

quences of the CP gene were identical to that of Thailand's PRSV isolates.²¹⁾ Furthermore, a multiple cloning site (containing restriction sites for *Xba*I and *Bam*HI) and the insertion of a start codon between the CaMV 35S promoter and the N-terminus of the CP gene were detected (Fig. 2A). The transgenic vector construct sequences of the CaMV 35S promoter and the CP gene in the GM papaya developed in Hawaii (line 55-1, GenBank accession no. FJ467933.1) and Taiwan (lines 16-0-1, 17-0-5)¹⁵⁾ showed no similarity (data not shown) to the sequence from the dried papaya product. In addition, our preliminary study using real-time PCR showed that the dried papaya product also contained high concentrations of two transgenic sequences, the *nopaline synthase* terminator, which is used in transgenic cassettes, and *neomycin phosphotransferase II*, which is used as a selectable marker (data not shown). These results suggest that the dried papaya product was contaminated with a new unauthorized GM papaya line, which we named PRSV-SC.

Designing a Novel Construct-Specific Detection Method for PRSV-SC DNA fragmentation occurs during the manufacturing of processed foods.^{22,23)} To qualitatively detect PRSV-SC in processed foods, specific primers and a probe for a real-time PCR assay were designed to produce a short amplicon (70bp) based on the detected transgenic construct sequence. Also, to prevent false-negative results using real-time PCR, the PRSV-SC detection method was designed to generate a target amplicon shorter than the endogenous papaya *Chy* detection method (amplicon size 72bp). The primers were designed to amplify the region between the transgenic vector backbone and the CP gene sequence. The probe (SC-P) was designed to target the site of the CP gene's start codon (Fig. 2A).

The real-time PCR assay for PRSV-SC detection confirmed that the dried papaya was positive for PRSV-SC, producing Ct values of 23.48 and 23.34 with a threshold value of 0.2 in a duplicate test (Fig. 2C). Endogenous *Chy* detection was positive for all samples, with Ct values of 21.27 and 21.28 for the dried papaya and 20.77 and 20.87 for the non-GM papaya (Sunset), each with a threshold value of 0.2 in a duplicate test (Figs. 2B, C). No amplification signals were obtained from the non-template control, from genomic DNA derived from 14 other crops (maize, rice, soybean, flax, canola, chickpea, wheat, sugarbeet, cottonseed, potato, papaya, tomato, eggplant, and green pepper), or from other GM papaya lines, such as 55-1 (Hawaii) and PRSV-YK (Taiwan), using the developed PRSV-SC detection method (data not shown). These results indicated that the method is specific for detecting PRSV-SC.

In the present study, as a result of monitoring processed foods for contamination with unauthorized GM papaya, we found a dried papaya product containing a transgenic vector construct for the expression of PRSV's CP gene, which was cloned from isolates in Thailand. A novel construct-specific real-time PCR detection method was developed for detecting PRSV-SC. Because the genetic background of PRSV-SC was unknown, it was not possible to estimate the content level of PRSV-SC in the papaya product. Further studies are underway to determine the PRSV-SC detection limits of the real-time PCR, and whether the qualitative PCR method using the p323/p324 primer set can function as an initial screening for the presence of GM papaya in foods.

Acknowledgment This study was partly supported by Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

REFERENCES

- 1) Tecson Mendoza EM, Laurena AC, Botella JR. Recent advances in the development of transgenic papaya technology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, **14**, 423–462 (2008).
- 2) Kosiyachinda P, Srivatanakul M. The transgenic Thai papaya story: a milestone towards Thailand becoming a biotech crop country. *Asia-Pacific perspectives on biotechnology and bioethics*. (Calderbank D, Macer DRJ ed.) UNESCO Asia and Pacific Regional Bureau for Education, Thailand, pp. 11–15 (2008).
- 3) Fitch MMM, Manshardt RM, Gonsalves D, Slightom JL, Sanford JC. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Nat. Biotechnol.*, **10**, 1466–1472 (1992).
- 4) Gonsalves D. Transgenic papaya in Hawaii and beyond. *AgBioForum*, **7**, 36–40 (2004).
- 5) 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*, **43**, 301–305 (2002).
- 6) Akiyama H, Sugimoto K, Matsumoto M, Isuzugawa K, Shibuya M, Goda Y, Toyoda M. A detection method of recombinant DNA from genetically modified potato (NewLeaf Plus potato) and detection of NewLeaf Plus potato in snack. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **43**, 24–29 (2002).
- 7) Akiyama H, Sakata K, Kondo K, Tanaka A, Liu MS, 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).
- 8) Matsuoka T, Kawashima Y, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **41**, 137–143 (2000).
- 9) Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, Miura H, Goda Y, Kusakabe Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **42**, 24–32 (2001).
- 10) Matsuoka T, Kuribara H, Suefuji Y, Miura H, Kusakabe Y, Akiyama H, Goda Y, Isshiki K, Toyoda M, Hino A. A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **42**, 197–201 (2001).
- 11) 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).
- 12) Nakamura K, Akiyama H, Kawano N, Kobayashi T, Yoshimatsu K, Mano J, Kitta K, Ohmori K, Noguchi A, Kondo K, Teshima R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct. *Food Chem.*, **141**, 2618–2624 (2013).
- 13) 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 Trifid (FP967). *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 532–534 (2010).
- 14) Notification 658, Food Safety Commission of Japan, 9 July, 2009.
- 15) Fan M, Chen S, Kung Y, Cheng Y, Bau H, Su T, Yeh S. Transgene-specific and event-specific molecular markers for characterization of transgenic papaya lines resistant to papaya ringspot virus. *Transgenic Res.*, **18**, 971–986 (2009).
- 16) 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).
- 17) Nakamura K, Akiyama H, Takahashi Y, Kobayashi T, Noguchi A, Ohmori K, Kasahara M, Kitta K, Nakazawa H, Kondo K, Teshima R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chem.*, **136**, 895–901 (2013).
- 18) Ohmori K, Nakamura K, Kasahara M, Takabatake R, Kitta K, Fujimaki T, Kondo K, Teshima R, Akiyama H. A DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Contr.*, **32**, 728–735 (2013).
- 19) Wakui C, Akiyama H, Watanabe T, Fitch MM, 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. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **45**, 19–24 (2004).
- 20) Reference no. 2012.BBD, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) of European Commission, 14 May, 2012.
- 21) Kertbundit S, Attasart P, Panyim S, Juricek M. Sequence comparison of coat protein and 3' non-translated region of papaya ringspot virus isolates from Thailand. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **6**, 191–197 (1998).
- 22) Greiner R, Konietzny U, Jany KD. Is there any possibility of detecting the use of genetic engineering in processed foods? *Z. Ernährungswiss.*, **36**, 155–160 (1997).
- 23) Gryson N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 2003–2022 (2010).

化粧品・医薬部外品中の乳アレルギータンパク質の分析

(2014年6月17日受付)

(2014年9月2日受理)

大月典子^{a)}、杉本理恵^{b)}、佐藤恭子^{a)}、杉本直樹^{a)}、秋山卓美^{a)}、豊田正武^{b)}、穂山 浩^{a)}

a) 国立医薬品食品衛生研究所

b) 実践女子大学

The determination of major allergens from cow's milk in cosmetics and quasi-drugs for skin care

(Received June 17, 2014)

(Accepted September 2, 2014)

Noriko Otsuki^{a)}, Rie Sugimoto^{b)}, Kyoko Sato^{a)}, Naoki Sugimoto^{a)},
Takumi Akiyama^{a)}, Masatake Toyoda^{b)}, Hiroshi Akiyama^{a)}

a) National Institute of Health Sciences

b) Jissen Women's University

Abstract

The onset and exacerbation of food allergies in children has recently been increasing. To investigate the correlation between the development of milk allergies and epicutaneous sensitization with milk allergens, we determined the amount of milk allergens in cosmetics and quasi-drugs used for skin care. The amount of α_{S1} -casein and β -lactoglobulin was determined in 29 products using immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assay.

In 9 of the 29 products, the levels of α_{S1} -casein and β -lactoglobulin were quantified in the range of 7.1–18,810 $\mu\text{g/g}$ and more than the limit of detection (LOD) to 10,429 $\mu\text{g/g}$, respectively. Both α_{S1} -casein (7.1–18,810 $\mu\text{g/g}$) and β -lactoglobulin (4.4–10,429 $\mu\text{g/g}$) were detected in 5 products that displayed unfractionated milk ingredients such as yogurt or dried nonfat milk on the labels. On the other hand, β -lactoglobulin was detected in only 2 of 15 products (6.6 $\mu\text{g/g}$ and 6.9 $\mu\text{g/g}$) that displayed whey fraction on the label. In addition, the amount of α_{S1} -casein was less than LOD in 23 products that displayed whey, casein, or nonprotein fraction on the labels. According to these results, the levels of α_{S1} -casein and β -lactoglobulin tend to be influenced by the forms of milk ingredients.

Thus, these analyses revealed that 31% of randomly selected products contained detectable levels of α_{S1} -casein and β -lactoglobulin. Moreover, 4 of the 9 allergen-positive products, including soap, lotion, and bath powder, were recommended for infant use. Our study provides the first data regarding cosmetics containing allergens and the development of food allergy. These results suggest that the continuous use of cosmetics containing milk allergens may induce epicutaneous sensitization with milk allergens.

