

一致した結果が得られた(Table 8)。この結果より、ケノムDNA中に含まれるHMG遺伝子、Lectin遺伝子のコピー数が同等であることが示唆された。

2) 加工影響評価用標準分子(PMuLSLH)の開発

各種加工食品における2つの内在性遺伝子のコピー数変動を数値化するため、Gmax HMG-01、Lc1-n02各プライマー対に加え、遺伝子組換え大豆特異的配列を増幅するRRS-01、P35S-1およびNOSter-2プライマー対によって増幅される増幅産物を連結、導入し、標準プラスミドDNA(PMuLSLH)を構築した (Fig 12)。

今後、開発した標準プラスミドDNAを用い、各種モデル加工食品を対象とした定量試験を実施する。

6 遺伝子組換えトウモロコシ5系統・ダイズ1系統を対象とした定量分析法の改良

1) 内標比測定試験

改良定量分析法(改良点 標準プラスミドDNA溶解液の変更ならびにトウモロコシ内在性遺伝子*SSI1b*定量用プライマー対の設計変更)を用い、ABI PRISM 7700、同7900、および7000、またRoche LightCycler Systemによる内標比算出試験を行った。各参加機関から報告された測定結果についてコクラン-グラブスの棄却検定を行った後に決定された内標比について、機種別に示す(Fig. 13およびFig. 14)。内標比は対象遺伝子組換え作物に固有の値であるため、理論的には全ての機種において一定の値を示すはずである。これについて検証するため、t検定およびメタアナリシスによる解析を行った(Fig. 15およびFig. 16)。その結果、内標比は機種間で一定しておらず、機種を越えた統合は行えないことが明らかとなった。これは、定量機器毎に異なるシグナルの集積機構の差異等、機種固有の要因を反映した結果であると推定された。

2) ブラインドテスト

さらに、基幹機種であるABI PRISM 7700において得られた内標比の妥当性を検証する事を目的として実施されたブラインドテストの結果を系統別に示す(Fig. 17~22)。CODEX/CCMASで提唱されている定量分析法における精度保証基準値(Bias \pm 25%)を基準とすれば、ほぼ全ての系統において十分評価しうる結果が得られた。定量下限値についてみると、改良以前と変わらず、Event 176ならびにGA21系統については0.1%、それ以外の系統については0.5%であることが明らかになった。

3) 機種間差試験

ブラインドテストを実施したABI PRISM 7700において得られた定量値と、それ以外の機種で得られた定量値の比較試験(機種間差試験)を実施した(Fig. 23~28)その結果、特定機種と系統の組み合わせにおいては考慮すべき異なりを持つ組み合わせがあることが明らかになった。今後、試験回数を繰り返すなどし、これらの原因について検討する予定である。

7. モデル加工食品を使用した遺伝子組換え定量分析法の適用可能範囲の検証

1) ダイズモデル加工食品の定量

DNA抽出法による定量値への影響についても考慮するため、同一の試料を対象に2つの異なるDNA抽出法(DNeasy 法およびGenomic-tip法)を用いてDNA抽出を行った。抽出されたDNAを鋳型DNAとして用いた定量試験の結果をFig. 29およびFig. 30に示す。その結果、豆腐、豆乳においては1および5%混入加工食品共にいずれのDNA抽出法を用いても、数値としては加工原材料とほぼ同等の定量値が得られた。しかしながら、煮豆においてはDNAの変質が原因と考えられる定量値の大きな変動が観察された。また、算出された定量値について有意差検定を行った結果、平均値としては有意差が認められない加工品目とDNA抽出法の組み合わせにおいても有意差ありと判定された。これ

は検体間でのばらつきが影響した結果であり、実際的には、有意であると判断すべきではないと考えられた。しかしながら、先に示したように煮豆を対象とした場合にはDNA抽出法の如何を問わず、加工原材料との間に大きな定量値の差異がみとめられており、これらから判断するに、煮豆を対象として得られる定量値は、信頼性が低いものと思われる。

2) トウモロコシモデル加工食品の定量

トウモロコシ加工食品を対象とした定量試験の結果をFig 31およびFig 32に示す。コーンスターチ、コーンパフおよびコーンチップいずれのトウモロコシ加工食品を対象とした場合においても、DNeasy 法を抽出法とした場合には十分なDNAを抽出することが出来なかった。この結果は、モデル加工食品における加工影響が大きく、DNAの変質が著しい事を示唆するものと考えられた。Genomic-tip法を用いて抽出したDNAを鋳型DNAとして得られた定量値についても、コーンスターチにおいては加工原材料と同等の混入率を得ることが出来たが、残り2品目においては内在性遺伝子、標的遺伝子のコピー数共に加工により大きく変化、減少しており、算出された混入率についても加工原材料から得られるものとは大きく異なっていた。これらのことから、コーンスターチを対象とした定量分析は可能であるが、コーンパフ、チップを対象とした分析は不可能であることが示された。また、コーンスターチについても、製造工程によりDNAが残存しにくいものがあることが知られており、定量分析を行う場合には、それらの情報を考慮した慎重な取り組みが必要と考えられる。

D. 結論

1. 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発ならびに協同試験による評価

安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ全8系統を対象とした定性PCR法が

開発された。また、開発された方法の妥当性が6機関参加の共同試験により確認された。

2. 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発ならびにin house validation

NewLeaf、NewLeaf Plusジャガイモを対象とした定量検知法(スクリーニング法、construct特異的検知法)が開発された。開発された方法のin house validationの結果、定量系の検知対象になりうる遺伝子組換えジャガイモ系統のうち、NL SPBT02-05に関しては適用が難しいことが示された。しかしながら、その原因に関しては、使用した試料にあることが示唆され、この点に関し検証が必要と考えられた。また、十分な考慮のもとで準用すること、本方法は有効に機能するものと考えられた。

3. スタック品種トウモロコシ定性検知法の開発

スタック品種を判別することを目的に、一粒別多粒同時粉碎及び同時DNA抽出法、GM粒同時検知のMultiplex real-time PCR法を開発した。今後、実際のスタック品種の入手を待ち、最終的な品種判別のためのMultiplex 定性PCRを含めた方法全体に渡り検証を行う。本検知法により、約2日間で試料180粒の混入率とスタック品種の存在を検知することか可能となる。

4. 競合PCR法を用いた簡易定量分析法の開発

競合PCR法の原理に基づき、遺伝子組換え作物を簡易に定量可能な検知法の開発を行った。今後、本年度において開発された方法の検証作業を行う。

5. 定量分析法の加工食品適用可能性検証法の検討

複数の内在性遺伝子の質的変動を、加工品目別に数値化することにより、加工影響を評価するための方法を検討した。今後、本年度に開発された加工影響評価用標準分子(PMulSLH)を用い、モデル加工食品等を多

数測定することによってその検証を進める。

6 遺伝子組換えトウモロコシ5系統・ダイズ1系統を対象とした定量分析法の改良

現行の遺伝子組換え作物を対象とした定量分析法の改良を行った。改良法についてコラホレーションスタティールにより検証した結果、従来法と同等の結果が得られることか明らかになった。また、従来法の適用機種がABI PRISM 7700に限られていたのに対し、全4機種での適用が可能となった。

7. モデル加工食品を使用した遺伝子組換え定量分析法の適用可能範囲の検証

現行定量分析法の加工食品適用可能性について検証するため、ダイズ、トウモロコシのそれぞれに3種のモデル加工食品を調製し検証を行った。加工による遺伝子組換え作物混入量への影響を調査した結果、豆腐、豆乳、コーンスターチにおいては原材料に比へ遜色のない定量値が得られることが明らかとなった。しかしながら、煮豆、コーンパフ、コーンチップにおいては加工により、定量値が大きな影響を受けていた。これらの結果は、加工影響の小さな品目においては原材料と同等の定量値を得ることが可能であるか、一方、加工影響の大きな品目については得られる定量値に信頼性がないことを示唆しているものと考えられる。

E. 参考文献

1) Watanabe, T , Kasama, K., Wakui, C , Shibuya, M., Matsuki, A., Akiyama, H , Maitani, T , Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y) J. Food hyg Soc Jpn 2003, 44, 281-288
2) 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) an

d detection of NewLeaf Plus[®] Potato in snack. J. Food hyg Soc. Jpn 2002, 43, 24-29.

