

## 千葉県における遺伝子組換え食品の検査状況（平成 22～24 年度） およびビーフンの検知不能事例の検討

中西希代子, 宮本文夫, 林千恵子, 中村和宏, 本郷猛, 橋本博之,  
芦澤英一, 長谷川康行, 石井俊靖, 池田恵

Analysis of Genetically Modified Foods in Chiba Prefecture from 2010 to 2012 and A Case Study for  
Nondetection of Taxon-Specific DNA from Rice Vermicelli

Kiyoko NAKANISHI, Fumio MIYAMOTO, Chieko HAYASHI, Kazuhiro NAKAMURA, Takeshi HONGO,  
Hiroyuki HASHIMOTO, Eiichi ASHIZAWA, Yasuyuki HASEGAWA, Toshiyasu ISHII  
and Megumi IKEDA

### 要旨

平成 22 年 4 月から平成 25 年 3 月までに千葉県において収去された食品 241 検体について遺伝子組換え食品（GM 食品）の検査を実施した。コーンスナック菓子 1 検体の Bt10 およびビーフン 1 検体が検知不能となったが、それ以外のばれいしょ加工品、とうもろこし加工品、パパイヤおよび米加工品はすべて検知可能で陰性であった。大豆および大豆加工品は、ラウンドアップ・レディ・大豆（RRS）の定量値が基準値の 5% を超えるものではなく、定量下限値を超えた検体の混入率は 0.1～0.9% であった。コメ陽性対照用試験で 48 未満の Ct 値が得られず検知不能となったビーフンについては、PCR 反応液に添加する DNA 試料液の濃度を 10～50 ng/μL に変化させて検討したところ、50 ng/μL DNA 試料液では、抽出 DNA の 10 試料液中 8 試料液（20 ウェル中 18 ウェル）で 48 未満の Ct 値が得られ、通知法より高い濃度の DNA 試料液を用いることにより検知が可能になると考えられた。

キーワード：遺伝子組換え食品、定性 PCR 法、定性リアルタイム PCR 法、ビーフン、加工食品

Keywords: genetically modified foods, qualitative PCR method, qualitative real-time PCR method, rice vermicelli, processed food

### I はじめに

近年、世界人口が増加し食糧およびバイオ燃料原料などの農産物の需要も増加したことから、農産物の供給拡大が必要となった。しかし、これらに対応できるような農業面積の増加は進んでいない。その対応策のひとつとして、単位面積当たりの収穫量の向上を目的とした遺伝子組換え作物が開発された。我が国では、平成 3 年より遺伝子組換え作物およびその加工品である遺伝子組換え食品（GM 食品）または組換え DNA 技術応用食品の安全性評価は安全性評価指針<sup>1)</sup>に基づき行われた。その後、平成 13 年 4 月からは食品衛生法に基づく安全性審査が GM 食品に義務付けられた<sup>2)</sup>。これによって、安全性審査の手続きを経していない GM 食品が国内で流通しないよう、輸入および販売が禁止された。現在、我が国において安全性審査済みの遺伝子組換え作物として 8 作物 33 食品群が義務表示の対象<sup>3)</sup>とされている。安全性審査済みの GM 食品については、内容を明確にするため、「遺伝子組換え食品」あるいは「遺伝子組換え不分別」である旨の表示が必要とされた<sup>3),4)</sup>。我が国では、GM 食品は分別流通管理により輸入されているが、管理が適切に行われた場合でも遺伝子

組換え作物の一定の混入は避けられないことから、5%以下の意図せざる混入が認められている<sup>5)</sup>。また、平成 21 年 9 月から食品衛生法に基づく表示に関する業務が消費者庁に移管され、安全性審査済みの GM 食品については消費者庁の所管となった。一方、安全性未審査の GM 食品については従来どおり厚生労働省が所管することとされた。これに伴い、これまでの検査法が見直され、それぞれの省庁から GM 食品の検査法<sup>6),7)</sup>が改めて通知された。

