

測定された内標比は妥当であり、本検討において決定された測定条件を適用することにより、LightCycler system を用いた RRS の定量分析が可能になるものと考えられた。

4. ABI PRISM 7500 を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とした定量分析法の開発

1)内標比測定試験

現行公定分析法に記載された遺伝子組換えトウモロコシを対象としたスクリーニング分析法においては、導入されている組換えDNA配列の特性に基づき、CaM定量系及びGA21系統特異的定量系を併用することが規定されている。さらに、CaM混入率の算出に使用する内標比には、遺伝子組換えトウモロコシの意図しない混入を最大に評価する目的から、CaM配列の導入数が最小であるMON810系統から得られた内標比の使用が指示されている。本研究においては、遺伝子組換えトウモロコシを対象としたスクリーニング分析を可能にするためのCaM内標比(MON810系統)及びGA21内標比、また、ダイズ定量分析を可能にするためのRRS内標比をそれぞれ3機関参加の共同試験によって計測した。

各機関では、1測定あたり1試料を分析し、これを3回繰り返すことと規定した。その結果、繰り返し3回の測定で得られた各機関別内標比の室内再現性は、いずれの試料と定量系を組み合わせ用いた場合にも、相対標準偏差(RSD)が約5%以下と良好であった(Table 6~8)。さらに、3回の繰り返し測定により得られた3データの平均値を機関報告値として集計し、その中央値として規定した内標比は、以下のとおりとなった。CaM内標比；0.46、GA21内標比；2.13、RRS内標比；1.02。

2)混入率測定試験

得られた内標比の妥当性を検証するため、トウモロコシ2種、ダイズ2種の計4種の擬似混合粉碎試料(Maize-Low並びにHigh、Soy-

Low並びにHigh)を調製し、分析を行った。各擬似混合粉碎試料からDNAを抽出し、濃度を調製した後に定量PCRを行い、得られた測定値及び内標比を用いて混入率を算出した結果、算出された混入率のRSDrはすべての試料を通して2.55~13.90%であり、良好な室内再現性が確認された(Table 9~11)。またABI PRISM 7700を用いて得られた分析結果に基づき、不確かさを加味して規定した認証値(Table 12)と比較した結果、Maize-Lowを対象に7500を用いて得られた混入率は、認証値とは異なる値であった。また、ABI PRISM 7700を用いて得られた混入率の平均値を真値として比較した結果、バイアスはそれぞれ以下のとおりであった。Maize-LowにおけるCaM混入率；+18.22%、GA21混入率；+24.71%、Maize-HighにおけるCaM混入率；+6.31%、GA21混入率；+11.20%、Soy-LowにおけるRRS混入率；-7.99%、Soy-HighにおけるRRS混入率；-8.91。認証値との比較において差が認められる結果が得られたものの、バイアスとして考えた場合には他の定量PCR法によって得られる結果とも大きな差異は認められず、また良好な室内再現性が確認されたことから、本研究において開発された定量PCR法の妥当性が確認されたと判断した。

5. 新たに安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ(3系統)を対象とした定量分析法の開発とT25系統を対象とした定量分析法の改良

1)MON863、NK603、TC1507、T25 系統特異的定量系の特異性検証

Fig.16 に示したとおり、MON863、NK603、T25 系統については組換え DNA 配列とトウモロコシゲノム DNA 配列との境界領域、TC1507 系統については、発現タンパク質である Cry 1Fa2 をコードする DNA 配列とその制御配列との境界領域をそれぞれの PCR における標的領域と定め、定量系を開発した。開発した定量系の特異性を確認するた

め、各定量系に含まれるプライマー対の特異性について定性 PCR 法により確認した。その結果、対象とする遺伝子組換えトウモロコシ系統からのみ予定断片長の PCR 産物が得られた(Fig.17)。定量系の特異性は一義的にプライマー対の特異性により決定されるため、これらの結果により開発した定量系の特異性が確認されたと判断した。

2)内標比測定試験

MON863、NK603、TC1507、及びT25系統を対象として新たに開発された定量PCR法を用い、各定量PCR機器(ABI PRISM 7700、7900及び、7500)を用いた場合に得られる内標比について検討した。各参加機関から報告された測定結果をコ克蘭-グラフスの棄却検定により解析した後に決定された内標比について、定量PCR機器別に示す(Table 13)。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PCR機器において一定の値となる。また、本研究において開発された定量系により得られる内標比の理論値はすべて0.5である。しかし、Table 13に示したとおり、実測された内標比の一部は理論的内標比とは明らかに異なっており、また定量PCR機器間でも変動が認められる。これらの結果は、定量系の特性及び、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。

3)混入率測定試験

各定量PCR機器に固有の値として内標比を決定した後、各内標比の妥当性を検証するために擬似混入率測定試験を実施した。国内外をあわせてABI PRISM 7700については16機関、7900については15機関、7500については3機関が参加した。解析に当たり、混入率の算出に使用する内標比は各定量PCR機器に固有の値を用いたものの、算出された混入率の集計及び統計解析は、PCR機器の種類を問わず、対象遺伝子組換えトウモロコシ系統ごとに行った(Table 14~17)。そ

の結果、擬似混入試料における各遺伝子組換えトウモロコシ系統の重量混合比を真値とした場合、NK603系統以外の系統について得られた混入率のバイアスは、+7.2~48.5%(最大はMON863系統の0.25%混入試料から得られた結果)と高めの傾向を示した。また、すべての試料と定量系の組み合わせを通して、室間再現性(RSD_R)の最大値はT25系統の0.25%混入試料で観察された25.7%であり、ISOの規格として示されている25%以下の基準を概ね満たした。さらに、測定値が検量線の最下点を下回ることを基準に定量下限値を判断した場合、すべての定量PCR法における定量下限値は0.25%であると考えられた。先述のとおり、各遺伝子組換えトウモロコシ系統の重量混合比を真値とした場合、測定の結果得られた混入率のバイアスが高めの傾向を示す場合があるものの、室間再現性が良好であったことから、本研究において開発された定量PCR法の妥当性が確認されたと判断した。

6. シリカベースレジソタイプキットを用いたダイズからのDNA抽出法の改良

1)Proteinase K添加量がDNA収量に与える影響

食安発第0517001号記載のシリカベースレジソタイプキット法(通知レジソ法)においては、20 mg/mL Proteinase Kを800 µL (Proteinase K量として16 mg)添加することが規定されている。この添加量は、キット付属のマニュアルに記載された方法を基本とし、初期試料量及び、DNA抽出緩衝液量の変更にあわせて規定されたものと思われる。しかし、通常のDNA抽出に使用するProteinase K量としては多量であり、本方法を使用する試験者にとっての大きな経済的負担となっている。そこで最小量のProteinase K添加量について明らかにするため、Proteinase Kの添加量を0、50、100、200 µL と変動させ、DNAの収量に与える影響について検討した。その結果、100及び200

μLの20 mg/mL Proteinase Kを添加した場合にも、通知レジソ法と比較して遜色のない収量のDNAを抽出することが可能であった(Fig.19)。これらの結果に基づき、Proteinase Kの添加量を減少させることで、より安価にDNAを抽出できるものと思われる。

2)抽出操作時間がDNA収量に与える影響

通知レジソ法においては、DNA抽出緩衝液を添加した後、規定温度条件下で3時間加温することが規定されている。本研究においてはシリカベースレジソタイプキットを用いてDNAを抽出する際の作業効率の向上を目的とし、抽出操作時間の短縮について検討を行った。その結果、抽出操作時の加温時間を15分間～3時間まで変動させた場合、30分間及び1時間の加温処理によって得られるDNA収量は、3時間の加温処理によって得られるDNA収量と同程度であることが明らかとなった(Fig.20)。これらの結果から、DNA抽出操作時の加温時間を短縮することにより、作業効率を向上させることが可能であると考えられた。