3) Akiyama, H , Watanabe, T., Wakui, C., Tiba, Y , Shibuya, M., Goda, Y , Toyoda, M A detection method of recombinant DNA from genetically modified potato (NewLeaf Y[®] Potato) J Food hyg Soc. Jpn 2002, 43, 301-305

4) Jaccaud, E , Hohne, M , Meyer, R. A assessment of Screening Methods for the identification of genetically modified potatoes in raw materials and finished products J Agric Food Chem. 2003, 51, 550-557

5) Kuribara, H , Shindo, Y , Takubo, K , Matsuoka, T , Takubo, K., Futo, S., Aoki, N , Hirano, T , Akiyama, H., Goda, Y , Toyoda, M., Hino, A Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean J. AOAC Int. 2002, 85, 1077-1089

6) Matsuoka, T , Kuribara, H , Akiyama, H., Miura, H , Goda, Y , Isshiki, K , Toyoda, M , Hino, A. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize J Food hyg Soc Jpn 2001, 42, 28-32

7) Borovkov, A Y , McCleen, P E., Secor, G A Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphylase Gene. 1997, 186, 293-297

8) Cren-R, M , Carrayol, E , Laforgue-T, T , Hirel, B. A novel HMG A-like protein binds differentially to the AT-rich regions located in the far distal and proximal parts of a soybean glutamine synthetase gene (GS15) promoter. Plant Cell Physiol 2002, 43, 1006-10

F.研究業績
論文

- 1) Watanabe, T , Kasama, K., Wakui, C., Shibuya, M , Matsuki, A , Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y) J. Food hyg. Soc Jpn 2003, 44, 281-288.
- 2) Wakui, C , Akiyama, H., Watanabe, T , Fitch, M M.M., 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. J. Food hyg. Soc. Jpn. 2004, 45, 19-24
- 3) Okunuki, H., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A , Goda, Y , Sawada, J., Toyoda, M , Maitani, T Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS J. Food hyg. Soc. Jpn. 2003, 44, 77-82
- 4) 日野明寛、穠山浩、栗原秀夫 “遺伝子組換え農産物の最新検知技術” 日本食品科学工学会誌, 2003, 50, 107-114.
- 5) 穠山浩、米谷民雄 “遺伝子組換え食品検知法” 食品衛生研究 2002, 52, 54-65.
- 6) Ogawsawra, T., Arakawa, F., Akiyama, H., Goda, Y., Ozeki, Y Fragmentation of DNAs of Processed Foods Made from Genetically Modified Soybeans 日本食品化学学会誌 2003, 10, 155-160.
- 7) Akiyama, H , Goda, Y , Aoyagi, Y., Watanabe, T., Wakui, C , Chiba, R , Toyoda, M , Mainani, T. A Comparative Study of Real-time PCR Method and ELISA Method for Detection of Recombinant DNA from Genetically Modified Soybean as Soybean Grain and De-fatted Soybean Jap J Food Chem. 2003, 10, 73-77. 学会発表等
- 1) 第85回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換え食品定量分析法のコラボレーションスタディーI」栗原秀夫、松岡 猛、吉村倫彰、井上真以子、古井 聡、正野仁慈、布藤 聡、小川真智子、大島慎司、渡邊敬浩、和久井千世子、穠山 浩、米谷民雄、砂川美佐緒、日野明寛、一色賢司(2003.5.)
- 2) 第85回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換え食品定量分析法のコラボレーションスタディーII」渡邊敬浩、和久井千世子、穠山浩、米谷民雄、栗原秀夫、松岡猛、太田順司、青木信太郎、渡井正俊、澤田千尋、森曜子、重松万由、大峽太郎、梶野敏彦、砂川美佐緒、日野明寛、一色賢司(2003.5.)
- 3) 第85回日本食品衛生学会学術講演会「サイズ及びトウモロコシ加工食品中の遺伝子組換え体の定量」吉村倫彰、栗原秀夫、松岡猛、児玉貴志、布藤聡、小川真智子、渡辺聡、青木信太郎、飯塚太由、吉川礼次、渡邊敬浩、和久井千世子、穠山浩、米谷民雄、砂川美佐緒、日野明寛、一色賢司(2003.5.)
- 4) 第9回日本食品化学学会学術大会「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定量法のコラボレーションスタディ」和久井千世子、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄、吉村倫彰、紀雅美、富岡千鶴子、有田世乃、松岡猛、栗原秀夫、日野明寛、酒井栄一、豊田安基江、小川真智子、布藤聡、梶原淳睦、乙黒敬生(2003.6.)
- 5) The 117th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition「Identification of Genetically Modified Maize by Multiplex PCR」SATOSHI FURUI, SHINJI KANAYAMA, SATOSHI FUTO, MACHIKO OGAWA, TAKESHI

MATSUOKA, TAKASHI KODAMA, HIDEO KURIBARA, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, AKIHIRO HINO, KENJI ISSHIKI (2003.9.)

6) The 117th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition「Collaborative Studies of Construct-Specific Quantitation for Genetically Modified Maize and Soybean Using Four Real-Time PCR Equipments」HIDEO KURIBARA, TAKESHI MATSUOKA, TAKAHIRO WATANABE, CHISEKO WAKUI, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, TOMOAKI YOSHIMURA, SATOSHI FUTO, JINJI SHONO, NOBUTARO AOKI, CHIHIRO SAWADA, MISAO SUNAGAWA, AKIHIRO HINO (2003.9)

7) The 117th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition「Quantitative Analysis of Genetically Modified Organisms in Processed Foods from Soy and Maize by using Japanese Standard Method」TOMOAKI YOSHIMURA, HIDEO KURIBARA, TAKESHI MATSUOKA, TAKASHI KODAMA, SATOSHI FUTO, MACHIKO OGAWA, SATOSHI WATANABE, NOBUTARO AOKI, TAYOSHI IIZUKA, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, MISAO SUNAGAWA, AKIHIRO HINO, KENJI ISSHIKI (2003.9.)

8) 第40回全国衛生化学技術協議会年会「遺伝子組換え大豆定量検査法の外部精度管理について」渡邊敬浩, 穂山浩, 米谷民雄, 笠間菊子, 松木容彦, 児玉貴志, 栗原秀夫, 日野明寛 (2003.11)

9) 第40回全国衛生化学技術協議会年会「遺伝子組換えハパイヤの定性検査法の外部精度管理について」穂山浩, 渡邊敬浩, 笠間菊子, 松木容彦, 米谷民雄 (2003.11)

10) 横浜市神奈川区食品衛生協会講習会「遺伝子組換えの基本的な原理について」穂山浩 (2003,10)

11) 国立保健医療科学院保健講習会「食物アレルギーと遺伝子組換え食品」穂山浩 (2004,2)

12) 酵素法による食品分析研究会 「遺伝子組換え食品の検知法について」穂山浩 (2003,12)

13) お茶の水女子大学生活環境研究センター食の安全性に関するシンポジウム「遺伝子組換え食品とは何か」と「最近の動向」穂山浩 (2003,12)

14) ハイオメティカル分析科学シンポジウム「遺伝子組換え食品の検知法について」穂山浩 (2003,8)

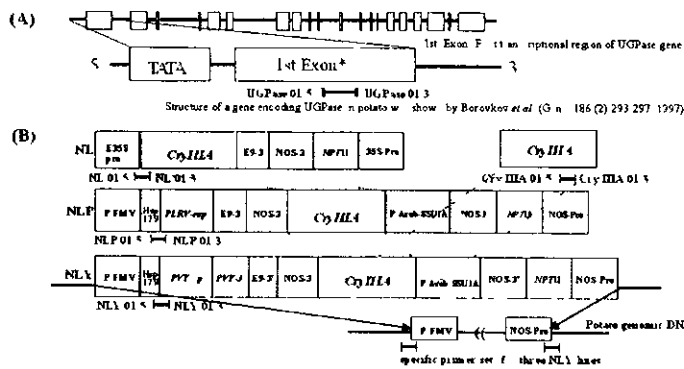


Fig 1 Schematic diagrams of PCR primers designated for detection of potato and three kinds of genetically modified potatoes
 (A) The structure of a gene encoding UGPase was shown. The primer pair was designated on the first exon of UGPase. (B) Schematic representation of recombinant DNA (rDNA) introduced into three kinds of genetically modified potatoes (NL, NLP and NLY). The primer pairs were designated on the junction between rDNA and potato genomic DNA for detection of 3 lines of NL. Specifically, further information for the location of primers was shown in Table 1.

