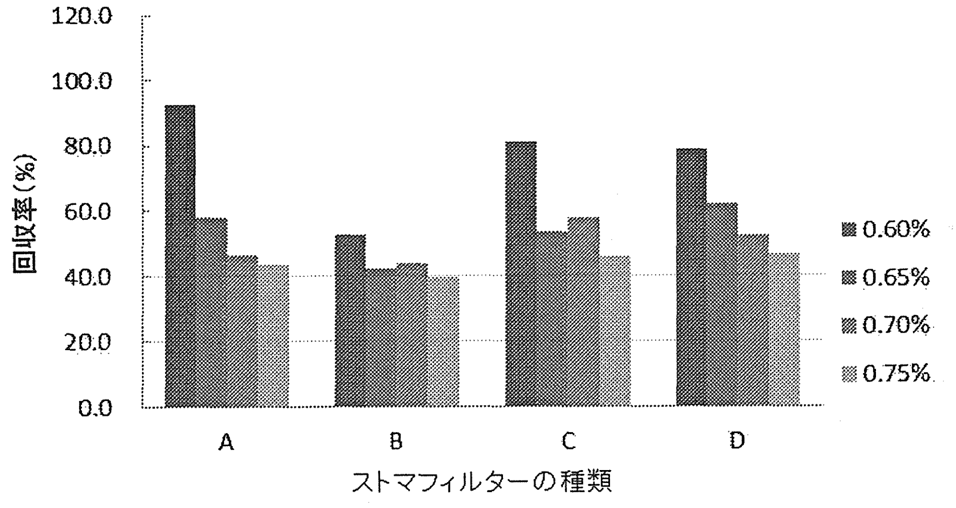
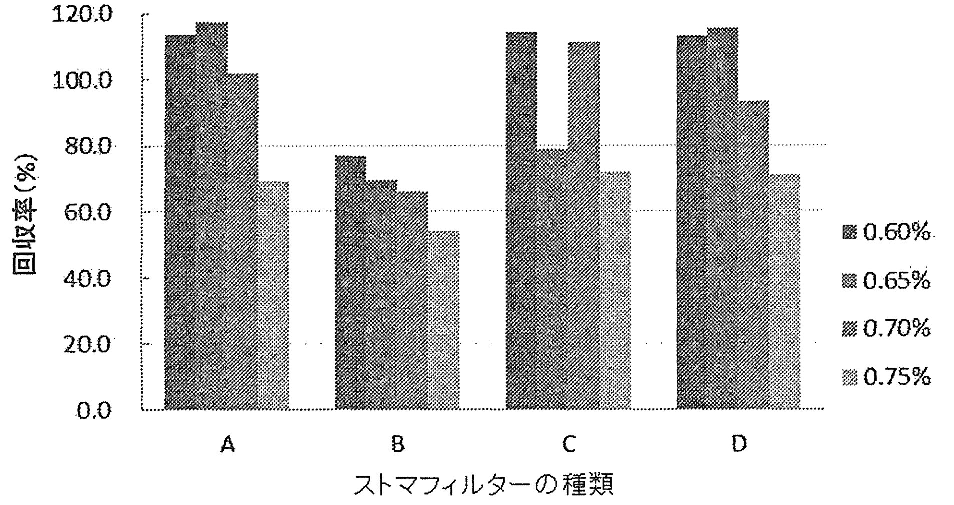


a) MERCK-ストマッカー処理1分



b) MERCK-ストマッカー処理3分

図 6　MERCK の寒天で作製した調査試料における寒天濃度、ストマフィルターおよびストマッカー処理時間の影響

A : ストマフィルターNEO、B : ピクソン 20、C : 滅菌フィルターバッグ NB、
D : サニスペックテストバッグ

表２　各種寒天とストマッカー袋を用いたときの試験対象菌の回収率

寒天	回収率（%）			
	ストマフィルター NEO	ピクソン 20	滅菌フィルターバッグ NB	サニスペックテストバッグ
和光純薬（通常使用）	95.6	112.7	97.6	67.8
和光純薬（試薬特級）	99.8	114.6	97.1	98.8
OXOID	96.1	98.3	96.6	86.6
MERCK	84.6	101.7	111.5	91.7

回収率はフィルターのないストマッカー袋（オルガノ）に対する生菌数の比率として算出した。

寒天状基材に別途試験対象菌を添加した後、生菌数測定を実施した。

平成25年度　厚生労働科学研究費補助金（食品の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

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査用適正試料の作製検討と
信頼性確保に関する研究（その3）
―食品中のアレルギー物質検査の外部精度管理に関する調査試料の作製検討―

主任研究者　小島　幸一　（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　所長

分担研究者　渡辺　卓穂　（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　食品衛生事業部長

協力研究者　安達　玲子　国立医薬品食品衛生研究所　代謝生化学部第三室長

鈴木　達也　（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　室長

梅津　麻実　（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　研究員

大向　志帆　（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　研究員

研究要旨

アレルギー物質を含む特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）については食品への表示が義務付けられており、検査法が消費者庁から通知されている。特定原材料検査の検査精度の適正化および向上のためには外部精度管理の実施が不可欠であるため、精度管理調査用試料の作製が必要となっている。そこで、本年度はそば試料の作製について検討するとともに、小規模での配布量を想定した試料調製を試みた。まず、3種類のそば粉からそれぞれ2種類の抽出液を用いてタンパク質を抽出し、3種類のELISAキットによる測定を行い、基材添加用そばタンパク質の調製に使用するそば粉および抽出液を選定した。その結果、中国北方産そば粉をメルカプトエタノールを含まない抽出液で抽出したそばタンパク質溶液で最もELISAキット間の差が少なかった。次に、このそばタンパク質溶液を4種類の基材に添加した試料を作製し、回収率および安定性を確認した。その結果、3キット中2キットについてはすべての試料について保存安定性が確認された。しかし、日本ハムのキットについてはすべての試料で保存期間が長くなるにつれて回収率が高くなる傾向が認められた。回収率が高くなる原因について検討した結果、キットに付属しているそば標準品が保存中に劣化し、検量線の測定値が低くなるため、試料の定量値が見かけ上高くなる可能性が考えられた。そこで、0ヶ月保存の検量線データを使用して、1ヶ月保存および2ヶ月保存の各試料について再計算したところ、回収率の増加はみられず、日本ハムキットにおいても、すべての試料について安定であることが確認された。

