

るといふ利点を持つ。上記2種の方法はそれぞれにタンパク質、また、DNAという異なる生体分子を測定しており、同一検体をこれら2種の方法を用いて測定した場合、算出される定量値が異なる可能性が考えられた。

本研究では、ELISA法に基づき作成された市販キット、ならびに定量的PCR法とを用いて同一の遺伝子組換えダイズ検体を測定し、得られた定量値比較を行うことで、両測定法の間にみられる相関性についての検証を行った。

#### 4. 遺伝子組換え食品の定性ならびに定量検知法における加工処理の影響の評価

平成13年4月からの遺伝子組換え食品の表示制度に対応し、厚生労働省では、医薬局食品保健部長通知として「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」（平成13年3月27日、食発第110号、一部改正：同年5月25日、同158号）で組換え食品の検査方法を定めた。同通知の中では、未承認組換えトウモロコシ、パパイヤ、ジャガイモの定性的検知法に加え、安全性確認ずみのダイズ並びにトウモロコシについて定量法が規定してある。ダイズについては、定量PCR法とELISA法が、複数のGM品種が流通しているトウモロコシについては、定量PCR法が定量法として示されている。通常、熱加工過程によりELISA法の検出対象であるタンパク質は変性する。従って、加工食品中の組換え体の定量には、定量PCR法によるしかない。他方、通知で示されている定量PCR法は、穀粒での含有率を算出する目的で開発された方法であり、遺伝子が断片化すると考えられる加工食品に応用可能かどうか、明確なデータはない。本研究では、まず、市販のダイズ加工品を用い、DNAを抽出し、加工により遺伝子がどの程度断片化するか検討した。さらに、GMダイズと非GMダイズより、実際にGMダイズ

含量既知の豆乳、おから、豆腐を作成し、DNAを抽出した後、通知で示された定量PCR法を用い、加工品中のGM品種含量を実測し、加工によりGM品種比率が変化するかどうか検討した。次いで、エクストルーダを用い、コーングリッツを加工し、トウモロコシ中の内部標準遺伝子として使用するスターチシンターゼIIb (SSIIB) 遺伝子を対象として、定性PCRとともに定量PCRを用い、予めコピー数の判明したプラスミドを標準としてPCR反応前のDNA抽出液中のコピー数を算出し、加工の前後でのコピー数の比較から、同遺伝子の減衰について調べた。

## B. 研究方法

### 1. 遺伝子組換えジャガイモならびにその加工品の検知法の開発

#### 1) Newleaf PlusならびにNewleaf Yの定性検知法の開発

厚生労働省医薬品食品保健部を通じ、モンサント社より入手した遺伝子非組換えジャガイモ2品種 (Russet BurbankおよびSuperior)、安全性審査を通過した遺伝子組換えジャガイモ1品種 (Newleaf Plus : RBMT21-356)、安全性審査中の遺伝子組換えジャガイモ1品種 (Newleaf Y : SEMT15-15) の凍結乾燥済み粉末を試料として用いた。これら試料よりQIAGEN DNeasy Plant Miniキットを用いて抽出精製したDNAをDNA試料溶液として実験に供した。反応組成液は、1×PCR緩衝液 (アプライドバイオシステムズ社製 : ABI社製)、0.20 mmol/L dNTP、3.0 mmol/L塩化マグネシウム、0.5 μmol/Lプライマー及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼになるように混合し、DNA試料溶液2.5 μLを加え、全量を25 μLにした。PCRはABI社製GeneAmp PCR System 9600をサーマルサイクラーとして使用し、条件は以下の通りである。ABI AmpliTaq Gold を用いたホットス

タート法；前熱変性95°C 10 min；熱変性95°C 0.5 min，アニーリング60°C 0.5 min，伸長72°C 0.5 min，繰り返し40回；終了反応72°C 7 min。

Newleaf Plusの検知を目的としたプライマー対としては、Newleaf Plusにのみ導入されているジャガイモ葉巻ウイルス replicase 遺伝子 (*PLRV-rep*) を標的とした確認用 (増幅バンド長172 bp) ならびに、特異性を向上させるため、*PLRV-rep*とその上流に位置し、当該遺伝子の発現を制御するゴマノハグサモザイクウイルス由来のプロモーター配列 (p-FMV) の異種生物由来の2塩基配列領域にまたがる検出用 (同234bp) を設計した。一方Newleaf Yの検知を目的としたプライマー対は、New leaf Yにのみ導入されているジャガイモYウイルス外被タンパク質遺伝子 (*PVYcp*) を標的とした確認用 (同161 bp) ならびに、Newleaf Plus同様検知の特異性を向上させることを目的とし、*PVYcp*とその上流に位置するp-FMVの異種生物由来の2塩基配列領域にまたがる検出用 (同225bp) を設計した。また、品種によらずジャガイモを検知するための陽性対照プライマーとしてジャガイモ内在性遺伝子であるpotato sucrose synthase (PSS) 遺伝子を標的としたプライマー (同216bp) を設計した。(Fig. 1ならびに5) プライマーの合成はすべて Amersham Pharmacia Biotechに委託し、逆相カートリッジ精製品を用いた。プライマーは蒸留滅菌水で50  $\mu$  mol/Lになるよう希釈し、-20°Cにて保存した。

市場に流通している加工品の調査には、世田谷区内のスーパーマーケットで購入したジャガイモを原材料とするスナック菓子54検体を試料として供した。

## 2) NewleafならびにNewleaf Plusの定量分析法の開発

B-1-1記載の遺伝子非組換えジャガイモ2品種ならびにNewleaf Plusに加え、同様に入手した安全性審査を通過した遺伝子組換えジャガイモ2品種 (Newleaf : SPBT02-05、ならびにRBBT-06) と遺伝子非組換えジャガイモ (Shepody) の凍結乾燥粉末、世田谷区内のスーパーマーケットにて購入し凍結乾燥処理を施したトマト、ナス、小麦、米を試料として用いた。これら試料よりQIAGEN DNeasy Plant Miniキットを用いて抽出精製したDNAをDNA試料溶液として実験に供した。定量的PCRにはABI PRIZM 7700を使用し、その際の反応液組成は以下の通りである。Universal PCR Master Mix 12.5  $\mu$  L、対象プライマー0.5  $\mu$  mol/L、対象プローブ0.2  $\mu$  mol/L、20 ng/mL DNA試料溶液2.5  $\mu$  L。これらを混合し最終液量を25  $\mu$  Lとした。New leaf 検知用には *Bacillus thuringiensis* 由来の害虫抵抗性遺伝子 (*CryIIIA*) および、その発現を制御するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター配列 (p-35S) の異種生物由来の2塩基配列にまたがる領域を標的としたプライマーを設計した。一方Newleaf Plusの検知を目的としたプライマーはB-1-1記載のNewleaf Plus検出用プライマーを設計する際に標的とした領域と同一の領域を標的とし、プライマー対を設計した。また、Seppanenらによりジャガイモゲノム中に1コピー存在することが明らかにされているGlutathione S-transferase (GST) 遺伝子 (*ScGST*) を内在性遺伝子の候補に選定し、当該遺伝子を標的とするプライマーを設計した。(Fig. 9)

2. マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムを用いた遺伝子組換え食品の定量分析法の開発

### 1) マイクロキャピラリー型定量PCRシステムを用いた定量的PCR法の開発

ダイズについては、遺伝子組換えダイズであるラウンドアップレディーダイズ(RRS)種子、ならびに国産非遺伝子組換えダイズ品種の種子をそれぞれ粉碎し、試料とした。トウモロコシについては遺伝子組換えトウモロコシ2品種 (Mon810およびGA21) の種子、ならびに米国産遺伝子非組換え種子を同様に粉碎し、試料とした。これら試料よりQIAGEN DNeasy Plant Maxiキットを用いて抽出精製したDNAをDNA試料溶液として実験に供した。PCR試薬キットにはLightCycler™ FastStart DNA Master Hybridization Probe (ロシュ・ダイアグノスティック社製) を使用した。使用した対象プライマーならびに対象プローブは以下の通りである。ダイス定量用としてLe1-n02とLe1-Taq、およびRRS-01とRRS-Taqを使用。Mon810定量用としてSSIIbとSSIIb-Taq、およびP35S-aとP35S-Taqを使用。GA21定量用としてSSIIbとSSIIb-Taq、およびGA21-3とGA21-Taqを使用 (いずれも食発110号記載)。反応組成液は、1XFastStart DNA Hybridization probe、4.0 mmol/L塩化マグネシウム、対象プライマー $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、対象プローブ $0.2 \mu\text{mol/L}$ になるように混合し、DNA試料溶液 ( $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )  $5.0 \mu\text{L}$ を加え、全量を $20 \mu\text{L}$ とした。PCR条件は以下の通りである。前熱変性 $95^\circ\text{C}$  1 min; 熱変性 $95^\circ\text{C}$  10 sec, アニーリング $60^\circ\text{C}$  20 sec, 伸長 $72^\circ\text{C}$  10 sec, 繰り返し50回; 終了反応 $40^\circ\text{C}$  30 sec。

2) 内標比試験ならびにブラインドテスト

内標比測定試験では、国立衛研にて抽出されたDNA試料溶液、対象プライマー、対象プローブ、標準分子 (プラスミド)、実験プロトコル、その他のPCR試薬キットを参加分析機関に送付し、各機関が保有するライトサイクラーシステムを用いて試験を実施した。分析結果は国立衛研で集計し、統計的な異常値棄却検定を施した後に得られ

