

びプローブを含む混合容液 10 μL (35S promoter、またGA21特異的配列を対象とした定量系については、primer対およびプローブの最終濃度をそれぞれ0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ とし、SSIIb遺伝子を対象とした定量系については、primer対およびプローブの最終濃度をそれぞれ0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ とした)、これに20 ng/ μL に濃度を調製したDNA試料液を2.5 μL 、またはnon template control用DNA溶液、positive control用のplasmid DNA (定量PCR法に使用する標準プラスミドDNAのうち、1,500コピーおよび、250,000コピーの溶液)2.5 μL 加え、全量を25 μL とした。なお、プライマー対およびプローブに関しては、現公定法において使用されるSSIIb-3・SSIIb-Taq、P35S-1・P35S-TaqおよびGA21-3・GA21-Taqを使用しているが、プローブの蛍光標識をmultilayerでの解析が可能ないようにP35S-TaqならびにGA21-TaqはFAM、SSIIb-TaqはVICへと変更している。反応条件は50 $^{\circ}\text{C}$ で2分間保持した後、95 $^{\circ}\text{C}$ で10分間保ち、95 $^{\circ}\text{C}$ 30秒、59 $^{\circ}\text{C}$ 1分30秒を1サイクルとして45サイクルの増幅反応を行った。

5)スクリーニング法におけるend point解析の応用

スクリーニング法によって得られる結果をより簡便かつ頑健に解析可能にすることを目的に、end point 解析方法の応用を試みた。シグナルの採取、および解析方法はABI PRISM 7900 HTに付属のSNPs解析用ソフトウェアに準拠した。

6)Multiplex 定性PCR法による遺伝子組換えトウモロコシの品種同定

B-2-4)に示した遺伝子組換えトウモロコシ・スクリーニング法により陽性判定された検体について、スタック品種であるのか、通常の遺伝子組換えトウモロコシ系統であるのかを同定可能とすることを目的に、multiplex 定性 PCR 法の検討を行った。本multiplex 定性 PCR 法の検討においては、

Mon810、GA21、Bt11、T25、Event 176、TC1507、Mon863、NK603 の計 8 系統の遺伝子組換えトウモロコシを対象とした。

7)応用事例の蓄積

開発された1粒毎に遺伝子組換え作物であるか否かを同定可能な検知法を用い、分別流通管理されたトウモロコシ検体4種および、不分別トウモロコシ検体4種、各180粒ずつ、全1440粒の試験を実施した。

3. 各種定量PCR機器により得られる定量値の同等性評価

1)試料

食安発第0628001号(平成16年6月28日)に記載されている定量PCR法において、定量分析の対象とされている遺伝子組換え作物(RRS、Mon810、GA21、Bt11、Event 176、T25)を対象とし、上記遺伝子組換え作物を0.1、0.5、5、10%(w/w)の割合でそれぞれ含有する疑似混入試料を調製し、DNeasy Plant Maxi kit法を用いてDNA抽出を行った。抽出DNAを1試験当たりの使用量に分注した上で、各機種試験に共通の試料として用いた。

2)定量PCR機種

ABI PRISM 7700、7900 (96ならびに384 well)、7000、5700を試験対象機種とした。

3)その他試薬

Universal Master Mix を含む、試験に使用した試薬は全て、同一ロットのものを用いた。

4)統計解析

ABI PRISM 7700を用いて得られた定量値と、その他の機種を用いて得られた定量値について、それぞれの機種内で等分散していることを確認した上で、両側t-検定により有意差を検定した。

C. 研究結果及び考察

1. 遺伝子組換え作物(ダイズ)を含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討

1) 開発された各定量系の確認試験

計6種の定量系および、加工食品定量用標

準分質 (PMuISLH) を用い、定量PCRの結果得られるシグナル増幅曲線の形状および、検量線の直線性について確認した。その結果、全ての定量系において良好な増幅曲線が確認され、また検量線についても、相関係数が0.998以上と非常に良い直線性を示した (Fig.2)。これらの結果から、反応試薬および反応条件に関しては至適化されたと判断した。

2) 内標比試験

遺伝子組換え食品を対象とした定量分析法 (定量PCR法) においては、内標比とよばれる係数を用い、混入率を算出する。内標比とは、純粋種子における内在性遺伝子と遺伝子組換え作物特異的配列の比である。内標比は、各遺伝子組換え食品の系統に固有の係数であり、理論的には、その遺伝的組成が同一であれば普遍である。遺伝子組換えダイズ (RRS) においては、RRS特異的配列がハプロイドゲノムあたり1コピー存在していることが明らかにされており、また、標的としている内在性遺伝子が single copy gene であるため、理論的に推測される内標比は1となる。しかしながら、使用する定量系の特性により若干の変動が観察される場合があるため、現行定量分析法においては、実測値を内標比として使用している。本研究においても、内在性2遺伝子4種および、RRS特異的配列2種の定量系を組み合わせた計8種の定量系の組み合わせにより内標比を測定した。また、内標比測定時の対象DNAとしては、穀粒を対象としたDNA抽出法として規定されているDNeasy Plant Maxi kitを用いて抽出したDNAならびに、加工食品を対象としたDNA抽出法として開発した Genomic-tip 20/Gを用いて抽出したDNAの両方を用いた。Table 1に示したとおり、それぞれの定量系を用いて計測されるコピー数に関しては、定量系およびDNA抽出法に固有と考えられる差違が認められたが、内標比に関しては、RSD 15%以下の精度で測定

されており、また理論的内標比(1)と大きな差違を示す組み合わせは観察されなかった。

3) 内標比検証試験

内標比は定量値を算出するために使用される係数であるため、その妥当性は実際に既知量の遺伝子組換え食品を含有する試料を用いて検証されなければならない。そのため、1および5% (w/w) の割合でRRSを含有する疑似混入試料を調製し、それらを対象とした測定、および定量値の算出を行った。また、内標比の測定にあたり、異なる2種のDNA抽出法を採用したことから、上記疑似混入試料からも同様に、2種の方法を用いてDNAを抽出し、試験を行った。得られた結果の中には、同一試料を異なる定量系の組み合わせを用いて定量した結果と有意な差を示す結果が認められたが、いずれの定量系、DNA抽出法、試料の組み合わせから得られた定量値も、重量混ぜ合わせ比率を真値とした場合にはbiasが25%未満の真度で定量値が算出されており、この結果から、先に測定された内標比の妥当性が確認されたものと考えられた (Table 2~5)。

4) モデル加工食品における測定コピー数の変動

開発された方法が、未加工原材料粉に含有されるRRS量を精度良く定量可能であることが確認されたことを踏まえ、次に、加工処理による測定コピー数への影響について検討した。Fig. 3に示したとおり、低圧加工ならびに高圧加工を施したモデル加工食品を対象に、各定量系を用いて測定されるコピー数は、処理時間依存性的かつ対数的に減少することが明らかとなった。また、高圧加工したモデル加工食品におけるコピー数の減少率は、低圧加工した加工食品におけるコピー数の減少率にくらべ明らかに大きく、この結果は、加工条件により測定対象であるDNAが受ける影響が異なることを示唆していると考えられた。

次いで、標的とするDNA配列の長さ、

加工処理による測定コピー数の減少との相関について明らかにするため、同一遺伝子内の異なる長さのDNA配列を標的配列とする2組の定量系について、コピー数を比較した。HMG遺伝子を標的遺伝子とし、それぞれ110、84bpのPCR増幅産物を生じるHMG01定量系とHMG02定量系について比較した結果、HMG02定量系を用いることにより、いずれの加工処理時間においてもより高いコピー数が測定された。また、Lectin遺伝子を標的遺伝子とし、それぞれ118、89bpのPCR増幅産物を生じるLe1n02定量系と、Le1n03定量系について比較した場合にも、HMG遺伝子を標的とする定量系の場合と同様に、標的DNA配列の短いLe1n03定量系により得られるコピー数のほうが、いずれの加工処理時間においても高いことが明らかになった (Fig. 4)。これらの結果は、1種類の遺伝子を標的遺伝子として複数の定量系を開発した場合、より短いDNA配列を標的配列とする事により、加工処理による影響を受けにくい定量系が開発される可能性が高いことを示唆している。

さらに、標的とする遺伝子の種類と、加工処理による測定コピー数の減少との相関を明らかにするため、ほぼ同じ大きさのPCR増幅産物を生じる、異なる遺伝子を標的遺伝子とする定量系について、それらを用いて得られるコピー数を比較した。それぞれ118および110bpのPCR増幅産物を生じるLe1n02定量系とHMG01定量系により得られるコピー数について比較した結果、HMG01定量系を用いることでより高いコピー数が測定されることが明らかになった。また、それぞれ89および84bpのPCR増幅産物を生じるLe1n02定量系とHMG01定量系により得られるコピー数についても同様に比較した結果、先の比較同様、HMG遺伝子を標的遺伝子としたHMG02定量系を用いることで、より高いコピー数が測定可能であった (Fig. 5)。これらの結果は、先の標的

