

図16. 直接ELISA法による*ctxB*タンパク質の検知結果

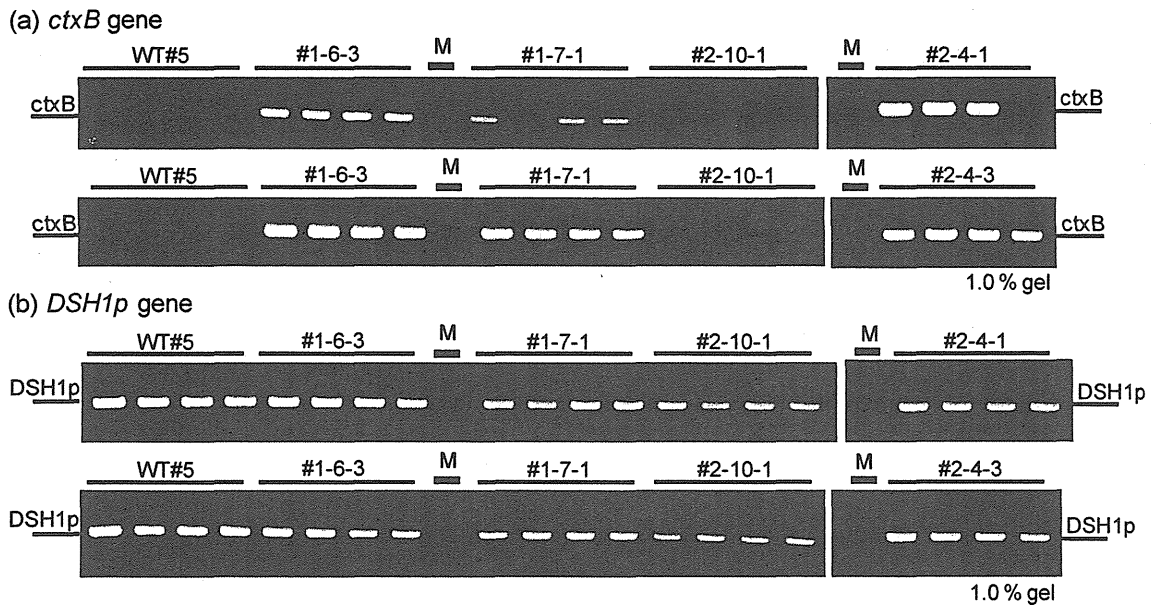
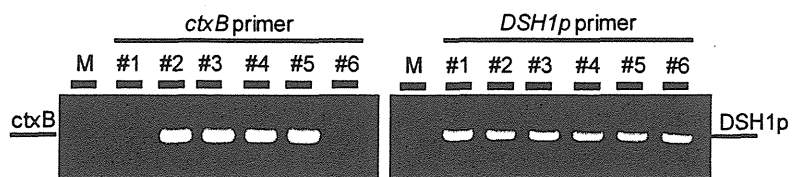
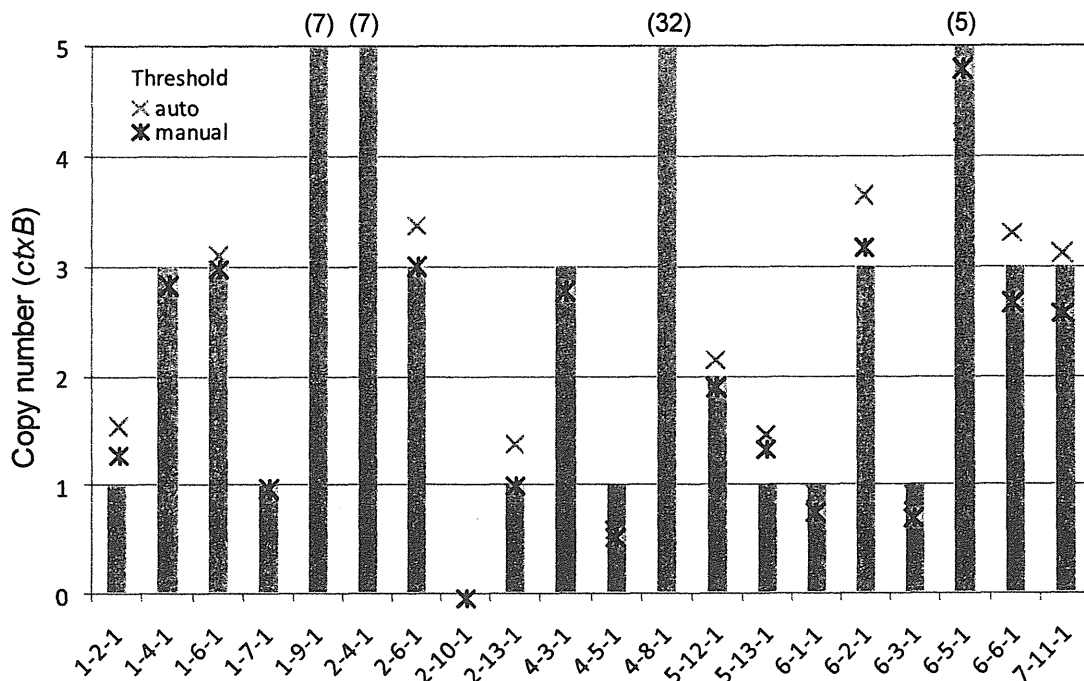


図17. T_1 種子1粒を検体とする*ctxB*遺伝子(a)及び*DSH1p*遺伝子(b)の検知結果



Templates: #1: WT#5, #2: #1-6-1, #3: #1-6-3, #4 #1-7-1, #5: #2-4-3, #6: #2-10-1

図18. T_1 コメ粉末を検体とする*ctxB*遺伝子(左)及び*DSH1p*遺伝子(右)の検知結果



Threshold 'auto'または'manual (0.1)'で計算したCt値より算出したctxB遺伝子の対DSH1p遺伝子存在比. 両者を平均し、整数値化した.

