

いずれも *ctxB* 遺伝子は検出されず、no insert であることが判明した。

さらに、コピー数が 1 と見積もられた line の一部について、オリジナル（元試験管）が同じ line について *ctxB* 遺伝子の導入コピー数を realtime-PCR 法で求めたところ、いずれの分割株もコピー数は 1 と見積もられた。これは、元の試験管培養物がキメラであった可能性が低いことを示すものである。

登熟過程穎果における *ctxB* 遺伝子の発現解析

種子（コメ）登熟過程における、*ctxB* 遺伝子の発現の有無は、コメにおける *ctxB* タンパク質生産を確認する指標となる。今回、供試した 3 系統の *ctxB* 遺伝子のコピー数は #1-6-1 系統 3 コピー、#1-7-1 系統 1 コピー、#2-4-1 系統 7 コピーであったが、*ctxB* 遺伝子の強い発現が確認されたのは #1-6-1 系統、また、弱い発現が確認されたのは #2-4-1 系統であった。#1-7-1 系統では発現は確認されなかった。

GM 植物における、導入遺伝子の発現能は、ゲノム上の導入遺伝子の挿入部位や、コピー数、サイレンシングの有無などの条件によって左右される。今回の試料においても同様の事象が発生していると考えられる。

CtxB イネにおける稲穂及びコメの生育状況

CtxB 遺伝子を導入した系統と、野生型株 (WT) における稲穂の生育状況を比較した。両者において、生育良好な稲穂と不良な稲穂の数を計数したところ、WT の 10 系統の生育良好穂数の平均値は 14.3 であったが、#1-6-1 系統では生育良好穂数は 7 と WT の平均値を下回り、一方、#1-7-1 系統では 22 であり、WT の平均値を上回った。#2-4-1 系統では生育良好な穂は得られなかった。

つぎに、稲穂の成長と導入遺伝子のコピー数との相関について解析を行った。コピー数の明らかになった各系統の代表株について、コピー数と稲穂の生育良好穂数の相関を解析した結果、導入コピー数が高くなると、生育良好穂数が減少する傾向（相関係数 $r=-0.556$ ）が認められた。また、稲穂の成長にはグロースチャンバーの密植の影響もあると考えられたため、同じ株について、栽培位置（換気の良い通路側か壁側か）と稲穂の生育良好穂数との相関について検討したところ、通路側の方が稲穂の成長がよい傾向が認められた。コメ（種籾）の生育状況については、

稲穂の生育状況と同様に、栽培位置の影響が大きいとみられ、通路側の方が、コメの成長がよい傾向であることが判明した。

自殖後代 (T_1) 種子における遺伝子導入の確認

CtxB 遺伝子が 3 コピー導入されていた #1-6-1 系統と同系列の #1-6-* 系統の種子（コメ）各 1 粒について *ctxB* 遺伝子の導入を確認したところ、#1-6-2 以外では PCR で陽性となり、導入が確認された。#1-6-2 のみが非検出であったため、#1-6-2 系統の種子、さらに 4 粒について同様に調査したところ、これらはいずれも *ctxB* 陽性であった。これは、 T_1 世代で、*ctxB* 遺伝子が遺伝的に分離したことを示すものである。

コメからのタンパク質調製法の検討

PBS-T (phosphate buffered saline, pH=7.4, 0.05% Tween20) または TBS-T (Tris-buffered saline, pH7.6, 0.05% Tween20) の 2 種のバッファーで、コメ（あきたこまち、市販品）粉砕試料約 100 mg または約 250 mg より、抽出時間 5 min.、3 hr.、16 hr. でタンパク質抽出を行い、それぞれの抽出効率を求めた。その結果、PBS-T の方が TBS-T よりも抽出効率がよいこと、また、サンプル量（コメ粉末量）は少量（約 100 mg）の方が抽出効率がよい一方、抽出時間（静置時間）延長の抽出効率向上に対する効果は少ないことが明らかになった。

競合 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の定量

ウェルに固相化する *ctxB* タンパク質量及び、anti-*ctxB* 一次抗体の濃度を振り、最適と考えられる吸光度が得られる固相化 *ctxB* タンパク質量及び、anti-*ctxB* 一次抗体濃度を、固相化抗原 (*ctxB*, コーティング) 量 50 ng/well、一次抗体 (mouse anti-*ctxB*) 濃度 0.5 μ g/mL と決定した。決定した抗原-抗体濃度で、標準 *ctxB* タンパク質を用い、一次抗体と共に加える *ctxB* (標準物質) の濃度を振って、検量線を作製した。競合抗原は blocking buffer、または、PBS-T で希釈して加えた。

その結果、競合抗原は blocking buffer で希釈すると、抗原（固相化）に対する競合抗原の量が等量以上になると吸光度が上昇し、競合抗原 (*ctxB*) 量と阻害率 (B/B0%) の関係を直線として得ることができなかった。そこで、競合抗原を PBT-T で希釈して加えたところ、競合抗原が過剰な領域における吸光度の上昇はみられなくなった。以上の結果から、以後

PBS-T で競合抗原を希釈することに決定し、定量を試みたが、非組換え体 WT#5 株と *ctxB* 遺伝子の導入を確認済みの組換え体#1-6-1 株のコメ粉末のタンパク質抽出液間で顕著な相違は認められず、*ctxB* タンパク質の検出はできなかった。

直接 ELISA 法による *ctxB* タンパク質の検知

Tween を除いた抽出バッファーを使用し検体を調製したところ、*ctxB* 標準品を固相化した well ではシグナルが検出されたが、コメ抽出試料についてはいずれも非組換え体 WT#5 及び #8 由来の試料と同じレベルであり、発現・蓄積した *ctxB* によるシグナルは検出できなかった。

T₁ 世代種子 (コメ) 1 粒またはコメ粉末を検体とする *ctxB* 遺伝子の検知

CtxB 遺伝子が 3 コピー導入されていた #1-6-1 系統と同系列の #1-6-3 系統について 8 粒のコメを独立に *ctxB* 遺伝子の検知を行ったところ、全てで陽性であった。同様に #1-7-1 系統では 8 粒中 7 粒が陽性で、#2-4-1 系統では 4 粒中 3 粒、#2-4-3 系統では 4 粒中 4 粒が陽性であった。なお、対照として検知を行った構成遺伝子 *DSH1* のプロモーター領域 *DSH1p* については全検体で増幅産物が認められた。なお、*ctxB* 遺伝子導入体の T₁ 種子において、*ctxB* 遺伝子が検出されない場合があるのは、T₀ 世代の後代としてメンデル則的に分離しているためと考えられる。以上のように *DSH1p* 遺伝子を対照として、導入した *ctxB* 遺伝子を特異的に検知可能な PCR 法を確立した。

同様に各系統のコメ粉末 (すなわち、コメの混合物) より調製したゲノム DNA について PCR を行ったところ、T₀ 世代での解析結果と矛盾なく、WT#5 及び #2-10-1 系統では、*ctxB* 遺伝子は検出されず、他の系統では陽性となった。なお、陽性対照の *DSH1p* 遺伝子は全系統で陽性となった。

T₁ 世代種子 (コメ) 1 粒を検体とする *ctxB* 遺伝子コンストラクトコピー数の解析

コメ粉末より調製したゲノム DNA を鋳型とした *DSH1p* 遺伝子及び *ctxB* 遺伝子のリアルタイム PCR の増幅曲線は、サイクル数の増加に応じた指数関数的な増幅を示し、また融解曲線、増幅産物はそれぞれ単一ピークとなり、プライマーの設計や PCR 条件等に問題がないことが確認された。

この条件で、コメ 1 粒またはコメ粉末より調製したゲノム DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行った。これらの増幅曲線について、基準とする *DSH1p* 遺伝子と解析対象である *ctxB* 遺伝子の Ct 値の差 (ΔCt 値) を求め、さらに、基準とする (ここでは #1-7-1-1) との ΔCt 値の差 ($\Delta \Delta Ct$ 値) を求め、存在比を求めた。

上述の $\Delta \Delta Ct$ 法により、非組換え体 (WT#5) を含む T₁ 世代種子 (1 粒由来サンプル) 5 系統、各系統 4 粒におけるリアルタイム PCR 法による *ctxB* 遺伝子のコピー数を解析した結果、導入コピー数は WT#5 及び #2-10-1 系統の 0 から、#2-4-3-2 の 15 コピーまで、同一系統でも種子検体ごとにバリエーションに富むことが明らかになった。一方、T₁ 世代種子 (コメ粉末サンプル) におけるコピー数解析の結果、粉末と鋳型とした場合は、導入コピー数は、各コメ粒のものが平均化され、WT#5 及び #2-10-1 系統では 0 であったが、#1-6-3 系統では 3.1、#1-7-1 系統では 0.9、#2-4-3 系統では 9.6 と求められた。