DNA配列の長さに加え、標的とする遺伝子の種類もまた、加工処理による影響を受けにくい定量系を開発するにあたり、重要な要素であることを示唆していると考えられた。

先に示したとおり、各定量系を用いて測定されたコピー数が、加工処理時間依存的かつ、対数的に減少していることが明らかになった。これらの結果は、加工処理により、測定対象となるDNAが変質しており、また、その反応様式が一次反応であることを意味している。そこで、定量系毎に得られたコピー数をy軸、加工処理時間をx軸にプロットし、指数近似曲線を作成すると、 $y=ae^{-kx}$ の一般式で表すことのできる数式が得られた。この式において、yはある時点におけるコピー数、aは初期コピー数(加工処理時間0分におけるコピー数)、kは反応速度定数、xは加工処理時間を表す (Fig. 6)。また、Fig. 7には、一次反応の一般式、 $[A]=[A]_0e^{-kt}$ を示した。この一般式において、[A]はある時点における物質の濃度、 $[A]_0$ は物質の初期濃度、kは反応速度定数、tは反応時間を表す。上記のように各定量系に対して作成された一次反応式を比較すると、反応速度定数は基本的に、各定量系、および加工処理条件に固有の値であり、試料に含まれているRRSの量にはよらず、一定であることが明らかになった。さらに、内在性遺伝子を標的とする定量系と、RRS特異的配列を標的とする定量系とを組み合わせた場合には、反応速度定数の値が非常に近い組み合わせがあることが明らかとなった。特に、HMG01とRRS02の定量系を用いて求められた反応速度定数は、1%試料において、それぞれ-0.0333、-0.0326、また5%試料において-0.0352、-0.0345と、全ての定量系の組み合わせの中で最も近い値を示した (Table 6)。この結果は、測定対象としたモデル加工食品(低圧加工処理)においては、上記2定量系を用いて測定されるコピー数が加工処理に

対し、同様の速度で減少していることを示唆している。

5) 定量値の検証

1ならびに5%試料に対する定量値を算出した。定量値の算出にあたっては、各定量系について測定した内標比を係数として用いた。その結果、低圧ならびに高圧処理モデル加工食品のいずれにおいても、先に、反応速度定数が最も近い内在性遺伝子および、RRS特異的配列定量系の組み合わせとして示したHMG01とRRS02の2定量系を用いて得られた測定値を基に算出された定量値が、他の定量系の組み合わせにより算出される定量値に比べ、真値(重量混合比)に近い値を示した。この傾向は混入率によらず安定しており、また、長時間の加工処理を施した場合にも維持された(Fig.8~11)。これらの結果から、加工食品を精度よく定量するためには、内在性遺伝子と遺伝子組換え作物特異的配列を対象とするそれぞれの定量系が、加工処理の影響を同じ程度に感受する性質を持つことが重要な要素であることが明らかにされた。なお、上記「加工処理の影響を同じ程度に感受する性質」とは、主として、同じ程度の速度で分解するDNA配列を標的とする性質と考えられ、本研究においては反応速度定数として表されたものである。

6) 加工食品定量値解析法の検討

これまでに、低圧、また高圧処理加工食品を対象とした場合、各定量系を用いて測定されるコピー数は加工処理時間依存的に減少し、その減少率は各定量系に固有のものであることを示した。これらの結果に基づき、内在性遺伝子を標的とした異なる定量系を組み合わせ、それらから得られるコピー数の比を求めることで、加工処理時間を推定できるのではないかと考え、検討を行った。その結果、いずれの定量系を組み合わせで検討した場合にも、コピー数比は、処理時間とよい相関を保ちながら変動して

いることが明らかになった。考えられる6種の組み合わせのうち、定量値解析法の構築にあたっては、コピー数比の処理時間依存的な変動率の高かった2種(LeIn03とLeIn02ならびにHMG02とLeIn02の組み合わせ)を用いることにした(Fig. 12)。また、Fig.13に示したとおり、特定の条件で処理したモデル加工食品においては、RRSの含量に寄らず、RRS01あるいはRRS02定量系を用いて得られるコピー数の減少率(反応速度定数)は一定であったことから、混入率未知試料においても、同様であると考えた。上記の加工処理時間推定方法および仮定を踏まえ、また、先に述べたとおり、モデル加工食品におけるコピー数の減少が一時反応であることに基づき、Fig.14に示した定量値の解析方法を構築した。本解析法を用いて、モデル加工食品を対象に、各定量系を用いて測定されたコピー数を解析し、定量値を算術的に求めた結果をTable 7に示した。40分間の加工処理を行った試料を検体としているが、HMG02とRRS01、あるいはRRS02定量系のそれぞれから得られたコピー数を算術に用いることにより、十分に妥当と判断可能な定量値が算出された。

2. 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発

1) 現行定量分析法を用いたスタック品種混入試料の測定例

現行の定量分析法を用い、スタック品種の穀粒を含む多粒粉碎試料を対象に定量値を求めた場合、スタック品種が1粒混入しているのか、あるいは該当する親系統の遺伝子組換えトウモロコシが各1粒ずつ、計2粒混入しているのかを区別することが出来ない。このため、各系統に毎に得られた定量値を合算し、試料に含まれる全遺伝子組換えトウモロコシの混入率を算出した場合には、単位重量を基準とした混入率に比べ、過剰に評価された結果が得られることが予測されてきた。この事について確認するた

め、全180粒のトウモロコシ穀粒中に9粒の Mon810あるいは、GA21穀粒を含む試料、Mon810ならびにGA21穀粒を9粒ずつ、計18粒を含む試料、さらにMon810とGA21とを交配して作出されたスタック品種 (Mon810 x GA21) の穀粒9粒を含む試料の計4種を調製し、粉碎混合した後に、現行公定法を用いた定量試験を行った。その結果、スタック品種を9粒含む試料から算出された定量値は、Mon810ならびにGA21穀粒を9粒ずつ含む試料から算出された定量値を上回り、約15%と計算された (Fig.15)。この結果により、スタック品種が混入した試料を対象に、現行の定量分析法を用いて分析を行った場合、単位重量を基準とした混入率としては過剰評価されることが初めて示された。

2) 1粒毎多粒同時DNA抽出法の検討

昨年度に引き続き、1粒毎多粒同時試料調製法ならびに、DNA抽出法について検討を行った。その結果、最終的に至適化された方法についてはB-2-2)および3)に示した。確立された方法を用い、非遺伝子組換えトウモロコシ、Mon810、GA21、スタック品種 (Mon810 x GA21)それぞれ12粒ずつを対象に試料調製およびDNA抽出を行った。Table 8に示したとおり、その後の試験に十分な量のDNAが、試料に寄らず安定して抽出されており、またO.D 260/280、230比についても、全ての試料を合わせたの平均値が1.76および1.90であり、十分に精製度が高いDNAが抽出されていると判断された。

3) Multiplex real-time PCR 法を用いた遺伝子組換えトウモロコシス・クリーニング法

遺伝子組換えトウモロコシであるか否かを明らかにするための、簡便なスクリーニング試験法として、昨年度に引き続き multiplex real-time PCR法についての検討を行った。35S promoter配列、GA21特異的配列、およびトウモロコシの内在性遺伝子である *SSIIB* 遺伝子の同時検知を可能とする複合反応について検討を重ねた。その結果、

いずれの対象配列からも十分なシグナルが、より安定して得られるように反応組成液ならびに反応条件が最適化された。確立した反応液組成および反応条件はB-2-4)に示した。Table 8に吸光値の測定結果を示したDNA溶液を試験対象とし、multiplex real-time PCR法を用いて試験した結果、*SSIIB* 遺伝子由来のシグナルは、非遺伝子組換えトウモロコシを含む全検体から、また遺伝子組換えトウモロコシに特異的な35S promoter配列あるいはGA21特異的配列由来のシグナルは、Mon810、GA21およびスタック品種のみから特異的に得られた (Fig. 16)。これらの結果から、本法を用いることにより、遺伝子組換えトウモロコシであるか否かについて、より簡便、かつ迅速に判定可能となると考えられた。

4) スクリーニング法における end point 解析の応用

前述したとおり、遺伝子組換えトウモロコシを対象とし、multiplex real-time PCR法を用いた簡便かつ迅速なスクリーニング検知法を開発した。この方法においては、検体から特異的なシグナルが得られるか否かに依って、遺伝子組換えトウモロコシであるか否かを判定する。この判定は、Fig.16に示したような、シグナルの増幅曲線を確認することによっても可能であるが、より簡便かつ頑健に判定を可能にするを目的に、end point 解析法の導入を試みた。解析に使用するアルゴリズムには、ABI PRISM 7900 HT に付属のソフトウェア (SDS 2.1)に組み込まれている SNPs 解析用のものを応用した。その結果、end point 解析によっても、通常の遺伝子組換えトウモロコシおよびスタック品種を、非遺伝子組換えトウモロコシと明確に区別することが出来る可能性が示された。Fig. 17において、スタック品種に対する結果を示す。

