

図4 GC-MS測定用母乳(脂肪分)前処理フローチャート(母乳-7)

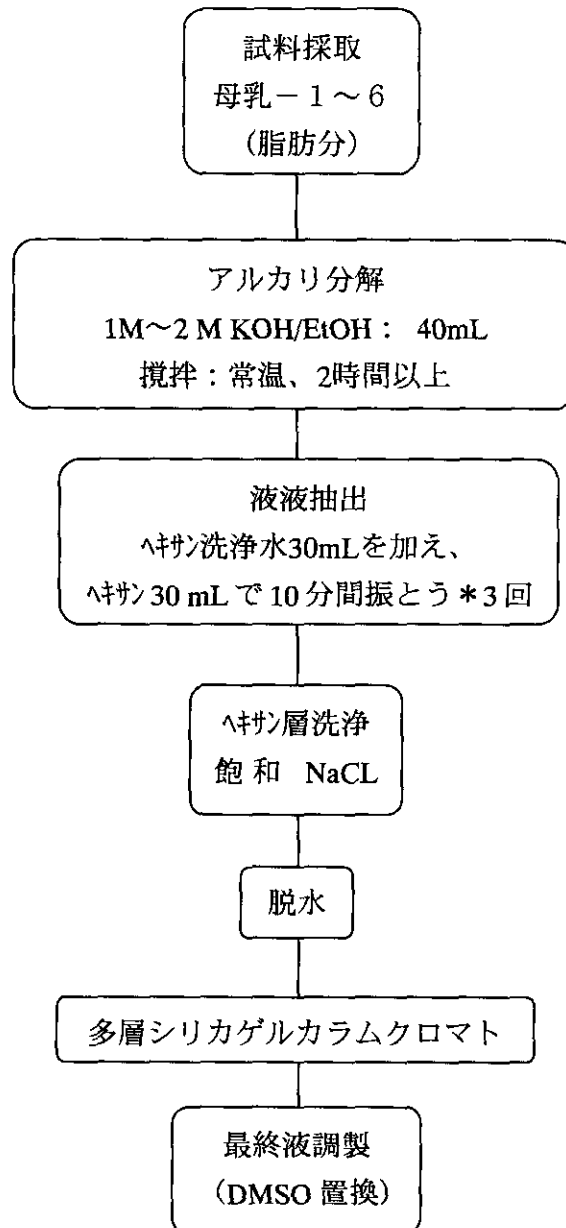


図5 AhR アッセイ用母乳(脂肪分)前処理フローチャート(母乳-1~6)

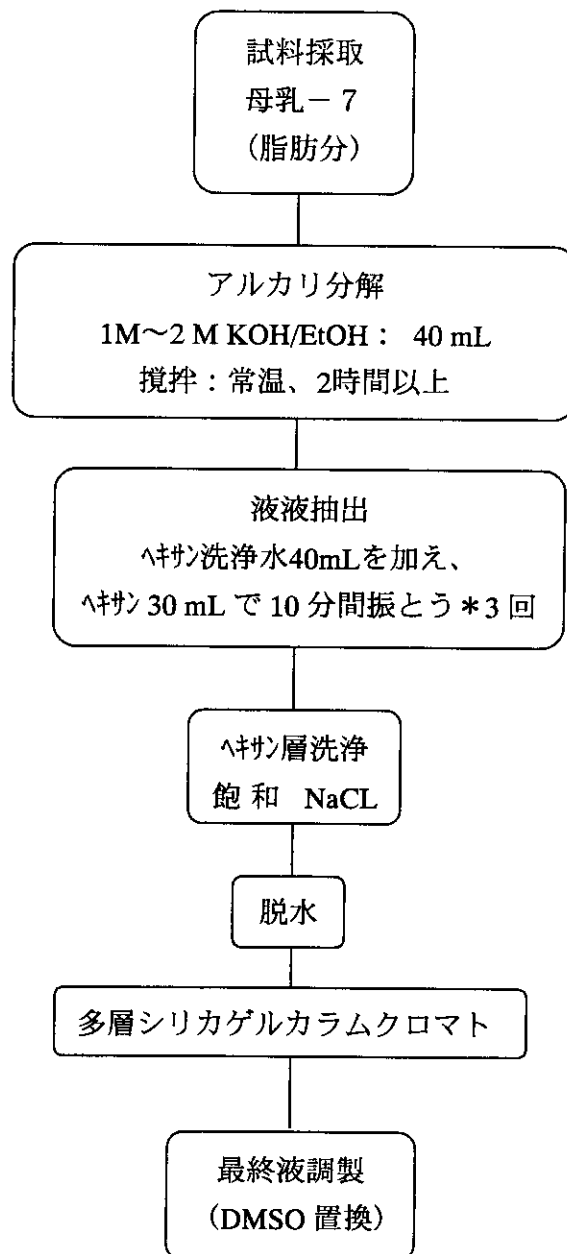


図6 AhR アッセイ用母乳（脂肪分）前処理フローチャート（母乳-7）

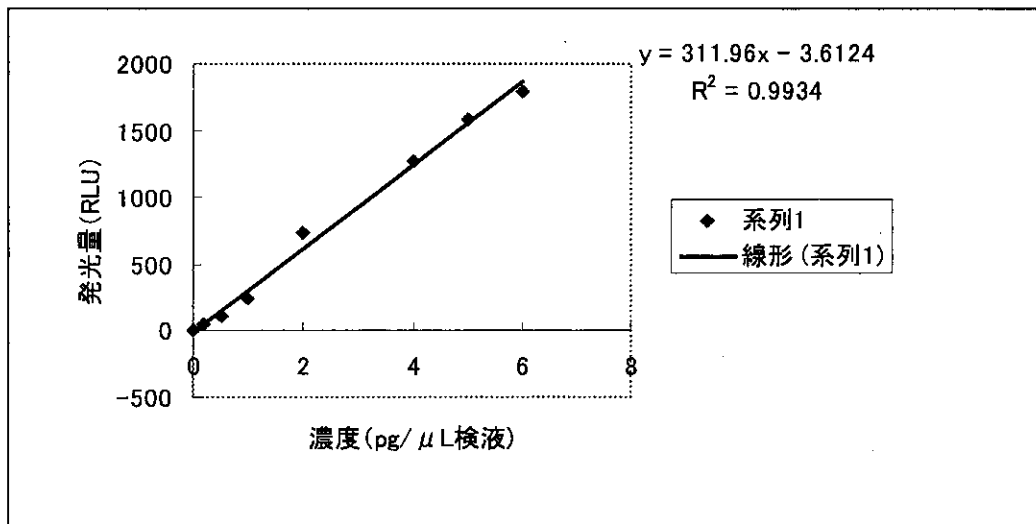


図7 AhR アッセイの検量線 (代表例)