T₀ 世代において導入遺伝子が認められなかった (0 コピー) WT#5 系統及び、#2-10-1 系統の T₁ 世代種子はすべて、*ctxB* 遺伝子の増幅が認められず、すなわち、0 コピーと判断され、同様にこれら 2 系統については、粉末を試料とした場合も 0 コピーと判断された。T₀ 世代において導入遺伝子のコピー数が 1 と推定された #1-7-1 系統では、T₁ 種子 (1 粒別) では 1 コピーが 3 粒、2 コピーが 1 粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の *ctxB* 遺伝子のコピー数は 0.9 と見積もられた。なお、これらの結果は、いずれもコメ 1 粒検体 #1-7-1-1 に存在する *ctxB* 遺伝子のコピー数を 1 として求めたものであり、homo であるか、または hetero であるかを考慮していないため、厳密には「コピー数」ではなく「*DSH1p* 遺伝子に対する遺伝子存在比」である。この点を勘案すると、#1-7-1 系統では、自殖交配により、T₁ 世代で 2 コピーの検体は homo になっていたものと考えられる。

T₀ 世代において同じ系統 #1-6-1 の導入遺伝子のコピー数が 3 と推定された #1-6-3 系統では、T₁ 種子 (1 粒別) では 2 コピーが 1 粒、4 コピーが 2 粒、6 コピーが 1 粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の *ctxB* 遺伝子のコピ

一数は 3.1 と見積もられた。コメ粒での結果を見ると、#1-6-3 では#1-6-3-1 では 6 コピーとすべて homo 化したと考えられ、4 コピーの #1-6-3-2 及び#1-6-3-3 では、一部が homo 化したと考えられる。一方、#1-6-3-4 では 2 コピーとなり、一部脱落が生じたものと考えられる。

T₀ 世代において同じ系統#2-4-1 の導入遺伝子のコピー数が 7 と推定された#2-4-3 系統では、T₁ 種子 (1 粒別) では 2、6、11、15 コピーが各 1 粒であり、本系統の粉末を検体とした場合の *ctxB* 遺伝子のコピー数は 9.6 と見積もられた。この系統では、hetero 化及び homo 化の両者が進んでいると考えられる。

以上のように、コメ 1 粒またはコメ粉末より調製したゲノム DNA 試料について、*DSH1p* 遺伝子の存在比を基準としたリアルタイム PCR 法により、*ctxB* 遺伝子の存在比を見積もることができた。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

(1) 文献調査

PubMed と SciFinder を利用した 2008-2012 年に発表された論文と特許の検索では非食用モダン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 20 報、10 報、70 報が該当した。

非食用 GM 魚の検索結果

該当した 20 報はバイオリクター (4 報)、病原菌への耐性付与 (6 報)、環境ストレスへの耐性付与 (1 報)、環境モニタリング (7 報)、観賞用 (2 報) の 5 つのカテゴリーに分類できる。バイオリクターのカテゴリーでは 4 報中の 3 報がカナダから報告されており、インシュリンを生産させていた。病原菌への耐性付与のカテゴリーでは様々な導入遺伝子が使われていた。環境モニタリングのカテゴリーにおいては GFP が導入遺伝子として頻繁に利用されていた。非食用 GM 魚の全体で報告を開発国別に分類すると、報告の多い国は台湾 (6 報)、米国 (3 報)、カナダ (3 報) となった。魚の種類に注目すると、ゼブラフィッシュとメダカを利用した報告が多かった。食用に供する魚としてはティラピアを利用した報告が 3 報あった。

非食用 GM ニワトリの検索結果

該当した 10 報はバイオリクター (8 報) と病原菌への耐性付与 (2 報) の 2 つのカテゴリーに分類されて、バイオリクターの報告が多かった。バイオリクターのカテゴリー中では様々な有用な組換

えタンパクを生産させることを目的としているが、ヒトエリスロポエチンを生産させた論文が 3 報あった。非食用 GM ニワトリの開発国は日本 (5 報)、韓国 (2 報) で報告が多かった。

非食用 GM ブタの検索結果

該当した 70 報は臓器移植用 (51 報)、バイオリクター (10 報)、環境浄化 (1 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、臓器移植用の報告がかなり多かった。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 $\alpha 1,3$ -galactosyl transferase 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 4 国は、米国 (29 報)、中国 (12 報)、ドイツ (10 報)、韓国 (8 報) となった。臓器移植用のカテゴリーについて開発国ごとに分類すると、51 報中の 26 報を米国、10 報をドイツが占めた。臓器移植用以外のカテゴリーについて開発国ごとに分類すると、20 報中の 12 報を中国が占めた。2012 年に発表された非食用 GM ブタについて注目すると、2012 年は利用したデータベースがそれ以前と異なるので、単純な比較はできないが、中国 (11 報)、米国 (10 報) において報告数が増えている。

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) LoxP 配列の検知

LoxP 配列を検知するためのアダプターライゲーション法について種々の条件を変えて試した。GM と非 GM のゲノミック DNA を材料としたときの増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって分析すると、スメアが検出されて2つのサンプルで同様のパターンになってしまった。非特異的な増幅が多いようであった。GM のゲノミック DNA を使ったときだけに増幅される DNA 断片は得られなかった。

(3) 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

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。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。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。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非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

トマトに関しては、今回の実態調査で検出された P35S 擬陽性検体は、P35S と CaMV 検出用プライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR の Ct 値を比較し、ほぼ同量のコピー数含まれていることが確認されたため、CaMV 混入であることが示唆された。P35S と CaMV 検出用のプライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR の Ct 値を比較することにより、GM 擬陽性検体か CaMV 混入によるものかを判別することが可能となった。

GM ジャガイモの混入を検査するための新しい検知法を開発するにあたり、ジャガイモ加工食

品から得られるDNAの評価を行った。生鮮ジャガイモ 10 品種、ポテトスナック 4 製品、冷凍ジャガイモ 3 製品、乾燥ジャガイモ 3 製品、ジャガイモデンプン製品 7 製品、調理済みジャガイモ惣菜食品 4 製品、ジャガイモデンプンを加工した加工食品 4 製品をそれぞれ粉砕し、DNA 抽出・精製を行い、分光光度計を用いて DNA 回収量及び精製度を測定した。その結果、ジャガイモデンプンとジャガイモデンプンを加工した加工食品から得られる DNA の低い精製度の問題は、DNA の回収量の低さに起因するものと考えられた。ジャガイモデンプンより加工された食品は、サンプルを溶解させるために使用する緩衝液(G2 バッファー)に難溶であるため、他の加工食品のサンプリング量の 6 ~ 8 割(6~8 g)に抑えたためと考えられた。また、ジャガイモデンプンは、製造工程において物理的に DNA が分解されるような製造工程が多く 10 段階以上もの工程を経た非常に加工度の高い製品である。そのため、ジャガイモデンプンを使用した加工食品より DNA を抽出しにくいと考えられた。その他のジャガイモ加工食品からは、1 g あたりのサンプリング量から 1 µg 以上の DNA を得ることが可能であることが示唆された。DNA の精製度については、その製造工程の複雑化によって低く見積もられることが考えられた。ジャガイモ加工食品から抽出精製される DNA 断片長に関して調査を行った結果、ジャガイモスナック菓子、冷凍ジャガイモや乾燥ジャガイモは製品によって差はあるものの全て 301~401 bp まで増幅産物を得られた。一方で、ジャガイモデンプンやジャガイモデンプンを加工した製品は 51~101 bp まで増幅産物を確認することが可能であった。つまり、製造加工工程における熱、冷却、圧力、粉砕、乾燥及びその他の物理的な加工工程の要素によって 51~101 bp 程度まで断片化されていることが示唆された。上記の考察を踏まえ、プロモーターやターミネーター領域などの組換え DNA セグメント、作物内在性遺伝子等を標的に検知するリアルタイム PCR 法により、GM ジャガイモの検出は可能であることが考えられた。

ジャガイモ加工食品への GM ジャガイモの混入を検査するスクリーニング試験法の開発を検討した。増幅断片長を 50~100 bp としたジャガイモ内在性遺伝子の UGPase 及び GM ジャガイモの構造遺伝子に汎用される遺伝子を検知するためのリアルタイム PCR 用のプライマー・プローブを設計し、GM ジャガイモ混入検査を行うことが可能であ

