

遺伝子組換え食品検査の対象食品拡大に向けた検討

生活衛生部門

Examination for expansion of object food of food developed through gene recombination inspection

Division of Food and Environmental Hygiene

Abstract

When they use one of seven kinds of genetically modified farm products, they must show it in Japan. The municipal institute in Kyoto city inspect to identify contents. The objects of inspection are few. The Ministry of Health, Labour and Welfare indicate inspectable processed foods of soybean. We tried to detect genetically modified products among them which we now do not inspect. As a result it is difficult to detect them in highly processed and highly DNA-broken foods. It was revealed that we could detect parched soybean, Yuba and Okara.

Key Words

遺伝子組換え食品 food developed through gene recombination ,
遺伝子組換え農産物 genetically modified farm products, 大豆 soybean

1 はじめに

国内では、大豆やトウモロコシなど7種類の農産物について、遺伝子組換え農産物を使用する場合にはその旨を表示する義務がある⁽¹⁾⁻⁽³⁾。しかし、これらの農産物は輸入に頼る面が大きく、また世界では遺伝子組換え農産物が広く出回り、生産、流通、加工などの過程においてそれらの混入を完全に防ぐことは難しい。そのため、「遺伝子組換えでない」の表示があっても混入していないとは言いきれないのが現状である。

そこで、京都市でも表示内容の確認のため大豆やトウモロコシなどについて、遺伝子組換え農産物の混入率を調べる検査を行っている。しかし、現在本市が検査対象としている農産物及び加工品は、その種類が限られている。そこで、検査対象食品の拡大を目的に、厚生労働省が検査可能としている大豆加工品中で、本市では検査対象としていないものについて、検査可能か検討を行った。

2 方法

(1) 試薬・キット等

DNA抽出キットとしてはQIAGEN DNeasy Plant Maxi kit, 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及びエチジルプ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及び-Hindはプロメガ社製、20bp DNA Ladder及び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。Ampli Taq Gold, 10×Gold Buffer with dNTP, MgCl₂ Solution, PCR Buffer及び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。

(2) 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 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, 定性PCR:アステック社製 ASTEC PC818-S

(3) 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。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⁽⁴⁾。

なお、今回新たに検討を行った大豆加工品及びトウモロコシ加工品からのDNA抽出においては、不純物を取り除き、抽出されたDNAの純度を高めるため、Fast ID Genomic DNA抽出キットのプロトコルを参考に、DNAの抽出過程でクロロホルムによる処理を行った。

3 結果

(1) DNA 抽出

公定法に従い、豆腐及び薄揚げは検体 2 g から、大豆缶詰、大豆水煮、大豆いり豆、湯葉、きな粉、おから

ら、納豆及び味噌については検体 4 g から DNA の抽出を行った。得られた DNA 抽出液を TE 緩衝液で希釈した後、吸光度を測定し純度確認を行った (表 1)。

表 1 DNA 抽出液の純度確認及び DNA 濃度

	(g)	希釈率 (倍)	OD ₂₃₀	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	吸光度比 OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	吸光度比 OD ₂₆₀ / OD ₂₃₀	DNA 濃度 (ng/ml)
豆腐	2	10	0.257	0.642	0.329	1.95	2.50	642
薄揚げ	2	10	0.449	1.131	0.590	1.92	2.52	1131
大豆缶詰	4	20	0.157	0.437	0.236	1.85	2.78	874
大豆水煮	4	20	0.183	0.520	0.284	1.83	2.84	1040
大豆いり豆	4	20	0.121	0.168	0.101	1.66	1.39	336
湯葉	4	20	0.101	0.284	0.147	1.93	2.81	568
きな粉	4	20	0.360	0.771	0.490	1.57	2.14	1542
おから	4	20	0.035	0.074	0.037	2.00	2.11	148
納豆	4	20	0.031	0.059	0.029	2.03	1.90	118
味噌	4	20	0.118	0.244	0.130	1.88	2.07	488

(判定基準) 吸光度比 (OD₂₆₀/ OD₂₈₀) : 1.7 以上が適 タンパクの混入により低下

(参考値) 吸光度比 (OD₂₆₀/ OD₂₃₀) : 2.0 以上が良, 1.7 以上が可 多糖類の混入により低下

表 2 定量 PCR 結果

	templateDNA 濃度 (ng/ml)	コピー数	検出下限値 (%)
豆腐	50	148609	0.013
薄揚げ	50	108958	0.018
大豆缶詰	500	40267	0.050
大豆水煮	200	69112	0.029
大豆いり豆	50	237043	0.008
湯葉	50	194077	0.010
きな粉	300	234473	0.009
おから	50	54400	0.037
納豆	100	604	3.311
味噌	500	5618	0.356

(2) 定量 PCR

公定法に従い、定量 PCR を行った。定量 PCR を行う際の templateDNA 濃度 (ng/ml) は、豆腐及び薄揚げについては約 50 ng/ml とし、大豆缶詰、大豆水煮、大豆いり豆、湯葉、きな粉、おから、納豆及び味噌に