以上のことから、今回検討したそば粉からのタンパク質抽出法および添加基材については、外部精度管理調査用試料として有用であると考えられたが、検量線に使用するタンパ

ク質溶液や基材への添加量については、検討の継続が必要であると考えられた。

A. 研究目的

アレルギー体質を持つ人の健康危害の発生を防止するため平成13年4月にアレルギー物質を含む原材料24品目について、食品への表示が推奨された。そのうち卵、乳、小麦、そば、落花生、平成20年に追加されたえび、かに の7品目は特定原材料と指定され、食品への表示が義務付けられている。これら特定原材料はいずれも検査法が通知されているため、食品衛生法施行規則に基づき検査の精度の適正化および向上のため外部精度管理を実施することが望ましいと考えられる。

特定原材料の検査法は平成14年11月6日、厚生労働省医薬局食品保健部長より通知（食発第1106001号）が発出された。その後、食品衛生法に基づく表示の所管が消費者庁に移管された事に伴い、消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」（消食表第286号、平成22年9月10日）および消費者庁食品表示課事務連絡「アレルギー物質を含む食品の検査方法について（参考）」（平成22年9月10日）が発出され、現在に至っている。

我々は昨年度までに特定原材料7品目すべてについて精度管理試料の調製を検討し、落花生を除く6品目について試料の試作を完了している。このうち、卵、乳、甲殻類（えび、かに）については検査機関の協力をえて、実際にELISA法による測定を対象とした外部精度管理の模擬試験を小規模で実施し、さらに卵については外部精度管理の本格的実施に向けて、より大きな規模での模擬試験を実施済みである。しかし、そば試料においては、粉末を添加した試料の測定に、日本ハムのキットを用いた場合、保存期間が長くなるほど回収率が高くなる傾向が認められたほか、標準品規格による抽出液のタンパク質量が、ケルダール法から算出したタンパク質量と比べて低く測定されるなど、そば粉末を添加した試料の調製には問題点が多い。

そこで本年度は、より安定的なそば試料の作製を目的として、そばタンパク質溶液添加試料の作製について検討するとともに、小規模での配布量を想定した試料調製を試みた。また、日本ハムのキットを使用した場合に回収率が高くなる原因についても検討した。

B. 研究方法

1. そば粉および添加用基材

そば粉は標準品規格に規定されている茨城県産そば粉および中国北方産そば粉、その他にダッタンそば粉を購入して使用した。添加用基材は原材料の欄にそばを使用した旨の表示が無い食材を選んで購入して使用した。

2. タンパク質抽出

そば粉からのタンパク質抽出は標準品規格に記載の方法に従って実施した。抽出液はメルカプトエタノールを含む抽出液（0.5%SDS、2%メルカプトエタノール、0.5M NaClを含む20 mM Tris-HCl、pH7.5）および、メルカプトエタノールを含まない抽出液（0.5%SDS、0.5M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl、pH7.5）の2種類を使用した。ま

た、抽出には振とう機：RECIPRO SHAKER NR-Iおよび Double Shaker R-30 mini（以上 TAITEC)、遠心機：himac CF 16RX（日立工機㈱）を使用した。

3. 総タンパク質の定量

そば粉から抽出したタンパク質の濃度は 2-D Quant Kit（GE ヘルスケアバイオサイエンス㈱）を用いて定量した。

4. 特定原材料タンパク質の定量

特定原材料タンパク質の定量は ELISA 法により実施した。すなわち FASTKIT エライザ Ver.Ⅱそば（日本ハム㈱）、モリナガ FASPEK そば 測定キット（㈱森永生科学研究所）およびアレルゲンアイ ELISA そば(プリマハム）のそれぞれの ELISA キットを使用した。また、吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダーEL 808IU、および計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver.1.80（Bio-Tek Instruments, Inc.)を使用した。

5. 試料の作製

中国北方産そば粉からメルカプトエタノールを含まない抽出液を用いて B.2. に従ってタンパク質抽出を行い、そばタンパク質溶液を調製した。次に、こしあん、カスタードクリームおよびチョコレートクリームにそれぞれそばタンパク質溶液を添加し、フードプロセッサー：MK-K58（松下電器産業㈱）で均質になるまで混合した後、遠沈管に分注して試料を作製した。ビスケットについては、ミルサーIFM-700G（岩谷産業㈱）を用いて粉砕し、遠沈管に 1 g ずつ分注した後、そばタンパク質溶液を添加して試料を作製した。作製した試料はいずれも-20℃で凍結保存した。