Keywords : 乳アレルギータンパク質、 α_{S1} -casein、 β -lactoglobulin、イムノクロマトグラフィー、ELISA
milk allergens, α_{S1} -casein, β -lactoglobulin, immunochromatography, ELISA

I 緒言

食物アレルギーは、「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して、生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義され¹⁾、乳児から成人まで幅広い年齢層に発症の可能性がある。特に有病率の高い年代は乳児から幼児早期にかけてであり、その三大原因食品原材料

として、卵、乳、小麦があげられる。乳幼児期に発症した食物アレルギーは、消化器機能の発達と免疫機構の成熟に伴い、抗原（アレルギータンパク質）に対する耐性を獲得し、症状が軽快していくことが一般的である。しかし、その一方でアレルギーの発症を発端として、年齢に応じて異なる症状、異なる抗原で発症する様々なアレルギーに発展する「アレルギーマーチ：allergy march」²⁾に進行するリスクがある。そ

連絡先：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 穂山 浩

Corresponding author: Hiroshi Akiyama, Division of Food Additives, National Institute of Health Science,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

のため、乳幼児期における食物アレルギーの発症を予防することはアレルギーマーチへの発展を防ぐための有効な対策と考えられる。

三大原因食品原材料の一つ、牛乳は栄養バランスの優れた食品であり、貴重なカルシウム源でもある。牛乳のタンパク質画分は弱酸性 (pH 4.6) でカゼイン画分と乳清画分 (ホエイ画分) に分けられ、カゼイン画分は総タンパク質画分の 80% を占める。一方乳清画分には、ラクトグロブリン、ラクトアルブミン、ラクトフェリン、血清アルブミン、免疫グロブリン、など様々なタンパク質が含まれている³⁾。牛乳中の主要アレルゲンタンパク質として、カゼイン画分には分子量 23.6 kD の α_{S1} -casein が、乳清画分には分子量 18.3 kD の β -lactoglobulin が知られている⁴⁾。

乳幼児の食物アレルギー発症の要因は、母乳あるいは離乳食からの食物アレルゲンタンパク質による経口感作が主要な経路だと考えられている⁵⁾。しかしながら近年では、乳幼児の食物アレルギーの発症と、患児の皮膚創傷や食品由来成分との接触頻度との相関性が指摘され、食物アレルゲンタンパク質の経皮感作も食物アレルギー発症の一因であることが示唆されている⁶⁾。

食品成分を含有した化粧品の使用後、同成分を含む食品を摂取したことが原因と推察される食物アレルギーの発症事例が、小麦^{7, 8)}、牛乳^{9, 10)}、果実^{11, 12)}、豆類¹³⁾、あるいは食用色素¹⁴⁻¹⁶⁾などで報告されている。特に、加水分解コムギ末含有洗顔石鹸の継続的な使用後、小麦を含む食品を摂取したことによるアナフィラキシー発症が報告された事例は、重大な社会問題となった¹⁷⁻²⁰⁾。

化粧品は薬事法により全成分表示が規定されており、それに準じて医薬部外品も業界の自主基準で全成分表示を推奨している²¹⁾。化粧品、医薬部外品には乳を原材料とする製品が多い。乳を原材料とする場合は、「乳」「ミルク」「カゼイン」「ホエイ」「ヨーグルト」などと表示されるが²²⁾、乳アレルゲンタンパク質の濃度に関する実態は把握されていない。

本研究において、我々は乳幼児用 11 製品を含む、牛乳を原材料とする国産化粧品と医薬部外品、主に浴用石鹸やローション等、29 製品中の乳アレルゲンタンパク質である、 α_{S1} -casein および β -lactoglobulin について、イムノクロマトグラフィーによるアレルゲン検出キットを用いた検出と enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による定量を行い、乳を原材料とするスキンケア製品に含まれる乳アレルゲンタンパク質の量的、質的な情報を明らかにすることを試みた。また、乳アレルゲンタンパク質の経皮感作の可能性について考察した。

II 研究方法

1. 試料

東京都内のスーパーおよびインターネットにおいて浴用石鹸類 13 製品、乳液・ローション・クリームを含む皮膚および頭髮の保護・保湿剤 9 製品、入浴剤 7 製品の、26 製品の化

粧品および 3 製品の医薬部外品を購入した (Table 1)。29 製品中 11 製品は乳幼児への使用を推奨しているものを選択した。すべての製品には日本国内の企業が製造元であることが記載されていた (計 18 社)。

記載されている乳成分は脱脂粉乳 (2 製品)、スキムミルク (3 製品)、ヨーグルト (1 製品)、ヨーグルト液 (3 製品)、ホエイ (13 製品)、ラクトフェリン (3 製品)、加水分解カゼイン (2 製品)、加水分解カゼイン Na (1 製品)、乳脂 (3 製品)、乳糖 (2 製品)、の 10 種類であった。2 種類以上の乳成分を原材料としている製品が 7 製品存在した。

2. イムノクロマトグラフィー

α_{S1} -Casein および β -lactoglobulin の検出は、アレルゲンアイ[®] イムノクロマトキット 加熱用 (製品番号: カゼイン; 056682、ホエイ; 056718、プリマハム株式会社) を用いて測定した。試料の調製は各キットに付属したプロトコールに従った。詳述すると、製品 1 g を秤量し、キット付属の試料抽出液を加えて 20 mL になるよう調製した (pH6.0 ~ 8.0)。ミキサーを用いて完全に攪拌・混合した後、20 分に一回攪拌しつつ、100°C の沸騰水浴中で 60 分加熱した。流水で室温に冷却後、4°C、4000 rpm、20 分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清はろ紙 (JIS P3801: 5 種 A、東洋濾紙) でろ過し、測定用試料として用いた。試料液調製から検出まで 2 回の検討を行い、結果を示した。

3. ELISA

β -Lactoglobulin はアレルゲンアイ[®] ELISA 牛乳キット (プリマハム株式会社)、 α_{S1} -casein はモリナガ FASPEK 特定原材料測定キット 牛乳測定キット (カゼイン) (株式会社森永生化学研究所) を用いて測定した。試料の調製は各キットに付属したプロトコールに従った。詳述すると、1 g の製品を秤量し、試料抽出液を加えて室温で 12 時間振とう混和し、均等に分散させて 20 mL になるよう調製した (pH6.0 ~ 8.0)。付属の希釈用緩衝液でさらに 20 倍希釈し、測定用試料とした。検出にはマイクロプレートリーダー (EMax[®], Molecular devices, Sunnyvale, CA) を使用し、吸光度を測定した。試料液調製から検出まで 2 回の検討を行い、その平均値を測定用試料の測定値とした。

測定用試料の測定値 (X ng/mL) に測定時の希釈倍率として 20 倍、さらに抽出時の希釈倍率として 20 倍を乗じた後、単位を統一し、製品重量 1 g 当たりのタンパク質濃度として、Y μ g/g を算出した。以下に換算式を示す (式 A)。

$Y \mu\text{g/g} = X \text{ ng/ml} \times 20$ (測定時の希釈倍率) $\times 20$ (抽出時の希釈倍率) $\times 1/1000$ —— (式 A)

III 結果

1. イムノクロマトグラフィーによる分析

乳由来成分を原材料とする 29 製品を試料として、イムノクロマトグラフィーによる α_{S1} -casein、 β -lactoglobulin の検出を

行った。使用したそれぞれのキットの添付文書によると、検出限界は両キットともに、食品製品重量あたりのアレルゲンタンパク質量 2 µg/g とされている。

α_{S1}-Casein は、乳幼児用製品では入浴剤 A-11 の 1 製品、一般用製品ではボディソープ B-1 および B-2、フェイスパック B-11、入浴剤 B-15 の 4 製品の計 5 製品から検出された。日時を変えて再分析したところ、上記 5 製品は同様に検出され、さらに一般用入浴剤 B-14 から検出された。本分析により、29 製品中、乳幼児用 1 製品を含む 6 製品の化粧品および医薬部外品より α_{S1}-casein が検出された (Table 1)。

β-Lactoglobulin は、乳幼児用製品では全身シャンプー A-1、ローション A-7 および入浴剤 A-11 の 3 製品から、一般用製品ではボディソープ B-2、フェイスパック B-11、および入浴剤 B-15 の 3 製品から検出された。日時を変えて再分析したところ、先の 6 製品は同様に検出された。さらに一般用入浴剤 B-14 と乳幼児用入浴剤 A-10 の 2 製品より、検出限界に近いと思われる薄いバンドが検出された。本分析により、29 製品中、乳幼児向け 4 製品を含む 8 製品の化粧品および

医薬部外品より β-lactoglobulin が検出された (Table 1)。

これらの結果により、29 製品中 9 製品から α_{S1}-casein と β-lactoglobulin の両方、あるいはいずれかの乳アレルゲンタンパク質が検出された。また、初回に検出されず、再分析で検出された製品が 2 製品あった (A-10: β-lactoglobulin、B-14: α_{S1}-casein、β-lactoglobulin)。その理由として、含まれている乳アレルゲンタンパク質量が、検出限界に近い量であったこと、あるいは製品の難溶性により試料抽出液に均等に分散せず、測定試料液の均一化が不十分であったことが考えられた。

2. ELISA による分析

ELISA により 29 製品中の α_{S1}-casein および β-lactoglobulin を定量した。両キットともに、定量限界は食品製品重量あたりのアレルゲンタンパク質量 0.31 µg/g であった。

α_{S1}-Casein は、乳幼児用 1 製品を含む 5 製品 (A-11、B-1、B-2、B-11、B-15) から定量された。それぞれの製品における含有量は、乳幼児用製品として入浴剤 A-11 が 18,800

Table 1. 牛乳由来成分が表示された化粧品・医薬部外品に含まれるアレルゲンタンパク質の分析結果

	化粧品および医薬部外品	順位 / 全表示成分	成分表示	α _{S1} -casein		β-lactoglobulin				
				イムノクロマトグラフィー	ELISA (µg/g)	イムノクロマトグラフィー	ELISA (µg/g)			
				1	2	1	2			
乳幼児用	A-1	全身シャンプー	8 / 12	ラクトフェリン	-	-	LOD	+	+	6.6
	A-2	髪用シャンプー	5 / 13	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-3	全身シャンプー	16 / 24	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-4	ハンドソープ	10 / 25	ヨーグルト液 (ヨーグルトエキス)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-5	ハンドソープ (医薬部外品)		ホエイ ラクトフェリン液	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-6	石鹸	3 / 11	乳脂 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-7	ローション	8 / 23	ホエイ	-	-	LOD	+	+	6.9
	A-8	ローション	13 / 45	ラクトフェリン	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-9	乳液	7 / 17	ヨーグルト液 (ヨーグルトエキス)	-	-	LOD	-	-	LOD
	A-10	入浴剤 (医薬部外品)		加水分解カゼイン Na	-	-	LOD	-	(±)	<LOQ
	A-11	入浴剤 (医薬部外品)		脱脂粉乳	+	+	18810	+	+	10429
一般用	B-1	ボディソープ	8, 9 / 20	ホエイ (牛乳) スキムミルク (牛乳)	+	+	7.1	-	-	7.4
	B-2	ボディソープ	8, 9 / 20	ホエイ (牛乳) スキムミルク (牛乳)	+	+	54.4	+	+	4.4
	B-3	シャンプー	10 / 22	加水分解カゼイン	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-4	シャンプー	9 / 19	加水分解カゼイン	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-5	ボディソープ	11 / 20	ラクトフェリン (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-6	ボディソープ	3 / 7	乳脂 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-7	ボディソープ	11 / 26	乳脂 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-8	ローション	4 / 21	ホエイ	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-9	ローション	8 / 35	ホエイ	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-10	ボディクリーム	17 / 27	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-11	フェイスパック	9 / 25	ヨーグルト	+	+	569	+	+	1240
	B-12	ヘアトリートメント	25 / 30	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-13	リップクリーム	16 / 23	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-14	入浴剤	8, 10 / 22	スキムミルク (牛乳) ホエイ (牛乳)	-	+	LOD	-	+	1.3
	B-15	入浴剤	6, 8 / 16	ヨーグルト液 (牛乳) 脱脂粉乳	+	+	487	+	+	1.3
	B-16	入浴剤	7 / 15	ホエイ (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-17	入浴剤	5 / 27	乳糖 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD
	B-18	入浴剤	3 / 21	乳糖 (牛乳)	-	-	LOD	-	-	LOD