5) Multiplex 定性 PCR 法による遺伝子組換えトウモロコシ品種判別

これまでも、multiplex 定性 PCR 法を用いた遺伝子組換え作物の検知法については、幾つかの報告がある^{5),6)}。しかしながら、いずれの報告においても対象としている作物種は、これまでに開発された通常の遺伝子組換え作物であり、スタック品種全てを検知可能な方法は報告されていない。そこで、日本において安全性審査の終了している遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種全7品目 (Mon863xNK603、GA21xMon810、NK603xMon810、T25xMon810、TC1507xNK603、Mon863xMon810、Mon810xMon863xNK603)と通常の遺伝子組換えトウモロコシを、合わせて同定可能なmultiplex 定性 PCR 法の開発を検討した。Fig. 18 に示したとおり、入手可能であった通常の遺伝子組換えトウモロコシおよびスタック品種については、互いを明確に区別することが可能であった。よって、先に示されている松岡ら⁷⁾の方法と合わせて準用することにより、現時点において安全性審査を終了しており、かつ栽培実績のある遺伝子組換えトウモロコシについて、スタック品種を含め、同定することが可能になるものと考えられる。

6) 応用事例の蓄積

分別流通管理された検体に関しては、全4検体を通し、各検体につき試験した180粒のうち、1粒あるいは2粒が遺伝子組換えトウモロコシであった。一方、不分別トウモロコシ検体については、試験した180粒のうち100粒以上が遺伝子組み合せトウモロコシであった検体も含まれており、この検体について粒換算の混入率を算出した結果、62.22%の値が得られた(Table 9)。

3. 各種定量PCR機器により得られる定量値の同等性評価

食安発第0628001号(平成16年6月28日)に記載されている定量PCR法の適用可能機種のうち、ABI PRISM 7700、7900 (96 ならびに384 well)、7000、5700を用いて得られる

定量値の同等性について検証するため、定量分析の対象とされている遺伝子組換え作物を0.1、0.5、5、10%(w/w)の割合でそれぞれ含有する疑似混入試料を共通の試料として用い、得られた定量値の比較検討を行った。比較検討は、これまでの検討において最も信頼性の高い機種として判断されたABI PRISM 7700を用いて求められた定量値に対し、他の機種で得られた定量値を比較するという方法で行った。その結果、特定の遺伝子組換え作物については、重量混合比を真値とした場合、真値に比べて、高めあるいは低めの定量値が得られる傾向が認められたが(Fig. 19~23)、機種の異なりによる有意な差は認められなかった(Table 10~15)。これらの結果から、上記定量値を与える作物・系統については内標比の見直しが必要である可能性が示唆されたが、異なる機種を用いた場合にも、同一の試料を対象とした場合には、同等と判断される定量値を求めることが可能であることが明らかになった。

D. 結論

1. 遺伝子組換え作物(ダイズ)を含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討

遺伝子組換えダイズを対象とする新たな定量分析法を開発した。未加工穀粒粉砕試料を用いた試験により、当該定量分析法が、既存の分析法と同等の真度を有することが示された。さらに、モデル加工食品を用いた試験からは、加工食品を対象に、精度よく混入率を算出するためには、内在性遺伝子と遺伝子組換え作物特異的配列を対象とするそれぞれの定量系が、加工処理の影響を同じ程度に感受する性質を持つことが重要な要素であることが強く示唆された。また一方では、加工食品を対象に、異なる複数種の内在性遺伝子のコピー数を測定し、その残存量を比較することから加工影響を推定することが可能ではないかとの示唆が

得られた。さらに、推定した加工影響を除くことにより、算術的に加工以前の混入率を求める解析法について検討を進めた。

2. 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発

昨年度報告した方法に改良を加え、より簡便かつ迅速に、また安定して、遺伝子組換えトウモロコシ粒を検知可能な方法が開発された。本検知法を使用し、分別流通管理された検体、あるいは不分別の検体を検査した結果、不分別検体において、粒換算で50%以上の混入率が算出される検体が確認された。分別流通管理された検体については、規定量以上の混入は確認されなかった。

3. 各種定量PCR機器により得られる定量値の同等性評価

同一試料に対し、複数種の定量PCR機器 (ABI PRISM 7700、7900 (96 ならびに384 well)、7000、5700) を用いて測定を行った結果、得られた定量値に機種依存的な偏りは認められなかった。しかし、特定の遺伝子組換え作物の種類・系統については、明らかに定量値の真度に問題が認められており、今後の検知法の改良点であると考えられた。

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) 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.
- 3) Cren-R, M. ; Carayol, E. ; Laforgue-T, T. ; Hirel, B. A novel HMG A-like protei

n binds differentially to the AT-rich regions located in the far distal and proximal parts of a soybean glutamine synthetase gene (G S15) promoter. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 1006-1016.

4) Yoshimura, T.; Kuribara, H.; Matsuoka, T.; Kodama, T.; Shigematsu, M.; Watanabe, T.; Akiyama, H.; Maitani, T.; Furui, S.; Hino, A. Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *J. Agric. food chem.* (impress)

5) HUANG, H-Y.; PAN, T-M. Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3264-3268.

6) GERMINI, A.; ZANETTI, A.; SALATI, C.; ROSSI, S.; FORRÉ, C.; SCHMID, S.; MARCHELLI, R. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3275-3280.

7) 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.

F. 研究業績

論文

- 1) 穂山浩、渡邊敬浩、笠間菊子、松木容彦、米谷民雄 (2004) 「食品衛生外部精度管理調査研究の概要(第1報) 遺伝子組換えトウモロコシ(CBH351)および遺伝子組換えジャガイモ(NewLeaf Plus and NewLeaf Y)の検知用試料の作製と調査成績について」 *食品衛生研究* **54**(4) 25-35.
- 2) Takahiro Watanabe, Hideo Kuribara, Takashi Mishima, Hiroyuki Kikuchi, Misao Kubo,

Takashi Kodama, Satoshi Futo, Kikuko Kasama, Akie Toyota, Masanori Nouno, Ayako Saita, Kunihiko Takahashi, Akihiro Hino, Hiroshi Akiyama, Tamio Maitani (2004). New Qualitative Detection Methods of Genetically Modified Potatoes. Biol. Pharm. Bull. 27(9):1333-1339.

3) Takeshi Ogasawara, Fumihiro Arakawa, Takahiro Watanabe, Hiroshi Akiyama, Akihiro Hino, Tamio Maitani, Yukihiko Goda, Yoshihiro Ozeki (2004). Genomic DNA fragmentation of genetically modified corn during food processing. Jap J. Food Chem. 11, 137-144.

4) Yoshimura T.; Kuribara H.; Matsuoka T.; Kodama T.; Shigematsu M.; Watanabe, T.; Akiyama H.; Maitani T.; Furui S.; Hino A. Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. J. Agric. food chem. (in press)

5) Yoshimura T.; Kuribara H.; Kodama T.; Yamata S.; Futo S.; Watanabe S.; Aoki N.; Iizuka T.; Akiyama H.; Maitani T.; Naito S.; Hino A. Comparative Studies of the Quantification of Genetically Modified Organisms in Foods Processed from Maize and Soy Using Trial-Producing. J. Agric. food chem. (in press)

学会発表等

1) 遺伝子組換え農産物の検知技術の現状と今後 (食品総合研究所国際ワークショップ) 「GMジャガイモ定性、定量分析法のコラボレーションスタディーおよび外部精度管理の概要」 渡邊敬浩 (2004. 4)

2) 第87回日本食品衛生学会学術講演会 「遺伝子組換えスタック品種トウモロコシの検知法について (第1報)」 穂山浩、若林薫、渡邊敬浩、菊地博之、米谷民雄、中出晋介、安井修二、千葉良子、日野明寛 (2004. 5)

3) 第87回日本食品衛生学会学術講演会 「Competitive PCR法を用いた遺伝子組換えダイズ・トウモロコシ定量法の検討」 中川由紀、加藤久、阿部直哉、布藤聡、松岡猛、栗原秀夫、渡邊敬浩、穂山浩、米谷民雄、児玉貴志、日野明寛 (2004. 5)

4) 第10回日本食品化学学会学術大会 「遺伝子組換えスタック品種トウモロコシの検知法について (第2報)」 渡邊敬浩、穂山浩、若林薫、菊地博之、米谷民雄、中出晋介、安井修二、昭和薬大 千葉良子、日野明寛 (2004. 6)

5) A symposium on “DNA analysis for Food safety and quality assurance”(at Chulalongkorn University in Thailand) 「MHLW test methods and monitoring for GMOs」 Takahiro Watanabe (2004. 8)

6) The 118th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting 「Novel Qualitative Detection Methods of Genetically Modified Potatoes」 TAKAHIRO WATANABE, HIROSHI AKIYAMA, HIROYUKI KIKUCHI, TAMIO MAITANI, HIDEO KURIBARA, TAKASHI KODAMA, TAKASHI MISHIMA, SATOSHI FUTO, AKIHIRO HINO (2004. 9)