Table 1 List of Primers

Name	Sequence (5' → 3')	Specificity	Amplicon
A	UGPase 01 5' 5'-CTC TCC ATA CTC TCT GCT CCT CG 3' UGPase 01 3' 5'-CGG CAT CAG CAG CAG AAA C 3'	Potato UGPase / sense Potato UGPase / antisense	Potato 111 bp
B	CryIIIA 01 5' 5'-GAA AGC CTA CAA GCT GCA ATC TG 3' CryIIIA 01 3' 5'-TCA GGT GTC AGC TAG ATA GTA C 3'	CryIIIA / sense CryIIIA / antisense	CryIIIA 117 bp
C	NL 01 5' 5'-CCT TCC CAA GAC CCT TCC TC 3' NL 01 3' 5'-CGG TGT TGT TGT CTC CAG TCA 3'	p35S / sense CryIIIA / antisense	Neol.leaf 113 bp
D	NLP 01 5' 5'-CCC ATT TGA AGG ACA CAG AAA CA 3' NLP 01 3' 5'-AGC GGC ATA TGC GCT AAA TC 3'	pFMY GMHp / sense FLR/stop / antisense	New Leaf of Pto 125 bp
E	NLY 01 5' 5'-CAA AAT CCC AGT ATC AAA ATT GTT 3' NLY 01 3' 5'-TGG TTT TGT ATC TTT GTT GCT GCT 3'	GmHp / sense PV2-top / antisense	New Leaf of Y (D line) 125 bp
F	NLY15-01 5' 5'-AAC GCT GCC GAC ATC TAA ATT CA 3' NLY15-01 3' 5'-TAC GGT TAC CAG TAG CTA CAC T 3'	pNOS / sense Potato genomic DNA / antisense	New Leaf Y (SEMT15-15) 164 bp
G	NLY02-01 5' 5'-TGA AAT TCG ACT AAT TAC AAG TTC A 3' NLY02-01 3' 5'-ACA TCG ATC GTG AAC TTT CTC AT 3'	Potato genomic DNA / sense pNOS / antisense	New Leaf Y (SEMT15-02) 86 bp
H	NLY101 01 5' 5'-ATC GCT GCT ACC TTG TTG ATT G 3' NLY101 01 3' 5'-AGC TCA AAG TTA AAA TGA AAC ATG 3'	pFMY / sense Potato genomic DNA / antisense	New Leaf of Y (RBMT15 101) 150 bp

A For confirmation of feasibility of the DNA extracted from potato for PCR. B For screening detection of GM potatoes. C For detection of NL. D For detection of NLP. E For detection of NLY. F For identification of NLY SEMT15-15 line. G For identification of NLY SEMT15-02 line. H For identification of NLY RBMT15-101 line.

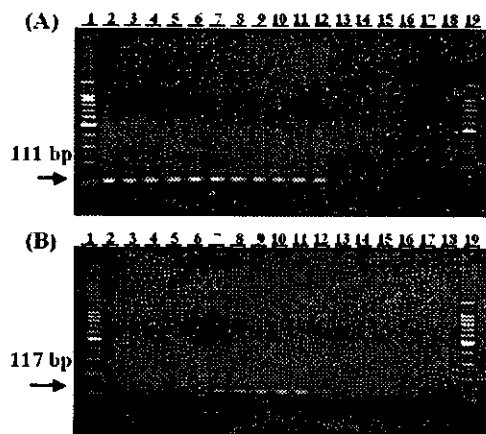


Fig 2 Specificity of potato and GM potato specific primer pairs
 Arrowheads indicate the expected PCR amplification products.
 The primer pairs UGPase 01 5' -3' (A) and CryIIIA 01 5' -3' (B).
 Lane 1 and 19 100 bp ladder size standard. Lane 2 non-GM potato (Russet Burbank). Lane 3 non-GM potato (Superior).
 Lane 4 non-GM potato (Shepody). Lane 5 non-GM potato (dansyaku). Lane 6 non-GM potato (may queen).
 Lane 7 NL (SEBT02 05). Lane 8 NL (B1-6). Lane 9 NLP (RBMT21 350). Lane 10 NLY (SEMT15 15).
 Lane 11 NLY (RBMT15 101). Lane 12 NLY (SEMT15 02). Lane 13 tomato. Lane 14 egg plant. Lane 15 maize.
 Lane 16 soy. Lane 17 wheat. Lane 18 negative control (no template DNA).

Fig 1 8 系統の遺伝子組換えジャガイモを対象とするプライマー対の標的領域

Table 1 各プライマー対の配列と標的系統

Fig 2 ジャガイモ内在性遺伝子を標的とするプライマー対の特異性(A) および遺伝子組換えジャガイモスクリーニング検知用プライマー対の特異性(B)

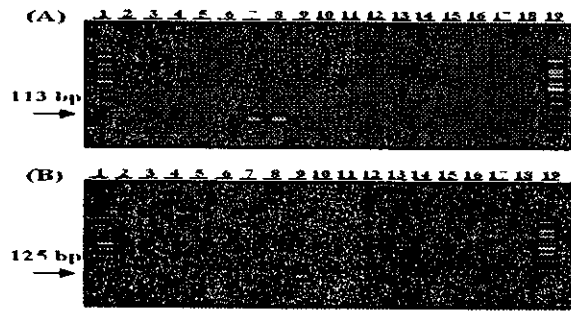


Fig.3 Specificity of NL and NLP specific primer pairs. Arrowheads indicate the expected PCR amplification product. The primer pairs NL 01 5 - 3 (A) and NLP 01 5 - 3 (B). See footnotes for Fig. 2

Fig 3 NL 特異的プライマー対の特異性(A)および NLP 特異的プライマー対の特異性(B)

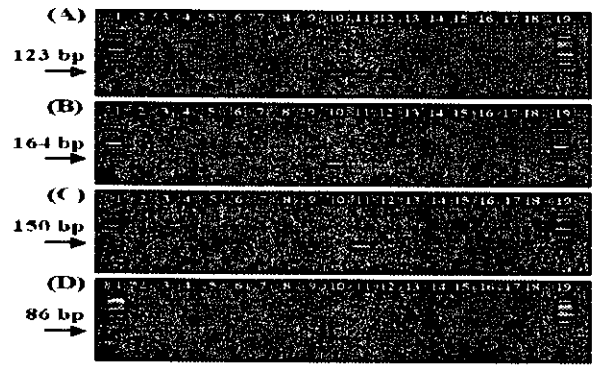


Fig.4 Specificity of NLY and each lines of NLY specific primer pairs. Arrowheads indicate the expected PCR amplification products. The primer pairs, NLY 01 5 - 3 (A), NLY 15 01 5 - 3 (B), NLY 101 01 5 - 3 (C) and NLY 02 01 5 - 3 (D). See footnotes for Fig. 2

Fig 4 NLY construct 特異的プライマー対の特異性(A)および系統特異的プライマー対の特異性(B から D)

