

京都市における遺伝子組換え食品の検査結果（平成17年度～19年度）

生活衛生部門

Investigation of the Quantitative Analysis for Genetically Modified Foods in Kyoto City (2005-2007)

Division of Food and Environmental Hygiene

Abstract

Genetically modified organisms (GMOs) were investigated in food samples obtained from 2005 to 2007 in the Kyoto city area using quantitative PCR technique. The existence of Roundup Ready Soybean (RRS) was surveyed in processed soybean foods. RRS was detected 12 of 82 processed soybean foods, and the mixing ratio of RRS was 0.1~0.5%. No GMOs were detected in all processed corn foods. The descriptions on the label in all samples were appropriate.

Key Words : 遺伝子組換え体 genetically modified organism, 定量PCR quantitative PCR, 加工品 processed food, 大豆 soybean, トウモロコシ corn

1 はじめに

組換え DNA 技術応用食品（遺伝子組換え食品）又はその加工食品については、平成13年4月から食品衛生法の改正により、遺伝子組換え食品の安全性審査が義務化されている。平成20年2月末現在、7作物88品種の遺伝子組換え作物が安全性審査を終了しており、これらについては食品衛生法及びJAS法に基づく表示が義務づけられている。

「遺伝子組換えでない」等の表示は任意で可能だが、生産、流通、加工の各段階で分別流通管理が行われたことを確認しなければならない。しかしながら、大豆、トウモロコシに関しては、完全に分別流通管理をすることは現実的に困難なため、原材料の5%までの混入が認められている。

当所では、平成17年度より、大豆及びトウモロコシの加工品に関して適切な表示がなされていることを調査する目的で定量PCR検査を開始した。本報告では、平成17年度から平成19年度の検査結果について報告する。

2 方法

(1) 試料

平成17年度から平成19年度に保健所で収去した大豆加工品82検体、トウモロコシ加工品44検体を分析した（表1）。

(2) 試薬・キット等

DNA抽出キットとしてはQIAGEN DNeasy Plant Maxi kit 及び QIAGEN Genomic-tip 20/G を、緩衝液、Proteinase-K 及び RNase A はキアゲン製、TE 緩衝液はニッポンジーン社製を使用した。エタノール及びイ

ソプロピルアルコールは試薬特級を用いた。

TBE 及びエチジルブロミドはニッポンジーン社製、アガロースはバイオラッド社製、100bp DNA Ladder はプロメガ社製、Loading buffer は宝酒造製を使用した。

プライマー、プローブ及びプラスミドセットはすべてニッポンジーン社製の遺伝子組換え食品検査用試薬を使用した。TaqMan® Universal PCR Master Mix はアプライドバイオシステムズ社製を使用した。

水は市販の滅菌水又は超純水をオートクレーブ処理したものを使用した。

(3) 装置

粉碎機：日本理化学機器株式会社製 ダンシングアジテーター II 型、分光光度計：島津社製 SHIMADZU UV-1600、電気泳動装置：アドバンス社製 Mupid-exu、定量PCR：アプライドバイオシステムズ社製 ABI PRISM 7900HT-4

(4) 検査方法

厚生労働省医薬局食品保健部長通知「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」に基づいて行った⁽¹⁾。また独立行政法人農林水産消費技術センター作成の JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」を参照した⁽²⁾。

なお、大豆加工品の抽出法は、平成17年度の大豆加工品 24 検体については、シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy plant Maxi kit）を用いたが、平成18年度以降はイオン交換樹脂タイプキット法（QIAGEN Genomic tip）に変更した。

表 1 平成17～19年度 組換え遺伝子検査項目及び試験法

原料	品目	検体数	抽出方法	試験方法	組換え遺伝子	内在性遺伝子
大豆	豆腐類	58	DNeasy Plant Mini kit ・Genomic-tip	定量PCR法	RRS	Le1
	豆乳類	11				
	凍り豆腐	1				
	油揚げ類	12				
トウモロコシ	トウモロコシ缶詰	24	Genomic-tip	定量PCR法	CAMV35S ・GA21	SS II b
	冷凍トウモロコシ	12				
	軸付き真空パック	3				
	乾燥スープ	3				
	ポップコーン(未調理)	1				
	スイートコーンドライパック	1				
合計		126				