た数値の平均値を内標比とした。

ブラインドテストでは、混入率未知の粉体試料から抽出したDNA溶液、対象プライマー、対象プローブ、標準分子 (プラスミド)、実験プロトコルを各機関に送付し、内標比試験と同様に試験を実施した。混入率未知の粉体試料は、遺伝子組換えダイズ(RRS)ならびに遺伝子組換えトウモロコシ (Mon810, GA21) のそれぞれを5段階の混入率 (0%、0.1%、0.5%、1.0%、5.0%) となるよう試料を作製後、国立衛研にて各試料からDNAを抽出し、blind duplicateとして各機関に送付した。さらに、内標比測定試験と同様に、分析結果は国立衛研にて集計され、統計処理を施した後に分析法の信頼性評価に用いた。全ての試験計画及び統計処理方法は *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17<sup>th</sup> Ed. を参考に行った。

3. 遺伝子組換え食品とその加工品を対象とした検知技術の妥当性の評価

#### 1) 脱脂ダイズを検体とした場合のELISA法と定量的PCR法との比較

醸造用脱脂ダイズは国内の商事会社より入手した。IP醸造用脱脂ダイズ、飼料用ダイズ粕フレーク、米国産遺伝子非組換えダイズを加工した脱脂ダイズ (脱脂ダイス Non-GM USA)、インド産非遺伝子組換えダイズを加工した脱脂ダイズ (脱脂ダイス Non-GMインド)、いり豆はいずれも厚生労働省横浜検疫所を通じて入手した。4種類のダイズ粕 (ダイズ粕A、B、C、D) は国内の取扱業者より入手した。

上記脱脂ダイズそれぞれに粉碎処理を行い、100 mesh (編み目の長さ $150 \mu\text{m}$ ) の篩を通過したものを試料とした。ELISA法の標準品としては脱脂ダイズ用ELISA標準品 (0.3、1.25、2.5%) を使用した。ELISA法による遺伝子組換えダイズの定量には

GMO/Soya RUR Test Kitを用いた。定量的PCR実験に供するDNAの抽出精製はQIAGEN DNeasy Plant Miniキットを用いて行った。定量的PCRの反応液25 $\mu$ Lの組成はUniversal PCR Master Mix 12.5 $\mu$ L、対象プライマー0.5 $\mu$ mol/L、対象プローブ0.2 $\mu$ mol/L、20ng/mL DNA試料溶液2.5 $\mu$ Lまたは検量線用標準液2.5 $\mu$ Lである。定量的PCR装置にはABI PRISM 7700を用いた。

## 2) 市販ダイズ加工品を検体とした両測定法の比較

市販豆腐は、世田谷区内のスーパーマーケットにて購入した48種55品目を検体として使用した。このうち、平成12年2月に4品目、また平成12年11月から平成13年2月にかけて26品目を購入しており、表示義務制度施行以前に流通した豆腐としては計30品目を検体として供した。表示義務制度施行以後に流通した豆腐としては、平成13年4月から同年5月にかけて購入した25品目を使用した。なお、検体とした55品目のうち、7品目に関しては表示義務制度施行時期を挟んで、ロットの異なる同一品を購入した。

市販豆腐は凍結乾燥後、粉碎し、検体試料とした。各試料より、QIAGEN DNeasy Plant MiniキットあるいはWizard<sup>®</sup> Magnetic DNA Purification System for Food (Promega社製)を用いてDNAを抽出精製し、各PCR法を用いた試験にDNA試料溶液として供した。定性PCR法においては、松岡らによって報告されたダイズlectin遺伝子を標的とするプライマー対 (Le1 01-5' ならびにLe1 n-3') を陽性対照用プライマー対として、導入発現カセット内において異種生物由来の2塩基配列領域を標的として設計されたプライマー対 (CTP n-5' ならびにEPSPS n-3') を検出用プライマー対として使用した。反応組成液は、1 $\times$ PCR緩衝液 (ABI社製)、0.20 mmol/L dNTP、2.0 mmol/L

塩化マグネシウム、1.0 $\mu$ mol/Lプライマー及び0.625 units Taq DNAポリメラーゼになるように混合し、DNA試料溶液2.5 $\mu$ Lを加え、全量を25 $\mu$ Lにした。PCRはABI社製GeneAmp PCR System 9600をサーマルサイクラーとして使用し、条件は以下の通りである。ABI AmpliTaq Gold を用いたホットスタート法; 前熱変性94 $^{\circ}$ C 3 min; 熱変性95 $^{\circ}$ C 0.5 min, アニーリング62 $^{\circ}$ C 1.0 min, 伸長74 $^{\circ}$ C 0.5 min, 繰り返し45回; 終了反応72 $^{\circ}$ C 7 min。定量的PCR法は食発110号記載の方法に準拠した。

## 4. 遺伝子組換え食品の定性ならびに定量検知法における加工処理の影響の評価

ダイズ: 豆腐, 湯葉, 味噌, 納豆等の加工食品は、2000年11月から2001年1月にかけて大阪府内のスーパーで購入したのを用いた。DNAの抽出は、QIAGEN社のDNeasy<sup>™</sup> Plant Maxi Kitを用いた。また既知のlectin1 遺伝子の塩基配列をもとに、これから95 bp、195 bp、295 bp、395 bp、495 bp、595 bpの長さの増幅産物が得られるようにプライマー・セットを設計し、定性PCRを行った。定性PCRは、Applied Biosystems社のGeneAmp PCR system 9600を用い、反応条件として、94 $^{\circ}$ Cで3分間保持後、94 $^{\circ}$ C 30秒、58 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を1サイクルとし、40サイクルの増幅反応を行った。増幅産物は、2% agarose電気泳動で分離・検出した。GM、非GMダイズは、米国オハイオ州1998年度産のものを用いた。重量比で、GM品種含量が、1、5、50%となるようダイズを混合したのち、混合ダイズとGM 100%ダイズより加工品を調製した。DNAの抽出は、前述の方法と同様に行った。定量PCRは、通知の方法に従いApplied Biosystems社のABI PRISM7700を用いた。

トウモロコシ: MON810が数%混入している米国産トウモロコシ2種を使用した。そ

れぞれコーングリッツを調製した後、食品研究用 2 軸エクストルーダ（日本製鋼所製ラボルーダマーク II-S）を用い、126℃（低温）、162℃（適温）、184℃（高温）の温度条件下、スナック菓子加工を行った。また温度のみの影響を調べるために、同上の温度条件にした油にコーングリッツ 1 分間つけ、加熱処理した。これらの加工・処理したサンプルおよび未加工のコーングリッツから QIAGEN 社 Genomic-tip system によって独立に 5 回ずつ DNA を抽出した。これらをテンプレートとして、SSIIb 遺伝子に対して 112 bp、197 bp、289 bp、403 bp、499 bp、602 bp の長さの増幅産物が得られるように設計したプライマー・セットを用いて定性 PCR を行った。また定量 PCR については増幅バンド長が 151bp となる SSIIb 遺伝子用プライマーを用いて ABI PRISM 7700 によって行った。

### C. 研究結果及び考察

1. 遺伝子組換えジャガイモならびにその加工品の検知法の開発

#### 1) Newleaf PlusならびにNewleaf Yの定性検知法の開発

ジャガイモゲノムに普遍的に存在する内在性遺伝子としてPSS遺伝子を選定し、PCRの陽性対照プライマー対として、当該遺伝子の塩基配列情報（Accession No. U21129）をもとに、216 bpのバンド長を持つ増幅産物を生じるようプライマー対を設計した（陽性対照用プライマー対：PSS01n-5' およびPSS01n-3'）。

Newleaf Plus (NLP) にはジャガイモ葉巻ウイルス (PLRV) の感染を抑制することを目的に当該ウイルスのもつreplicase 遺伝子 (PLRV-rep) が導入されている。また、PLRV-repはNLPにのみ導入されているため、同遺伝子を標的とすることで、他の遺伝子組換えジャガイモと明確に区別しNLPを検

知することが可能となる。そこで、塩基配列情報 (Accession No. AF220151) をもとに当該遺伝子内に172 bpのバンド長を持つ増幅産物を生じるようプライマー対を設計した (確認用プライマー対：PLRV-rep1-5' およびPLRV-rep1-3')。しかし同遺伝子は、自然環境下でPLRVに感染した検体においても存在するため、検知の特異性をより向上させることを目的とし、PLRV-repとその上流に位置し当該遺伝子の発現を制御するゴマノハグサモザイクウイルス (FMV) 由来のプロモーター配列 (p-FMV: Accession No. AR091795) の異種生物由来の2塩基配列領域にまたがるプライマー対を設計した (検出用プライマー対：p-FMV02-5' およびPLRV-rep01-3')。各プライマーを設計した標的塩基配列領域ならびに各プライマー対によって増幅される増幅バンド長をFig. 1 に示す。これらプライマー対を用い、Newleaf (NL)、NLP、Newleaf Y (NLY) の各遺伝子組換えジャガイモ4種、ならびにに遺伝子非組換えジャガイモ2種を検体としてPCR増幅を行ったところ、プライマー対 No. 2 (確認用プライマー対) ならびにNo. 3 (検出用プライマー対) を使用した場合にNLPに特異的に予想されるバンド長を持つ増幅産物が得られることが明らかとなった。(Fig. 2、3) なお、陽性対照用プライマー対、PSS01n-5' およびPSS01n-3' を用いてPCR増幅を行った場合には、すべての検体で予想されるサイズのバンド長を持つ増幅産物が得られた。さらに、NLP含量を5~0.01% (wt/wt) まで段階的に希釈した疑似混入試料についてプライマー対No. 3を用いた検知を実施したところ、本プライマー対により0.5%の混入を検知することが可能であることが明らかとなった。(Fig. 4) 以上の結果より、上記プライマー対を用いることでNLPの特異的な検知が可能であることが

