negative reaction rate were calculated from the 32 repetitions for each sample reaction.

For the SSIIB detection, the positive reaction rates of 0.1 (w/w), 0.05 (w/w), 0.01% (DNA solution) and 0% (w/w) samples were 100, 100, 100, and 100%, respectively (Table 4A).

For the event-specific detection of E32 maize, the positive reaction rates of 0.1, 0.05, and 0.01% samples were 100, 100 and 96.9%, respectively (Table 4B). Only laboratory B included a negative reaction in duplicate reactions for one of the two samples of 0.01% E32 DNA solution; although the negative reaction was amplified the Ct value was over 38 (38.54). This result suggests that the LOD of the method appears to be close to 0.01% E32 maize between 0.01% and 0.05%. False positive results for E32 maize were not observed.

Many validation studies have been performed and are still ongoing, based on European Regulation [(EC) NO. 1829/2003]. But almost all studies are only based on genomic DNA as the sample, omitting the DNA extraction step. Therefore, direct comparison of our results with those from the previous studies is not possible. However, for practical reasons, it is very important to know the overall uncertainty of the method. Therefore, inter-laboratory studies including the DNA extraction step are of high relevance.

Conclusions

The results obtained in this study demonstrated that this real-time PCR detection method for E32 maize is suitable for enforcement purposes with respect to its inter-laboratory reproducibility and transferability. The inter-laboratory study including the DNA extraction step was conducted in close adherence to internationally accepted guidelines for collaborative trials. In practical terms, this method could be readily adopted by the various laboratories. This real-time PCR detection method has an LOD of approximately 0.01% E32 maize. It provides a precise and reliable tool for the event-specific detection of E32 maize. This proposed test is able to accurately monitor E32 contamination in maize samples and is therefore an appropriate tool to implement Japanese regulatory requirements concerning unauthorized biotechnology products.

Acknowledgements

We thank the following collaborators for participating in the inter-laboratory study: Mr. H. Asaki, Mr. T. Kusama, Mr. T. Yoshida, Mr. H. Hashimoto (Food and Agricultural Materials Inspection Center, Japan), Mr. T.

Takahashi (Yokohama Plant Protection Station, Japan), Mr. T. Suzuki and Ms. A. Ogawa (Yokohama quarantine station, Japan), Mr. K. Takagi and Mr. T. Yamagishi (Kobe quarantine station, Japan). We would like to thank Dow AgroSciences LLC for providing E32 maize. We also thank Dr. S. Futo and Mr. H. Haraguchi (FASMAC Co., Ltd., Atsugi, Japan) for the useful suggestions. This study was supported by Health and Labour Science Research Grants for Research on Food Safety from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- 1) James, C. ISAAA Briefs 2008, **39** (2008).
- 2) Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Off. J. Eur. Commun. L268: 1-23.
- 3) Regulation (EC) No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Off. J. Eur. Commun. L268: 24-28.
- 4) Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Sebata, T., Issiniki, K., Toyoda, M., Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 149-157 (1999).
- 5) Matsuoka, T., Kuribara, H., Suefuji, Y., Miura, H., Akiyama, H., Kusakabe, Y., Goda, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, 197-201 (2001).
- 6) Goda, Y., Asano, T., Shibuya, M., Hino, A., Toyoda, M. Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **42**, 231-236 (2001).
- 7) Akiyama, H., Sugimoto, K., Matsumoto, M., Isuzugawa, K., Shibuya, M., Goda, Y., Toyoda, M. A detection method for recombinant DNA from genetically modified potato (NewLeaf Pluspotato) in snacks. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 24-29 (2002).
- 8) Akiyama, H., Watanabe, T., Wakui, C., Chiba, Y., Shibuya, M., Goda, Y., Toyoda, M. A detection method for recombinant DNA from genetically modified potato (NewLeaf Y potato). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **43**, 301-305 (2002).
- 9) Matsuoka, T., Kuribara, H., Takubo, K., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2100-2109 (2002).
- 10) Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T. A histochemical method using a substrate of beta-glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **45**, 19-24 (2005).
- 11) Kikuchi, H., Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T. Laboratory-

