

## 香川県における遺伝子組み換え食品の検査について

### Investigation on Genetically Modified Processed Foods in KAGAWA

西岡千鶴・森香織・千葉貴子・山下みよ子

Chiduru NISHIOKA, Kaori MORI, Takako TIBA, Miyoko YAMASITA,

#### 要 旨

平成14年度から16年度に香川県で流通していた大豆加工品については、リアルタイムPCRを用いた遺伝子組み換え大豆の定量試験、また、ジャガイモ加工品、トウモロコシ加工品については安全性未審査の組み換え体の有無の検査を実施した。大豆加工品30検体中12検体から0.1%~0.7%の組み換え体を検出したが、5%を超える検体は認められず、分別生産流通管理システムが適切に実施されていたと考えられる。「遺伝子組み換えでない」という表示と混入率の関係も適正であった。流通しているジャガイモ及びトウモロコシ加工品においても未審査の組み換え体は検出されなかった。

#### キーワード:

リアルタイムPCR, 遺伝子組み換え大豆, 未審査, 分別生産流通管理システム, トウモロコシ

#### I はじめに

平成13年4月1日食品衛生法の一部改正により、組み換えDNA技術応用食品の安全性と表示が義務化された。遺伝子組み換え食品は遺伝子組み換え技術を応用した食品で食糧の増産などを目的として各国で開発が進んでいる。平成16年6月までに日本で安全性審査の手続きをした遺伝子組み換え食品は58品種、食品添加物は12品種である<sup>1)</sup>。これらの作物の中で大豆はもっとも栽培面積が広く又摂取する機会が多い。その中でもモンサント社のラウンドアップレディ大豆は除草剤グリホサート耐性を持ち、安全性審査を終了している。現在市場に流通している大豆はラウンドアップレディ大豆である。組み換え大豆として分別されたものや、不分別のものは表示義務の対象となっており、分別生産流通管理システム(IPハンドリング)が適正に行われたかどうかは遺伝子組み換え体の混入率5%を目安としている。醤油、油以外の表示対象食品の表示は「遺伝子組み換え食品でない」という表示が大半である。そこで表示の対象食品について遺伝子組み換え大豆の混入率を検査した。又、遺伝子組み換え体品種が多いトウモロコシ及びじゃがいもについて安全性未審査の組み換え体New leaf Y, CBH351の定性検査を実施したのでその結果について報告する。

#### II 方法

##### 1. 試料

平成14年から平成16年度に香川県内で収去した豆腐26検体、きな粉2検体、納豆2検体、トウモロコシ加工品14検体、ジャガイモ加工品4検体について検査を実施した。

##### 2. 試薬

###### ・DNA抽出キット

DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

Genomic-tip (QIAGEN)

Universal PCR Master Mix (ABI)

10×PCR Gold buffer (ABI)

Taq DNAポリメラーゼ (ABI)

###### ・プライマー、プローブ、プラスミドはすべて(株)日本ジーン遺伝子組み換え食品検査用の物を使用。

Roundup Ready Soybean 定量用

Le1-n02 と Le1-Taq 及び RRS-01 と RRS-Taq を使用

ジャガイモ New leafY 定性用

F-primer (p-FMV05-5'), R-primer (PVY02-3')

F-primer (Pss 01n-5'), R-primer (Pss01n-3')

F-primer (PVY01-5'), R-primer (PVY01-3')

トウモロコシ CBH351 定性用

F-primer (Zeinn-5'), R-primer (Zeinn-3')

F-primer (CaM03-5'), R-primer (CBH02-3')

F-primer(Cry9C-5'), R-primer(35Ster-3')

・使用した水は超純水をオートクレーブ処理した物を使用した。

3. 装置

ABI PRISM7000 Sequence DetectionSystem (Applied Biosystems)