ることが示唆された。また、増幅断片長を短く設計することで増幅効率を向上させ、リアルタイム PCR の感度を向上させることが可能であると考えられた。

また、GM ジャガイモ混入に関する擬陽性判定を防ぐため、GM ジャガイモ検知法は、ジャガイモ内在性遺伝子検知法よりも高感度であることが求められる。本研究では、検出限界(LOD)は、UGPase については 2,500 コピー、Tnos・P35S については 12.5 コピーであることが示唆された。定量下限(LOQ)は、UGPase では 250 コピー、Tnos、P35S では 12.5 コピーであった。Tnos と P35S の検出感度は UGPase よりも高いことから、GM ジャガイモのスクリーニング法に適合していることが示唆された。

実際に市販されているジャガイモ加工食品に意図しない GM ジャガイモの混入を検査するため、開発した GM ジャガイモのスクリーニング検査を行った。その結果、検査を行った全てのジャガイモ製品に GM ジャガイモは検出されず、Tnos や P35S の検査で高い Ct 値(38 以上)を検出した製品については、食品へのバクテリアやウイルスの汚染によることが考えられた。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

1. 微生物組換え体に関する情報収集

バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、平成 21 年度までの 3 年間に行われた研究により、研究用・商業的に入手可能な市販の大腸菌用のベクター、研究用に開発された乳酸菌用発現ベクター、枯草菌と酵母のベクターに関して一覧表を作成して、ほぼ網羅的にデータベース化を行ったが、その後追加された情報について文献調査や web 等を用いて情報収集を続けた。これらはそのほとんどが研究用に用いられているため、食品への混入のリスクはそれほど高くないと思われた。GM 微生物として実際に使用段階であるものとしては、食品添加物の生産に用いられる GM 細菌や、ワクチンなどの医療用途に用いられる組換え微生物がある。本年度は、国内の食品添加物用途や医療用として既に使用が認可されている微生物組換え体について整理した。

実用化されている組換え体に関する情報収集では、国内で既に評価を終了し、官報で公表されている添加物 14 を一覧とした。これらについては、企業保護の立場から、細かい情報までは公開されていない。これまでに食品安全委

員会で、GM 添加物として審議中ないしは、審議が終了したものは7件であった。

医療用途としては、食品安全委員会動物用医薬品調査会で審議中の GM ワクチン1件、また、ヒトの医療用として日本で承認された GM 医薬品・細胞培養医薬品リストを作成した。このリストは、国立感染症研究所の生物製剤部がまとめた医薬品リストから、GM と明記されている医薬品のみを選別した。酵素 11 件、血液凝固線溶系因子 5 件、血清タンパク質 1 件、ホルモン 22 件、ワクチン 4 件、インターフェロン類 7 件、エリスロポエチン類 4 件、サイトカイン類 6 件、抗体 16 件、融合タンパク質 2 件の合計 78 件があった。

海外の GM ワクチンの研究状況について情報収集を行ったが、ウイルスワクチン研究は盛んであるが、細菌を用いた GM ワクチンの実用化は見えていないように思えた。この中で、乳酸菌を組換え体を抗原運搬体とする経口粘膜ワクチンは注目されており、研究論文数も多い。

海外の情報収集として、平成 22 年度にスロバキアで開催された International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics に参加し、乳酸菌を用いた GM ワクチンの研究状況について情報収集を行った。

このシンポジウムでもプロバイオティクス乳酸菌の安全性に関する議論が行われ、生きた乳酸菌の安全性をどのような観点で行うか考えるべきかをはっきりとさせるべきだとされた。また組換えなどを利用し新たに開発される乳酸菌の安全性については、国際的な安全性に関するコンセンサスが必要であると議論されていた。生きたままの遺伝子組換えの安全性をどのように考えるかは、最も重要な課題であると思われた。

国内の学会としては、腸内細菌学会、日本乳酸菌学会に参加し、情報収集を行った。日本乳酸菌学会では、乳酸菌を抗原運搬体とする GM 経口粘膜ワクチンの研究動向について口頭発表を行った。この分野の研究は世界的にも注目されており、GM 微生物の安全性の問題が解決されれば実用化が進むものと思われる。

海外における GM 微生物研究は急速に進んでいる一方で、多くの場合は研究段階である。また実用化されている GM 微生物では主に閉鎖系における物質生産に利用されており、生菌

が環境中に放出する可能性は低い。

GM 微生物に関して、生きている GM 微生物の安全性並びに環境への放出のリスクに関する方向性が決まっていないため、開放系で用いられることを前提とした GM 微生物の実用化は遅れていると思われる。したがって、環境中から GM 微生物が検出されるとすると、実験段階の GM 微生物が漏出した場合や、正規の扱いを受けていない組換え体の可能性が高いと思われる。このような遺伝子組換え体は、組換えに関する情報が不明であるため、当該組換え体を検知することは容易ではない。そこで、遺伝子組換えのマーカースとして広く用いられている耐性遺伝子に着目してこのような組換え微生物を検出する方法の検討は重要であると考えている。

2. モデル組換え体

ゲノム DNA にエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ery*) を組込んだ *L. casei* IGM232 株とエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ermC*) をプラスミド上に保持する *L. casei* IGM393 株の 2 株を用いた。標的とした遺伝子は、組換え体(IGM232)株やプラスミド上には 1 コピーのみ存在することを確認した。今回実験を用いるうえで、大変使いやすいモデル組換え体であった。

3. GM 微生物の検知技術の検討

GM 微生物の定量的検知法に関し検討を進めた。平成 22 年度は、モデル組換え体として乳酸菌を用い、定量 PCR を行い評価した。定量 PCR のブランクにいくつか非特異増幅が認められた。この非特異反応については原因を調べているが未だ結論に至っていない。非特異反応の影響を受けない範囲を検討したところ、スタンダード遺伝子の定量において、Ct 値 = 31.3 で正確な定量が可能であるため、これ以外の領域を定量可能範囲とした。

1 つの GM 細菌あたり 1 コピーしか持たない遺伝子を標的とした場合と、プラスミドなどの複数コピー存在する遺伝子を標的とする場合では、期待したとおり複数コピー存在する場合の検出感度が高かった。

また、豚肉に接種後直接分析した結果より、組換え乳酸菌においても、組換え大腸菌と同様、本方法で GM 微生物を定量的に検知することが可能であることが示された。

豚肉に接種後、MRS 培地で 24 時間増菌し

た場合、豚肉に存在していた低レベルの共雑菌の増殖が認められ、エリスロマイシン遺伝子陽性結果が得られることがわかった。これは、検査対象の乳酸菌組換えの体の定量分析の妨げとなった。この結果は、自然界に存在した菌が探知対象とするエリスロマイシン耐性遺伝子を元々保持していたのか、またはエリスロマイシン耐性遺伝子を増菌培養中に組換え体から獲得したものである可能性もあるため、遺伝子配列の確認を必要とした。

平成 23 年度は、グラム陽性菌で頻繁に用いられているマーカーであるエリスロマイシン遺伝子を標的として、組換え微生物の定量的検知法に関し検討を進めた。モデル組換え体として乳酸菌を用い、豚肉に接種後定量 PCR を行い評価した。

接種直後において 1 つの GM 細菌あたり 1 コピーしか持たない遺伝子を標的とした場合を比べてみると、ほぼ同じコピー数まで検知できることが明らかになった。認められる約 2 倍の差は PCR 効率の差によるものと考えられる。接種菌数とコピー数について検討してみると、 6×10^4 cfu/g 接種し、*ery* 遺伝子を標的とした場合、PCR の反応チューブあたり菌が 30 個存在したことになり、この時のコピー数は 41 コピーとなり両者に大きな差は認められず、元の遺伝子数を反映していた。

また、プラスミドなどの複数コピー存在する遺伝子を標的とする場合では、当然複数コピー存在する場合の検出感度が高く本方法で定量的に検知することが可能であることが示された。しかしながら、豚肉に接種後、MRS 培地で 24 時間増菌した場合、豚肉に存在していた低レベルの耐性菌の増殖が認められ、これらの菌は少なくともエリスロマイシン耐性を示す *ery* 遺伝子および *ermC* 遺伝子を保有していた。エリスロマイシン耐性遺伝子について調べてみると、本研究で検討した *ery* および *ermC* は、リボソームメチル化に関連する *erm* 遺伝子群の一つであり、*ery* は *erm(B)* 遺伝子であった。

erm 遺伝子の中で組換え体によく利用されている *ery* (*erm(B)*) 遺伝子と *erm(C)* 遺伝子の相同性について調べた結果、相同性は 59% と低かった。組換え体検知の一次スクリーニングとして *erm* 遺伝子群のユニバーサルプライマーの設計についても検討したが、*erm* 遺伝子群のホモロジーレンジはさらに広く、共通領