7) The 118th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting 「Quantitation of Genetically Modified Maize and Soy by Competitive PCR」 HISASHI KATO, YUKI NAKAGAWA, NAOYA ABE, TAKASHI KODAMA, TAKESHI MATSUOKA, HIDEO KURIBARA, SATOSHI FUTO, TAKAHIRO WATANABE, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, AKIHIRO HINO (2004. 9)

8) 第88回日本食品衛生学会学術講演会 「遺伝子組換え食品における加工影響についての基礎的検討I」 渡邊敬浩、菊地博之、荒川史博、小笠原健、峯岸恭孝、栗原秀夫、児玉貴志、古井聡、日野明寛、穂山浩、米谷民雄 (2004. 11)

9) 第88回日本食品衛生学会学術講演会

「遺伝子組換え食品における加工影響についての基礎的検討 II」 菊地博之、渡邊敬浩、荒川史博、小笠原健、峯岸恭孝、栗原秀夫、児玉貴志、古井聡、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2004.11)

10) International Workshop on Detection Methods for Genetically Modified Organisms
「Development of the detection methods for GM potatoes and stack trait maize」 Takahiro Watanabe (2004.11)

11) 第 41 回全国衛生化学技術協議会年会
「遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810) 定量検査法の外部精度管理について」 渡邊敬浩、菊地博之、穠山浩、米谷民雄、笠間菊子、松木容彦、日野明寛 (2004.11)

12) 日本薬学会第 125 年会 「遺伝子組換えトウモロコシスタック品種の検知法の開発について」 若林薫、穠山浩、渡邊敬浩、菊地博之、坂田こずえ、中出晋介、安井修二、千葉良子、日野明寛、米谷民雄 (2005.3)

13) 日本農芸化学会 2005 年度大会 「加工食品における GM 作物定量法の開発の試み」 菊地博之、渡邊敬浩、時下祥子、荒川史博、小笠原健、峯岸恭孝、栗原秀夫、児玉貴志、古井聡、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.3)

Primer pairs

•Lectin 遺伝子定量系

Le1n02-5' -3' *及びLe1-Taq
(amplicon: 118 bp)

Le1n03-5' -3' **及びLe1-Taq
(amplicon: 89 bp)

•RRS特異的DNA配列定量系

RRS01-5' -3' *及びRRS-Taq
(amplicon: 121 bp)

RRS02-5' -3'及びRRS-Taq
(amplicon: 83 bp)

•HMG 遺伝子定量系

HMG01-5' -3' 及びHMG-Taq
(amplicon: 110 bp)

HMG02-5' -3' 及びHMG-Taq
(amplicon: 84 bp) *HMG-TaqはVICラベル

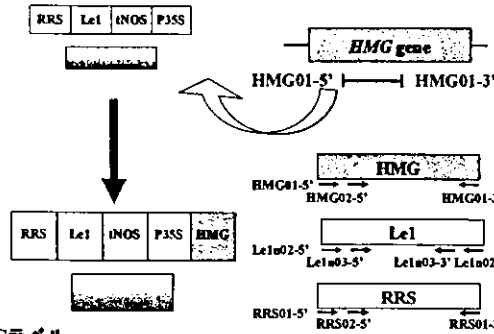


Fig. 1 ダイズ加工食品定量系 (プライマー対ならびにプローブ、および標準物質)

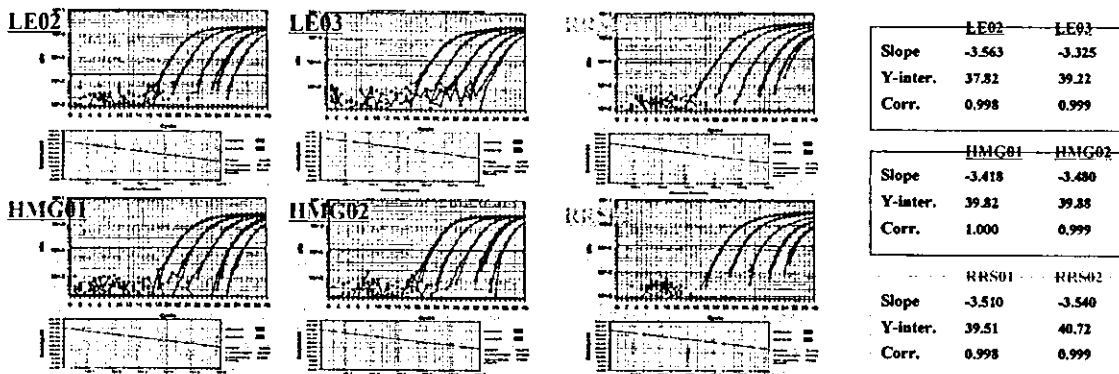


Fig. 2 遺伝子組換えダイズを対象とする各定量系の確認試験

Conversion factors (Cf) for RRS

*Copy numbers for a taxon specific gene
**Copy numbers for a target gene
N=6, one time measurement

		Combinations of the detection system for an endogenous and a target gene			
		RRS01/HMG01	RRS02/HMG01	RRS01/HMG02	RRS02/HMG02
Maxi	CNTSG* (RSD)	31254.91 (20.48)	33247.16 (17.34)	32464.12 (15.55)	32524.56 (15.79)
	CNTG** (RSD)	33798.49(19.27)	35442.96 (18.96)	32651.42 (18.17)	35473.59 (18.62)
	Cf (RSD)	1.08 (2.87)	1.06 (7.42)	1.00 (3.83)	1.09 (9.12)
G-tip	CNTSG* (RSD)	47165.22 (8.04)	48095.46 (6.23)	50287.87 (8.05)	48706.86 (8.08)
	CNTG** (RSD)	50652.47 (2.04)	51203.23 (4.16)	49444.63 (5.02)	47448.61 (2.26)
	Cf (RSD)	1.08 (5.86)	1.07 (2.22)	0.98 (2.91)	0.98 (8.27)
		RRS01/Le1n02	RRS02/Le1n02	RRS01/Le1n03	RRS02/Le1n03
Maxi	CNTSG* (RSD)	28611.68 (24.19)	31819.22 (16.36)	32369.42 (17.98)	32541.78 (19.82)
	CNTG** (RSD)	36100.49(19.58)	35120.99 (17.07)	36462.11 (21.70)	36480.48 (25.72)
	Cf (RSD)	1.28 (11.36)	1.10 (5.31)	1.13 (12.34)	1.12 (15.49)
G-tip	CNTSG* (RSD)	49171.73 (13.69)	48361.09 (8.42)	52159.01 (11.33)	48874.08 (12.12)
	CNTG** (RSD)	58111.30 (10.34)	53935.84 (9.92)	50788.36 (3.45)	54389.46 (5.04)
	Cf (RSD)	1.19 (4.47)	1.11 (1.47)	0.98 (7.88)	1.12 (8.67)

Table 1 各定量系およびDNA抽出法別 RRS 内標比

True value	Combinations of the detection system				
	RRS01/HMG01	RRS02/HMG01	RRS01/HMG02*RRS02/HMG02		
Mean	1.02	1.13*	1.07	0.99	
Bias	1.58	13.22	7.41	-0.91	
RSD	5.81	5.81	3.32	10.74	
1.0%	Combinations of the detection system				
	RRS01/LeIn02	RRS02/LeIn02	RRS01/LeIn03	RRS02/LeIn03	
	Mean	0.96*	1.01	1.04	1.08
	Bias	-4.32	0.62	4.37	8.45
RSD	2.39	17.53	9.63	12.69	

n=5 *p<0.05

Table 2 1%疑似混入試料の定量値(DNA抽出法：DNeasy Plant Maxi kit 法)

True value	Combinations of the detection system				
	RRS01/HMG01	RRS02/HMG01	RRS01/HMG02*RRS02/HMG02		
Mean	4.97*	5.80	6.03	5.46	
Bias	-0.59	16.04	11.98	17.00	
RSD	8.17	12.37	9.29	9.29	
5.0%	Combinations of the detection system				
	RRS01/LeIn02	RRS02/LeIn02	RRS01/LeIn03	RRS02/LeIn03	
	Mean	5.05	5.38	5.73*	6.02*
	Bias	0.97	7.53	14.63	20.49
RSD	5.53	13.86	6.93	3.60	

n=5 *p<0.05

Table 3 5%疑似混入試料の定量値(DNA抽出法：DNeasy Plant Maxi kit 法)

True value	Combinations of the detection system				
	RRS01/HMG01	RRS02/HMG01	RRS01/HMG02*RRS02/HMG02		
Mean	0.93	0.93	1.05	0.98	
Bias	-7.31	-7.24	5.39	-1.60	
RSD	5.21	14.16	9.59	16.76	
1.0%	Combinations of the detection system				
	RRS01/LeIn02	RRS02/LeIn02	RRS01/LeIn03	RRS02/LeIn03	
	Mean	1.17	1.03	1.05	1.08
	Bias	17.17	3.08	5.45	8.23
RSD	4.87	18.37	4.57	11.19	

n=3

Table 4 1%疑似混入試料の定量値(DNA抽出法：Genomic tip 20/G 法)