3)カラムからのDNA溶出に要するTE緩衝液の最適化

シリカベースレジソに吸着したDNAは、カラムに詰められた後、最終的にTE緩衝液中に溶出される。このDNA溶出操作において、TE緩衝液の量及び、その負荷回数が不適切であるとその後に行う吸光度測定が困難になり、またDNA抽出効率の低下を招くおそれがある。そこで、DNA溶出に要するTE緩衝液量について検討した。その結果、1回あたり50 μLのTE緩衝液を負荷し溶出する操作を2回繰り返すことによって、DNAのカラムからの溶出効率は最大であり、また、吸光度測定を問題なく実施可能な濃度のDNA試料液を調製可能であることが明らかになった(Fig.21)。

4)グアニジン化合物によるPCRの効率及び特異性への影響

通知レジソ法において使用するDNA抽出

緩衝液中には、グアニジン塩酸が含まれる。また、キットに付属しているシリカベースレジソ担体の懸濁液中には、グアニジンイソチオシアネートが含まれている。これらグアニジン化合物はO.D. 230 nm付近に吸光を有する物質であるため、これらが最終的に得られるDNA試料液に多量に残存した場合、抽出DNAの質を評価するための指標の一つであるO.D. 260/230 nm比の大幅な低下や、DNA質量の算出に使用するO.D. 260 nm値の不正確な測定につながるおそれがある。実際に、通知レジソ法を用いて得られるDNA試料液の吸光値を測定すると、他のDNA抽出法を用いて得られるDNA試料液においては観察されないほどの高値でO.D. 230 nmの吸光値が計測されることから、試験法の特長としてグアニジン化合物がDNA試料液に残存し、これを防ぐことが難しいと考えられる⁵⁾。このため、通知レジソ法を用いて得られるDNA試料液については、一般的に示されている基準に従い、O.D. 260/230 nm比による質の評価をすることができないと考えられる。また、本DNA抽出法を用いて得られたDNA試料液は、定量PCR法における直接の分析試料として使用されるため、DNA試料液中に残存するグアニジン化合物が定量PCRの効率や特異性に影響を与えた場合には、定量PCR法の結果として得られる遺伝子組換え作物混入率が不正確になる可能性も考えられる。そこで、グアニジン化合物の定量PCRに与える影響について検討した。DNA試料液に含まれるグアニジン化合物の実際的な量について検討するため、試料を用いないブランク抽出により得られたブランク抽出液を試験液とし、これを定量PCR法に使用するキャリブプレートスタンダード(プラスミドDNA)に添加した上で定量PCRを実施し、得られた検量線について非添加処理区と比較した。その結果、添加処理区及び、非添加処理区から得られた検量線の傾きに明確な差は認め

られなかった(Fig.22)。この結果から、通知レジン法により得られるDNA試料液中に通常含まれる濃度のグアニジン化合物は、定量PCRの効率や特異性に影響を与えないことが示唆された。

シリカベースレジンタイプキットを用いたDNA抽出法については、今後も継続して検討を続けることにより、定量PCR法に供するための要件を満たしたDNA試料を、迅速、簡便かつ安価に調製可能な方法として改良することができるものとする。

D. 結論

1. 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした検知技術の開発

安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした定性PCR法を開発した。JSFR3及びBt11 3-5'-3'プライマー対を用いた定性PCR法について、共同試験により妥当性を確認した結果に基づき、食安発第0517001号として公定分析法がされた。さらに、継続的な検討の成果として、より高い特異性を有するBt10LSプライマー対を用いた定性PCR法を開発し、JSFR3プライマー対を用いる定性PCR法の変法と併せて検討を進めた。

2. 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした検知技術の検討

安全性未審査遺伝子組換えコメについて入手された情報に基づき、CryIAcタンパク質を標的タンパク質としたラテラルフロー法のコメへの適用を試みた。精製した組換えCryIAcタンパク質を用いた検討の結果、未精製及び精製コメのいずれと共存した場合においても、CryIAcタンパク質の検知が可能であることが明らかになった。

3. LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法の改良

LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法について改良を行った。分析試料となるDNAを抽出する方法、試薬の種類及びサーマルサイクラー条件を含む

PCR条件について検討した結果、繰り返し再現性良く遺伝子組換えダイズを定量可能な分析法が開発された。

4. ABI PRISM 7500を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とした定量分析法の開発

ABI PRISM 7500を用いて遺伝子組換えトウモロコシのスクリーニング分析及び、同ダイズの定量分析法を実施可能とするため、反応条件等について検討した。さらに、共同試験により内標比を測定し、得られた内標比を用いて擬似混入試料を分析することにより、その妥当性を検証した。その結果、繰り返し再現性良く定量分析が可能であることを明らかにした。

5. 新たに安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ(3系統)を対象とした定量分析法の開発とT25系統を対象とした定量分析法の改良

2001年以降に安全性審査を終了したMON863、NK603及び、TC1507系統に、T25系統を加えた計4系統の遺伝子組換えトウモロコシを対象とした定量PCR法について検討した。ABI PRISM 7700、7900及び、7500を定量PCR機器に用いた共同試験を実施し、内標比決定後、その妥当性を検証した。その結果、定量PCR機器の如何を問わず良好な再現性をもって分析が可能であることを明らかにした。

6. シリカベースレジンタイプキットを用いたダイズからのDNA抽出法の改良

公定分析法に記載されたシリカベースレジンタイプキット法について、より安価にかつ短時間でDNAを抽出することが可能となるよう改良を試みた。その結果、Proteinase K使用量及び、DNA抽出時間を大幅に削減できる可能性を示した。今後、定量PCR法による評価を検討することによって、シリカベースタイプキットを用いた迅速、簡便かつ安価なDNA抽出法が開発されるものと期待される。

E.参考文献

- 1) Nature 434, 423(2005)
- 2)厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について(一部改正)” 平成 17 年 5 月 17 日, 食安発第 0517001 号(2005)
- 3)渡邊敬浩, 笠間菊子, 菊地博之, 鈴木達也, 時下祥子, 坂田こずえ, 松木容彦, 日野明寛, 穠山浩, 米谷民雄: 遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験. 食品衛生学雑誌, 47 (1) in press (2006).
- 4)Kuribara, H., Shindo, Y., 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. 85, 1077-1089 (2002).
- 5)Kasama, K., Watanabe, T., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T., Laboratory-performance study of the Japanese official notified methods to detect genetically modified soybeans (Roundup Ready Soybean 40-3-2). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 46, 270-276 (2005).
- 6)独立行政法人 農林水産消費技術センター: JAS 分析試験ハンドブック “遺伝子組み換え食品検査・分析マニュアル 改訂第 2 版” (2002).
- 7)Horwitz, W. ed., “Official methods of analysis of AOAC International” 17th Ed. , Gaithersburg, MD, AOAC International, Appendix D, 2000, pp 2-11 (ISBN 0-935584-67-6).
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室長通知 “安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品に係わる輸入米の検査について”平成 17 年 4 月 21 日, 食安発第 0421002 号 (2005).

F.研究業績

論文

- 1) 菊地博之、渡邊敬浩、笠間菊子、和久井千世子、松木容彦、穠山浩、米谷民雄 (2005) 「遺伝子組換えパパイヤ(55-1)定性検査法を対象とした外部精度管理試験結果の解析」. 食品衛生学雑誌 46 (1) 21-27.
- 2)渡邊敬浩 (2005) 「未承認遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)の検知技術について」食品衛生学雑誌 46 (4) J223-J227.
- 3) 笠間菊子、渡邊敬浩、鈴木達也、菊地博之、時下祥子、坂田こずえ、松木容彦、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005) 「遺伝子組換えダイズ (ラウンドアップ・レディー・大豆 40-3-2 系統) の定量検査法の外部精度管理試験」 食品衛生学雑誌 46 (6) 270-276.
- 4) 渡邊敬浩、笠間菊子、菊地博之、鈴木達也、時下祥子、坂田こずえ、松木容彦、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2006) 「遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験」食品衛生学雑誌 (in press).
- 5) 渡邊敬浩、時下祥子、笠間菊子、鈴木達也、大島赴夫、菊地博之、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2006) 「遺伝子組換えトウモロコシ(GA21 ならびに MON810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験」食品化学学会誌 (in press).
- 6) Hiroshi Akiyama, Takahiro Watanabe, Kaoru Wakabayashi, Shinsuke Nakade, Shuji Yasui, Kozue Sakata, Ryoko Chiba, Frank Spiegelhalter, Akihiro Hino and Tamio Maitani (2005) Quantitative Detection System for Maize Sample Combined-Trait Genetically Modified Maize. Anal. Chem. 77 7421-7428.
- 7) Onihshi M., Matsuoka T., Kodama T., Kashiwaba K., Futo S., Akiyama H., Maitani T., Furui S., Oguchi T., Hino A. (2005) Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize. J. Agric. food chem. 53(25) 9713-9721.