図19. イネ形質転換体候補代表株(T₀)におけるctxB遺伝子コピー数の解析結果

DSH1p遺伝子の増幅曲線

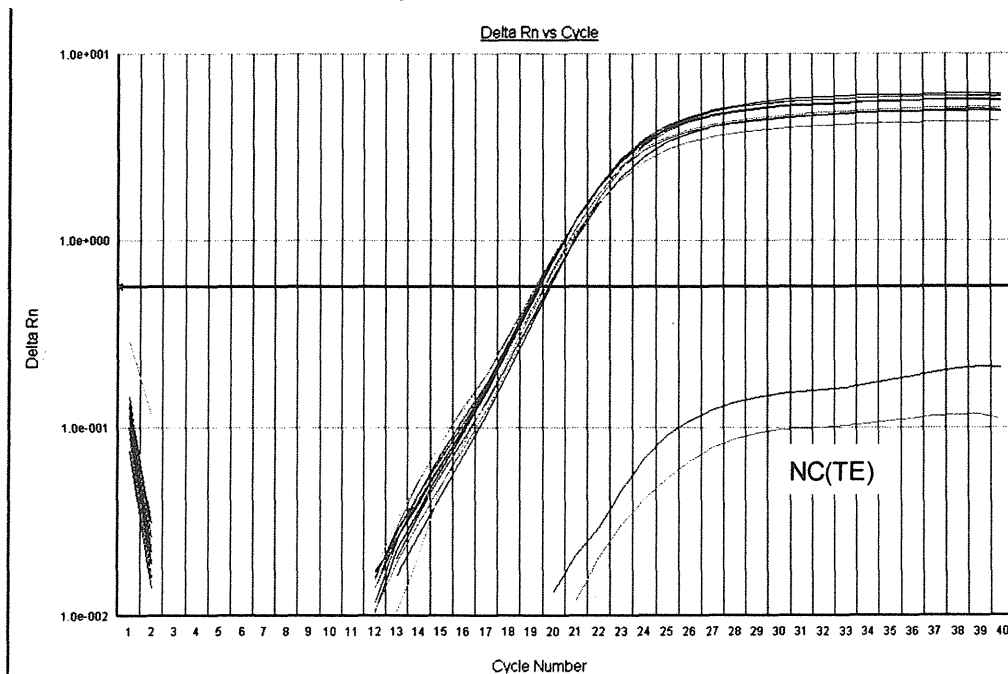


図20. コメ粉末より調製したゲノムDNAを鋳型とするDSH1p遺伝子の増幅曲線

ctxB遺伝子の増幅曲線

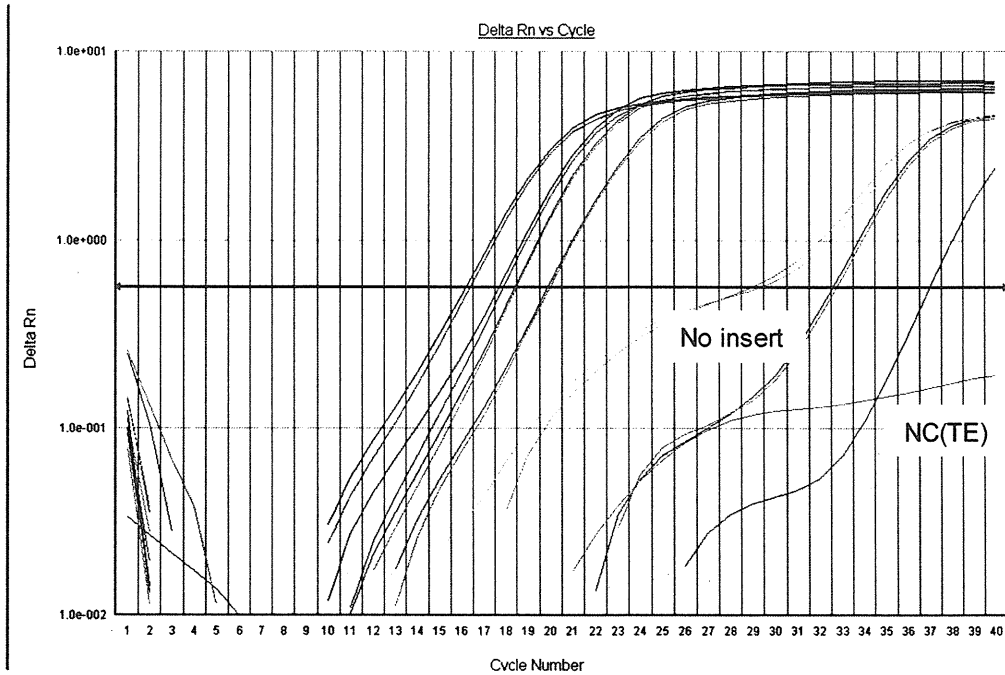


図21. コメ粉末より調製したゲノムDNAを鋳型とするctxB遺伝子の増幅曲線

融解曲線

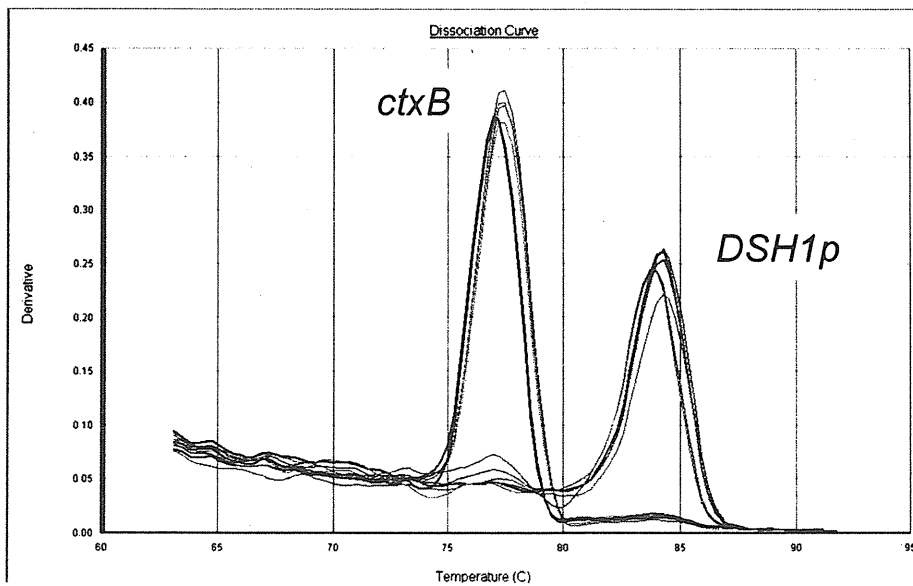
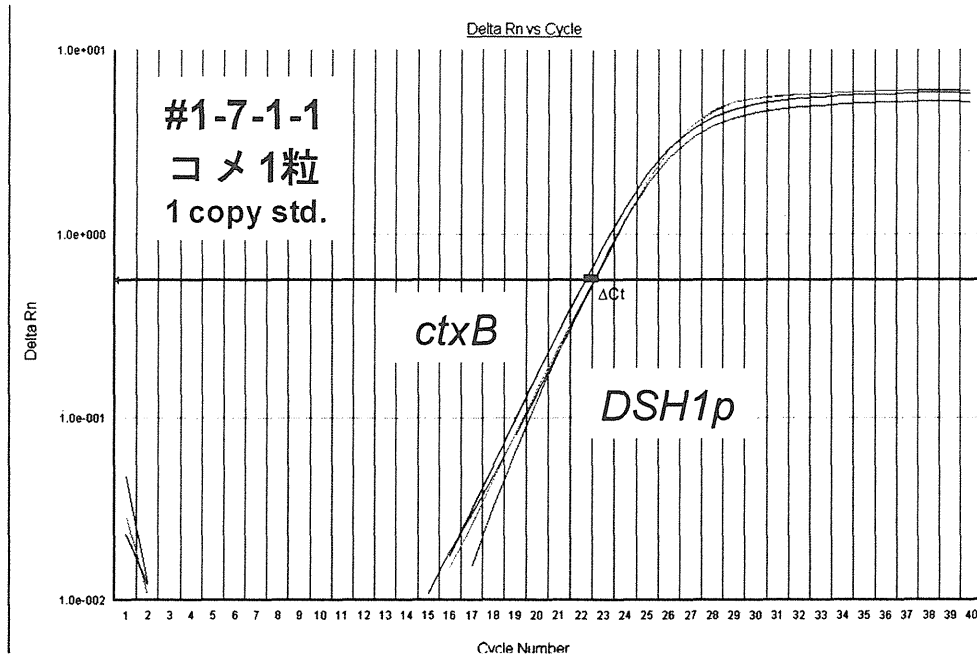


図22. コメ粉末より調製したゲノムDNAを鋳型とするリアルタイムPCRのctxB遺伝子及びDSH1p遺伝子の融解曲線

(a)



(b)