True value	Combinations of the detection system			
	RRS01/IMG01	RRS02/IMG01	RRS01/IMG02*RRS02/IMG02	
Mean	4.67	4.88	5.83	5.24
Bias	-6.98	-2.42	16.67	4.83
RSD	6.89	6.29	6.47	9.05
5.0%	RRS01/Le1n02	RRS02/Le1n02	RRS01/Le1n03	RRS02/Le1n03
Mean	5.67	5.48	5.83	5.97
Bias	13.34	9.69	16.75	19.38
RSD	1.64	6.80	3.72	6.57

n=3

Table 5 5%疑似混入試料の定量値(DNA抽出法: Genomic tip 20/G法)

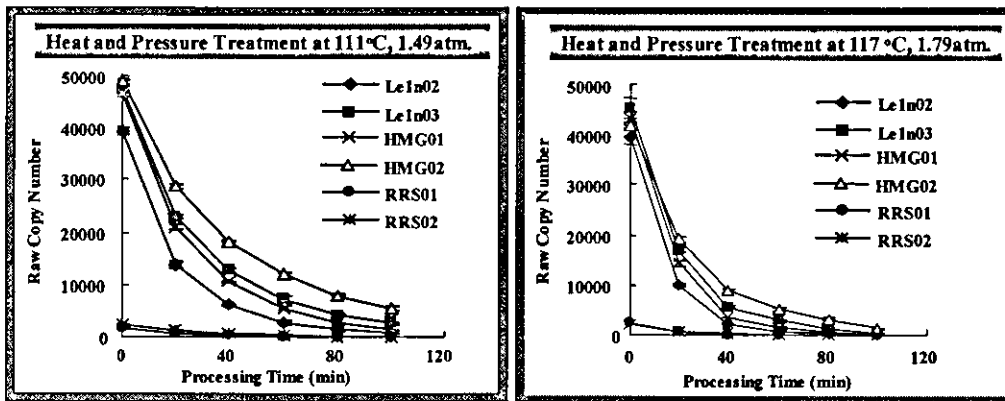


Fig. 3 加工処理時間依存的な対象コピー数の減少

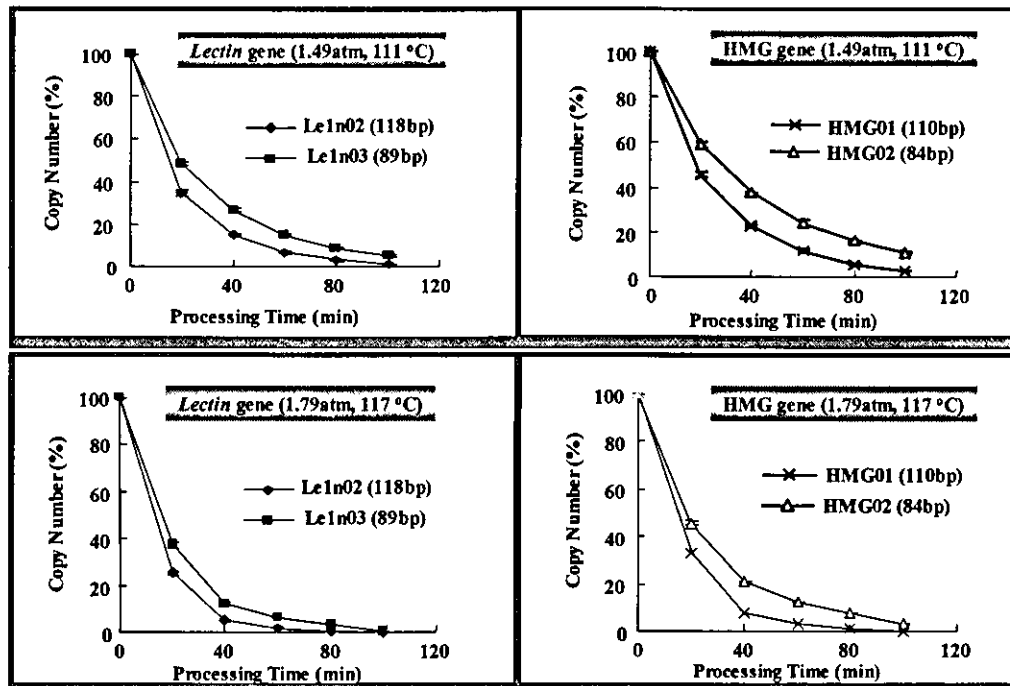


Fig. 4 PCR増幅産物長を基準とした測定コピー数の比較

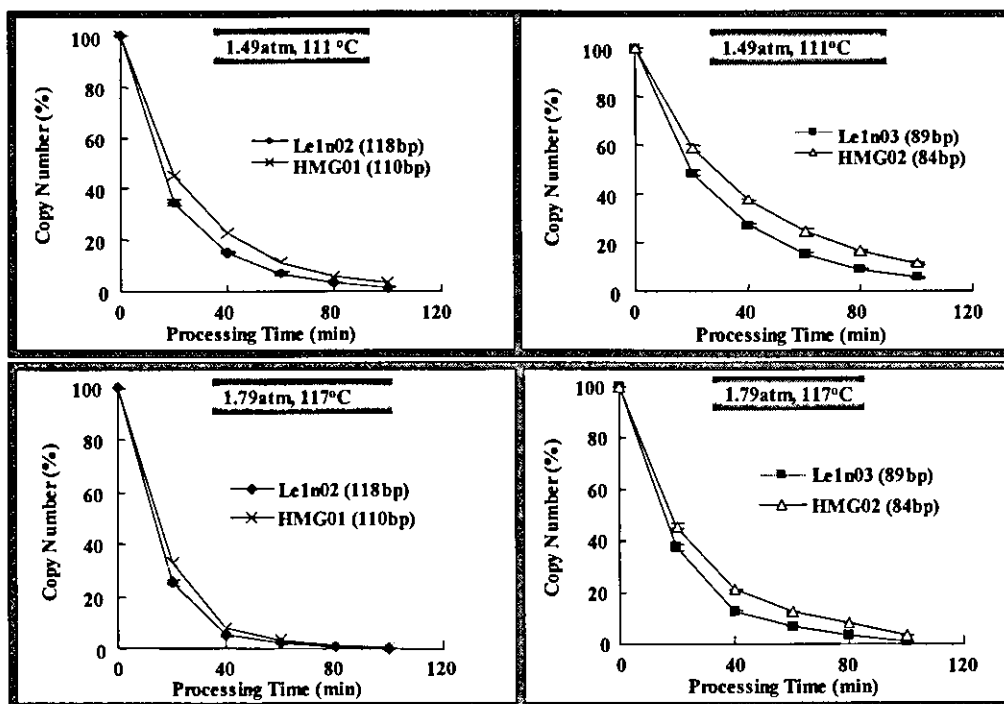


Fig. 5 標的とする遺伝子の種類を基準とした測定コピー数の比較

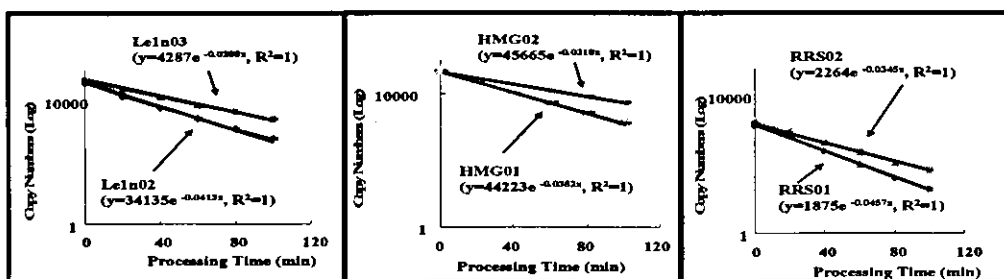


Fig. 6 各定量系により測定されたコピー数変動の数式化

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] \longrightarrow \ln[A] = \ln[A]_0 - kt \longrightarrow [A] = [A]_0 e^{-kt}$$

Fig. 7 反応速度式 (一次反応)

Sample	Le1n02	Le1n03	HMG01	HMG02	RRS01	RRS02
1%RRS	-0.0411	-0.0288	-0.0333	-0.0213	-0.0432	-0.0326
5%RRS	-0.0413	-0.0288	-0.0352	-0.0218	-0.0457	-0.0345