- performance study of the notified methods to detect genetically modified papaya (55-1). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 21-27 (2005).
- 12) Yamaguchi, A., Shimizu, K., Mishima, T., Aoki, N., Hattori, H., Sato, H., Ueda, N., Watanabe, T., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T. Detection method for genetically modified papaya using duplex PCR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 146-150 (2006).
- 13) Akiyama, H., Watanabe, T., Kikuchi, H., Sakata, K., Tokishita, S., Hayashi, Y., Hino, A., Teshima, R., Sawada, J., Maitani, T. A detection method of CryIAC protein for identifying genetically modified rice using the lateral flow strip assay. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **47**, 111-114 (2006).
- 14) Watanabe, T., Shiramasa, Y., Furui, S., Kitta, K., Minegishi, Y., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of qualitative detection methods for unapproved genetically modified rice (LLRice) *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, 170-178 (2007).
- 15) Watanabe, T., Tokishita, S., Spiegelhalter, F., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Matsuda, R., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of event-specific qualitative PCR methods for genetically modified Bt10 maize. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1274-1279 (2007).
- 16) Akiyama, H., Sasaki, N., Sakata, K., Ohmori, K., Toyota, A., Kikuchi, Y., Watanabe, T., Furui, S., Kitta, K., Maitani, T. Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5942-5947 (2007).
- 17) Akiyama, H., Watanabe, T., Wakabayashi, K., Nakade, S., Yasui, S., Sakata, K., Chiba, R., Spiegelhalter, F., Hino, A., Maitani, T. Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Anal. Chem.*, **77**, 7421-7428 (2005).
- 18) Akiyama, H., Sakata, K., Kondo, K., Tanaka, A., Liu, M. S., Oguchi, T., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Teshima, R. Individual detection of genetically modified maize varieties in non-identity-preserved maize samples. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1977-1983 (2008).
- 19) Thompson, M., Wood, R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. *J. AOAC Int.*, **76**, 926-940 (1993).
- 20) Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 22 年度

研究成果の刊行物・別刷

学会発表

GC/MS/MS を用いた加工食品中の残留農薬の一斉分析法の検討

—農産物を主原料とした加工食品を中心に—

北川陽子、起橋雅浩、高取 聡、福井直樹、

中辻直人、小阪田正和、柿本幸子、尾花裕孝

(大阪府立公衆衛生研究所)

1. はじめに

平成20年初頭に発覚した「冷凍餃子への有機リン系農薬混入事件」を契機に、消費者の加工食品に対する不安が高まり、加工食品中の残留農薬分析が重要視されるようになった。加工食品は生鮮食品以外の全ての食品が該当するため、全ての加工食品を単一の分析法で網羅することは困難である。加工食品中の残留農薬を精度よく分析するためには、図1に示すように加工食品を系統的に分類し、その分類に応じた分析法を開発することが重要である。

我々はこれまでに、餃子など高脂質食品を対象とした分析法を構築した¹⁻³⁾。さらに、LC/MS/MSで測定可能な農薬に重点をおき、農産物を主原料とした低脂質加工食品を対象とした分析法の検討を行い、昨年⁴⁾の第46回全国衛生化学技術協議会年会で報告した⁴⁾。本研究では、昨年と同じ低脂質加工食品を対象に、GC/MS/MSで分析可能な農薬について検討したので報告する。

2. 方法

2-1) 評価対象農薬、試料及び添加回収試験

GC/MS/MSで分析可能な291項目（塩素系農薬、含窒素系農薬、有機リン系農薬、ピレスロイド系農薬等）を評価対象農薬として検討を行った。これら農薬の混合標準溶液を調製し、アセトンで希釈したものを添加回収試験及び検量線の作成に用いた。

添加回収試験は、低脂質加工食品を対象とし、図1に示した5種類の試料（マーマレード、レーズン、キムチ、梅干し、ウスターソース）について検討を行った。各試料について2濃度の添加濃度（20及び100 ng/g）の回収試験を行い、GC/MS/MSで測定を行った（試行数5）。

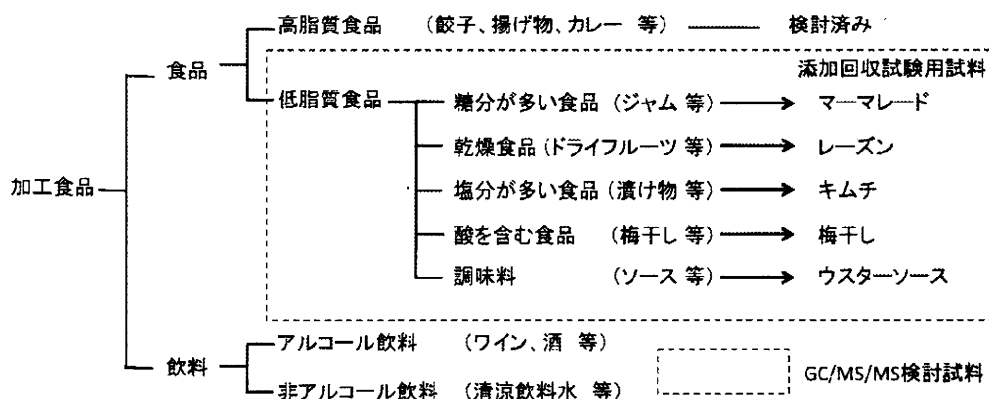


図1 加工食品の系統的分類