LOQ: 定量限界 (0.31 µg/g)、LOD: 検出限界以下

乳幼児への使用を推奨している 11 製品については製品 A-1 から A-11 とし、特に言及のない製品については B-1 から B-18 とした。化粧品に関して全表示成分のうちの順番を記した。表示上のホエイとは乳清のことである。

μg/g、一般用製品としてボディソープ B-1 が 7.1 μg/g、同じくボディソープ B-2 が 54.4 μg/g、フェイスパック B-11 は 569 μg/g、入浴剤 B-15 は 487 μg/g であった (Table 1)。

β-lactoglobulin は、乳幼児向け 3 製品を含む 8 製品 (A-1、A-7、A-11、B-1、B-2、B-11、B-14、B-15) から定量値が得られた。これら 8 製品のうち B-1 のみ、イムノクロマトグラフィーでは検出されていないが、他の 7 製品はすべて検出されていた。さらにイムノクロマトグラフィーでは検出の判別が困難であった乳幼児用入浴剤 A-10 は、定量限界未満 (<0.31 μg/g)、検出限界以上として検出された。その他 20 製品は検出限界以下であった。各濃度は、乳幼児用全身シャンプー A-1 が 6.6 μg/g、ベビーローション A-7 が 6.9 μg/g であった。一般用製品では B-1 および B-2 のボディソープがそれぞれ 7.4 μg/g と 4.4 μg/g であった。さらに B-11 のフェイスパックが 1240 μg/g であった。一般用入浴剤の B-14 および B-15 はいずれも 1.3 μg/g の比較的低い値であったが、乳幼児用入浴剤 A-11 は 10,429 μg/g の濃度を検出した (Table 1)。

これらの結果により、29 製品中、乳幼児向け 4 製品を含む 9 製品の化粧品および医薬部外品より α_{SI}-casein、β-lactoglobulin の両方、あるいはいずれかの乳アレルギータンパク質が ELISA により検出され、そのうち 8 製品が、1.3 μg/g 以上の定量値を得た。定量された製品のうち、最も低濃度な α_{SI}-casein 濃度を示した製品は一般用ボディソープ B-1 の 7.1 μg/g であり、β-lactoglobulin では一般用入浴剤 B-14,15 の 1.3 μg/g であった。また、α_{SI}-casein が 18,810 μg/g と最も高濃度を示した乳幼児用入浴剤 A-11 の製品は、β-lactoglobulin も 10,429 μg/g と高い値を示し、両乳アレルギータンパク質が定量された。

3. 乳に関する成分表示と ELISA による定量結果の関係

α_{SI}-Casein はカゼイン画分に、β-lactoglobulin は乳清画分に存在する。そこで乳成分の表示画分と ELISA による定量結果の関係について検討するために、測定結果を表示成分別に再編集した (Table 2)。29 製品に記載された乳成分を、I、II、III、IV の 4 つのグループに分類した。脱脂粉乳、スキムミルク、ヨーグルトなど、全乳から加工された成分が表示されている製品を I、ヨーグルト液、ホエイ、ラクトフェリンなど乳清画分に含まれる成分のみが表示されている製品を II とした。一方、加水分解カゼイン等、カゼイン画分に含まれる成分が表示されている製品を III とし、乳脂、乳糖など非タンパク質画分である成分が表示されている製品を IV とした。全乳から加工された成分を表示した I に分類された製品は 6 製品存在した。そのうちの 5 製品から α_{SI}-casein と β-lactoglobulin の両方の乳アレルギータンパク質が定量され、残り 1 製品からは β-lactoglobulin が定量された。一方、乳清画分に含まれる成分を表示した II に分類された 15 製品からは、2 製品のみ、β-lactoglobulin が単独で定量され、α_{SI}-casein は定量されなかった。残り 13 製品はどちらの乳アレルギータンパク質も検出限界以下であった。カゼイン画分である「加水分解カゼイン」と表示された III の 3 製品からは、いずれの製品からも α_{SI}-casein は検出されず、1 製品のみ定量限界以下、検出限界以上の β-lactoglobulin が検出された。非タンパク質画分である乳脂、乳糖と表示された IV の 5 製品からはいずれの乳アレルギータンパク質も検出されなかった。この結果により、全乳から加工された成分を表示した製品に乳アレルギータンパク質が含まれる可能性が高

Table 2. 乳に関する表示成分と検出したアレルギータンパク質

画分	表示成分	製品数	アレルギータンパク質				
			α _{SI} -casein	β-lactoglobulin	α _{SI} -casein β-lactoglobulin	< LOD ^{a)}	
I	脱脂粉乳	1	6	-----	1 (A-11)	-----	
	ホエイ・スキムミルク	3			1 (B-14)		2 (B-1, B-2)
	ヨーグルト	1			1 (B-11)		
	ヨーグルト液 (牛乳)・脱脂粉乳	1			1 (B-15)		
II	ヨーグルト液 (ヨーグルトエキス)	2	15	-----	-----	2	
	ホエイ	9			1 (A-7)	8	
	ラクトフェリン	3			1 (A-1)	2	
	ホエイ・ラクトフェリン	1			-----	1	
III	加水分解カゼイン	2	3	-----	-----	2	
	加水分解カゼイン Na	1			1 (A-10) ^{b)}		
IV	乳脂	3	5	-----	-----	3	
	乳糖	2			-----	2	
計		29		0	4	5	20

^{a)} < LOD: 検出限界以下

^{b)} LOD 以上 LOQ 以下の結果を得た製品 (< 0.31 μg/g)

く、特に α_{S1} -casein と β -lactoglobulin の両方が含まれる可能性が高いことが示された。一方、乳清画分、カゼイン画分、あるいは非タンパク質画分など、精製画分を表示した製品の、 α_{S1} -casein、 β -lactoglobulin は比較的低値あるいは検出限界以下を示した。

次に全表示成分中の乳成分の表示順位と分析結果について比較した (Table 1)。医薬部外品 3 製品に関しては成分配合量の順位の情報がなため検討から除外した。検討した化粧品 26 製品は、表示成分が 7 成分で構成されている製品から 45 成分で構成されている製品まで存在した。非タンパク質画分である乳脂、乳糖を原材料とした製品では、B-18 で 21 成分中 3 番目、A-6 で 11 成分中 3 番目など、比較的上位の表示順位にあり、相対的な配合量が多いと考えられたが、いずれの乳アレルゲンタンパク質も検出限界以下であった。加水分解カゼインを原材料とした製品では、いずれの乳アレルゲンタンパク質も検出限界以下であったが、B-3 で 22 成分中 9 番目、B-4 で 19 成分中 9 番目であった。全乳を原材料とした製品では、 α_{S1} -casein を比較的高い値で検出した B-2 のスキムミルクの表示が 20 成分中 9 番目、B-15 の脱脂粉乳の表示が 18 成分中 8 番目であった。 α_{S1} -casein と β -lactoglobulin の両方を高く検出した B-11 のフェイスパックは、ヨーグルトの表示が 25 成分中 9 番目であった。このように、原材料の乳成分の表示順位が上位でも乳アレルゲンタンパク質が検出されない製品があり、表示順位が中位でも乳アレルゲンタンパク質が検出される製品もあり、検出と表示順位に明らかな相関は認められなかった。むしろ、Table 2 に示されたように、全乳を原材料とした製品は、乳タンパク質、非タンパク質ともに精製画分を原材料とした製品よりも、乳アレルゲンタンパク質が高く検出されたことから、乳アレルゲンタンパク質量は、製品中の乳成分の種類には依存するが、乳成分の配合割合には依存しない傾向が示された。

IV 考察

本研究において、乳を原材料とした国産の化粧品および医薬部外品より、牛乳アレルギーの主要アレルゲンタンパク質である、 α_{S1} -casein および β -lactoglobulin の検出と定量を試みた。本稿は市販の化粧品および医薬部外品中の乳アレルゲンタンパク質を分析した初めての報告である。29 製品中の 8 製品よりいずれかの乳アレルゲンタンパク質が定量された。また、定量限界以下、検出限界以上の β -lactoglobulin を検出した 1 製品を含め、乳アレルゲンタンパク質が検出された製品は 29 製品中 9 製品で、その比率は 31% であった。

B-14 の入浴剤中の α_{S1} -casein は、イムノクロマトグラフィーでは陽性を示したが、ELISA では検出限界以下であった。感度の高い ELISA で検出限界以下であったこと、イムノクロマトグラフィーの 2 回の測定結果は陰性と陽性の結果を一度ずつ示したことから、B-14 の測定試料液中には、検出限界近くの非常に微量な α_{S1} -casein が存在し、イムノクロマトグラフィーで検出された可能性が考えられた。また B-1 のボディ

ソープ中の β -lactoglobulin の検出結果は、イムノクロマトグラフィーでは陰性だったが、ELISA では 7.4 $\mu\text{g/g}$ と定量された。ELISA の測定試料液の調製過程には、室温で 12 時間以上、抽出液との振とう混和を行う操作がある。この操作により様々な加工条件で変性した製品中の β -lactoglobulin を抽出することが可能とされている²³⁾。一方、イムノクロマトグラフィーの測定試料液の調製過程では、沸騰水浴中で 60 分間の振とう混和による抽出を行う。このような、分析法による製品からのタンパク質抽出法の相違が、2 種類のキットの検出感度の違い (イムノクロマトグラフィー: 2 $\mu\text{g/g}$ 、ELISA: 0.31 $\mu\text{g/g}$) の一因と考えられた。

