

表12 共同試験試料からのDNA抽出結果

基材	試料	抽出 番号	DNA試料原液 のDNA濃度 <sup>a)</sup> (ng/ $\mu$ L)	O.D.260/280	DNA収量 ( $\mu$ g)	DNA試料液 のDNA濃度 (ng/ $\mu$ L)	希釈倍率	
							個別	平均
ホワイト ソース	試料1 (カニ)	1	27	1.80	5.4	27	1	1
		2	27	1.80	5.4	27	1	
		3	29	1.71	5.8	29	1	
	試料2 (エビ)	1	31	1.82	6.2	31	1	1
		2	29	1.61	5.8	29	1	
		3	29	1.71	5.8	29	1	
	試料3	1	36	1.80	7.2	36	1	1
		2	40	1.74	8.0	40	1	
		3	37	1.76	7.4	37	1	
ハンペン	試料4	1	246	1.88	49	21	12	10
		2	150	1.83	30	21	7	
		3	230	1.89	46	19	12	
	試料5 (カニ)	1	234	1.87	47	20	12	12
		2	239	1.88	48	20	12	
		3	228	1.88	46	19	12	
ブロッコ リー	試料6 (エビ)	1	699	1.82	140	20	35	35
		2	662	1.82	132	20	33	
		3	713	1.82	143	20	36	
	試料7	1	749	1.95	150	20	37	35
		2	705	1.94	141	20	35	
		3	659	1.93	132	20	33	
	試料8 (エビ)	1	654	1.82	131	20	33	35
		2	707	1.82	141	20	35	
		3	725	1.82	145	20	36	

a) 200  $\mu$ L の水に溶解

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	秦野研究所	所長
分担研究者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所	室長
協力研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所	食品添加物部	部長
	笠間 菊子	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員
	小熊 恭代	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員

研究要旨

改正通知法による遺伝子組換え米を検査対象とした外部精度管理調査を実施するため、63Bt コメ DNA 溶液および CpTI プラスミド溶液を用いて調査試料の調製を検討した。調製試料について均一性試験を実施した結果、いずれも想定どおり正しく検出され、Ct 値の再現性も良好だった。この試料について、陽性対照プラスミドと試料の Ct 値から 50 ng DNA (PCR 1 反応分)あたりの害虫抵抗性遺伝子のコピー数を推定した結果、試料 A は 7.6 コピー、試料 B は 84.2 コピー、試料 D は 49.2 コピーを含むと算出された。

陽性対照プラスミドを用いて改正通知法における害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用の各検出系の検出下限(コピー数)を検討した。その結果、63Bt コメ検出用試験は 6.25 コピー、NNBt コメ検出用試験および CpTI コメ検出用試験では 12.5 コピーで、改正前の通知法に比べ、63Bt コメ検出用試験、NNBt コメ検出用試験共に検出感度が上昇したと考えられた。

定性試験による外部精度管理調査の結果をより詳細に検討することを目的として、リアルタイム PCR で得られる Ct 値の統計解析を試みた。外部精度管理調査の際、Th.line を指定して収集した参加機関における Ct 値のデータについて正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成し、グラフを検討した。その結果、63Bt 検出用試験においては正規分布に近い形状が得られ、Ct 値の統計解析結果から参加機関の測定精度を推定できる可能性が示唆された。

A. 研究の目的

遺伝子組換え食品の検査は、各都道府県の衛生研究所および登録検査機関等で広く

実施されている。我々はこれらの検査機関における遺伝子組換え食品検査の信頼性の確保および向上を目的として、外部精度管理調

査を実施してきた。平成 22 年度は遺伝子組換えコメの検知法が改正(食安監発 0106 第 6 号、平成 23 年 1 月 6 日、以下改正通知法とする)されたのを受け、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ(63Bt コメ、NNBt コメおよび CpTI コメ)を対象として外部精度管理調査を行った。

遺伝子組換えコメを対象とした外部精度管理調査は平成 19 年度にも実施した。前回は中国産安全性未審査遺伝子組換え米は全く入手できなかったため、63Bt コメ、NNBt コメの DNA 配列を含む陽性プラスミドの検出下限を検討後、陽性プラスミドを nonGM コメ DNA 溶液で希釈して精度管理試料を作製した。今回は国立医薬品食品衛生研究所から供与された 63Bt コメを含む原料から抽出した DNA 溶液(以下 63Bt コメ DNA 溶液とする)および CpTI コメの DNA 配列を含むプラスミド溶液(以下 CpTI プラスミド溶液とする)を前回同様 nonGM コメ DNA 溶液で希釈して精度管理試料を作製することとした。このためまず、63Bt コメ DNA 溶液および CpTI プラスミド溶液を nonGM コメ DNA 溶液で段階希釈して対応する害虫抵抗性コメ検出用試験で測定し、精度管理試料の調製濃度(希釈率)を検討した。また陽性対照プラスミドと試料の測定結果の Ct 値から、調製した精度管理試料および 63Bt コメ DNA 溶液が含む害虫抵抗性遺伝子のコピー数を推定した。さらに、陽性対照プラスミドを希釈して測定し、改正通知法における各検出系の検出感度を検討し、旧通知法の感度と比較した。

改正通知法は定性試験ではあるもののリアルタイム PCR 法による試験であるため、増幅が認められた測定においては Th.line を設定することにより Ct 値(増幅曲線が Th.line と交わるサイクル数)を求めることができる。Th.line

上の Ct 値は初期鋳型量に比例するが、外部精度管理は共通試料の分析であるため、Th.line を同じ値に設定した場合、Ct 値は一定になると考えられた。このため、外部精度管理の際にあらかじめ Th.line を指定し、参加機関における Ct 値のデータを収集した。この値に対して定量試験の外部精度管理で用いる統計手法を適用し、定性試験による外部精度管理結果をより詳細に解析できないか検討した。

## B. 研究方法

### 1. DNA 試料

63Bt コメ DNA 溶液および CpTI プラスミド溶液はいずれも国立医薬品食品衛生研究所から供与を受け使用した。

また、あらかじめ害虫抵抗性遺伝子組換えコメを含まないことを確認した米粉から GM quicker2(ニッポンジーン)を使用し改正通知法のプロトコールに従って DNA 溶液を抽出し、nonGM コメ DNA 溶液とした。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。