千葉県では、厚生労働省通知平成 13 年 3 月 27 日付け食発第 110 号別添「組換え DNA 技術応用食品の検査方法」<sup>2)</sup>に基づき、平成 14 年 4 月から県内流通品のばれいしょ、とうもろこし、パパイヤ、米、大豆の 5 品目の加工品を含む食品について検査を実施している。今回、平成 22～24 年度の 3 カ年に当所で実施した GM 食品の検査結果についてとりまとめ報告する。また、平成 24 年 11 月の新たな通知<sup>7)</sup>に基づき検査を実施した際に安全性未審査害虫抵抗性遺伝子組換えコメの検知不能事例を経験し、当該検査に検討を加えたところ若干の知見が得られたのでその結果も併せて報告する。

## II 実験方法

### 1. 試料

千葉県内の小売店等から県内健康福祉センター食品機動監視課および健康生活支援課により、平成22年4月から平成25年3月までに収去された食品241検体を用いた。各年度の検体数は、平成22年度82検体、平成23年度79検体、平成24年度80検体であり、その内訳は、ばれいしょ加工品24検体、とうもろこし加工品16検体、パパイヤ16検体、米加工品48検体、大豆および大豆加工品137検体であった。また、試料には食品をフードプロセッサで破碎して均一に混合したものを用いた。

### 2. 試薬

1) DNAの抽出精製: Genomic-tip20/G、Genomic-tip100/GおよびGM quicker2 ((株) ニッポンジーン社製)、DNeasy plant Mini Kit ((株) QIAGEN社製)、CTAB (分子生物学用、Sigma-Aldrich社製)、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1、遺伝子工学研究用)、1mol/L Tris-HCl (pH8.0、遺伝子工学研究用)および0.5mol/L EDTA溶液 (pH8.0、遺伝子工学研究用) ((株) ニッポンジーン社製)

2) PCR反応: TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems社製)、AmpliQ Gold DNA Polymerase with GeneAmp 10×PCR buffer II & MgCl<sub>2</sub> Solution (Applied Biosystems社製)、各種プライマーおよびプローブ、各種陽性コントロールプラスミド標準プラスミド ((株) ニッポンジーン社製または(株) ファスマック社製)

3) アガロース: Agarose L03「TAKARA」 (宝酒造(株)製)、5×TBE (遺伝子工学用、(株) ニッポンジーン社製)

### 3. 装置

1) フードプロセッサ: Cuisinart DLC-NXPLUS ((株) クイジナートサンエイ社製)、16 Speed Blender (オースター社製)

2) 冷却遠心機: KUBOTA 5922 および 3780 ((株) 久保田製作所製)

3) 分光光度計: BioSpec-1600 ((株) 島津製作所製)

4) 定性および定量PCR装置: PCR Thermal Cycler SP TP400 (宝酒造(株)製)、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System および 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems社製)

5) 電気泳動装置: Mupid ミニゲル泳動装置 (アドバンス社製)

6) ゲル撮影装置: FAS-III (東洋紡績(株)製)

### 4. GM食品の検査法

検査法は、厚生労働省通知「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」<sup>8)</sup>、JAS分析試験ハンドブック<sup>9)</sup>、および安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査法に関する通知<sup>7), 10)-12)</sup>に従った(表1)。

GM食品の定性試験では、平成13年にGM食品の検査が導入されて以降、PCR反応後アガロースゲルにて電気泳動した後、蛍光染色して増幅バンドの確認を行う方法が採られていた。その後、リアルタイムPCR装置の普及に伴い、蛍光シグナルを増加させる蛍光色素を用いて測定し、蛍光強度の指数関数的な増殖曲線の有無で判定できる定性リアルタイムPCR法が用いられるようになった。安全性未審査パパイヤ PRSV-YK および安全性未審査害虫抵抗性遺伝子組換えコメ (63Bt、NNBt、CpTI) の通知法<sup>7), 10), 11)</sup>には、定性リアルタイムPCR法が用いられている。