（倫理面への配慮）

添加試料が食材であるため、誤って口に入ることが無いよう、試料の残余や廃棄物は速やかに焼却処分に付した。

C. D. 結果および考察

1. 添加用そばタンパク質の調製に用いるそば粉および抽出液の選定

標準品規格では、茨城県産そばおよび中国北方産そばを等量混合した後に粉砕して調製した粉末を使用し、メルカプトエタノールを含む抽出液を用いてタンパク質を抽出するが、操作が複雑であることに加え、試料を各検査機関に送付し、検査者が取り扱う際には毒物であるメルカプトエタノールは含有していないことが望ましい。そこで、あらかじめ粉砕されている市販のそば粉 3 種類（茨城県産そば粉、中国北方産そば粉およびダッタンそば粉）からそれぞれ 2 種類の抽出液（メルカプトエタノールを含む（+ME）抽出液またはメルカプトエタノールを含まない（-ME）抽出液）を用いてタンパク質を抽出し、各抽出液のタンパク質濃度を比較した（表 1)。その結果、すべてのそば粉において-ME 抽出液よりも+ME 抽出液の方がタンパク質濃度が高かった。しかし、-ME 抽出液のタンパク質濃度は標準品規格に記載のタンパク質濃度（2.8～4.2 mg/mL）をいずれも満たすことから、メルカプトエタノールを含まない抽出液でもそば粉からのタンパク質抽出は十分可能であることが確認された。

次に、これら 6 種類のそばタンパク質抽出液をそれぞれ 100 μg/mL となるよう希釈

後、3 種類の ELISA キットでそばタンパク質を測定し、比較した（表 2)。その結果、茨城県産そば粉および中国北方産そば粉では、すべてのキットでそばタンパク質が検出された。しかし、ダッタンそば粉では、日本ハムキット、モリナガキットでは検出されたが、プリマハムキットでは検出下限以下だった。プリマハムキットはそばタンパク質の検出にモノクローナル抗体を使用していることから、ダッタンそば粉はプリマハムキットのモノクローナル抗体が認識できる抗原タンパク質を含んでいない可能性が考えられた。また、各抽出液を比較した場合、中国北方産（日本ハムキット使用時）を除くすべてのそば粉およびキットにおいて、+ME 抽出液よりも-ME 抽出液で測定値が高かった。また、中国北方産そば粉および-ME 抽出液を使用した溶液でキット間の測定値の差が最も小さかった。

以上の結果より、添加用そばタンパク質溶液の調製には 3 キットの測定値の差が最も少ない中国北方産そば粉および-ME 抽出液を使用することとした。

2.　そば添加試料作製の検討

上記 において選定したそば粉および抽出液を用いて調製したそばタンパク質溶液を基材に添加し、回収率および安定性を検討した。すなわち中国北方産そば粉から-ME 抽出液を使用して標準品規格に従って調製したそばタンパク質溶液を、ビスケット、こしあん、カスタードクリーム、チョコレートクリームに添加してそばタンパク質添加試料を作製した。そばタンパク質の添加量はそれぞれ 8.6 µg/g、9.7 µg/g、8.9 µg/g、8.8 µg/g とした。各そばタンパク質添加試料のそばタンパク質量を調製直後に 3 種類のキットで測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求めた（表 3)。その結果、日本ハムキット、モリナガキット、プリマハムキットの順に回収率が高かった。さらに、油分の少ない基材であるビスケット、こしあんは油分の多いカスタードクリーム、チョコレートクリームに比べて回収率が高かった。調製した試料は-20℃で保存し、保存 1 ヶ月後および保存 2 ヶ月後にも保存前と同様に測定し、保存後の測定値を保存前の測定値で除して安定性を求めた（表 3)。その結果、全ての試料において、モリナガキットでは 97.4～119.1%、プリマハムキットでは 91.2～123.8%と安定性は良好であった。しかし、日本ハムキットでは、保存 1 ヶ月後の安定性が 148.5～164.1%、保存 2 ヶ月後の安定性が 160.3～281.5%と保存期間が長くなるにつれ回収率が高くなる傾向が認められた。平成 19 年度にも、そば粉添加試料において同様の傾向が認められることを報告しており、そばタンパク質の添加方法や添加基材を変更しても改善されないことから、試料ではなくキットに問題がある可能性が考えられた。また、日本ハムキットの検量線作成に使用したそば標準品の実測値を比較したところ、保存前、保存 1 ヶ月後、保存 2 ヶ月後の順に低下していた（図 1)。一方、試料の実測値は全期間を通してほぼ同程度であった（データは示さず)。このことから、日本ハムキットに付属のそば標準品が長期保存により劣化し、検量線の吸光度が低くなるため、試料の定量値が見かけ上高くなる可能性があると考えられた。そこで、保存前の検量線データを使用して、保存 1 ヶ月後、保存 2 ヶ月後

の試料について再計算して得られた測定値について、安定性を検討した（表4）。その結果、全ての試料において、保存 1 ヶ月後の安定性が 77.4～85.7%、保存 2 ヶ月後の安定性が 79.2～89.9%と良好であった。

3. そば標準品の安定性

日本ハムキットでは試料の保存期間が長くなるにつれ回収率が高くなる傾向が認められた。その原因として、日本ハムキットに同梱されているそば標準品（以下、日本ハム標準品とする）が長期保存により劣化する可能性が考えられた。そこで、そば標準品の安定性について確認するために、日本ハム標準品とモリナガキットに同梱されているそば標準品（以下、モリナガ標準品とする）を日本ハム、モリナガの両キットを使用して測定し、実測値を比較した（図2)。なお、キット（同梱のそば標準品を含む）は全て 4℃で保存し、測定回数はキット購入時（保存 0 ヶ月)、保存 2 ヶ月後の計 2 回実施した。その結果、モリナガキットで測定した場合、キット購入時の日本ハム標準品とモリナガ標準品の測定値は同程度であり、保存 2 ヶ月後においても同程度であった。一方、日本ハムキットを用いて測定した場合、キット購入時の日本ハム標準品の測定値は、モリナガ標準品の測定値に比べて低かった。また、保存 2 ヶ月後では、日本ハム標準品とモリナガ標準品の両方でキット購入時と比較して測定値が低かった。以上結果より、標準液中に含まれるそばタンパク質のうち、モリナガキットで検出するタンパク質は長期保存により劣化しないが、日本ハムキットで検出するタンパク質は長期保存により劣化する可能性が考えられた。また、日本ハムキットにおいて、日本ハム標準品がモリナガ標準品に比べて測定値が低かったのは、標準品に記載されている使用期限が日本ハム標準品では 2 ヶ月短く、モリナガ標準品よりも古いためであると考えられた。また外部精度管理調査を実施するにあたっては、各参加機関で保存期間の異なる標準品を使用して検量線を引いた場合に試料の測定結果に大きく影響する可能性があるため、共通のそば標準品の配布についても検討する必要があると考えられた。