域は見つからなかった。また、組換え体マーカーとして利用される頻度は低い、薬剤排出亢進にかかわる遺伝子として *msr* 遺伝子や *mef* 遺伝子等も報告されており、スクリーニングには、それぞれのプライマーセットが必要であると考えられる。エリスロマイシン耐性遺伝子は予想以上に多く、近年の報告においても新たな遺伝子が増えられている。それらが組換え体由来であるか判定することは容易ではなく、今後、プロモーターや制限酵素サイトなど、他の領域を組み合わせて検討を行っていく必要があると思われる。

乳酸菌のモデル組換え体を食肉に添加し、定量 PCR 法により定量的な検知が可能であるか検討した。グラム陽性菌の組換え体にしばしば用いられる 2 種類のエリスロマイシン耐性遺伝子を標的として検知法を検討した。ゲノム上に挿入した “*ery*” とプラスミド上にコードする “*ermC*” のそれぞれのモデル組換え体を用いた検討により、純培養では定量的な検知が可能である方法を開発した。

一方、食肉に添加した後検知可能であるかを検討した結果、自然界に存在する耐性菌の影響を受け、結果が不安定となった。添加回収実験を行った食肉からは、2 種のエリスロマイシン耐性遺伝子を保有する常在菌が分離された。それぞれ *Staphylococcus* spp. 及び *Streptococcus* spp. が分離できたことから、食品や環境中にこのような耐性菌が広く分布しているものと思われた。食品や環境から GM 細菌を検知するためには、耐性マーカー遺伝子単独では不十分で、更に 1 つ以上の組換え体に固有と思われる遺伝子を対象として評価をする必要があると思われ、頻度高く用いられるプロモーター配列などについて検討した。複数の遺伝子の組合せにより組換え体と思われる微生物を絞り込んでゆくことは可能である。これらの候補から、挿入配列と思われる遺伝子情報を解読することにより、探知の可能性は高まる。一方、細菌の遺伝子組換えでは、ダブルクロスオーバー法による特定の箇所への遺伝子組換えが可能であり、この方法を用いた場合、遺伝子組換えの痕跡を残さず、組換え体を取得することが可能である。このような組換え体では、遺伝子組換えが行われたかどうかを判定することは難しいと思われる。このような場合は、挿入遺伝子の情報が無いと探知は困難である

と思われる

複数の遺伝子を標的として評価する方法としては、メンブレン上に集落を形成させた後、コロニーハイブリダイゼーションを行うことは有用であると思われる。スパイラルプレーターを用いて調製したコロニーリフトはメンブレン上に均一コロニーを出現させることが可能でプローブによる検出シグナルの位置関係の特定が簡単にできた。今回確立した方法はメンブレンリフトが上手くいかない場合には、有用な方法であり、他の菌種にも応用できると考えられる。

コロニーの変性は菌種によって、NaOH を用いた変性処理の他にリゾチウムや SDS を加える等の条件検討が今後必要であると考えられる。豚肉より単離されたエリスロマイシン耐性菌は一部の菌で Probe ermB、Probe ermC の両方で検出されるコロニーが認められたが、ほとんどが Probe ermB か Probe ermC で検出された。Probe MCS は、*L. casei* IGM393 だけでなく、*L. casei* IGM232 に対して交差性を示した。*L. casei* IGM232 に関しては、*ermB* 遺伝子を挿入する際に必要となるトランスポザーブルエレメントの配列についても確認したが、プローブとの類似配列は認められなかった。そのため、組換え体作出時にマルチクロニングサイトに類似した配列が組換えにより出現した可能性が示唆される。

今回の検討結果より、エリスロマイシン遺伝子とマルチクロニングサイトを検出するプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションを利用すれば生きた組換え微生物をスクリーニングすることが可能であると考えられる。しかしながら、近年、組換え体を作成するバイオテクノロジー応用技術は進歩しており、マルチクロニングサイトを残さない方法も確立されている。したがって、今回検討した方法でも、すべての組換え微生物を検出するには不十分であり、塩基配列の情報がない状況において GM 微生物を検知するのは容易ではないと考えられる。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

DNA マイクロアレイを用いて組換え遺伝子の検知を行うために、検出感度の向上を目的として標識方法について検討を行った。その結果、プライマー標識法ではなく、内部標識法を

用いること、また、標識の反応液量を増やすことで検出感度が向上することが確認された。また、ビオチンを用いてターゲット DNA を標識したのちに、蛍光標識されたアビジンや抗体を用いて検出を行った場合には、蛍光の増強が確認された。原理的には DNA デンドリマーを用いた場合には、1 分子あたり数百分子の蛍光色素で修飾されていることから蛍光強度が数百倍になるものと期待されたが、実際には数十倍程度の増幅であった。これは、デンドリマー分子が大きいために十分な分子同士の相互作用が十分に行われなかったことや、ターゲット DNA に対する分子数が十分量ではなかったことが考えられた。また、いずれの検出方法においても、SSIIb 遺伝子に比べて、ADH 遺伝子の検出感度が高い傾向が見られた。このことからプローブとして用いる DNA 塩基配列によって検出感度が異なる可能性が示唆された。

非食用の GM 植物は現在までのところ国内において流通はしていないが、開発自体はなされていることから、これらの組換え遺伝子の検知法を開発しておくことは重要であると考えられる。本研究では一つのモデルケースとして、生分解性プラスチックの原料である PHB 合成にかかわる遺伝子である *phbA*、*phbB* 遺伝子が、トウモロコシゲノムに混入した場合にマイクロアレイ法を用いて検知可能であるかについて検討を行った。その結果、それらの遺伝子断片がトウモロコシゲノム 30 μ g あたりに 1.0×10^8 コピー存在した場合に検出可能であることが判明した。この検出感度は昨年度までの報告から少なくとも混入率 100%であれば組換え *phb* 遺伝子を検知可能である感度であった。トウモロコシゲノムは約 23 億塩基対であり、食用となる主要な作物の中でもそのサイズが大きい。そのため、トウモロコシゲノムを用いて検出することが可能であれば、他植物への応用が十分可能であると期待される。そこで、日本国における主食であるコメについてマイクロアレイ法による組換え遺伝子の検出が可能であるかについて検討を行った。その結果、コメを用いた場合には組換えコメの混入率が 1% 程度であっても十分に検知可能であることが示唆された。これはコメのゲノムサイズは約 4 億塩基対程度であり、トウモロコシゲノムに比較して十分に小さいことからグラム当量の組換え遺伝子のコピー数が高くなったためであ

ると考えられた。

DNA マイクロアレイを用いて組換え遺伝子の検出を行うために、検出感度の向上を目的として標識方法について検討を行った。その結果、プライマー標識法ではなく、内部標識法を用いること、また、標識の反応液量を増やすことで検出感度が向上することが確認された。また、ビオチンを用いてターゲット DNA を標識したのちに、蛍光標識されたアビジンや抗体を用いて検出を行った場合には、蛍光の増強が確認された。原理的には DNA デンドリマーを用いた場合には、1 分子あたり数百分子の蛍光色素で修飾されていることから蛍光強度が数百倍になるものと期待されたが、実際には数十倍程度の増幅であった。これは、デンドリマー分子が大きいために十分な分子同士の相互作用が十分に行われなかったことや、ターゲット DNA に対する分子数が十分量ではなかったことが考えられた。また、いずれの検出方法においても、SSIIB 遺伝子に比べて、ADH 遺伝子の検出感度が高い傾向が見られた。このことからプローブとして用いる DNA 塩基配列によって検出感度が異なる可能性が示唆された。

本年度はマイクロアレイ解析を昨年度まで使用してきたイネ、トウモロコシの他に、比較的遺伝子組換えの報告例が多く流通量も多いと思われる、ジャガイモ、トマト、ダイズに適応することが可能であるかについて検討を行った。それぞれの植物種のゲノム DNA を特異的に検出するためのプローブを各遺伝子について 4 ~ 6 種類ずつ設計し、それらを固定化した DNA アレイを作製した。まず、これまでにサンプルとして使用実績のあったコメから抽出したゲノム DNA を用いてアレイ解析を行ったところ、内在性遺伝子と、組換え体においては組換え遺伝子が検出されることが判明した。しかし、同じ遺伝子上に設計したプローブでもその配列によって検出されるシグナルの強度が異なっていた。これは、それぞれの配列のハイブリダイゼーションの効率を反映しているものと考えられた。このアレイを用いて各植物種を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、コメではジャガイモのプローブと、ジャガイモではトマトのプローブとで交叉ハイブリが認められた。コメとジャガイモでは同じ遺伝子上に設計した 6 種類のプローブのうち 1 種類とだけで交差が見られたことか