示された。

一方、NLVにはジャガイモYウイルス (PVY) の感染を抑制することを目的に当該ウイルスのもつ外被タンパク質遺伝子 (*PVYcp*) が導入されている。また、*PVYcp*はNewleaf Yにのみ導入されているため、同遺伝子を標的とすることで他の遺伝子組換えジャガイモと明確に区別し検知することが可能となる。そこで、Lawsonらによって報告されている情報をもとに当該遺伝子内に161bpのバンド長を持つ増幅産物を生じるようプライマー対を設計した (確認用プライマー対: PVY01-5' およびPVY01-3')。しかし同遺伝子は、自然環境下でPVYに感染した検体においても存在するため、検知の特異性をより向上させることを目的とし、*PVYcp*とその上流に存在するp-FMVの異種生物由来の2塩基配列領域にまたがるプライマー対を設計した (検出用プライマー対: p-FMV05-5' およびPVY02-3')。各プライマーを設計した標的塩基配列領域領域ならびに各プライマー対によって増幅される増幅バンド長をFig. 5に示す。これらプライマー対を用い、NLP検知法検討の際に用いたもの同一の検体を用い、PCR増幅を行ったところ、プライマー対No. 4 (確認用プライマー対) ならびにNo. 5 (検出用プライマー対) を使用した場合のみにNLV特異的に予想されるバンド長を持つ増幅産物が得られた。(Fig. 6、7) さらに、NLV含量を5~0.01% (wt/wt) まで段階的に希釈した疑似混入試料についてプライマー対No. 5を用いた検知を実施したところ、0.5%の混入を検知することが可能であることが明らかとなった (Fig. 8)。以上の結果より、上記プライマー対を用いることでNLVの特異的な検知が可能であることが示された。

市場に流通するジャガイモ加工食品における表示内容の検証ならびに安全性審査の

終了していない遺伝子組換えジャガイモの混入についての実態調査を行うべく、上記検知法を用い、世田谷区内のスーパーマーケットにて購入したジャガイモ加工食品54検体を対象とした試験を行った。その結果、試験に供した54検体中には、NL、NLP、NLVのいずれも含有されていないことが明らかとなった。

## 2) NewleafならびにNewleaf Plusの定量分析法の開発

NLならびにNLPは、平成13年度現在、安全性審査を終了しており、国内市場に流通することが可能な状況にある。そのため、表示内容の検証を可能とする定量的分析法が必要とされる。そこでTaqMan Chemistryを応用した定量PCR法の開発を検討した。NL検知用には*CryIIIA*とその上流に存在するp-35Sの異種生物由来の2塩基配列にまたがる領域を標的としたプライマー対 (NL012-5' ならびにNL012-3') を、NLP検知用には*PLRV-rep*とその上流に存在するp-FMVの異種生物由来の2塩基配列にまたがる領域を標的としたプライマー対 (NLP019-5' ならびにNLP019-3') を設計した。また、内在性遺伝子の候補として選定した*ScGST* (Accession No. AF002692) については、*ScGST*のコードするGSTが植物界に広く存在している事実を考慮し、特異性の高い塩基配列領域として知られる非翻訳領域 (3' untranslated region: 3' UTR) を標的としてプライマー対 (StGST01-5' ならびにStGST01-3') を設計した。TaqMan プローブは各標的配列内部に存在するようPrimer Express (ABI社製) を使用し設計した。各プライマーを設計した標的領域ならびに各プライマー対によって増幅される増幅バンド長をFig. 9に示す。

上記対象プライマー対ならびに対象プローブを用い、ABI PRISM 7700を使用しての

定量的PCR実験を行ったところ、NL定量系、NLP定量系、ならびに*ScGST*定量系ともに特異的な遺伝子増幅産物の増加が認められ、またその効率も良好なものであった (Fig. 10ならびにTable 1)。さらにNL、あるいはNLPの凍結乾燥粉末をトウモロコシの凍結乾燥粉末を用いて1~20% (wt/wt) となるよう希釈することで疑似混入試料を作成し、それぞれ対応する定量系にて定量実験を行ったところ、いずれの定量系においても混入率を反映した定量結果が得られ、検討された定量系が定量分析法作成に大きく寄与することが示された (Fig. 11ならびにTable 2)。

2. マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムを用いた遺伝子組換え食品の定量分析法の開発

#### 1) マイクロキャピラリー型定量PCRシステムを用いた定量PCR法の開発

試薬濃度及びPCR条件について検討を行った結果、至適塩化マグネシウム濃度は4 mmol/L、対象プライマー及び対象プローブの至適濃度は各0.5  $\mu$ mol/L、0.2  $\mu$ mol/Lと規定した。PCR条件は開発者により提示された実験方法に示された方法が最適であった。確立したPCR条件、ならびにRRS定量用プラスミドを用いて再現性を検討した結果、キャピラリー間のCV値は2.5%以内、Run間のCV値は5%以内であり、良好な再現性が得られた。また、ブラインドテスト用試料をライトサイクラーシステムならびにABI PRISM 7700を用いた定量分析試験の検体として供し、得られた定量値について比較したところ、両器機を用いて得られた定量値には良好な相関性が認められた。

#### 2) 内標比試験ならびにブラインドテスト

内標比試験における各8分析機関のデータを集計、統計処理を行った結果をFig. 12~14に示す。その結果、RRSの内標比は0.96、

CaMV35S promoter (Mon810)の内標比は0.44、GA21の内標比は1.82となった。また、ブラインドテストにおける各分析機関のデータを集計、統計処理を行った結果をTable 3及びFig. 15~17に示す。本定量法の定量下限は混入率0.5%程度であった。低混入率での室内誤差及び室間誤差はやや高いが、表示義務上の混入率限度値である5%では良好な結果が得られた。以上の結果より、マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムを用いることで組換え食品の定量分析が可能であることが示された。

3. 遺伝子組換え食品とその加工品を対象とした検知技術の妥当性の評価

#### 1) 脱脂ダイズを検体とした場合のELISA法と定量PCR法との比較

ELISA法では導入遺伝子の産物であるタンパク質を検出定量化するのに対し、定量PCR法では導入遺伝子自身が持つ標的配列を増幅し、増幅したDNAを検出定量化する。定量化に当たり測定対象が異なることより、これら両法による定量値に違いが生じる可能性が考えられた。特にタンパク質は加熱処理等の影響を受けやすく、加工食品での正確な定量が不可能となる場合が考えられる。加工食品のモデルとして複数の脱脂ダイズ試料、いり豆、ダイズ粕を検体とし、各同一検体を対象にELISA法、ならびに定量的PCR法を用いた定量実験を行った。その結果、定量的PCR法により得られた結果においては、10検体中8検体において遺伝子組換えダイズが検出されたが、一方のELISA法においては10検体中7検体で遺伝子組換えダイズが検出されなかった。また、ELISA法によって遺伝子組換えダイズが検出された3検体についても、ELISA法により得られた定量値と、対応する検体について定量的PCR法により得られた定量値とを比較すると、大きな開きがあり、いずれも、ELISA法での定量

値が低く算出されていることを示していた (Table 4)。さらに、両法により得られた定量値の相関を算出したところ、相関係数 ( $R^2$ ) 0.7312が得られ、両法により得られる定量値の間に相関性が認められないことが示された (Fig. 18)。

## 2) 市販ダイズ加工品を検体とした両測定法の比較

市販豆腐55品目から抽出精製したDNAをDNA試料溶液とし、定性PCR法を用いた試験を実施したところ、表示義務制度施行以前に購入した30品目 (サンプル番号1-30) のうち13品目から組換え遺伝子が検知された。また、検知された13品目において表示内容の確認を行ったところ、8品目に関しては遺伝子組換えダイズ不使用の表示があった。一方、表示義務制度施行後に購入した25品目 (サンプル番号31-55) に対して同様の試験を実施したところ、対象25品目のうち7品目から組換え遺伝子が検知された。また、検知された7品目すべてに遺伝子組換えダイズ不使用の表示が確認された。これら55品目の調査結果をTable 5に示す。さらに、同一品目について、表示制度施行時期を挟んで異なるロットの検体を入手し、それらについての試験を行ったところ、表示義務制度施行以前の別時期に購入した2製品 (製品AならびにB) のうち、1製品 (製品B) において検知結果の差違が確認された。また、表示義務制度施行時期を挟んで購入した5製品 (製品C、D、E、FおよびG) のうち、1製品 (製品E) において購入時期によって差違が認められた。これらの結果をTable 6に示す。

遺伝子組換えダイズ不使用の表示があり、かつ先の定性的検知法を用いた試験法において陽性判定のなされた検体について、その混入量の確認を行うべく、定量的PCR法を用いた定量実験を行った。その結果い

