

新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究

研究代表者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部部長

研究要旨:

生産性の向上や栄養付加を目的として開発されている新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究を遂行するため、1主任研究者、7分担研究者を中心として、16機関にわたる研究グループを組織した。(1)多様化、複雑化する新機能遺伝子組換え食品の安全性評価に対応するためのオミックス手法の整備、定量解析手法の開発並びに規格への反映化をめざすための科学的知見の蓄積、(2)消費者に受容されにくい状況が続いている組換え食品の本質的原因の究明並びに社会的受容の促進を大きな柱とし、(3)組換え食品の違法な流通を監視するための未承認組換え食品の検出技術の開発及び合法的な流通を検証するためのスタック品種の検査法についての検討を行った。なお、(1)の対象となる新機能遺伝子組換え食品には、代謝改変や環境抵抗性に関わる機能性タンパク質が新機能として付与された遺伝子組換え植物およびそれらの後交代品種スタックに加えて、植物以外のニワトリやサケ等の遺伝子組換え生物も含めることとした。

研究分担者

今村 知明	奈良県立医科大学 健康政策医学講座 教授
小関 良宏	東京農工大学工学部 教授
太田 大策	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授
五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 部長
名古屋 博之	水産総合研究センター 増養殖研究所 グループ長
近藤 一成	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
野口 秋雄	国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部主任研究官

A. 研究目的

本研究は、多様化、複雑化する新機能遺伝子組換え食品の安全性確保のための科学的知見の蓄積、当該食品並びに未承認組換え食品の検知に関する試験法の確立、安全性審査基準への反映並びに社会的受容の促進を図るためのリスクコミュニケーションを行うことを目的とする。

B. 研究方法

生産性の向上や栄養付加を目的として開発されている新開発バイオテクノロジー応用植物由来食品の安全性評価のためのポストゲノム(網羅的オミックス)手法を用いる意図的並びに非意図的生成物の解析のための研究を小関班員、太田班員、手島班員、組換え微生物または遺伝子組換え魚由来食品の安全性評価のための研究を五十君班員、名古屋班員が担当した。安全性確保に有用な試験方法の確立のための未承認遺伝子組換え体の検知に関する研究を近藤班員がまた、承認済遺伝子組換え体の検知に関する研究を野口班員が担当し、研究代表者は、研究班全体の総括を行った。また、遺伝子組換え食品に関する開発・実用化の動向や安全性に関する調査研究の一環として、リスクコミュニケーション(遺伝子組換え食品の社会的受容に関する研究)に関する調査が奈良県立医科大学で、遺伝子組換え薬用植物に関する文献

調査が医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部で、遺伝子組換え動物の開発並びに調査研究が広島大学生物圏科学研究科で行われ、研究代表者がとりまとめを行った。

C . 結果およびD . 考察

遺伝子組換え食品の国民受容に関する研究：

遺伝子組換え作物・食品に関するリスクコミュニケーションについて、今後我が国で取り組むべき方策に対する示唆を得るため、GM作物・食品の社会的受容の調査研究として、消費者意識の国内外比較調査（結果分析）食品に対する安心感の調査を実施した。また、リスクコミュニケーション方策の調査研究として、GM動物に関する海外動向の調査、NBTに関するリスクコミュニケーションの検討を実施した。

社会的受容の推移の調査：我が国と欧米諸国における遺伝子組換え食品に対する消費者意識を比較するために、日本、欧州（イギリス、フランス）、アメリカにおいて、共通の調査項目によりWebアンケートを実施し、各国の回答の傾向を比較した。調査実施日は、2013年4月20日～5月20日で、有効回答数は各国520人を目標とした。アンケート解析により、以下の結果が得られた。遺伝子組換え食品について、リスク認知の割合は各国とも40～50%が知っているという回答していた。この中には、遺伝子組換え食品の人体への影響は未知数だという意識で知っているとする回答者もいれば、遺伝子組換え食品は人体に悪影響があるという意識で知っているとする回答者もいるものと考えられた。いずれにせよ、実際に健康被害は生じていない遺伝子組換え食品に対して、実勢に食中毒や誤飲による窒息などが起きているいくつかの食品と同等、またはそれ以上にリ