E. 結論

より簡便で安全性の高いそば試料の作製を目的として、3 種類のそば粉および 2 種類の抽出液を用いてタンパク質を抽出し、3 キットの ELISA 測定値から最もキット間の差が少ない組み合わせとして、中国北方産そば粉およびメルカプトエタノールを含まない抽出液を選定した。さらに、そばタンパク質抽出液を基材に添加し、添加回収率および保存安定性について検討した。その結果、すべての試料において、モリナガキット、プリマハムキットで測定した場合は、回収率および安定性ともに良好であった。日本ハムキットで測定した場合には、保存期間が長くなるにつれ、そば標準品の劣化が原因と考えられる検量線の測定値の低下がみられたため、保存前の検量線を使用して保存後の試料の安定性を確認した。その結果、日本ハムキットにおいてもすべての試料で良好な回収率および安定性結果が確認された。

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

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

表1 そば粉から抽出したタンパク質のタンパク質濃度

試料名	タンパク質濃度(μg/mL)		-MEの抽出率[c] (+MEを100とした場合) (%)
	+ME抽出液(+ME)[a]	-ME抽出液(-ME)[b]	
茨城県産そば粉	4.9	3.9	80.6
中国北方産そば粉	5.3	3.5	66.7
ダッタンそば粉	4.2	3.1	75.2

a メルカプトエタノールを含む抽出液(0.5%SDS、2%メルカプトエタノール、0.5M NaClを含む20 mM Tris-HCl、pH7.5)

b メルカプトエタノールを含まない抽出液(0.5%SDS、0.5M NaClを含む20 mM Tris-HCl、pH7.5)

c (-ME)/(+ME)×100

表2 各種そば粉から抽出したタンパク質溶液のELISAキットにおける測定値

試料名	抽出液	タンパク質濃度[a] (μg/mL)	日本ハムキット[b] タンパク質濃度 (μg/mL)	日本ハムキット[b] 回収率 (%)	モリナガキット[c] タンパク質濃度 (μg/mL)	モリナガキット[c] 回収率 (%)	プリマハムキット[d] タンパク質濃度 (μg/mL)	プリマハムキット[d] 回収率 (%)
茨城県産そば粉	+ME	100	123.70	123.7	132.51	132.5	100.07	100.1
	−ME	100	125.95	126.0	140.09	140.1	149.36	149.4
中国北方産そば粉	+ME	100	142.22	142.2	105.40	105.4	82.37	82.4
	−ME	100	135.32	135.3	127.46	127.5	138.03	138.0
ダッタンそば粉	+ME	100	100.28	100.3	64.15	64.2	ND	−
	−ME	100	125.96	126.0	71.69	71.7	ND	−

+ME：メルカプトエタノールを含む抽出液(0.5%SDS、2%メルカプトエタノール、0.5M NaClを含む20 mM Tris-HCl、pH7.5)
−ME：メルカプトエタノールを含まない抽出液(0.5%SDS、0.5M NaClを含む20 mM Tris-HCl、pH7.5)
ND：検出下限以下
a 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値を参考に希釈した濃度
b FASTKITエライザ Ver.II そばキット
c モリナガ FASPEK そばキット
d アレルゲンアイ ELISAそばキット

表3 そばタンパク質添加試料における添加回収および安定性試験

ELISAキット	試料名	タンパク質添加量[a]	保存前(調製直後)(n=5)			-20℃ 1ヶ月保存後(n=5)			安定性[c]	-20℃ 2ヶ月保存後(n=5)			安定性[c]
			測定値	回収率[b]	RSD	測定値	回収率[b]	RSD		測定値	回収率[b]	RSD	
		(μg/g)	(μg/g)	(%)	(%)	(μg/g)	(%)	(%)	(%)	(μg/g)	(%)	(%)	(%)
日本ハム FASTKIT エライザ Ver.II そばキット	ビスケット	8.6	15.15	175.8	1.2	22.50	261.0	1.6	148.5	24.28	281.7	15.7	160.3
	こしあん	9.7	17.38	179.6	7.1	26.47	273.4	2.4	152.2	30.54	315.4	21.4	175.7
	カスタードクリーム	8.9	12.00	134.5	1.7	19.68	220.6	2.1	164.1	23.45	262.9	30.6	195.5
	チョコレートクリーム	8.8	9.54	108.5	3.2	15.18	172.7	1.4	159.1	26.85	305.5	5.8	281.5
モリナガ FASPEK そばキット	ビスケット	8.6	10.99	127.5	2.2	11.78	136.7	2.3	107.2	10.71	124.2	3.1	97.4
	こしあん	9.7	11.65	120.4	1.9	12.37	127.8	1.4	106.1	11.86	122.6	1.6	101.8
	カスタードクリーム	8.9	9.64	108.1	0.7	10.80	121.1	1.6	112.0	11.49	128.8	2.2	119.1
	チョコレートクリーム	8.8	10.34	117.6	2.3	11.81	134.4	1.1	114.3	10.96	124.7	6.5	106.0
プリマハム アレルゲンアイ ELISA そばキット	ビスケット	8.6	9.37	108.7	2.9	9.66	101.4	1.5	103.1	8.55	99.2	8.2	91.2
	こしあん	9.7	9.31	96.2	1.8	9.84	102.4	1.7	105.7	9.88	102.1	8.8	106.1
	カスタードクリーム	8.9	7.63	85.5	2.3	8.12	100.2	1.4	106.4	9.22	103.4	11.7	120.9
	チョコレートクリーム	8.8	7.56	86.0	3.5	8.03	99.8	0.7	106.2	9.36	106.5	8.1	123.8

a 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値から計算
b 測定値/タンパク質添加量×100
c 保存後の測定値/保存前の測定値×100