マイクロチップ電気泳動解析システム：コスモアイ SV-1210

4. 試験溶液の調製, 及び測定条件, 検査方法

厚生労働省通知「組み換えDNA技術応用食品の検査方法について」<sup>2)~7)</sup>に準拠し、農林水産消費技術センター JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組み換え食品検査・分析マニュアル個別品目編」<sup>8)</sup>を参照し、検査を実施した。通知は何回か一部改正されているが検査時における最新の通知に基づいた。その概略は次のとおりである。

1) DNA 抽出

試料を凍結乾燥後ミキサーミルで粉碎し、1g (2g) を量り採り、QIAGEN Genomic-tip (DNeasy Plant Mini Kit) によりDNAを抽出。

2) DNA の吸光度を測定

DNA 試料原液5μLを滅菌水を用いて10倍希釈後分光光度計により260, 280nmの各吸光度を測定した。280nmの吸光度に対する260nmの吸光度の比(A260/A280)からDNAの純度を確認し、260nmの吸光度からDNA濃度を求めた。

3) 定量的場合

DNA濃度が20ng/μLになるようにDNA溶液をTEで調整し、PCR反応の鋳型として用いた。定性の場合はDNA濃度が10ng/μLになるようにDNA溶液を滅菌水で調整した。

4) ①定量PCR反応

Primer probe mix, Universal mixを混合調整し、各1.5mLマイクロチューブに分注、鋳型DNAを8.75μLずつ加え、よく混合した。プレートに25μLずつ3wellに分注したのち、PRISM7000 Sequence DetectionSystemにより定量した。図1に定量PCRの増幅曲線を示した。

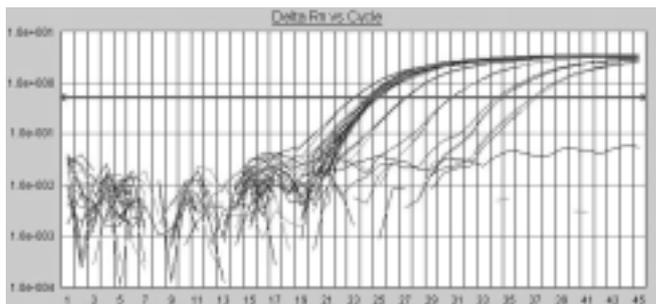


図1 定量PCR増幅曲線

②定性PCR

PCR buffer II, Taq DNAポリメラーゼ, 鋳型DNA等試薬を混合し、PCRを用い増幅する。チップ電気泳動装置を用い電気泳動をし、増幅バンドの解析により未審査組み換え体の検知をする。

5) 結果の解析

結果の解析法については厚生労働省通知「組み換えDNA技術応用食品の検査方法について」、JAS分析試験ハンドブック「遺伝子組み換え食品検査・分析マニュアル個別品目編その概略はJAS分析試験ハンドブックに準拠した。

III 結果及び考察

平成14年から16年度に香川県内で販売されている豆腐等大豆加工品について定量検査を、ジャガイモ加工品、トウモロコシ加工品について定性検査を実施した。これらの検査結果を表1, 表2, 表3, 図1に示した。

表1 大豆加工品の遺伝子組み換えに対する表示及び組み換え体混入率

番号	品名	製造所	表示	結果
1	湯豆腐	KA	遺伝子組換えしていない	0.1%
2	もめんとうふ	KK	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず
3	もめんとうふ	TN	遺伝子組換えでない	0.2%
4	黒豆とうふ	HHT	遺伝子組換えでない	検出せず
5	もめんとうふ	OO	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず
6	きぬとうふ	OS	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず
7	もめんとうふ	KK	表示なし	0.2%
8	もめんとうふ	KK	表示なし	検出せず
9	もめんとうふ	KKI	非遺伝子組換え大豆	0.2%
10	もめんとうふ	KS	遺伝子組換えでない	0.5%
11	もめんとうふ	KH	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	0.3%
12	ソフトとうふ	KS	表示なし	0.3%
13	きぬとうふ	KK	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず
14	きぬとうふ	KA	遺伝子組換えしていない	検出せず
15	もめんとうふ	KK	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず
16	油揚げの生地	KK	不明	0.6%
17	もめんとうふ	KS	表示なし	0.7%
18	もめんとうふ	KH	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	0.3%
19	ソフトとうふ	KS	遺伝子組換えでない	0.1%
20	油揚げの生地	KS	不明	検出せず
21	もめんとうふ	KA	国産大豆、遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず
22	もめんとうふ	KA	国産大豆、遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず
23	ソフトとうふ	KN	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	0.2%
24	もめんとうふ	KA	遺伝子組換えしていない	検出せず
25	もめんとうふ	KA	遺伝子組換えしていない	検出せず
26	もめんとうふ	KM	遺伝子組換え大豆は使用しておりません	検出せず