### 2. リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は改正通知法に従い、コメ陽性対照用試験はコメ陽性対照用プライマー対(KVM159 および KVM160)およびコメ陽性対照用プローブ(TM013)、63Bt コメ検出用試験は Bt コメ検出用プライマー対(T51-SF および OsNOS-R2)、および 63Bt コメ検出用プローブ(GM63-Taq)、NNBt コメ検出用試験は Bt コメ検出用プライマー対(T51-SF および OsNOS-R2)、および NNBt コメ検出用プローブ

ブ(NGMr-Taq)、CpTI コメ検出用試験は CpTI コメ検出用プライマー対 (CpTi-1F および CpTi-1R)、および CpTI コメ検出用プローブ (CpTi-P) 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 Life Technologies Japan) を使用した。リアルタイム PCR の結果は指数関数的な増幅が観察された場合、Th.line を 0.2 から 0.5 に設定して Ct 値を求め、38 未満の Ct 値が得られた場合、陽性と判定した。

### 3. 各種試料のコピー数の推定

各試料の害虫抵抗性遺伝子のコピー数は陽性対照プラスミドのコピー数を 500、増幅率を 2 と仮定し、同じプレートで測定したリアルタイム PCR における試料と陽性対照プラスミドの Ct 値の差から計算した。また、陽性対照プラスミドの段階希釈液の測定結果から、63Bt コメ、CpTI コメ、コメ陽性対照用の各検出系の検量線を作成し、これに別プレートで得られた Ct 値を代入する方法によっても計算した。

### 4. 外部精度管理調査結果のまとめ

外部精度管理調査のリアルタイム PCR 結果は、試料および検出系に分けてまとめ、試料ごとに正答率を算出した。

また、外部精度管理調査の際あらかじめ Th.line を 0.2 および 0.5 に指定し、各測定における Ct 値のデータを収集した。そのうち試料 A、試料 B、試料 D の害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験の Ct 値およびこの値と陽性対照プラスミドの Ct 値との差について正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成し、リアルタイム PCR 法による定性試験の結果の評価法について検討した。

## C. D. 結果および考察

### 1. 1 外部精度管理調査試料調製

外部精度管理調査試料調製に先立ち、63Bt コメ DNA 溶液を nonGM コメ DNA 溶液で段階希釈して 63Bt コメ検出用試験を行い、増幅の有無を検討した (表 1)。その結果 1600 倍希釈まで全ての反応で増幅が確認されたが Ct 値および増幅曲線についても検討を加えた結果、希釈率が 100 倍以上では Ct 値のバラツキが大きいことおよび増幅曲線の安定性も良くないことがわかった。一方、供与された 63Bt コメ DNA 溶液の量には限りがあるため、増幅曲線が安定し Ct 値の再現性が期待できる 10 倍希釈液および増幅曲線の安定性、Ct 値の再現性は期待できないが、陽性の判定は十分期待できる 100 倍希釈液を調製することとし、10 倍希釈液を試料 B (63Bt 高濃度)、100 倍希釈を試料 A (63Bt 低濃度) とした。次に CpTI プラスミド溶液を Ct 値が試料 A と同程度となるよう nonGM コメ DNA 溶液により希釈し、試料 D とした。さらに、nonGM コメ DNA 溶液を試料 C とした。

調製した各試料について均一性試験を実施した。その結果、コメ陽性対照用試験では全試料の全測定で陽性となったほか、試料 A の 63Bt コメ検出用試験、試料 B の 63Bt コメ検出用試験、試料 D の CpTI コメ検出用試験の全測定で陽性の結果が得られた。また、これ以外に陽性となった測定はなかった。表 2 に均一性試験で得られた Ct 値の平均および標準偏差を示したが、いずれも再現性は良好であり、予定どおり試料が調製できたものと考えられた。

### 1. 2 63Bt コメ DNA 溶液および調製した各試料のコピー数の推定

陽性対照プラスミドと試料の Ct 値から、各

精度管理試料の PCR 1 反応液あたり(50 ng DNA)の害虫抵抗性遺伝子のコピー数を推定した。

試料 A、試料 B、陽性対照プラスミドの 63Bt コメ検出用試験の測定において、Th.line を指数増幅部に設定してそれぞれ Ct 値を求め、試料と陽性対照プラスミドの差を n とした。次にリアルタイム PCR の増幅率を 2 と仮定して、 $2^n$  を陽性対照プラスミドと試料のコピー数の相対値とし、相対値に陽性対照プラスミドのコピー数 500 を乗じ、試料のコピー数とした。その結果、試料 A は 7.6 コピー、試料 B は 84.2 コピーの組換え遺伝子を含むと算出された(表 3)。また、試料 D についても CpTI コメ検出用試験の結果から同様にしてコピー数を推定したところ、49.4 コピーとなった。

250K の陽性対照プラスミド(非売品)を段階希釈して測定し、63Bt コメ検出用試験、CpTI コメ検出用試験、コメ陽性対照用試験のそれぞれについて検量線を作成した。これに別プレートによる測定で得られた Ct 値を代入し、試料 A、試料 B、63Bt コメ DNA 溶液の 63Bt 遺伝子のコピー数、試料 D の CpTI 遺伝子のコピー数、および 63Bt コメ DNA 溶液のコメ陽性対照用遺伝子(PLD)のコピー数を求めた(表 4)。その結果、63Bt 遺伝子のコピー数は試料 A では 11.6 コピー、試料 B は 103 コピー、試料 D の CpTI 遺伝子では 45.5 コピーと算出された。これらの値は表 3 に示した陽性対照プラスミドとの Ct 値の差から計算したコピー数と近似していた。また、63Bt コメ DNA 溶液の 63Bt コメ遺伝子のコピー数は 1093 コピー、コメ陽性対照用遺伝子のコピー数は 69110 コピーと計算された。さらに 63Bt コメにおける組換え DNA 配列と内在性遺伝子の存在比を 1:1 と仮定し、抽出原料の組換え米混入率を計算