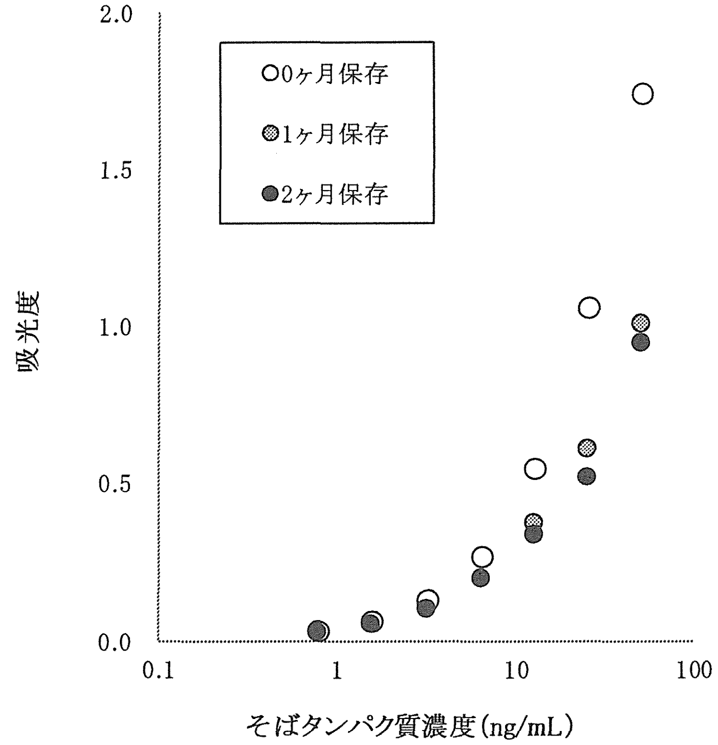


図1 そばタンパク質添加試料の安定性確認に用いた検量線(日本ハム)の実測値

そば添加試料の0ヶ月保存(調製直後)、1ヶ月保存、2ヶ月保存安定性確認時に検量線に用いた日本ハムキット標準品の実測値をグラフ上にプロットした。そば標準品はキットとともに冷蔵(4℃)で保存した。

表4　そばタンパク質添加試料における添加回収および安定性試験（日本ハムキット再計算）

ELISAキット	試料名	タンパク質添加量[a]	保存前（調製直後）(n=5)			-20℃　1ヶ月保存　(n=5)			安定性[c]	-20℃　2ヶ月保存　(n=5)			安定性[c]
			測定値	回収率[b]	RSD	測定値	回収率[b]	RSD		測定値	回収率[b]	RSD	
		(μg/g)	(μg/g)	(%)	(%)	(μg/g)	(%)	(%)	(%)	(μg/g)	(%)	(%)	(%)
日本ハム FASTKIT エライザ Ver.II そばキット	ビスケット	8.6	15.15	175.8	1.2	11.73	136.1	1.7	77.4	12.01	139.3	2.9	79.2
	こしあん	9.7	17.38	179.6	7.1	13.90	143.6	2.5	80.0	14.29	147.6	2.9	82.2
	カスタードクリーム	8.9	12.00	134.5	1.7	10.28	115.3	2.0	85.7	10.78	120.9	1.9	89.9
	チョコレートクリーム	8.8	9.54	108.5	3.2	8.07	91.8	1.4	84.6	8.05	91.6	3.0	84.4