8) Takeshi Ogasawara, Yukie Chikagawa, Fumihiro Arakawa, Asami Nozaki, Yoshio Itoh, Kazuo Sasaki, Hironori Umetsu, Takahiro Watanabe, Hiroshi Akiyama, Tamio Maitani, Masatake Toyoda, Hiroshi Kamada, Yukihiko Goda, and Yoshihiro Ozeki (2005) Frequency of Mutations of the Transgene, which might Result in the Loss of the Glyphosate-Tolerant Phenotype, was Lowered in Roundup Ready Soybeans. *J.Health.Sci.* 51(2) 197-201.

9) Akie Toyota, Hiroshi Akiyama, Mitunori Sugimura, Takahiro Watanabe, Hiroyuki Kikuchi, Hisayuki Kanamori, Akihiro Hino, Muneharu Esaka, Tamio Maitani. (2006) Quantification of genetically modified soybeans using a combination of a capillary-type real-time PCR system and a plasmid reference standard. *B.B.B.* (in press).

学会発表等

1) 日本食品化学学会第11回総会・学術大会 「遺伝子組換え食品検査におけるコンタミネーション予防策について-オートクレーブ処理条件の検討-」 渡邊敬浩、寺西清貴、武田明治、峯岸泰孝、古井聡、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.4)

2) 日本食品化学学会第11回総会・学術大会 「遺伝子組換えダイズの導入遺伝子の突然変異について」 小笠原健、荒川史博、佐々木和生、梅津博紀、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄、合田幸広、豊田正武、鎌田博、近川幸恵、野崎亜佐美、伊藤佳央、小関良宏 (2005.4)

3) 日本食品化学学会第11回総会・学術大会 「プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用2. 非遺伝子組換えダイズのプロファイリング」 佐々木和生、梅津博紀、山川隆、太田大策、小関良宏 (2005.4)

4) 第 18 バイオメディカル分析科学シンポジウム「加工食品における DNA の分解と遺伝子組換え食品定量分析法の開発につい

て」 渡邊敬浩、菊地博之、穠山浩、米谷民雄 (2005.8)

5) The 119th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting 「Comparative Studies of Five Real-Time PCR Equipments on Quantitative Methods for Genetically Modified Maize and Soy」 HIDEO KURIBARA, MASAKI KAKIHARA, TAKASHI KODAMA, TAKAHIRO WATANABE, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, SATOSHI FUTO, SATOSHI FURUI, AKIHIRO HINO (2005.9)

6) 第 90 回日本食品衛生学会学術講演会 「未承認遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)を対象とした検知技術の開発」 渡邊敬浩、時下祥子、菊地博之、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.10)

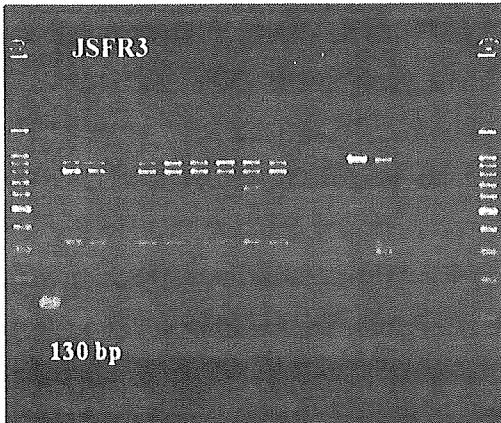
7) 第 90 回日本食品衛生学会学術講演会 「シリカベースレジソタイプキット法による遺伝子組換え大豆 DNA 抽出法に関する検討」 大森清美、土屋久世、平山クニ、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄 (2005.10)

8) 第 90 回日本食品衛生学会学術講演会 「遺伝子組換えトウモロコシ 4 系統 (MON863, NK603, TC1507 及び T25) の定量分析法のコラボレーションスタディー」 児玉貴志、栗原秀夫、松岡猛、青木信太郎、澤田千尋、布藤聡、峯岸泰孝、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄、古井聡、日野明寛 (2005.10)

9) 第 42 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、笠間菊子、鈴木達也、大島赴夫、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.11)

10) 日本農芸化学会 2006 年度大会 「遺伝子組換え穀物検査のための迅速な DNA 抽出キットの開発」 黒澤康紀、谷中有香、峯岸泰孝、栗原秀夫、穠山浩、米谷民雄、金山晋治、古井聡、日野明寛 (2006.3)

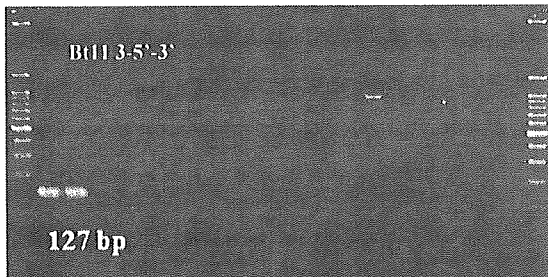
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M



M; 100 bp ladder marker, lane 1; Bt10, lane 2; Bt11, lane 3; GA21, lane 4; Event176, lane 5; Mon810, lane 6; T25, lane 7; NK603, lane 8; Mon863, lane 9; TC1507, lane 10; non GM maize, lane 11; RRS, lane 12; non GM soy, lane 13; オオムギ, lane 14; コムギ, lane 15; コメ, lane 16; no template control (NTC), lane 17; Bt10 (no primers)

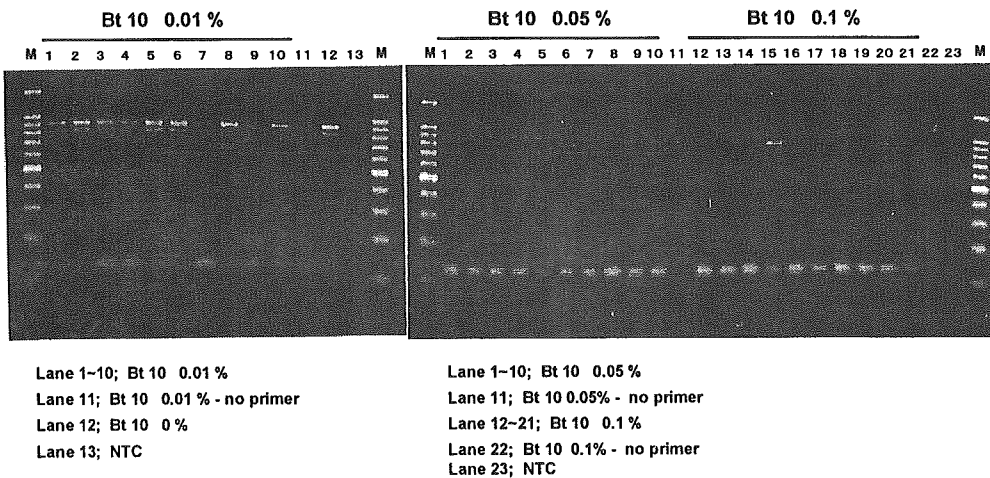
Fig. 1 Bt10 系統特異的プライマー対 (JSFR3)の特異性

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M



M; 100 bp ladder marker, lane 1; Bt10, lane 2; Bt11, lane 3; GA21, lane 4; Event176, lane 5; Mon810, lane 6; T25, lane 7; NK603, lane 8; Mon863, lane 9; TC1507, lane 10; non GM maize, lane 11; RRS, lane 12; non GM soy, lane 13; オオムギ, lane 14; コムギ, lane 15; コメ, lane 16; no template control (NTC), lane 17; Bt10 (no primers)