石鹸・ローションでは、乳幼児用 2 製品、一般用 2 製品より乳アレルゲンタンパク質が検出された。特に一般用 1 製品から、 α_{S1} -casein が 54.4 $\mu\text{g/g}$ と比較的高濃度で検出された。いずれも希釈せずに用いる製品であるため、連続した使用による経皮感作が懸念された。入浴剤では、乳幼児への使用を目的とした医薬部外品の A-11 が、29 製品の中で α_{S1} -casein 18,810 $\mu\text{g/g}$ 、 β -lactoglobulin 10,429 $\mu\text{g/g}$ という高値を示した。使用時には希釈するため、製品 1 包 20 g を浴槽 200 L の水に溶解した場合、最終濃度は各アレルゲンタンパク質とも 1.0 ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ になる。この濃度での経皮感作の可能性については明らかではないが、乳幼児は皮膚の感受性が高く乳児湿疹を発症しやすいことから、繰り返しの使用により乳アレルゲンタンパク質の感作性が高くなることが推察された。その点からも乳幼児、あるいは牛乳アレルギー患者には、石鹸、ローション、入浴剤などの浴用化粧品の選別には十分な配慮が必要である。また、B-11 のフェイスパックより、569 $\mu\text{g/g}$ の α_{S1} -casein と 1240 $\mu\text{g/g}$ の β -lactoglobulin が検出された。製品の目的上、乳幼児は使用しないことが予想されるが、使用者の皮膚には乳アレルゲンタンパク質を含むパック剤が数分間接触する状態になる。顔面への使用は、湿疹や小さな傷などに気付かないことがあるため、特に牛乳アレルギー患者の連続使用は、注意が必要であると思われる。

本研究の分析では、全乳から加工された原材料を使用した 6 製品中 5 製品より α_{S1} -casein と β -lactoglobulin の両方が検出され、検出濃度も高い傾向にあった。それらの原材料表示としてスキムミルク、脱脂粉乳、ヨーグルトの三種類の表示が記載されていた。いずれも、生乳を高温加熱殺菌したのち、脱脂粉乳・スキムミルクは高速遠心分離により脱脂後、噴霧乾燥したもの、またヨーグルトは乳酸菌や酵母による発酵の過程を経たものであり、それ以上の分画精製を行っていない。この結果より、全乳から加工された原材料を使用した製品では、製造工程を経た後も α_{S1} -casein と β -lactoglobulin は本研究で使用したイムノクロマトグラフィーおよび ELISA の抗体で認識される部位を維持して存在している可能性が示唆された。

一方、乳清画分に含まれる、ヨーグルトの上清部分を分離したヨーグルト液、ホエイ、ラクトフェリン等を原材料とする 15 製品の分析では、2 製品より 6.6 $\mu\text{g/g}$ と 6.9 $\mu\text{g/g}$ と比較的低濃度の β -lactoglobulin が検出され、残り 13 製品は検出限界以下であった。この結果より、乳清に精製した画分を原材

料とした製品では、画分の精製過程、あるいは製品の製造工程で乳清中の β -lactoglobulin が分解、変性、あるいは除去される可能性が考えられた。

また、乳清画分、カゼイン画分、乳脂、乳糖を原材料とした 23 製品では、いずれの製品からも α _{S1}-casein は検出されなかった。カゼイン画分を除去して精製した、乳清画分、乳脂、乳糖の場合、カゼインの特性である酸性条件下やカルシウム存在下で沈殿する性質を利用することで、比較的容易にカゼイン画分の除去が可能であることが推察された。一方、カゼイン画分を加水分解カゼインとして精製した成分は、検出抗体の認識するカゼイン上の抗原決定基の配列に、加水分解に伴う変性や分解が起きている可能性が考えられた。また、これらの結果からは、化粧品由来の共存物質が検出反応を部分的に阻害している可能性を否定することはできない。

ピーナッツアレルギーを対象とした Lack らのコホート研究によると、乳児の皮膚創傷の存在、あるいはピーナッツオイルを含む保湿剤で継続的に肌の手入れを行う行為は、ピーナッツアレルギー発症頻度とそれぞれ独立した相関性を示したことにより、経皮感作によるアレルギー発症の可能性が示唆された²⁴⁾。同時期、T 細胞抗原受容体遺伝子改変マウスを用いた検討で、免疫寛容を誘導する抗原を、経口投与前に皮膚に塗布した結果、免疫寛容誘導が阻害される現象が、オボアルブミン (OVA)²⁵⁾、次いでピーナッツタンパク質²⁶⁾ を抗原として報告され、経皮感作の成立と経口免疫寛容の破綻に正の相関がある可能性が示唆された。

さらに遺伝子解析により、表皮の最上層である角質層の保護バリア機能を担うタンパク質、filaggrin をコードする塩基配列に、アトピー素因特異的な遺伝子変異が発見され、保護バリア機能を欠失した数種の filaggrin 変異体が存在する事が報告された^{27, 28)}。角質の一つ下層である顆粒層では、外部からの異物を認識する機能をもつランゲルハンス細胞が樹状突起を伸長し、侵入しようとする異物を捕獲することが知られている²⁹⁾。正常な状態では角質層の保護バリア機能により顆粒層には到達しない異物が、Filaggrin の機能欠損により角質層に侵入し、外来抗原として認識され、抗体・サイトカイン産生、細胞浸潤を伴う組織の炎症が誘導されることが示された³⁰⁾。

経皮感作による食物アレルギーの発症を誘導した代表的な例として、小麦タンパク質の加水分解物を含む化粧品の使用による即時型小麦アレルギーの発症例が国外で報告されている^{7, 8, 31, 32)}。我が国においては、洗顔石鹸に含まれていた加水分解コムギ末、グルパール 19S との継続的な接触を原因とする経皮感作により、小麦を含む食品を摂取した後に小麦依存性運動誘発アナフィラキシー (wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis ; WDEIA) を発症した事例が報告され、社会問題化した¹⁷⁻²⁰⁾。加水分解コムギ末の不完全な分解、再重合による分子量の増大 (30 ~ 50 kD)、あるいは分解反応後の新たな抗原決定基の出現、などにより、感作性を有するに至る結果となったことが推察されている²⁰⁾。

一方、食品成分のアレルゲン性を低減化する試みは既に行われている³³⁾。特定の食物アレルゲンタンパク質について、

感作と症状惹起に関わる抗原決定基の修飾、変性、分解等による低アレルゲン化が報告されている。また、アレルゲン性を修飾する物質として、化粧品成分の皮膚への浸透や拡散を促進する基剤・界面活性剤なども機能している可能性が考えられる。食品由来の有効成分に含まれるアレルゲン性の低減化と適切な基剤・界面活性剤の選択により、経皮感作のリスクの軽減が期待されることから、より機能的で安全性の高い、化粧品および医薬部外品の原材料の開発が望まれる。

本研究により、乳アレルゲンタンパク質を含む国産の化粧品、医薬部外品の継続的な使用による経皮感作のリスクが考えられた。本研究では国産製品に限定したが、国内に流通する海外製品も検討する必要があると考えられる。また、 α _{S1}-casein、 β -lactoglobulin 以外の乳アレルゲンタンパク質や卵、小麦、果実、豆類⁷⁻¹³⁾ などに由来する他の食物アレルゲンタンパク質についても調査することが望まれる。

V 結論

近年、食物アレルギー発症のメカニズムの一因として経皮・経粘膜感作が示唆されている。我々は乳幼児に多い、牛乳アレルギーの発症と経皮感作の可能性について考察するために、乳幼児向け 11 製品を含む、乳成分配合の国産化粧品および医薬部外品 29 製品について、市販キットを用いて牛乳アレルギーの主要アレルゲンタンパク質である α _{S1}-casein と β -lactoglobulin の測定を試みた。その結果、乳幼児用 4 製品を含む 9 製品から乳アレルゲンタンパク質を検出した。そのうち、全乳から加工された成分を原材料とした 5 製品から β -lactoglobulin および α _{S1}-casein の両方が検出された。一方、乳清画分、カゼイン画分、乳糖画分、乳脂画分を原材料とした 23 製品は 3 製品から比較的低濃度の β -lactoglobulin が検出されたが、 α _{S1}-casein は検出限界以下であった。化粧品・医薬部外品に含まれる食品由来のアレルゲンタンパク質の濃度やアレルゲン性に関する情報の蓄積は、食物アレルギーの発症とアレルギーマーチの予防のために重要と考えられる。

VI 謝辞

本稿で紹介した内容の一部は、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) によるものである。実験に協力して下さった実践女子大学食生活科学科生活基礎化学研究室の学生の皆様に深謝します。

VII 参考文献

- 1) 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会 (宇理須厚雄、近藤直実監修) “食物アレルギー診療ガイドライン 2012” 東京、共和企画、2012。