表中の測定値は全て保存前（調製直後）の測定時に使用した検量線データを用いて算出した。

a　2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値から計算

b　測定値/タンパク質添加量×100

c　保存後の測定値/保存前の測定値×100

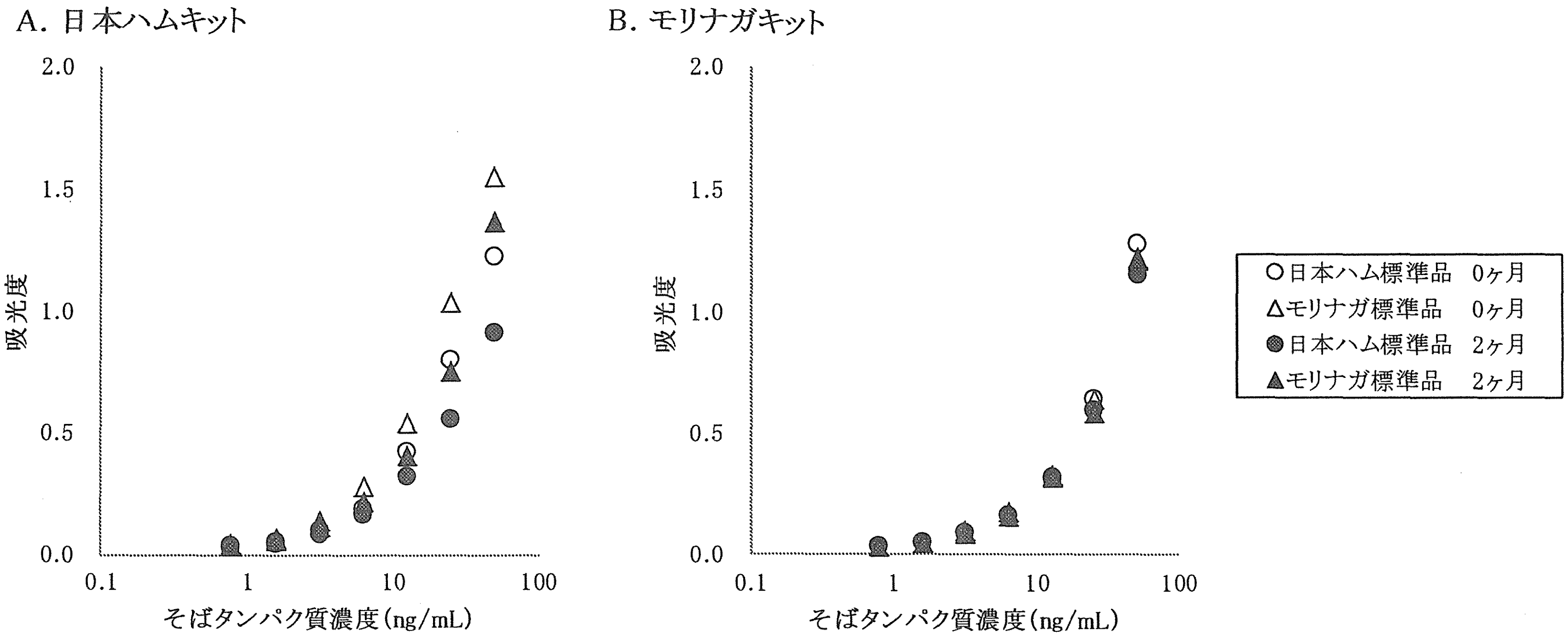


図2　そば標準品の保存安定性確認

A.　日本ハム FASTKITエライザ Ver.II そばキットで測定したそば標準品の濃度(対数値)および吸光度のグラフ
B.　モリナガ FASPEK そばキットで測定したそば標準品の濃度(対数値)および吸光度グラフ
日本ハム標準品およびモリナガ標準品は各キットに付属のものを使用した。購入時に測定したデータ(0ヶ月)および2ヶ月間冷蔵(4℃)保存した後に測定したデータ(2ヶ月)をグラフ上にプロットした。

平成25年度　厚生労働省科学研究費補助金　（食品の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

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査用適正試料の作製検討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	（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　所長
分担研究者	渡辺　卓穂	（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　部長
協力研究者	近藤　一成	国立医薬品食品衛生研究所　代謝生化学部第二室長
	鈴木　達也	（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　室長
	梅津　麻実	（一財）食品薬品安全センター　秦野研究所　研究員

研究要旨

厚生労働省より安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法として、定性リアルタイムPCR法が通知のされている。また同通知には定性リアルタイムPCR法を行う際に使用できるリアルタイムPCR機器としてABI PRISM™ 7900、ランモードとして9600 emulation modeが示されているが、本機器は2013年3月で販売を終了しており、今後発売される機器については9600 emulation modeが搭載されていない。そのため、新しい機器を使用する場合には、通知法とは異なるランモードで測定する必要があるが、組換えDNA技術応用食品の検査においてランモードの違いがリアルタイムPCR測定結果に与える影響についてはこれまでに明らかにされていない。そこで、安全性未審査の遺伝子組換えコメおよびパパイヤの陽性コントロールプラスミドを段階希釈した溶液について 9600 emulation mode および Standard mode により測定を行い、ランモードの違いによる Ct 値への影響を検証した。その結果、遺伝子組換えコメの4遺伝子（PLD、63Bt、NNBt、CpTI）は、Standard modeで測定した場合、9600 Emulation modeよりもCt値が高くなる傾向にあった。一方、遺伝子組換えパパイヤの4遺伝子（Chy、CaM、PRSV-YK、PRSV-SC）は、Standard modeで測定した場合、9600 Emulation modeよりもCt値が低くなる傾向にあった。しかし、モード間のCt値の差はほとんどの遺伝子および濃度で1サイクル以内と非常に小さく、判定結果にはほとんど影響しないことが明らかになった。

A. 研究目的

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年度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。

現在、厚生労働省通知「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について」(平成24年1月16日付食安発1116第3号)に記載されている検査項目のほとんどは「定性リアルタイムPCR法」を用いて評価することが定められている。定性リアルタイムPCR法は目的とする遺伝子の増幅により得られるCt値から遺伝子組換え食品混入の有無を定性的に評価する方法であるが、リアルタイムPCR機器の性能や解析方法の違いにより、得られるCt値が異なる可能性があることから、同通知には検査項目ごとに使用できるリアルタイムPCR機器および反応条件が指定されており、その他のリアルタイムPCR機器を使用する場合には最適化が必要であるとしている。例えば、安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK、PRSV-SC)の定性リアルタイムPCR法ではリアルタイムPCR機器として、ABI PRISM™ 7900 (ABI7900) または 7500 (ABI7500) を、ランモードとして 9600 emulation mode (GeneAmp® PCR System 9600のサーマルサイクリングを再現するモード。通常よりも温度の切り替えにかかる時間が長い。) を使用することとしている。また、平成24年度遺伝子組換え食品検査の外部精度管理調査において実施した「参加機関における遺伝子組換え食品検査に使用したリアルタイムPCR装置」に関するアンケートでは、25参加機関のうち19機関がABI7900を、残り7機関がABI7500を使用したと報告しており、ほとんどの機関がABI7900を使用していることが明らかとなった。しかし、ABI7900は2013年3月で販売を終了しており、今後発売される機器については9600 emulation modeが搭載されていない。そのため、新しい機器を購入して使用する場合には、9600 emulation modeとは異なるランモードで測定する必要があるが、組換えDNA技術応用食品の検査においてランモードの違いがリアルタイムPCR測定結果に与える影響についてはこれまでに明らかにされていない。