## III 結果および考察

### 1. GM食品の検査結果

検査対象食品241検体のGM食品の検査結果を表2および3に示した。

1) ばれいしょ加工品、とうもろこし加工品、パパイヤおよび米加工品の定性試験結果

ばれいしょ加工品としてポテトスナック菓子、乾燥ばれいしょおよび冷凍ばれいしょの24検体について検査を実施し、いずれの検体からもNew Leaf Plus および New Leaf Y は検出されなかった。

とうもろこし加工品については安全性未審査のBt10 および CBH351 の検査を実施した。実施検体16

表 1. GM食品の検査法

| 食品        | 検査項目                         | DNA抽出精製法       |                       | 試験法          |
|-----------|------------------------------|----------------|-----------------------|--------------|
| ばれいしょ加工品  | New Leaf Plus および New Leaf Y | イオン交換樹脂タイプキット法 | Genomic-tip 20/G      | 定性PCR法       |
|           |                              | シリカゲル膜タイプキット法  | DNeasy Plant Mini Kit |              |
| とうもろこし加工品 | CBH351およびBt10                | イオン交換樹脂タイプキット法 | Genomic-tip 20/G      | 定性PCR法       |
|           |                              | CTAB法          |                       |              |
| パパイヤ      | パパイヤPRSV-YK                  | イオン交換樹脂タイプキット法 | Genomic-tip 100/G     | 定性リアルタイムPCR法 |
|           |                              | シリカゲル膜タイプキット法  | GM-quicker 2          |              |
| 米加工品      | Btコメ(63Bt、NNBt)              | イオン交換樹脂タイプキット法 | Genomic-tip 100/G     | 定性リアルタイムPCR法 |
|           | 害虫抵抗性コメ(63Bt、NNBt、CpTI)      | イオン交換樹脂タイプキット法 | Genomic-tip 100/G     |              |
| 大豆加工品     | RRS                          | イオン交換樹脂タイプキット法 | Genomic-tip 20/G      | 定量PCR法       |

表 2. ばれいしょ加工品、とうもろこし加工品、パパイヤおよび米加工品の定性試験結果

| 食 品       | 平成 22 年度          |     |      | 平成 23 年度 |     |      | 平成 24 年度 |     |      | 合 計 |     |      |    |
|-----------|-------------------|-----|------|----------|-----|------|----------|-----|------|-----|-----|------|----|
|           | 検体数               | 陽性数 | 検知不能 | 検体数      | 陽性数 | 検知不能 | 検体数      | 陽性数 | 検知不能 | 検体数 | 陽性数 | 検知不能 |    |
| ばれいしょ加工品  | ポテトスナック菓子         | 6   | 0    | 0        | 8   | 0    | 0        | 5   | 0    | 0   | 19  | 0    | 0  |
|           | 乾燥ばれいしょ           | 0   | 0    | 0        | 0   | 0    | 0        | 1   | 0    | 0   | 1   | 0    | 0  |
|           | 冷凍ばれいしょ           | 2   | 0    | 0        | 0   | 0    | 0        | 2   | 0    | 0   | 4   | 0    | 0  |
| とうもろこし加工品 | とうもろこし缶詰          | -   | -    | -        | 5   | 0    | 0        | 8   | 0    | 0   | 13  | 0    | 0  |
|           | コーンスナック菓子         | -   | -    | -        | 1   | 0    | 1*       | 0   | 0    | 0   | 1   | 0    | 1* |
|           | コーンスターチ           | -   | -    | -        | 2   | 0    | 0        | 0   | 0    | 0   | 2   | 0    | 0  |
| パパイヤ      | 生鮮パパイヤ            | -   | -    | -        | 8   | 0    | 0        | 8   | 0    | 0   | 16  | 0    | 0  |
| 米加工品      | ライスヌードル           | 0   | 0    | 0        | 2   | 0    | 0        | 3   | 0    | 0   | 5   | 0    | 0  |
|           | ビーフン              | 7   | 0    | 0        | 2   | 0    | 0        | 6   | 0    | 1   | 15  | 0    | 1  |
|           | ライスペーパー           | 2   | 0    | 0        | 1   | 0    | 0        | 3   | 0    | 0   | 6   | 0    | 0  |
|           | 米粉・上新粉(うるち米)      | 4   | 0    | 0        | 7   | 0    | 0        | 3   | 0    | 0   | 14  | 0    | 0  |
|           | だんご粉(うるち米・もち米1:1) | 2   | 0    | 0        | 2   | 0    | 0        | 1   | 0    | 0   | 5   | 0    | 0  |
|           | 白玉粉(もち米)          | 1   | 0    | 0        | 2   | 0    | 0        | 0   | 0    | 0   | 3   | 0    | 0  |