れの検体においても遺伝子組換えダイズの混入量は1%未満と算出された (Table 7) よって、これら当該製品においては意図せざる混入があったものと推測された。

## 4. 遺伝子組換え食品の定性ならびに定量検知法における加工処理の影響の評価

ダイズ: ダイズを原料とする各種市販食品のDNAの断片化を検証した結果、納豆、醤油のような醗酵工程を経ないものに関しては、200 bpのサイズまでは比較的安定して増幅産物が得られることが判明した。次に、通知の定量PCR法により、GM品種混合比が正しく定量検知できるかどうか検討を行った。GM品種混合比を1、5、25、50、75、100%となるようダイズを調製し、粉砕物について定量PCRを行ったところ、それぞれ0.8、6.6、29、58、76、98%の定量値 ( $R^2$  値0.991) が得られ、正しく定量検知されることが判った。さらに、加工食品について、定量を行ったところ、1%含有ダイズから調製した豆乳、おから、豆腐で、各々0.60、0.66、0.84%、5%含有ダイズから調製したもので、4.2、4.6、3.8%、50%含有ダイズから調製したもので、49、50、50%、100%ダイズから調製したもので105、111、112%と、良好な結果が得られ、加工によるGM品種比率の顕著な変化・変動は見られなかった。このことから、ダイズ加工品において、通知で示された定量PCR法によって、GM品種含量の定量が良好にできることが示された。

トウモロコシ: 定性PCRの結果、スナック菓子加工によって、温度が126°Cですすでに300 bp以上のDNA断片の増幅が見られなくなり、著しい核DNAの断片化が生じていることがわかった。しかし、油煎で加熱処理をただけの場合では、130°Cにおいても602 bpのDNA断片の増幅が見られた。よって、エクストルーダ加工では、加熱に

見られた。よって、エクストルーダ加工では、加熱による核 DNA の断片化のみならず、射出という物理的剪断力による核 DNA の断片化が生じているものと考えられた。次に本現象を定量的に調べるために定量 PCR を行った。未加工トウモロコシでは、トウモロコシの違いによる検知量に差はなかった。しかし低温加工すると、検知される遺伝子のコピー数が未加工品と比較し 1/100~1/1000 程度まで減衰していることが判明した。また、適温加工処理では、定量限界以下にまで減衰するサンプルも生じた。定量できたものについてのみ計算すると、1/20000 程度遺伝子量が減衰していることが判明した。さらに高温加工を行ったものでは、全ての検体で定量検知が不可能であった。以上の結果を考えると、エクストルーダ加工では温度と同時に圧力がかかり、物理的な剪断力が DNA を減衰させ、PCR で検知できるコピー数が大幅に減少することが明らかとなった。

#### D. 結論

1. 遺伝子組換えジャガイモならびにその加工品の検知法の開発

1) 安全性審査の終了した Newleaf Plus ならびに未終了の Newleaf Y について定性検知法を確立した。

2) 安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ2品種を定量的に検知するための定量分析法の検討を行い、内在性遺伝子の選定も含め、その開発段階を前進させた。

2. マイクロキャピラリー型リアルタイム PCR システムを用いた遺伝子組換え食品の定量分析法の開発

新たな遺伝子組換え食品の定量分析系としてマイクロキャピラリー型リアルタイム PCR システムを用いた定量系を開発した。また8分析機関参加による試験により、ライトサイクラーシステムにおける遺伝子組

換えダイズならびにトウモロコシの内標比が決定された。

3. 遺伝子組換え食品とその加工品を対象とした検知技術の妥当性の評価

ダイズ加工品中の遺伝子組換えダイズの定量には定量的PCR法を用いることにより、信頼性の高い数値が得られることを示した。

また、表示義務制度施行前後の両時期において遺伝子組換えダイズの混入した市販豆腐が発見されたが、定量実験の結果いずれの製品においても混入率は1%未満であることが明らかとなり、意図せざる混入が起きてはいるものの、表示義務に即した表示がなされているものと判断された。

4. 遺伝子組換え食品の定性ならびに定量検知法における加工処理の影響の評価

大豆加工品においては、食発第110号に記載されている検知法により加工の影響を受けることなく分析を行うことが可能であったが、トウモロコシ加工品においては、加工様式により影響を受ける可能性があることを明らかにした。

#### E. 参考文献

1) Mervi M. Seppanen, Teodoro Cardi, Marianne Borg Hyokki, Eija Pehu, Characterization and expression of cold-induced glutathione S-transferase in freezing tolerant *Solanum commersonii*, sensitive *S. tuberosum* and their interspecific somatic hybrids. (Plant Sci.), **153**, 125-133 (2000)

2) Takeshi Matsuoka, Yoshimi Kawashima, Hiroshi Akiyama, Hirohito Miura, Yukihiro Goda, Tamaki Sebata, Kenji Isshiki, Masatake Toyoda, Akihiro Hino, A detection method for recombinant DNA from genetically modified soybeans and processed foods containing them. (J. Food Hyg. Soc. Japan), **40**, 149-157 (1999)

3) Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. (AOAC

International), Appendix D, 1-11 (2000)

## F. 研究業績

### 論文

- 1) T. Matsuoka, H. Kuribara, H. Akiyama, H. Miura, Y. Goda, Y. Kusakabe, K. Isshiki, M. Toyoda, A. Hino, "A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize," *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 42, 24-32 (2001).
- 2) T. Matsuoka, H. Kuribara, S. Suefuji, H. Akiyama, H. Miura, Y. Kusakabe, Y. Goda, K. Isshiki, M. Toyoda, A. Hino, "A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351," *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 42, 197-201 (2001).
- 3) Y. Goda, T. Asano, M. Shibuya, A. Hino, M. Toyoda, "Detection of recombinant DNA from genetically modified papaya," *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 42, 231-236 (2001).
- 4) M. Mutsuga, H. Ohta, M. Toyoda, Y. Goda, "Comparison of carotenoids between GM and Non-GM papaya," *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 42, 367-373 (2001).
- 5) Y. Goda, Y. Kakihara, H. Akiyama, T. Matsuoka, A. Hino, M. Toyoda, "Detection of recombinant DNA from genetically modified maize grain," *J. Food Hygienic Soc. Japan*, 43, 74-79 (2002).
- 6) H. Akiyama, M. Matsumoto, K. Sugimoto, K. Isuzugawa, M. Shibuya, Y. Goda, M. Toyoda, "A Detection Method of Recombinant DNA from Genetically Modified Poteto (New Leaf Plus Poteto) and Detection of NewLeaf Plus Poteto in sunack," *J. Food Hygienic Soc. Japan*, 43, 24-29 (2002).
- 7) T. Matsuoka, H. Kuribara, K. Takubo, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, A. Hino, "Detection of recombinant DNA segments Introduced to genetically modified maize (*Zea*

maize)," *J. Agric. Food Chem.*, submitted.

- 8) Y. Kakihara, Y. Goda, H. Akiyama, H. Matsufuji, M. Chino, M. Toyoda, M. Takeda, "Detection of Recombinant DNA from Commercial Tofu and Estimation of GM Contents in Material Soybean," *Jpn. J. Food Chem.*, submitted.
- 9) H. Kuribara, Y. Shindo, T. Matsuoka, K. Takubo, S. Futo, N. Aoki, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, A. Hino, "Quantification methods using novel reference molecules for detection of genetically modified maize and soybean," *J. AOAC International*, submitted.
- 10) Y. Shindo, H. Kuribara, T. Matsuoka, K. Takubo, S. Futo, C. Sawada, J. Shono, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, A. Hino, "Validation studies of real-time PCR analyses for ine-specific quantification of genetically modified maize and soybean using new reference molecules," *J. AOAC International*, submitted.
- 11) 遺伝子組換えばれいしょの検査法の概要 穂山浩、豊田正武 食品衛生研究 52 13-20(2002)  
学会発表等
- 1) 日本農芸化学会2002年大会「遺伝子組換えジャガイモの定量的検知技術の開発」日野明寛、栗原秀夫、穂山浩、松岡猛、布藤聡、一色賢司、豊田正武 (2002.3)
- 2) 日本食品化学会学術講演会「市販豆腐からの組換え遺伝子の検知並びに原料ダイズ中の組換え体比率の推定」合田幸広、穂山浩、豊田正武、柿原芳輝、松藤寛、武田明治 (2001.5)
- 3) 日本食品化学会学術講演会「ダイズ加工による遺伝子の断片化と組換え体比率の変化の有無」荒川史博、小笠原健、鈴木優子、小関良宏、合田幸広、豊田正武 (2001.5)
- 4) 日本食品化学会学術講演会「加工によ

るトウモロコシ中の内部遺伝子の減衰」小笠原健、荒川史博、鈴木優子、小関良宏、合田幸広、豊田正武 (2001.5)

5)第38回全国衛生化学技術協議会年会「リアルタイムPCRによる遺伝子組換え食品の定量分析についてーライトサイクラーシステムの適用ー」穂山浩<sup>1</sup>、松本美佐緒<sup>1</sup>、杉本和恵<sup>1</sup>、合田幸広<sup>1</sup>、豊田正武<sup>1</sup>、梶原淳睦<sup>2</sup>、紀雅美<sup>3</sup>、中間昭彦<sup>3</sup>、富岡千鶴子<sup>4</sup>、日野明寛<sup>5</sup>、松岡猛<sup>6</sup>(2001.11)

6)日本食品衛生学会特別シンポジウム：食の安全性を取りまく諸問題に関する最近の知見と動向「遺伝子組換え食品の検知について」穂山浩 平成14年2月13日(東京)