した結果、1.58%となった。

### 1.3 陽性プラスミドを用いた検出下限の検討

改正通知法における害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用の各検出系の検出下限(コピー数)を陽性対照プラスミドを用いて検討した。陽性対照プラスミドを nonGM コメ DNA 溶液で段階希釈し、害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用 3 試験をそれぞれ 8 並行で測定し、実施した全ての反応で陽性と判定された最低濃度を検出下限とした。その結果、検出下限は 63Bt コメ検出用試験が 6.25 コピー、NNBt コメ検出用試験および CpTI コメ検出用試験が 12.5 コピーとなり、検出系による差はほとんどなかった(表 5)。この結果は平成 20 年度に報告したリアルタイム PCR によるコメ最終確認試験の検出下限の 63Bt コメ検出用試験 750 コピー、NNBt コメ検出用試験 80 コピーに比べいずれも検出感度が上昇し、特に 63Bt コメ検出用試験で顕著だった。この原因としては、旧検知法では 63Bt コメ検出用試験と NNBt コメ検出用試験はプライマーを共用した Duplex PCR であったのに対し、改正通知法は 63Bt コメ検出用試験と NNBt コメ検出用試験をそれぞれ別の反応液で実施するようになったこと、NNBt コメ検出用試験に用いるプローブの蛍光色素が VIC (HEX) から FAM に変更されたこと、使用した陽性対照プラスミドが前回とは違うものであること、陽性判定の基準が変更になったことなどが影響していると考えられた。

### 2 外部精度管理結果の解析

外部精度管理の結果をまとめて表 6 に示したが、害虫抵抗性遺伝子組換えコメの検出に関しては全試料について全機関が正しく判定した。

一般に定性試験の検出下限付近の測定で

は、検出の有無は確率の問題となるため、結果を正しく判断するためには繰り返しの数を多くする必要がある。しかし、通知法には繰り返しの数が指定されており、外部精度管理調査では試料の濃度を検出下限付近に設定すると陰性だった場合、結果の解釈が難しくなると考えられた。本年度作製した試料は検出下限付近の濃度設定を避け、低濃度試料でも検出下限の 10 倍以上の濃度としたため、組換え遺伝子の検出に関しては難易度が低い試料となった。この結果、正答率は全試料とも 100%となり、参加機関における測定精度は確認できなかった。

改正通知法は定性試験ではあるもののリアルタイム PCR による試験であるため、増幅が認められた測定においては増幅曲線に Th.line を設定することにより Ct 値を求めることができる。また、DNA 溶液試料においては DNA 抽出および濃度調整の操作が含まれないため PCR 反応液に含まれる鋳型の量には機関間差が生じにくく、Ct 値はほぼ一定になると予想された。このため外部精度管理調査の際あらかじめ Th.line を 0.2 および 0.5 に指定して収集した参加機関における Ct 値のデータについて以下の解析を行った。まず、参加機関の増幅曲線について検出系ごとに検討した結果、63Bt コメ検出用試験では Th.line 0.2、CpTI コメ検出用試験では Th.line 0.5 が指数増幅域の中央により近いと考えられた。このため 63Bt コメ検出用試験では Th.line 0.2 における Ct 値を、また CpTI コメ検出用試験では Th.line 0.5 の Ct 値を使用して解析することにし、参加機関の Ct 値をまとめて表 7 および表 8 に示した。次にこれらの Ct 値について正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成し、グラフの形状を検討した。試料 A および

試料 B の 63Bt コメ検出用試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示していた(図 1、2)。試料 A で z-スコアが 2 を超えた機関番号 6 はリアルタイム PCR 装置に ABI7700 を使用しており、増幅曲線を確認したところベースラインの継続的増加が認められた。ベースラインの増加分は増幅による蛍光増加分から差し引かれるため、蛍光の増加が緩やかになり、Ct 値が大きくなったと考えられた。また、試料 B で z-スコアが 2 を超えた機関番号 17 は 63Bt 検出用試験の増幅曲線が波打って安定しないため、Ct 値の再現性が悪いこともあり、Ct 値が大きくなったものと考えられ、リアルタイム PCR 測定装置の点検および整備が必要と考えられた。一方同じく z-スコアが 2 を超えた機関番号 15 では特に問題は認められなかった。機関番号 31 は試料 A および試料 B で z-スコアが -2 以下となった。リアルタイム PCR による定性試験では Ct 値が小さいほど検出感度が良いことを示すので、組換え遺伝子の検出に関しては問題がないと考えられるが、同じ 63Bt コメ検出用試験で 2 試料とも他の機関と比べて Ct 値が小さいため、測定の際何らかの誤りがあった可能性も考えられた。

一方、試料 D の CpTI コメ検出用試験では正規確率プロットを作成した結果、正規分布から大きくはずれた値(図 3 の黒丸)が認められた。このため、2 シグマ処理(z-スコアの絶対値が 2 以上のデータを除く操作)を 2 回実施した。この結果、試料 D の正規確率プロットはひずみ、とがりが小さくなり、正規分布に近い形状となった(図 4)。CpTI コメ検出用試験の増幅曲線を確認した結果、正規分布を大きくはずれた機関のうち機関番号 20、22、31 は反応がプラトーに達した時の蛍光強度が他の

機関に比べて約 10 倍小さいため、Th.line 0.5 では指数増幅領域をはずれており、Ct 値が大きくなったものと考えられた。さらにこれら 3 機関の CpTI コメ検出用試験結果の蛍光コンポーネントを検討した結果、いずれも CpTI コメ検出用プローブに由来する FAM の初期値が低いことが観察され、PCR 反応液に加えるプライマー・プローブミックスの量を誤った可能性が高いことが分かった。また、機関番号 6 は試料 A の結果でも述べたが測定機器の性能に依存して Ct 値が大きくなった可能性が考えられた。

以上述べたように、得られた Ct 値をそのまま統計解析した場合、Ct 値は測定機器の特性や整備状況に依存した誤差を含むものと考えられた。この誤差を補正することを目的として陽性対照プラスミドと試料の Ct 値の差を算出し(表 7、表 8)、この差について正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成して解析した(図 5~8)。その結果、試料 A および試料 B の 63Bt コメ検出用試験では正規確率プロットの形状はほとんど変化がなく、陽性対照プラスミドによる補正の効果は認められなかった。また、CpTI コメ検出用試験でも正規確率プロットの形状は若干の改善に留まり、補正の効果は明確ではなかった。

以上の結果から、定性試験の測定法がリアルタイム PCR 法の場合、あらかじめ Th.line を指数増幅領域に指定し、収集した Ct 値を解析することにより、外部精度管理参加機関における測定精度をより詳しく推定できると考えられた。また、DNA 抽出も含めたリアルタイム PCR 法による定性試験の Ct 値を解析する場合は、PCR 反応液に含まれる鋳型の量が機関によってばらつくことが予想されるため、組換え遺伝子の測定における Ct 値と陽性対照