表2 大豆加工品の遺伝子組み換えに対する表示及び組み換え体混入率

番号	品名	製造所	表示	結果
1	きな粉	HHA	遺伝子組換えではない	検出せず
2	きな粉	AN	遺伝子組換えでない	検出せず
3	ひきわり納豆	KS	遺伝子組換えではありません	検出せず
4	納豆	KT	国産・遺伝子組換えでない	測定不能

表3 大豆加工品の遺伝子組み換え体混入率

検体名	検査年度	件数	Le1遺伝子コピー数	RRS遺伝子コピー数	混入率(%)	キット
豆腐	14	6	35073~116604	39~120	0~0.16	DNeasy mini
	15	8	24235~116090	105~485	0~0.54	DNeasy mini
	16	12	9682~166107	1.9~633	0~0.73	Genomic tip
きな粉	15	2	2715~14773	7.6~14	0	Genomic tip
納豆	15	2	805~4894		0	Genomic tip

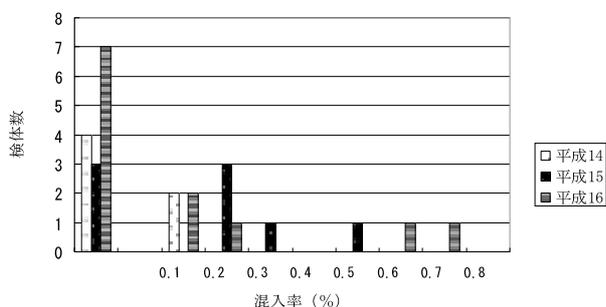


図2 定量結果と分布状況

### 1. 定量試験について

表1, 表2に平成14年から16年度に県内に流通している豆腐等大豆加工品の検査結果を示した。

表示と遺伝子組み換え体の混入率の関係について、豆腐24検体のうち(表示のなかったものは2検体のみ)表示のあったものすべて「遺伝子組み換えでない」という趣旨の表示が記載されていた。「遺伝子組み換え」、「遺伝子組み換え不分別」といった表示は皆無であった。「木綿」「絹」「ソフト」といった豆腐の種類と混入率との関係は見られなかった。また豆腐等加工品の製造所と混入率の関係も見られなかった。これらから「遺伝子組み換えでない」という表示と混入率の関係は妥当であった。

現在のところ市場に流通している遺伝子組み換え大豆はRoundup Ready Soybeansのみである。通知で示された試験法もRoundup Ready Soybeansについてである。図1に年度ごとの定量結果分布状況を示したが、平成14年度は6検体すべて0.1%以下であった。平成16年度は0.6~0.7%混入していた検体も見られた。組み換え体遺伝子の検出された検体の最大混入率は0.7%であり、分別生産流通管理システムの目安である5%を下回っており、適切に分別生産流通管理システムが行われていたことが判明した。定量試験を実施した豆腐等26検体のうち12検体から組み換え遺伝子を検出し、検出率は46%であった。組み換え大豆の定量下限はJAS分析試験ハンドブックに示されているのを参考に0.1%とした。<sup>7)</sup>