スクを感じているのが実態であった。また、遺伝子組換え食品の摂食意向は、どの国も他の食品に比べて低く、その割合はリスク認知率以上であった。リスクはよく分からないが食べたくないという意識があることが伺えた。遺伝子組換えに対する抵抗感は、国別に見ると、日本、フランスが全体的に抵抗を感じる割合が高く、組換え生物の性質別に見ると、いずれの国も組換え動物に対する抵抗感が高く、植物の中では除草剤耐性や害虫抵抗性に対する抵抗感が強かった。遺伝子組換え食品に対する支払意思額と遺伝子組換えでない食品の市場価格の相関関係を見ると、日本は他国に比べて市場価格からの乖離が大きかった（割引率が大きくないと購入したくない）。抵抗を感じる人の割合はフランスと同程度かやや低い割合であったが、抵抗感の強さは他国よりも強い傾向が伺えた。

食品に対する安心感の調査：医療リスクとGM食品をはじめとした食品に関する事例を対象とし、消費者が意思決定に至るプロセスを比較分析し、主観的な安心に至る要素を特定・抽出した。調査はWebアンケートで、食品は、2014年3月26日～3月31日を調査実施日とし、821人の有効回答数が得られた。また、医療は、2014年3月11日～3月31日を調査実施日とし、898人の有効回答数が得られた。アンケート解析により、以下の結果が得られた。遺伝子組み換え食品のリスクについて、内容を知っている人はふぐや生牡蠣、こんにゃくゼリーと比較すると多くはなかった。ただし、それらと比較して食べたくないと思っている人は多く、情報提供による行動変容が小さく、遺伝子組み換え食品を食べないと最初から決めている人が多いことがうかがえた。また、遺伝子組換え食品だけを食べないようにしている人は、

単独で遺伝子組換え食品のみを食べないようにしている人が、他の食品と比較して多かった。遺伝子組換え食品を避けている人のうち、他の食品も避けている人は、「肉刺身」や「海外産の果物」なども避けており、また、行政の規制対象や、残留農薬など健康被害の点で話題になる食品を避けており、食の安全性に関する情報に敏感である人が多い可能性が高かった。医療と比較した場合、何らかの疾病に対する治療を選択しない人は少ないが、予防接種については、判断が分かれていた。食品は食べないという選択がありうるという点で、予防医療と似ており、リスクコミュニケーションにおいて参考にできる可能性があった。また、食品、医療ともに、リスクについては、知りたいと思っている人が多く、行政や医師だけが考えることではないと考えている人も多かった。健康被害において、当事者である一般消費者は重要なステイクホルダーであり、今後もより一層の配慮が求められる存在であると思われた。

GM 動物に関する海外動向の調査:アメリカにおける遺伝子組換えサーモンに係るその後の動向のレビューを行った。具体的には、Aqua Bounty 社による遺伝子組換えサーモン (Aqu-Advantage® Salmon) に係る動向をレビューするため、FDA や AquaBounty 社の Web サイトからの情報収集を行った。2013 年 2 月 25 日までの 60 日間で、パブリックコメントの募集が掛けられ、2 月 13 日にはパブリックコメントの期間を 4 月 26 日まで延長することが公表されたが、パブリックコメントの結果を含め、その後の遺伝子組換えサーモンの承認に係る追加情報は公表されていなかった。遺伝子組換えサーモンの承認が世界に与える影響は大きいものと考えられ、我が国も例外ではないため、今後も引き続き関連情報の収集を