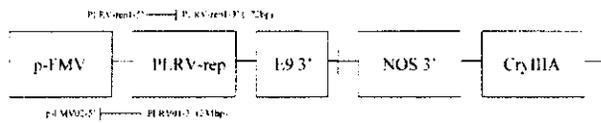
7)日本薬学会第122年会「マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムによる遺伝子組換え食品の定量分析について」穂山浩、和久井千世子、渡邊敬浩、三浦嘉巳、合田幸広、豊田正武、吉村倫彰、紀雅美、山本敦史、富岡千鶴子、日野明寛、酒井栄一、松岡猛、布藤聡、小川真智子、梶原淳睦 (2002.3)

7)日本薬学会第122年会ミニシンポジウム「遺伝子組換え食品の検知法」穂山浩 (2002.3)

8)マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムによる遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズの定量法(2002.5.第84回日本食品衛生学会学術講演会発表予定)和久井千世子、渡邊敬浩、三浦嘉巳、穂山浩、豊田正武、吉村倫彰、紀雅美、山本敦史、富岡千鶴子、日野明寛、酒井栄一、松岡猛、布藤聡、小川真智子、梶原淳睦、島津光伸

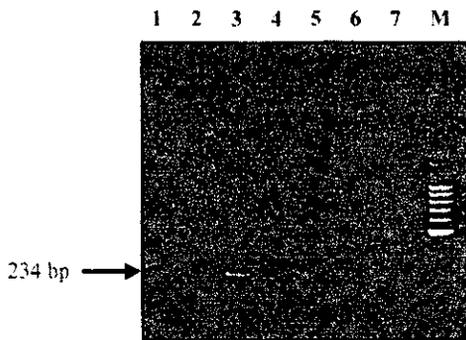
9)Program 115<sup>th</sup> AOAC International Annual Meeting and Exposition 「Development and Validation of a Real-time PCR Analysis for Quantification of Genetically Modified Soybean and Maize Using Novel Reference Molecules」Yoichiro Shindo, Takeshi matuoka,

Hideo Kuribara, Satoshi Futo, Yukihiro Goda, Akihiro Hino (September 12, 2001)



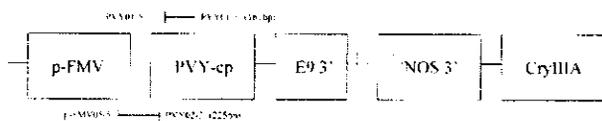
**Fig.1 Schematic diagram of PCR primers designed for detection of NewLeaf<sup>®</sup> Plus potato (NLP)**

The two pairs of PCR primers were designed for detection of NewLeaf<sup>®</sup> Plus potato (NLP). The expected lengths of PCR products are indicated in parentheses.



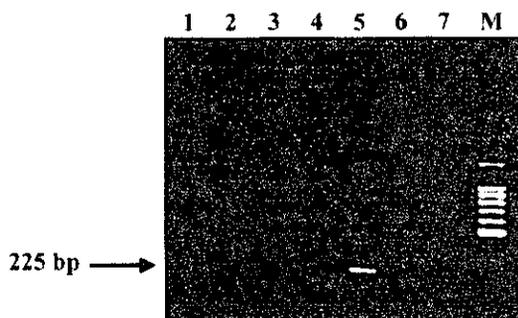
**Fig. 3 Specificity of potato-specific primers (primer pair No. 3).**

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. See foot notes for Fig. 2.



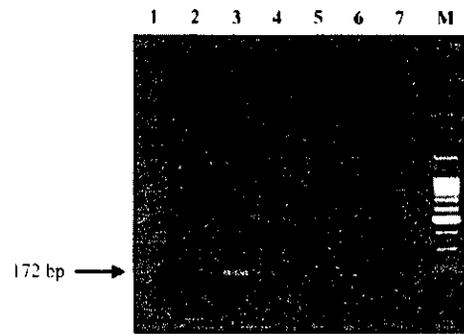
**Fig.5 Schematic diagram of PCR primers designed for detection of NewLeaf<sup>®</sup> Y potato (NLY)**

The two pairs of PCR primers were designed for detection of NewLeaf<sup>®</sup> Plus potato (NLY). The expected lengths of PCR products are indicated in parentheses.



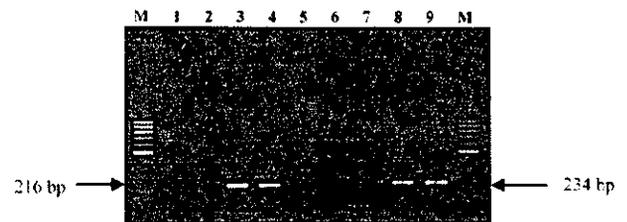
**Fig. 7 Specificity of potato specific primer (primer pair No. 5)**

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. See foot notes for Fig. 6



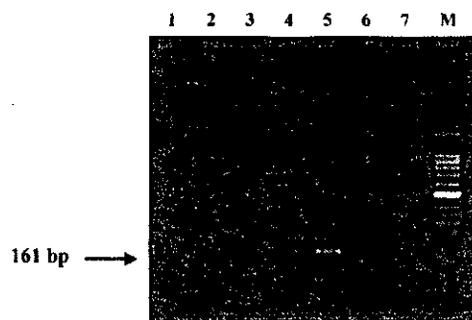
**Fig. 2 Specificity of potato-specific primers (primer pair No.2)**

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. Lane 1: negative control (no DNA), lane 2: NewLeaf<sup>®</sup> potato SPBT02-05 DNA, lane 3: NL-P DNA, lane 4: NewLeaf<sup>®</sup> potato RBBT-06 DNA, lane 5: NewLeaf<sup>®</sup> Y potato DNA, lane 6: non-GM potato (Russet Burbank) DNA, lane 7: non-GM potato (Superior) DNA, M: 100bp ladder size standard



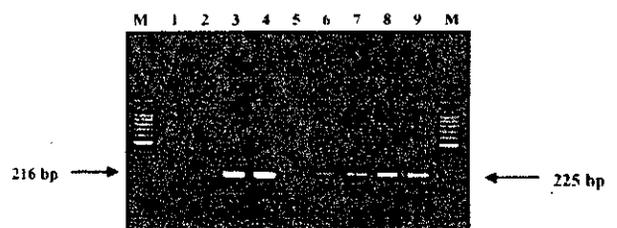
**Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from potato DNA containing various amounts of NL-P**

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. Primer-pair No.1 (lanes 3, 4), No. 3 (lanes 1, 2, 5~6). Lane 1: no potato DNA, lane 2, 3: non-GM DNA, lane 4: NewLeaf<sup>®</sup> Y potato DNA, lane 5: potato DNA containing 0.01% NL-P, lane 6: potato DNA containing 0.05% NL-P, lane 7: potato DNA containing 0.1% NL-P, lane 8: potato DNA containing 0.5% NL-P, lane 9: potato DNA containing 1.0% NL-P, M: 100bp ladder size standard.



**Fig. 6 Specificity of potato specific primer (primer pair No. 4)**

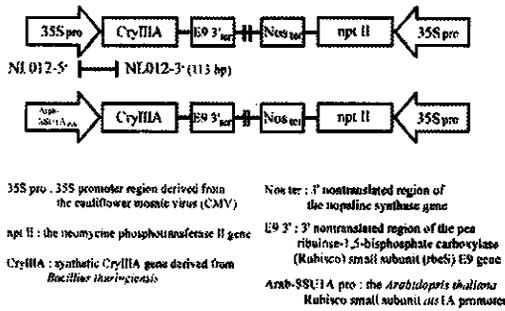
Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. 1: negative control (no DNA), 2: New Leaf SPBT02-05 potato DNA, 3: New Leaf Plus potato DNA, 4: New Leaf RBBT-66 potato DNA, 5: New Leaf Y potato DNA, 6: non-GM potato (Russet Burbank) DNA, 7: non-GM potato (Superior) DNA, M: 100bp ladder size standard.



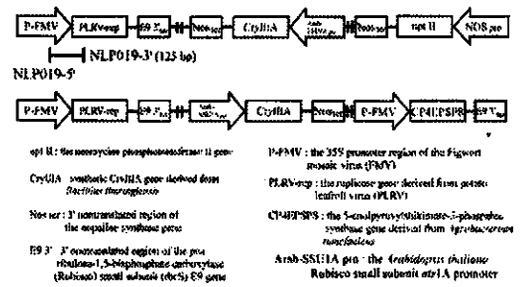
**Fig. 8 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from potato DNA containing various amounts of New Leaf Y potato.**

Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. Primer-pair No.1 (lanes 3, 4), No. 5 (lanes 1, 2, 5~9). Lane 1: no potato DNA, 2, 3: non-GM DNA, 4: New Leaf Y potato DNA, 5: potato DNA containing 0.01% New Leaf Y potato, 6: potato DNA containing 0.05% New Leaf Y potato, 7: potato DNA containing 0.1% New Leaf Y potato, 8: potato DNA containing 0.5% New Leaf Y potato, 9: potato DNA containing 1.0% New Leaf Y potato, M: 100bp ladder size standard.