- 2) Baba, M., Yamaguchi, K.: "The allergy march": Can it be prevented? *Allergy & Clinical Immunology News*, 1(3), 71-73 (1989).
- 3) Renner E., (Furuyama, J. trs.), "Milk and dairy products in human nutrition (Gyunyu To Nyuseihin No Hikaku)", Tokyo, Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Company, 1983.
- 4) Wal, J. M.: Structure and function of milk allergens. *Allergy*, 56, Suppl 67, 35-38 (2001).
- 5) Pali-Scholl, I., Renz, H., Jensen-Jarolim, E.: Update on allergies in pregnancy, lactation, and early childhood. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5), 1012-1021 (2009).
- 6) Lack, G.: Epidemiologic risks for food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1331-1336 (2008).
- 7) Lauriere, M., Pecquet, C., Bouchez-Mahiout, I., Snegaroff, J., Bayrou, O., Raison-Peyron, N., Vigan, M.: Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis*, 54(5), 283-289 (2006).
- 8) Olaiwan, A., Pecquet, C., Mathelier-Fusade, P., Frances, C.: Contact urticaria induced by hydrolyzed wheat proteins in cosmetics. *Ann. Dermatol. Venereol.*, 137(4), 281-284 (2010).
- 9) Wang, J., Nowak-Wegrzyn, A.: Reactions of 2 young children with milk allergy after cutaneous exposure to milk-containing cosmetic products. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 158(11), 1089-1090 (2004).
- 10) Bito, T., Kanda, E., Tanaka, M., Fukunaga, A., Horikawa, T., Nishigori, C.: Cows milk-dependent exercise-induced anaphylaxis under the condition of a premenstrual or ovulatory phase following skin sensitization. *Allergology International*. 57(4), 437-439 (2008).
- 11) Vieira, T., Cunha, L., Neves, E., Falcao, H.: Diagnostic usefulness of component-resolved diagnosis by skin prick tests and specific IgE to single allergen components in children with allergy to fruits and vegetables. *Allergologia et Immunopathologia*, 42(2), 127-135 (2014).
- 12) Antignac, E., Nohynek, G. J., Re, T., Clouzeau, J., Toutain, H.: Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food Chem. Toxicol.*, 49(2), 324-341 (2011).
- 13) Gu, X., Beardslee, T., Zeece, M., Sarath, G., Markwell, J.: Identification of IgE-binding proteins in soy lecithin. *International Archives of Allergy and Immunology*, 126(3), 218-225 (2001).
- 14) Kotobuki, Y., Azukizawa, H., Nishida, Y., Murota, H., Katayama, I., Yoshikawa, K.: Case of urticaria due to cochineal dye in red-colored diet. *Arerugi (Japanese Society of Allergology)*, 56(12), 1510-1514 (2007).
- 15) Yamakawa, Y., Oosuna, H., Yamakawa, T., Aihara, M., Ikezawa, Z.: Cochineal extract-induced immediate allergy. *J. Dermatol*, 36(1), 72-74 (2009).
- 16) Suzuki, K., Hirokawa, K., Yagami, A., Matsunaga, K.: Allergic contact dermatitis from carmine in cosmetic blush. *Dermatitis*, 22(6), 348-349 (2011).
- 17) Chinuki, Y., Sakieda, K., Kaneko, S., Nakamura, C., Murata, S., Sumikawa, Y., Niihara, H., Yoshida, Y., Tohgi, K., Morita, E.: Three cases of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis possibly sensitized by hydrolyzed wheat proteins in soap. *Jpn. J. Dermatol.*, 120(12), 2421-2425 (2010).
- 18) Chinuki, Y., Kaneko, S., Sakieda, K., Murata, S., Yoshida, Y., Morita, E.: A case of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis sensitized with hydrolysed wheat protein in a soap. *Contact Dermatitis*, 65(1), 55-57 (2011).
- 19) Fukutomi, Y., Itagaki, Y., Taniguchi, M., Saito, A., Yasueda, H., Nakazawa, T., Hasegawa, M., Nakamura, H., Akiyama, K.: Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 531-533 (2011).
- 20) Teshima, R.: Kasui Bunkai Komugi Ni Yoru Arerugi Ni Tsuite. *The Pharmaceutical Society of Japan*, 49, No.2 116-120 (2013).
- 21) 厚生省告示第 332 号 (2000) "薬事法第五十九条第八号及び第六十一条第四号の規定に基づき名称を記載しなければならないものとして厚生労働大臣の指定する医薬部外品及び化粧品成分" 平成 12 年 9 月 29 日 .
- 22) Japan Cosmetic Industry Association. ed., "Nihon Keshohin Seibun Hyoji Meisho Jiten, 3rd Ed.", Tokyo, Yakuji Nippo Sha, 2007.
- 23) Kato, S., Yagi, T., Namioka, M., Akimoto, M., Arihara, K.: Development of a cow's milk detection sandwich ELISA kit using monoclonal antibodies. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 61(6), 223-231 (2014).
- 24) Lack, G., Fox, D., Northstone, K., Golding, J.: Factors associated with the development of peanut allergy in childhood. *N. Engl. J. Med.*, 348(11), 977-985 (2003).
- 25) Hsieh, K. Y., Tsai, C. C., Wu, C. H., Lin, R. H.: Epicutaneous exposure to protein antigen and food allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 33(8), 1067-1075 (2003).
- 26) Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R., Strobel, S.: Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy*, 35(6), 757-766 (2005).
- 27) Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M.,

- Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H.: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.*, **38**(4), 441-446 (2006).
- 28) Osawa, R., Konno, S., Akiyama, M., Nemoto-Hasebe, I., Nomura, T., Nomura, Y., Abe, R., Sandilands, A., McLean, W. H., Hizawa, N., Nishimura, M., Shimizu, H.: Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients suffering from atopic eczema and asthma. *The Journal of Investigative Dermatology*, **130**(12), 2834-2836 (2010).
- 29) Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., Amagai, M.: External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *The Journal of Experimental Medicine*, **206**(13), 2937-2946 (2009).
- 30) Oyoshi, M. K., Murphy, G. F., Geha, R. S.: Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **124**(3), 485-493, 493 e481 (2009).
- 31) Sanchez-Perez, J., Sanz, T., Garcia-Diez, A.: Allergic contact dermatitis from hydrolyzed wheat protein in cosmetic cream. *Contact Dermatitis*, **42**(6), 360 (2000).
- 32) Varjonen, E., Petman, L., Mäkinen-Kiljunen, S.: Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. *Allergy*, **55**(3), 294-296 (2000).
- 33) Ogawa, T.: Shokuhin Arerugi To Arerugen (Food allergis and allergens). *Eiyogaku Zasshi (The Japanese Journal of Nutrition)*, **53**, 155-166 (1995).

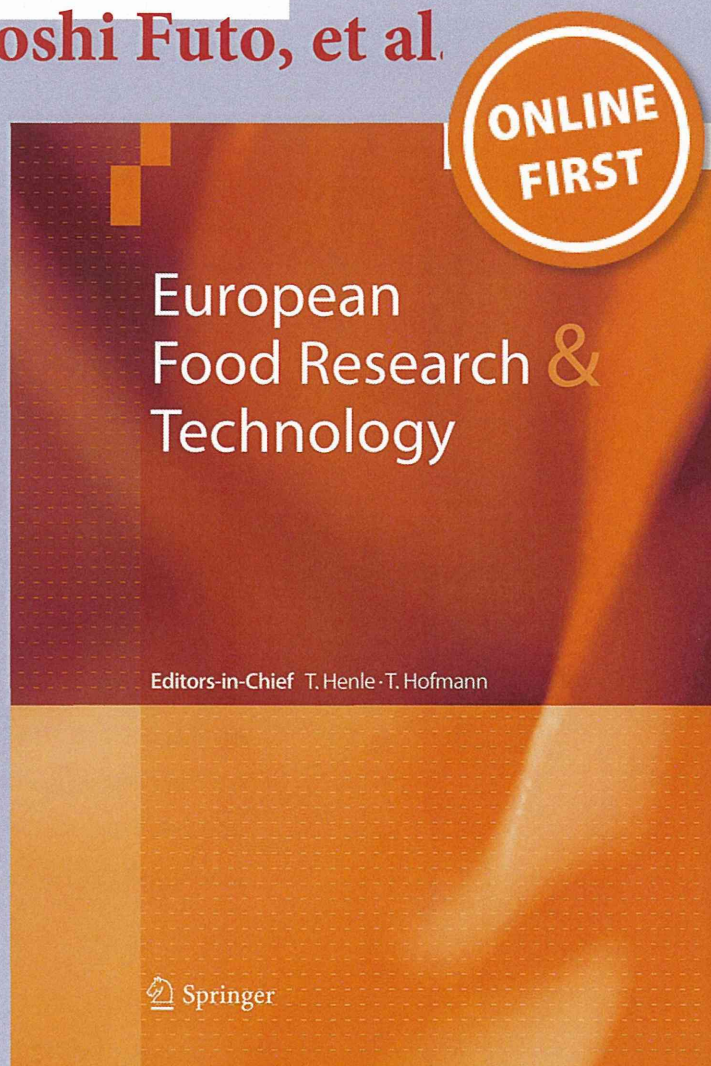
A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize

Akio Noguchi, Hiroshi Akiyama, Kosuke Nakamura, Kozue Sakata, Yasutaka Minegishi, Junichi Mano, Reona Takabatake, Satoshi Futo, et al.

European Food Research and Technology
Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A

ISSN 1438-2377

Eur Food Res Technol
DOI 10.1007/s00217-014-2340-7



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize

Akio Noguchi · Hiroshi Akiyama · Kosuke Nakamura · Kozue Sakata · Yasutaka Minegishi · Junichi Mano · Reona Takabatake · Satoshi Futo · Kazumi Kitta · Reiko Teshima · Kazunari Kondo · Tomoko Nishimaki-Mogami

Received: 30 March 2014 / Revised: 7 September 2014 / Accepted: 16 September 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Stacked genetically modified (GM) maize is increasingly produced; thereby, current event-specific quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) methods have led to the overestimation of GM organism (GMO) content compared with the actual weight/weight percentage of GM organism in maize samples. We developed a feasible qPCR method in which the GMO content is calculated based on the quantification of two herbicide-tolerant trait genes, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4 (*cp4epsps*) and phosphinothricin *N*-acetyl-transferase from *Streptomyces viridochromogenes* (*pat*) to quantify the GMO content in ground grain samples containing stacked GM maize.

The GMO contents of two genes were quantified using a plasmid calibrant and summed for quantification of total GMO content. The trait-specific method revealed lower biases for examination of test samples containing stacked GM maize compared with the event-specific method. Our results clearly show that the trait-specific method is not only simple and cost-effective, but also useful in quantifying the GMO content in ground grain samples containing stacked GM maize, which are expected to be major events in the near future. The developed method would be the only feasible way to conduct the quantification of GMO content in the ground maize samples containing stacked GM maize for the verification of the labeling regulation.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00217-014-2340-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Noguchi · H. Akiyama · K. Nakamura · K. Sakata · R. Teshima · K. Kondo (✉) · T. Nishimaki-Mogami
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
e-mail: kondo@nihs.go.jp

A. Noguchi
e-mail: noguchi@nihs.go.jp

Y. Minegishi
Nippon Gene Co. Ltd., 1-5 Kandanishiki-cho, Chiyoda-ku,
Tokyo 101-0054, Japan

J. Mano · R. Takabatake · K. Kitta
National Food Research Institute, National Agriculture and Food
Research Organization, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba,
Ibaraki 305-8642, Japan

S. Futo
Fasmac Co., Ltd., 5-1-3 Midorigaoka, Atsugi,
Kanagawa 243-0041, Japan

Keywords Genetically modified maize · qPCR · Trait-specific method · Stacked GM maize

Introduction

In recent years, an increasing number of genetically modified (GM) crops have been developed using recombinant DNA technology and are widely cultivated as sources of food and feed in many countries. GM crops have generally been assessed and authorized for use as food by administrative authorities. However, the use of GM crops for food remains controversial among consumers in many countries. Labeling of GM foods allows consumers to make informed food choices. Therefore, many countries have mandated the labeling of foods containing a specified threshold level of GM crops (0.9 % in the European Union, 3 % in Korea and 5 % in Japan) [1]. To monitor the content of GM crops such as maize [2–8], soybean [2–4, 8–10] and other crops [11–13] in foods, in general, the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) has been used. In several

countries including Japan, the regulatory threshold levels of GMO content are evaluated on a weight/weight (w/w) basis and are calculated based on the GM event-specific DNAs to taxon-specific DNA ratio measured using qPCR.