行っていく必要があると思われた。

NBT に関するリスクコミュニケーションの検討:新植物育種技術 (NBT; New Plant Breeding Techniques) と総称される新たな育種技術の開発が進められている。NBT の中には育種のプロセスの中で遺伝子組換え技術を活用しているものの、最終的に生成される作物等の中には組換えに使用した遺伝子が残らず、遺伝子組換え技術の適用の有無を評価することが難しい技術もある。こうした技術については、「消える痕跡」といった表現で報道されるなど社会の関心は高まっている。NBT により生成された作物の取り扱いについて、消費者や食品関連市場の意向を無視した形で議論を進めることは、実用化の段階での大きな障壁となり得る。そのため、NBT について消費者とリスクコミュニケーションを行い、消費者の受容性を把握することを目標とし、本研究では、消費者に提示するリスクコミュニケーション用の資料 (NBT 説明書) を作成することを目的とした。本年度は、消費者に提示する NBT 説明書作成の第一段階として、NBT の実態の整理・翻訳 - (a) 既存資料のレビュー、(b) 専門家へのインタビュー、(c) NBT 説明書 (案) の作成を行った。(a) 既存資料のレビューは、欧州委員会の Joint Research Centre (JRC) によるテクニカルレポート「New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects for commercial development (2011)」で取り上げられている以下の 7 つの技術をレビューした。すなわち、(i) Zinc finger nuclease (ZNF; ジンクフィンガーヌクレアーゼ)、(ii) Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM; オリゴヌクレオチド特異的変異誘発)、(iii) Cisgenesis and Intragenesis (シスジェネシス/イントラジェネシス)

(iv)Grafting (接ぎ木) (v)Agro-Infiltration (アグロインフィルトレーション) (vi)RNA-dependent DNA methylation(RdDM;RNA 依存性 DNA メチル化) (vii)Reverse breeding (逆育種) である。(b)専門家へのインタビューでは、2013 年 8 月 20 日に筑波大学大学院生命環境科学研究科鎌田博教授よりご意見を伺った。(c) NBT 説明書として、個々の NBT の技術ごとに解説スライドを作成した。なお、本研究で作成した説明書は、NBT の個々の技術について説明する資料であるため、一般の消費者にはまだ難解なものとなっていることが懸念される。そのため、「育種の過程で加えられる遺伝子組換えの痕跡が残らないこと」のように、従来の植物育種、遺伝子組換え技術、NBT の違いを明確にし、議論のポイントを整理した上で、そのポイントに対する消費者の理解、反応を把握するための資料とすることも重要であると考えられた。

薬用遺伝子組換え植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究：

遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人や家畜などの動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」と定め、その開発及び生産に関する情報を、環境浄化目的の植物に関する情報及び食用作物を用いた産業用 GM 植物に関する情報とともに収集した。また、新規植物育種法 (NBT: New Breeding Techniques) の開発状況を調査した。2009-2013 年の米国における薬用及び環境浄化用 GM 植物の野外圃場栽培認可・作付け状況を調査した結果、2009 年から 2013 年にかけて作付けが行われた州が著しく減少し、2013 年においてはわずか 1 社の作付けが行われたことが判明した。得られた情報を分類するカテゴリーとし

て、機能性食品、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化、産業用及び NBT の 10 種類を設定した。国内の状況について、関連学会講演要旨集で調査した結果、24 件の情報が得られ、その内訳は、機能性食品：7 件 (1 件は治療薬と重複)、経口ワクチン：1 件、食用医薬：3 件、ワクチン抗原：0 件、抗体医薬：1 件、治療薬：4 件 (1 件は機能性食品と重複)、診断薬・試薬：0 件、環境浄化：1 件、産業用 (バイオ燃料)：1 件、NBT：7 件であり、日本において NBT に関連した研究・開発が増えていることが判明した。また、SciFinder®により、キーワード「transgenic plant」で 2013 年に公表・出版された論文等を調査した結果、83 件が得られ、その内訳は、機能性食品：27 件 (香料に関する 10 件を含む)、経口ワクチン：4 件、食用医薬：3 件、ワクチン抗原：3 件、抗体医薬：7 件、治療薬：19 件 (5 件は他の項目と重複)、診断薬・試薬：3 件 (2 件は他の項目と重複)、環境浄化：14 件 (1 件は治療薬と重複)、産業用：0 件、NBT：9 件 (4 件は他の項目と重複)であり、特に機能性食品、治療薬及び環境浄化の件数が多かった。また、2013 年の国別の件数は、中国：30 件が最も多かった。