ら、プローブ領域を検討することで、特異性を確保することが可能であることが示唆された。ジャガイモを用いた場合には、2 種類のトマト内在性の遺伝子検出用のプローブ 8 種類中 7 種類で交叉ハイブリが認められた。これは、ジャガイモとトマトが同属の植物種であることからゲノム配列上によく似た配列を多く含んでいるためであると考えられた。しかし、これらのらプローブのうち 1 種類では交叉シグナルが検出されておらず、このプローブを用いることで、トマトとジャガイモのゲノム DNA を区別することが可能であることが示唆された。

④医薬品用 GM 植物の検出法開発に関する研究

— 今回の調査から、医薬品用・環境浄化用 GM 植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国、カナダにおいては、急速に野外圃場栽培面積が減少し、医薬品類の生産は、一過的遺伝子発現システムを用いた閉鎖系栽培施設での生産に移行していることが判明した。その一方で、野外圃場栽培状況は不明であるが、本分野において中国での開発例が、ますます活発化していることが判明した。

ミラクリントマトについては、得られた果実数が WT で 2 個、MMMir で 1 個と芳しくない結果となった。これは施肥量の不足 (Hyponex® 500 倍液、週 1 回) が原因と考えられるため、施肥条件を検討する必要がある。

CtxB イネについては、T₁ 種子を取得するとともに、それらにおける *ctxB* 遺伝子の導入を確認することができた。これらは、T₁ 世代で分離していることが明らかになったため、当世代の育成の際には、播種後のなるべく早い段階で、葉からゲノム DNA を調製するなどし、PCR により *ctxB* 遺伝子の存否を確認する必要がある。グロースチャンパーにおけるイネの栽培では、密植の影響が問題となることがあらためて認識された。グロースチャンパー栽培では、イネ植物体周囲における換気、温度条件に注意しなくてはならない。

PCR 法により遺伝子導入を確認した *ctxB* 遺伝子導入株の T₁ 種子 (コメ) について総タンパク質を調製し、*ctxB* タンパク質の検出を試みたが、間接、直接 ELISA 法いずれにおいても検知することはできなかった。原因として、*ctxB* がタンパク質として生産、蓄積されていない可能性があるが、遺伝子は導入されており、また、*ctxB* イネ #1-6-1 系統及び、#2-4-1

系統についてはその種子の登熟過程における *ctxB* 遺伝子の半定量的な発現量解析から *ctxB* 遺伝子の発現を確認しているが、遺伝子発現からタンパク質の生産、蓄積に至る過程になんらかの問題がある可能性は否定できない。

今回、ELISA において、抗 *ctxB* モノクローナル抗体を使用したが、ポリクローナル抗体を使用することで、検知できる可能性があるため、今後検討したい。(e.g. Anti-beta subunit Cholera Toxin antibody (Rabbit, polyclonal) (ab34992, abcam)を Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody, Peroxidase labeled (074-1506, KPL)と共に使用。)

また、 T_1 種子 (コメ) の 1 粒を検体とする *ctxB* 遺伝子の検知法については、構成遺伝子である *DSH1p* 遺伝子のプロモーター領域 *DSH1p* を対照として使用することにより、安定した検知法として確立することができた。*CtxB* イネの T_1 種子取得にあたっては、 T_0 世代の葉より調製したゲノム DNA について、*DSH1p* を対照として、*ctxB* 遺伝子の存在比率を求めることにより、導入遺伝子コンストラクトのコピー数の見積りを行ったが、今回、種子 1 粒またはコメ粉末を検体として、リアルタイム PCR 法により、導入遺伝子コンストラクトの定量的な検出が可能なが示された。

⑤経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

(1) 文献調査

PubMedとSciFinderを利用して2008-2012年に発表された文献や特許を検索した結果、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20報、10報、70報であった。非食用 GM 魚、ニワトリの報告は少なく、ブタの報告が多いことが明らかになった。

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 51 報中 26 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 20 報中の 12 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 ブタについてカテゴリーに分類すると、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、非食用 GM ブタがフードチェーンへ混入する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主に使われており、これらは通常は食用としない種類である。食用に供する魚としてはテトラピアを利用した報告が 3 報あったが、報告数は少ない。以上から、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。

非食用 GM ニワトリについては報告数が 10 報と少なかった。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。

次に、非食用 GM 魚、ニワトリ、ブタの全体の報告 101 報を開発国ごとに分類すると、米国(33 報)、中国(15 報)、台湾(11 報)、韓国(11 報)、ドイツ(10 報)の上位5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。特に、米国からの報告が多いことが明らかになった。

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。

E. 結論

①非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

リアルタイム PCR を使用すれば、GM トマトに使用される可能性が高い P35S を高感度に検出することが可能であることが明らかとなった。また、本研究により、国内で市販されているトマト加工製品に CaMV のコンタミネーションによる擬陽性判定の結果が得られる可能性が示唆された。今後、リアルタイム PCR を使用して CaMV ゲノム配列の検出と CaMV 35S プロモーターの検出を同時に行い、得られる Ct 値の差を検出することで GM トマトの混入を調査することが可能であると考えられた。

現在、世界では多くの GM ジャガイモが開発されていることが報じられているが、日本で安全性が承認されているものは、米国産害虫抵抗性の GM ジャガイモのニューリーフみである。ニューリーフ・ジャガイモ (SPBT02-5 系統、Bt-6 系統、SEMT15-15 系統、SEMT15-02 系統、RBMT15-101 系統、RBMT21-350 系統) を検出するための定性 PCR 法の標的増幅産物は、111 bp 又は 117 bp に設定されており、その検知法は公定法として報告されている。加えて、我が国で未承認の GM ジャガイモの中で海外で作出報告のある品種は 3 種類程度存在する。そこで、意図しないこれらの GM ジャガイモのジャガイモ食品への混入をより高い精度で検査するための、GM ジャガイモ検出法の開発が求められていた。GM ジャガイモの検出法は、まずジャガイモ内在性遺伝子の検出を前提とし、ゲノム中に組み込まれた遺伝子の検出を必要とする。また、それらを検出する方法の特異性及び検出感度も重要である。本研究では、特異的、且つ高感度な GM ジャガイモをスクリーニングする検出技術を開発することができた。

我が国の GM 表示対象であるジャガイモ加工食品 6 種 (ポテトスナック、冷凍ジャガイモ、乾燥ジャガイモ、ジャガイモデンプン、調理済みジャガイモ惣菜食品、ジャガイモデンプンを加工した食品) から抽出・精製された DNA は、51~101 bp 程度まで断片化されていることが示唆され、リアルタイム PCR を用いて標的配列を検出することが可能であることが示唆され

た。GM ジャガイモに汎用される Tnos (過去データによると AV43-6-G7 系統には Tnos は含まれないとされているが、今回新たな調べにより全ての GM ジャガイモに Tnos が含まれるとされた) 及び P35S を特異的に検出するリアルタイム PCR 法を用い GM ジャガイモの混入を検査することが可能であることが示唆された。

ジャガイモ加工食品の GM ジャガイモ混入に関する実態調査を行った結果、GM ジャガイモの混入は認められなかった。

②非食用 GM 微生物の検知法開発に関する研究

モダンバイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。食品添加物製造用に用いられる GM 微生物や、医療用途に用いられる GM 微生物に関する情報収集を進めた。乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン開発が注目されはじめていることから、平成 22 年にはスロバキアで開催された International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics に参加し、GM 乳酸菌に関する研究成果を発表すると共に、GM 微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。平成 23 年度には、フランスで開催された国際酪農連盟の分析週間に参加し、微生物の検知法に関する会議に出席し情報収集を行った。その後、オーストリアで開催された腸内細菌に関する国際シンポジウムで乳酸菌組換え体に関する研究成果を発表すると共に、GM 微生物の検知法に関する情報交換を行った。

GM 微生物の定量的検知法の検討では、豚肉中に混入した乳酸菌モデル組換え体を用いて具体的な定量探知法について検討を行い、リアルタイム PCR 法で定量する方法を示した。

GM 微生物をスクリーニングするためのコロニーハイブリダイゼーション法を確立した。確立した方法で食品から組換え体を検知することが可能であるかを検討し、2つのプローブを用いた方法によりモデル乳酸菌組換え体を食品から検知できることが可能であった。

③工業原料用 GM 植物の検知法開発に関する研究

本研究では、増え続ける GM 植物からの多種類の組換え遺伝子の検出に、DNA マイクロアレイ法が適応可能であるかについて検討を行った。その結果、コメを材料とした場合には検出感度としては混入率数パーセント程度まで検出が可能であること、また、トウモロコシ

の場合には一粒から抽出したゲノムDNAを用いた場合でも組換え遺伝子を検出することが可能であった。また、ジャガイモについても適応可能な方法であり、本方法は多種植物種に適用可能であると期待される。