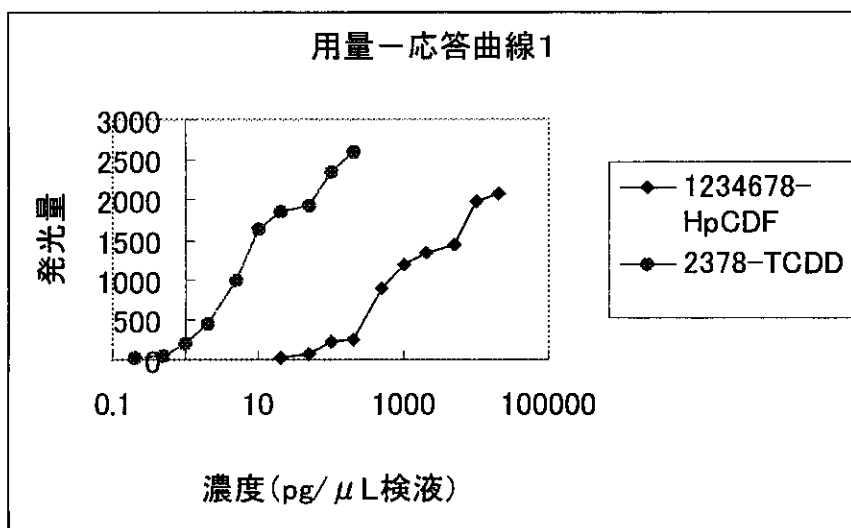


図8 用量-応答曲線1 (1234678-HpCDF)

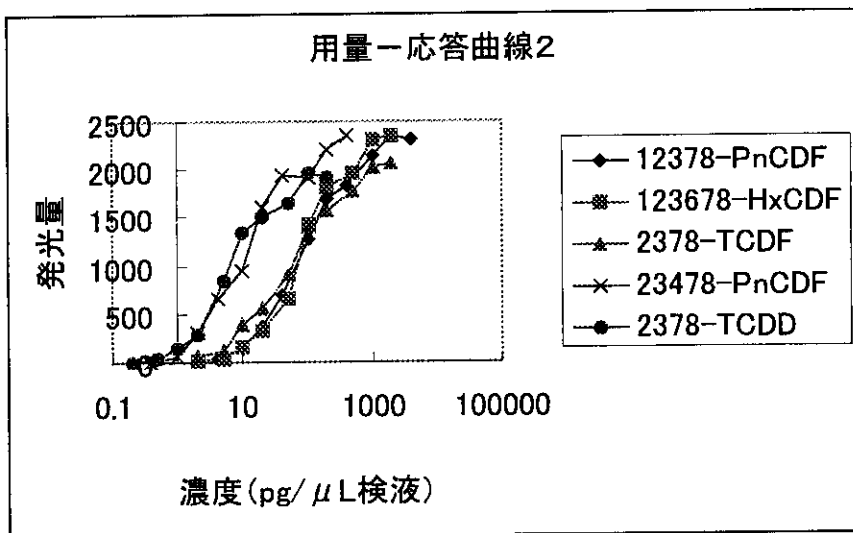


図9 用量-応答曲線2 (PCDFs)

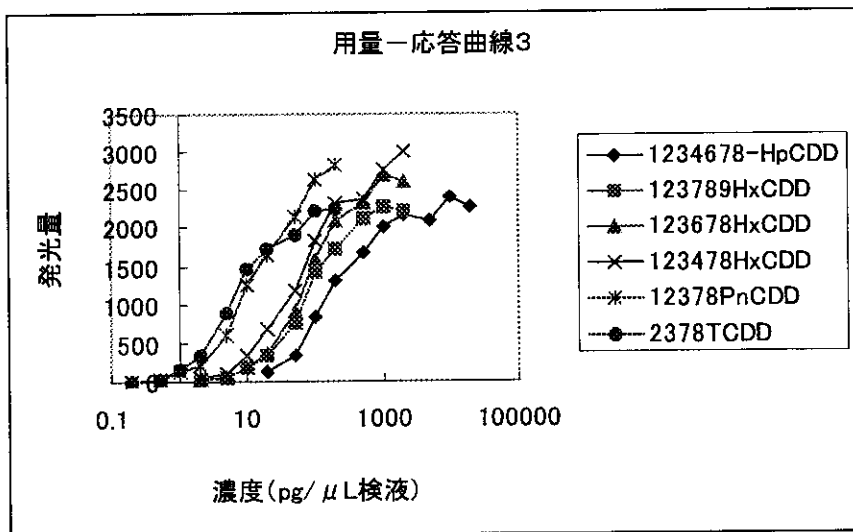


図10 用量-応答曲線3 (PCDDs)