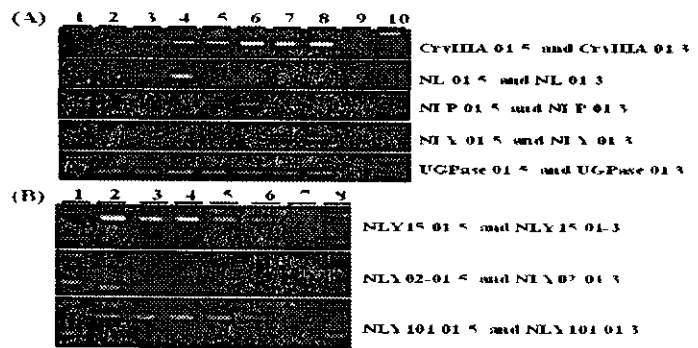


Fig.5 Sensitivity of PCR methods using the specific primer pairs. Genomic DNAs extracted from the mixed samples of potato powder containing the 0.1 or 1.0% of some GM potatoes (A) or mixed sample of genomic DNAs containing the various amount of genomic DNAs extracted from some GM potatoes (B) were amplified. (A) Lane 1 and 10: 100 and 200 bp size standard bands of ladder marker; lane 2: non-GM potato; lane 3 and 4: potato containing 0.1 or 1.0% of NI; lane 5 and 6: potato containing 0.1 or 1.0% of NLP; lane 7 and 8: potato containing 0.1 or 1.0% of NLY; lane 9: negative control (no template DNA). (B) Lane 1 and 8: 100 or 200 bp size standard band of ladder marker; lane 2 to 7: genomic DNA containing 5.0, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 of genomic DNAs extracted from NLY SEMT1515, CEMT1505 or RBMT15101 respectively; lane 7: negative control (no template DNA).

Fig 5 各プライマー対の検知感度

Table 2 Results of Inter Laboratory Studies to Validate the Methods

Target	Primer pairs	Samples															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
UGPase	UGPase 01-3 UGPase 01-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CryIIIA	CryIIIA 01-3 CryIIIA 01-3	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
NL	NL 01-3 NL 01-3	+	-	-	-	-	/	/	+	/	+	-	-	/	+	-	-
NLP	NLP 01-3 NLP 01-3	/	+	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/	/	/	/
NLY	NLY 01-3 NLY 01-3	/	-	+	+	+	/	/	/	/	/	-	+	/	/	+	+
SEMT	MLW02 01-3 MLW02 01-3	/	/	+	-	-	/	/	/	/	/	-	/	/	+	-	-
SEMT	NLY15 01-3 NLY15 01-3	/	/	-	+	-	/	/	/	/	/	-	/	/	-	+	+
REMT	NLY101 01-3 NLY101 01-3	/	/	-	-	+	/	/	/	/	/	+	/	/	-	-	-
Judgments		NL	NLP	15-02	15-15	15-101	Negative	Negative	NL	Negative	NL	NLP	15-101	Negative	NL	15-02	15-15

+ positive - negative / no test
 A first PCR was performed with the UGPase 01 5-3 and CryIIIA 01 5-3
 When the result was positive a second PCR was performed with the NL 01 5-3
 If the PCR product was not obtained from the second PCR a third PCR was performed with the NLY 01 5-3
 A fourth PCR was performed for the NLY positive samples with the NLY02 01 5-3 NLY15 01 5-3 and NLY101 01 5-3 respectively

Table 2 ハリテーション結果の報告例

Table 3 Judgments and Percentage of Correct Results for All of Test Samples in Inter laboratory Validation Based 6 Labs

Laboratory	Samples						
	NL	NLP	NLY15 15	NLY15-02	NLY15 101	dansysku	max queen
I	++ ++	++ ++	++/++	++/++	++/++		
II	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++		
III	++ ++	++/++	++/++	++/++	++/++		
IV	++ ++	++ ++	++/++	++/++	++/++		
V	++ ++	++ ++	++/++	++ ++	++/++		
VI	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++		-
Percentage of correct results	100	100	100	100	100	100	100

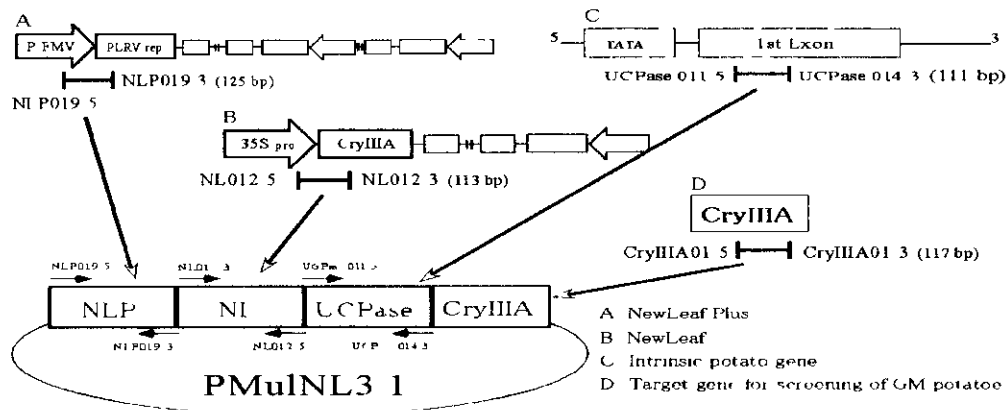
++/++ Both of two positive sample was judged correctly --/-- Both of two negative sample was judged correctly

Table 3 バリテーション結果の集計

Samples	OD 260/280	OD 260/230	DNA Conc (ng/ul)	平均収量とばらつき	
Russet Burbank	①	1.80	2.12	1200	平均値 1196 標準偏差 4.42 変動係数 3.70
	②	1.83	1.99	1255	
	③	1.82	2.18	1145	
	④	1.83	2.16	1190	
	⑤	1.83	2.13	1150	
	⑥	1.82	2.17	1235	
100% GM Bt-6	①	1.83	1.95	1170	平均値 1230 標準偏差 6.90 変動係数 5.61
	②	1.84	2.05	1140	
	③	1.82	2.07	1250	
	④	1.83	1.98	1210	
	⑤	1.83	2.02	1300	
	⑥	1.83	2.05	1310	
100% GM SPBT 02-05	①	1.84	1.93	965	平均値 1108 標準偏差 10.66 変動係数 9.62
	②	1.86	2.16	1155	
	③	1.86	2.03	1005	
	④	1.84	2.07	1095	
	⑤	1.85	2.05	1200	
	⑥	1.82	2.10	1230	
100% GM RBMT 21-350	①	1.85	2.06	1120	平均値 998 標準偏差 8.11 変動係数 8.13
	②	1.83	2.09	970	
	③	1.83	1.96	870	
	④	1.84	2.00	1020	
	⑤	1.83	1.88	1015	
	⑥	1.83	2.06	990	

Non-GM/マカイモであるRusset Burbank NL 2系統 (Bt-6 SPBT02-05) ならびにNLP 1系統 (RBMT21-350) の100%稈体各6点からCTAB法を用いて抽出したDNAの純度検定の結果および収量
 左から試料 得られた吸光値 右には系統ごとのDNA収量の平均 標準偏差 変動係数を示した

Fig 6 CTAB 抽出液を用いた DNA 抽出法の検討結果



Construction of plasmid DNA as reference molecule and schematic diagram of the plasmid DNA

Fig 7 遺伝子組換えジャガイモ定量用標準分子の構築

Quantification Methods	Potato Samples		
	NL	NLP	
	Bt-6	SPBT02-05	RBMT21-350
Cry IIIA	0.28	0.29	0.64
NL specific	0.21	0.23	
NLP specific			0.51