そこで、当センターで現在所有しているABI7900を使用し、陽性コントロールプラスミドが入手可能な安全性未審査の遺伝子組換え米およびパパイヤの各遺伝子について、9600 Emulation mode および Standard mode (通常のペルチェ素子プレート加熱冷却方式のモード。9600 Emulation mode よりも温度の切り替えにかかる時間が短い。) の2種類のランモードでリアルタイムPCR測定を行い、結果を比較した。

B. 研究方法

1. 材料

陽性コントロールプラスミドはニッポンジーンより購入したGMコメ 害虫抵抗性検査用 陽性コントロールプラスミド及びGMパパイヤ系統別DNA PRSV陽性コントロールプラスミドを使用した。非遺伝子組換えコメは神奈川県内で購入した上新粉を使用した。

2. 非遺伝子組換えコメからのDNA抽出

非遺伝子組換えコメからのDNA抽出には

GM quicker2（ニッポンジーン）を使用し、通知法に記載のプロトコールに従って抽出した。抽出後のDNA溶液は水で10ng/μLに調製し、陽性コントロールプラスミドの希釈液として使用した。なお、遠心分離には多用途小型遠心機 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. 陽性コントロールプラスミドの段階希釈液の調製

コメ陽性コントロールプラスミドは希釈液に水または非遺伝子組換えコメDNAを用いて、40、20、15、10、5、2.5 コピー/ウェルとなるよう希釈した。パパイヤ陽性コントロールプラスミドは水を用いて40、20、10、5、2.5、1.25 コピー/ウェルとなるよう希釈した。

4. リアルタイムPCR測定

リアルタイムPCRは通知法に従い、安全性未審査の遺伝子組換え米検査では、コメ陽性対照遺伝子（PLD）および遺伝子組換え米3系統（CpTI、63Bt、NNBt）の4遺伝子、安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ検査では、パパイヤ陽性対照遺伝子（Chy）、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター配列（CaM）および遺伝子組換えパパイヤ2系統（PRSV-YK, PRSV-SC）の4遺伝子について測定した。なお、測定は1濃度につき6ウェル併行で実施した。ただし、9600 emulation modeおよびStandard modeの2種類のランモードで測定した。なお、リアルタイム PCR 装置は ABI PRISM™7900 96 well（Life Technologies Japan）を使用した。

5. リアルタイム PCR 結果の解析および判定

判定は通知法に従って実施した。すなわち、Amplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースラインを（3 サイクルから 15 サイクル）設定し、⊿Rn 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Threshold line（Th. line）として0.2に設定し、得られたCt値を確認した。遺伝子組換え米では48未満のCt値が得られた場合に、陽性と判定した。遺伝子組換えパパイヤでは43未満のCt値が得られた場合に陽性と判定した。

増幅効率は、遺伝子組換え米では40、20、15、10、5コピー/ウェルの希釈液、遺伝子組換えパパイヤでは 40、20、10、5、2.5 コピー/ウェルの希釈液の測定結果を使用して算出した。ベースラインおよび Th. line は自動（Automatic Ct）で設定した。なお、解析ソフトウェアはSDS v2.4.1を使用した。

C. D. 結果および考察

1.遺伝子組換え米検査における異なるランモードのCt値への影響

遺伝子組換え米の検査に使用する4遺伝子（PLD、CpTI、63Bt、NNBt）について、コメ陽性コントロールプラスミドを水で段階希釈した DNA 溶液を鋳型として、9600 Emulation modeおよびStandard modeの2種類のランモードでそれぞれリアルタイム

PCR 測定を行い、Ct 値を比較した（表 1)。その結果、PLD および 63Bt では 6 濃度中 4 濃度、NNBt では 6 濃度中 5 濃度で 9600 Emulation mode よりも Standard mode で Ct 値が若干ではあるが大きい傾向にあった。さらに、指数関数的な増幅がみられたウェル数（増幅数)、さらに、指数関数的な増幅が確認されたウェルのうち、48 未満の Ct 値が得られたウェル数（陽性数）について比較した結果、PLD および CpTI の 5 コピー/ウェルでは 9600 Emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 6 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 5 ウェルと増幅しないウェルが 1 ウェルあった。また、NNBt では 5 コピー/ウェルと 2.5 コピー/ウェルの両方で 9600 Emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 5 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 4 ウェルに減少した。

次に、実際の遺伝子組換え食品検査に近づけるため、希釈液を水から非遺伝子組換え米 DNA に変えて DNA 溶液を調製した。この DNA 溶液を鋳型として CpTI、63Bt、NNBt の 3 遺伝子について同様にリアルタイム PCR 測定を行い、モード間の比較を行った（表 2)。その結果、CpTI ではすべての濃度で 9600 Emulation mode よりも Standard mode で Ct 値が大きく、水で希釈した場合に比べて Ct 値のモード間差が大きい傾向があった。また 63Bt、NNBt では 6 濃度中 4 濃度で Standard mode の Ct 値が若干ではあるが大きく、希釈液に水を用いた場合と同様の傾向がみられた。一方、増幅数は CpTI、NNBt ではいずれの濃度においてもモード間の差はみられなかったが、63Bt の 5 コピー/ウェルでは、9600 Emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 6 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 5 ウェルとモード間で差がみられた。