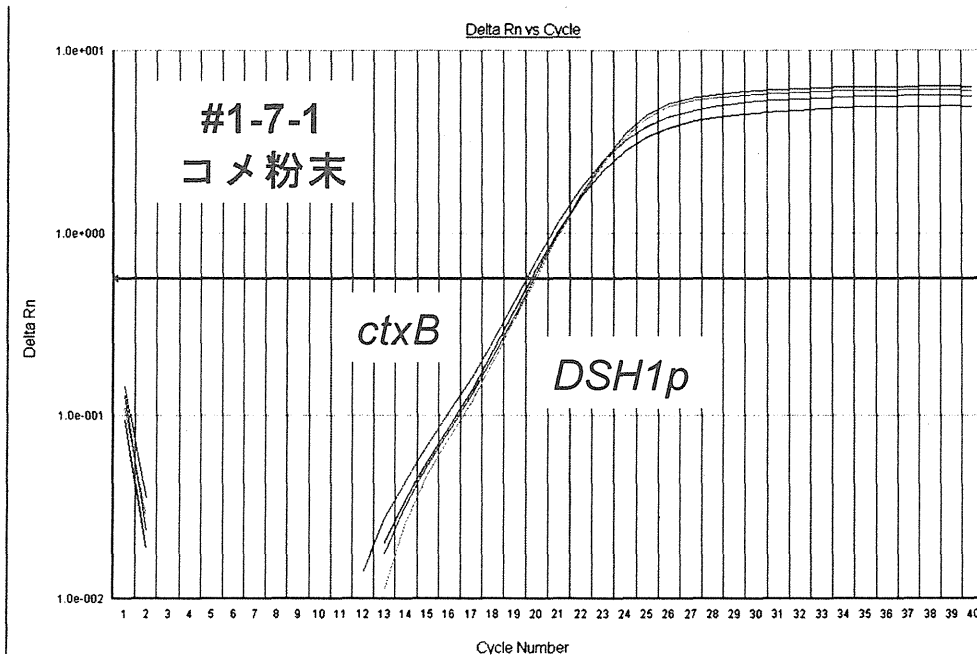
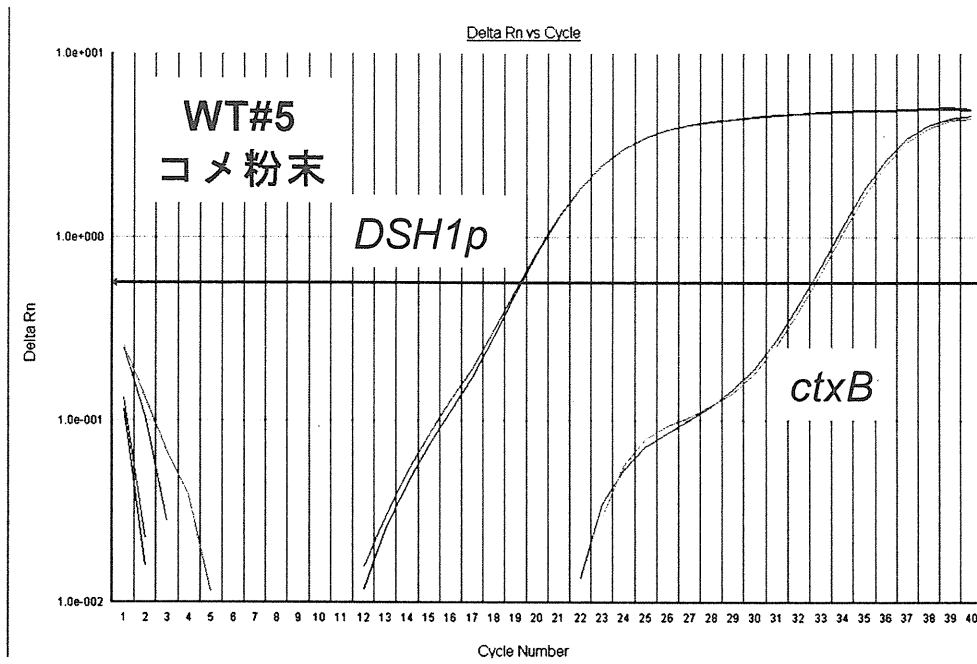


図23-1. リアルタイムPCRの増幅曲線, (a)#1-7-1-1 (コメ1粒), (b)#1-7-1

(c)



(d)