Recently, the production of stacked GM maize grains, with two or more GM events for enhanced production efficiency [14], has been increasing worldwide. The GMO content of maize samples containing stacked GM maize is generally overestimated when determined using qPCR methods, as compared to the actual w/w percentage of GM maize, because a kernel of stacked GM maize contains the GM-specific DNAs in proportion to the number of GM events. To avoid overestimation, we developed an individual kernel detection method that involves multiplex real-time PCR using the extracted DNA from individual ground maize kernels [15–18]. This detection system has already been implemented in Japan as an official GM maize detection method [19]. Moreover, a GMO content evaluation method based on group testing strategy [20–22] was recently developed [23]. In this method, GMO content is statistically evaluated based on qualitative PCR for multiple small portions, consisting of 20 maize kernels. However, these methods are not applicable to ground grain samples such as corn grits, corn flour and corn meal. Moreover, both methods are time consuming and require additional equipment with large sample numbers. A simpler, time-saving and cost-effective method is required for roughly quantifying GMO content in maize samples containing stacked GM maize.

We previously determined the GM maize content on a kernel basis and the events of GM maize kernels in non-identity-preserved (IP) maize samples imported from the USA in 2005 and 2009 using an individual kernel detection system [24, 25]. The main GM maize events detected in the non-IP maize samples in 2009 were MON88017, MON810 × MON88017, NK603, MON810, TC1507 × DAS59122, MON810 × NK603, TC1507, DAS59122 and MON863. With the exception of single GM maize events of MON810 and MON863, these GM maize events contain a herbicide-tolerant trait gene encoding either 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4 (*cp4epsps*) or phosphinothricin *N*-acetyl-transferase from *Streptomyces viridochromogenes* (*pat*) (Supplementary Table S1). Moreover, many other stacked GM maize events detected in the non-IP maize samples in 2009 also contain *cp4epsps* or *pat*. Thus, we hypothesized that the GMO content in ground maize samples containing stacked GM maize might be quantified from the sum of *pat* and *cp4epsps* contents. This hypothetical method, termed the trait-specific method, might be applicable to ground samples, whereas the individual kernel detection method and the group testing method are applicable only to kernel samples. Moreover, the hypothetical method for the determination of trait-specific gene might be also applicable

to kernel samples, with the advantages of easy sample preparation and enhanced cost-effectiveness. To date, *pat* or *cp4epsps* is used in most GM lines as an herbicide-tolerant trait gene. In this study, we developed a trait-specific method that can quantitate GMO content by measuring only *cp4epsps* and *pat* using qPCR and demonstrated that the developed method is appropriate for approximate quantification of GMO content in ground grain samples containing stacked GM maize by evaluating the performance of the developed method by quantitating five test samples in comparison to the event-specific method.

Materials and methods

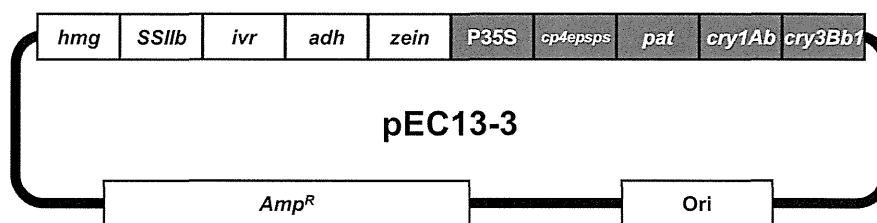
Maize materials

The MON88017, MON810, MON863, NK603, MON88017 × MON810, MON810 × NK603 and non-GM maize seeds were kindly provided by Monsanto Co. (St. Louis, MO). Seeds of TC1507 and DAS59122 were kindly provided by Pioneer Hi-Bred International (Johnston, IA). The 5 % MON810 certified reference material (CRM), 5 % NK603 CRM and 10 % TC1507 CRM were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

DNA extraction

The maize seeds were ground using a Mixer Mill MM200 (Retsch, Haan, Germany). Genomic DNA was extracted and purified from 1 g of ground maize powder using a DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, with the following modifications. Five milliliters of AP1 buffer (QIAGEN) and 10 μ L of 100 mg/mL RNase (QIAGEN) were added to the sample and vortexed thoroughly and then incubated at 65 °C for 1 h. The mixture was incubated at 65 °C for another 1 h after the addition of 200 μ L of Proteinase K (QIAGEN). During incubation, the mixture was mixed several times by vortexing the tubes. After incubation, 1.8 mL of AP2 buffer (QIAGEN) was added to the mixture and vortexed and then incubated on ice for 15 min. The mixture was centrifuged at 2,300 \times g for 15 min at room temperature in a swing-out rotor, and the supernatant was applied to a QIAshredder Maxi spin column. The column was centrifuged at 2,300 \times g for 5 min at room temperature, and 5.1 mL of AP3/E buffer (QIAGEN) was added to 3.4 mL of flow-through solution, followed by vortexing thoroughly. The mixture was applied to a DNeasy Maxi spin column, followed by centrifugation at 2,300 \times g for 5 min at room temperature. The column was washed with 12 mL of AW buffer (QIAGEN) and then centrifuged at 2,300 \times g for 15 min at room temperature. To elute the DNA, 1 mL of pre-warmed distilled water (65 °C)

Fig. 1 Schematic diagram of pEC13-3 integrating ten fragments (*hmg*, *SSIIB*, *ivr*, *adh*, *zein*, P35S, *cp4epsps*, *pat*, *cry1Ab* and *cry3Bb1*). *Amp^R*, ampicillin resistance gene. Ori, origin of replication



was added to the column. After incubation at room temperature for 5 min, the column was centrifuged at $2,300\times g$ for 10 min at room temperature. An equal amount of isopropyl alcohol was added to the eluted solution, and the mixture was mixed thoroughly. After incubation at room temperature for 5 min, the mixture was centrifuged at $12,000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The pellet was rinsed with $500\text{ }\mu\text{L}$ of 70 % (v/v) ethanol and centrifuged at $12,000\times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min. The supernatant was discarded and the precipitate was dried. The DNA was dissolved in $100\text{ }\mu\text{L}$ of distilled water.

DNA concentrations were determined by measuring UV absorption at 260 nm with a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Samples were diluted to $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ with sterile distilled water. The extracts (600 ng) were analyzed by electrophoresis on a 1.0 % agarose gel containing Midori Green Advanced DNA stain (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan).

Preparation of plasmid DNA

To quantitate the GM maize content, we prepared plasmid DNA as a calibrant. Ten targeted DNA fragments consisting of five reference genes [high mobility group protein (*hmg*, AJ131373), starch synthase IIb (*SSIIB*, NM_001111410), invertase A (*ivr*, ZMU16123), alcohol dehydrogenase 1 (*adh*, X04050) and delta zein protein (*zein*, FJ557103)] and five GM genes [cauliflower mosaic virus 35S promoter (P35S, AB863197), *cp4epsps* (AY125353), *pat* (DQ156557) and two Bt toxins (*cry1Ab*; AY326434 and *cry3Bb1* [26])] were incorporated (as shown in Fig. 1) by PCR as described previously [2] using appropriate primers. The resultant fragment was ligated into pUC19, and its sequence was confirmed by nucleotide sequence analyses and designated as pEC13-3. The cells of *Escherichia coli* DH5 α were transformed using pEC13-3. The plasmid was extracted with a Plasmid Mega Kit (QIAGEN) and purified by ultracentrifugation with cesium chloride. The purified pEC13-3 was cut by *Nde*I, and the resultant linearized plasmid DNA was purified again by ultracentrifugation with cesium chloride. The copy number of purified pEC13-3 was estimated as that of *SSIIB* by qPCR as described previously [2], and plasmid DNA was diluted with $5\text{ ng}/\mu\text{L}$ ColE1 plasmid solution in tris-ethylenediaminetetraacetic acid buffer (Nippon Gene, Tokyo, Japan) to 20, 125, 1,500, 20,000 and 250,000 copies per $2.5\text{ }\mu\text{L}$.

Table 1 The GM maize event and content (%) of test samples prepared by mixing the ground samples of several GM maize and non-GM maize

GM maize event	Sample number				
	1	2	3	4	5
MON88017	2.0	1.3	1.3	1.5	–
MON810 \times MON88017	–	1.2	1.3	1.5	3.0
NK603	1.0	0.6	0.7	–	–
MON810	0.9	0.5	0.7	–	–
TC1507 \times DAS59122	–	0.4	0.5	1.0	1.0
MON810 \times NK603	–	0.4	0.5	1.0	1.0
TC1507	0.6	0.3	–	–	–
DAS59122	0.3	0.2	–	–	–
MON863	0.2	0.1	–	–	–
Total	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Preparation of test samples

To prepare the five test samples, the ground grain samples of several GM maize events were mixed with ground non-GM maize at 5 % (w/w) GMO content (Table 1). Genomic DNA was extracted from each test sample in three parallels and diluted to $20\text{ ng}/\mu\text{L}$ with sterile distilled water.

qPCR assay

qPCR assay was performed by trait- and event-specific qPCR methods using an ABI PRISMTM 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies, Carlsbad, CA). For the trait-specific method, five sets of primer pairs and probe (*hmg* [27–30], *SSIIB* [31], *ivr* [32], *adh* [32] and *zein* [32]) were identical with those in previous reports. Two sets of primer pairs and probe (*cp4epsps* and *pat*) were designed using Primer Express software (Life Technologies) (Table 2). These sets of primer pairs and probe were evaluated for PCR efficiency and linearity of calibration curves for each gene in pEC13-3. Trait-specific quantification was performed by quantitating *cp4epsps* and *pat* in each DNA extracted in three parallels. A $25\text{ }\mu\text{L}$ volume of the reaction mixture contained $2.5\text{ }\mu\text{L}$ of template DNA, $12.5\text{ }\mu\text{L}$ of TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Life Technologies), $0.5\text{ }\mu\text{M}$ of each primer and