- : 未実施  
\* : Bt10のみ検知不能

表 3. 大豆および大豆加工品の定量試験結果

| 大豆および大豆加工品 | 平成 22 年度 |       |         |         | 平成 23 年度 |       |         |         | 平成 24 年度 |       |         |         | 合 計 |       |         |         |
|------------|----------|-------|---------|---------|----------|-------|---------|---------|----------|-------|---------|---------|-----|-------|---------|---------|
|            | 検体数      | 基準値以上 | 定量下限値以上 | 定量下限値未満 | 検体数      | 基準値以上 | 定量下限値以上 | 定量下限値未満 | 検体数      | 基準値以上 | 定量下限値以上 | 定量下限値未満 | 検体数 | 基準値以上 | 定量下限値以上 | 定量下限値未満 |
| 大豆穀粒       | 26       | 0     | 1       | 25      | 16       | 0     | 3       | 13      | 17       | 0     | 5       | 12      | 59  | 0     | 9       | 50      |
| おから        | 16       | 0     | 0       | 16      | 9        | 0     | 3       | 6       | 10       | 0     | 1       | 9       | 35  | 0     | 4       | 31      |
| 豆腐類        | 16       | 0     | 0       | 16      | 14       | 0     | 3       | 11      | 13       | 0     | 1       | 12      | 43  | 0     | 4       | 39      |

定量下限値 : 0.1%

検体のうち 15 検体は陰性であり、コーンスナック菓子 1 検体の Bt10 の検査結果が検知不能であった。検知不能となった検体は、1 回目の DNA の抽出精製を DNeasy Plant Mini Kit を用いて行った。定性 PCR では内在性 DNA 検知用に用いている陽性対照用プライマー (Zein n-5' & Zein n-3') の増幅バンドが Bt10 および CBH351 のいずれにおいても認められず、検知不能となった。その後、2 回目の DNA の抽出精製を Genomic-tip 20/G で行い、3 回目の DNA の抽出精製を CTAB 法で実施したところ、Bt10 はいずれの抽出精製においても検知不能であったが、CBH351 は Genomic-tip 20/G で得られた DNA 試料液で陽性対照用プライマーに増幅バンドが認められたことから結果は陰性となった。大森らの報告<sup>13)</sup>と同様に、本検体はいわゆる「ポン菓子」の製法により作られたコーンスナック菓子であり、加圧加工により DNA の分解が起きたと考えられ、Bt10 のみが検知不能になった原因について今後さらに検討が必要と思われる。

安全性未審査のパパイヤ PRSV-YK の検査は、定性リアルタイム PCR 法を用いて平成 23 年度から実施した。平成 23 および 24 年度のいずれの検体からも、パパイヤ PRSV-YK は検出されなかった。

安全性未審査のコメの検査は、平成 22 年度は Bt コメ (63Bt、NNBt) の検査を 16 検体実施した。平成 23 年度は害虫抵抗性遺伝子組換えコメ (63Bt、NNBt、CpTI) の検査を 16 検体、平成 24 年度も 23 年度と同様の検査を 16 検体実施した。結果は 48 検

体中 47 検体が陰性であり、ビーフン 1 検体が検知不能であった。

## 2) 大豆および大豆加工品の定量試験結果

平成 22 年から平成 24 年度に千葉県内豆腐製造業者から収去された大豆穀粒 59 検体、おから 35 検体、豆腐類 43 検体の定量試験を実施した結果、RRS の定量値が基準値の 5%を超える検体はなかった。120 検体が定量下限値 (0.1%) 未満であり、17 検体が 0.1~0.9%であった。これは、意図せざる混入とされる 5%を大幅に下回っており、分別生産流通管理が適切になされていると考えられた。