ついては、予備試験を行い、あらかじめ最も増幅率の高い濃度を決定しておいた。

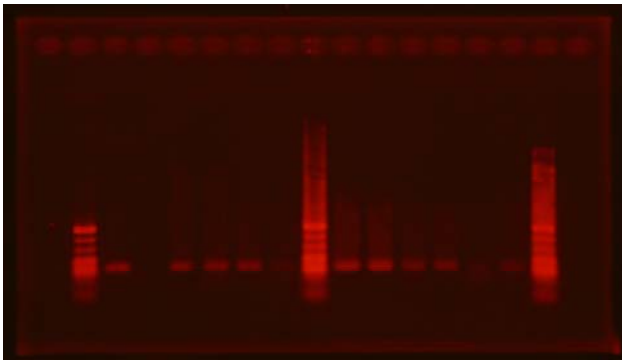
得られた結果を解析し、内在性配列 (Le1) のコピー数を算出して、その値から検査における検出下限値 (%) を求めた (表 2)。

現在、遺伝子組換え大豆の混入率の基準値は、組換え配列 (RRS) が 5% 以下であるが、結果のばらつきを考慮して、検出下限値が 0.1% 以下を目標値としている。

(3) 電気泳動

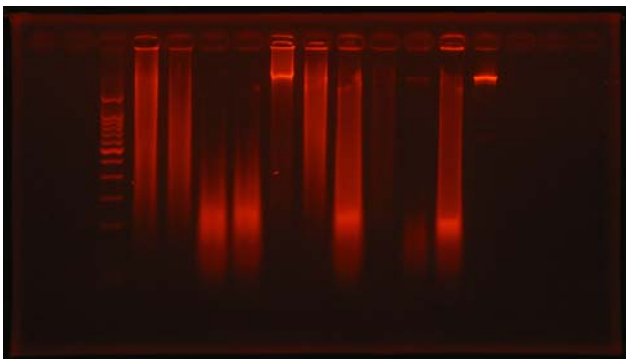
PCR 後、TBE 緩衝液と 3% アガロースゲルを用いて 100 V 定電圧で電気泳動を行い、エチジウムブロミド液で染色し、内在性遺伝子 (Le1) を確認した (図 1)。DNA マーカーは 20bp DNA Ladder を用いた。

また、抽出した DNA 原液について、TBE 緩衝液と 0.8% アガロースゲルを用いて 100 V 定電圧で電気泳動を行い、エチジウムブロミド液で染色し、DNA パターンを確認した (図 2)。DNA マーカーは 100bp DNA Ladder 及び -Hind を用いた。



20bp DNA Ladder	大豆缶詰	きな粉
PC	大豆水煮	おから
NC	20bp DNA Ladder	納豆
豆腐	大豆いり豆	味噌
薄揚げ	湯葉	20bp DNA Ladder

図1 PCR後の電気泳動



100bp DNA Ladder	大豆水煮	おから
豆腐	大豆いり豆	納豆
薄揚げ	湯葉	味噌
大豆缶詰	きな粉	-Hind

図2 DNA抽出原液の電気泳動

4 考察

DNA抽出を行った結果、DNA量が少ないものや不純物の混入による純度の低下がみられたものもあったが、今回検討を行った10検体すべてから定量PCRに必要な量のDNAを抽出することが出来た。

定量PCRを行った結果、普段検査を行っている豆腐及び薄揚げに加え、大豆いり豆、湯葉及びおからに関しては問題なく検査を行うことが出来た。また、大豆缶詰、大豆水煮及びきな粉に関してはDNA濃度を通常の50 ng/mlとして定量PCRを行った結果、DNAの増幅率が低かった。そこで、数種類のDNA濃度において検討を行った結果、それぞれ、500、200及び300 ng/mlにおいて適当な増幅率を示した。一方、納豆及び味噌もDNAの増幅率が低かったため数種類のDNA濃度において検討を行ったが、いずれのDNA濃度においても十分な増幅率を示さなかった。

PCR後の電気泳動の結果、全ての検体にDNAの増幅が認められたが、大豆水煮、納豆及び味噌ではその量が少なかった。また、抽出したDNA原液で電気泳動を行った結果、大豆缶詰、大豆水煮、きな粉、納豆及び味噌ではDNAの分解が進んでいることが分かった。

これらの結果から、大豆いり豆、湯葉及びおからに関しては問題なく検査を行うことが出来ると思われる。一方で、大豆缶詰、大豆水煮、きな粉、納豆及び味噌については、加工過程においてDNAの分解が進んでおり、検査を行うことはやや困難であるという結果となった。特に納豆及び味噌に関しては、現状検査を行うことはほぼ不可能であることが示された。ただ、今回はそれぞれ1種類の検体でしか検討を行っていないため、収去の対象に加えることが可能であるか判断するためには、さらなる検討が必要である。

5 参考文献

- (1) 厚生省生活衛生局長通知：生衛発第825号-1，平成12年5月1日
- (2) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知：食発第79号，平成13年3月15日
- (3) 農林水産省告示第517号：平成12年3月31日
平成19年10月1日改正
- (4) 独立行政法人農林水産消費技術センター：JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改定第2版，平成14年6月20日