

【調査研究】

ディスポーザブルチューブからの溶出物の PCR 阻害活性について

武 志保, 山本 淳, 肥塚加奈江, 山辺真一, 今中雅章 (衛生化学科)

要 旨

遺伝子組換え食品 (GMO) 検査の際に使用しているポリプロピレン (PP) 製ディスポーザブルチューブからの溶出物について, その同定を行うとともに, 検出された化合物の PCR 反応に対する阻害活性の有無を検討した。①PP 製ディスポーザブルチューブ内でミリポア水を加熱することにより作成した加熱滅菌水中の溶出物を GC/MS で分析したところ, 3 種類の化合物 (Benzaldehyde, p-Methylbenzaldehyde, p-Methylbenzoic acid) が同定された。また加熱処理の条件では, 滅菌時間が長いほど化合物の溶出量は増加する傾向にあった。②検出された上記の 3 化合物は, それぞれ一定濃度以上で PCR 反応の阻害活性を示した。しかしながら今回検出された濃度においては, いずれの化合物も定性 PCR 反応を阻害しないことが明らかとなった。

[キーワード: ディスポーザブルチューブ, 溶出物, PCR 阻害, p-メチルベンズアルデヒド]

1 はじめに

遺伝子組換え食品 (GMO) 検査の際に使用される滅菌水は, 通常 1 L 程度のガラス容器で作成し, 実験の度に小分けして使用に供していた。しかし, その際の遺伝子混入の可能性が心配されたことから, 小分けの必要がないポリプロピレン (PP) 製 15 mL チューブでの滅菌水作成を試みた。その過程で, 作成された滅菌水にかなりの着臭がみられることがわかった。GMO 検査では, 多種類の PP 製ディスポーザブルチューブが使用されており, 更に PP 製容器から検出される物質に関する報告^{1)~3)}も多いことから, 今回の溶出物が GMO の検査精度に何らかの悪影響を及ぼすことが危惧された。

このため, GC/MS を用いて臭いの原因物質を追求し, 同定された化合物の定性 PCR に対する阻害活性を調べたので報告する。

2 実験方法

2.1 試 料

ポリプロピレン (PP) 製 γ 線滅菌済 15 mL チューブ 5 検体 {A 社製 (2002 年 7 月購入), A 社製 (2004 年 4 月購入), B 社製 (1997 年 12 月購入), B 社製 (2004 年 3 月購入), C 社製 (2002 年 7 月購入)}

2.2 試 薬 等

有機溶媒等は残留農薬分析用試薬を使用した。

標準品は試薬特級を使用した。

2.3 装置及び測定条件

GC/MS の測定条件

装置: Thermo Quest Polaris

使用カラム: DB-5 MS ϕ 0.25 mm \times 30 m 膜厚 0.25 μ m

カラム温度: 50°C (2 min) - 5°C/分 - 120°C - 7°C/分 - 150°C - 15°C/分 - 310°C

注入法: スプリットレス 注入口温度: 250°C

注入量: 1 μ L

キャリアーガス流量: 1.0 mL/min (定流量モード)

インターフェース温度: 270°C

イオン化条件: EI 法 イオン源温度: 230°C イオン化電圧: 70 eV

測定法: SCAN 法

2.4 検査方法

ポリプロピレン (PP) 製 γ 線滅菌済 15 mL チューブにミリポア水を 8 mL 加え, 121°C で 15~60 分加熱滅菌し加熱処理水を作成した。加熱処理水 7 mL をジクロロメタン 1 mL で抽出し, 試験溶液とした。GC/MS で測定した。

2.5 定性 PCR 阻害活性の検査方法

遺伝子組換え食品の検査で実施する方法⁴⁾⁵⁾を参考にし, 表 1 の PCR 溶液の組成を用いた。PCR 溶液中の

滅菌水の代わりに化合物の入った水を使用した。PCR条件は95℃10分変性、95℃60秒、60℃60秒、72℃60秒で40回増幅し、4℃冷却した。電気泳動にかけPCR産物のバンドが認められなかったものをPCRが阻害されたと判定した。

表1 PCR溶液の組成

滅菌水	15.375μL
AmpliTa TM Gold	0.125μL (終濃度0.625U)
10xPCRbuffer II	2.5μL (終濃度1x)
dNTP (2mmol/L each)	2.5μL (終濃度200μmol/L each)
MgCl ₂ (25mmol/L)	1.5μL (終濃度1.5mmol/L)
プライマー対 (25μmol/L each)	0.5μL (終濃度0.5μmol/L each)
鋳型 DNA (10ng/μL)	2.5μL (終濃度25ng)