Table 6 各定量系から求められた一次反応式の傾き(コピー数の減少率) 1+0.49atm 111°C

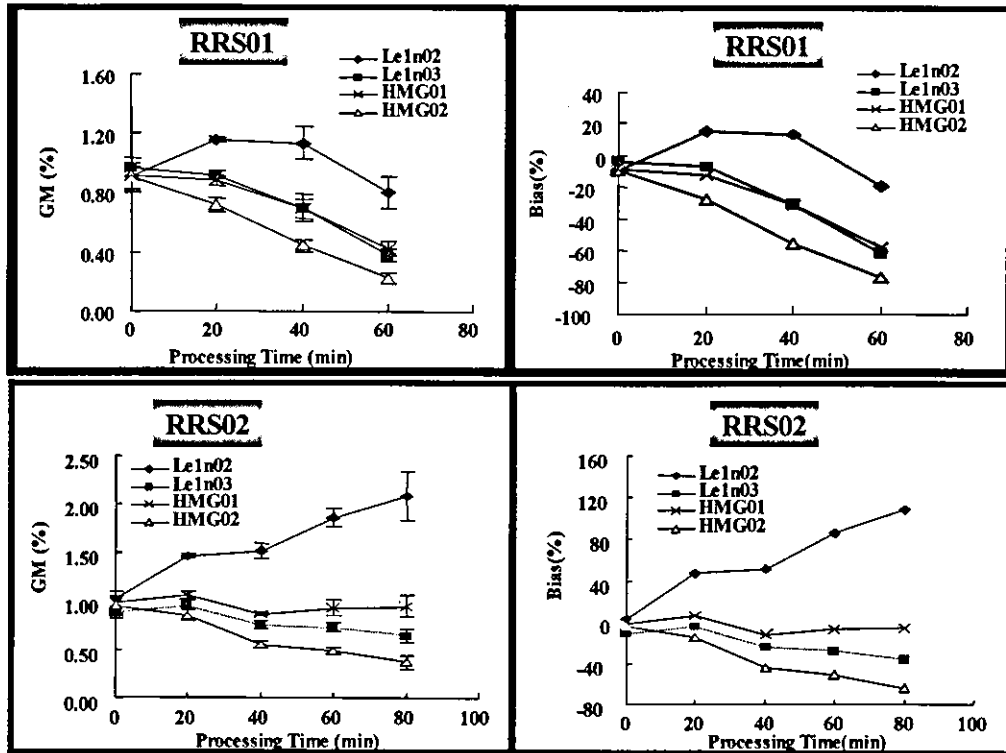


Fig. 8 加工処理による RRS 混入率の変動 1 (1%RRS 試料、1+0.49atm 111°C)

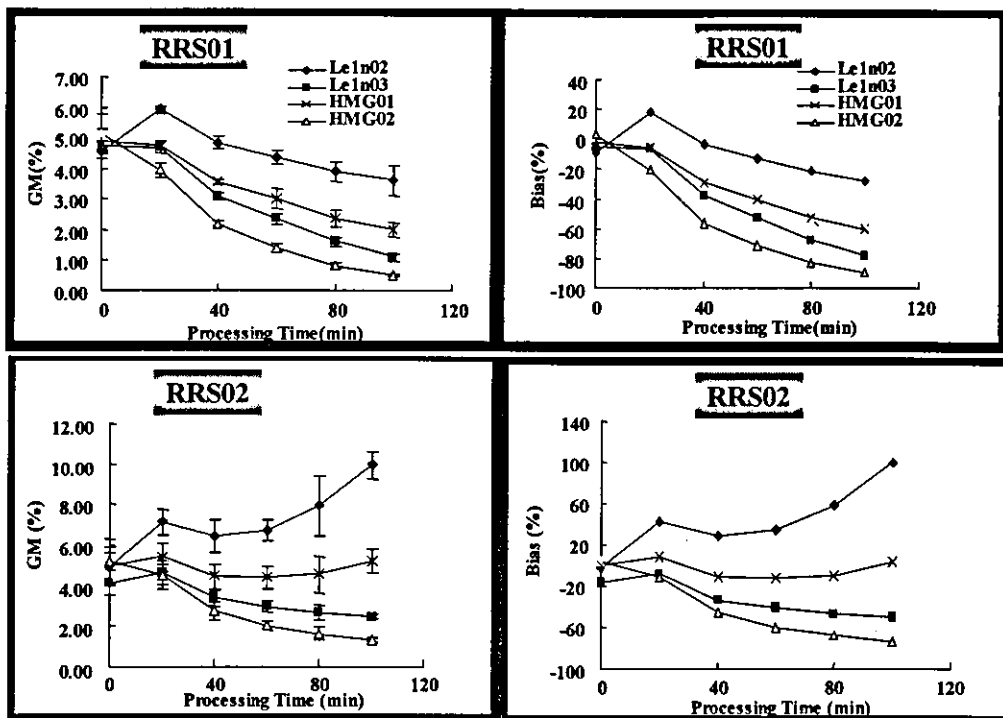


Fig. 9 加工処理による RRS 混入率の変動 2 (5%RRS 試料、1+0.49atm 111°C)

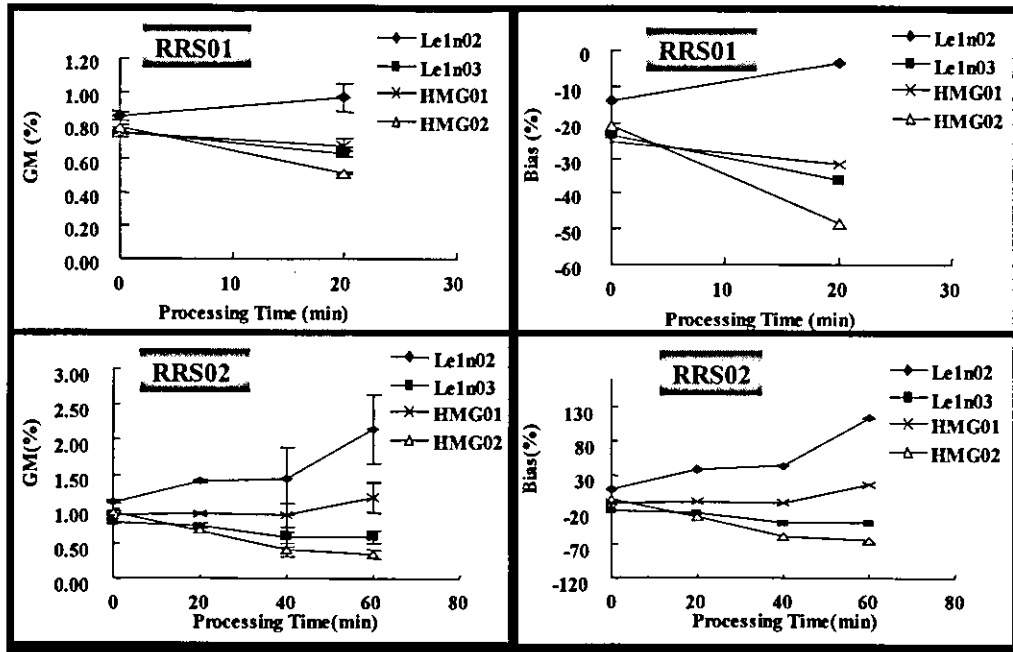


Fig. 10 加工処理による RRS 混入率の変動 3 (1%RRS 試料、1+0.79atm 111 °C)

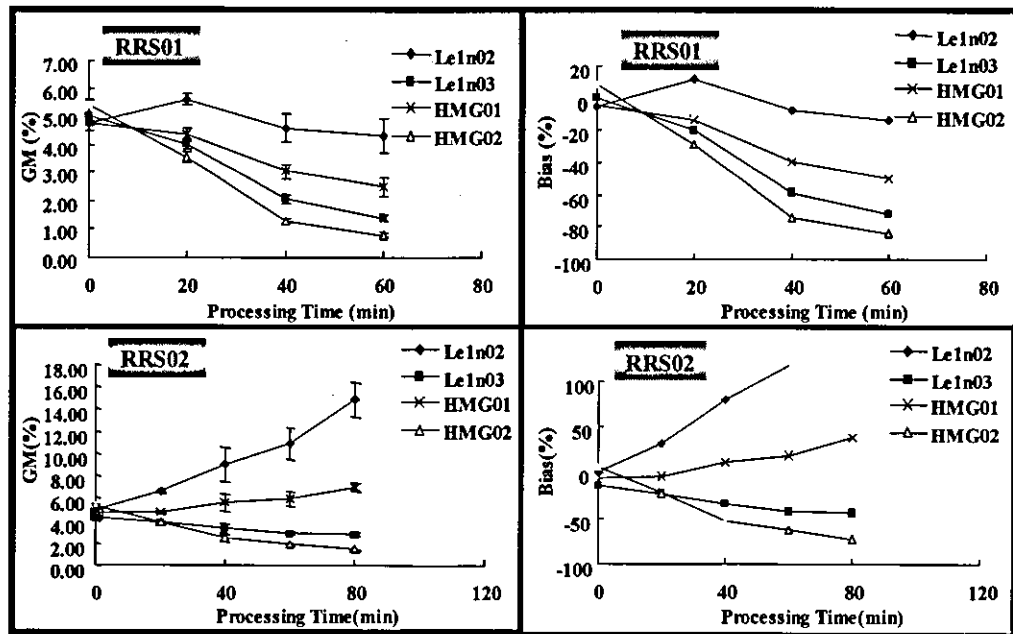


Fig. 11 加工処理による RRS 混入率の変動 4 (5%RRS 試料、1+0.79atm 111 °C)