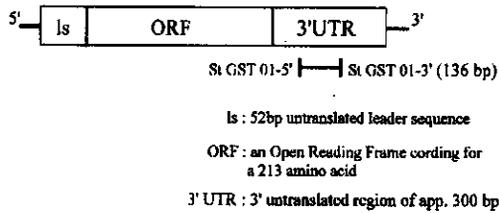
Fig.9 各プライマー対の標的領域ならびに予想増幅バンド長



Schematic diagram of designed PCR primers to detect New Leaf potato



Schematic diagram of designed PCR primers to detect New Leaf Plus potato

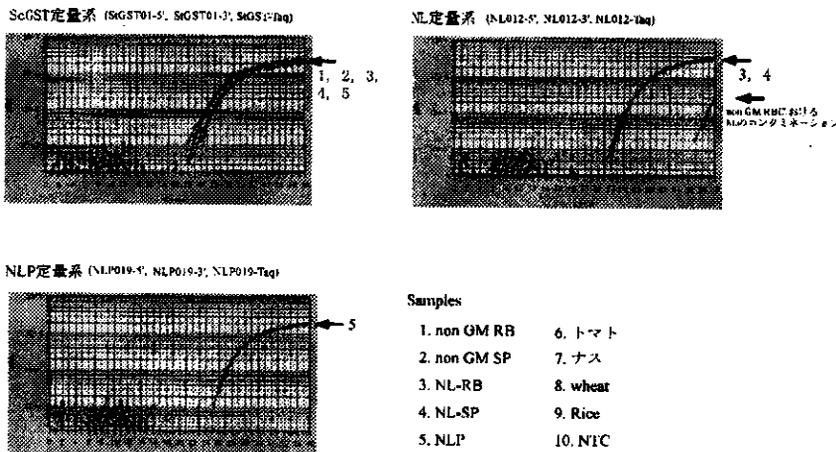


Schematic diagram of designed PCR primers to detect intrinsic ScgSt1 gene

ScgSt1 gene was isolated from wild potato species *Solanum commersonii*, and it was showed that the gene encodes the protein which has glutathione S-transferase enzyme activity (plant sci. 153 pp125-133 2000). In the report, it was revealed that a single copy of ScgSt1 is present in the both of *S.commersonii* and *S. tuberosum* genome.

Fig.10 各定量系の特異性の検証

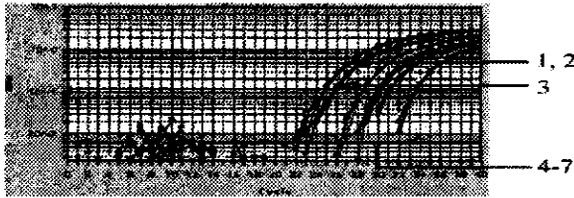
Table 1 各定量系における増幅ウェル数ならびに Ct 値



定量系	sample No.	sample	増幅の認められたWell数 (/3 well)	Ct値(3 well 平均)
New Leaf	1	nonGM RB	3	38.5
	2	nonGM SP	0	/
	3	NL-RB	3	26.2
	4	NL-SP	3	26.2
	5	NLP	0	/
	6	トマト	0	/
	7	ナス	0	/
	8	Wheat	0	/
	9	Rice	0	/
	10	NTC	0	/
New Leaf PLUS	1	nonGM RB	0	/
	2	nonGM SP	0	/
	3	NL-RB	0	/
	4	NL-SP	0	/
	5	NLP	3	26.7
	6	トマト	0	/
	7	ナス	0	/
	8	Wheat	0	/
	9	Rice	0	/
	10	NTC	0	/
ScGST	1	nonGM RB	3	24.4
	2	nonGM SP	3	24.7
	3	NL-RB	3	24.5
	4	NL-SP	3	25.4
	5	NLP	3	25.8
	6	トマト	0	/
	7	ナス	0	/
	8	Wheat	0	/
	9	Rice	0	/
	10	NTC	0	/

Fig.11 各定量系における遺伝子組換えジャガイモ含量依存的定量値変動

SeGST 定量系

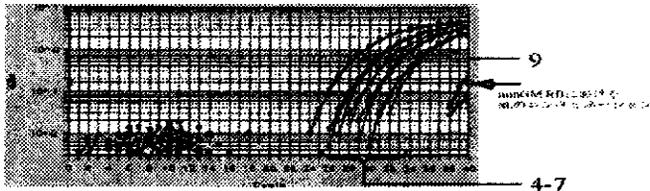


1-20% NL-SP: maize powder contains 1-20 % of NL-SP powder (wt/wt).

Samples

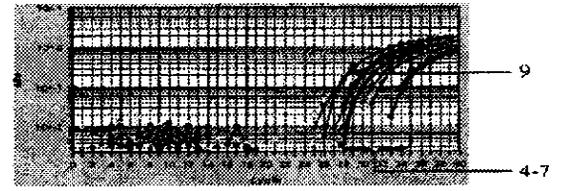
- 1. non GM RB
- 2. non GM SP
- 3. non GM Shepody
- 4. 1%GM
- 5. 5% GM
- 6. 10%GM
- 7. 20%GM
- 8. maize
- 9. NTC

NewLeaf 定量系 (NL-RB)



1-20% NL-RB: maize powder contains 1-20 % of NL-RB powder (wt/wt)

NewLeaf 定量系 (NLP)



1-20% NLP: maize powder contains 1-20 % of NLP powder (wt/wt).

NewLeaf 定量系 (NL-SP)



1-20% NL-SP: maize powder contains 1-20 % of NL-SP powder (wt/wt).

Samples

- 1. non GM RB
- 2. non GM SP
- 3. non GM Shepody
- 4. 1%GM
- 5. 5% GM
- 6. 10%GM
- 7. 20%GM
- 8. maize
- 9. 100%GM
- 10. NTC

Table 2 各定量系における増幅ウェル数ならびに Ct 値

定量系	sample No.	sample	増幅の認められたWell数 (/3 well)	Ct値(3 well 平均)
GST	1	nonGM RB	3	24.9
	2	nonGM SP	3	24.8
	3	nonGM shepody	3	25.8
	4	1% NL-RB	3	33.4
	5	5% NL-RB	3	31.1
	6	10% NL-RB	3	30
	7	20% NL-RB	3	28.6
	8	maize	0	/
	9	NTC	0	/

定量系	sample No.	sample	増幅の認められたWell数 (/3 well)	Ct値(3 well 平均)
New Leaf-SP	1	nonGM RB	2	26.7
	2	nonGM SP	0	/
	3	nonGM shepody	0	/
	4	1% NL-SP	3	33.5
	5	5% NL-SP	3	30.82
	6	10% NL-SP	3	29.6
	7	20% NL-SP	3	28.4
	8	maize	0	/
	9	100% NL-SP	3	26.2
	10	NTC	0	/

定量系	sample No.	sample	増幅の認められたWell数 (/3 well)	Ct値(3 well 平均)
New Leaf-RB	1	nonGM RB	2	39.8
	2	nonGM SP	0	/
	3	nonGM shepody	0	/
	4	1% NL-RB	3	33.2
	5	5% NL-RB	3	31.4
	6	10% NL-RB	3	30.3
	7	20% NL-RB	3	29
	8	maize	0	/
	9	100% NL-RB	3	26.8
	10	NTC	0	/

定量系	sample No.	sample	増幅の認められたWell数 (/3 well)	Ct値(3 well 平均)
New Leaf-PLUS	1	nonGM RB	0	/
	2	nonGM SP	0	/
	3	nonGM shepody	0	/
	4	1% NLP	3	34.12
	5	5% NLP	3	31.3
	6	10% NLP	3	29.9
	7	20% NLP	3	28.9
	8	maize	0	/
	9	100% NLP	3	27.2
	10	NTC	0	/

RB : Russet Burbank, SP : Superior, NL-RB : 親株が RB の NL, NL-SP : 親株が SP の NL

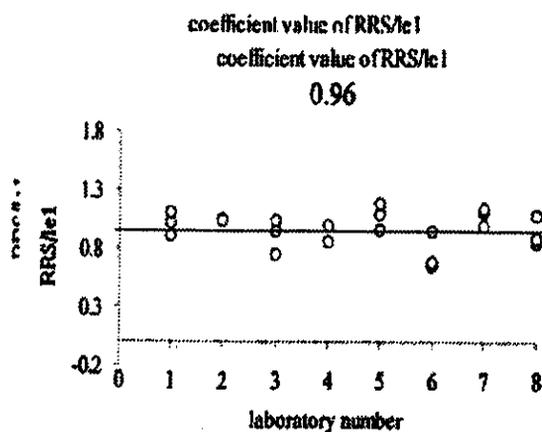


Fig.12. The observed coefficient values of the Roundup Ready Soy (RRS)  
The coefficient values of line specific target region/leI observed in RRS. Individual data is represented as an open circle (retained, O). The average of each value is illustrated in the graph as horizontal line.

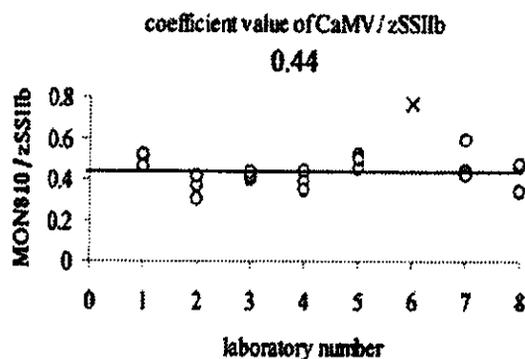


Fig.13. The observed coefficient values of the CaMV 35S promoter / zSSIIB in MON810  
Individual data is represented as an open circle (retained, O), or a cross (outlier, X). The average of each value is illustrated in the graph as horizontal line. The average of each value is illustrated in the graph as horizontal line.