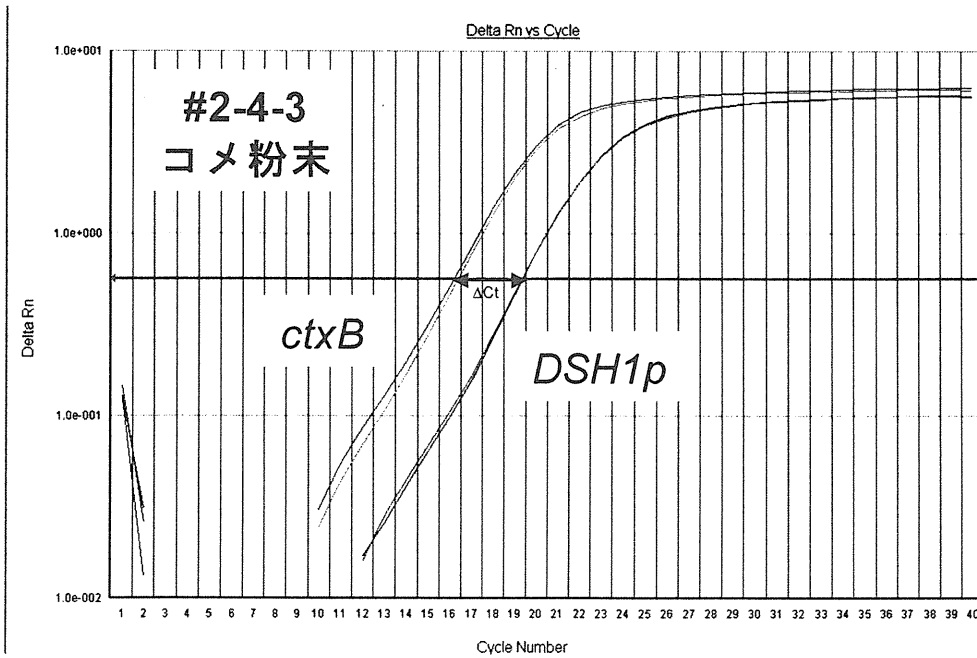


図23-2. リアルタイムPCRの増幅曲線, (c)WT#5, (d)#2-4-3

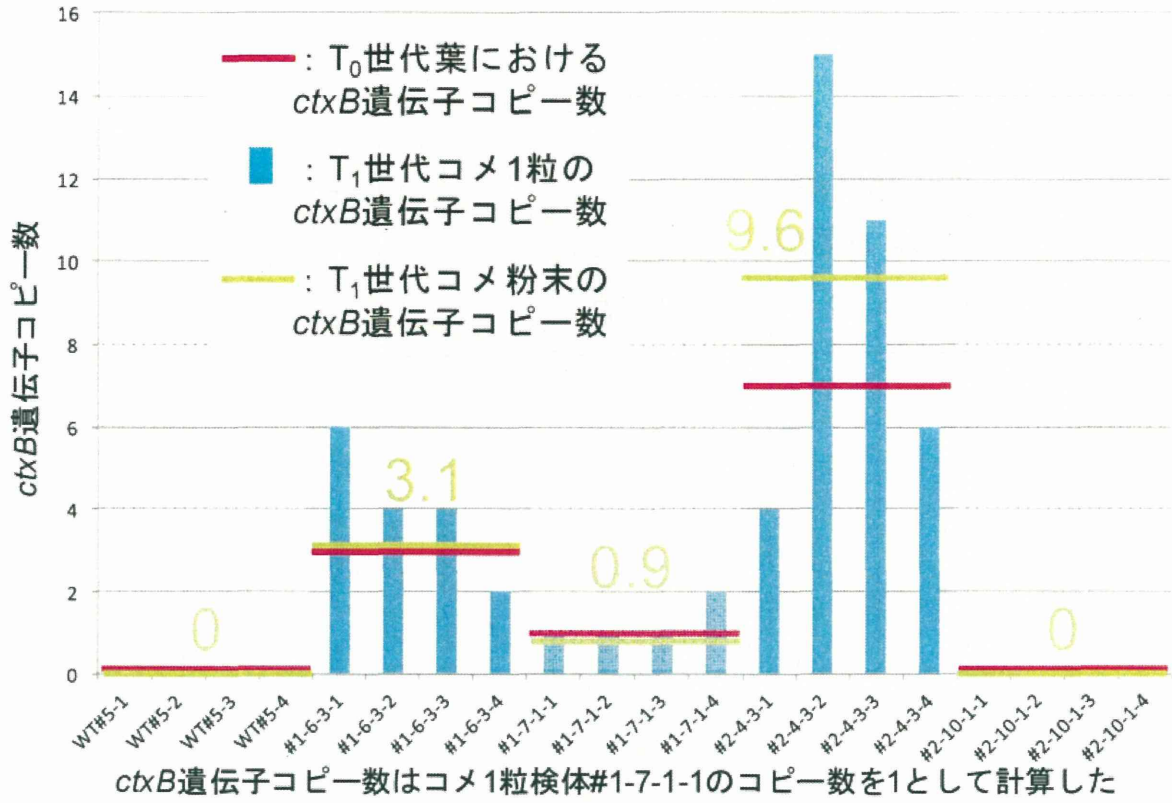


図24. 自殖交配後の*ctxB*遺伝子コピー数の変化

経口ワクチン用遺伝子組換え動物の検知法開発に関する研究

研究分担者 中島治 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 主任研究官

研究要旨

近年、非食用モダンバイオテクノロジー応用動物が多数報告されている。これらの非食用モダンバイオテクノロジー応用動物に由来する材料の食品への混入危害防止を考える必要がある。今年度はまず、2012年に発表された非食用モダンバイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタの文献調査などを行ってそれらの開発状況を調べた。それぞれ5報、3報、28報の論文や特許が見出され、ブタについて盛んに研究が行われていることが明らかになった。非食用モダンバイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタをまとめて開発国ごとに分類すると、米国（12報）、中国（11報）、日本（5報）において報告が多かった。また、最近の注目すべき技術としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼと transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を利用した GM 生物の開発の報告が増えている。ブタにおいては全ゲノムの解読が終了し、GM ブタの開発がさらに進展しそうである。

鶏卵中で医療目的に応用できる組換えタンパクを生産させる研究が行われている。このような目的で作成された GM ニワトリに由来する鶏肉が市場の鶏肉に混入してしまう懸念が考えられる。非食用モダンバイオテクノロジー応用動物についての検知法の開発として、ヒトエリスロポエチン (hEpo) を生産する GM ニワトリに由来する鶏肉の検知法を作成した。プラスミド中の hEpo cDNA をスタンダードとして利用して、リアルタイム PCR によって鶏肉中から hEpo 遺伝子を検知する方法を作成した。市場調査として生の鶏肉 6 品、加工食品中の鶏肉 6 品をこの検知法で調べた結果、いずれのサンプルからも hEpo 遺伝子は検出されなかった。

研究協力者

手島玲子（代謝生化学部 部長）

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え（以下、「GM」と記す）動物の開発が活発に行われている。非食用に開発された GM 動物や魚はフードチェーンに混入したときに食用に開発されたものよりも大きな健康被害をもたらす可能性がある。そのため、非食用に開発された GM 動物の開発状況を調査して将来起きるであろう問題を予想することや市場への混

入を検知するための方法を作成することが求められている。

そこで、本研究においては非食用 GM 動物の中から報告の多い魚、ニワトリ、ブタを選んでそれらの開発と実用化への動向を調査する。

また、医療目的で利用される有用タンパクを鶏卵において生産させる研究が行われている。このように鶏卵をバイオリクターとして利用することが可能であれば、培養細胞を利用するよりも安価に医療目的の有用タンパクを生産させられる可能性があ

り、期待される研究分野である。近年、ヒトエリスロポエチン (hEpo) を鶏卵中で発現させた報告が3報あり、いずれも *in vitro* で生理活性が確認されている (Kodama D., et. al. Production of human erythropoietin by chimeric chickens. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **367** (4) 834-839 (2008); Penno C.A., et. al. Production of recombinant human erythropoietin / Fc fusion protein by genetically manipulated chickens. *Transgenic Research* **19** (2) 187-195 (2010); Koo B. C., et. al. Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Research* **19** (3) 437-447 (2009))。このようにhEpoをGMニワトリを利用して生産させる研究報告が多く、本研究ではhEpoを生産させることを目的に作成されたGMニワトリに由来する鶏肉の検知を課題とする。なお、hEpoのオープンリーディングフレームは582 bp、193アミノ酸残基から成り、hEpoは医療においては貧血の治療に利用される糖タンパクである。本研究では、hEpoを鶏卵中で発現させることを目的に作成された非食用GMニワトリに由来する鶏肉が市場に混入してしまったことが疑われるときに、鶏肉中からhEpo遺伝子を検知する方法をリアルタイムPCRを利用して作成した。

B. 研究方法

(1) 文献調査

論文、インターネット、新聞を使って非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタの開発状況についての情報収集を行った。インターネットを使った調査では SciFinder (キーワー

ド: transgenic fish、transgenic chicken、transgenic pig) を利用して 2012 年に発表された論文と特許を検索した。この中からタイトルと要旨を読んで将来フードチェーンへの混入につながる懸念のある発表を選んだ。なお、プロモーターの性質の解析、構造遺伝子の機能の解析、病態モデルの作成などの目的で作成された非食用 GM 動物は研究室の閉鎖系の中で飼育されるに留まり、フードチェーンへの混入の懸念はないと判断して本研究の調査対象には含めなかった。また、最近になって注目されている技術や報告なども調査した。

(2) 鶏肉中からの hEpo 遺伝子の検知 市場調査用の鶏肉サンプル

生の鶏肉 6 品 (ムネ、ササミ、レバー、モモ、手羽元、ひき肉) と鶏肉を含む加工食品 6 品 (唐揚げ、親子丼、焼き鳥レバー、チキンカツ、照り焼き、チキンカレー) を東京の小売店で購入した。

リアルタイム PCR のキャリブレーション用のスタンダード

hEpo cDNA を組み込んだ市販のプラスミドを購入して使用した (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. MHS1010-98053191)。

鶏肉からのゲノミック DNA の抽出

Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen) を利用して鶏肉からゲノミック DNA を抽出した。抽出したゲノミック DNA の性質は紫外吸収と 0.8%アガロースゲル電気泳動によって調べた。

リアルタイム PCR による hEpo 遺伝子のス

スタンダードプロットのキャリブレーション
リアルタイム PCR の反応液は 25 μL で以下の物を含む：12.5 μL ユニバーサル PCR マスターミックス (Life Technologies), 0.4 μL プライマー対 (各 25 μM), 0.5 μL TaqMan プローブ(10 μM), 2.5 μL コントロールプラスミド DNA テンプレート。コントロールプラスミド DNA テンプレートは、リアルタイム PCR のキャリブレーション用のスタンダードの項目に記載したプラスミドを *Nco* I で切断してリニアにした物を 20, 200, 2.0 k, 20 k, 200 k コピー使用した。