④医薬品用 GM 植物の検知法開発に関する研究

これまで医薬品用・環境浄化用 GM 植物の開発及び野外圃場栽培が活発であった米国、カナダにおいては、急速に野外圃場栽培面積が減少し、医薬品類の生産は、一過的遺伝子発現システムを用いた閉鎖系栽培施設での生産に移行していることが判明した。国内外での医薬品用・環境浄化用 GM 植物に関する研究・報告件数のうち、最近では、中国の報告が最も多くなってきていることが判明した。

本研究では、文献等調査研究の結果に基づき、検知対象 GMO のモデルとしてミラクリン生産トマト及びコレラトキシン B サブユニット生産イネを設定し、これらの研究試料としての供給系の構築を進めるとともに、組換え体検知法の開発を進めた。

ミラクリントマトについては、自殖後代の種子を得るとともに、無菌培養物を確立し、遺伝子検知モデル実験を行い、果実からの標的遺伝子の検知が可能であることを示した。

コレラトキシン B サブユニット生産イネ (ctxB イネ) については、イネグルテリンプロモーターで ctxB タンパク質を発現するコンストラクトを導入したイネ形質転換体の馴化栽培をグロースチャンバーで行い、realtime-PCR 法により導入遺伝子コピー数の解析を行うとともに、T₁ 種子 (コメ) を取得した。さらに ctxB イネの T₁ 種子 (コメ) を検体とする、免疫学的手法による ctxB タンパク質の検知法について検討するとともに、リアルタイム PCR を用いた、ctxB 遺伝子の定量的検知法について検討した。その結果、構成遺伝子である DSH1p 遺伝子の存在比率を基準として外来の ctxB 遺伝子のコピー数を求めることが可能な定量的検知法の確立に成功した。

以上のように、遺伝子またはタンパク質レベルでの検知実験に利用可能なモデル GM トマト及びモデル GM イネの、研究試料としての供給体制の構築を完了するとともに、組換え体検知法の基盤技術の整備を完了した。

⑤ 経口ワクチン用 GM 動物の検知法開発に関する研究

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、Cre/LoxP を応用した非食用 GM 動物の検知法を作成することを旨として LoxP 配列の検知法を検討した。さらに、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考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) 清水えり、布藤聡、増渕友子、峯岸恭孝、笠原正輝、穂山浩、手島玲子、日野明寛、真野潤一、古井聡、橘田和美、リアルタイム PCR による DNA 検査に好適なポリプロピレンチューブの選択方法、食品衛生学雑誌, 51, 43-47 (2010)
- 2) Oguchi, T., Onishi, M., Mano, J., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Furui, S., Kitta, K., Development of multiplex PCR method for simultaneous detection of four events of genetically modified maize, DAS-59122-7, MIR604, MON863 and MON88017, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 92-100 (2010)
- 3) Sato, Y., Akiyama, H., Matsuoka, H., Sakata, K., Nakamura, R., Ishikawa, S., Inakuma, T., Totsuka, M., Sugita-Konishi, Y., Ebisawa, M., Teshima, R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7180-7186 (2010)
- 4) Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S.B., Ulberth, F., Van Hengel, A.J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeung, J.M., Wehling, P., Taylor, S.L., Poms,

- R.E., Delahaut, P., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices, *Journal of AOAC International*, 93, 442-450 (2010)
- 5) Akiyama, H., Sakata, K., Spiegelhalter, F., Furui, S., Nakashima, A., Kitta, K., Teshima, R., Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 maize, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 65-70 (2010)
 - 6) Mano, J., Yanaka, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Improvement of polymerase chain reaction-based Bt11 maize detection method by reduction of non-specific amplification, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 32-36 (2010)
 - 7) Nakajima, O., Koyano, S., Akiyama, H., Sawada, J., Teshima, R., Confirmation of a predicted lack of IgE binding to Cry3Bb1 from genetically modified (GM) crops, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56, 306-311 (2010)
 - 8) 清木興介、織田浩司、柴原裕亮、蒲生玲子、有馬優美、酒井信夫、中村厚、安達玲子、塩見一雄、穂山浩、手島玲子、加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討、*食品衛生学雑誌*, 51, 133-138 (2010)
 - 9) Sakai, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Yano, T., Uchida, K., Nakao, Y., Urisu, A., Adachi, R., Teshima, R., Akiyama, H., Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8145-8151 (2010)
 - 10) 峰松和彦、中村公亮、穂山浩、張替直輝、中島治、橘田和美、手島玲子、飯塚太由、コンニャク製粉含有コメ粉からのコメDNA抽出精製法の検討、*食品衛生学雑誌*, 51, 247-252 (2010)
 - 11) Nakamura, K., Yamada, C., Akiyama, H., Takabatake, R., Kitagawa, M., Kitta, K., Kawakami, H., Teshima, R., Evaluation of tomato DNA fragmentation and PCR amplicon size for detection of tomato DNA in processed products, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 17, 123-128 (2010)
 - 12) Harikai, N., Akiyama, H., Kondo, K., Kitta, K., Teshima, R., Yoshida, Y., A novel chromogenic method for determining the genetically modified soybean content in soybean powder with primer extension, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 17, 110-115 (2010)
 - 13) Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, K., Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H., Kita, K., Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among Trypanosoma brucei subspecies, *Parasitology International*, 59, 560-564 (2010)
 - 14) 丸山卓郎、近藤健児、四柳雄一、山本豊、川崎武志、司馬真央、寺坂和祥、山根真由、Shu Zhug、坂田こずえ、藤田正雄、穂山浩、西村直行、小松かつ子、水上元、合田幸広、PCR-RELP法によるビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の妥当性確認試験、*生薬学雑誌*, 64, 96-101 (2010)
 - 15) Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Establishment and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean MON89788, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 242-246 (2010)
 - 16) Takabatake, R., Futo, S., Minegishi, Y., Watai, M., Sawada, C., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Akihiro, H., Kitta, K., Evaluation of quantitative PCR methods for genetically modified maize (MON863, NK603, TC1507 and T25), *Food Science and Technology Research*, 16, 421-430 (2010)
 - 17) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S.,

- Hino, A., Kitta K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, *Journal of AOAC International*, in press (2010)
- 18) Akiyama, H., Makiyama, D., Nakamura, K., Sasaki, N., Minegishi, Y., Mano, J., Kitta, K., Ozeki, Y., Teshima, R., A Novel Detection System for the Genetically Modified Canola (*Brassica rapa*) Line RT73, *Analytical Chemistry*, 82, 9909-9916 (2010)
- 19) 中村厚、酒井信夫、川浦知子、安達玲子、穂山浩、手島玲子、すり身およびその加工食品に含まれる甲殻類の実態調査、*日本食品化学学会誌*, 17, 213-220 (2010)
- 20) Takabatake, R., Akiyama, H., Sakata, K., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Development and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean A2704-12, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 52, 100-107 (2011)
- 21) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 1648-1651 (2011)
- 22) Matemu, A.O., Nakamura, K., Kayahara, H., Murasawa, H., Katayama, S., Nakamura, S. Enhanced Antiviral Activity of Soybean β -Conglycinin-Derived Peptides by Acylation with Saturated Fatty Acids. *Journal of Food Science*, 76(6), 299-304 (2011)
- 23) Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K., Teshima R. Inter-laboratory Study of DNA Extraction from Multiple Ground Samples, Multiplex Real-Time PCR and Multiplex Qualitative PCR for Individual Kernel Detection System of Genetically Modified Maize. *Journal of AOAC International*, 94, 1540-1547 (2011)
- 24) Ohashi-Suzuki, M., Yabu, Y., Ohshima, S., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Kita, K., Ohta, N., Suzuki, T. Differential Kinetic Activities of Glycerol Kinase among African Trypanosome Species: Phylogenetic and Therapeutic Implications. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(5), 615-621 (2011)
- 25) Suzuki, A., Duc, H. P. N., Nakamura, K., Akiyama, H. and Kasahara, Y. Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 81, 18-23, (2011)
- 26) Kasama, K., Inoue, Y, Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 215-222, (2012)
- 27) Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 53, 157-165 (2012)
- 28) Nakamura, K., Ohtsuki, T., Mori, H., Hoshino, H., Hoque, A., Oue, A., Kanou, F., Sakagami, H., Tanamoto, K., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Ogawa, H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research*, 94, 89-97 (2012)
- 29) Mano J., Harada, M., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Noritake, H., Iizuka, T., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K. Single-laboratory validation of comprehensive GMO detection method using real-time PCR array, *Journal of AOAC International*, 95, 508-516 (2012)
- 30) Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S. Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris*