Table 4 内標比の計測

Samples	True value	CryIII A		NL Specific		NLP Specific	
		content	Bias	content	Bias	content	Bias
Bt-6	0.5%	0.43	-13	0.43	-14		
	5.0%	3.59	-28	4.24	-15		
SPBT02-05	0.5%	0.37	-26	0.35	-31		
	5.0%	2.72	-45	2.78	-44		
RBMT21-350	0.5%	0.42	-16			0.39	-21
	5.0%	3.82	-23			3.81	-23

Table 5 疑似混入試料を用いた内標比の検証

Multiplex real-time PCRによるGM粒の検出

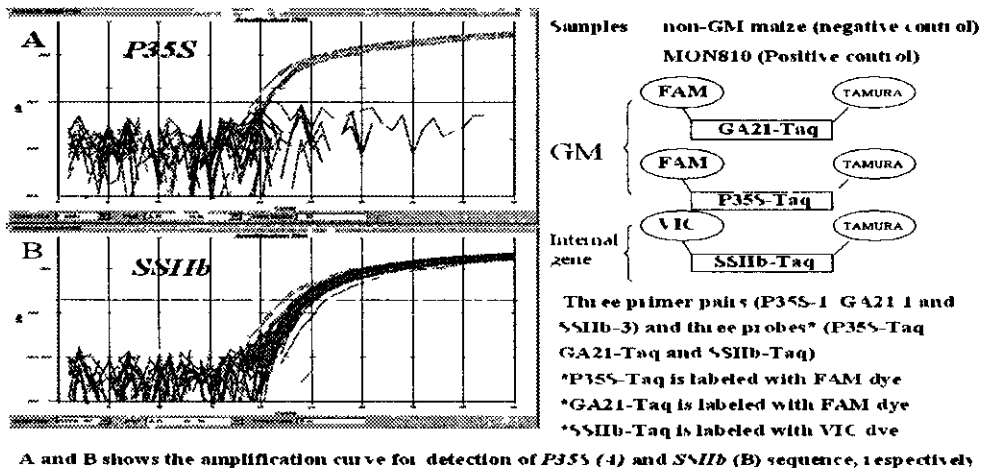


Fig 8 Multiplex real-time PCR 法の検討

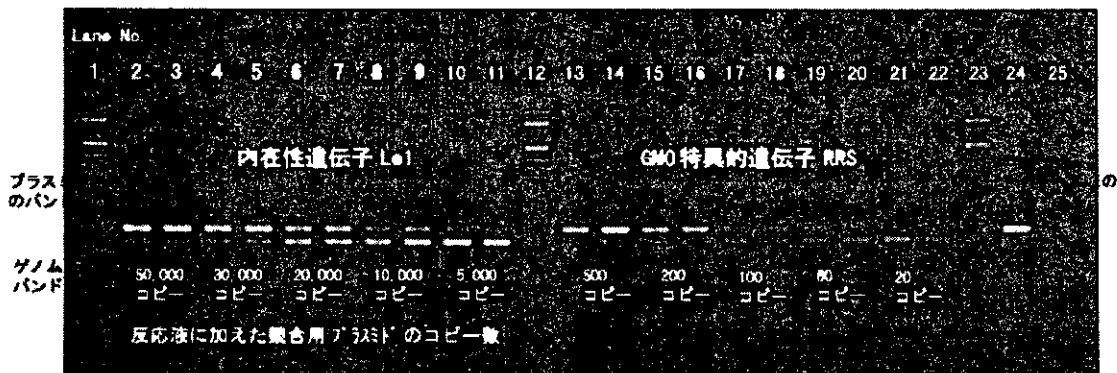


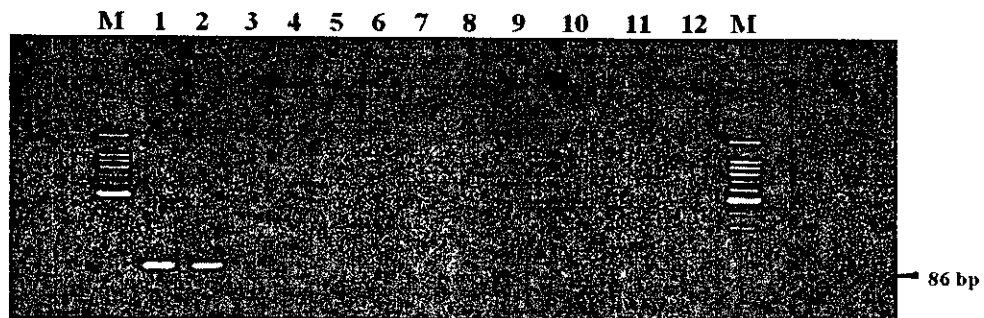
Fig 9 競合 PCR 法の実施例

検出となる遺伝子	PCR反応液あたりの競合プラスミドの濃度
ダイズ内在性Le1	50,000 30,000 20,000 10,000 5,000
ダイズ遺伝子組換えRRS (3.3%)	2,000 1,000 500 200 100
ダイズ遺伝子組換えRRS (1%前值)	500 200 100 50 20
トウモロコシ内在性SSIIB	50,000 30,000 15,000 10,000 5,000
トウモロコシ遺伝子組換えP35S (3.3%)	3,000 2,000 1,000 500 300
トウモロコシ遺伝子組換えP35S (1%前值)	600 300 200 100 40
トウモロコシ遺伝子組換えGA21 (3.3%)	3,000 2,000 1,000 500 300
トウモロコシ遺伝子組換えGA21 (1%前值)	2,000 1,000 500 300 200

Table 6 遺伝子組換え作物混入量に依存した競合プラスミド DNA 添加量の変化

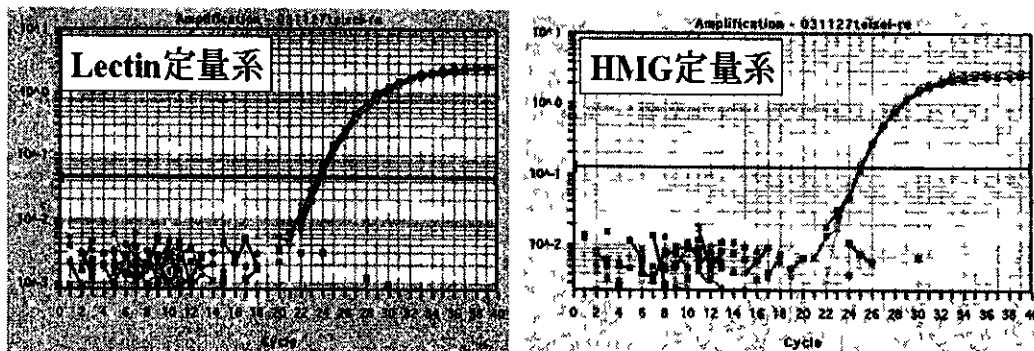
試料名	対象系統	内標比	備 考
ダイズ	Roundup Ready Soybean	0.64	Lel-n02とRRS 01を使用
トウモロコシ	スクリーニング用	0.91(0.98)	SSIIb 3とP35S 1を使用
トウモロコシ	GA21	2.13	SSIIb 3とGA21 3を使用

Table 7 競合 PCR 法における内標比



Lane 1 non-GM-大豆(Murayutaka), 2 GM-大豆(RRS), 3 小豆, 4 落花生, 5 いんげん豆, 6 そら豆, 7 えんどう豆, 8 non-GM-maize, 9 GM-maize(Mon810), 10 米, 11 小麦, 12 DW

Fig 10 GmaxHMG 01 プライマー対の特異性 1



シグナルはいずれの定量系においても遺伝子組換え、および非組換えダイズのみで得られた

Fig 11 HMG 遺伝子を標的とした定量系の特異性 1

定量系	sample No	sample	増幅の認められたwell数(3well)	Ct値	定量系	sample No	sample	増幅の認められたwell数(3well)	Ct値
Lel	1	non-OM-大豆	3	249	HMG	1	non-OM-大豆	3	248
	2	GM-大豆	3	251		2	GM-大豆	3	250
	3	小豆	0	—		3	小豆	0	—
	4	落花生	0	—		4	落花生	0	—
	5	いんげん豆	0	—		5	いんげん豆	0	—
	6	そら豆	0	—		6	そら豆	0	—
	7	えんどう豆	0	—		7	えんどう豆	0	—
	8	non-OM-mame	0	—		8	non-OM-mame	0	—
	9	OM-mame	0	—		9	OM-mame	0	—
	10	米	0	—		10	米	0	—
	11	小麦	0	—		11	小麦	0	—