使用機器：アプライドバイオシステムズ社製 GeneAmp PCR System 9700

3 結果及び考察

3.1 GC/MS クロマトグラム

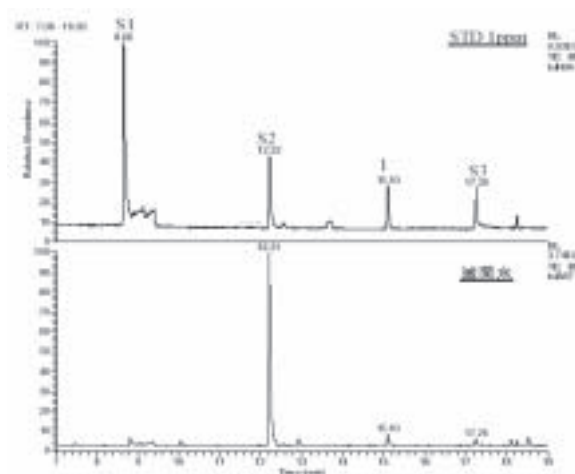
Benzaldehyde, p-Methylbenzoic acid, p-Methylbenzaldehyde 標準液 (各1ppm) の混合液のクロマトグラムと容器A-1の加熱処理水のクロマトグラムを図1に示した。

容器の種類と溶出量の関係を表2に示した。容器の種類により溶出される物質や量が異なっていた。一方、市販の滅菌水、ガラス瓶で作製した加熱処理水ともに何も検出されなかった。

3.2 滅菌時間と溶出量の関係

滅菌時間と溶出量の関係を表3に示した。Benzaldehyde, p-Methylbenzoic acid, p-Methylbenzaldehydeとも温度と圧力をかける時間が長いほど溶出量が増える傾向であった。また、15mLチューブに蒸留水を入れて2週間室温放置しただけで温度や圧力をかけなくても少量ではあるが溶出した。アセトンでの溶出はアルデヒド類はほとんど溶出できなかった。p-Methylbenzoic acidのみ少量溶出した。

滅菌方法と Benzaldehyde, p-Methylbenzaldehyde, p-Methylbenzoic acid の溶出量の関係を図2, 図3, 図4



S1: Benzaldehyde
S2: p-Methylbenzaldehyde
S3: p-Methylbenzoic acid
I: Naphthalene-d8 (内部標準物質)

図1 標準液と滅菌水のトータルイオンクロマトグラム (TIC)

表2 PP製容器の種類と溶出量の関係

	加熱処理水濃度 (ppm)						
	A-1	A-2	B-1	B-2	C	D	E
Benzaldehyde	0.01	0.02	9.1	0.32	0.02	0	0
p-Methylbenzaldehyde	12	12	0	8.1	21	0	0
p-Methylbenzoic acid	4.0	3.8	0.18	0.46	1.7	0	0
Formaldehyde	1.1	1.0	0	0.5	0.2	-	-

* 溶出条件 * 121℃60分オートクレーブ滅菌した場合
(Formaldehyde測定, 容器Eのみ121℃20分, Dは加熱処理なし)

容器種類

- | | | | |
|-----|------------------|---|-----------------|
| A-1 | A社製 (2002年7月購入) | C | C社製 (2002年7月購入) |
| A-2 | A社製 (2004年4月購入) | D | 市販滅菌水 |
| B-1 | B社製 (1997年12月購入) | E | ガラス瓶で滅菌したミリポア水 |
| B-2 | B社製 (2004年3月購入) | | |

表3 滅菌時間と溶出量

1本の容器中からの検出量

(ug)

操作	NO. 1	NO. 2	NO. 3	NO. 4	NO. 5	NO. 6	NO. 7	NO. 8	NO. 9	NO.10	NO.11	NO.12	
容器種類	A-1	0	0	0.12	0.12	0.064	0	0	0	0	0.071	0	0.10
		54	64	82	92	78	44	52	82	77	78	0	4.7
	17	18	32	32	7.1	11	14	14	22	6.6	3.2	0.57	
	A-2	0	0	0.13	0.15	0.10	0	0	0	0.18	0.086	0	0.11
		48	55	67	95	79	44	56	76	108	74	0.033	12
12	16	25	30	6.5	12	13	14	30	6.0	2.1	0.57		
B-1	15	18	32	73	11	18	17	17	46	11	0.015	1.1	
	0	0	0	0	0.12	0	0	0	0.31	0.14	0	0.067	
0.75	0.72	1.2	1.3	0.27	0.98	0.85	0.80	1.6	0.27	0.56	0		
B-2	1.9	1.7	2.0	2.5	1.4	1.2	1.6	1.3	1.3	1.1	0	0.23	
	16	32	34	65	36	17	24	35	52	31	0	0.42	
	2.9	2.6	3.3	3.5	0.80	2.5	1.8	2.6	4.6	0.72	0.53	0.13	
C	0.12	0.19	0.18	0.16	0.12	0	0	0.14	0.14	0.10	0	0.12	
	30	34	49	169	56	20	28	38	76	37	0	5.3	
	4.2	4.0	6.1	13	1.6	2.8	3.8	3.7	5.7	0.91	0.49	0	