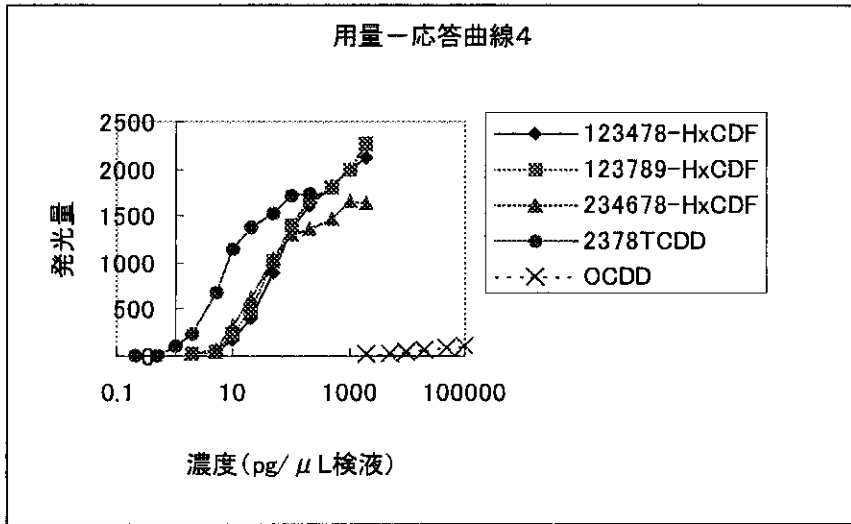


図 1.1 用量-応答曲線 4 (HxCDFs)

表1 AhR アッセイの TEF (Luc-TEF) と WHO TEF との比較

	WHO TEF	Luc-TEF ^a	Luc-TEF/WHO TEF
2,3,7,8-TCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PnCDD	1	0.563	0.56
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.106	1.06
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.085	0.85
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.084	0.84
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.041	4.13
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.116	1.16
1,2,3,7,8-PnCDF	0.05	0.076	1.52
2,3,4,7,8-PnCDF	0.5	0.563	1.13
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.111	1.11
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.074	0.74
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.129	1.29
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.234	2.34
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.010	0.99

^a2,3,7,8-TCDD の EC₅₀ 値を各標品の EC₅₀ 値で除した値

表2 混合標品添加牛乳試料の AhR アッセイ測定値

	調製濃度 pg-TEQ/g 牛乳	AhR アッセイ (ブランク補正 ^a) pg-TEQ/g 牛乳
牛乳 50.04g+DXN82pg-TEQ	1.64	1.28
牛乳 51.67g+DXN82pg-TEQ	1.59	1.35
牛乳 50.49g+CoPCB44pg-TEQ	0.87	0.15
牛乳 50.42g+CoPCB44pg-TEQ	0.87	0.19

^a多層カラム (標品無添加) 溶出液の測定値を差し引いた

表3 混合標品添加牛乳試料の GC-MS 測定値

試料	pg-TEQ/g 牛乳			
	調製濃度		GC-MS 測定濃度	
	DXN	CoPCB	DXN	CoPCB
牛乳 50.04g+DXN82pg-TEQ+CoPCN44pg-TEQ	1.64	0.88	1.68	1.00
牛乳 50.02g+DXN82pg-TEQ+CoPCB44pg-TEQ	1.64	0.88	1.84	1.00
牛乳 50.025g (標品無添加)	—	—	0.0000	0.0006
牛乳 50.02g (標品無添加)	—	—	0.0000	0.0007

表4 混合標品溶液の AhR アッセイ測定値

	調製濃度 pg-TEQ/μL	AhR アッセイ pg-TEQ/μL
DXN ^a	4.1	4.4
CoPCB ^b	4.4	0.9
DXN+CoPCB ^c	4.3	2.9

^aPCDDs/PCDFs 混合標品 (組成比は付表2参照)

^bCoPCB 混合標品 (組成比は付表3参照)

^cDXN と CoPCB 標品溶液の等量混合

表6 母乳試料 (脂肪分) の AhR アッセイおよび GC-MS 測定値 1

試料	AhR アッセイ			GC-MS 測定 ^a	
	pg-TEQ/μL 検液		pg-TEQ/g fat (補正あり ^b)	pg-TEQ/μL 検液	pg-TEQ/g fat
	補正なし ^b	補正あり ^b			
母乳-1	2.34	0.57	14.8	0.96	24.99
母乳-2	3.15	1.38	21.0	1.72	26.15
母乳-3	3.48	1.70	20.7	1.86	22.60
母乳-4	4.05	2.28	31.8	1.70	23.73
母乳-5	3.63	1.85	26.0	1.93	27.13
母乳-6	2.85	1.07	27.3	1.24	31.42