各定量系におけるサンプル Ct 値の比較 (Threshold line=0.128 固定)

Table 8 HMG 遺伝子を標的とした定量系の特異性 2

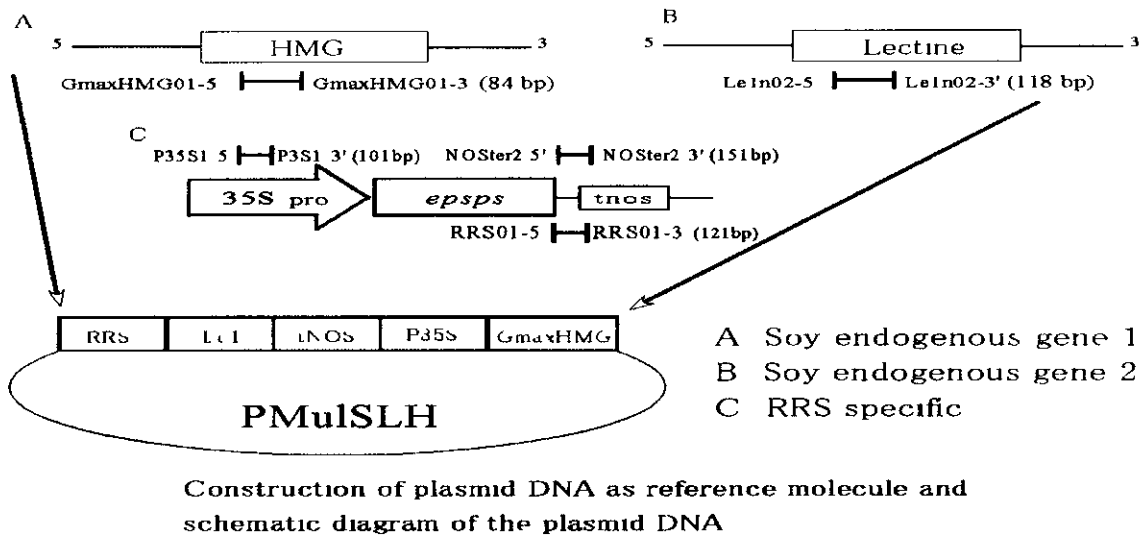


Fig 12 標準分子(PMuSLH)の構築

Target	ABI各定量機器における内標比				
	7700 試薬変更前	7700	7900 96 well	7900 384 well	7000
CaMV 35S promoter					
RRS	0.94 ± 0.01	0.77 ± 0.04	0.77 ± 0.01	0.75 ± 0.04	0.74 ± 0.02
Bt11	0.91 ± 0.02	0.91 ± 0.04	0.87 ± 0.02	0.91 ± 0.04	0.83 ± 0.02
T25	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.02
Event176	0.79 ± 0.01	0.86 ± 0.02	0.87 ± 0.01	0.87 ± 0.05	0.82 ± 0.01
MON810	0.39 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.01	0.35 ± 0.02
NOS terminator					
RRS	1.10 ± 0.03	0.97 ± 0.09	1.00 ± 0.03	0.99 ± 0.02	1.02 ± 0.03
Bt11	0.96 ± 0.02	0.85 ± 0.04	0.90 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.87 ± 0.05
GA21	1.05 ± 0.04	1.34 ± 0.06	1.33 ± 0.04	1.38 ± 0.04	1.18 ± 0.04
Construct specific					
RRS	0.95 ± 0.07	1.04 ± 0.06	1.04 ± 0.02	1.00 ± 0.04	0.95 ± 0.04
Bt11	0.50 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.41 ± 0.01
GA21	1.40 ± 0.03	2.01 ± 0.07	1.99 ± 0.03	2.06 ± 0.05	1.83 ± 0.06
T25	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.40 ± 0.01
Event176	2.05 ± 0.05	2.02 ± 0.09	2.02 ± 0.05	2.12 ± 0.07	1.93 ± 0.08
MON810	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.38 ± 0.01

平均値 ± 95%信頼区間で示した

Fig 13 改良定量法を用いた内標比 1 (ABI 定量 PCR 機器)

ライトサイクラーにおける内標比

Target	変更前	変更後
CaMV 35S promoter		
RRS	1.00 ± 0.04	0.74 ± 0.02
Bt11	1.43 ± 0.09	1.12 ± 0.07
T25	0.46 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Event176	0.81 ± 0.05	0.79 ± 0.05
MON810	0.44 ± 0.03	0.53 ± 0.03
NOS terminator		
RRS	1.26 ± 0.05	0.98 ± 0.03
Bt11	1.91 ± 0.14	1.45 ± 0.10
GA21	1.32 ± 0.08	1.82 ± 0.09
Construct specific		
RRS	0.96 ± 0.05	1.01 ± 0.04
Bt11	0.73 ± 0.04	0.63 ± 0.06
GA21	1.86 ± 0.08	2.63 ± 0.20
T25	0.40 ± 0.03	0.31 ± 0.02
Event176	2.63 ± 0.20	2.60 ± 0.15
MON810	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.04

平均値 ± 95%信頼区間で示した

Fig 14 改良定量法を用いた内標比 2 (Roche Lightcycler system)

内標比の有意差検定 (t検定)

各機種の内標比を7900の内標比と比較

Target	両側 t 検定		
	7900 96well	7900 384well	7000
CaMV 35S promoter			
RRS	○	○	×
Bt11	○	○	×
T25	○	×	×
Event176	○	○	×
MON810	○	○	×
NOS terminator			
RRS	○	○	×
Bt11	×	×	○
GA21	○	○	×
Construct specific			
RRS	○	○	×
Bt11	×	○	×
GA21	○	○	×
T25	○	×	×
Event176	○	×	○
MON810	○	○	○

○ 有意差なし
× 有意差あり
(p = 0.05)

Fig 15 内標比の有意差検定 1 (t検定)

内標比の有意差検定 (Meta-analysis)

t検定の結果をもとに、フィッシャーの方法を用いた検定結果の統合

$$\chi^2 \text{ value} = -2 \sum \ln P_i$$

機種	χ^2 値	t検定より求められたP値を上記の式に従って検定結果を統合
7900(96 well)	43.670	↓
7900(384 well)	83.924	
7000	182.437	それぞれに有意差が認められ、機種間での内標比の統合は行えない
限界値(df=28)	41.337	

Fig 16 内標比の有意差検定 2 (メタアナリシス)

疑似混入率算出値の真度と精度 (MON810)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)		Detection limit Under Q.L
		Mean	Bias	RSD _I	RSD _R	
0.1%	10	0.11	+12.6	38.1	36.5	20/20
0.5%	10	0.52	+4.1	16.6	24.8	00/20
1.0%	10	0.97	-3.1	11.1	14.7	00/20
3.0%	10	3.02	+0.6	12.9	20.3	00/20
5.0%	10	4.38	-12.4	10.5	15.0	00/20
10.0%	10	9.05	-9.6	10.8	11.5	00/20

Fig 17 ブラインドテストの結果 1 (MON810)

疑似混入率算出値の真度と精度 (Bt11)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)		Detection limit Under Q.L
		Mean	Bias	RSD _I	RSD _R	
0.1%	10	0.09	-14.7	31.7	25.2	20/20
0.5%	9	0.53	+6.0	15.5	16.2	00/18
1.0%	9	1.25	+24.7	16.6	14.3	00/18
3.0%	9	4.00	+33.3	13.0	11.4	00/18
5.0%	8	6.21	+24.2	6.2	5.6	00/16
10.0%	8	11.70	+17.4	5.6	7.1	00/16