- using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2013, in press.
- 31) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2013, in press.
- 32) Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 2013, in press.
- 33) Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136(2), 895-901, 2013
- 34) Ito A., Taguchi, T, Mogi, T, Wake, H, Tanaami T, Akiyama, H, Teshima, R, Sasaki, N, Yamada, A, Ozeki, Y. Comparison of signal enhancement techniques using DNA microarrays for screening GM crops. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 19: 141- 148 (2012).
- 35) Yoshimatsu, K., Kawano, N., Kawahara, N., Akiyama, H., Teshima, R., Nishijima, M.: Current status of application and commercialization of genetically modified plants for human and livestock health and phytoremediation, *YAKUGAKU ZASSHI*, 132 (5) , 629-674 (2012).
- 36) Nakajima O., Koyano S., Akiyama H., Sawada J., and Teshima R. Confirmation of a predicted lack of IgE binding to Cry3Bb1 from genetically modified (GM) crops. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56 (3) 306-311 (2010).
- 37) 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)
- 38) 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
- 39) Kajikawa A, Masuda K, Katoh M, and Igimi S. Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(1):43-48. (2010)
- 40) Kajikawa A, Ichikawa E, and Igimi S. Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(2):375-382 (2010)
- 41) Kajikawa A and Igimi S. Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine* 28(19):3409-3415.(2010)
- 42) 五十君静信。自然界の薬剤耐性菌汚染 食品衛生の視点から。臨床と微生物、37(6):617-622. (2010)
- 43) Masuda K. Kajikawa A, and Igimi S. Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. 30(2):37-44. (2011)
- 44) Saito E, Yoshida N, Kawano J, Shimizu A, Igimi S. Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation with culture methods. *J. Vet. Med. Sci* 73(3):287-292. (2011)
- 45) 梶川揚申、五十君静信。乳酸菌組換えワクチン。書籍：新しい乳酸菌の機能と応用.in press シーエムシー出版
2. 学会発表
- 1) 穂山浩、未承認遺伝子組換え食品およびアレルギー誘発物質の検知法の開発と評価に関する研究日本食品衛生学会第99回学術講演会 (2010.5)
- 2) 中村公亮、穂山浩、山田千尋、佐藤里絵、牧山太樹、坂田こずえ、川上浩、真野潤一、橘田和美、手島玲子、カナダ産安全性未審

- 査遺伝子組換え亜麻の検知法について、日本食品衛生学会第99回学術講演会 (2010.5)
- 3) 張替直輝、吉田雄三、橘田和美、近藤一成、穂山浩、手島玲子、プライマー伸長反応を使用した遺伝子組換え大豆の発色定量法、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
 - 4) 高畠令王奈、大西真理、小岩智宏、布藤聡、峯岸恭孝、穂山浩、手島玲子、古井聡、橘田和美、遺伝子組換え(GM)ダイズ新系統 MON89788の系統特異的定量検知法開発および妥当性の確認、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
 - 5) 山田千尋、中村公亮、穂山浩、高畠令王奈、北川麻美子、橘田和美、川上浩、手島玲子、トマト含有加工食品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に向けて、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
 - 6) 穂山浩、食物アレルギーを誘発する原材料の検知法における最近の進歩について、日本分析化学会表示・起源研究懇談会第3回講演会 (2010.7)
 - 7) 穂山浩、未承認遺伝子組換え食品の検査法について、平成22年度食品安全行政講習会 (2010.6)
 - 8) 笠間菊子、小熊恭代、鈴木達也、穂山浩、大島赴夫、小島幸一、特定原材料検査に関する外部精度管理の実施に向けた検討、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 9) 真野潤一、谷中有香、池津陽子、大西真理、布藤聡、穂山浩、手島玲子、日野明寛、高畠令王奈、古井聡、橘田和美、スタック品種の混入に影響を受けない遺伝子組換えトウモロコシ混入率評価手法グループテストリングの性能確認、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 10) 大森清美、中村公亮、穂山浩、濱岡志津子、牧山太樹、坂田こずえ、笠原正輝、橘田和美、岸弘子、藤巻照久、手島玲子、加工食品からのパパイヤDNA抽出精製法の検討、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 11) 中村公亮、穂山浩、大森清美、濱岡志津子、牧山太樹、坂田こずえ、笠原正輝、橘田和美、手島玲子、ハワイ産遺伝子組換えパパイヤ55-1系統の特異的検知法の開発について、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
 - 12) Mano, J., Shigemitsu, N., Ikezu, Y., Yanaka, Y., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., In-house validation of component reactions on the real-time PCR array for comprehensive GMO analysis, AOAC 124th Annual Meeting (2010.9)
 - 13) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S., Hino, A., Kitta, K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, AOAC 124th Annual Meeting (2010.9)
 - 14) Ito, K., Yamamoto, T., Doi, H., Shoji, M., Kato, M., Akiyama, H., Adachi, R., Novel ELISA for determine food allergen in processed food, AOAC 124th Annual Meeting (2010.9)
 - 15) 穂山浩、牧山太樹、真野潤一、安井修二、峯岸恭孝、坂田こずえ、中村公亮、橘田和美、手島玲子、2009年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
 - 16) Akiyama, H., Japanese Food Allergen Labeling, Seminar on Food Allergen : Opportunities and Challenges for Thai Food Industries (2010.11, Thailand)
 - 17) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Noguchi, A., Kondo, K., and Teshima, R. Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain in Processed Food. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011.9)
 - 18) 中村公亮、穂山浩、濱岡志津子、大森清美、坂田こずえ、笠原正輝、高畠令王奈、橘田和美、近藤一成、手島玲子：加工食品からの未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK)の検出について (第二報)、第48回全国衛生化学技術協議会年会 (2011.11)

- 19) 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子：スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発（第一報）、第102回日本食品衛生学会 学術講演会、秋田（2011.9）
- 20) 高橋勇貴、中村公亮、穠山浩、明石良、橘田和美、中澤裕之、近藤一成、手島玲子：パパイヤ加工品の未承認遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)の検出に関する調査について、第102回日本食品衛生学会 学術講演会（2011.9）
- 21) 北川麻美子、山田千尋、中村公亮、小林武史、川上浩、穠山浩、手島玲子：野菜加工品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に関する研究（第一報）、日本食品化学学会第17回、総会・学術大会（2011.5）
- 22) 穠山浩、牧山太樹、真野潤一、安井修二、峯岸恭孝、坂田こずえ、中村公亮、橘田和美、手島玲子：2009年度産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の混入率と系統分析、日本食品化学学会第17回 総会・学術大会（2011.5）
- 23) 中村公亮、穠山浩、濱岡志津子、大森清美、坂田こずえ、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：未承認遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)の検知法開発について（第一報）、日本食品化学学会第17回 総会・学術大会（2011.5）
- 24) 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、坂田こずえ、穠山浩、手島玲子：リアルタイムPCR法を用いた遺伝子組換え(GM)サケの特異的検知法の開発、日本薬学会第131年会（2011.3）
- 25) 高橋勇貴、中村公亮、穠山浩、大森清美、笠原正輝、中澤裕之、橘田和美、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換えパパイヤ(GM)パパイヤ 55-1 系統検知法のパパイヤ含有食品への適用性と検出感度について、日本薬学会第132回年会（2012.3）
- 26) 穠山浩：遺伝子組換え食品と検査法の動向と課題、日本薬学会第132回年会（2012.3）
- 27) 高橋勇貴、中村公亮、穠山浩、大森清美、笠原正輝、中澤裕之、橘田和美、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換え(GM)パパイヤ 55-1 系統検知法のパパイヤ含有食品への適用性と検出感度について、日本薬学会 第132年会（2012.3）
- 28) 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、穠山浩、坂田こずえ、野口秋雄、近藤一成、手島玲子：加工品中の遺伝子組換えサケのコンストラクト構造を標的とした新規検知法の開発、日本薬学会 第132年会(2012.3)
- 29) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Apple procyanidins inhibit development of collagen-induced arthritis via down-regulation of Th17 response. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.2).
- 30) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting genetically modified Bt rice lines harboring CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct in rice product. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)
- 31) Morimoto, K., Katayama, S., Fukumoto, T., Nakamura, K., Nakamura, S. Amyloidogenicities of artificially synthesized human stefins A and B. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)
- 32) Nakamura, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R. Applicability of Qualitative and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Genetically Modified Papaya Line 55-1 to Papaya Products. 126th AOAC Annual Meeting & Exposition, Las Vegas, USA, (2012.10)
- 33) 中村公亮、穠山浩、松岡英樹、中島翔平、神田智正、近藤一成、手島玲子：リンゴプロシアニジン(ACT)の経口摂取によるコラーゲン誘導性関節炎の発症遅延効果、日本薬学会 第133年会、横浜、(2013.3)