以上より、通知法の遺伝子組換え米の検出に使用する 4 遺伝子では、Standard mode を用いて測定を行った場合、9600 Emulation mode に比べ得られる Ct 値が大きく、検出下限付近の低い濃度では増幅数および陽性数が減少する傾向が確認された。しかし、Ct 値のモード間差はほとんどが 1 サイクル以内と非常に小さいことから、ランモードの違いは判定結果にほとんど影響しないと考えられた。また、今回は併行数および反復数が少なく、検出下限付近の濃度におけるランモードの違いによる増幅の有無についての明確な差は確認できなかった。

2. 遺伝子組換えパパイヤにおける異なるランモードの Ct 値への影響

通知法に記載されている安全性未審査の遺伝子組換え米のリアルタイム PCR 条件は変性時間が 20 秒間であるのに対し、安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤでは 15 秒間と短いため、9600 Emulation mode よりも温度変化が速い Standard mode では、変性時間が短いことによる PCR 反応への影響がより大きくなることが予想された。そこで、遺伝子組換えパパイヤの検査に使用する 4 遺伝子（Chy、CaM、PRSV-YK、PRSV-SC）について、2 種類のモード間における Ct 値、検出数および陽性数について比較した（表 3)。ただし、陽性数については、指数関数的な増幅が確認されたウェルのうち、43 未

満の Ct 値が得られたウェル数を陽性と判定した。その結果、Ct 値は CaM、PRSV-YK の 1.25 コピー/ウェルを除くすべての遺伝子および濃度で 9600 Emulation mode よりも Standard mode の方が若干小さくなった。しかし、CaM では 1.25 コピー/ウェルにおいて 9600 Emulation mode の増幅数が 6 ウェル中 6 ウェルであったのに対し、Standard mode の増幅数が 6 ウェル中 4 ウェルと増幅しないウェルがあった。また、PRSV-YK では同濃度において 9600 Emulation mode および Standard mode の増幅数がいずれも 6 ウェル中 5 ウェルであったが、陽性数は 9600 Emulation mode が 6 ウェル中 4 ウェル、Standard mode が 6 ウェル中 3 ウェルとモード間で差がみられた。

以上より、通知法の遺伝子組換えパパイヤの検出に使用する 4 遺伝子では、Standard mode を用いて測定を行った場合、9600 Emulation mode に比べ得られる Ct 値が小さい傾向にあったが、モード間差は遺伝子組換え米の場合よりもさらに小さく、Ct 値に与える影響はほとんどないと考えられた。また、CaM および PRSV-YK では検出下限付近の低い濃度では増幅数および陽性数が Standard mode で減少する傾向が確認されたが、併行数および反復数が少なく、検出下限付近の濃度におけるランモードの違いによる増幅の有無および増幅の遅れについての明確な差は確認できなかった。

3. ランモードの違いによる増幅効率への影響

上述したように、異なるランモードが Ct 値および判定結果に与える影響はほとんどないことが確認された。次に、リアルタイム PCR の測定結果から各遺伝子の増幅効率を算出し、比較した（表 4）。その結果、遺伝子組換え米の検査に使用する 4 遺伝子（PLD、CpTI、63Bt、NNBt）では希釈液に水を用いた場合、CpTI および NNBt では各ランモードの増幅効率に差はみられなかったが、PLD および 63Bt では 9600 Emulation mode よりも Standard mode で増幅効率が高かった。さらに、希釈液に非遺伝子組換えコメ DNA を用いて測定した 3 遺伝子（CpTI、63Bt、NNBt）すべてで、9600 Emulation mode よりも Standard mode で増幅効率が高く、水希釈の時よりもモード間差が大きくなった。3 遺伝子全ての増幅効率が Standard mode で上昇したのは、希釈に使用した非遺伝子組換え米 DNA 溶液中に含まれる PCR 反応阻害物質と Standard mode における温度の切り替えにかかる時間が短いことが影響している可能性が考えられた。

遺伝子組換えパパイヤの検査に使用する 4 遺伝子（Chy、CaM、PRSV-YK、PRSV-SC）では、全ての遺伝子で増幅効率のモード間差が非常に小さく、Standard mode で測定しても 9600 Emulation mode と同様の増幅効率が得られることが確認された。

E. 結論

通知法に記載されている 9600 emulation mode および通常のリアルタイム PCR 機器で設定されている Standard mode を使用し、遺伝子組換え米および遺伝子組換えパパイヤの各遺伝子についてリアルタイム PCR を行い、Ct 値、増幅数、陽性数について比較した。その結果、遺伝子組換え米の 4 遺伝

子（PLD、63Bt、NNBt、CpTI）は、Standard mode で測定した場合、9600 Emulation mode よりも Ct 値が高くなる傾向にあった。一方、遺伝子組換えパパイヤの 4 遺伝子(Chy、CaM、PRSV-YK、PRSV-SC）は、Standard mode で測定した場合、9600 Emulation mode よりも Ct 値が低くなる傾向にあったが、モード間の Ct 値の差は比較的小さく、判定結果にはほとんど影響しないことが明らかになった。また、各遺伝子の増幅効率についても比較した結果、希釈液に水を使用した場合はほとんどの遺伝子でモード間の差は認められなかった。一方、希釈液に DNA 溶液を使用した場合には Standard mode の増幅効率が高く、モード間差が大きくなることから、実際に食品から抽出した DNA 溶液中に PCR 阻害物質を多く含んでいる場合には、使用するランモードにより、増幅効率に差が生じる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1）笠間菊子、小熊恭代、穐山浩、鈴木達也、渡辺卓穂、小島幸一:ダイズおよびトウモロコシ抽出 DNA の精製度の検討，日本食品化学学会誌、20(3),203-208（2013）

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