また、豆腐製造業者は表 4 に示したとおりアメリカ産、カナダ産および国産大豆を 1 種類または数種類配合して豆腐を製造しており、国産大豆のみで造られた豆腐は 4 割程度であったことから、今後も分別生産流通管理が適切になされていることを確認するための検査を実施する必要があると考えられた。

## 2. 表示の状況

遺伝子組換え食品は、現在 8 作物およびその加工品のうち、組換えられた DNA やたん白質が検出可能とされている 33 食品群が義務表示の対象となっている。平成 22 年 4 月から平成 25 年 3 月までに収去された食品 241 検体のうち、「遺伝子組換え不分別」である旨の義務表示があったのはポテトスナック菓子 1 検体のみであった。他の検体は「遺伝子組換えではない」142 検体、任意表示のため表示のないもの 50 検体および表示の対象品目外のもの 48 検体で

表 4. 検査対象食品の産地および表示

| 食品         | 検体数 | 産地          |     | 表示         |     |
|------------|-----|-------------|-----|------------|-----|
|            |     | 産地名         | 検体数 | 表示内容       | 検体数 |
| ばれいしょ加工品   | 24  | アメリカ産       | 12  | 不分別        | 1   |
|            |     | マレーシア産      | 1   | 遺伝子組換えではない | 17  |
|            |     | 国産          | 11  | 表示なし       | 6   |
| とうもろこし加工品  | 16  | タイ産         | 3   | 不分別        | 0   |
|            |     | アメリカ産       | 3   | 遺伝子組換えではない | 15  |
|            |     | 国産          | 10  | 表示なし       | 1   |
| パパイヤ       | 16  | フィリピン産      | 15  | 不分別        | 0   |
|            |     | アメリカ産       | 1   | 遺伝子組換えではない | 0   |
| 米加工品       | 48  | ベトナム産       | 10  | 表示の対象品目外   | 48  |
|            |     | タイ産         | 10  |            |     |
|            |     | 台湾産         | 6   |            |     |
|            |     | 国産          | 22  |            |     |
|            |     |             |     |            |     |
| 大豆および大豆加工品 | 137 | アメリカ産       | 28  | 不分別        | 0   |
|            |     | カナダ産        | 28  | 遺伝子組換えではない | 110 |
|            |     | アメリカ/カナダ産   | 4   | 表示なし       | 27  |
|            |     | アメリカ/カナダ/国産 | 2   |            |     |
|            |     | アメリカ/国産     | 13  |            |     |
|            |     | カナダ/国産      | 10  |            |     |
|            |     | 国産          | 52  |            |     |
| 合計         | 241 |             |     |            |     |

あった (表 4)。

3. 検知不能のビーフンについての検討

平成 24 年度に安全性未審査の害虫抵抗性遺伝子組換えコメの検査を通知法により実施し、結果判定スキームに従い判定したところ、台湾産ビーフン (以下、T ビーフン) 1 検体が検知不能となった。通知法では、内在性 DNA 検知のためのコメ陽性対照用試験として phospholipase D 遺伝子配列を検知するプライマー対およびプローブを用いた定性リアルタイム PCR を実施し、増幅曲線と閾値が交差するサイクル数 (Ct 値) が得られることを確認している。この試

験でコメ陽性対照用試験の 2 併行すべてのウェルで 48 未満の Ct 値が得られたものについて害虫抵抗性遺伝子組換えコメ検出用試験の 3 試験 (63Bt、NNBt、CpTI) を実施することとされている。しかし、T ビーフンはコメ陽性対照用試験のすべてのウェルで 48 未満の Ct 値が得られなかったことから、通知法の結果判定スキームに従い、再度、粉碎・均質後の当該試料から 2 回目の DNA 抽出精製を行った後、定性リアルタイム PCR 法を実施したが、やはりコメ陽性対照用試験のすべてのウェルで 48 未満の Ct 値が得られず、検知不能となった。