用遺伝子の測定における Ct 値の差をとるなどの補正が必要となる可能性も考えられた。

## E. 結論

### 1. 外部精度管理調査試料の調製

害虫抵抗性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、調査試料の調製を検討し、作製試料について均一性試験を実施した。その結果、いずれも想定通り正しく検出され、また Ct 値の再現性も良好だったことから、計画どおり試料が調製できたものと考えられた。また、陽性対照プラスミドと試料の Ct 値から、各精度管理試料について 1 反応あたりの害虫抵抗性遺伝子のコピー数を推定した結果、試料 A は 7.6 コピー、試料 B は 84.2 コピーの試料 D は 49.4 コピーの組換え遺伝子を含むと算出された。

改正通知法の害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用の各検出系の検出下限(コピー数)を陽性対照プラスミドを用いて検討した。その結果、63Bt コメ検出用試験は 6.25 コピー、NNBt コメ検出用試験および CpTI コメ検出用試験では 12.5 コピーとなり、63Bt コメおよび NNBt コメ検出用試験の検出感度が旧検知法に比べて上昇したほか、検出系による感度の差も無くなったことが明らかになった。

### 2. 外部精度管理結果の解析

外部精度管理調査の際に Th.line を指定して収集した参加機関における Ct 値のデータについて正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成し、グラフの形状を検討した。その結果、試料 A および試料 B の 63Bt コメ検出用試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。この時、z-スコアが 2 以上となった機関のうちいくつかからは、Ct 値がはずれた原

因が推定でき、Ct 値の解析により、外部精度管理参加機関における測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。一方、試料 D の CpTI コメ検出用試験では正規確率プロットを作成した結果、正規分布から大きくはずれた値が認められた。測定結果を詳細に検討した結果、正規分布を大きくはずれた機関のうち 3 機関はプローブに由来する FAM の蛍光初期値が低いことが観察され、反応液の調製を誤った可能性が高いと推察された。なお試料 D の正規確率プロットは、2 シグマ処理を 2 回実施後、正規分布に近いグラフとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akiyama H., Sakata K., Makiyama D., Nakamura K., Teshima R., Nakashima A., Ogawa A., Yamagishi T., Futo S., Mano J., Oguchi T., Kitta K., Inter-laboratory Validation Study of Individual Kernel Detection Method for Genetically Modified Maize, *J AOAC Int.*, 94, 1540-1547 (2011).
- 2) Takabatake R., Akiyama H., Sakata K., Onishi M., Koiwa T., Futo S., Minegishi Y., Teshima R., Furui S., Kitta K., Development and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean A2704-12, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 52, 100-107 (2011).
- 3) Taguchi H., Watanabe S., Tenmei Y., Hirao T., Akiyama H., Sakai S., Adachi R., Sakata K., Urisu A., Teshima R., Differential detection of shrimp and crab for food labeling using polymerase chain reaction, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3510-3519 (2011).
- 4) Sakai Y., Kotoura S., Yano T., Kurihara T., Uchida K., Miake K., Akiyama H., Tanabe S., Quantification of pork, chicken and beef by using a novel reference molecule. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75, 1639-1643 (2011).
- 5) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R., Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain, *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 1648-1651 (2011).
- 6) Takabatake R., Koiwa T., Kasahara M., Takashima K., Futo S., Minegishi Y., Akiyama H., Teshima R., Oguchi T., Mano J., Furui S., Kitta K., Interlaboratory validation of quantitative duplex real-time PCR method for screening analysis of genetically modified maize, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 52, 265-269 (2011).
- 7) Mano J, Yanaka Y, Ikezu Y, Onishi M, Futo S, Minegishi Y, Ninomiya K, Yotsuyanagi Y, Spiegelhalter F, Akiyama H, Teshima R, Hino A, Naito S, Koiwa T, Takabatake R, Furui S, Kitta K. Practicable group testing method to evaluate weight/weight GMO content in



maize grains. *J. Agric. Food Chem*, 59,  
6856-6863 (2011)

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

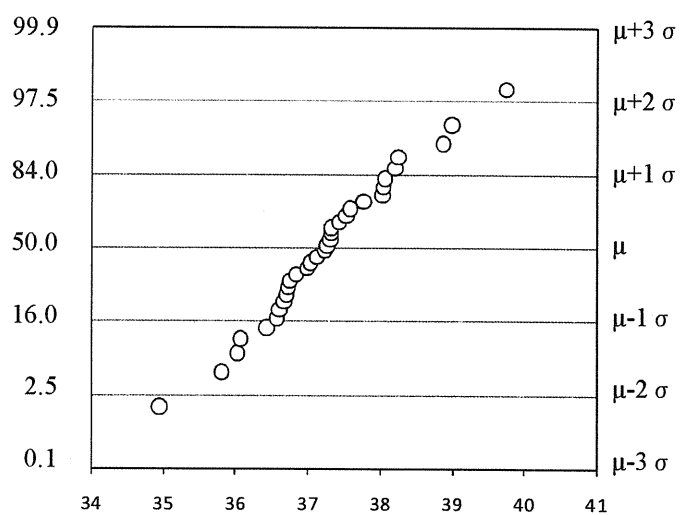
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	32
最小値	34.945
最大値	39.745
平均値	37.257
標準偏差	0.975
ひずみ	0.277
とがり	0.832