- 34) 中島治、中村公亮、近藤一成、穠山浩、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、横浜、(2013.3)
- 35) 近藤一成、小櫃冴未、小林友子、中村公亮、坂田こずえ、野口秋雄、手島玲子: PCR-RFLP 法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法、日本薬学会 第 133 年会、横浜、(2013.3)
- 36) 中村公亮、穠山浩、河野徳昭、吉松嘉代、野口秋雄、近藤一成、真野潤一、橘田和美、手島玲子: 日欧で検出された安全性未審査遺伝子組換えコメ(Kefeng 系統)混入に関する検知技術の開発について(第 2 報)、日本食品化学学会 第 18 回 総会・学術大会、函館、(2012.6)
- 37) 高島令王奈、則武寛通、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、真野潤一、橘田和美: 加工品を含む複数のスイートコーン試料からの DNA 抽出法の検討、日本食品化学学会 第 18 回 総会・学術大会、函館、(2012.6)
- 38) 中村公亮、穠山浩、野口秋雄、小林友子、坂田こずえ、近藤一成、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子: パパイア加工品の遺伝子組換えパパイア含有に関する総合的評価法、第 49 回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012.11)
- 46) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、小林友子、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、穠山浩、近藤一成、手島玲子: 遺伝子組換えパパイア55-1系統特異的検知法の妥当性評価、第 49 回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012.11)
- 47) 近藤一成、坂田こずえ、小櫃冴未、中村公亮、野口秋雄、手島玲子: フロクマリン類の *in vitro* 光毒性について、第 49 回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012.11)
- 48) 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子: スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発(第二報)、第 104 回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 49) 小林友子、中村公亮、近藤一成、野口秋雄、小櫃冴未、峯岸恭孝、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、手島玲子: 遺伝子組換えコメ検知法に用いる内在性遺伝子の比較検討、第 104 回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 50) 中村公亮、南竹優美、近藤一成、野口秋雄、小櫃冴未、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、穠山浩、川上浩、手島玲子: 遺伝子組換え表示対象のジャガイモ加工食品から抽出されるジャガイモ DNA の断片長について、第 104 回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 51) 真野潤一、高島かおり、峯岸恭孝、二宮健二、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高島令王奈、橘田和美: 遺伝子組換えトウモロコシグループテスト法におけるグループ作成法及び系統判別試験法の確立、第 104 回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 52) 西辻泰之、菊池洋介、真野潤一、福留真一、遠藤繁、林田拓也、川上裕之、栗本洋一、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高島令王奈、橘田和美: プロリンリッチプロテイン遺伝子を標的としたコムギ内在性遺伝子検出系の開発とリアルタイム PCR アレイ法への適用、第 104 回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012.9)
- 53) Masuda K., and Igimi S.: Observation of *Lactobacillus casei* IGM 393 transport using *in vitro* M cell model. International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics. Kosice, Slovakia (2010.6)
- 54) 五十君静信: 乳酸菌・ビフィズス菌の新しい研究と応用—医薬分野への応用の可能性—。日本乳酸菌学会。(2010.11)
- 55) Masuda K and Igimi S. Establishment of *in vitro* M cell model and evaluation of M-cell targeted genetically modified bacteria. The 6th International Yakult Symposium. The Gut and Its Role in Health Maintenance. Vienna, Austria(2011.5)
- 56) Kazuya Masuda and Shizunobu Igimi. Establishment of *in vitro* M cell model and evaluation of genetically modified bacteria as vaccine delivery vehicles targeting M cells. 1st Biotechnology World Congress.

- 2012.2.14-15 (Dubai, UAE) なし
- 57) 森田英利、Tulika Prakash、大島健志朗、藤英博、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。乳酸菌とビフィズス菌における線毛遺伝子群の解析。日本ゲノム微生物学会。2012.3.10 2.実用新案登録
なし
3.その他
なし
- 58) 森田英利・藤英博・中野章代・大島健志朗・五十君静信・服部正平。*Lactobacillus casei* グループの比較ゲノム解析。日本畜産学会 第 115 回大会 2012.3.27-30
- 59) 森田英利、Tulika Srivastava、中野章代、高畑宗明、高木孝士、西山英利、藤 英博、大島健志朗、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。*Lactobacillus*属と*Bifidobacterium*属における線毛および鞭毛の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察。日本乳酸菌学会。2012.7.12-13。伊東 篤志、田口 朋之、和気 仁志、穂山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山田 晃世、小関 良宏 「DNA チップを用いた遺伝子組換え食品の遺伝子非増幅検出法の検討」日本食品化学学会第 16回総会・学術大会 (大阪) (2010.6)
- 60) 伊東 篤志、田口 朋之、茂木豪介、田名網健雄、穂山 浩、近藤 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山田 晃世、小関 良宏。DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発。日本食品化学学会 第 18 回総会・学術大会 (函館) (2012.6)
- 61) 吉松嘉代、河野徳昭、川原信夫、穂山浩、手島玲子、西島正弘：非食用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会 (2011.5)
- 62) 2) 吉松嘉代、河野徳昭、川原信夫、穂山浩、手島玲子、西島正弘：薬用及び環境浄化用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向 第 29 回日本植物細胞分子生物学会 (福岡) 大会・シンポジウム (2011.9.)
- 63) 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 (2013.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得

分担研究総合報告書

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の検知法開発に関する研究

研究代表者 穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 市販のトマト加工食品を対象に、遺伝子組換え(GM)作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (P35S) を検出するリアルタイム PCR 法を用いて調査を行った。トマト 55 検体中 2 検体より、P35S が検出された。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 検出用プライマー・プローブを設計し、擬陽性 2 検体を分析したところ、CaMV のゲノムが検出された。従って、CaMV の混入であると判断された。リアルタイム PCR 法を用いてジャガイモ加工食品中に混入する可能性のある未承認非食用 GM ジャガイモを検知する方法を開発するため、GM 表示対象のジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモ DNA の断片長の検出下限値を解析した。その結果、ジャガイモ加工食品から精製した DNA を定性 PCR 法に供したところ、すべての加工食品において検出可能な増幅断片長は 51~101 bp 以下であった。この結果から、増幅断片長を 51~101 bp 以下に設計することで、標的遺伝子を検出できることが示唆された。市販のジャガイモ加工食品における GM ジャガイモ混入に関する実態調査を行った。非食用バイオテクノロジーの開発状況に関する Web 公開用データベース検索サイトを確立し、一般公開した。

協力研究者

中村公亮、近藤一成(国立医薬品食品衛生研究所)
川上浩、山田千尋、中村香織、南竹優美(共立女子大学大学院)

A. 研究目的

非食用 GM トマトが誤って食品中に混入される可能性があるため、非食用 GM トマトのトマト加工食品への混入を監視するための検査法を開発した。市販の GM 表示対象のトマト加工食品を対象に、GM トマトの形質転換用ベクターに汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (P35S) を用いて調査を行った。また擬陽性判定を見極めるために、カリフラワーモザイクウイルスの感染を検知する方法について検討を行った。また、リアルタイム PCR 法を用いてジャガイモ加工食品中に混入する可能性のある非食用未承認 GM ジャガイモを検知する方法を開発するための基礎的な検討を行った。GM 表示対象の生鮮ジャガイモ、及び、ジャガイモ加工食品から抽出したジャガイモ DNA の断片化の程度を解析した。また非食用 GM ジャガイモの混入に関する実態調査を行った。さらに非食用 GM 体データベース Web 検索用サイトを開発し、2 年間一般公開した。

B. 研究方法

1) 試料

トマト含有加工食品(ケチャップ、ソース、チリソース、ピューレー、ジュース、ペースト、缶詰)は、都内のスーパーで購入したものを用いた。また、

生鮮トマトも同様に国産品を都内のスーパーで購入したものを用いた。厚生労働省が定めた GM 食品表示対象のジャガイモ加工食品は、都内のスーパーやインターネットで購入した。

2) DNA 抽出精製

イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い付属のプロトコールを改変して抽出精製を行った。

3) 試薬調製・リアルタイム PCR

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下のとおりである。Universal Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L)各 0.9 μ M、対象プローブ溶液(10 μ mol/L) 1 μ M を混合し、水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (25 ng) を添加した。装置は ABI PRISM™ 7900HT を用いた。

4) リアルタイム PCR 増幅条件

リアルタイム PCR 装置に 96 ウェルプレートを設定し、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は以下のとおりである。50°C 2 分間の条件で保持した後、95°C 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 15 秒間、60°C 1 分を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行った。ベースラインは 3~15 サイクルに設定した。Ct 値をプロットするための Δ Rn threshold は指数関数的な増幅の間、0.2~0.5 に設定した。指数関数的な増幅が確認され Ct 値が 48 未満の