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究：

人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術は、新しい農畜産物の育種技術として注目されている。そこで本研究では、本技術を用いて今後開発される食品を想定し、食品としての安全性を担保する上で必要な科学的な要件を整理することを目的とした。平成 25 年度は、ゲノム編集技術を用いたアレルギーの遺伝子ノックアウトを想定し、鶏

卵をモデルケースにアレルゲン破壊人工ヌクレアーゼエフェクターの再設計並びに構築、SSA (single-strand annealing) assay による活性評価、ニワトリ多能性幹細胞へのエフェクターの導入条件の検討、および変異導入効果を評価した。その結果、平成 24 年度に作製したエフェクターよりも強い活性を持つエフェクターの構築に成功し、また多能性幹細胞に対するエレクトロポレーションの至適条件を決定した。さらに Cel-1 assay を用いた変異導入活性評価試験では、ニワトリ多能性幹細胞に対して、構築したエフェクターが十分な変異導入活性を有することが示唆された。

遺伝子組換え魚の安全性に関する研究：

米国において成長ホルモン(GH)遺伝子を導入した遺伝子組換え大西洋サケは FDA の審査が終了したが、許可されていない状況である。許可が遅れている理由は公表されていない。その他の国でもコイ、ティラピア、ギンザケ等で遺伝子組換え魚を作出し、一部では食用として利用することを想定しているが、こちらの情報も公表されていない。遺伝子組換え魚の安全性に関する資料は AquaBounty Technologies 社が FDA の審査を受ける際に提出した資料が公開されているだけで、その他の魚類で安全性に係わる資料が公開された例はない。そこで、日本で開発されている GH 遺伝子を導入した遺伝子組換えアマゴを実験動物として、安全性に関する研究を行う。本年度は昨年度に引き続き、遺伝子組換え大西洋サケと同様にベクター領域を除去したプロモーターと GH 遺伝子だけの配列をアマゴにマイクロインジェクションして新しい系統の作出を試みた。遺伝子組換えアマゴを用いた実験では肝臓の形態がコン

トロールと比べ顕著に異なることから、肝臓の代謝について網羅的に調べた。その結果、本研究で行った網羅的イルミナ解析によって、GH transgenic アマゴは肝臓での脂肪酸の異化作用を活発にさせることで、高成長の維持に必要なエネルギーを生産していることが明らかとなった。また、GH transgenic アマゴ肝臓の形態変化には微小管繊維の減少や安定性の低下が関与していることが示唆された。

組換え微生物の安全性に関する研究

遺伝子組換え微生物の利用を実用化するにあたって障害となっており、検討が必要とされている安全性に関する項目としては、組換え微生物のヒトや動物の免疫系への影響評価や腸内フローラを介した健康影響が重要であるとされている。本分担研究では遺伝子組換え技術を用いてモデル組換え細菌を作出し、それらの組換え体を用いて細胞や実験動物を用いた実験により、上述の組換え微生物の安全性に関する知見を集積すると共に、安全性評価手法の開発を行った。

大腸菌と乳酸菌を宿主として、M 細胞への取り込みに重要な働きをすることが知られているエルシニアの Invasin を発現する遺伝子組換え体を作成し、ヒト腸管モデル細胞 C2BBE1 単層膜を用いて、評価を行った。大腸菌では、Invasin を発現する組換え体で取り込みが増強されたのに対し、乳酸菌組換え体ではそのような取り込みの増強は確認できなかった。大腸菌組換え体の取り込みの増強は、クラスリンを介した取り込み機構が主であることが確認された。細胞を用いた評価系が示した結果は、ヒトや動物の腸管の M 細胞でも実際に同様に起こっているかは大変重要であり検討を進めた。また、この現象のメカニズムの