Ct 値の Z スコア

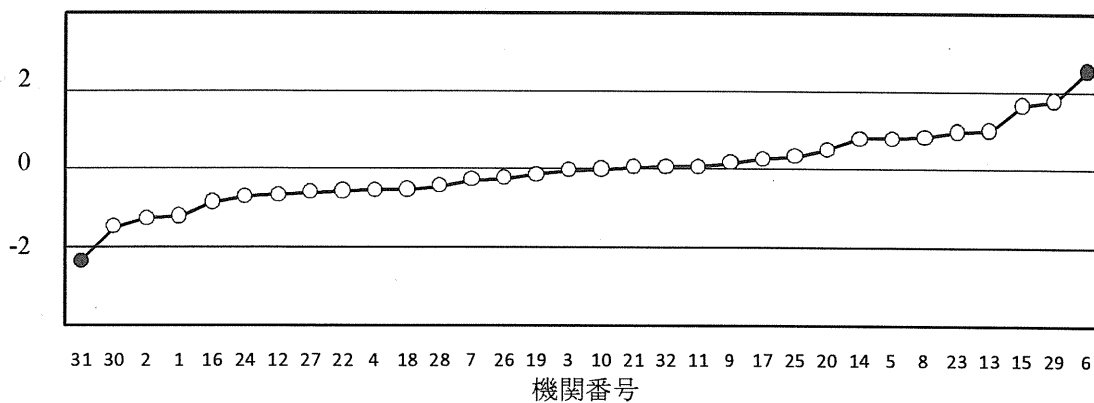
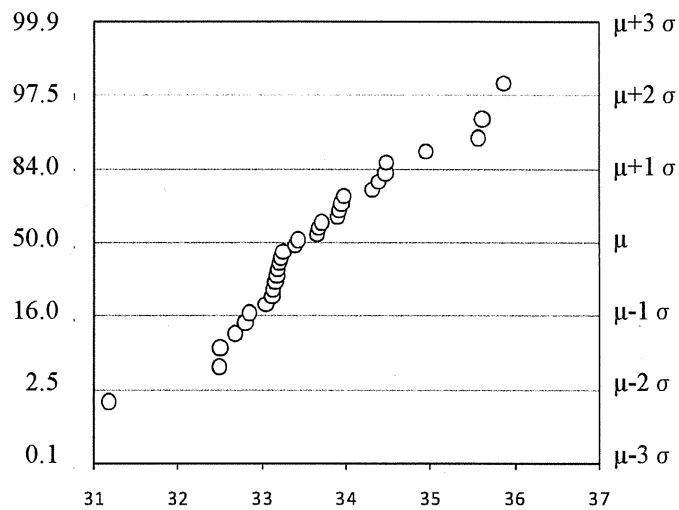


図 1 試料 A の 63Bt 検出用試験における Ct 値の解析

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	32
最小値	31.185
最大値	35.873
平均値	33.634
標準偏差	0.986
ひずみ	0.362
とがり	0.854

Ct 値の Z スコア

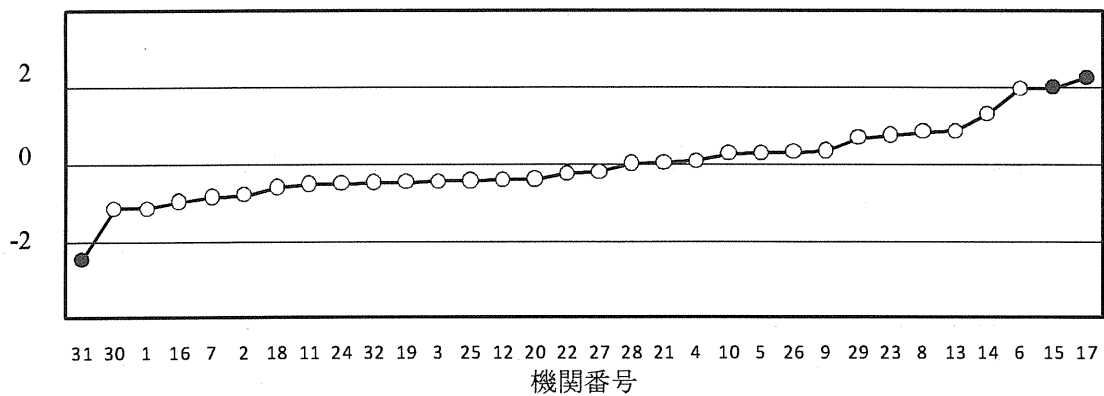
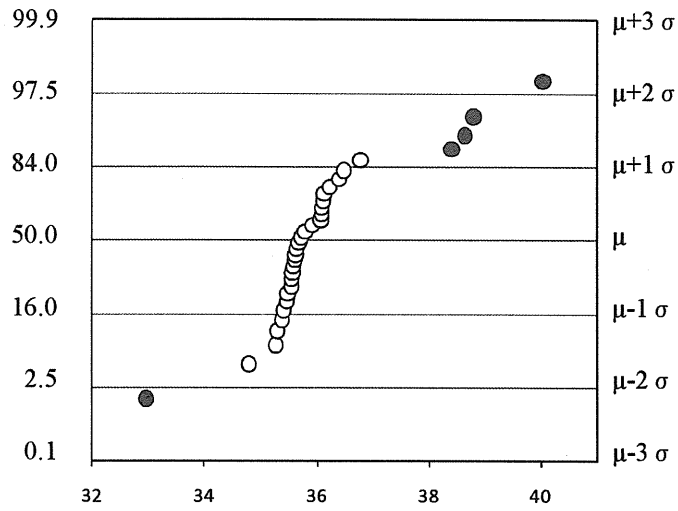


図 2 試料 B の 63Bt 検出用試験における Ct 値の解析

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	32
最小値	32.980
最大値	40.050
平均値	36.091
標準偏差	1.298
ひずみ	1.207
とがり	3.194