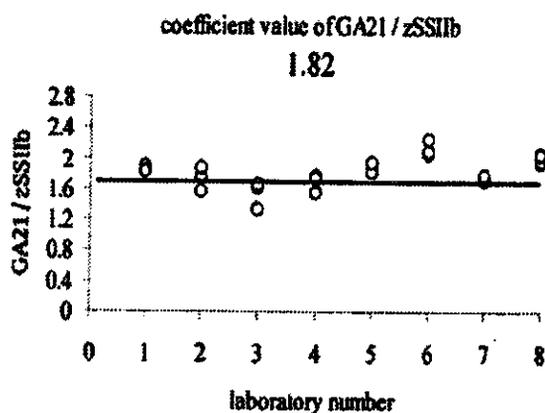


Fig.14. The observed coefficient values of the GA21 specific target region / zSSIIB in GA21  
Individual data is represented as an open circle (retained, O). The average of each value is illustrated in the graph as horizontal line.

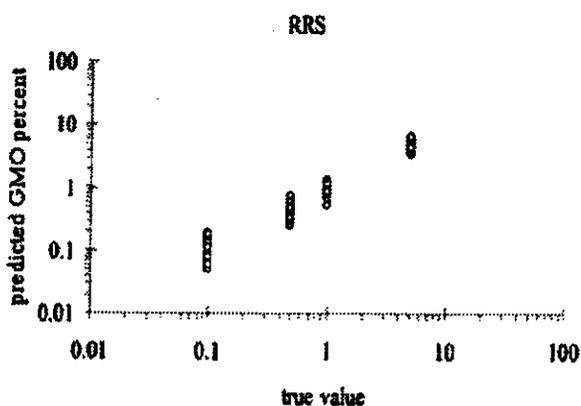


Fig.15. The predicted GMO percent of the blind samples of RRS  
The true and predicted values are indicated in horizontal and vertical line respectively

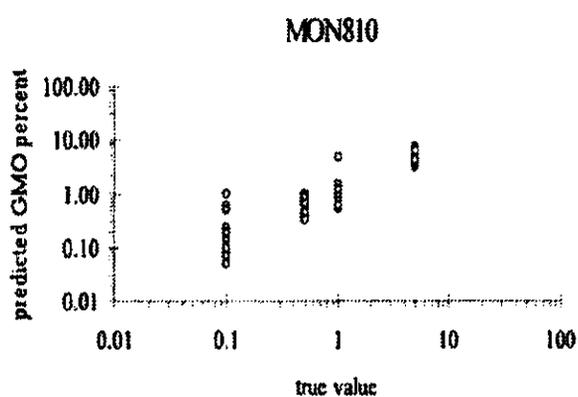


Fig.16. The predicted GMO percent of the blind samples of MON810 (CaMV 35S promoter). The true and predicted values are indicated in horizontal and vertical line respectively.

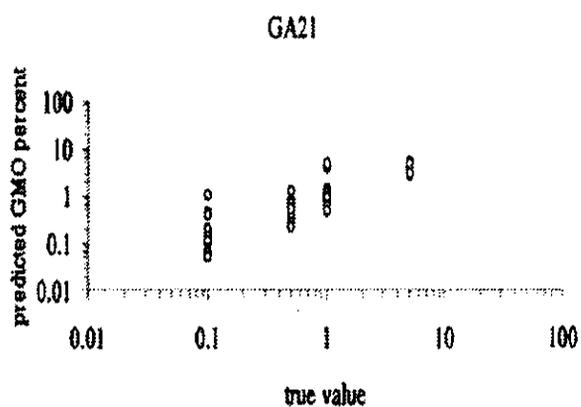


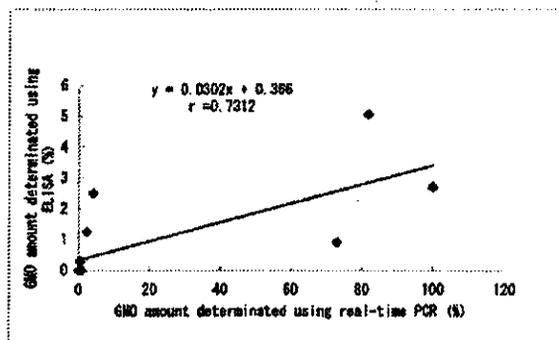
Fig.17. The predicted GMO percent of the blind samples of GA21(specific). The true and predicted values are indicated in horizontal and vertical line respectively.

Table 3. Results of the inter-laboratory evaluation for GMO quantification using LightCycler system

		Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)		Under 40copies
			Mean	Bias	RSD <sub>r</sub>	RSD <sub>R</sub>	
RRS	0.1%	7	0.091	-9.3	43	42.2	3/14
	0.5%	7	0.427	-14.8	23.1	30.8	0/14
	1.0%	7	0.941	-5.9	19.9	22	0/14
	5.0%	7	4.74	-5.2	22.9	19.5	0/14
CaMV 35S promoter (MON810)	0.1%	8	0.116	+16.3	24.7	48.4	13/16
	0.5%	8	0.575	+15.0	17.1	27.3	0/16
	1.0%	8	1.013	+1.3	7	30.4	0/16
	5.0%	8	5.078	+1.5	7.6	22.1	0/16
GA21	0.1%	8	0.119	+19.3	21.5	31.9	2/16
	0.5%	8	0.481	-3.8	14.7	31.6	0/16
	1.0%	8	0.991	-0.9	8.9	25.7	0/16
	5.0%	8	4.236	-15.3	9.3	17.3	0/16

**Table 4** The determination of GMO amount (%) of Processed Soy using Taqman PCR and ELISA

Sample	Taqman PCR	ELISA	PCR/ELISA
加工大豆			
IP醸造用脱脂大豆	0.23	0.00	-
飼料用大豆粕フレーク	0.86	0.00	-
脱脂大豆 Non-GM USA	0.20	0.00	-
脱脂大豆 Non-GM インド	0.00	0.00	-
醸造用脱脂大豆	81.74	5.04	16.22
いり豆	0.00	0.00	-
大豆粕A	0.06	0.00	-
大豆粕B	72.86	0.91	80.51
大豆粕C	100.00	2.69	37.12
大豆粕D	0.05	0.00	-



**Fig.18** Correlation between real-timePCR and ELISA data in Processed Soybeans (GMO amount, %)

**Table 5** Detection of recombinant DNAs from commercial tofu samples

Printing "not genetically modified"		Number of sample	Number of positive
Yes	Before April 1, 2001	19	8
	After April 1, 2001	21	7
No	Before April 1, 2001	11	5
	After April 1, 2001	4	0
Total		55	20

**Table 6** Summarization of recombinant DNA detection for commercial tofu samples purchased before and after the enforcement of the mandatory labeling system (April 1, 2001)

Product	Sample number	(Month of purchase)	Detection
A	1	(Feb. 2000)	+
	2	(Nov. 2000)	+
B	3	(Feb. 2000)	+
	4	(Nov. 2000)	-
C	12	(Dec. 2000)	-
	34	(Apr. 2001)	-
D	21	(Jan. 2000)	-
	33	(Apr. 2001)	-
E	22	(Jan. 2000)	+
	40	(May 2001)	-
F	28	(Feb. 2001)	-
	44	(May 2001)	-
G	30	(Mar. 2001)	-
	43	(May 2001)	-

**Table 7** Estimated GM contents (%) in material soybeans by quantitative PCR

Sample number	2	15	17	18	23	24	25	27	46	47	50	51	52	53	55
GM contents (%)	0.58	0.92	.*	0.81	.*	.*	.*	.*	0.98	0.83	0.80	0.19	0.67	0.78	0.73

\* Less than 0.1%

平成13年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究」  
分担研究報告書

アレルギー性に関する研究

分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部室長

研究要旨 アレルゲン性に関する研究として、(1)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討、(2)動物を用いるアレルゲン性の検討、(3)新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討を行った。(1)の患者血清を用いる研究では、国内食物アレルギー患者血清117種について、除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS)、及び害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9C)タンパク質に対するIgE抗体の有無の検討を、ウェスタンブロット法で検討したが、陽性の血清はみられなかった。(2)の動物実験では、人工胃液での分解性の悪い害虫毒素Cry9Cを導入したとうもろこしにつき免疫系への影響評価を行った。アレルギー高感受性のB10Aマウス及びBNラットを用い、亜急性毒性試験の期間、害虫抵抗性遺伝子(Cry9C)が導入された遺伝子組換え(GM)とうもろこし摂取が、動物の免疫系に影響を及ぼすか否かの検討を行った。同等の栄養成分を有する近親(isoline)の非組換え(non-GM)とうもろこしを対照として用いた。GM, non-GM混餌飼料を摂取させたマウス、ラットとも両群の体重及び餌の摂取量に有意差はみられず、13週投与後の各種主要免疫臓器の病理組織像においても、両群とも異常は認めらず、またCry9Cに対するIgE抗体産生は両群において認められなかった。(3)の人工胃腸液による分解性の検討では、特に人工腸液による分解性試験の場合に、加熱による分解性の著しい亢進がみられた。

協力研究者

豊田正武、穂山浩、今井俊夫、澤田純一(国立医薬品食品衛生研究所)

宇理須厚雄(藤田学園大学坂文種報徳会病院)

河野陽一(千葉大学医学部)

A. 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、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ているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。本分担研究では、アレルゲン性の評価に関する研究として、(1)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討、(2)動物を用いるア