^a大阪府立公衆衛生研究所測定値から算出

^bブランク (多層カラム溶出物 1.77 pg/μL 検液) 補正あり/なし

表5 母乳脂肪中のダイオキシン類及びコブранаPCBs濃度

ダイオキシン異性体	毒性等価係数 (TEF)	No.1		No.2		No.3		No.4		No.5		No.6	
		試料中濃度 pg/g	毒性等量 pg-TEQ/g	試料中濃度 pg/g (ppt)	毒性等量 pg-TEQ/g	試料中濃度 pg/g (ppt)	毒性等量 pg-TEQ/g	試料中濃度 pg/g (ppt)	毒性等量 pg-TEQ/g	試料中濃度 pg/g (ppt)	毒性等量 pg-TEQ/g	試料中濃度 pg/g (ppt)	毒性等量 pg-TEQ/g
2,3,7,8-TCDD	1	1.43	1.430	0.79	0.790	0.35	0.350	0.95	0.950	1.11	1.110	1.62	1.620
1,2,3,7,8-PeCDD	1	5.25	5.250	6.71	6.710	6.08	6.080	5.70	5.700	7.65	7.650	7.85	7.850
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	2.53	0.253	2.18	0.218	1.94	0.194	2.20	0.220	1.50	0.150	1.98	0.198
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	31.48	3.148	35.97	3.597	29.30	2.930	32.23	3.223	37.97	3.797	36.17	3.617
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	5.55	0.555	6.56	0.656	4.61	0.461	5.07	0.507	7.01	0.701	4.33	0.433
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	14.81	0.148	9.9	0.099	11.45	0.115	12.24	0.122	13.62	0.136	12.64	0.126
OCDD	0.0001	86.15	0.009	68.32	0.007	56.51	0.006	63.09	0.006	136.96	0.014	85.87	0.009
計		147.20	10.793	130.43	12.077	110.24	10.135	121.48	10.729	205.82	13.558	150.46	13.853
PCDDs													
ベンゾフラン異性体													
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.81	0.081	0.37	0.037	0.71	0.071	0.72	0.072	0.28	0.028	0.77	0.077
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.48	0.024	0.45	0.023	0.48	0.024	0.37	0.019	0.53	0.027	0.15	0.008
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	7.09	3.545	10.27	5.135	8.35	4.175	9.00	4.500	9.19	4.595	10.14	5.070
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	2.79	0.279	4.11	0.411	2.70	0.270	1.76	0.176	4.41	0.441	2.81	0.281
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	4.15	0.415	3.34	0.334	2.42	0.242	2.25	0.225	4.05	0.405	2.99	0.299
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	1.46	0.146	1.88	0.188	1.82	0.182	1.92	0.192	1.59	0.159	2.34	0.234
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	1.43	0.014	2.30	0.023	1.39	0.014	2.00	0.020	2.38	0.024	1.98	0.020
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000
OCDF	0.0001	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000
計		18.21	4.504	22.72	6.151	17.87	4.978	18.02	5.204	22.43	5.678	21.18	5.988
合計		165.41	15.297	153.15	18.227	128.11	15.113	139.5	15.932	228.25	19.236	171.64	19.841
PCDDs+PCDFs													
コブранаPCB													
3,3',4,4'-TCB	0.0001	26.08	0.003	13.27	0.001	11.95	0.001	17.04	0.002	14.68	0.001	15.45	0.002
3,3',4,4',5'-PeCB	0.1	91.84	9.184	75.35	7.535	70.50	7.050	73.81	7.381	74.58	7.458	111.28	11.128
3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.01	50.92	0.509	38.91	0.389	43.57	0.436	41.28	0.413	43.19	0.432	44.49	0.445
計		168.84	9.696	127.53	7.925	126.02	7.487	132.13	7.796	132.45	7.891	171.22	11.574
合計		334.25	24.993	280.68	26.153	254.13	22.600	271.63	23.728	360.70	27.128	342.86	31.416
ダイオキシン類													
AhR7 ッセイ値 (pg-TEQ/g)		14.2	21.0	20.7	31.8	26.0	27.3						

付表1 AhR アッセイから求めた EC₅₀ 値

	EC ₅₀	Luc-TEF (EC ₅₀ 比) ^a
010307 測定分		
2378-TCDD	5.73	1
1234678-HpCDF	576	9.95E-3
010310 測定分		
2378-TCDD	5.52	1
23478-PnCDF	9.81	5.63E-1
12378-PnCDF	72.5	7.61E-2
2378-TCDF	47.4	1.16E-1
123678-HxCDF	74.8	7.38E-2
010318 測定分		
2378-TCDD	6.03	1
12378-PnCDD	11.2	5.38E-1
123478-HxCDD	56.7	1.06E-1
123678-HxCDD	70.9	8.5E-2
123789-HxCDD	72.2	8.35E-2
1234678-HpCDD	146	4.13E-2
010328 測定分		
2378-TCDD	6.23	1
123478-HxCDF	56.3	1.11E-1
123789-HxCDF	48.4	1.29E-1
234678-HxCDF	26.6	2.34E-1

^aE-n は 10⁻ⁿ を表す

附表2 PCDDs/PCDFs 混合標品 (NKSTB3) 組成

DXN	量比	WHO TEF	TEQ 比
PCDDs			
2, 3, 7, 8-T ₄ CDD	1	1	1
1, 2, 3, 7, 8-P ₅ CDD	1	1	1
1, 2, 3, 4, 7, 8-H ₆ CDD	2	0.1	0.2
1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDD	2	0.1	0.2
1, 2, 3, 7, 8, 9-H ₆ CDD	2	0.1	0.2
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₇ CDD	2	0.01	0.02
O ₈ CDD	4	0.0001	0.0004
PCDFs			
2, 3, 7, 8-T ₄ CDF	1	0.1	0.1
1, 2, 3, 7, 8-P ₅ CDF	1	0.05	0.05
2, 3, 4, 7, 8-P ₅ CDF	1	0.5	0.5
1, 2, 3, 4, 7, 8-H ₆ CDF	2	0.1	0.2
1, 2, 3, 6, 7, 8-H ₆ CDF	2	0.1	0.2
1, 2, 3, 7, 8, 9-H ₆ CDF	2	0.1	0.2
2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₆ CDF	2	0.1	0.2
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-H ₇ CDF	2	0.01	0.02
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-H ₇ CDF	2	0.01	0.02
O ₈ CDF	4	0.0001	0.0004

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）における
「ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究」
分担研究報告書

Ⅰ-4. 遺伝子組換え食品検査の信頼性確保に関する調査研究

分担研究者 豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

遺伝子組換えDNA技術応用食品に関しては、安全性審査の手続きを経していないものが国内で流通しないよう、平成13年から食品衛生法に基づく安全性審査を義務づけるとこととし、あわせて表示についても法的に義務化することとした。従って表示を検証する方法の確立が急務となった。本研究では、国立衛研を中心として、大学、地方衛研、関連企業等から遺伝子組換えDNA技術応用食品の検査法に関する専門家と厚生労働省の行政担当官から検討班を編成し、公的検査の指針となるガイドライン試案を作成した。本試案に基づき厚生労働省は平成13年3月27日にガイドラインを厚生労働省医薬局食品保健部長通知（食発第110号）として発表した。

A. 研究目的

近年バイオテクノロジー技術を応用した遺伝子組換え食品の開発が進み、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきた。消費食品の相当の部分が輸入に依存している我が国においては、今後より不可逆的に、広範囲な組換え食品が流通し、国民の食生活に浸透するものと考えられる。厚生労働省では平成13年から食品衛生法に基づく安全性審査を義務づけるとこととし、あわせて表示についても法的に義務化することとした。また、平成13年4月から、安全性審査を受けていない遺伝子組換え食品又はこれを原材料を用いた食品は、輸入、販売等が法的に禁止されることになった。このことを踏まえ、表示の制度化に伴い、表示内容について検証する方法が求められている。