プライマーの配列は hEpo F, 5'-AGCCCAGAAGGAAGCCATCT-3' および hEpo R, 5'-GGAAAGTGTCAGCAGTGATTGTTC-3' である。プローブの構造は hEpo Pro, 6-carboxy-fluorescein (FAM)-CCTCCAGATGCGGCCTCAGC-tramethylrhodamine (TAMRA) である。

Δ Rn threshold は 0.20 として、5 回測定を行った。

鶏肉サンプルから抽出したゲノミック DNA の存在下でのスタンダードプロットのキャリブレーション

生の鶏肉サンプルの 1 つから抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/ μL となるように PCR 反応液に加えた (1 反応当たり 130 ng)。リアルタイム PCR の測定条件は、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載したものと同一であり、5 回測定を行った。

鶏肉の実態調査

上述の生の鶏肉 6 品と鶏肉を含む加工食品 6 品から抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/ μL となるように PCR 反応液に加えた。コントロールプラスミドは添加しなかった。それ以外の条件については、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載の条件と同じである。リアルタイム PCR の測定を行なって鶏肉中の hEpo 遺伝子の存在を調べた。Ct 値が 38 以上は陰性とした。Ct 値が 38 以下で指数関数的増幅が確認できる反応を陽性とした。

次に、上述の生の鶏肉 6 品と鶏肉を含む加工食品 6 品から抽出したゲノミック DNA を最終濃度 5.2 ng/ μL となるように PCR 反応液に加えて、さらにコントロールプラスミドを添加した。リアルタイム PCR の測定条件は、hEpo 遺伝子のスタンダードプロットのキャリブレーションに関するリアルタイム PCR の項目に記載したものと同一であり、hEpo 遺伝子が検出されるかを調べた。2 回測定を行った。

リアルタイム PCR の内在性コントロールとしてのニワトリ cytochrome b 遺伝子の検出

鶏肉の実態調査を行うときに、抽出されたゲノミック DNA の品質を評価するために、ニワトリ cytochrome b 遺伝子の検出をリアルタイム PCR によって同時に行った。プライマーは既報の通りとした (Tanabe S., et al. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 3131-3135 (2007))。プロー

ブは既報の構造のクエンチャーについて FAMに変えた。測定はシングルプレックス PCRとして、 ΔRn thresholdを0.10とした。

C. 研究結果

(1) 文献調査

SciFinder を利用した文献と特許の検索では非食用バイオテクノロジー応用魚、ニワトリ、ブタについてそれぞれ 5 報、3 報、28 報が該当した。

非食用 GM 魚の検索結果

該当した 5 報は観賞用 (2 報) と環境モニタリング (3 報) の 2 つのカテゴリーに分類できる (表 1)。観賞用については、導入遺伝子として青色蛍光タンパク遺伝子、FP635 蛍光タンパクが使用されてそれぞれ青色、紫色の蛍光を発するゼブラフィッシュの特許が見出された。以前から緑、黄色、赤の蛍光を発するゼブラフィッシュが発表されていたが、新しい色を発する非食用 GM 魚が登場した。環境モニタリングのカテゴリーではエストロジェン用物質の検出、PCB の検出、内分泌攪乱物質の評価を目的としており、3 報のすべてにおいて導入遺伝子として GFP 遺伝子を利用していた。非食用 GM 魚の全体で報告を開発国別に分類すると、米国 (2 報)、日本 (1 報)、韓国 (1 報)、香港 (1 報) となった (表 4)。

非食用 GM ニワトリの検索結果

該当した 3 報のすべてがバイオリクターのカテゴリーに分類されて、有用な組換えタンパクを生産させることを目的としていた (表 2)。導入遺伝子は、ニワトリ卵白リゾチームと杉花粉アレルゲンの 7 つの主要

ヒト T 細胞エピトープに由来するペプチドの融合遺伝子、ヒト成長ホルモン、ヒトエリスロポエチン、腫瘍壊死因子、一本鎖 Fv/Fc 断片があった。非食用 GM ニワトリの開発国はいずれも日本であった (表 4)。

非食用 GM ブタの検索結果

該当した 28 報は臓器移植用 (15 報)、バイオリクター (4 報)、病原菌耐性付与 (7 報)、その他 (2 報) の 4 つのカテゴリーに分類された (表 3)。臓器移植用のカテゴリーにおいては改変あるいは導入遺伝子としては $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase gene-knockout (GTKO)、CD46 が頻繁に登場した。前者はブタに存在する主要な異種抗原の生合成を抑制する作用があり、後者はヒトの補体の攻撃からブタの臓器を防御する作用があり、いずれもこれらの GM ブタの臓器をヒトに移植したときに急性拒絶反応が抑制される。

非食用 GM ブタの全体の報告について開発国別に分類すると、報告数の多い上位 3 国は中国 (11 報)、米国 (10 報)、ドイツ (3 報) となった (表 4)。臓器移植用のカテゴリーでは 15 報中の 9 報を米国が占めた。臓器移植用以外のカテゴリーでは 13 報中の 11 報を中国が占めた。

最近注目を集めている技術や報告

ゲノムのヌクレオチド配列を編集する技術としてジンクフィンガーヌクレアーゼや transcription activator-like effector nuclease (TALEN) があり、これらの人工ヌクレアーゼを利用した論文が増えている (Prez-Pinera P., Ousterout D.G., Gersbach C.A. Advances in targeted

genome editing. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**: 268-277(2012)).この技術によって GM 生物の作成の効率が大きく向上した。これら人工エンドヌクレアーゼを利用して作成された GM 動物にはカエル、ハエ、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、ブタなどがある。また、最近になってブタの全ゲノムが解読されており、今後 GM ブタの作成が進展するであろうと予想されている (Groenen M.A.M. et. al. *Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. Nature* **491**, 393-398 (2012)).一方で、動物にヒトの iPS 細胞を移植させてヒトの臓器を作成させる研究が行われている (2012年10月12日、「再生医療危うい倫理」東京新聞)。

(2) 鶏肉中からの hEpo 遺伝子の検知 鶏肉サンプルからのゲノミック DNA の抽出

鶏肉サンプルから抽出されたゲノミック DNA の収量と紫外吸収を表 5 に、0.8%アガロースゲル電気泳動で分析した結果を図 1 に示した。ゲノミック DNA の収量はサンプルごとに大きく変動した。280 nm の紫外吸収に対する 260 nm の紫外吸収の比、230 nm の紫外吸収に対する 260 nm の紫外吸収の比に基づいて、抽出されたゲノミック DNA はリアルタイム PCR の測定に適していると考えた。

生の鶏肉については、280 nm の紫外吸収と 0.8%アガロースゲル電気泳動に基づき、レバーを用いたときに短くて多くの量のゲノミック DNA が抽出されたことが明らかになった。0.8%アガロースゲル電気泳動に基づき、加工食品中の鶏肉からは生の鶏肉か

らよりも短いゲノミック DNA が抽出された。チキンカレー中の鶏肉から抽出されたゲノミック DNA は特に短かった。食品加工の過程でゲノミック DNA が分解したことが示された。

リアルタイム PCR のためのプライマーとプローブの設計

GM ニワトリのゲノムに挿入された hEpo cDNA についての詳細な情報は入手できなかった。まず、hEpo cDNA をデータベース中を検索すると 2つの型が見出された。コドン 143 位に Lys を含む cDNA と含まない cDNA である。2つの cDNA とともにシグナルペプチドと成熟タンパクをコードする部分から構成されている。hEpo cDNA のヌクレオチド配列に基づいて特異的なプライマーとプローブを設計しようと試みたところ、成熟タンパクをコードする部分から 2つの組み合わせが得られた。1つのプライマーは 2つの型の cDNA の異なる配列を含んでいた。2つの型の cDNA を同時に検出できるように、このプライマーを含まないプライマーとプローブの組み合わせを本研究では利用した。これらのプライマーとプローブの構造は研究方法の項目に示した。