操作

- NO. 1 121℃15分 オートクレーブ
- NO. 2 121℃20分 オートクレーブ
- NO. 3 121℃30分 オートクレーブ
- NO. 4 121℃60分 オートクレーブ
- NO. 5 121℃20分 オートクレーブ後1ヶ月放置
- NO. 6 121℃15分 圧力電気釜
- NO. 7 121℃20分 圧力電気釜
- NO. 8 121℃30分 圧力電気釜
- NO. 9 121℃60分 圧力電気釜
- NO.10 121℃20分 圧力電気釜後1ヶ月放置
- NO.11 空容器にアセトン1ml入れて抽出
- NO.12 蒸留水、加熱なし

上段 Benzaldehyde

中段 p-Methylbenzaldehyde

下段 p-Methylbenzoicacid

容器種類については表1参照

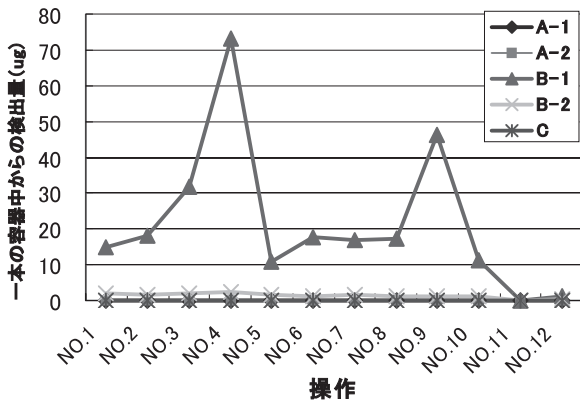


図2 滅菌操作のベンズアルデヒド溶出量に及ぼす影響

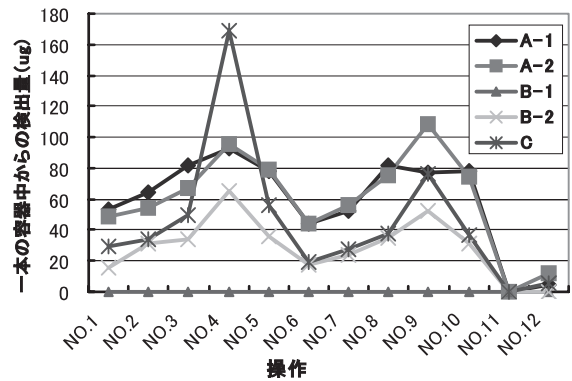


図3 滅菌操作のp-メチルベンズアルデヒド溶出量に及ぼす影響

に示した。Benzaldehydeは容器B-1に特徴的に検出された。A-1とA-2の溶出成分や溶出量ともに差はあまり見られなかった。A-1はA-2に比べて購入時期が2年ほど古い室温で保管している場合は変質がないと考えられる。B-1とB-2は溶出成分に差が見られたが、その原因はB社がポリプロピレン原料を変更⁶⁾したことによると推定される。

3. 3 化合物のPCR阻害濃度

加熱処理水から検出された4種類とアセトン、エタノールの6種類についてPCR阻害を調べた。アセトンは実験室によくあり、エタノールは検査の際に清掃用を使用するのでPCR溶液を調整する際に混入の可能性があるためこれらについても調べた。化合物のPCR阻害濃度を表4に示した。それぞれのPCR阻害

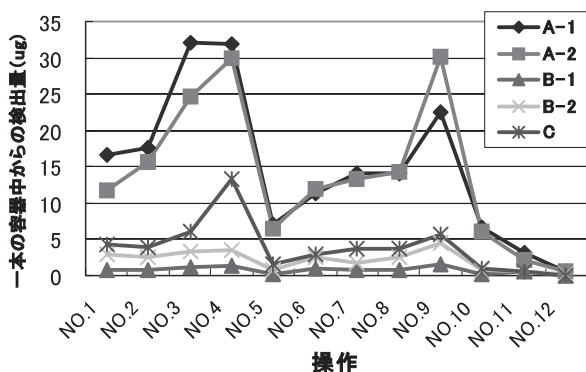


図4 滅菌操作のp-メチル安息香酸溶出量に及ぼす影響

濃度はBenzaldehydeでは3000~5000ppm以上、p-Methylbenzaldehydeでは2000ppm以上、p-Methylbenzoicacidでは3000~4000ppm以上、Formaldehydeでは500ppm以上、acetoneでは5%以上、ethanolでは7%以上であった。この化合物のなかではFormaldehydeがPCRの阻害活性が一番強いことがわかった。今回作製した加熱処理水から検出された程度の濃度ではPCRは阻害されないが、ある程度の濃度を超えるとPCRを阻害することが分かった。また、使用中のクリーンベンチ中にもアルデヒド類が含まれていることが分かった(表5)。しかし、室内基準にかかるほどの値はなく、PCRには影響がなかった。