本研究では遺伝子組換え食品の検査法のための指針を作成することを緊急課題と認識し、「組換えDNA技術応用食品の検査方法のためのガイドライン試案」の作

成について検討を行ったものである。

B. 研究方法

大学、地方衛研、企業等から、食品中の遺伝子組換え食品検査について経験のある専門家、オブザーバーとして厚生省生活衛生局食品保健課（現厚生労働省医薬局食品保健部）の行政担当官等に参加を求め、検討班を編成した。関係者は次のとおりである。

豊田正武、合田幸広、穂山浩（国立医薬品食品衛生研究所）、渋谷雅明（東京大学薬学部）小関良宏（東京農工大学）、紀雅美（大阪市立環境科学研究所）、梶原淳睦（福岡県保健環境研究所）、布籐聡（日本製粉中央研究所）並びに厚生省生活衛生局食品保健課（現厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課）及び厚生省生活衛生局食品保健課検疫所業務管理室（現厚生労働省医薬局食品保健部検疫所業務管理室）の担当官。

C. 研究結果及び考察

平成12年9月11日第1回班会議を行い、研究課題説明を行った。平成12年12月21日第2回班会議を行い、トウモロコシ規

格値の設定のための分別定量実験報告、サンプリング法及び加工食品からのDNA抽出法に関するの進捗状況とガイドライン案の骨格について討論した。平成13年1月22日第3回班会議を行い、ガイドライン試案についての内容について討論した。平成13年2月28日第4回班会議を行い、ガイドライン試案の詳細について最終的な討論を行った。すべての班会議の討論をとりまとめた上、「組換えDNA技術応用食品の検査方法のためのガイドライン試案」を作成した。この試案を基に厚生労働省医薬局食品保健部長より平成13年3月27日にガイドラインが通知された（食発第110号）。このガイドラインにより表示内容について検証する方法が確立された。