キャリブレーションプロットの確立

hEpo cDNA を含む市販のプラスミドを購入してスタンダードとして使用した。このとき増幅曲線が得られて、リアルタイム PCR によってプラスミド中の hEpo 遺伝子が検出できることを確認した。増幅曲線とスタンダードプロットを図 2 に示した。図の脚注に記載したスタンダードプロットの 5つの数式から結果は再現性があると考え

られた。

次に、生の鶏肉のサンプルの1つから抽出されたゲノミック DNA にコントロールプラスミドをスパイクした。このとき増幅曲線が得られて、生の鶏肉から抽出されたゲノミック DNA の存在下でプラスミド中の hEpo 遺伝子が検出されることを確認した。このときの増幅曲線とスタンダードプロットを図3に示した。図の脚注に記載したスタンダードプロットの5つの数式から結果は再現性があると考えられた。

6つの加工食品のサンプル中の鶏肉から抽出したゲノミック DNA にコントロールプラスミドをスパイクしたときに、hEpo 遺伝子は検出されてスタンダードプロットが得られた。

鶏肉の市場調査

本研究で開発した hEpo 遺伝子の検出法の応用性を評価するために、12品の鶏肉サンプル（生の鶏肉6品、加工食品中の鶏肉6品）を測定した。hEpo 遺伝子が検出されるかを決定するためにスタンダードプロットを使用した。今回測定したサンプルのいずれからでも hEpo 遺伝子は検出されなかった。

内在性ニワトリ cytochrome b 遺伝子の分析では、すべてのサンプルにおいて同様な増幅曲線と Ct 値が得られた。すべてのサンプルについてのニワトリ cytochrome b 遺伝子と hEpo 遺伝子の Ct 値を表5に示した。また、抽出されたゲノミック DNA はブタ、ウシ、ヒツジ、ウマからではなくてニワトリから得られたことが確認された。

D. 考察

(1) 文献調査

SciFinder で文献や特許を検索して本研究の対象となった報告は非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタについてそれぞれ5報、3報、28報であった。非食用 GM 魚、ニワトリの報告は少なく、ブタの報告が多かった。

非食用 GM ブタについて開発国を調査すると、臓器移植用のカテゴリーに分類される物15報中の9報を米国が占めた。また、非食用 GM ブタの臓器移植以外のカテゴリーに分類される物13報中の11報を中国が占めた。このように非食用 GM ブタについてはカテゴリーによって開発国の偏りが明瞭である。つまり中国は非食用 GM ブタを開発しているが臓器移植用の物は開発していない。非食用 GM ブタについては臓器移植用に開発されるものが多い。しかし、臓器移植は現在研究中であり、それを目的とした非食用 GM ブタが大量に飼育される段階には達していないようである。したがって、フードチェーンへの混入の懸念は少ないと思われる。

非食用 GM 魚については、魚の種類はゼブラフィッシュとメダカが使われており、これらは通常は食用としない種類である。したがって、これらの非食用 GM 魚がフードチェーンに混入する懸念は少ないと思われる。

次に、非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタの全体の報告36報を開発国ごとに分類すると、米国(12報)、中国(11報)、日本(5報)の上位3国で78%を占めており、非食用 GM 動物の開発の盛んな国が明確に示された。これらに続く国としてはドイツ(3報)、韓国(3報)であった。

最近注目される技術や報告を以下に3つ述べる。その1つ目は、人工エンドヌク

レアーゼがある。ジンクフィンガーヌクレアーゼや transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を利用したゲノム編集の報告が近年急上昇している。この技術を使うと遺伝子の継ぎ目がなくなり、抗生物質による選抜が不要になるなど、古い方法を利用していたときよりもはるかに洗練されたゲノムの操作が可能になる。今後、これらの技術を利用して作成された GM 動物に由来する材料がフードチェーンに混入したことが疑われるときに、それらを検知することがきわめて困難になってしまうことが予想される。

最近注目される技術や報告の2つ目は、ブタの全ゲノムが解読されたことが挙げられる。これによってブタを利用した研究やバイオテクノロジー技術の全般が大きく進展することが予想される。その中の1つとして、非食用 GM ブタの作成が容易になり促進されることが考えられる。

最近注目される技術や報告の3つ目は、動物にヒトの iPS 細胞を移植して動物中でヒトの臓器を作らせる研究が始まっている。この研究自体は非食用 GM 動物の開発の研究の範疇には入らない。しかし、この新しい研究は臓器移植用の非食用 GM 動物の開発の研究と目的が類似しており、臓器移植用の非食用 GM ブタの開発に置き換わる研究になる可能性がある。臓器移植用の非食用 GM ブタの開発が影響を受けて、その開発が鈍る可能性が考えられる。

(2) 鶏肉中からの hEpo 遺伝子の検知

本研究においては、hEpo 遺伝子を含む GM 鶏肉がフードチェーンに混入したことが疑われるときに鶏肉を調べる方法として、ニ

ワトリゲノム中から hEpo 遺伝子を検出するためのリアルタイム PCR を使った方法を作成した。ポジティブコントロールとして hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する肉を入手することやそれに特異的な配列を得ることが困難であったので hEpo cDNA を含むプラスミドをスタンダードとして使用した。本研究ではコントロールプラスミドをニワトリゲノミック DNA にスパイクしてそれが検出されることを示した。同様な手法が食品中の GM 材料の分析に使われており、本研究の手法も妥当であると考えられる。

ニワトリエリスロポエチンまたは類似の遺伝子をデータベースで検索したところ該当する遺伝子が見出されなかった。そこで実験的にリアルタイム PCR によってニワトリゲノムを調べた。ニワトリゲノムからは hEpo 遺伝子は検出されなかった。この結果と、鶏肉から抽出したゲノミック DNA にコントロールプラスミドをスパイクすると hEpo 遺伝子が検出されること、内在性ニワトリ cytochrome b 遺伝子が鶏肉から抽出されたゲノミック DNA から検出されることを合わせて考えると、本研究で使用したプライマーとプローブによって検出される配列はニワトリゲノム中には存在せず、今回の市場調査で調べたサンプルは非 GM ニワトリに由来することが示された。

コントロールプラスミドを生鶏肉サンプルの1つから抽出したゲノミック DNA にスパイクしたところ、hEpo 遺伝子を検出することができた。この結果は、この検出法によって hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する肉を検知できることを

強く示唆する。この検出法を 12 品のサンプルの測定に適用したところ、いずれのサンプルからも hEpo 遺伝子は検出されなかった。ゲノミック DNA を 0.8%アガロースゲル電気泳動によって分析したところ、生のレバーと加工食品中の鶏肉から抽出したゲノミック DNA は短くなっていた。しかし、表 4 に示したように、内在性ニワトリ cytochrome b 遺伝子についての Ct 値がすべてのサンプルから同様に得られていたので、今回調べたすべてのゲノミック DNA は本方法で測定可能であると考えた。さらに、コントロールプラスミドを 6 品の加工食品中の鶏肉から抽出されたゲノミック DNA にスパイクしたところ、hEpo 遺伝子が検出された。この結果は、ニワトリゲノミック DNA の存在下でリアルタイム PCR によって hEpo 遺伝子が検出できることを示している。これらの結果は、もし hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する肉を本検出法で測定したならば、検出できるであろうことを意味する。したがって、今回調べたサンプルはいずれも hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する鶏肉ではないと判断した。