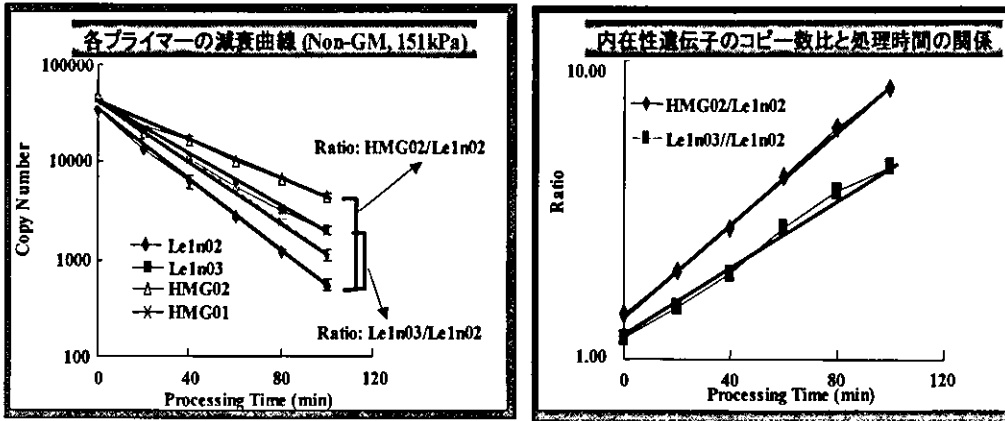


Fig. 12 加工処理による2種類の内在性遺伝子のコピー数比の変動

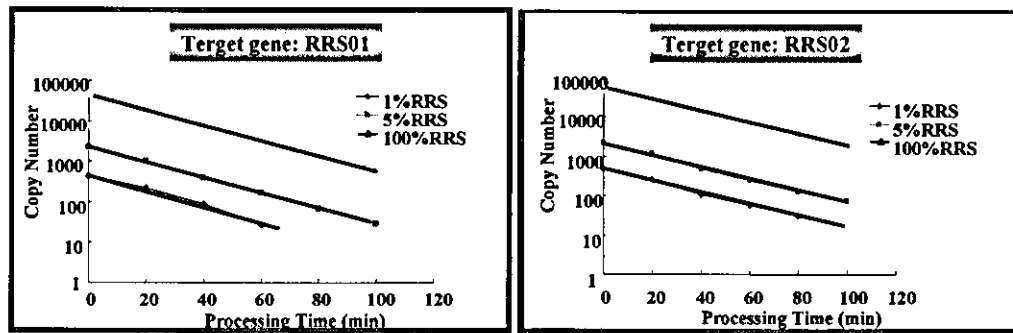


Fig. 13 各混入率の疑似混入試料におけるRRS特異的配列のコピー数変動

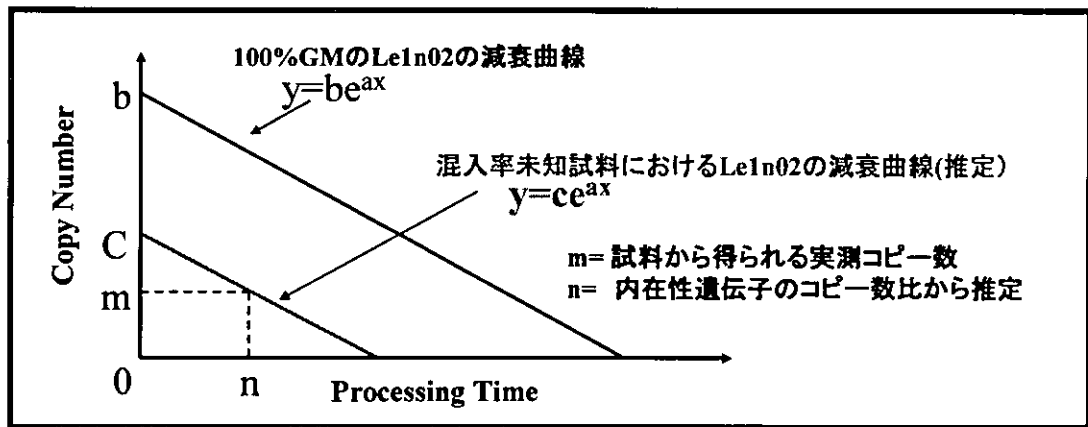


Fig. 14 算術式を用いた加工食品における遺伝子組換えダイズ混入率算出のモデル

Treatment	True value	Processing Time (min)	Detection System (Endogenous gene/ Target gene)			
			Le1n02/RRS01	Le1n03/RRS01	HMG01/RRS01	HMG02/RRS01
			Mean	Mean	Mean	Mean
1.49 atm 111°C	1%	40	2.28	0.78	0.96	1.06
	5%	40	10.76	2.61	3.86	5.62
1.79 atm 117°C	1%	40	2.70	0.77	0.87	1.26
	5%	40	15.83	2.62	5.54	6.14

Treatment	True value	Processing Time (min)	Detection System (Endogenous gene/ Target gene)			
			Le1n02/RRS02	Le1n03/RRS02	HMG01/RRS02	HMG02/RRS02
			Mean	Mean	Mean	Mean
1.49 atm 111°C	1%	40	1.90	0.53	0.75	0.83
	5%	40	11.34	2.24	3.79	5.52
1.79 atm 117°C	1%	40	1.73	0.49	0.67	0.89
	5%	40	10.86	1.78	3.90	4.77

Table 7 加工食品における遺伝子組換えダイズ混入率の算術的解析結果

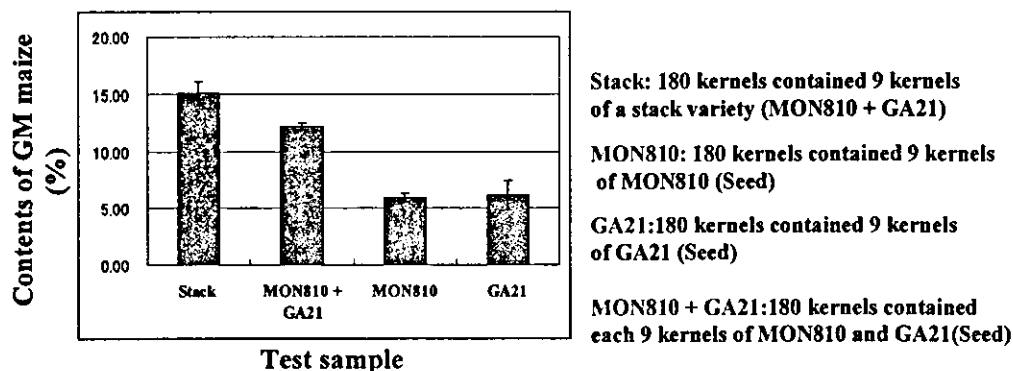


Fig. 15 スタック品種混入による定量値への影響

	non-GM		MON810		GA21	
	Ave.	RSD	Ave.	RSD	Ave.	RSD
DNA conc.	122.96	15.12	125.01	8.75	104.52	10.51
260/280 nm	1.77	1.18	1.75	0.59	1.77	1.06
260/230 nm	1.94	5.94	1.86	3.65	1.89	3.89

Stack		All	
Ave.	RSD	Ave.	RSD
115.66	12.34	117.04	13.57
1.75	0.57	1.76	0.99
1.90	2.84	1.90	4.39