名古屋市、岡山県、福岡市などでの大豆加工品の調査結果も、混入率に差はあるものの本県と同様5%以上を示した検体は認められず、豆腐などの加工品には組み換え

大豆の使用頻度が少ないと考えられる。<sup>9)~11)</sup>

表3に大豆加工品の豆腐、きな粉や、納豆の混入率算出の基となる組み換え体及び内在遺伝子のコピー数を示している。本県で使用しているリアルタイムPCR装置(ABI PRISM7000)では検量線を作成するための標準プラスミドの最小コピー数が20であることから、大豆内在性遺伝子(Le1)のコピー数が2万コピー以上得られることが0.1%定量限界を保障する条件となっている。きな粉や、納豆では得られた内在遺伝子のコピー数が2万コピー以下であったので、遺伝子組み換え体は「検出不能」とした。きな粉や、納豆ではDNA抽出をDNeasy Plant Mini Kit, Genomic-tip, CATB法などで試みた。しかし、加工が進んだ検体では十分なDNAは得られず定量は不可能であった。定量PCR法ではシリカゲル膜タイプキット(DNeasy Plant Mini Kit)法を用いたDNA抽出を行うと室間精度が確認されたが、吸光度で評価される抽出DNAの精度が良好でも他のDNA抽出法に比べ定量PCR法による測定値が低くなる傾向が明らかであるということでDNeasy Plant Mini Kitの適用がはずされている。当所でも16年度より豆腐のDNA抽出はGenomic-tipを用いて実施した。

国の通知では定量時のDNA濃度は20ng/μlとされている。大豆の加工品でも加工の度合いの高い製品については、抽出されたDNAが部分分解をしており、DNA濃度が見かけ上十分量得られても、定量検査が難しいものがあった。しかし、豆腐では定量限界0.1%での検査は可能であった。<sup>12)</sup>以上のことを考慮すると抽出法や、試料量など最適な条件を検討する必要があると考えられる。

### 2. 定性試験について

表4にジャガイモ、とうもろこし中の遺伝子組み換え体検査結果を示した。安全性審査の終了していないトウモロコシCBH351について組み換え体の有無を、ジャガイモについては「じゃがりこ」など安全性審査が終了していないものが国内に流通したこともあり、これらの加工品の定性試験を実施した。通知の一部改正によりジャガイモNew Leaf Plusは13年9月に削除されたのでNew Leaf Yの検査を実施した。しかしこれも14年10月に安全性審査済みとなり、通知試験法から削除されている。

平成14年度から16年度にかけてジャガイモ加工品4件、とうもろこし加工品14検体について安全性未審査

CBH351, New leaf Yの検知を行った。いずれの検体からもとうもろこしでは 170bp, 171bp, ジャガイモでは 225bp, 161bp の増幅バンドは検出されなかった。

図3にマイクロチップ電気泳動のチャートを示した。

表4 ジャガイモ、とうもろこし組み換え体定性検査結果

検体名	検査年度	件数	検体名	結果	キット
ジャガイモ	14	4	フライドポテト(冷凍)	ND	Genomic tip
			ハッシュドポテト(冷凍)		Genomic tip
			ポテトチップ		Genomic tip
			フライドポテト(冷凍)		Genomic tip
トウモロコシ	14	2	スイートコーン(冷凍)	ND	DNeasy mini
			コーン(缶)		DNeasy mini
	15	6	スイートコーン(ホール)	ND	Genomic tip
			スイートコーン(ホール)		Genomic tip
			スイートコーン		DNeasy mini
			コーンクリーム		Genomic tip
			コーン		Genomic tip
			ポップコーン		Genomic tip
	16	6	スイートコーン	ND	Genomic tip
			スイートコーン(ホール)		Genomic tip
			スイートコーン(袋)		Genomic tip
			スイートコーン(コーンクリーム)		Genomic tip
スイートコーン(缶)			Genomic tip		
スイートコーン			Genomic tip		