表 5. 抽出 DNA 濃度および各 DNA 試料液濃度における Ct 値

| 抽出DNA<br>試料液No. | DNA濃度<br>(ng/μL) | 260nm/280nm | 260nm/230nm | ウェルNo. | Ct 値             |          |          |          |
|-----------------|------------------|-------------|-------------|--------|------------------|----------|----------|----------|
|                 |                  |             |             |        | DNA試料液濃度 (ng/μL) |          |          |          |
|                 |                  |             |             |        | 10               | 20       | 30       | 50       |
| 1               | 71               | 1.58        | 1.03        | 1      | -                | 40.2     | 40.2     | 41.9     |
|                 |                  |             |             | 2      | -                | -        | 39.4     | 40.9     |
| 2               | 69               | 1.53        | 1.02        | 3      | -                | 39.9     | 40.4     | 40.4     |
|                 |                  |             |             | 4      | -                | -        | 46.2     | -        |
| 3               | 75               | 1.53        | 0.99        | 5      | -                | 39.2     | -        | 40.8     |
|                 |                  |             |             | 6      | -                | -        | -        | 41.9     |
| 4               | 66               | 1.50        | 0.99        | 7      | -                | 40.1     | 47.8     | 41.2     |
|                 |                  |             |             | 8      | -                | -        | 40.3     | 39.5     |
| 5               | 66               | 1.50        | 0.97        | 9      | 39.9             | 40.2     | -        | 41.8     |
|                 |                  |             |             | 10     | -                | -        | -        | 43.1     |
| 6               | 76               | 1.52        | 0.97        | 11     | -                | 40.1     | 40.5     | 40.6     |
|                 |                  |             |             | 12     | -                | 40.5     | -        | -        |
| 7               | 71               | 1.51        | 0.97        | 13     | 40.3             | -        | -        | 39.7     |
|                 |                  |             |             | 14     | -                | -        | -        | 40.8     |
| 8               | 68               | 1.55        | 0.97        | 15     | -                | 39.5     | 41.4     | 40.6     |
|                 |                  |             |             | 16     | -                | -        | -        | 41.0     |
| 9               | 71               | 1.58        | 0.99        | 17     | 39.1             | 40.9     | 40.2     | 39.9     |
|                 |                  |             |             | 18     | -                | -        | 40.0     | 39.2     |
| 10              | 61               | 1.56        | 0.97        | 19     | 40.9             | 40.0     | 40.1     | 40.9     |
|                 |                  |             |             | 20     | -                | -        | -        | 40.0     |
| 平均値±SD          | 69±4             | 1.54±0.03   | 0.99±0.02   |        | 40.1±0.7         | 40.1±0.5 | 41.5±2.8 | 40.8±0.7 |

-: 48未満のCt 値が得られなかったもの

T ビーフンの原材料は米粉、コーンスターチおよび小麦粉で、その組成は、重量比で米粉 60%、コーンスターチ 25%および小麦粉 15%であった。加工段階では、「浸漬」、2 回の「蒸」等の工程があり、これらの組成比と DNA の断片化等の理由によりコメ内在性の DNA が減少していると推測された。そこで今回、T ビーフンのコメ陽性対照用試験で 48 未満の Ct 値が得られなかった原因を調べる目的で、PCR 反応液に添加する試料液を希釈し、DNA 濃度を 10、20、30 および 50 ng/μL と変化させて Ct 値が得られるか否かの検討を行った。

#### 1) T ビーフンから得られた抽出 DNA の濃度および純度

T ビーフンの DNA の抽出精製は Genomic-tip 100/G を用いて 10 試行で行った。抽出精製した DNA 試料液は 260nm での吸光度を測定し、1 O.D.を 50 ng/μL とし、DNA 濃度を算出した。また、260 nm/280 nm および 260 nm/230 nm を測定し、純度の指標とした。