解明に向けて、実用性が高いヒト M 細胞モデル系の更なる改良を行った。

遺伝子組換え体のトランスクリプトーム解析並びに成分分析:

成長ホルモン遺伝子 (Growth hormone 1: GH1) 組換えアマゴと低アレルゲンコメについてトランスクリプトーム解析を行った。GH1 導入アマゴは生育段階を生重量 100, 125, 150g に分けたものの筋肉組織をヘテロ GH1 組換えアマゴと非組み換えアマゴの 2 種について名古屋博之班員に分与いただいた。低アレルゲンコメ (14-16kDa knock out 体) は東京理科大島田浩章教授から前年度とは異なるロットのサンプルを分与いただいた。なお、アマゴに関しては、マイクロアレイチップはアマゴと同じサケ科のサーモンの約 43,000 のプローブが固定化されている DNA マイクロアレイチップ (Salmon Gene Expression Microarray 4x44) を用いた。検出された各遺伝子のスポットにおいて、十分信頼できる強度の蛍光が観測されたのは全体の 50% 程度であった。低アレルゲン化コメの DNA マイクロアレイ解析は、約 42,000 のイネの遺伝子が搭載された DNA マイクロアレイチップ (イネオリゴ DNA アレイ 4x44K RAP-DB) を用いて行った。検出されたスポットの約 50% 程度において信頼性の高いシグナルが検出されていることが判明した

GH1 導入アマゴでは、シグナルが観測された遺伝子についてそれらの発現量を同一の生重量間の組換え体と非組換え体で比較したところ (NT-100 vs GM-100、NT-125 vs GM-125、NT-150 vs GM150)、これまでの GH1 導入アマゴでの肝組織で発現比較の報告と同様に、組換え体のアマゴでは脂肪酸関連遺伝子の発現が低下していること

が確認された。これは GH1 組換えアマゴでは脂肪組織の蓄積が少ないとする先の報告とも一致した結果である。またアレルゲン物質である Parvalbumin は非組換え体と比較してどの成長ステージにおいても 3 割程度の発現量であったことから、組換え体では Parvalbumin の蓄積量は低下していることが示唆された。他にも糖代謝やサイトカイン関連遺伝子でも成長ステージに関わりなく組換え体において発現が変動していることが確認された。低アレルゲンコメにおいても前回と同様にアレルゲンタンパク質をコードする遺伝子の発現が顕著に低下していることが認められた。なお、低アレルゲンイネ玄米を分析対象とし、食品五成分の分析を行い、分析値を従来品種の値と比較した結果では、大きな差異は認められないことを確認した。

さらに、スタック品種の安全性評価に資するための遺伝子組換えモデル植物については、前年度に得られていた環境耐性遺伝子を導入したシロイヌナズナスタック個体を使用し、その個体から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を委託した。

遺伝子組換え体のメタボローム解析:

質量分析を基盤としたメタボローム分析によってバイオテクノロジー食品の成分を網羅的に解析し、その安全性検証のための情報を取得することを目的として研究を行った。平成 25 年度は、1) 植物性食品であるイネ科のイネ種子と、2) 動物性食品であるサケ科アマゴを解析対象とした。まず、1) イネ種子中の主要アレルゲンである 14-16 kDa タンパク質群 (-amylase/trypsin 阻害タンパク質ファミリータンパク質群) の発現を RNAi 法で抑制した RA14-pANDA 系統 (GM イネ)、および非組換え体 (non-GM イネ) の種子から メタノール/クロロホルム/水抽出液を調