レルゲン性の検討、(3)新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討の3点を取りあげ、研究を進めている。(2)の動物を用いるアレルゲン性の検討は、現在、FAO/WHOの専門者会議でも方法論等で、議論になっているところであるが<sup>1)</sup>、本分担研究の中では、とうもろこしと粉末飼料に混ぜ動物により長期に(亜急性毒性試験の期間)投与し、免疫影響並びに新規産生タンパク質に対する抗体産生を検討する方法を用いた。とうもろこしとして、本年度は、人工胃液での分解性の悪い害虫毒素Cry9Cが導入された遺伝子組換え(GM)とうもろこし(CBH351(スターリンク)とうもろこし)を、50%ないし5%配合した飼料を、動物に摂取させ、免疫系への影響評価を行なった。一般毒性に加え、免疫系への影響を調べた理由は、長期投与でのアレルギー誘発性の有無の確認を行うこと、食物の吸収される場に

位置する腸管粘膜系への影響について確認を行うためである。なお、対照としては同等の栄養成分を有する近親(iso-line)の非組換え (NGM)とうもろこしを用いた。(1)の患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討は、主にすでに承認されている組換え食品のフォローアップ的研究として、協力医療機関より提供された食物アレルギー患者血清中の除草剤グリホサート抵抗性タンパク質 (CP4-EPSPS), 及び害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9C)タンパク質に対するIgE抗体の有無の検討を、ウェスタンブロット法で検討した。(3)の人工胃腸液による分解性の検討では、1995年のUSPの方法<sup>2)</sup>に基づいて行われることの多いin vitro分解性試験の改良、並びにvalidationを行うために研究を行った。

## B. 研究方法

### (1) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

食物アレルギー患者血清中の新規産生タンパク質(CP4-EPSPS, Cry1Ab または Cry9C)に対するIgE抗体の存在の有無をウェスタンブロット法にて検討した。具体的には、CP4-EPSPS抗原としては、CP4-EPSPS 遺伝子を組み込んだ大腸菌の培養上清を、Cry1Ab抗原としては、Btk菌から、結晶毒素として単離したものを、Cry9C抗原としては、Aventis社より供与された精製品を用いた。SDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)にてタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜に電気的に転写し、種々の食物アレルギー患者血清と反応させ、コニカイムノステインによる発色から、これらタンパク質に特異的に反応するIgE抗体の存在の有無を検討した。

### (2) 動物を用いるアレルギー性の検討

#### (i) スターリンクとうもろこし摂取動物実験

害虫抵抗性遺伝子(Cry9C)が組み込まれたGMとうもろこし及びNGMとうもろこしは、Aventis社より供与された米国テキサス州産のものを用い、100°C, 10分の加熱処理後、オリエンタル酵母に依頼して50%粉末飼料を作成した (Table 1)。それぞれ7週令のアレルギー高感受性動物であるB10Aマウス雌及びBNラット雌に

自由摂取させた<sup>3,4)</sup>。

Table 1 Composition of Diets

Ingredients	g/100g dry matter
corn	50
L-cystine	0.18
casein	10.5202
corn starch	15.5
sucrose	10
soybean oil	4
cellulose	5
AIN-93 minerals	3.5
AIN-93 vitamins	1
Choline	0.25
TBHQ	0.0008
Tryptophan	0.049
Analyzed protein	14-15

飼料摂取量、体重測定は、1週間ごとに行った。13週目に解剖し、血液採取後、血液学的検査として赤血球数(RBC)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)及び白血球数(WBC)を多項目自動血球計数装置を用いて測定すると共に、Wright染色した塗抹標本を作製し、好中球(Neut)、好酸球(Eosino)、好塩基球(Baso)、リンパ球(Lympho)、単球(Mono)、および有核赤血球(Ebl)について血液細胞自動分析装置を用いて計測した。血清については、Cry9C蛋白質に対する血清中IgE,IgG抗体価を、間接ELISA法で、血清中ヒスタミンについてはポストカラムHPLC法で、総蛋白、A/G値については(株)エスアールエル(東京)で測定した。採血終了後、動物を放血死させ、肝臓、脾臓、胸腺重量の測定並びに、主な免疫組織である肝臓、脾臓、胸腺、腸管膜リンパ節、パイエル板、並びに小腸、腎臓、骨髄について、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従って薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的解析を行った。また、GMとうもろこしを投与した群については、小腸内容物の残留Cry9CをELISA法等により調べた。マウス、ラットそれぞれ1群10匹で、3群30匹を用いて実験を行った。GM,NGMとうもろこし

投与群に加え、とうもろこし粉末飼料の controlとして、通常の飼育用粉末飼料 (AIN-93)を摂取する群を1群設けた。動物の環境は、SPF(special pathogen free)の準無菌のクリーンな条件で、飼育を行った。(ii)Cry9Cの潜在的抗体産生能の検討

害虫抵抗性遺伝子Cry9C蛋白質を非経口的に強制的に投与した場合のタンパク質の持つ潜在的な抗原性の検討を行う目的<sup>5)</sup>で、B10AマウスおよびBNラットにCry9C 5-25 $\mu$ gをAlumと共に腹腔内投与し、抗原特異的IgE,IgG1抗体産生の有無について検討を行い、代表的食物アレルゲンである卵白アルブミン(OVA)との比較を行った。具体的には、Aventis社より供与されたCry9Cタンパク質(大腸菌で発現させたタンパク質を精製したもので、分子量69kDa並びにその酵素分解物である55kDaからなっている)を、7週令メスB10Aマウス及びBNラットに、10日おきに4回、5 $\mu$ gまたは、25 $\mu$ g/animalの用量で1mgのAlumと共に免疫した。免疫の進行は、3回投与後、部分採血した血液を用いて行い、最終投与後7日目に全採血を行った。血清中のIgG,IgE抗体価は、ELISA法にて測定を行った。対照としてのOVAは、5 $\mu$ g/animalの用量で1mgのAlumと共にCry9Cと同じ回数免疫を行った。

### (3) 新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討

1995年のUSPの方法<sup>2)</sup>に基づいて人工胃液(SGF)(NaCl 1g, Pepsin 1.6g(0.32%), concHCl 3.5ml, H<sub>2</sub>O 496.5 ml (pH1.2)), 人工腸液(SIF)(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.4g, NaOH 0.76g, pancreatin 5.0g, H<sub>2</sub>O 500 ml (pH7.4))を作成し、CP4-EPSPS,並びにCry1Abの分解性を検討した。それに際し、基質タンパク質の100°C、5分の加熱前処理にSGF,SIFによる分解性についても併せて検討した。なお、現在、ILSI(the Allergy and Immunology Institute of the International Life Science Institute)による国際的validationに参加し、10種の基質タンパク質について、SGF (pH1.2とpH2.0の両方)による分解性の検討を行っている。

## C. 研究結果および考察

### 1) 患者血清と、新規産生タンパク質との

### 反応性の検討

平成12年度から平成13年度にかけて供与された国内食物アレルギー患者血清117種について、CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9Cタンパク質に対するIgE抗体の存在の有無の検討を、ウェスタンブロット法で行ったが、陽性の血清はみられなかった。

### 2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

#### (i) スターリンクとうもろこし摂取動物実験

最初に、動物実験に用いたGM, NGMとうもろこしの実質的同等性を調べるために両とうもろこしの成分の比較を行った結果をTable 2-4に示す。タンパク、脂肪、糖、繊維質、灰分、Ca, P,K,Mg含量 (Table 2)、脂肪酸組成 (Table 3)、アミノ酸組成、フィチン酸含量 (Table 4)にGM, NGMとうもろこしの間で殆ど差はみられず、両者は、同等の栄養成分を有するものと考えられた。

Table 2 Nutritional components in corns

	Non-GM	GM	(Unit)
Moisture	13.2 $\pm$ 0.1	13.3 $\pm$ 0	(g/100g)
Crude protein	8.6 $\pm$ 0	8.9 $\pm$ 0.4	(g/100g)
Crude fat	3.7 $\pm$ 0	3.6 $\pm$ 0.1	(g/100g)
Carbohydrates	71.8 $\pm$ 0.1	71.4 $\pm$ 0.1	(g/100g)
Crude fiber	1.5 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0	(g/100g)
Ash	1.3 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0	(g/100g)
Energy	350 $\pm$ 0.7	349 $\pm$ 0.7	(kcal/100g)
Calcium	8.2 $\pm$ 0.2	12.3 $\pm$ 3.9	(mg/100g)
Phosphorus	288 $\pm$ 8.5	274 $\pm$ 3.5	(mg/100g)
Potassium	353 $\pm$ 0.7	357 $\pm$ 9.9	(mg/100g)
Magnesium	103 $\pm$ 0	109 $\pm$ 1.4	(mg/100g)

(n=2)

Table 3 Summary of fatty acids analysis of corns

Fatty acid	Seed line	
	Non-GM	GM
	%	
C16:0	12.45 $\pm$ 0.07	12.85 $\pm$ 0.07
C18:0	1.65 $\pm$ 0.07	1.6 $\pm$ 0
C18:1	20.0 $\pm$ 0.28	20.0 $\pm$ 0
C18:2	63.35 $\pm$ 0.49	62.8 $\pm$ 0.14
C18:3	1.6 $\pm$ 0	1.75 $\pm$ 0.07
C20:0	0.4 $\pm$ 0	0.4 $\pm$ 0
C20:1	0.2 $\pm$ 0	0.2 $\pm$ 0
C22:0	0.15 $\pm$ 0.07	0.2 $\pm$ 0
C24:0	0.2 $\pm$ 0	0.2 $\pm$ 0

(n=2)