Table 2 Primers and probes used for qPCR assay

Target gene	Accession number	Primer or probe name	Primer or probe sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>reference gene</i>				
<i>hmg</i>	AJ131373	hmg-F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79
		hmg-R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCTT	
		hmg-P	FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA	
<i>SSIb</i>	NM_001111410	SSIb3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC	114
		SSIb3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGGA	
		SSIb-P	FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA	
<i>ivr</i>	ZMU16123	ivr-F	CGTCTGTACAAGCGTGC	135
		ivr-R	GCAAAGTGTGTGCTTGACC	
		ivr-P	FAM-CACGTGAGAATTTCCGTCTACTCGAGCCT-TAMRA	
<i>adh</i>	X04050	adh-F	CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC	103
		adh-R	CCACTCCGAGACCCTCAGTC	
		adh-P	FAM-AATCAGGGCTCATTTTCTCGTCTCTCA-TAMRA	
<i>zein</i>	FJ557103	zein-F	GCCATTGGGTACCATGAACC	104
		zein-R	AGGCCAACAGTTGCTGCAG	
		zein-P	FAM-AGCTTGATGGCGTGTCCGTCCT-TAMRA	
<i>trait gene</i>				
<i>cp4epsps</i>	AY125353	cp4epsps-F	TTCACGGTGCAAGCAGCC	82
		cp4epsps-R	GACTTGTGCGCCGGAATG	
		cp4epsps-P	FAM-CGCAACCGCCCGCAAATCC-TAMRA	
<i>pat</i>	DQ156557	pat-F	GGCCTTCCAAACGATCCAT	96
		pat-R	CCATCCACCATGCTTGATCC	
		pat-P	FAM-ATGAGGCTTTGGGATACACAGCCCG-TAMRA	

0.2 μM of probe. PCR conditions were as follows: 2 min at 50 °C, 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of 30 s at 95 °C and 1 min at 59 °C. Standard curves were calibrated using the five concentrations of plasmid DNAs, such as 20, 125, 1,500, 20,000 and 250,000 copies per reaction. The no-template control containing 5 ng/μL ColE1 plasmid was also prepared as the negative control for analysis. For event-specific quantification, event-specific sequences of MON88017, MON810, MON863, NK603, TC1507 and DAS 59122 were quantitated in each DNA extracted in three parallels according to the methods reported by the European Commission's Joint Research Centre [27–30, 33, 34]. Standard curves were calibrated by using genomic DNA extracted from 5 % MON810 CRM, 5 % NK603 CRM and 10 % TC1507 CRM, and 10 % MON88017, 5 %

Data analysis

For trait-specific quantification, the baseline was set to cycles 3 through 15 and the ΔRn threshold for plotting quantification cycle (C_q) values was set to 0.2 during exponential amplification. The PCR efficiency (E, %) of reference genes was calculated using the slope of the standard curve according to the following formula:

$$\text{PCR efficiency } (E, \%) = \left[10^{(-1/\text{slope})} - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

The ratio of the copy number of *hmg* and trait gene (*cp4epsps* and *pat*) in GM maize seeds, defined as the conversion factor (C_f), was calculated using the following formula:

$$C_f = \frac{\text{copy number of trait gene in the DNA extracted from GM maize seeds}}{\text{copy number of } hmg \text{ in the DNA extracted from GM maize seeds}} \quad (2)$$

DAS59122 and 10 % MON863 prepared from ground powders of GM maize and non-GM maize. Triplicate reactions for each DNA extracted in three parallels were conducted using trait- and event-specific qPCR.

To prevent overestimation of GMO content, we used the corrected C_f value calculated using following formula:

$$\text{Corrected } C_f = \sum (C_{f(\text{trait})} \times x) \quad (3)$$

Table 3 The corrected C_f calculated from the C_f value and the rate of each GM maize event containing *cp4epsps* or *pat*

GM maize event	<i>cp4epsps</i>		<i>pat</i>	
	C_f	x^a	C_f	x^a
MON88017	0.30	0.38	–	–
MON810 × MON88017	0.28	0.34	–	–
NK603	0.72	0.18	–	–
MON810	–	–	–	–
TC1507 × DAS59122	–	–	0.61	0.42
MON810 × NK603	0.71	0.10	–	–
TC1507	–	–	0.30	0.38
DAS59122	–	–	0.29	0.20
MON863	–	–	–	–
Corrected C_f^b	0.41		0.43	

^a x is the rate of a GM maize event in all main GM maize events containing *cp4epsps* or *pat*, which was calculated using the data of GMO content in the non-IP maize sample imported from the USA in 2009. The sum of x of all main GM maize events containing *cp4epsps* or *pat* was 1.00

^b The corrected C_f was calculated from the sum of the product of each C_f and x as follows: for *cp4epsps*, the corrected $C_{f(cp4epsps)} = C_{f(MON88017)} (0.30) \times x_{(MON88017)} (0.38) + C_{f(MON810 \times MON88017)} (0.28) \times x_{(MON810 \times MON88017)} (0.34) + C_{f(NK603)} (0.72) \times x_{(NK603)} (0.18) + C_{f(MON810 \times NK603)} (0.71) \times x_{(MON810 \times NK603)} (0.10) = 0.41$; for *pat*, the corrected $C_{f(pat)} = C_{f(TC1507 \times DAS59122)} (0.61) \times x_{(TC1507 \times DAS59122)} (0.42) + C_{f(TC1507)} (0.30) \times x_{(TC1507)} (0.38) + C_{f(DAS59122)} (0.29) \times x_{(DAS59122)} (0.20) = 0.43$

where $C_{f(trait)}$ is each C_f value for *cp4epsps* or *pat* in a GM maize event containing *cp4epsps* or *pat* and x is the rate of a GM maize event in all main GM maize events containing *cp4epsps* or *pat*, which was calculated using the data of GMO content in the non-IP maize sample imported from the USA in 2009 [25] (Table 3). The corrected C_f was calculated by summing the product of $C_{f(trait)}$ and x ($C_{f(trait)} \times x$) for each GM maize event. The GMO content (%) of a sample for each trait gene was calculated using the following formula:

$$\text{GMO content (\%)} = \frac{\text{copy number of trait gene in the DNA extracted from a sample}}{\text{copy number of } hmg \text{ in the DNA extracted from a sample} \times \text{corrected } C_f} \times 100 \quad (4)$$

Total GMO content was calculated by summing the GMO content for *cp4epsps* and *pat*.

For event-specific quantification, the baseline was set to cycles 3 through 15 and the ΔRn threshold for plotting C_q values was set to 0.1–0.5 during exponential amplification. The GMO content (%) of a sample for each GM sequence was calculated using the following formula:

$$\text{GMO content (\%)} = \frac{\text{copy number of event-specific sequence in the DNA extracted from a sample}}{\text{copy number of endogenous gene in the DNA extracted from a sample}} \times 100 \quad (5)$$

Table 4 The PCR efficiencies (E) and linearity (R^2) of calibration curves for five reference genes and two herbicide-tolerant trait genes in pEC13-3

Target gene	E		R^2	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
<i>Reference gene</i>				
<i>Hmg</i>	100.7	2.2	0.9990	0.08
<i>SSIIb</i>	98.7	2.3	0.9980	0.10
<i>Ivr</i>	96.7	2.4	0.9960	0.39
<i>Adh</i>	96.7	3.2	0.9961	0.13
<i>Zein</i>	97.0	2.0	0.9989	0.06
<i>Trait gene</i>				
<i>Cp4epsps</i>	96.7	3.7	0.9992	0.05
<i>Pat</i>	94.7	3.0	0.9992	0.03

Total GMO content was calculated by summing the GMO content for each event-specific sequence.

Results and discussion

Construction of plasmid DNA

Plasmid pEC13-3 was constructed by tandem integration of ten PCR products amplified from five reference genes (*hmg*, *SSIIb*, *ivr*, *adh* and *zein*) and five GM genes (*P35S*, *cp4epsps*, *pat*, *cry1Ab* and *cry3Bb1*) (Fig. 1) as a calibrant. The purified pEC13-3 was diluted to 20, 125, 1,500, 20,000 and 250,000 copies per 2.5 μ L, equivalent to 0.12, 0.72, 8.6, 115 and 1,440 ng of genomic DNA of F1 GM maize seed, respectively, based on the genome size of maize (the diploid DNA content per nucleus, 5.75 pg/2C) [35]. The dilution series was sufficient to quantitate GM maize content from 0.23 to 100 % in 50 ng of genomic DNA.

The PCR efficiencies of reference genes in pEC13-3 were calculated by the designated qPCR system (Table 4).

Among the five reference genes, *hmg* showed the highest PCR efficiency [$E = 100.7$ %, relative standard deviation (RSD) = 2.2 %], followed by *SSIIb* (98.7 %), *zein* (97.0 %), *adh* (96.7 %) and *ivr* (96.7 %), with RSD ranging from 2.0 % to 3.4 %. Moreover, the standard curve of *hmg* showed greater linearity ($R^2 = 0.9990$, RSD = 0.08 %) than that of the other reference genes (0.9960–0.9989),

with RSD ranging from 0.06 to 0.39 %. The relative copy number of *hmg* in some GM maize events was compared to that of *SSIIb*, which is a standard reference gene of maize used in Japanese regulation (Supplementary Table S2), where that of *hmg* or *SSIIb* in the non-GM maize was 1.00. The resulting data of quadruplicate reactions showed that the mean of the relative copy numbers of *hmg* (1.21, RSD = 0.6–12.5 %) was lower than that of *SSIIb* (1.36, RSD = 4.1–9.6 %). The estimated copy number of *SSIIb* in GM maize was higher than non-GM maize as compared to that of *hmg*. These results suggest that *hmg* is the most appropriate reference gene for the designated qPCR system in this method. On the other hand, the PCR efficiencies of the two herbicide-tolerant trait genes, *cp4epsps* and *pat* (96.7 and 94.7 %, respectively), were comparable to the reference genes (96.7–100.7 %), and both standard curves of the two genes showed excellent linearity ($R^2 = 0.9992$) (Table 4).

Measurement of conversion factor

To determine the C_f value required for the trait-specific qPCR method, the copy number of *hmg* and the trait gene in the genomic DNA extracted from GM maize seed were each measured. All experiments were repeated three times, and the mean values were set as the C_f value (Table 3). The C_f value from whole seed [$C_{f(\text{seed})}$] should be a mean value between the C_f value from embryo [$C_{f(\text{emb})}$] and that from endosperm [$C_{f(\text{endo})}$], because the DNA amounts derived from embryo and endosperm are equivalent in each seed [36]. In F1 hybrid maize having a single copy of the trait gene per maize genome, the ideal $C_{f(\text{emb})}$ is theoretically expected to be 0.5, and on the other hand, the ideal $C_{f(\text{endo})}$ should be 0.33 or 0.67 in paternally or maternally derived GM maize events, respectively [31]. As a result, the ideal $C_{f(\text{seed})}$ should be 0.42 or 0.59. In this study, the experimental C_f values for trait genes in GM maize events having a single copy of transgene per genome were 0.28–0.30. The C_f values for *cp4epsps* in NK603 and MON810 \times NK603 having two copies of *cp4epsps* per genome [37] were 0.72 and 0.71, respectively. In TC1507 \times DAS59122 having two copies of *pat* per genome, the C_f value for *pat* was 0.61. The discrepancy between ideal and experimental values has been previously reported [2, 31] and may be due to differences in PCR efficiencies resulting from the amount of non-targeted sequences in plasmid and genomic DNA [2] or due to differences in the efficiency of DNA extraction between reference and trait genes [31].