Table 8 各種遺伝子組換えトウモロコシからの DNA 収量ならびにその質

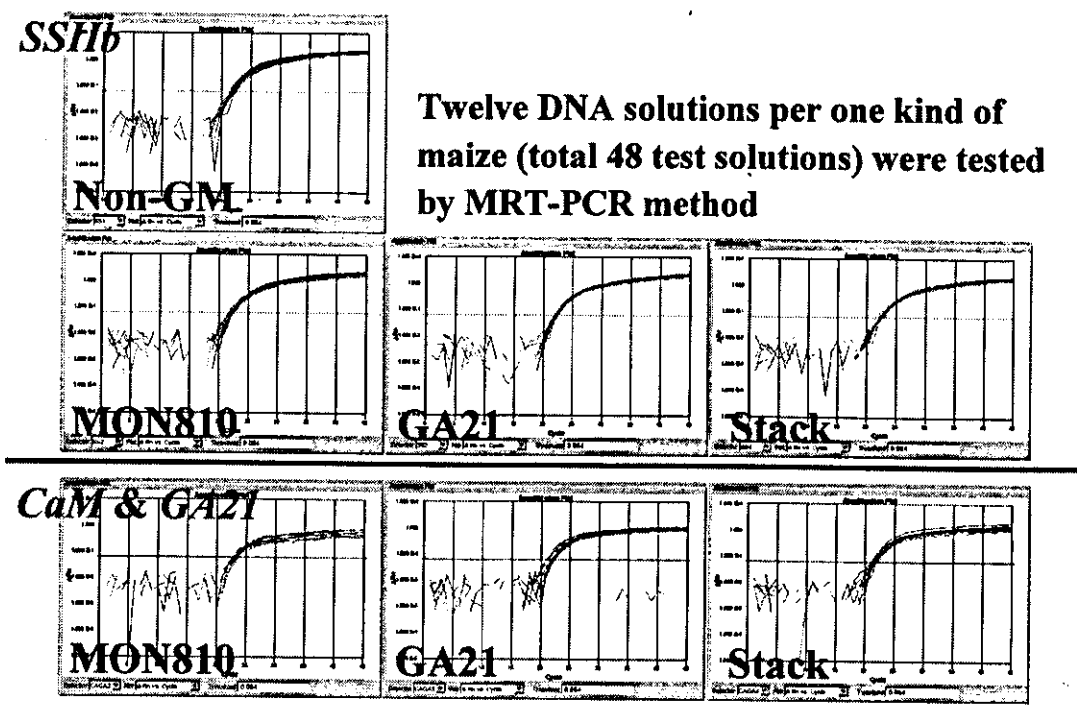


Fig. 16 Multiplex real-time PCR 法の検討

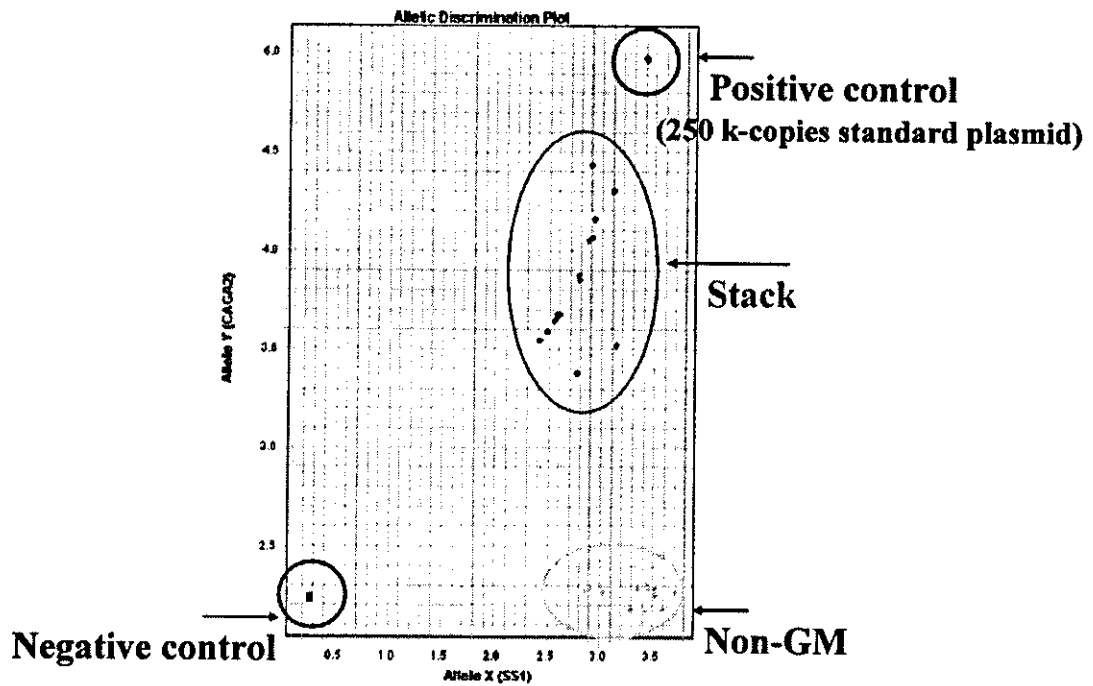


Fig. 17 遺伝子組換えトウモロコシ・スクリーニング法への end point 解析の応用

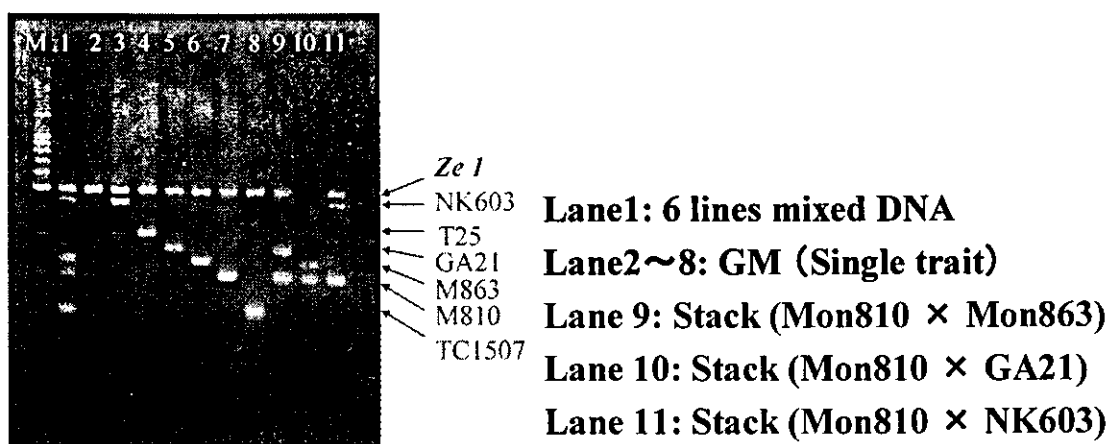


Fig. 18 multiplex 定性 PCR 法を用いた遺伝子組換えトウモロコシ 6 系統同時同定法

	検体	スクリーニング陽性粒数	同定 (multiplex qualitative PCR)	混入率 (180粒中)
IP	YC16-8-1	0		0%
	YC16-8-2	0		
	sample1-1	2	Mon810 2粒	1.67%
	sample1-2	1	未	
	sample5-1	1	Mon810 (1粒)	0.56%
	sample5-2	0		
	sample14-1	2	T25 (2粒)	1.67%
	sample14-2	0		
不分別	611-1	44	未	39.44%
	611-2	27	未	
	612-1	39	未	37.78%
	612-2	29	未	
	618-1	57	Mon810 × GA21 - TC1507 - NK603 - GA21(各1粒)、Mon810(41粒)	62.22%
	618-2	55	未	
	619-1	53	未	56.67%
	619-2	49	未	

未: 検査未終了

Table 9 トウモロコシ 1 粒毎検査法の実用例

RRS								
混入率	0.1%				0.5%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	0.108	7.81	17.78	-	0.544	8.84	21.46	-
7900-96	0.107	7.13	17.55	-	0.488	-2.46	21.39	-
7900-384	0.110	9.84	30.89	-	0.494	-1.29	27.37	-
7000	0.126	26.48	23.89	-	0.656	31.10	25.81	-
5700	0.121	21.26	19.30	-	0.507	1.49	13.07	-
混入率	5%				10%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	5.61	12.24	9.07	-	11.314	13.14	6.56	-
7900-96	5.27	5.48	12.45	-	9.983	-0.17	7.86	**
7900-384	5.63	12.51	6.70	-	10.946	9.46	8.43	-
7000	5.98	19.51	26.88	-	11.429	14.29	22.91	-
5700	4.40	-12.05	7.11	**	11.878	14.29	6.85	-

Table 10 定量値同等性試験の結果 (RRS) * P<0.05, ** P<0.01

Bt11								
混入率	0.1%				0.5%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	0.097	-0.03	19.39	-	0.531	6.23	7.49	-
7900-96	0.069	-30.81	37.80	*	0.542	8.42	15.38	-
7900-384	0.056	-44.16	34.35	**	0.477	-4.57	15.73	-
7000	0.082	-18.04	47.31	-	0.689	37.85	17.72	**
5700	0.095	-5.49	39.35	-	0.536	7.26	29.57	-
混入率	5%				10%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	6.04	20.82	1.44	-	12.940	29.40	3.84	-
7900-96	7.07	41.40	11.07	**	13.685	36.85	6.61	-
7900-384	6.13	22.56	8.41	-	12.446	24.46	10.92	-
7000	8.06	61.23	29.76	*	14.192	41.92	28.07	-
5700	5.37	7.49	19.26	-	11.991	19.91	9.63	-

Table 11 定量値同等性試験の結果 (Bt11) * P<0.05, ** P<0.01

GA21								
混入率	0.1%				0.5%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	0.076	-24.06	27.33	-	0.436	-12.83	14.32	-
7900-96	0.059	-41.17	28.94	-	0.416	-16.76	10.58	-
7900-384	0.057	-43.44	21.50	-	0.417	-16.55	8.01	-
7000	0.046	-53.77	57.55	*	0.379	-24.21	25.87	-
5700	0.063	-37.50	46.91	-	0.460	-8.06	23.40	-
混入率	5%				10%			
	mean	bias	RSD	有意差	mean	bias	RSD	有意差
7700	4.56	-8.82	8.02	-	8.620	-13.80	7.09	-
7900-96	4.85	-3.02	7.12	-	9.201	-7.99	7.46	-
7900-384	4.72	-5.65	5.82	-	9.248	-7.52	3.17	*
7000	4.70	-5.96	26.10	-	14.192	41.92	28.07	-
5700	4.69	-6.26	14.90	-	8.510	-14.90	17.75	-

Table 12 定量値同等性試験の結果 (GA21) * P<0.05, ** P<0.01