3. 4 化合物を2種類混ぜたときのPCR阻害結果

化合物を2種類混ぜたときのPCR阻害結果を表6に示した。Benzaldehydeは一種類では3000~5000ppm以上の濃度にならないとPCR阻害をしないが1/6以下の500ppmでもエタノール(単品では7%以上でPCR阻害がかかる)を5%添加してやることによってPCRを阻害した。他の化合物も同様に単独でPCRを阻害する1/2~1/3の濃度でも他の化合物を単品で阻害する濃度の約1/2~1/5の濃度添加することによってPCRの阻害がみられた。

化合物一種類では阻害されない濃度でも2種類混ぜることによってPCRが阻害されることがあるので相加効果があると考えられる。

4 まとめ

- 加熱処理水から化合物3種類(Benzaldehyde, p-Methylbenzaldehyde, p-Methylbenzoicacid)をGC/MSで同定した。

表4 化合物のPCR阻害濃度

Benzaldehyde	3000~5000ppm以上
p-Methylbenzaldehyde	2000ppm以上
p-Methylbenzoicacid	3000~4000ppm以上
Formaldehyde	500ppm以上
acetone	5%以上
ethanol	7%以上

表5 使用中のクリーンベンチ内の空気より検出されたアルデヒド類濃度(ug/m³)

ホルムアルデヒド	16.7
アセトアルデヒド	2.6
アセトン	15.8
アクロレイン	3.2
メチルエチル	3.0

- 加熱処理水は滅菌時間が長いほど、化合物の溶出量は増える傾向にあった。また、15mLチューブに蒸留水を入れておくだけで加熱滅菌しなくても溶出された。
- Benzaldehyde, p-Methylbenzaldehyde, p-Methylbenzoicacid, Formaldehyde, acetone, ethanolではそれぞれ一定濃度以上でPCRを阻害することが分かった。
- 今回作成した加熱処理水程度の濃度では定性PCRは阻害されなかったことが分かった。しかし、定量レベルでのPCR反応を阻害している可能性が考えられ、これは今後の課題である。

文 献

- 河村葉子他：食品用ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリスチレン製品へのガンマ線照射の影響：揮発性物質，食品照射第35号第1，2号，15-22，2000
- 河村葉子他：食品用ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリスチレン製品へのガンマ線照射の影響：添加剤及びその他の化合物，食品照射第35号第1，2号，7-14，2000
- 河村葉子他：食品用ポリプロピレン製品中の添加剤の分析，食衛誌，41(2)，154-161，2000
- 厚生労働省通知食発第1113001号：組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)，平成15年11月13日

表6 化合物を2種類混ぜたときのPCR阻害結果

Benzaldehyde	500ppm	p-Methylbenzaldehyde	1000ppm	○
〃	1000ppm	〃	1000ppm	×
〃	1000ppm	p-Methylbenzoicacid	1000ppm	×
〃	1000ppm	Formaldehyde	100ppm	○
〃	2000ppm	〃	100ppm	×
〃	1000ppm	acetone	3%	○
〃	500ppm	ethanol	5%	×
p-Methylbenzaldehyde	1000ppm	p-Methylbenzoicacid	2000ppm	○
〃	500ppm	Formaldehyde	100ppm	○
〃	1000ppm	〃	100ppm	×
〃	1000ppm	acetone	3%	○
〃	1000ppm	ethanol	5%	×
p-Methylbenzoicacid	1000ppm	Formaldehyde	100ppm	○
〃	2000ppm	〃	100ppm	×
〃	1000ppm	acetone	3%	×
〃	1000ppm	ethanol	5%	×
Formaldehyde	50ppm	acetone	3%	○
〃	100ppm	〃	3%	×
〃	100ppm	ethanol	5%	○
acetone	3%	〃	5%	○

阻害されたものを×，阻害されなかったものを○とする。

5) 農林水産消費技術センター：JAS分析試験ハンドブック遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改定第2版，平成14年6月20日

6) 2003年9月遠沈管ポリプロピレン原料変更
<http://www.atgc.co.jp/div/rika/>