Animal Genome Size Databaseによると (<http://www.genomesize.com>)、ニワトリの C-値は1.25であり、ニワトリのハプロイドの細胞 1 つに含まれるゲノムが1.25 pgであることを意味する。本研究では1反応当たり鶏肉の各サンプルから抽出されたゲノミックDNAを130 ng使っている。このゲノミックDNAの量は52000個の細胞に含まれる量に相当する。GMニワトリを作成したときにhEpo遺伝子1コピーがニワトリゲノムに挿入されたとして、またGMニワトリに由来

する肉の混入比が100%であると仮定すると、1反応当たり仮のGMサンプル中には52000コピーのhEpo遺伝子が存在することになる。図3のスタンダードプロットに基づいて考えると、この仮のGMサンプルを測定したときには安定してhEpo遺伝子が検出できると思われる。

加工食品6品に由来する鶏肉はいずれも本検出法で調べることができた。その理由はリアルタイム PCR による測定では短い DNA 配列を標的として利用するため、ゲノミック DNA 調製液中の混入物がリアルタイム PCR の反応を阻害しなかったためと考えられる。しかし、複雑な加工を施された食品に本検出法を適用するにはさらなる研究が必要である。例えば、真空パックや缶詰中の鶏肉からゲノミック DNA を抽出する方法として適した方法を見出して本検出法の適用性を試すことが求められる。

近年、多くの種類の GM ニワトリが開発されている。それらの中から本研究の題材として hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリを選び、GM 鶏肉を検知する方法を作成した。本研究と同じ方法論が他の種類の GM ニワトリに由来する鶏肉の検知にも応用できると考えられる。

E. 結論

非食用 GM 動物の産業的利用は現在のところ国から承認が出ていない。しかし、近年、非食用 GM 動物を開発するための技術は大きく進歩している。非食用 GM 動物についての今後の研究の進展を予測することは難しいが、注意深く調査し状況を把握しておく必要がある。また、非食用 GM 動物を開発するための新しい技術にも対応で

きる検知法を作成することが望まれる。

非食用 GM 動物の検知法として、GM ニワトリのゲノム中に挿入された hEpo 遺伝子を迅速に検知する方法をリアルタイム PCR を利用して開発した。この方法によって hEpo 遺伝子を含む GM ニワトリに由来する鶏肉の市場への混入を監視できる。本研究は食品の安心や安全に寄与できるものとする。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. 中島治、穂山浩、手島玲子 非食用遺伝子組換え動物の最近の開発状況についての調査 国立医薬品食品衛生研究所報告 第 130 号 50-57 (2012)
2. Nakajima O., Nakamura K., Kondo K., Akiyama H., and Teshima R. Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene. Biol. Pharm. Bull. (2013) 投稿中

学会発表

中島治、中村公亮、近藤一成、穂山浩、手島玲子 ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入された組換えニワトリに由来する肉の検知法について 日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

非食用モダンバイオテクノロジー応用魚の研究報告

1. Blake, Alan; Crockett, Richard; Nasevicius, Aidas. Blue transgenic fluorescent ornamental fish. (2012), US 8232451 B1 20120731. (米国特許)
2. Blake, Alan; Crockett, Richard; Nasevicius, Aidas. Purple transgenic fluorescent ornamental fish. (2012), US 8232450 B1 20120731. (米国特許)
3. Abdelkader, Tamer Said; Chang, Seo-Na; Kim, Tae-Hyun; Song, Juha; Kim, Dongso; Park, Jae-Hak. Teratogenicity and brain aromatase induction of monosodium glutamate in estrogen-responsive mosaic transgenic zebra fish *Danio rerio*. African Journal of Biotechnology (2012), 11(48), 10816-10823
4. Hung, Karen W. Y.; Suen, Miranda F. K.; Chen, Y. F.; Cai, H. B.; Mo, Z. X.; Yung, Ken K. L. Detection of water toxicity using cytochrome P450 transgenic zebrafish as live biosensor: For polychlorinated

- biphenyls toxicity. *Biosensors & Bioelectronics* (2012), 31(1), 548-553.
5. Hano, Takeshi. Studies on the evaluation of the effect of endocrine disrupting chemicals using transgenic see-through medaka (*Oryzias latipes*), olvas-GFP/STII-YI strain. *Suisan Sogo Kenkyu Senta Kenkyu Hokoku* (2012), 36, 1-56.
- 非食用モダンバイオテクノロジー応用ニワトリの研究報告
6. Kawabe, Yoshinori; Hayashida, Yuuki; Numata, Kensaku; Harada, Shota; Hayashida, Yoshifumi; Ito, Akira; Kamihira, Masamichi. Oral immunotherapy for pollen allergy using T-cell epitope-containing egg white derived from genetically manipulated chickens. *PLoS One* (2012), 7(10), e48512.
7. Kodama, Daisuke; Nishimiya, Daisuke; Nishijima, Ken-ichi; Okino, Yuuki; Inayoshi, Yujin; Kojima, Yasuhiro; Ono, Ken-ichiro; Motono, Makoto; Miyake, Katsuhide; Kawabe, Yoshinori; et. al. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2012), 113(2), 146-153.
8. Mizutani, Akifumi; Tsunashima, Hiroyuki; Nishijima, Ken-ichi; Sasamoto, Takako; Yamada, Yuki; Kojima, Yasuhiro; Motono, Makoto; Kojima, Jun; Inayoshi, Yujin; Miyake, Katsuhide; et. al. Genetic modification of a chicken expression system for the galactosylation of therapeutic proteins produced in egg white. *Transgenic Research* (2012), 21(1), 63-75.
- 非食用モダンバイオテクノロジー応用ブタの研究報告
9. Peng, Qiang; Yeh, Heidi; Wei, Lingling; Enjojo, Keiichi; Machaidze, Zurab; Csizmad, Eva; Schuetz, Christian; Lee, Kang Mi; Deng, Shaoping; Robson, Simon C.; et. al. Mechanisms of xenogeneic baboon platelet aggregation and phagocytosis by porcine liver sinusoidal endothelial cells. *PLoS One* (2012), 7(10), e47273.
10. Yeom, Hye-Jung; Koo, Ok Jae; Yang, Jaeseok; Cho, Bumrae; Hwang, Jong-Ik; Park, Sol Ji; Hurh, Sunghoon; Kim, Hwajung; Lee, Eun Mi; Ro, Han; et .al. Generation and