Ct 値の Z スコア

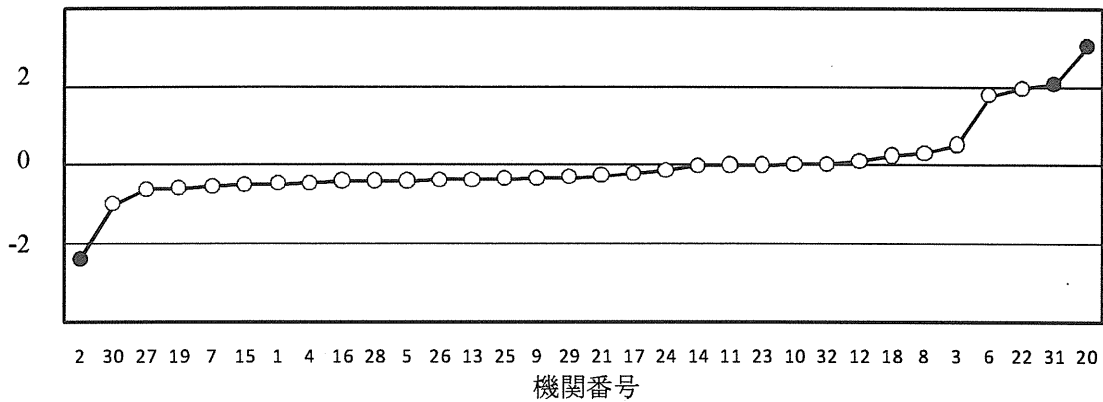
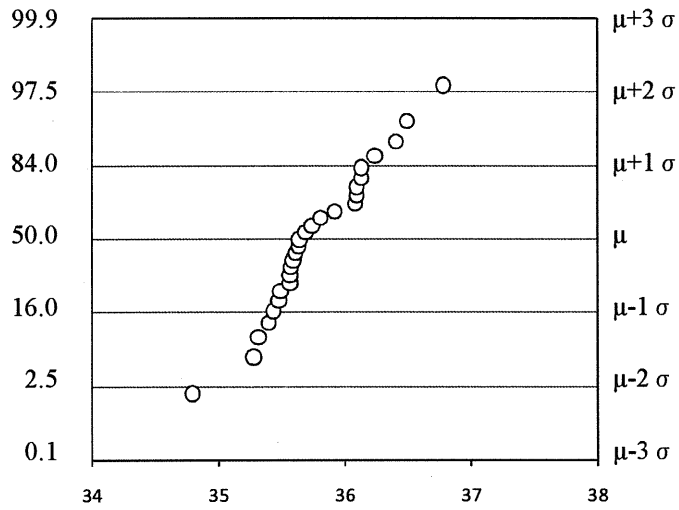


図3 試料D の CpTI 検出用試験における Ct 値の解析

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	27
最小値	34.795
最大値	36.785
平均値	35.777
標準偏差	0.432
ひずみ	0.296
とがり	0.352

Ct 値の Z スコア

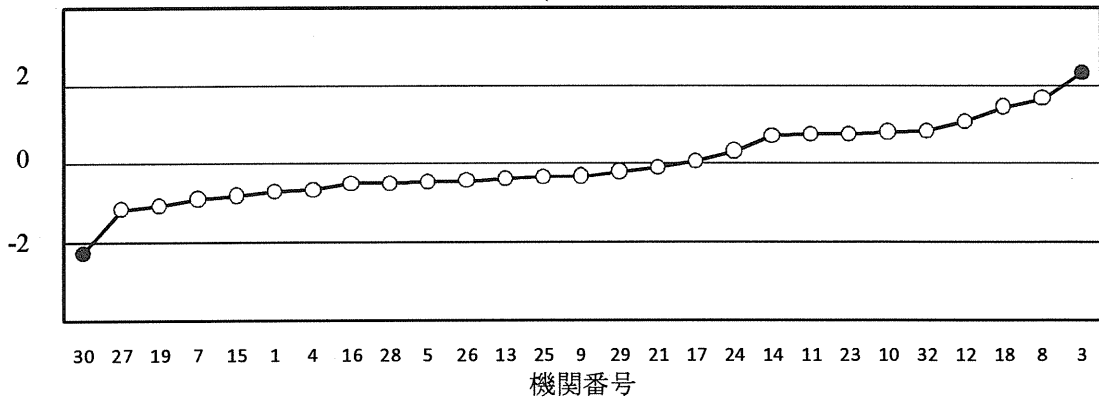
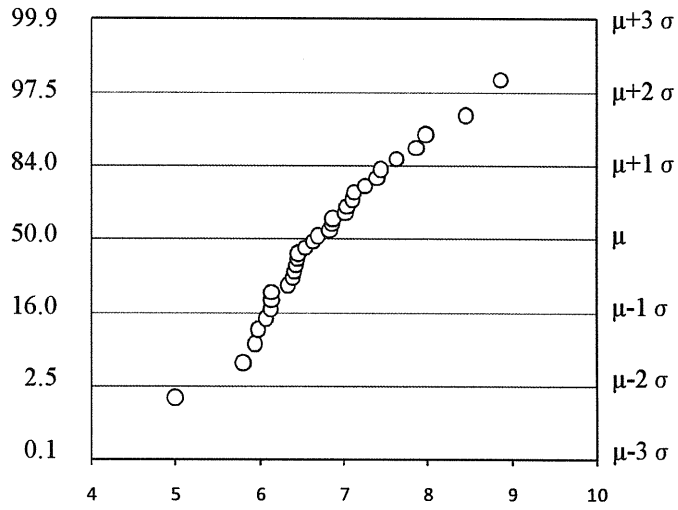


図4 試料D の CpTI 検出用試験における Ct 値の解析  
(2シグマ2回処理後)

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	32
最小値	4.995
最大値	8.875
平均値	6.792
標準偏差	0.805
ひずみ	0.553
とがり	0.793

Ct 値の Z スコア

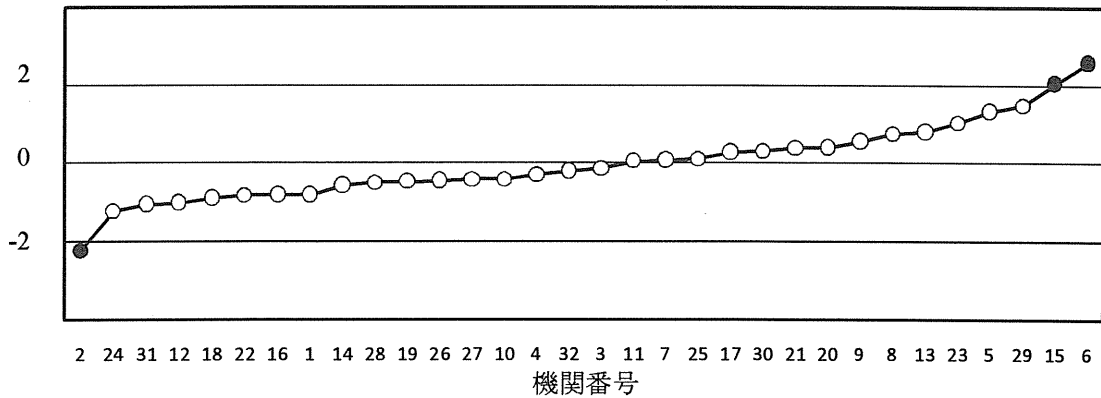
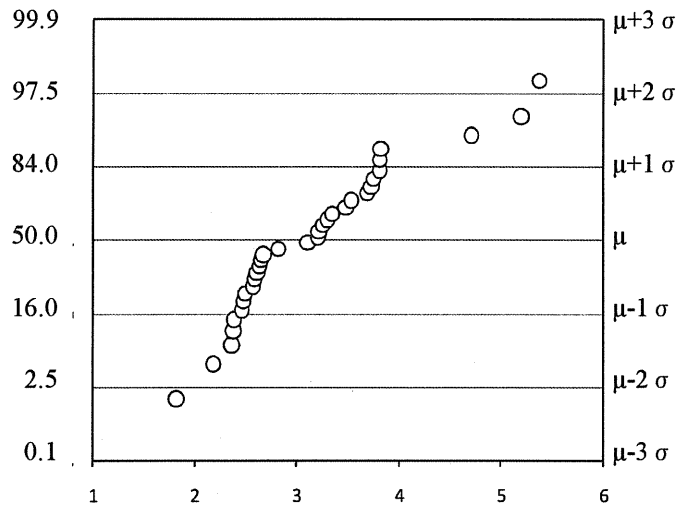