製し GC-MS を用いたメタボローム解析に供した。GC-MS 分析によるすべての計測データ (イオン化されて検出された化合物の質量値とイオン強度の情報) を用いて主成分分析したところ、GM イネと non-GM イネは独自のメタボロームを形成することが明らかとなった。標準化合物を用いて同定・定量した 52 化合物に関する主成分分析に於いても、GM イネと non-GM イネが独立したメタボロームを形成した。これらのメタボロームクラスター形成は、GM イネにおける 14 種の化合物 (アミノ酸 2 種類, 炭化水素 7 種類, 補酵素 2 種類, 脂質 1 種類, 核酸 2 種類) の蓄積量の有意な増加と、2 種類の化合物 (アミノ酸 1 種類, 補酵素 1 種類) の蓄積量の有意な減少によるものであった。GM イネにおいては、RNAi 法によって α -amylase/trypsin 阻害タンパク質ファミリーのタンパク質群の発現が抑制された結果、種子貯蔵デンプンおよび種子貯蔵タンパク質の分解に関わる代謝活性が亢進したと考えられ、遺伝子組換えによる代謝変動の範疇に入るものと推察された。次に、2) ヒト成長ホルモン GH をアマゴで高発現させた遺伝子組換え体 GH 系統 (GM アマゴ) と非組換え体 (non-GM アマゴ) の 3 段階の生育ステージ (100 g, 125 g, 150 g) にある個体から採取した筋肉組織を供試し、そのメタノール/クロロホルム/水抽出液を GC-MS メタボローム解析に用いた。GC-MS 分析によるすべての計測データを用いて主成分分析したところ、GM アマゴ と non-GM アマゴが形成するメタボロームには明確な差は無かった。GM アマゴでは、同定した 72 化合物のうち大部分の化合物の蓄積量に変化は認められなかったが、4 種類の化合物 (cis-aconitate, GABA, glutamate, phosphate) の蓄積量が有意に減少していた。LC-MS/MS を用いた脂質プロファイリングに供した。その結果、GM アマゴ と non-GM アマゴの極性脂質プロファイルに顕著な

違いは認められなかった。

遺伝子組換え体のアレルギー性評価並びにプロテオーム解析:

平成 25 年度は、新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関するアレルギー性評価並びにプロテオーム解析に関する調査研究として、(1)成長ホルモン導入組換えアマゴを用いたタンパク質発現の非組換え体との網羅的比較解析、(2)マウスを用いる経口感作、経口惹起による低アレルゲン組換えコメのアレルゲン性の検討、(3)アレルゲンデータベース(ADFS)のアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行った。具体的には、(1) 2D-DIGE 法を用いた 100g, 125g, 150g 体重の組換え (GM) 並びに非組換え (NT) アマゴの筋肉タンパク質の発現差異解析の結果、100g で 63 spots、125g で 50 spots, 150g で 100 spots のタンパク質で、2 倍以上の発現差異がみられた。全体に、GM アマゴでは NT アマゴと比較して、発現差違のみられたタンパク質では、発現量の低下しているタンパク質の方が多かったが、発現量の増加していたタンパク質に、ピルビン酸キナーゼがあり、解糖系の活性化の起きていることが示唆された。一方、発現の大きく低下していたタンパク質として、Creatine kinase, nucleoside diphosphate kinase 等のエネルギー代謝に関連するタンパク質があった。Parvalbumin 等のアレルゲンについては、GM 並びに NT アマゴの間で差がみられないか、むしろ GM の方で低下傾向が認められた。(2) 非組換えコメあるいは低アレルゲン化 (14-16kDa タンパク質発現抑制) 組換えコメの抽出タンパク質で感作されたマウスにおける経口惹起時にみられるアナフィラキシー症状の比較を行ったが、低アレルゲン米群では、ほとんど

アナフィラキシー症状を示さず、非組換え米群に比べて抗体価レベルが低かったことから、低アレルゲン米の食物アレルゲン性の低下が動物モデルにおいて検出されたと考えられた。(3)ADFSのアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行い、新たに10種のアレルゲンについて、総エピトープ数191の情報を追加し、本年度のアレルゲンおよびエピトープ情報更新作業により、アレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は1698となり、また、エピトープ既知のアレルゲン数は137種となった。