抽出された DNA の濃度は 61~76 ng/μL であった。純度の指標となる 260 nm/280 nm 比および 260 nm/230 nm 比は、タンパク質等の混入および多糖類等夾雑物の混入由来の吸光度比であり、これらの比がそれぞれ 1.7~2.0、2.0 以上の場合 DNA が十分に精製されていることを示している<sup>7),14)</sup>。抽出された DNA の 260 nm/280 nm 比と 260 nm/230 nm 比は 1.50~1.58 および 0.97~1.03 であり、両指標から夾雑物の混入が認められた (表 5)。

#### 2) DNA 試料液の各濃度における Ct 値および陽性数

リアルタイム PCR は希釈した各 DNA 試料液あたり 2 ウェル並行で行い、これから得られた 20 ウェルの結果も併せて表 5 に示した。各濃度の DNA 試料液において得られた Ct 値は 39.1~47.8 であり、平成 24 年度にリアルタイム PCR を実施した T ビーフン以外の米加工品の Ct 値 22.7~37.9 (平均値 26.2) に比べて高い値であった。これは、DNA の断片化が進んだため PCR で増幅可能な DNA が得られにくいことが原因と考えられた。

DNA 試料液の各濃度における Ct 値が得られたウェル数および陽性となった抽出 DNA 試料液数について比較した (図 1)。10 ng/μL DNA 試料液では 48 未満の Ct 値が得られたウェル数は少なく、20 ウェル中 4 ウェルのみであった。しかし、50 ng/μL DNA 試料液では 20 ウェル中 18 ウェルで 48 未満の Ct 値が得られたことから DNA 試料液の濃度を高くすることで鋳型となる DNA のコピー数が増えたと考えられた。通知法では各 DNA 試料液あたり 2 ウェル並行でリアルタイム PCR を行うこととし、2 ウェルともに 48 未満の Ct 値が得られた場合、その DNA 試料液を陽性としている。これに基づき判定すると、10 ng/μL DNA 試料液では Ct 値の得られた 4 つの試料

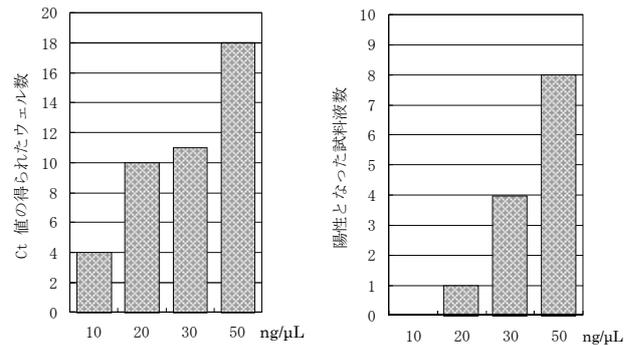


図 1 DNA 濃度別にみた Ct 値の得られたウェル数および陽性となった抽出 DNA 試料液数

液のいずれも 2 ウェル中 1 ウェルでのみ Ct 値が得られたため、陽性と判定された抽出 DNA 試料液はなかった。しかし、50 ng/μL DNA 試料液では、Ct 値の得られた抽出 DNA の 10 試料液中、8 試料液が陽性となった。

今回得られた各濃度の DNA 試料液の Ct 値 (平均値) は、10 ng/μL では 40.1、20 ng/μL では 40.1、30 ng/μL では 41.5、50 ng/μL では 40.8 であった。同じプライマーを用いて平成 24 年度にリアルタイム PCR を実施した T ビーフン以外の米加工品の Ct 値 (平均値) は 26.2 であった。このことから PCR の増幅効率を 100% と仮定すると、Ct 値の差 (n) は鋳型となる DNA コピー数が  $2^n$  異なることを意味しているため、Ct 値 40 の T ビーフンには Ct 値 26 の T ビーフン以外の米加工品の DNA 試料液の概ね 1/16000 の鋳型となる DNA コピー数しか存在していないと推定され、T ビーフンの鋳型となる DNA コピー数は検知下限付近であると考えられた。また、DNA 試料液の濃度を高く調製する場合、試料液の希釈倍率が低くなることから夾雑物も同様に希釈倍率が低くなり PCR への影響が懸念されたが、各濃度の DNA 試料液より得られた Ct 値から今回は夾雑物の影響は少ないと考えられた。