E. 結論

通知されたガイドライン及び検査法のフローチャートは別添のとおりである。ガイドラインの項目を次に記載する。

1. 検体採取方法

1.1 組換え DNA 技術応用食品の検体採取

1.1.1. トウモロコシ及び大豆の穀粒の検体採取

1.1.1.1. 袋積みの場合

1.1.1.2. ばら積みの場合

1.1.1.2.1 サイロ搬入時

1.1.1.2.2. はしけ搬入時

1.1.1.2.3. はしけにおける検体採取

1.1.2. パパイヤの検体採取

1.2. 加工食品の検体採取

1.2.1. トウモロコシ及び大豆の粉砕加工品

1.2.2. それ以外の加工食品

2. 安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法

2.1 検査方法

2.1.1. トウモロコシ(CBH351)の検査

2.1.1.1. トウモロコシ穀粒からの CBH351 トウモロコシの検知

2.1.1.1.1. ラテラルフロー法

2.1.1.1.1.1. 実験操作

2.1.1.1.1.2. 結果の判定

2.1.1.2. トウモロコシ加工品からの

CBH351 トウモロコシの検知

2.1.1.2.1. 定性 PCR

2.1.1.2.1.1. PCR 増幅

2.1.1.2.1.2. アガロースゲル電気泳動

2.1.1.2.1.2.1. アガロースゲルの作成

2.1.1.2.1.2.2. 電気泳動

2.1.1.2.1.2.3. ゲルの染色

2.1.1.2.1.3. ゲルイメージ解析

2.1.1.2.1.4. 結果の判定

2.1.1.3. トウモロコシ半製品からの CBH351 トウモロコシの検知

2.1.2. パパイヤ(55-1)の検知

2.1.3. New Leaf Plus ジャガイモの検知

2.2. DNA 抽出精製法

2.2.1. トウモロコシ及び大豆穀粒からの DNA 抽出精製

2.2.1.1. CTAB 法

2.2.1.2. シリカゲル膜タイプキット法

2.2.1.3. シリカーベースレジンタイプキット法

2.2.2. パパイヤからの DNA 抽出精製

2.2.2.1. CTAB 法

2.2.2.2. シリカゲル膜タイプキット法

2.2.3. 加工食品からの DNA の抽出精製