未承認組換え生物の検知技術の開発に関する研究：本研究では、新開発のGM作物も含めた未承認GM作物の流通阻止を監視するための検知技術の開発に関して、以下に列挙する4項目に関する検知技術開発を行った。すなわち、1) コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、2) 亜硫酸塩漂白剤処理によるGM作物検査法への影響、3) リアルタイムPCRを使用した新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発、4) 未承認GM作物(ヒヨコマメ、バスマティ米)の食品への混入に関する実態調査、である。以下、項目ごとに研究結果を記す。1) コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定：食品衛生法により未承認GMコメの国内への流通・販売は禁止されている。しかし、これまでに海外から輸出されたビーフンやコメ粉などのコメ加工食品から害虫抵抗性の未承認GMコメの混入を認めている。いずれの加工食品についてもGMコメの混入はきわめて微量であったため、次の課題としてより高感度なGMコメ混入に関する検査法の確立が求められた。そこで、コメ加工食品に混入したGMコメ由来のDNA標的配

列のコピー数をデジタルPCRにて測定し、GMコメの混入を正しく判定できるDNA標的配列を評価した。デジタルPCR解析より、GMコメの構造特異的配列は系統特異的配列に比べ試料中に10倍以上混入していることが確認された。以上のことから、コメ加工食品中に微量混入したGMコメをより高感度に検出するためには、系統特異的な配列よりも構造特異的な配列を検出するリアルタイムPCR検知法の方が有効であることが示唆された。2) 亜硫酸塩漂白剤処理によるGM作物検査法への影響：現在、市販されるパパイヤ加工食品は、7種類の製品に細分類され、定性リアルタイムPCRを用いたGMパパイヤの混入に関する検査が行われている。しかし、漂白剤(亜硫酸塩)処理されたドライフルーツの陽性対照試験は不検出となることが報告されている。そこで亜硫酸塩処理されたドライフルーツにおける陽性対照試験での不検出の実態を精査した。亜硫酸塩処理されたドライパパイヤおよびドライトマトにおいて、リアルタイムPCRを用いた内在性遺伝子の検出は、ドライパパイヤ1製品を除き検査不能であった。また、直接抽出法によるPCR反応や大量DNA抽出法によるDNA収量に改善が見られないことから、試料中のDNAは分解し、残存量も極めて低いと考えられ、pH調整によるDNA抽出効率の改善は困難であると考えられた。以上の結果から、亜硫酸塩処理されたドライフルーツの多くは、加工度が非常に高く、DNA検出を指標とした検査では検出不能となることが判明した。3) リアルタイムPCRを使用した新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法の開発：昨年度、ヒヨコマメに特異的で染色体上に1コピーのみ存在する9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (CaNCED, GenBank no. AB771415) 遺伝子のクローニングに成功した。本研究では、明らか

となったCaNCED配列を基に、リアルタイムPCR法を用いた新規ヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を開発した。設計したCaNCED検知用のプライマーブロープは特異性および検出限界（250コピー）に優れているものであった。今後、構築したヒヨコマメ内在性遺伝子検知法を使用して、GMヒヨコマメの国内の食品への混入状況を継続的に調査していく予定である。4)未承認GM作物(ヒヨコマメ、バスマティ米)の食品への混入に関する実態調査：国内で購入可能なヒヨコマメとバスマティ米食品のGM作物含有に関する実態調査を行った。トランスジェニックベクターに使用される可能性の高いプロモーター4種類(P35S、PNOS、AINT、Pubi)、ターミネーター2種類(T35S、TNOS)、薬剤選択マーカー遺伝子(NPTII、HPT)を特異的に検出するリアルタイムPCR検知法によりスクリーニングを行った。その結果、いずれの製品においてもGMヒヨコマメ及びGMコメの混入を確認できなかった。なお、土壌細菌やウィルスの混入によって、リアルタイムPCRで増幅が確認されるものがあったが、いずれの検体においてもCt値として非常に高くDNAの微量混入が疑われた。