GM maize imported to Japan contains not only single GM maize events having a single copy of the trait gene per genome, but also stacked GM maize events having multiple copies of the trait gene per genome as previously reported [25]. The corrected C_f values for each trait gene were

required to calculate GMO contents in maize samples containing GM maize events having multiple copies of the trait gene per genome, because GMO content is overestimated using the C_f value calculated from each GM maize event having a single copy of the trait gene per genome. Therefore, the corrected C_f value for *cp4epsps* (0.41), which was calculated based on each C_f value in GM maize events having *cp4epsps* and the rate of a GM maize event determined from a non-IP maize sample imported from the USA in 2009, was used (Table 3). Similarly, the corrected C_f value for *pat* (0.43) was used (Table 3).

GMO content in test samples

To approximately quantitate the GMO content in five test samples (Table 1), which were prepared by mixing the ground grain samples of several GM maize and non-GM maize at 5 % (w/w) GMO content (Table 1), we extracted genomic DNA from each test sample in three parallels without degradation of DNA (Supplementary Fig. S1) and performed qPCR assays for trait- and event-specific methods (Table 5). The trait-specific method results showed lower RSD (1.3–17.1 %) as compared to those of the event-specific method (4.1–45.2 %), which is consistent with previously reported validation studies [28, 38–42]. Moreover, in the trait-specific method, the biases against theoretical values, which are calculated on the basis of the copy number of the trait gene per genome, were positive values for *cp4epsps* (3.6–18.6 %) and negative values for *pat* (–14.8 to –34.2 %). This suggests that the experimental values of GMO contents for *cp4epsps* were higher than the theoretical values, whereas those for *pat* were lower than the theoretical values. On the other hand, the absolute values of bias against theoretical value for the event-specific method were much higher (4.5–108.6 %) than those for the trait-specific method (3.6–34.2 %). In particular, the absolute values of bias in TC1507 (19.0–108.6 %) were the highest, followed by DAS59122 (50.3–63.3 %), MON863 (50.0–60.0 %), MON810 (13.0–39.9 %), NK603 (10.9–34.1 %) and MON88017 (4.5–16.5 %). These tendencies toward high biases were also shown in the previously reported validation studies [28, 38–42], where the biases were lower than those in this study. In the absolute values of total bias against theoretical value, there was little difference between the trait-specific method (1.2–6.8 %) and the event-specific method (3.6–21.8 %). These results demonstrate that the trait-specific method has higher repeatability and lower bias for each reaction, although the two methods show similar bias overall.

Test sample #1 contained only single GM maize events. Samples #2, #3 and #4 contained both single and stacked GM maize events, and the highest content of stacked GM maize events was in sample #4, followed by samples #3

Table 5 The theoretical value and experimental value (mean) of GMO content, relative standard deviation (RSD) and bias for trait- and event-specific methods

	Sample number				
	1	2	3	4	5
Trait-specific method					
<i>cp4epsps</i>					
Theoretical value (%) ^a	4.0	4.5	5.0	5.0	5.0
Experimental value (mean, %)	4.3	5.0	5.2	5.9	5.2
RSD (%)	13.9	1.9	13.2	17.1	11.1
Bias of experimental value against theoretical value (%)	8.5	11.9	3.6	18.6	4.1
<i>pat</i>					
Theoretical value (%)	0.9	1.3	1.0	2.0	2.0
Experimental value (mean, %)	0.8	1.0	0.7	1.5	1.3
RSD (%)	1.3	3.9	4.6	14.8	12.6
Bias of experimental value against theoretical value (%)	-14.8	-25.7	-25.0	-26.8	-34.2
Total					
Theoretical value (%)	4.9	5.8	6.0	7.0	7.0
Experimental value (mean, %)	5.1	6.0	5.9	7.4	6.5
RSD (%)	11.6	2.1	11.9	16.4	9.4
Bias of experimental value against theoretical value (%)	4.2	3.5	-1.2	5.6	-6.8
Bias of theoretical value against 5 % (%) ^b	-2.0	16.0	20.0	40.0	40.0
Bias of experimental value against 5 % (%) ^c	2.1	20.0	18.6	47.9	30.5
Event-specific method					
<i>MON88017</i>					
Theoretical value (%)	2.0	2.5	2.6	3.0	3.0
Experimental value (mean, %)	2.3	2.4	2.7	3.2	3.4
RSD (%)	20.2	45.2	10.5	17.1	19.9
Bias of experimental value against theoretical value (%)	16.5	-4.7	4.5	7.6	14.1
<i>MON810</i>					
Theoretical value (%)	0.9	2.1	2.5	2.5	4.0
Experimental value (mean, %)	0.5	1.4	1.8	1.9	3.5
RSD (%)	14.1	6.9	14.6	10.7	7.6
Bias of experimental value against theoretical value (%)	-39.9	-34.8	-28.9	-22.6	-13.0
<i>NK603</i>					
Theoretical value (%)	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0
Experimental value (mean, %)	1.2	1.1	1.5	1.3	1.2
RSD (%)	7.3	8.1	10.3	4.4	5.2
Bias of experimental value against theoretical value (%)	16.0	10.9	21.9	34.1	20.2
<i>TC1507</i>					
Theoretical value (%)	0.6	0.7	0.5	1.0	1.0
Experimental value (mean, %)	1.3	0.8	0.3	0.7	0.7
RSD (%)	44.0	18.4	6.9	7.1	8.0
Bias of experimental value against theoretical value (%)	108.6	19.0	-33.2	-27.8	-28.5
<i>DAS59122</i>					
Theoretical value (%)	0.3	0.6	0.5	1.0	1.0
Experimental value (mean, %)	0.5	0.9	0.8	1.6	1.6
RSD (%)	9.8	4.1	10.3	7.2	8.3
Bias of experimental value against theoretical value (%)	63.2	51.2	50.3	56.8	63.3
<i>MON863</i>					
Theoretical value (%)	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0
Experimental value (mean, %)	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0
RSD (%)	17.5	4.7	-	-	-

Table 5 continued

	Sample number				
	1	2	3	4	5
^a This value is calculated based on the copy number of transgene per genome					
^b Bias of theoretical value against 5 % GMO content on a w/w basis					
^c Bias of experimental value against 5 % GMO content on a w/w basis					
Bias of experimental value against theoretical value (%)	60.0	50.0	–	–	–
<i>Total</i>					
Theoretical value (%)	5.0	7.0	7.3	8.5	10.0
Experimental value (mean, %)	6.1	6.7	7.0	8.8	10.5
RSD (%)	4.8	14.8	4.3	4.9	4.2
Bias of experimental value against theoretical value (%)	21.8	–3.6	–3.5	3.4	4.5
Bias of theoretical value against 5 % (%)	0.0	40.0	46.0	70.0	100.0
Bias of experimental value against 5 % (%)	21.8	35.0	40.8	75.9	109.1

and #2. Test sample #5 contained only stacked GM maize events. In regard to bias of the experimental value against 5 % (w/w) GMO content, the trait-specific method (2.1–47.9 %) showed lower bias than the event-specific method (21.8–109.1 %); specifically, the difference in bias between the two methods was largest in test sample #5 (30.5 and 109.1 % for trait- and event-specific methods, respectively). These results suggest that the overestimation of the event-specific method was higher than that of the trait-specific method in proportion to the content of the stacked GM maize event. Moreover, these results are consistent with the bias of theoretical value against 5 % (w/w) GMO content (–2.0–40.0 % for the trait-specific method and 0–100.0 % for the event-specific method). These results suggest that the difference in bias between the two methods was attributed not only to the accuracy of the method, resulting from the difference in calibrant, PCR efficiency and so on, but also to the principle of the method. The uncertainty in GMO content determined by the trait- and event-specific methods of the sample containing stacked GM maize events is largely attributed to sample characteristics, such as the content and the kind of stacked GM maize events. Theoretically, the uncertainty in GMO content determined by the trait-specific method is expected to be smaller than that determined by the event-specific method, because the overestimation of the trait-specific method is smaller than that of the event-specific method. This theory was substantiated by this study. Each test sample was designed according to the distribution of GM maize events in the US market in the past, present and future. Test sample #1, containing only single GM maize events, was modeled on GM maize events planted in the past. Test samples #2, #3 and #4, containing single and stacked GM maize grains, were modeled on GM maize events planted in the present, and sample #5, containing only stacked GM maize grains, was modeled on GM maize events to be planted in the future. The results of this study suggest that the trait-specific method has higher trueness (GMO content on a w/w basis) than the event-specific method, especially for the GM maize events planted in the present and future.

A drawback of the trait-specific method, if any, is the possible oversight of single GM maize events having no *cp4epsps* and *pat*, such as MON810 and MON863 (Supplementary Table S1). The National Agricultural Statistics Service (NASS) reported that the percentage of stacked GM maize events has consecutively increased from 1 % in 2000 to 71 % in 2013 in the USA [43]. Indeed, our previous studies showed that the percentage of stacked GM maize events in non-IP samples imported to Japan from the USA increased from 12 % in 2005 [24] to 35 % in 2009 [25]. Judging from these data, almost all GM maize is composed of stacked GM maize events, indicating that no single GM maize events will be distributed commercially in the future. In this situation, the potential oversight of single GM events having no *cp4epsps* and *pat* can be ignored. The content of single GM maize events having no *cp4epsps* and *pat* would be measured from non-IP maize samples imported into Japan in future using the individual kernel detection method [15]. Furthermore, the corrected C_f for *cp4epsps* or *pat* would need to be consecutively updated by monitoring the GM maize events in non-IP maize samples imported into Japan, because the rates of the GM maize events would be predicted to vary every year. In addition, the trait-specific method can prove GMO content, but not the existence of stacked GM maize events in maize sample, whereas the individual kernel detection method enables identification of stacked GM maize event in a maize kernel by combining with the event-specific method [17, 18, 44].

In countries evaluating GMO content on a w/w basis, current event-specific method has the potential to lead to an excess of the regulatory threshold levels of GMO content in the ground maize samples containing stacked GM maize events, even though the actual GMO content is lower than the regulatory threshold levels. We believe that the proposed trait-specific method would be the only feasible way to solve this problem and would be useful not only for the countries importing maize and requiring the verification of the labeling regulation on a w/w basis, such as Japan and Korea, but also for the countries exporting maize, such as the USA and Brazil.