Fig. 2 Bt11 構造特異的プライマー対(Bt11 3-5'-3')の特異性



Lane 1-10; Bt 10 0.01 %
Lane 11; Bt 10 0.01 % - no primer
Lane 12; Bt 10 0 %
Lane 13; NTC

Lane 1-10; Bt 10 0.05 %
Lane 11; Bt 10 0.05 % - no primer
Lane 12-21; Bt 10 0.1 %
Lane 22; Bt 10 0.1 % - no primer
Lane 23; NTC

Fig. 3 Bt10 系統特異的プライマー対(JSFR3)の検知感度

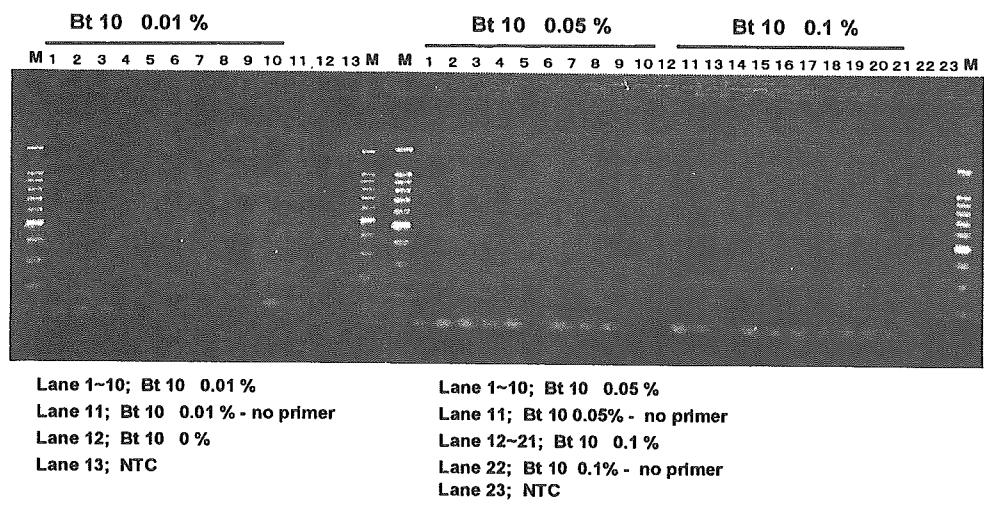


Fig. 4 Bt11 構造特異的プライマー対(Bt11 3-5'-3')の検知感度

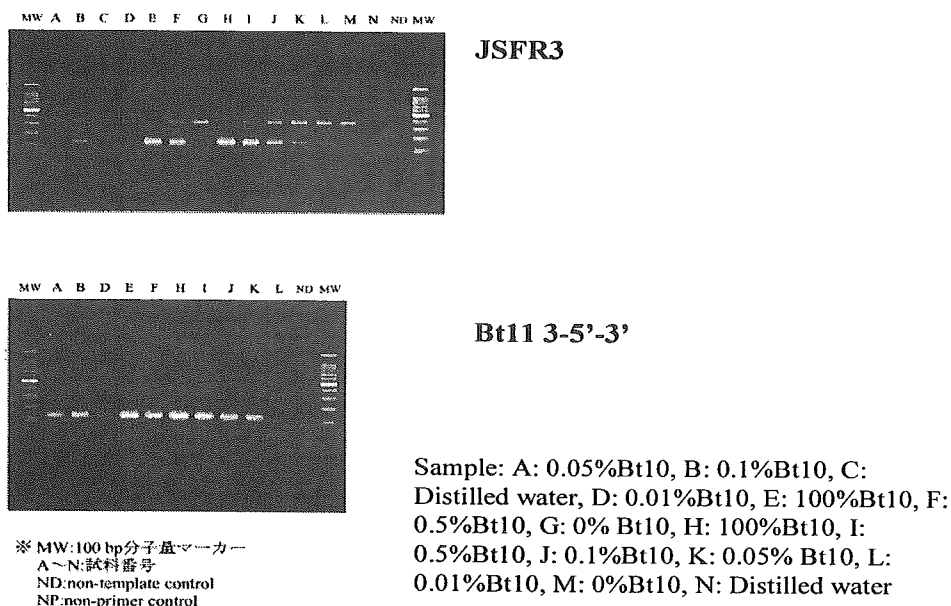


Fig. 5 共同試験結果の一例

サンプル	検査項目	機関番号1	機関番号2	機関番号3	機関番号4	機関番号5	機関番号6	陽性/検査数	%
DW	Zein	-	-	-	-	-	-	0 / 12	0
	Bt10	-	-	-	-	-	-	0 / 12	0
	コンストラクト特異的	/	/	/	/	/	/	-	-
0%	Zein	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	Bt10	-	-	-	-	-	-	0 / 12	0
	コンストラクト特異的	/	/	/	/	/	/	-	-
0.01%	Zein	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	Bt10	-	+	+	+	-	+	8 / 12	67
	コンストラクト特異的	/	-	+	+	/	+	5 / 8	63
0.05%	Zein	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	Bt10	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	コンストラクト特異的	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
0.10%	Zein	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	Bt10	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	コンストラクト特異的	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
0.50%	Zein	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	Bt10	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	コンストラクト特異的	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
100%	Zein	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	Bt10	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100
	コンストラクト特異的	+	+	+	+	+	+	12 / 12	100

Table 1 共同試験結果のまとめ

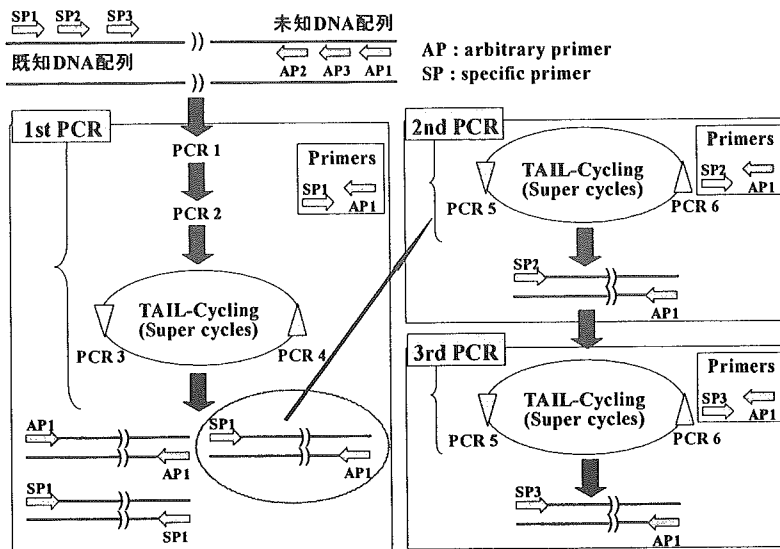


Fig. 6 TAIL PCR 法の原理

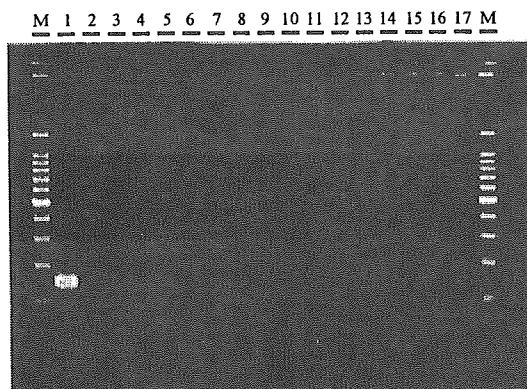


Fig. 7 Bt10 系統特異的プライマー対 (Bt10LS)の特異性

M; 100bp ladder marker, lane 1; Bt10, lane 2; Bt11, lane 3; GA21, lane 4; Event176, lane 5; Mon810, lane 6; T25, lane 7; NK603, lane 8; Mon863, lane 9; TC1507, lane 10; non GM maize, lane 11; RRS, lane 12; non GM soy, lane 13; オオムギ, lane 14; コムギ, lane 15; コメ, lane 16; non template control (NTC), lane 17; Bt10 (non primers)