承認済組換え生物の検知技術の開発に関する研究：我が国に輸入される安全性承認済みの遺伝子組換え(GM)作物の種類は増加の一途を辿っている。なかでもトウモロコシは品種数が多く、表示の妥当性を検証するために多くの検査法が開発されているが、実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。そこで本研究では、これらの問題を解決する新たなGMトウモロコシ検査法を開発を行うことを目的に、本年度は、新開発GM品種を検出でき、かつ実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法を開発を行った。新

開発GM品種を検出するために、GM品種に広く存在している組換え遺伝子P35SおよびtNOSを検出対象とした。また、実験操作の簡便化のために、表示義務の閾値であるGM混入率5%の判定にはmultiplexリアルタイムPCRから得られた内在性遺伝子(SSI1b)と組換え遺伝子(P35SおよびtNOS)のCq値あるいはCt値の差を用いた。プラスミドやgenomic DNAを用いた実験から、本スクリーニング検査法は十分な定量性と検出感度を有していることが示され、ABI PRISM™ 7900HTでは Δ Ct閾値を4.7、LightCycler® 96では Δ Cq閾値を6.0と決定した。本スクリーニング検査法は、新開発GM品種の見逃しを防ぎ、実験操作の労力を減らすことで、スクリーニング検査の精度を向上させることができると期待された。

E. 結論

生産性の向上や栄養付加を目的として開発されている新開発バイオテクノロジー応用食品のより一層の安全性確保のため、安全性評価に資するための研究として、成長ホルモン導入組換えアマゴ及び低アレルゲン化コメをモデル植物として用い、意図的並びに非意図的影響を知るためのポストゲノム手法による解析を行い、非組換え体との発現の違いの解析、遺伝子組換えにより発現の違いのみられるmRNA、代謝産物、タンパク質の同定を行い、規格への反映化をめざすための科学的知見の蓄積を行った。また、2種以上の形質を掛け合わせたいわゆるスタック品種の安全性試験に資するためのモデル植物としては、前年度に得られていた環境耐性遺伝子を導入したシロイヌナズナスタック個体を使用し、その個体からRNAを抽出してマイクロアレイ解析を委託した。また、遺伝子組換え食品の検知については、安全

性未審査の遺伝子組換え作物(東南アジア産ヒヨコマメ、中国産 BT 米、東南アジア産バスマチイ米、タイ産パパイア)の定性試験法の開発を行い、また、未承認の GM 作物を幅広く検知するためのスクリーニング法の開発も行った。さらに、安全性承認済の組換え作物の定量検査法の開発においても、GM 品種に広く存在している組換え遺伝子 P35S および tNOS を検出対象として、実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法の開発を行った。社会的受容に関する調査研究では遺伝子組換え作物・食品の社会的受容の調査研究として、消費者意識の国内外比較調査、食品に対する安心感の調査を実施し、また、リスクコミュニケーション方策の調査研究として、遺伝子組換え動物に関する海外動向の調査を実施し、新たに、新植物育種技術(NBT; New Plant Breeding Techniques)と総称される新たな育種技術に関するリスクコミュニケーションの検討に関する調査も開始した。さらに、組換え微生物を用いた食品や遺伝子組換え魚、遺伝子組換え動物、遺伝子組換え薬用植物の諸外国での開発動向、各国の規制状況等についても調査が行われた。

バイオテクノロジー応用食品については、多様化、複雑化する新機能遺伝子組換え食品が開発されている現状に鑑みて、新開発食品の安全性に関する研究、当該食品の検知に関する試験法の確立は、安全性審査への反映、監視体制に直接つながる社会的に要請の高い研究である。これら研究をさらに進めると共に、社会的受容に関する研究等も持続することにより、透明性を確保しつつ、より一層の安全確保、消費者の不安解消に努める必要があると考えられる。

F . 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。