図 5 63Bt 検出用試験における試料 A と陽性対照プラスミドの Ct 値の差の解析

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	32
最小値	1.820
最大値	5.373
平均値	3.169
標準偏差	0.839
ひずみ	0.998
とがり	0.923

Ct 値の Z スコア

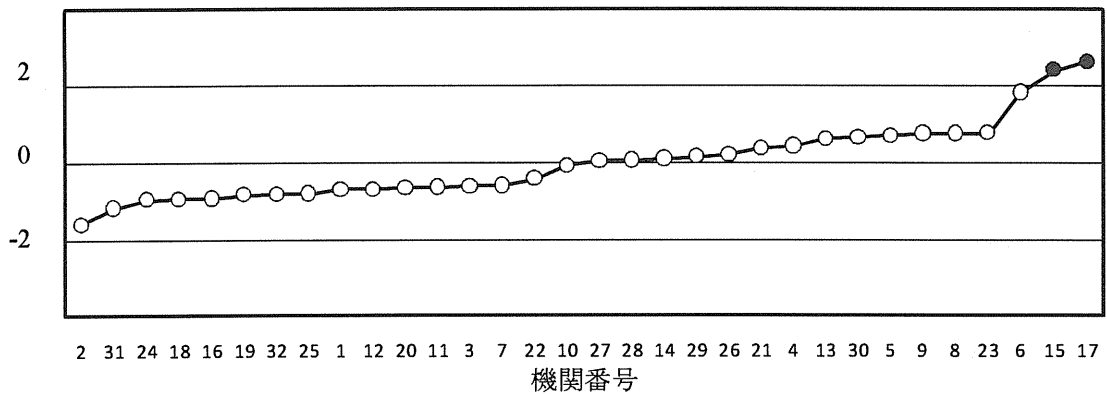
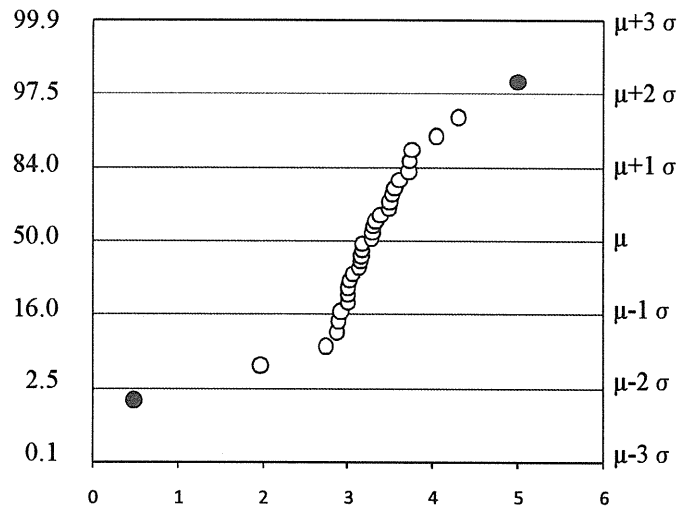


図 6 63Bt 検出用試験における試料 B と陽性対照プラスミドの Ct 値の差の解析

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	32
最小値	0.485
最大値	4.995
平均値	3.233
標準偏差	0.722
ひずみ	-1.404
とがり	6.980

Ct 値の Z スコア

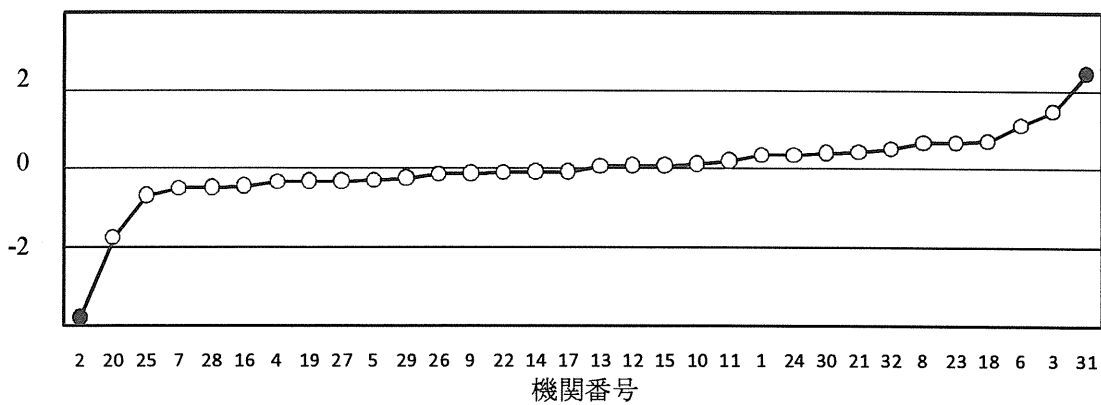
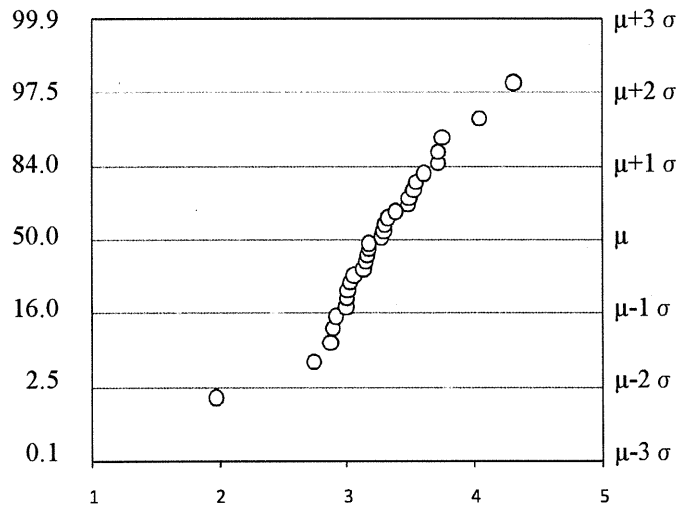