図3 マイクロチップ電気泳動チャート

当所では電気泳動の方法は通知の方法であるアガロース電気泳動でなくチップ電気泳動装置による泳動法を用いている。この方法では染色に使用するエチジウムブロミド(この試薬は強力な発ガン作用、毒性があり取り扱いに注意を要する試薬である)を用いることなく少量のDNA溶液で行え、感度、精度に優れている装置である。PCR Gold Bufferを用いアガロース電気泳動を行うと、とうもろこしでは 170bp 付近に擬似バンドが見られる(神奈川県衛研)が、チップ電気泳動を用いると(±10の誤差はあるが)190bp 付近に増幅バンドが確認されるが、バンドの判定は容易であった。

抽出キットの種類であるが、15年度とうもろこし加工品において DNeasy Plant Mini Kit では十分なDNA量が得られなかった。(10ng/μl)Genomic-tipを用いると定性可能な濃度が得られた。表5にトウモロコシのキ

ット別の抽出濃度を示した。

表5 トウモロコシ加工品のDNA濃度(15年度)

	検体名	DNeasy mini 1	DNeasy mini 2	Genomic tip
1	スイートコーン(ホール)	61	測定不能	1175
2	スイートコーン(ホール)	---	---	499
3	スイートコーン	測定不能	測定不能	75
4	コーンクリーム	418	測定不能	766
5	コーン	測定不能	測定不能	1575
6	ポップコーン	288	---	33

現在、とうもろこし加工品中(主として缶詰など)の未審査の遺伝子組み換え体 CBH351 の検査を実施しているが流通量の多い菓子類などについても抽出等問題点はあるが検討し実態を調査していく必要がある。

遺伝子組み換え食品は表示制度が導入されたことにより適正な表示が行われているかといった消費者の関心は高く、科学的な検証が必要である。しかしまだ十分な検査法が整備されておらず、他の組み換え体についても定量等検査方法の開発を望むところである。

## V まとめ

平成14年から16年度に香川県内で販売されている豆腐等大豆加工品について定量検査を、ジャガイモ加工品、トウモロコシ加工品について定性検査を実施した。

大豆加工品30検体中12検体から0.1%~0.7%の組み換え体を検出したが、5%を超える検体は認められず、分別生産流通管理システムが適切に実施されていたと考えられる。また、遺伝子組み換え体でないという表示と混入率の関係も適正であった。流通しているジャガイモ及びトウモロコシ加工品においても未審査の組み換え体は検出されなかった。

本稿の一部は、第50回四国公衆衛生学会(平成17年2月10日、於松山市)で発表したものである。

## 文献

- 1) 厚生労働省遺伝子組み換え食品ホームページ：  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/idenshi>
- 2) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について、厚生労働省医薬局食品保健部長通知、平成13年3月27日付食発第110号
- 3) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)、厚生労働省医薬局食品保健部長通知、平成13年5月25日付食発第158号
- 4) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正)、厚生労働省医薬局食品保健部長通知、平成13年9月14日付食発第241号

- 5) 組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正), 厚生労働省医薬局食品保健部長通知, 平成14年4月30日付食発第0430001号
- 6) 組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正), 厚生労働省医薬局食品保健部長通知, 平成15年6月18日付食発第0618001号
- 7) 組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正), 厚生労働省医薬局食品保健部長通知, 平成15年11月13日付食安発第113001号
- 8) 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
- 9) 宮崎仁志他: 加工食品からの組換え遺伝子の検出, 名古屋市衛研報, 50, 7-10, (2004)
- 10) 武志保他: 岡山県における遺伝子組み換え食品の実態調査, 岡山県環境保健センター年報, 28, 111-114, (2004)
- 11) 宮崎悦子他: リアルタイム PCR による遺伝子組み換え大豆の定量, 福岡市衛試報, 28, 155-157, (2002)
- 12) 松岡猛他: ダイズ及びびダイズ加工食品からの組換え遺伝子の検知法 (第1報), 食衛誌, 40 (2), 149-157, (1999)