M; 100bp ladder marker, lane 1-10; 0.05 % Bt10, lane 11; non GM maize, lane 12; non template control (NTC), lane 13; 0.05 % Bt10 (non primers)



M; 100bp ladder marker, lane 1-10; 0.01 % Bt10, lane 11; non GM maize, lane 12; non template control (NTC), lane 13; 0.01 % Bt10 (non primers)

Fig. 8 Bt10 系統特異的プライマー対(Bt10LS)の検知感度

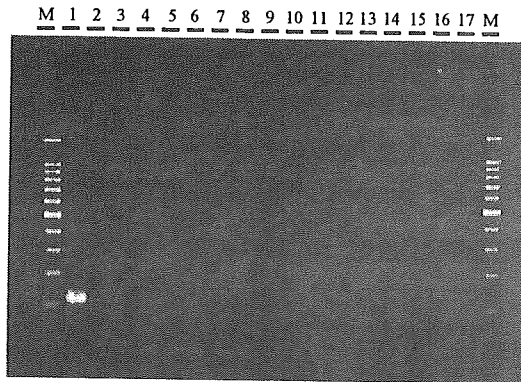
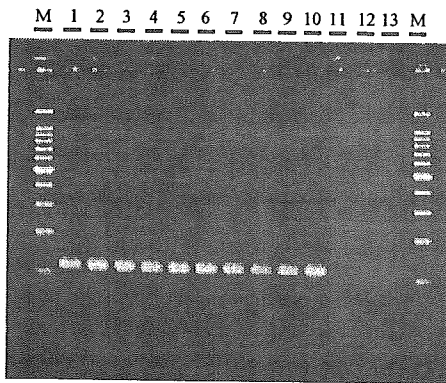


Fig. 9 Bt10 系統特異的プライマー対 (JSFR5)の特異性

M; 100bp ladder marker, lane 1; Bt10, lane 2; Bt11, lane 3; GA21, lane 4; Event176, lane 5; Mon810, lane 6; T25, lane 7; NK603, lane 8; Mon863, lane 9; TC1507, lane 10; non GM maize, lane 11; RRS, lane 12; non GM soy, lane 13; オオムギ, lane 14; コムギ, lane 15; コメ, lane 16; non template control (NTC), lane 17; Bt10 (non primers)

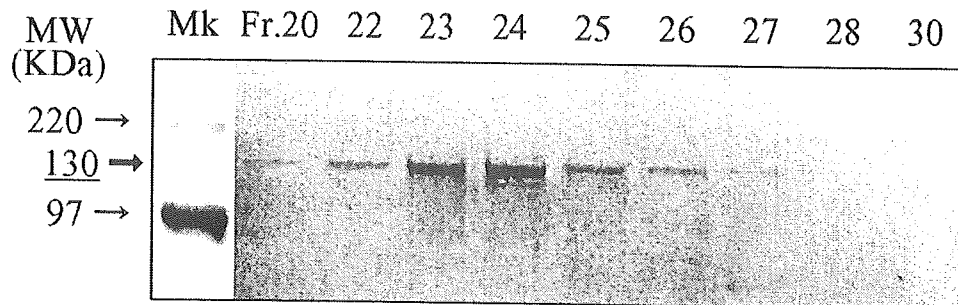


M; 100bp ladder marker, lane 1~10; 0.05 % Bt10, lane 11; non GM maize, lane 12; non template control (NTC), lane 13; 0.05 % Bt10 (non primers)



M; 100bp ladder marker, lane 1~10; 0.01 % Bt10, lane 11; non GM maize, lane 12; non template control (NTC), lane 13; 0.01 % Bt10 (non primers)

Fig. 10 Bt10 系統特異的プライマー対(JSFR5)の検知感度



The recombinant CryIAc protein band is indicated by arrow at 130KDa. The protein bands were visualized using Coomassie Brilliant BlueR-250.