Fig 18 ブラインドテストの結果 1 (Bt11)

疑似混入率算出値の真度と精度 (GA21)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)		Detection limit Under Q.L
		Mean	Bias	RSD _I	RSD _R	
0.1%	8	0.06	-36.5	15.2	14.6	5/16
0.5%	8	0.40	-20.2	9.6	13.5	00/16
1.0%	8	0.94	-6.4	14.2	12.8	00/16
3.0%	8	2.91	-2.9	5.7	7.4	00/16
5.0%	9	4.53	-9.4	5.0	7.3	00/18
10.0%	8	8.57	-14.3	5.6	8.2	00/16

Fig 19 ブラインドテストの結果 1 (GA21)

疑似混入率算出値の真度と精度 (Event176)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)		Detection limit
		Mean	Bias	RSD _I	RSD _R	Under Q L
0.1%	10	0.12	+18.3	14.6	20.3	00/20
0.5%	9	0.54	+8.1	12.1	16.1	00/18
1.0%	9	0.98	-2.5	19.9	22.4	00/18
3.0%	8	3.32	+10.8	5.5	8.8	00/16
5.0%	8	5.01	+0.3	6.6	6.6	00/16
10.0%	9	9.88	-1.2	9.0	11.2	00/18

Fig 20 ブラインドテストの結果 1 (Event 176)

疑似混入率算出値の真度と精度 (T25)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)		Detection limit
		Mean	Bias	RSD _I	RSD _R	Under Q L
0.1%	10	0.15	+48.7	33.1	32.1	20/20
0.5%	9	0.63	+26.7	23.2	24.8	00/18
1.0%	9	1.22	+21.6	14.5	13.1	00/18
3.0%	9	3.74	+24.7	7.0	11.8	00/18
5.0%	9	5.83	+16.7	8.2	9.8	00/18
10.0%	9	10.83	+8.3	17.0	16.4	00/18

Fig 21 ブラインドテストの結果 1 (T25)

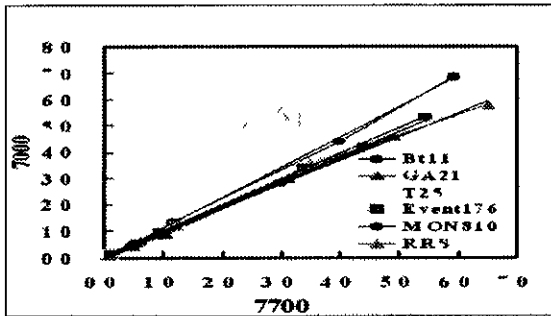
疑似混入率算出値の真度と精度 (RRS)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)		Detection limit
		Mean	Bias	RSD _I	RSD _R	Under Q L
0.1%	10	0.13	+25.8	20.2	18.7	20/20
0.5%	10	0.63	+25.2	12.4	17.0	00/20
1.0%	9	1.18	+17.9	14.6	10.7	00/18
3.0%	10	3.67	+22.4	12.5	11.6	00/20
5.0%	10	6.35	+27.0	5.8	11.4	00/20
10.0%	10	12.66	+26.6	11.1	9.2	00/20

Fig 22 ブラインドテストの結果 1 (RRS)

機種間における混入率算出値の相関性

－ABI PRISM 7700 と7000－



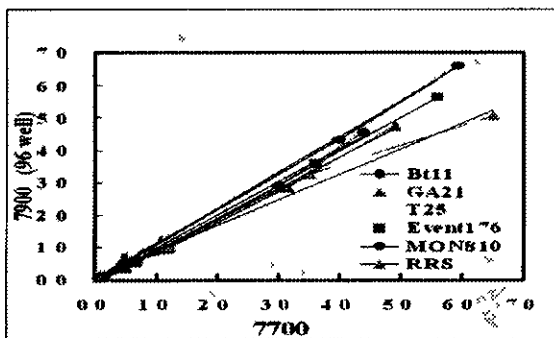
Correlation and slope

Line	Corr	Slope
Bt11	0.999	1.159
GA21	0.999	0.952
T25	0.998	0.940
Event176	1.000	0.981
MON810	1.000	0.956
RRS	0.996	0.898

Fig 23 機種間差試験の結果 1 (ABI PRISM 7000)

機種間における混入率算出値の相関性

－ABI PRISM 7700 と7900 (96 well)－



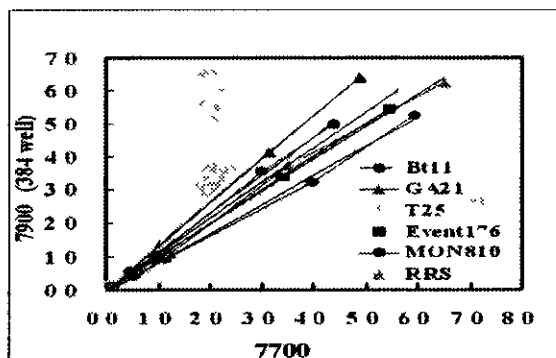
Correlation and slope

Line	Corr	Slope
Bt11	0.999	1.101
GA21	0.998	0.971
T25	0.993	1.108
Event176	0.998	1.027
MON810	0.998	1.027
RRS	0.989	0.792

Fig 24 機種間差試験の結果 2 (ABI PRISM 7900 96 well)

機種間における混入率算出値の相関性

－ABI PRISM 7700 と7900 (384 well)－



Correlation and slope

Line	Corr.	Slope
Bt11	0.997	0.876
GA21	1.000	1.310
T25	0.999	1.074
Event176	1.000	1.003
MON810	0.999	1.150
RRS	0.996	0.972

Fig 25 機種間差試験の結果 3 (ABI PRISM 7900 384 well)

ABI PRISM 7700との相関性

-MON810-

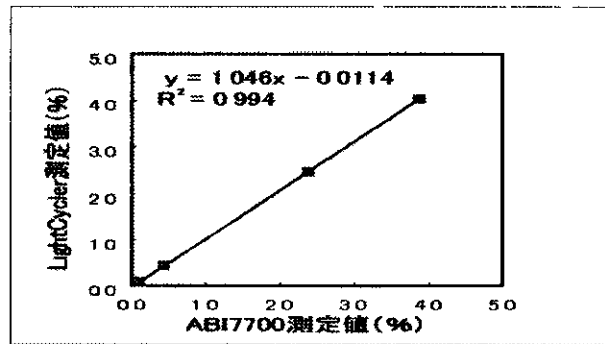


Fig 26 機種間差試験の結果 2 (Roche LightCycler System MON810)

ABI PRISM 7700との相関性

-GA21-

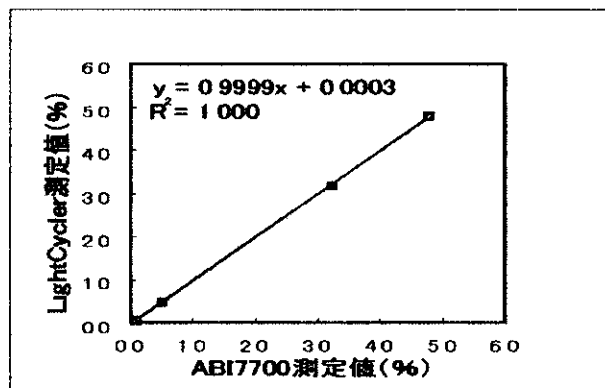


Fig 27 機種間差試験の結果 2 (Roche LightCycler System GA21)