2.2.3.1. タコス及びトルティーヤ（加熱加工されているものに限る）からの DNA の抽出精製

2.2.3.2. ジャガイモからの DNA の抽出精製

2.2.3.3. 缶詰のパパイヤからの DNA の抽出精製

2.2.4. DNA 試料溶液中の DNA の純度確認並びに DNA 試料液の調製と保存

3. 安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法

3.1. 大豆

3.1.1. ELISA 法

3.1.2. 定量 PCR 法

3.1.2.1. 検量線用標準液の作成

3.1.2.2. PCR 用反応液の調製

3.1.2.3. 定量 PCR

3.1.2.4. 検量線の作成

3.1.2.5. 試料の組換え DNA 技術応用食品含有率の計算

3.1.3. 結果の判定

3.2. トウモロコシ

3.2.1. 定量 PCR 法

3.2.1.1. スクリーニング

3.2.1.1.1. Cauliflower mosaic virus 由来の 35 S promoter が組み込まれた組換え品種の定量

3.2.1.1.2. GA21 の定量

3.2.1.1.3. 結果の判定

3.2.1.2. トウモロコシ組換え品種特異的定量

3.2.1.2.1. Event 176、Bt 11、T25、Mon 810 の定量

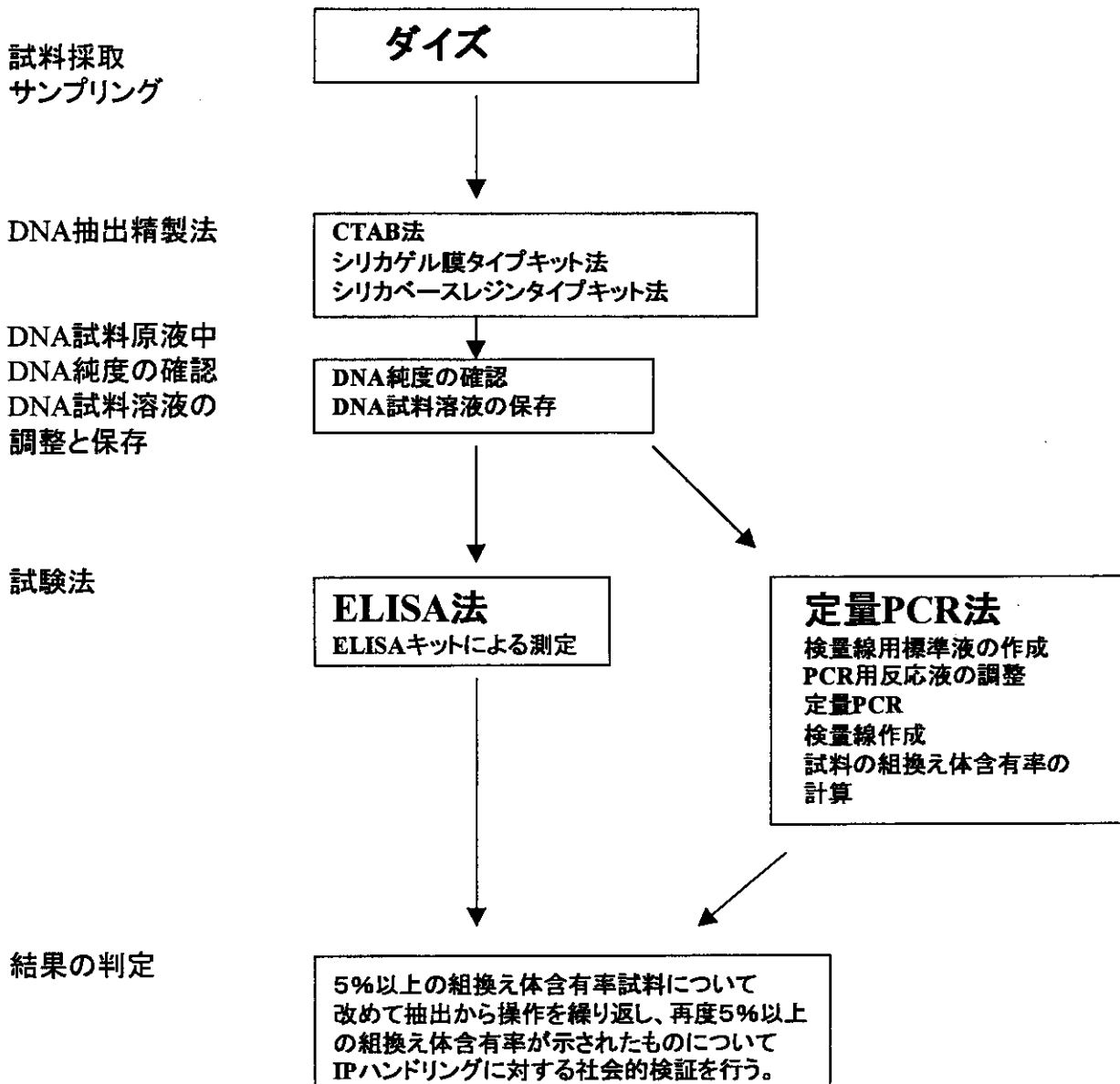
3.2.2. 結果の判定

F. 今後の課題

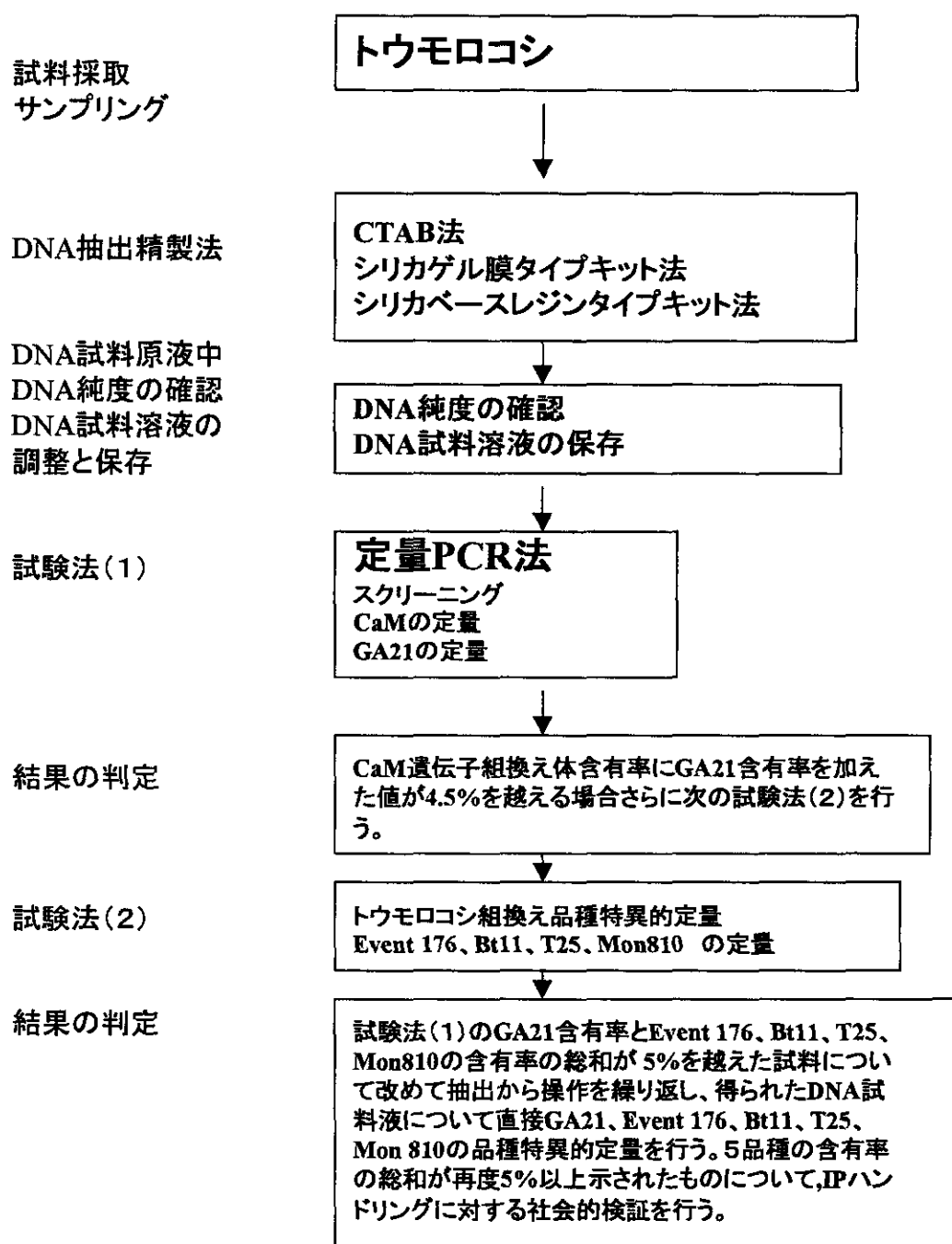
今後の課題として以下の項目が挙げられる。

1. ガイドラインの検査に係わる精度管理体制の整備を確立する。
2. 加工品に関する組換え食品原料の定量法について詳細に検討する。
3. ガイドラインに検査法が掲載していない未承認組換え食品に対して、定性検査法を確立し、随時ガイドラインに付け加える
4. 今後、承認される DNA 組換え食品の定量検査法を確立し、随時ガイドラインに付け加える。

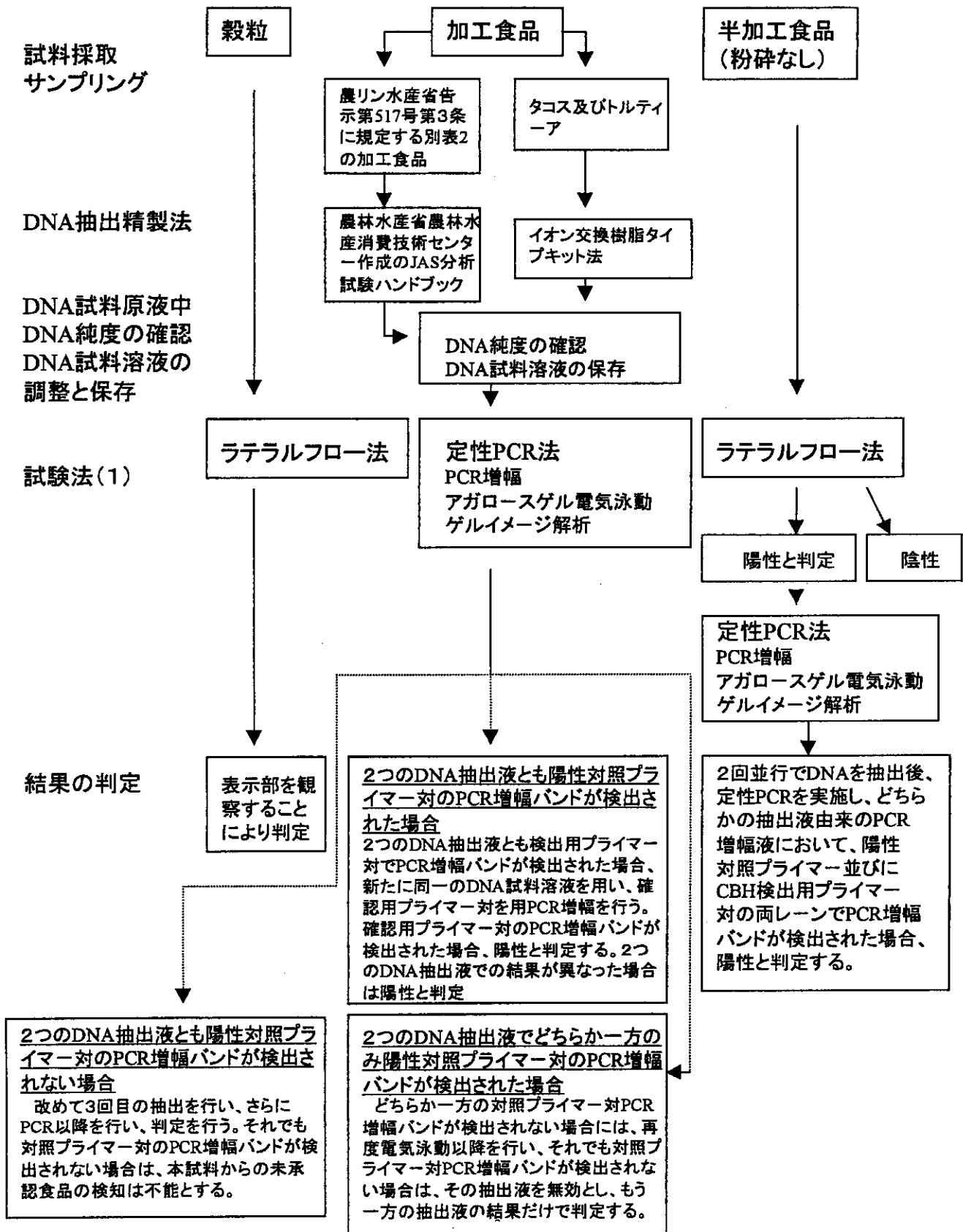
安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の 検査方法(ダイズ)