Fig. 11 組換え CryIAc タンパク質(rCryIAc)の精製

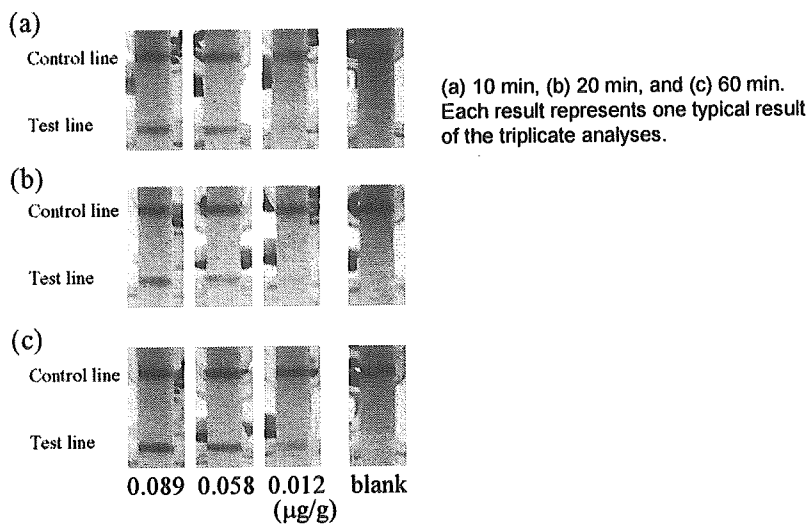


Fig. 12 未精製コメに混入した rCry1Ac の検知

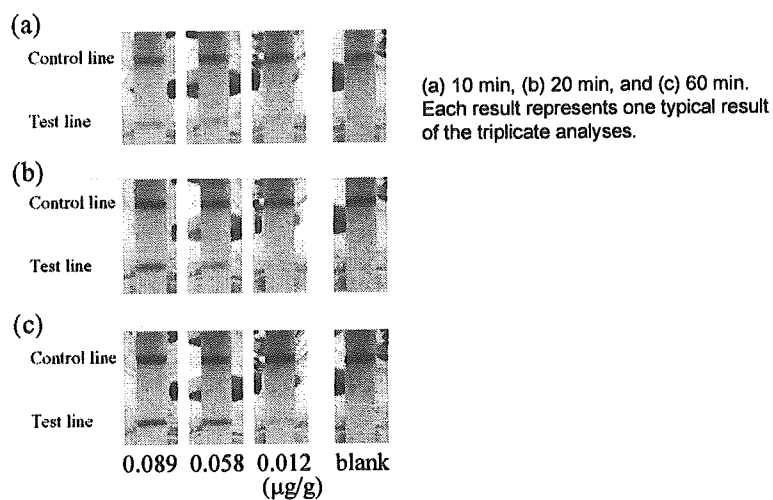


Fig. 13 精製コメに混入した rCry1Ac の検知

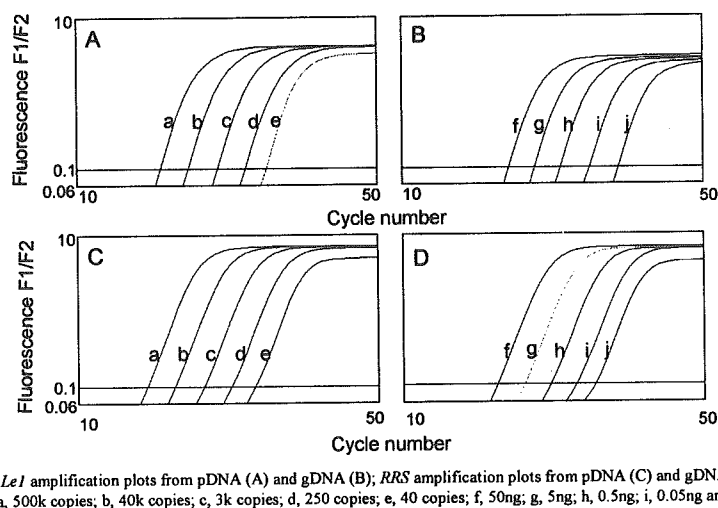
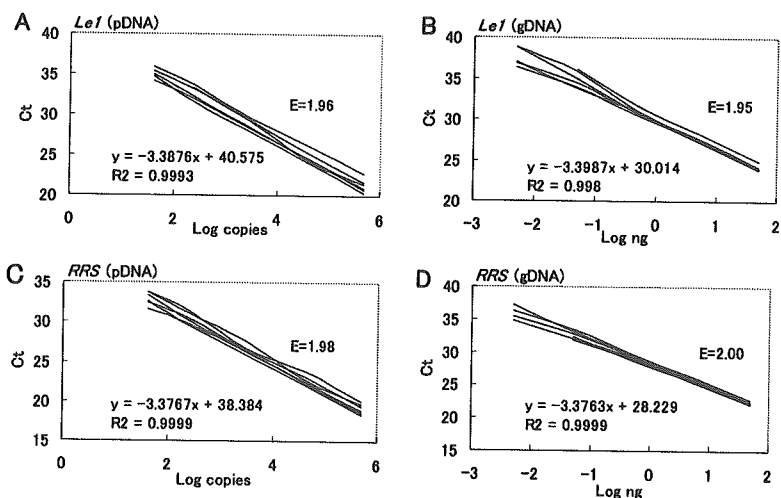


Fig. 14 ダイズを対象とした Light Cycler system を用いた PCR 条件の最適化



Lel standard curves obtained from pDNA (A) and gDNA (B), *RRS* standard curves obtained from pDNA (C) and gDNA (D). Six standard curves are indicated in each column. The standard curves for A and C were obtained from 40 to 500,000 copies of pDNA, and those for B and D were obtained from 0.005 to 50 ng of gDNA.

Fig. 15 プラスミド DNA 及びゲノミック DNA を鋳型とした場合の検量線比較

Sample	Target	Standard (copies)	Ct ^a	SD ^b	Sample	Target	Standard (ng)	Ct ^a	SD ^b
pDNA	<i>Lel</i>	40	35.02	0.63	gDNA	<i>Lel</i>	0.005	37.58	1.16
		250	32.66	0.82			0.05	34.83	1.00
		3,000	28.79	0.65			0.5	30.99	0.38
		40,000	24.83	0.77			5	27.59	0.38
		500,000	21.34	0.85			50	24.20	0.35
pDNA	<i>RRS</i>	40	32.93	0.83	gDNA	<i>RRS</i>	0.005	35.94	1.10
		250	30.39	0.74			0.05	32.64	0.65
		3,000	26.58	0.58			0.5	29.31	0.38
		40,000	22.82	0.61			5	25.90	0.33
		500,000	19.17	0.69			50	22.43	0.21

^a Ct, cycle of threshold (mean of six replicates for standard curves). ^b SD, standard deviation.

Table 2 プラスミド DNA 及びゲノミック DNA を鋳型とした場合の Ct 値比較

Target	Criterion	Type of calibrator	Mean of data set	Variance of data set	n	T statistical data	P (T < t) two-sided
<i>Lel</i>	slope	pDNA	-3.416	0.013	6	-0.379	0.720
		gDNA	-3.463	0.073	6		
	E	pDNA	1.964	0.002	6	0.227	0.829
		gDNA	1.953	0.011	6		
<i>RRS</i>	slope	pDNA	-3.377	0.019	6	0.502	0.637
		gDNA	-3.344	0.035	6		
	E	pDNA	1.980	0.003	6	-0.606	0.571
		gDNA	1.996	0.005	6		

Table 3 検量線の傾き及び PCR 効率の統計処理による検定

Sample	(n)	GMO Amount of RRS (%)		RSD (%)
		Actual	Calculated	
RRS0	(2)	0	0	
RRS1	(5)	1.0	0.86	22.28
RRS5	(15)	5.0	4.74	7.00
IRMM5	(5)	5.0	4.62	12.42

Table 4 擬似混合粉碎試料及び標準試料を用いた内標比の検証

	Same day (n = 5)			Three days (n = 15)
	1	2	3	
GMO Amount (%)	4.95	4.35	4.91	4.74
RSD (%)	2.00	2.01	4.51	7.00

Table 5 算出される混入率の日差変動

定量系	機関	Run	コピー数		機関別内標比		SD	RSD
			SSIib	P35S	試料毎	平均		
CaM	A	1	36630	15415	0.42	0.45	0.03	5.80
		2	35016	16225	0.46			
		3	35451	16605	0.47			
	B	1	32853	14712	0.45	0.46	0.02	3.41
		2	34930	16537	0.47			
		3	36201	16121	0.45			
	C	1	27508	13404	0.49	0.47	0.02	4.39
		2	26289	12664	0.48			
		3	24735	11103	0.45			

Table 6 ABI PRISM 7500 により得られる内標比の測定(CaM 定量系)

定量系	機関	Run	コピー数		機関別内標比		SD	RSD
			SSIib	GA21	試料毎	平均		
GA21	A	1	37759	82644	2.19	2.13	0.15	7.12
		2	42856	83897	1.96			
		3	38232	85759	2.24			
	B	1	36328	77529	2.13	2.14	0.00	0.13
		2	36092	77208	2.14			
		3	37144	79283	2.13			
	C	1	34166	71049	2.08	2.06	0.02	1.07
		2	27966	57697	2.06			
		3	30245	61574	2.04			

Table 7 ABI PRISM 7500 により得られる内標比の測定(GA21 定量系)

定量系	機関	Run	コピー数		機関別内標比		SD	RSD
			Lel	RRS	試料毎	平均		
RRS	A	1	38775	41584	1.07	1.01	0.05	5.08
		2	40010	39075	0.98			
		3	39109	38797	0.99			
	B	1	38189	37643	0.99	1.02	0.03	3.35
		2	37141	37809	1.02			
		3	37456	39478	1.05			
	C	1	38136	40189	1.05	1.05	0.04	4.09
		2	39435	39556	1.00			
		3	37448	40759	1.09			

Table 8 ABI PRISM 7500 により得られる内標比の測定(RRS 定量系)

Maize-Low

RUN	CaM			GA21		
	mean(%)	SD	RSD(%)	mean(%)	SD	RSD(%)
1	1.87	0.184	9.83	1.74	0.058	3.35
2	1.98	0.198	10.02	1.61	0.062	3.85
3	1.79	0.174	9.72	1.71	0.173	10.14
total*	1.88	0.094	4.98	1.69	0.067	3.94

*各RUNの平均値をRUN代表値として各種統計量を算出

Table 9 擬似混入試料(Maize-Low)を対象とした混入率測定結果

Maize-High

RUN	CaM			GA21		
	mean(%)	SD	RSD(%)	mean(%)	SD	RSD(%)
1	1.57	0.220	14.00	6.63	0.421	6.36
2	1.59	0.080	5.03	6.95	0.561	8.07
3	1.99	0.109	5.48	6.89	0.637	9.23
total*	1.88	0.094	13.90	6.82	0.174	2.55

*各RUNの平均値をRUN代表値として各種統計量を算出

Table 10 擬似混入試料(Maize-High)を対象とした混入率測定結果

RRS

RUN	Soy-Low			Soy-High		
	mean(%)	SD	RSD(%)	mean(%)	SD	RSD(%)
1	1.02	0.017	1.69	4.95	0.417	8.43
2	1.05	0.055	5.23	5.36	0.135	2.52
3	0.83	0.056	6.66	4.56	0.108	2.36
total*	0.97	0.119	12.27	4.96	0.398	8.04