図 7 CpTI 検出用試験における試料 D と陽性対照プラスミドの Ct 値の差の解析



正規確率プロット



基本統計量	
データ数	30
最小値	1.970
最大値	4.305
平均値	3.266
標準偏差	0.434
ひずみ	-0.265
とがり	2.263

Ct 値の Z スコア

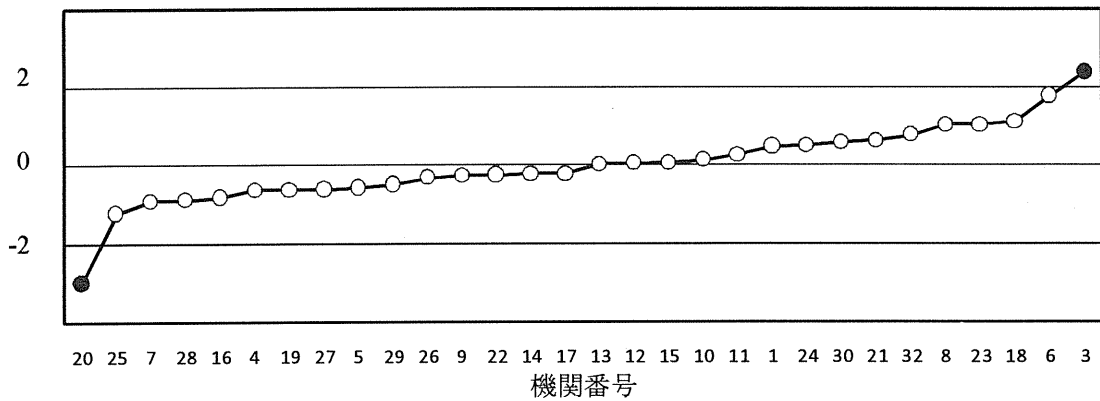


図 8 CpTI 検出用試験における試料 D と陽性対照プラスミドの Ct 値の差の解析  
(2 シグマ処理後)

表1 63BtコメDNA溶液希釈系列の測定結果

希釈倍	陽性反応数/試行数	Ct値(Th.line 0.3) 平均
1	4/4 <sup>a)</sup>	30.10
10	2/2	33.64
100	2/2	37.42
200	2/2	39.26
400	2/2	41.01
800	4/4(8/8)	41.94(40.55)
1600	(8/8)	(40.36)
3200	(8/7)	-

a): 陽性反応数/試行数

( ): カッコ内は別プレートで実施したデータ

表2 均一性試験のCt値

試料名	検出系	Th.line	n数	Ct値	
				平均	S.D.
試料A	63Btコメ	0.3	20	36.37	0.32
試料B	63Btコメ	0.3	20	33.02	0.30
試料D	CpTIコメ	0.2	20	34.29	0.29

表3 Ct値の差から求めた精度管理試料の害虫抵抗性遺伝子コピー数

検出系	試料	陽性対照 プラスミド のCt値 (A)	試料のCt 値 (B)	Ct値の差 (C)	相対量 (D)	コピー数 (E)
63Btコメ	試料A	31.19	37.23	-6.05	0.0151	7.6
	試料B	31.23	33.80	-2.57	0.1684	84.2
CpTIコメ	試料D	31.10	34.44	-3.34	0.0988	49.4

$$C=A-B$$

$$D=2^C \quad (\text{増幅率を2と仮定して計算})$$

$$E=\text{陽性対照プラスミドのコピー数} \times C \quad (\text{プラスミドのコピー数:500})$$

表4 検量線から求めた各遺伝子のコピー数

検出系	検量線*			試料名	試料のCt 値 (c)	コピー数 (d)	含量(%)
	傾き(a)	切片(b)	相関係数 (R <sup>2</sup> )				
63Btコメ	-3.610	41.07	0.999	試料A	37.23	11.6	/
				試料B	33.80	103	
				63Btコメ DNA溶液	30.10	1093(e)	
CpTIコメ	-3.275	39.87	0.999	試料D	34.44	45.5	
コメ陽性対照用 (PLD)	-3.490	39.75	0.999	63Btコメ DNA溶液	22.86	69110(f)	

\*: 25000、2500、250コピーの陽性対照プラスミドの測定結果から作成

$$d = 10^{[(b-c) \times 1 / -a]}$$

$$g = e / f \times 100$$

(ただし g は組換えDNA配列(63Btコメ)と内在性遺伝子(コメ陽性対照用)の存在比が1:1の場合の含量)

表5 陽性対照プラスミドを用いた各試験系の検出下限の検討

測定法	コピー数	検出系		
		63Btコメ	NNBtコメ	CpTIコメ
改正通知法	50	8/8 <sup>a)</sup>	8/8	8/8
	25	8/8	8/8	8/8
	12.5	8/8	8/8	8/8
	6.25	8/8	7/8	7/8
	3.13	6/8	5/8	6/8
旧通知法 (平成20年度に 報告済み)	750	16/16	16/16	
	336	11/16	16/16	
	168	11/16	16/16	
	80	10/16	16/16	
	40	6/16	14/16	
	20	5/16	14/16	

a): 陽性反応数/試行数

表6 外部精度管理調査結果のまとめ

試料名	試料の種類	検出機関数				正答率 (%)
		コメ陽性対 照用試験	害虫抵抗性コメ検出用試験			
			63Btコメ 検出用試験	NNBtコメ 検出用試験	CpTIコメ 検出用試験	
試料A	63Bt陽性 (低濃度)	32	32	0	0	100
試料B	63Bt陽性 (高濃度)	32	32	0	0	100
試料C	陰性	32	0	0	0	100
試料D	CpTI陽性	32	0	0	32	100