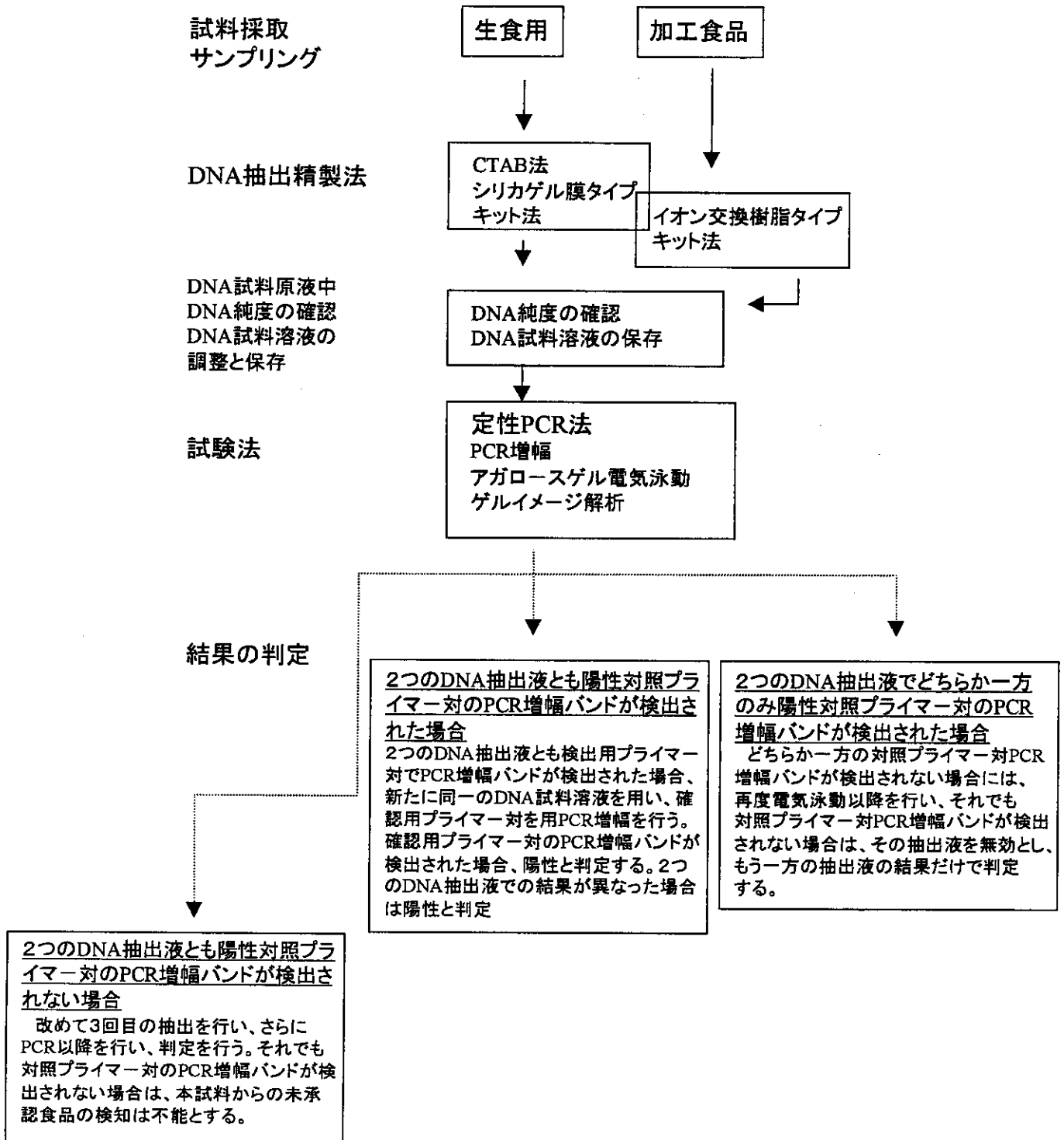
安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の 検査方法(トウモロコシ)



未承認組換え食品の検知 CBH351トウモロコシの検知



未承認組換え食品の検知 パパイヤ(55-1)の検知



未承認組換え食品の検知 New leaf Plus の検知

試料採取
サンプリング

冷凍ジャガイモ

DNA抽出精製法

CTAB法
シリカゲル膜タイプ
キット法

DNA試料原液中
DNA純度の確認
DNA試料溶液の
調整と保存

DNA純度の確認
DNA試料溶液の保存

試験法

定性PCR法
PCR増幅
アガロースゲル電気泳動
ゲルイメージ解析

結果の判定

2つのDNA抽出液とも陽性対照プライマー対のPCR増幅バンドが検出された場合
2つのDNA抽出液とも検出用プライマー対でPCR増幅バンドが検出された場合、新たに同一のDNA試料溶液を用い、確認用プライマー対を用PCR増幅を行う。確認用プライマー対のPCR増幅バンドが検出された場合、陽性と判定する。2つのDNA抽出液での結果が異なった場合は陽性と判定

2つのDNA抽出液でどちらか一方のみ陽性対照プライマー対のPCR増幅バンドが検出された場合
どちらか一方の対照プライマー対PCR増幅バンドが検出されない場合には、再度電気泳動以降を行い、それでも対照プライマー対PCR増幅バンドが検出されない場合は、その抽出液を無効とし、もう一方の抽出液の結果だけで判定する。

2つのDNA抽出液とも陽性対照プライマー対のPCR増幅バンドが検出されない場合
改めて3回目の抽出を行い、さらにPCR以降を行い、判定を行う。それでも対照プライマー対のPCR増幅バンドが検出されない場合は、本試料からの未承認食品の検知は不能とする。

食 発 第 110 号
平成13年3月27日

都道府県知事
各 政令市長 殿
特別区長

厚生労働省医薬局食品保健部長

組換えDNA技術応用食品の検査方法について

組換えDNA技術応用食品に関しては、安全性審査の手続を経ていないものが国内で流通しないよう、本年4月から食品衛生法に基づく安全性審査を義務付けることとし、あわせて表示についても法的に義務化することとしている。

これに関連して、今般、別添のとおり組換えDNA技術応用食品の検査方法を定めたので、検査を行う場合には、これらの方法により実施されたい。

なお、組換えDNA技術は、科学技術分野の中でも最も進歩が早い分野の一つであることから、技術の進歩に対応し、検査方法については順次見直しを行っていくこととしているので、御留意願いたい。