*各RUNの平均値をRUN代表値として各種統計量を算出

Table 11 擬似混入試料(RRS-Low 並びに High)を対象とした混入率測定結果

	Maize-Low		Maize-High		RRS	
	CaM	GA21	CaM	GA21	Soy-Low	Soy-High
mean(n=20)	1.59	1.35	1.62	6.14	1.05	5.44
SD	0.12	0.09	0.08	0.55	0.10	0.46
assigned value	1.35~1.83	1.17~1.53	1.46~1.78	5.04~7.24	0.85~1.25	4.52~6.36

Table 12 認証値の設定

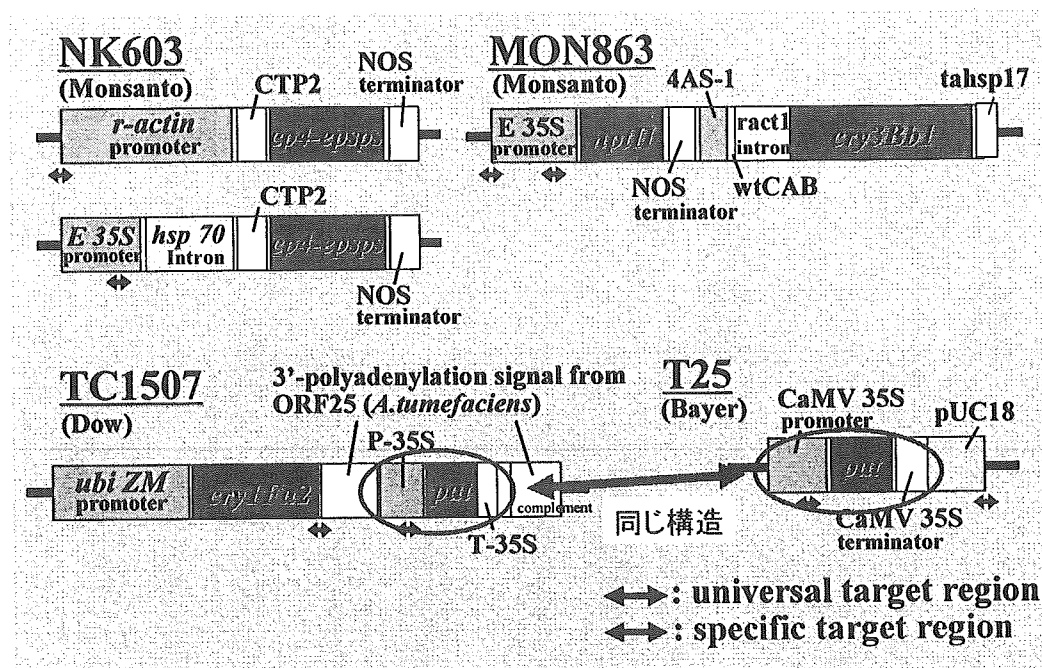


Fig. 16 MON863、NK603、TC1507、T25 系統特異的定量系の標的配列

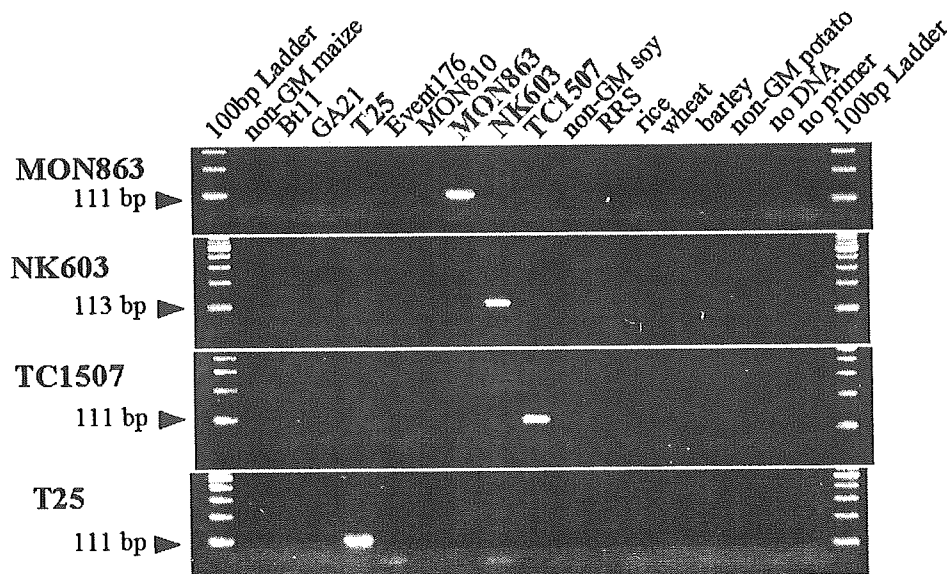


Fig. 17 各種定量系の特異性確認

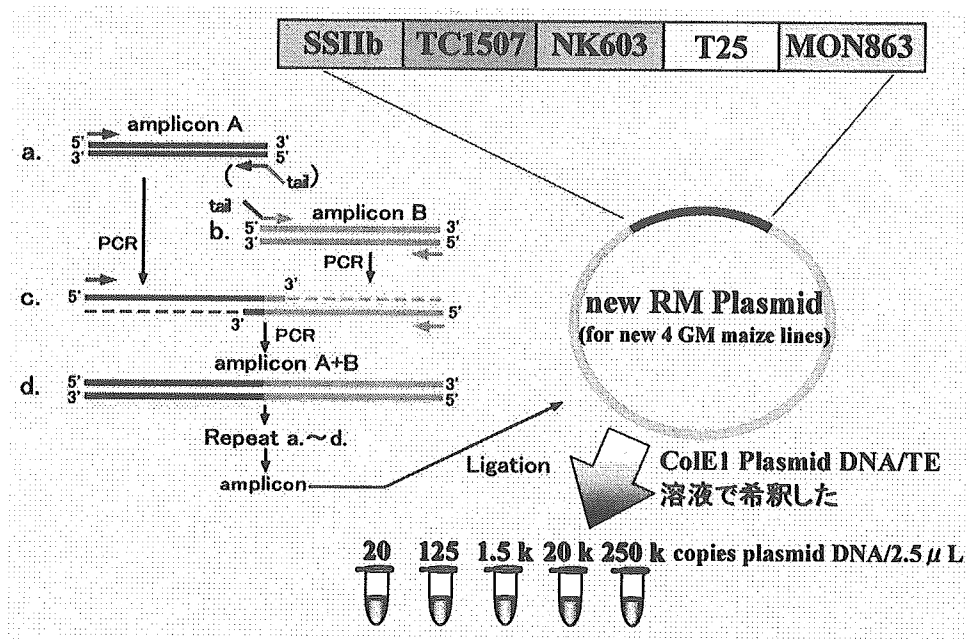


Fig. 18 MON863、NK603、TC1507、T25 系統特異的定量分析用標準物質の開発

Target	7700	7900 96 well	7500
MON863	0.54	0.52	0.52
NK603	0.49	0.54	0.53
TC1507	0.36	0.37	0.35
T25	0.35	0.40	0.37
参加機関数	5	5	3

Table 13 共同試験結果として得られた各種内標比

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)*		Detection limit Under Q.L.
		Mean	Bias	RSD _r	RSD _R	
0.25%	33	0.37	+48.5	14.8	18.9	0/66
0.50%	31	0.69	+37.8	15.8	15.8	0/62
1.0%	34	1.27	+26.6	11.8	12.9	0/68
5.0%	34	5.96	+19.2	8.5	9.9	0/68
10.0%	33	11.1	+11.1	8.8	8.8	0/66

Table 14 混入率測定試験の結果(MON863 系統)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)*		Detection limit Under Q.L.
		Mean	Bias	RSD _r	RSD _R	
0.25%	33	0.25	-0.4	18.5	20.3	1/66
0.50%	31	0.50	+0.7	16.0	19.6	0/62
1.0%	32	1.03	+3.2	12.2	12.2	0/64
5.0%	33	4.77	-4.7	8.0	9.8	0/66
10.0%	33	8.97	-10.3	9.9	9.9	0/66