ABI PRISM 7700との相関性

-RRS-

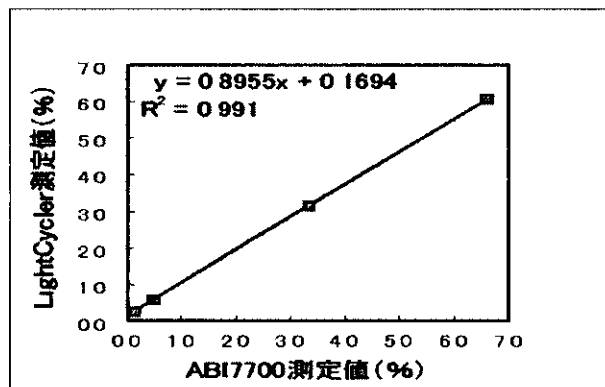


Fig 28 機種間差試験の結果 2 (Roche LightCycler System RRS)

ダイズ加工食品1%

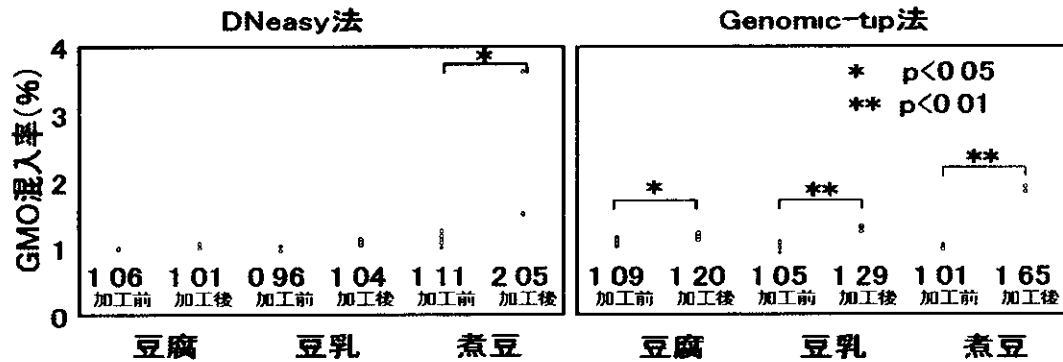


Fig 29 モデル加工食品の定量分析 (ダイズ加工食品 RRS 1%混入)

ダイズ加工食品5%

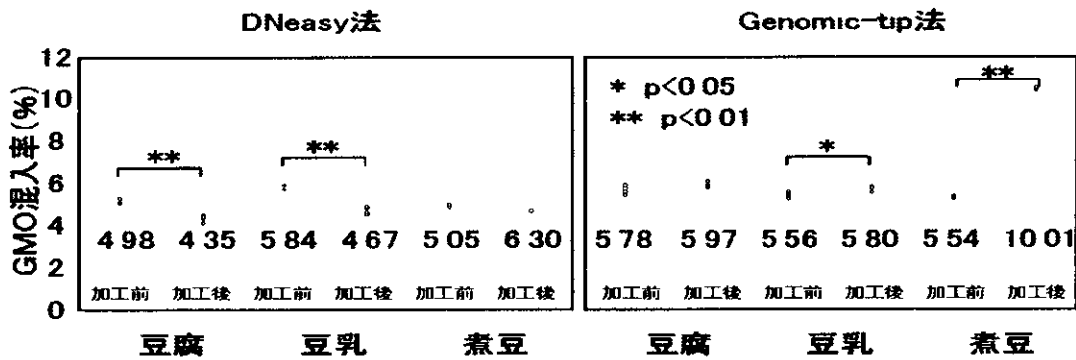


Fig 30 モデル加工食品の定量分析 (ダイズ加工食品 RRS 5%混入)

コーンスターチ

DNeasy法では定量に十分量のDNAが得られなかった

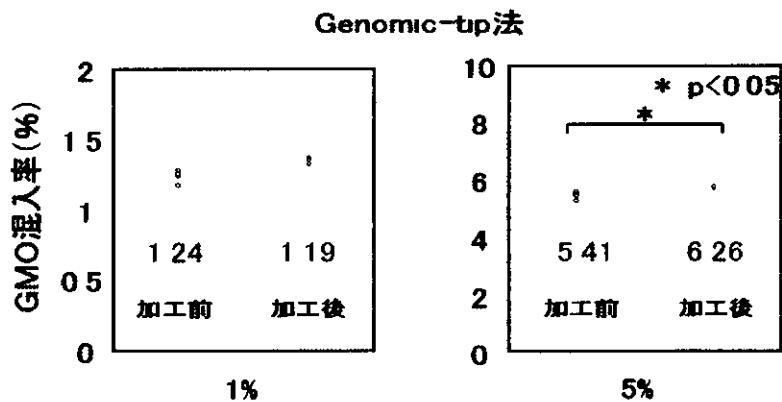


Fig 31 モデル加工食品の定量分析 (トウモロコシ加工食品 コーンスターチ)

コーンパフ・コーンチップ

コーンパフ	SSIb	MON810	混入率(%)	コーンチップ	SSIb	MON810	混入率(%)
	6.44	0.00	0.00		112.20	5.83	16.24
	12.65	0.00	0.00		108.66	1.99	5.72
1%	15.76	0.00	0.00	1%	115.37	2.58	6.99
	5.98	0.00	0.00		103.21	1.10	3.33
	13.84	0.00	0.00		122.69	1.87	4.76
	446.27	12.14	8.50		115.49	7.74	20.94
	353.40	10.39	9.19		121.22	7.07	18.23
5%	484.56	20.21	13.03	5%	135.00	6.85	15.86
	625.03	19.20	9.60		106.48	7.52	22.07
	630.44	19.32	9.58		118.73	6.93	18.24

Genomic-tip法抽出したDNA溶液中で測定された各遺伝子のコピー数

Fig 32 モデル加工食品の定量分析 (トウモロコシ加工食品 コーンパフおよびチップ)

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
「バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」
分担研究報告書

新規タンパク質のアレルギー性評価に関する調査研究
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 平成15年度は、(1)アレルゲン予測の解析法の検討、(2)食物アレルギー動物モデルの開発、(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分解産物と患者血清との反応性の検討及び、(4)1種の新規タンパク質と1種の既知アレルゲンと患者血清との反応性についてエピトーフ部位を考慮した検討を行った。具体的には、(1)アレルゲン予測の解析法では、B細胞エピトーフの相同性も考慮に入れた既存アレルゲンと新規アレルゲンの相同性に関するハイオインフォーマティク手法の導入を検討した。アミノ酸の疎水性、親水性だけでなく、エピトーフの出現頻度も考慮にいたれた方法の有用性が示された。(2)食物アレルギー動物モデルの開発では、マウスを用いる経口感作の方法について数種の系統の差違、及び投与時の溶媒の差違について検討を行った。経口感作モデルとして、W/Wvマウスが最も感受性が高いこと、また、BALB/cマウスを用いた経口感作で、溶媒の脂溶性を高めることで、感作能の上昇することが認められた。また、別途、ILSI-HESI主催の食物アレルギーモデルのvalidation試験に参画し、投与を開始した。(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分解産物と患者血清との反応性の検討では、卵白中の主要なアレルゲンであるオボムコイト (OVM) の人工胃液による分解産物と患者血清との反応性を詳細に検討し、分解によるアレルゲン性の変化を検討した。低分子の7kDa, 4.5kDaの断片に対しても、一部の患者のIgE抗体の結合が確認された。(4)1種の新規タンパク質 (Cry 1Ac)と1種の既知アレルゲン(ABA-1)と患者血清との反応においてエピトーフを考慮に入れた試験を行うために、6個の連続したアミノ酸の合成ペプチドによるELISAの阻害試験を行ったが、今年度合成したペプチドでの阻害はかからなかった。

協力研究者

澤田純一 (国立医薬品食品衛生研究所)

美宅成樹 (名古屋大学工学部)

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)

金澤由基子 (食品薬品安全センター泰野研究所)

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。安全性評価の国際的動向としては、1999年から2003年にかけて、コーデックス(Codex)食品規格委員会(国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)では、ハイオ食品特別部会が設置され、ハイオ食品について必要な基準、指針あるいは勧告を策定することとなり、2002年3月に横浜で開催された第3回特別部会にて採択された