3 結果及び考察

(1) DNA 抽出法の選択

各食品の DNA 抽出結果及び定量 PCR に用いた鋳型 DNA 濃度を表 2 に示す。一般に食品に適した抽出法を用いないと、十分な純度の DNA が得られない。260nm の吸光度を用い DNA 濃度を算出するが、タンパク質などの混入があると 260nm/280nm 比が小さくなる。この比が 1.7 以上のとき、定量 PCR 検査に適していると判断している。また多糖類等の混入により 260nm/230nm 比は低下するため、この比が 2.0 以上となることを目安としている。トウモロコシについては DNeasy plant Maxi kit 及び CTAB 法では DNA 純度が十分でなかったため、Genomic tip を用いた。また、今回の結果では DNeasy Plant Mini kit により抽出した豆乳の検体で、一部 260nm/280nm 比が 1.7 を下回るものがあつたが、抽出法を変更することで最終的に結果を出すことができた(表 2 に含めず)。その他の検体では 1.7 以上となり、十分な DNA 純度を得られた。また、260nm/230nm 比が 2.0 に満たないものもあつたが、PCR 反応に支障を来さない程度であつた。

(2) 鋳型 DNA 濃度の決定

抽出操作により得られた DNA 原液は、定量 PCR に用いる際に電気泳動パターンを参考にして適切な濃度に希釈する。加工されていない大豆やトウモロコシの抽出原液では、高分子側に太いバンドが確認されるが、加工品では、加熱加工等により DNA が断片化(分解)し、スメア状の泳動像が確認される。希釈の目安として、電気泳動パターンで長鎖側に泳動像が確認できる場合は、ゲノム DNA の分解は比較的少なく、定量 PCR に用いる鋳型 DNA 濃度は 50~100ng/μL とし、短鎖側にスメア状の泳動像がみられる場合は、DNA の分解が

進んでいると考えられ、鋳型 DNA 濃度は 300ng/μL 程度となるよう希釈する。また、定量 PCR での最小標準は 20copies であるため、目標検出下限 0.1% を得るには、内在性配列が 20000copies 以上必要で、さらに検量線の最大値 250000copies を超えないように鋳型 DNA 濃度を決定する。大豆加工品の場合、豆腐や油揚げでは鋳型 DNA 濃度が 50~80ng/μL 程度で適当な内在性配列を検出できたが、豆乳では DNA 純度の低いものや、電気泳動パターンからゲノム DNA を十分得られていないと考えられるものもあり、鋳型 DNA 濃度が 100ng/μL 以上必要な場合もあつた。一方、トウモロコシの適切な鋳型 DNA 濃度は、品目により偏っていた(図 1)。すなわち、冷凍トウモロコシや乾燥スープでは 40~70ng/μL 程度の鋳型 DNA 濃度で 50000~100000copies の SS II b を検出したのに対して、缶詰では SS II b を 20000copies 以上検出するために、鋳型 DNA 濃度が 200~300ng/μL 程度必要であつた。この原因として 0.8% アガロースゲルを用いた DNA 抽出液の電気泳動パターンより、缶詰では他の製品よりも DNA の分解が進んでいるためであると考えられた。

(3) 定量 PCR 検査結果と表示

大豆加工品 82 検体中 1 検体について「遺伝子組換え不分別」である表示があつた。その他については「遺伝子組換えでない」等の任意表示のあるものか、表示のないものであつた。定量 PCR 検査の結果、表示義務違反の検体はなく、遺伝子組換え不分別の検体からも Roundup Ready Soybean (RRS) 遺伝子は検出されなかつた。また RRS 遺伝子が検出されたのは 12 検体(検出率 15%)であつた(表 3)。混入率は 0.1~0.5% であり、意図せざる混入の目安である 5% より低い値を示し、分別生産流通管理が適切に行われていると考え