高橋らは、加熱加圧処理により DNA の断片化が進み、加熱処理や蒸気処理に比べて PCR で増幅されるコメ内在性の DNA の初期量が非常に少ない結果となったと報告<sup>15)</sup>している。T ビーフンは原材料が 100% 米ではない加工品であり、また加工段階の物理的作用や熱による DNA の断片化も受けていることから、DNA 試料液中のコメの内在性 DNA が減少し、通知法の DNA 試料液の濃度では PCR で増幅可能な DNA を得ることができなかったものと推測される。

今回の実験結果から DNA 試料液の濃度を高くすることにより、PCR での増幅が可能になると考えられ、このような加工品が検査対象食品の場合には、夾雑物の影響を考慮し DNA 試料液の濃度設定をすることが必要であると考えられた。

#### IV まとめ

平成22～24年度にばれいしょ加工品24検体、とうもろこし加工品16検体、パパイヤ16検体、米加工品48検体、大豆および大豆加工品137検体の合計241検体のGM食品についての検査を実施した。コーンスナック菓子1検体のBt10およびビーフン1検体が検知不能となったが、それ以外のばれいしょ加工品、とうもろこし加工品、パパイヤおよび米加工品はすべて陰性であった。また、大豆および大豆加工品は、RRSの定量値が基準値の5%を超えるものではなく、定量下限値を超えた検体の混入率は0.1～0.9%であった。

また、検知不能のビーフンについて検討したところ、10 ng/μL DNA試料液では陽性と判定された抽出DNA試料液はなかった。しかし、50 ng/μL DNA試料液では、20ウェル中18ウェルでCt値が得られ、抽出DNAの10試料液中8試料液が陽性となった。DNA試料液中のコメの内在性DNAが減少し、PCRで増幅可能なDNAを得ることができない加工品が検査対象食品の場合、通知法より高い濃度のDNA試料液を用いることにより検知が可能になると考えられた。

#### VI 引用文献

- 1) 組換えDNA技術応用食品・食品添加物の製造指針及び組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針，衛食第153号，平成3年12月26日
- 2) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について，食発第110号，平成13年3月27日
- 3) 食品衛生法第19条第1項の規定に基づく表示の基準に関する内閣府令，内閣府令第45号，平成23年8月31日
- 4) 食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について，食発第79号，平成13年3月15日
- 5) 加工食品の表示に関する共通Q&Aについて(第3集:遺伝子組換え食品に関する表示について)，消食表第474号，平成23年12月1日改正
- 6) 安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査方法について，消食表第201号，平成24年11月16日
- 7) 安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について，食安発1116第3号，平成24年11月16日
- 8) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について，食安発第0618001号，平成20年6月18日改正
- 9) 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，独立行政法人農林水産消費技術センター，平成14年6月20日
- 10) 安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ

(PRSV-YK)の暫定検査法について，食安監発0222第3号，平成23年2月22日

- 11) 安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について，食安監発0106第5号，平成23年1月6日
- 12) 安全性未審査の中国産米加工品の検知法について，食安監発第0220001号，平成19年2月20日
- 13) 大森清美，土屋久世，岸弘子，山田利治，平山クニ，佐藤修二，他：遺伝子組換え食品の分析結果(平成14年度)，神奈川県衛生研究所研究報告，33，111-113(2003)
- 14) 松岡猛，川島よしみ，穂山浩，三浦裕仁，合田幸広，瀬畑環，一色賢司，豊田正武，日野明寛：ダイズ及びダイズ加工食品からの組換え遺伝子の検知法(第1報)，食品衛生学雑誌，40，149-157(1999)
- 15) 高橋邦彦，石井里枝，松本隆二，堀江正一：加工モデル実験によるコメ内在性DNAが検出されなかったビーフンに関する一考察，食品衛生学雑誌，51，37-42(2010)