- characterization of human heme oxygenase-1 transgenic pigs. *PLoS One* (2012), 7(10), e46646.
11. Ekser, Burcin; Lin, Chih C.; Long, Cassandra; Echeverri, Gabriel J.; Hara, Hidetaka; Ezzelarab, Mohamed; Bogdanov, Vladimir Y.; Stolz, Donna B.; Enyoji, Keiichi; Robson, Simon C.; et. al. Potential factors influencing the development of thrombocytopenia and consumptive coagulopathy after genetically modified pig liver xenotransplantation. *Transplant International* (2012), 25(8), 882-896.
12. Dufrane, Denis; Veriter, Sophie; Gianello, Pierre. Modified pig islets capable of producing higher levels of glucagon for diabetes treatment. *PCT Int. Appl.* (2012), WO 2012113859 A1 20120830. (国際特許)
13. Ayares, David. Engineering multi-transgenic pigs lacking α -1, 3-galactosyltransferase expression as donors for xenotransplantation of vascularized xenografts. *PCT Int. Appl.*(2012), WO 2012112586 A1 20120823. (国際特許)
14. Klymiuk, Nikolai; van Buerck, Lelia; Baehr, Andrea; Offers, Monika; Kessler, Barbara; Wuensch, Annegret; Kurome, Mayuko; Thormann, Michael; Lochner, Katharina; Nagashima, Hiroshi; et. al. Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes* (2012), 61(6), 1527-1532.
15. Mohiuddin, M. M.; Corcoran, P. C.; Singh, A. K.; Azimzadeh, A.; Hoyt, R. F., Jr.; Thomas, M. L.; Eckhaus, M. A.; Seavey, C.; Ayares, D.; Pierson, R. N.; et. al. B-cell depletion extends the survival of GTKO.hCD46 Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months. *American Journal of Transplantation* (2012), 12(3), 763-771.
16. Kumar, Goutham; Hara, Hidetaka; Long, Cassandra; Shaikh, Humza; Ayares, David; Cooper, David K. C.; Ezzelarab, Mohamed. Adipose-derived mesenchymal stromal cells from genetically modified pigs:

- immunogenicity and immune modulatory properties. *Cytherapy* (2012), 14(4), 494-504.
17. Ekser, Burcin; Klein, Edwin; He, Jing; Stolz, Donna B.; Echeverri, Gabriel J.; Long, Cassandra; Lin, Chih Che; Ezzelarab, Mohamed; Hara, Hidetaka; Veroux, Massimiliano; et. al. Genetically-engineered pig-to-baboon liver xenotransplantation: histopathology of xenografts and native organs. *PLoS One* (2012), 7(1), e29720.
18. Ekser Burcin; Bianchi John; Ball Suyapa; Iwase Hayato; Walters Anneke; Ezzelarab Mohamed; Veroux Massimiliano; Gridelli Bruno; Wagner Robert; Ayares David; et. al. Comparison of hematologic, biochemical, and coagulation parameters in α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs, wild-type pigs, and four primate species. *Xenotransplantation* (2012), 19 (6), 342-54.
19. Ezzelarab Corin; Ayares David; Cooper David K C; Ezzelarab Mohamed B. Human T-cell proliferation in response to thrombin-activated GTKO pig endothelial cells. *Xenotransplantation* (2012), 19 (5), 311-6.
20. Yazaki Satoko; Iwamoto Masaki; Onishi Akira; Miwa Yuko; Hashimoto Michiko; Oishi Takatsugu; Suzuki Shunichi; Fuchimoto Dai-ichiro; Sembon Shoichiro; Furusawa Tadashi; et. al. Production of cloned pigs expressing human thrombomodulin in endothelial cells. *Xenotransplantation* (2012), 19 (2), 82-91.
21. Semaan Marwan; Kaulitz Danny; Petersen Bjorn; Niemann Heiner; Denner Joachim. Long-term effects of PERV-specific RNA interference in transgenic pigs. *Xenotransplantation* (2012), 19 (2), 112-21.
22. Kemter Elisabeth; Lieke Thorsten; Kessler Barbara; Kurome Mayuko; Wuensch Annegret; Summerfield Artur; Ayares David; Nagashima Hiroshi; Baars Wiebke; Schwinzer Reinhard; et. al. Human TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate

- human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation* (2012), 19 (1), 40-51.
23. Hemann Michelle; Shen Hui-Gang; Beach Nathan M; Meng Xiang-Jin; Halbur Patrick G; Opriessnig Tanja. Expression of human CD46 has no effect on porcine circovirus type 2 infection and shedding in the experimental pig model. *Veterinary research communications* (2012), 36 (3), 187-93.
24. Zhao, Jie; Xu, Jianxiang; Wang, Jianwu; Zhao, Yaofeng; Zhang, Lei; He, Jin; Chu, Mingxing; Li, Ning. Impacts of human lysozyme transgene on the microflora of pig feces and the surrounding soil. *Journal of Biotechnology* (2012), 161 (4), 437-444.
25. Sun, Yu-ling; Chang, Yuo-sheng; Lin, Yin-shen; Yen, Chon-ho. Pilot production of recombinant human clotting factor IX from transgenic sow milk. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2012), 898, 78-89.
26. Watanabe, Masahito; Kurome, Mayuko; Matsunari, Hitomi; Nakano, Kazuaki; Umeyema, Kazuhiro; Shiota, Akira; Nakauchi, Hiromitsu; Nagashima, Hiroshi. The creation of transgenic pigs expressing human proteins using BAC-derived, full-length genes and intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer. *Transgenic Research* (2012), 21(3), 605-618.
27. Choi Myoung-Seob; Shim Mi-Ran; Oh Mi-Yun; Kim Kyung-Woon; Lee Hwi-Cheul; Yang Byoung-Chul; Chung Hee Kyoung; Kim Jin-Hoi; Lee Hoon-Taek; Hwang In-Sul; et al. Proteins associated with reproductive disorders in testes of human erythropoietin gene-harboring transgenic boars. *Theriogenology* (2012), 78(5), 1020-9.
28. Prather, Randall S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus resistant animals. *PCT Int. Appl.* (2012), WO 2012158828 A1 20121122. (國際特許)
29. Chen, Chuangfu; Ouyang, Hongsheng; Qiao, Jun; Saiwu, Jiafu; Ma, Shiwei; Wang, Pengyan. Preparation of

- transgenic pigs carrying integral Type O foot-and-mouth disease virus shRNA. Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102703392 A 20121003. (中国特許)
30. By Liu, Xiangtao; Chen, Yan; Tian, Hong; Wu, Jinyan; Shang, Youjun; Yin, Shuanghui; Wang, Guangxiang; Jin, Ye; Zhang, Keshan; Yang, Shunli; et al. Method for preparing RNAi inhibiting replication of classical swine fever virus. Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102660544 A 20120912. (中国特許)
31. Zhou, Rui; Yang, Xi. Method for breeding transgenic pig with overexpression of PBD-2 gene. Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102517329 A 20120627. (中国特許)
32. He, Hongbin; Wang, Hongmei; Wu, Jianming; Liu, Lan; Lv, Yang; Yang, Hongjun; Song, Lingling; Sun, Tao; Gao, Yundong; Hou, Minghai; et. al. Method for obtaining anti-FMD transgenic goat or pig by knocking out foot-and-mouth disease virus (FMDV) receptor integrin $\beta 6$ subunit gene. Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102492685 A 20120613. (中国特許)
33. Bao, Yonghua; Guo, Yongchen; Li, Qiuyan; Tang, Bo; Li, Ning. Expressing shRNA specific to PRRSV genes for prevention of porcine reproductive and respiratory syndrome in pigs. PCT Int. Appl. (2012), WO 2012071762 A1 20120607. (国际特許)
34. Qian, Ping; Li, Xiangmin; Chen, Huanchun. Method for cloning and breeding transgenic pigs expressing IFITM3 gene. Faming Zhuanli Shenqing (2012), CN 102391990 A 20120328. (中国特許)
35. Zhang, Peng; Zhang, Yidi; Dou, Hongwei; Yin, Jingdong; Chen, Yu; Pang, Xinzhi; Vajta, Gabor; Bolund, Lars; Du, Yutao; Ma, Runlin Z. Handmade Cloned Transgenic Piglets Expressing the Nematode Fat-1 Gene. Cellular Reprogramming (2012), 14 (3), 258-266.
36. Hua, Wen-jun; Liu, Xi-mei; Cheng, Ni; Qiao, Xian-feng; Zheng, Xin-min. Hereditary characters and gene flow of