られた。検出された RRS も極微量であることから、原料大豆の流通過程における混入によるものと思われる。

トウモロコシ加工品では、44 検体中 1 検体について「遺伝子組換え不分別」である表示があったが、その他については「遺伝子組換えでない」等の表示がある

ものや、表示のないものであった。定量 PCR 検査の結果、すべての検体において CAMV35S プロモータ及び GA21 遺伝子は検出されなかった（表 4）。

今後、検査対象とする食品、品目、組換え遺伝子を増やすために、抽出法、定性検査等を検討していく必要がある。

表 2 各食品の DNA 抽出結果及び定量 PCR に用いた鋳型 DNA 濃度

品目	抽出法	検体数	O.D. ₂₆₀ *	DNA純度* (O.D. ₂₆₀ /O.D. ₂₈₀)	DNA純度* (O.D. ₂₆₀ /O.D. ₂₃₀)	DNA濃度* (ng/μL)	鋳型DNA* (ng/μL)	内在性配列* (copies)
豆腐	DNeasy Plant Mini kit	13	0.126 (0.068-0.188)	2.034 (1.889-2.250)		126 (68-188)	72 (51-94)	182720 (105117-249369)
凍り豆腐	DNeasy Plant Mini kit	1	0.090	2.143		90	18	52453
豆乳	DNeasy Plant Mini kit	7	0.173 (0.064-0.238)	1.845 (1.646-2.100)		173 (64-238)	81 (48-96)	100864 (6441-328323)
油揚げ類	DNeasy Plant Mini kit	3	0.153 (0.105-0.207)	2.060 (2.010-2.143)		153 (105-207)	45 (21-74)	150816 (91277-238772)
豆腐	Genomic tip	45	0.298 (0.095-0.671)	2.097 (1.740-2.717)	2.825 (1.886-5.302)	351 (95-671)	62 (40-107)	130765 (41922-265444)
豆乳	Genomic tip	4	0.199 (0.179-0.230)	2.149 (1.898-2.456)	1.958 (1.535-2.732)	230 (179-353)	115 (88-179)	102027 (67156-137316)
油揚げ類	Genomic tip	9	0.516 (0.260-1.008)	2.026 (1.822-2.314)	2.593 (2.227-3.111)	559 (280-1008)	77 (49-101)	156670 (96888-213459)
トウモロコシ缶詰	Genomic tip	24	0.669 (0.426-1.344)	1.843 (1.725-1.915)	2.220 (1.996-2.520)	669 (426-1344)	240 (199-339)	43697 (10760-80339)
冷凍トウモロコシ	Genomic tip	12	0.679 (0.390-0.977)	1.807 (1.712-1.866)	2.100 (1.884-2.442)	679 (390-977)	61 (41-73)	90917 (65662-117723)
軸付き真空パック	Genomic tip	3	0.908 (0.588-1.237)	1.834 (1.764-1.903)	2.220 (2.178-2.262)	908 (588-1237)	255 (225-294)	121941 (56532-231615)
乾燥スープ	Genomic tip	3	0.863 (0.614-1.134)	1.882 (1.871-1.896)	2.122 (2.067-2.159)	863 (614-1134)	53 (42-61)	89546 (74215-110923)
ポップコーン(未調理)	Genomic tip	1	0.439	1.807	1.925	439	44	53593
スイートコーンドライパック	Genomic tip	1	0.531	1.890	2.167	531	266	55365

*: 平均値, ()内は範囲を示す。

表 3 平成 17～19 年度 大豆加工品検査結果

	検体数	検出数	(単位: %)			
			検出率	検出値範囲	平均	目標検出下限
豆腐類	58	8	13.8	0.1-0.5	0.19	0.1
豆乳類	11	2	18.2	0.2	0.20	0.1
凍り豆腐	1	0	0.0			0.1
油揚げ類	12	2	16.7	0.1-0.2	0.15	0.1
計	82	12	14.6			

表 4 平成 17～19 年度 トウモロコシ加工品検査結果

	検体数	検出数	(単位: %)	
			検出率	目標検出下限
トウモロコシ缶詰	24	0	0	0.1
冷凍トウモロコシ	12	0	0	0.1
軸付き真空パック	3	0	0	0.1
乾燥スープ	3	0	0	0.1
ポップコーン(未調理)	1	0	0	0.1
スイートコーンドライパック	1	0	0	0.1
計	44	0	0	

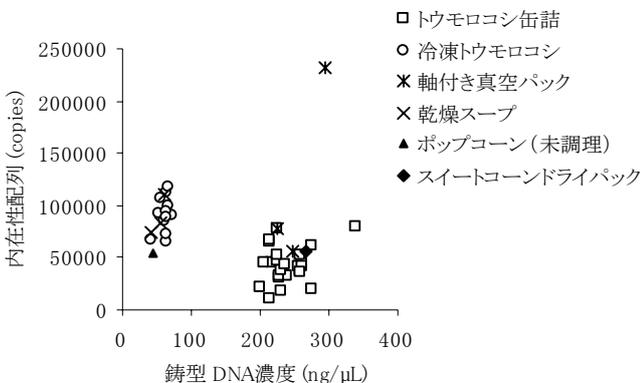


図 1 トウモロコシ加工品の鋳型 DNA 濃度と検出した内在性配列

4 まとめ

平成17年度から平成19年度までに、市内に流通する大豆加工品 82 検体、トウモロコシ加工品 44 検体について遺伝子組換え体の定量 PCR 検査を行った。大豆加工品については15%から RRS 遺伝子が検出され、混入率は0.1~0.5%であった。トウモロコシ加工品についてはいずれの検体からも組換え遺伝子は検出されなかった。検査結果はすべて5%以下であり、適正な表示がなされてい

た。

5 参考文献

- (1) 厚生労働省通知食発第113001号: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15年11月13日
- (2) 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換え食品検査・分析マニュアル改定第2版,平成14年6月20日