Table 15 混入率測定試験の結果(NK603 系統)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)*		Detection limit Under Q.L.
		Mean	Bias	RSD _r	RSD _R	
0.25%	33	0.36	+45.3	22.0	22.3	3/66
0.50%	33	0.74	+48.3	16.9	19.6	0/66
1.0%	33	1.47	+46.7	15.7	15.7	0/66
5.0%	34	7.09	+41.8	11.9	12.6	0/68
10.0%	32	13.30	+32.9	8.3	10.2	0/64

Table 16 混入率測定試験の結果(TC1507 系統)

True value	Retained laboratories	Accuracy (%)		Precision (%)*		Detection limit Under Q.L.
		Mean	Bias	RSD _r	RSD _R	
0.25%	32	0.32	+28.5	25.7	25.7	7/64
0.50%	30	0.63	+25.1	17.3	18.8	0/60
1.0%	31	1.24	+23.5	12.0	14.4	0/62
5.0%	30	5.78	+15.7	10.1	12.6	0/60
10.0%	32	10.70	+7.2	9.4	15.7	0/64

Table 17 混入率測定試験の結果(T25 系統)

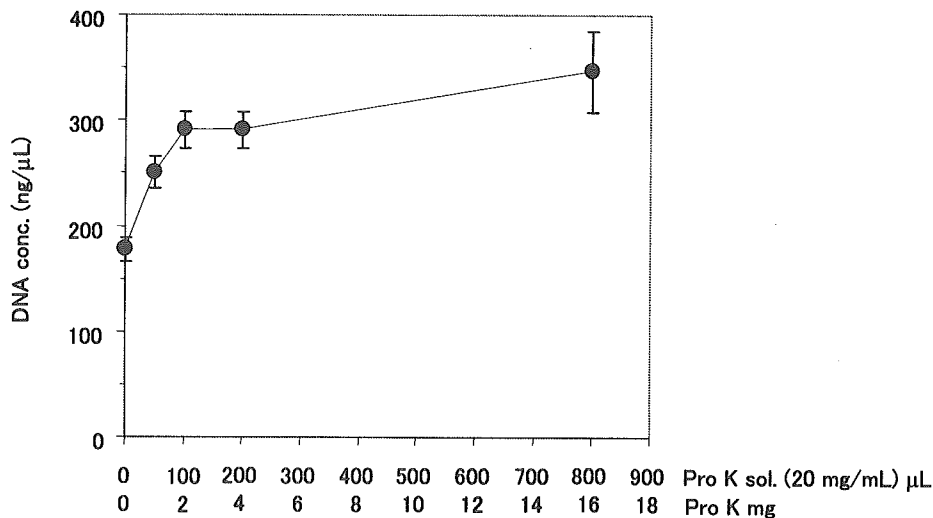


Fig. 19 DNA 収量に対する Proteinase K 添加量の影響 (抽出時間 3 時間)

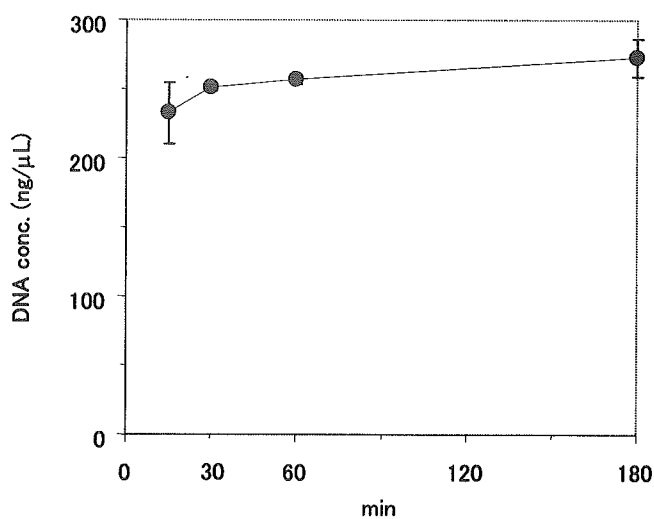


Fig. 20 DNA 収量に対する抽出時間の影響 (20 mg /mL Proteinase K 100 μL 添加)

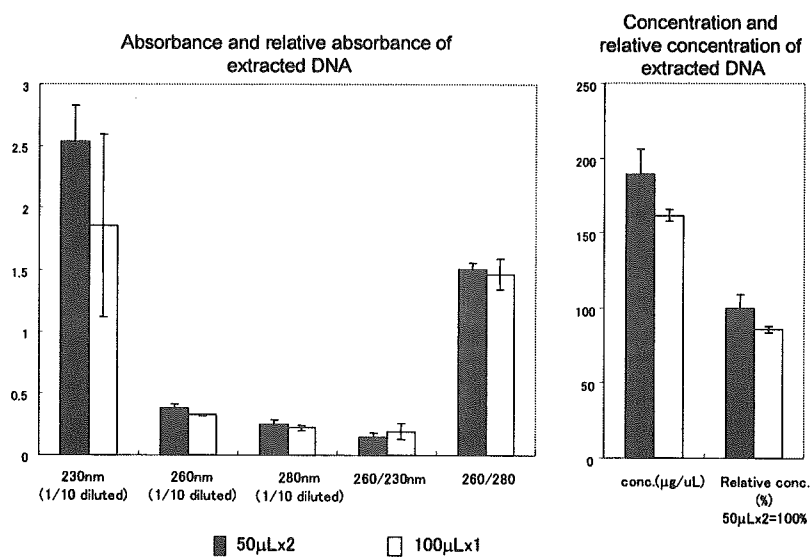


Fig. 21 DNA 溶出に要する TE 緩衝液量の検討

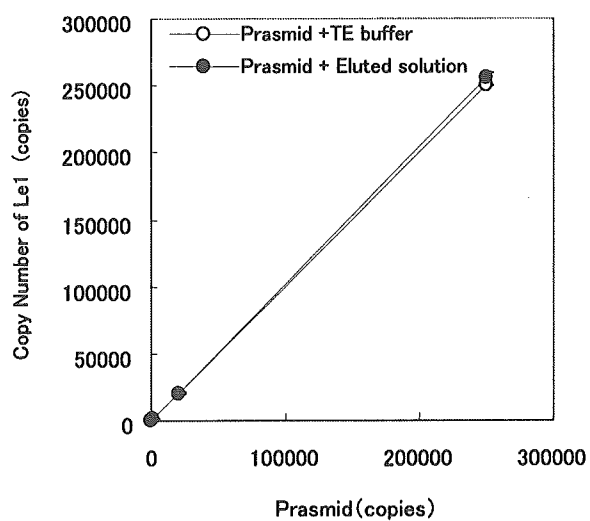


Fig. 22 PCR の効率及び特異性に対する Guanidine HCl の影響

平成17年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
「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17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)血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性について検討を行った。具体的には、(1)アレルゲン予測の解析法では、(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法 -アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討、立体構造も加味したエピトープ部位の解析を行い、エピトープになりやすいアミノ酸の分布が存在することが示唆された。(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の立ち上げ、更新を行なった。ADFSでは、独自に調査した結果も含めアレルゲン数1280, エピトープ既知のアレルゲン74種を搭載した。タンパク質のアレルゲン予測機能については、FAO/WHO法 (Hilemanらの方法) と motif-based法 (Stadlerらの方法) を掲載した。(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アレルゲン (卵白アルブミン)、非アレルゲン物質 (ペプシン) を用いて、BALB/cマウスに投与時の溶媒の差違について検討を行った。アレルゲンの溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、経口での感作、経口での惹起が可能であった。また、Balb/cマウス、W/Wvマウスにおける他の食物抗原オボムコイド (OVM) の経口感作において、抗原-油脂emulsionの投与により、感作能の上昇がみられた。(3) 血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性については、新たに36検体の食物アレルギー患者血清を用いて、PAT, CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9Cに対するIgE抗体の産生をELISA法で検討したが、いずれの抗原に対する抗体産生も認められなかった。

協力研究者

澤田純一、中島治、中村亮介 (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、バイオ食品特別部会が設置され、バ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