

組換え DNA 技術応用食品の実態調査の概要(2001 年度)

田栗 利紹

Detection of Genetically Modified Foods in Nagasaki Prefecture (2001)

Toshitsugu TAGURI

Key word : Genetically Modified Foods , polymerase chain reaction(PCR)

キーワード:組換え DNA 技術応用食品(遺伝子組換え食品), ポリメラーゼ連鎖反応

まえがき

米国, カナダを中心とした遺伝子組み換え(以下、GM と略記)農作物の栽培に伴い, わが国でも 44 種類の GM 農作物が食品等に利用されるようになってきた。これらの食品に対する安全性審査の義務化と表示の制度化^{1),2),3)}に伴い, 組み換え食品を検証する方法が求められ, 平成 13 年 3 月には厚生労働省医薬局食品保健部長より, 「組み換え DNA 技術応用食品の検査方法について」^{4),5),6)}(以下、厚労省法と略記)が通知された。

これらのことを受けて, 今回, 長崎県における GM 食品の流通状況を調査したので報告する。

調査方法

1 調査期間と試料

平成 13 年 8 月~ 11 月まで, 項目はダイズ穀粒, ダイズ加工品, トウモロコシ半生製品およびトウモロコシ加工品とし, 各々 30 試料, 32 試料, 32 試料及び 32 試料を検査した。今回試験に供した項目ごとの製品の種類を図 1 に示した。これらのものは, GM に関する表示を調査し, 「国産」, 「分別流通管理原料」, 「非遺伝子組換え」および「非表示」に区分して分類した。穀粒及び半生製品はイムノクロマト法(厚労省法⁴⁾のラテラルフロー法)と定性PCR法により, 加工品は定性PCR法により検査した。

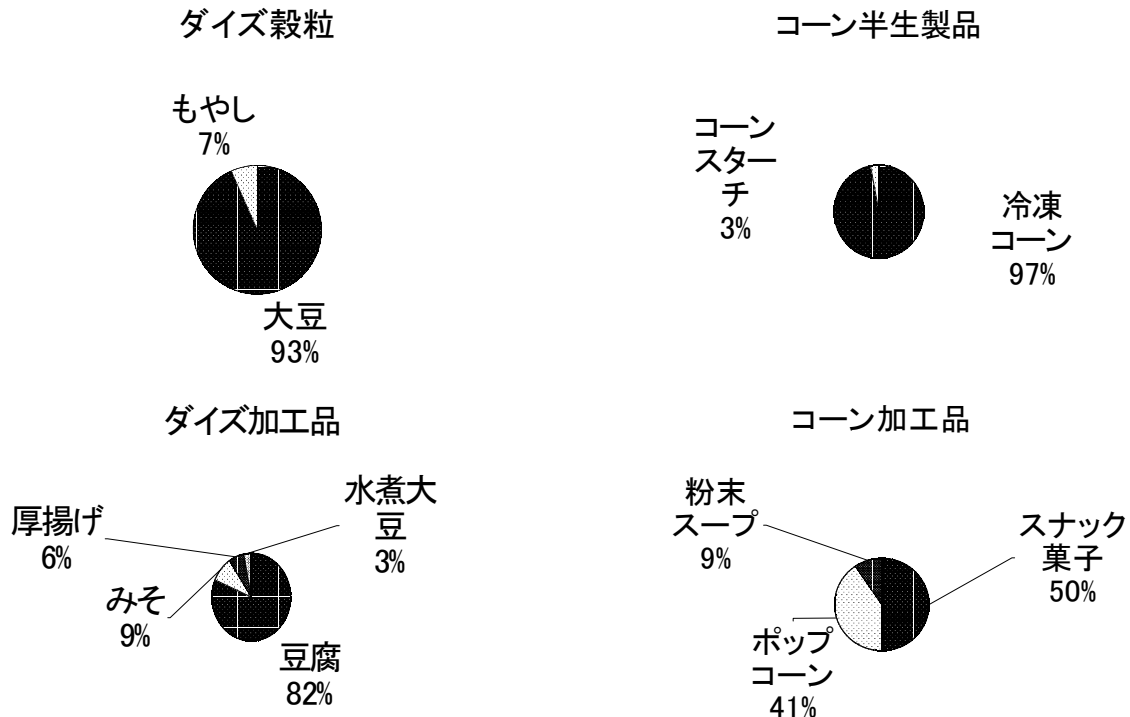


図1 項目ごとの製品の種類

表1 PCR プライマーリスト

Primer name	Sequence	Destination	Amplicon
CaMV03-5'	5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'	グリホサート耐性遺伝子検出	513bp
EPSPS01-3'	5'-ATC CTG GCG CCC ATG GCC TGC ATG-3'		
Le101-5'	5'-GGC TGA TAA CAC ACT CTA TTA TTG T-3'	ダイズ内在性遺伝子検出	818bp
Le101-3'	5'-TGA TGG ATC TGA TAG AAT TGA CGT T-3'		
CaMV03-5'	5'-CCA TAA ACC CCA AGT TCC TAA ATC-3'	グリホサート耐性遺伝子確認	366bp
EPSPS01-3'	5'-ATC CTG GCG CCC ATG GCC TGC ATG-3'		
CaM03-5'	5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'	CBH351 遺伝子検出	170bp
CBH02-3'	5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT-3'		
Zein-5'	5'-CCT ATA GCT TCC CTT CTT CC-3'	トウモロコシ内在性遺伝子検出	157bp
Zein-3'	5'-TGC TGT AAT AGG GCT GAT GA-3'		
Cry9C-5'	5'-TAC TAC ATC GAC CGC ATC GA-3'	CBH351 遺伝子確認	171bp
35Ster-3'	5'-CCT AAT TCC CTT ATC TGG GA-3'		

2 試薬および装置

アガロースは L03 「TAKARA」(宝酒造)を用い、DNA マーカーは Hi-Lo™ DNA Marker((株)アベテック)を用いた。DNA ポリメラーゼは HotStarTaq mastermix(Qiagen)を用いた。

装置類は、粉砕器: Oster Blender ST-1(OSAKA CHEMICAL), 遠心機: Centrifuge 5415D (eppendorf), 分光光度計: Gene Quant(amersham pharmacia), 電気泳動装置: Mupid-2(コスモ・バイオ), 画像撮影装置: ポラロイド多用途カメラ MP-4 (Polaroid), トランスイルミネーター: TF-20C(VILBER LOURMAT), サーマルサイクラー: iCycler(Bio-RAD)を用いた。

3 イムノクロマト法

ダイズ穀粒は, Trait RUR Soybean Grain Test Kit (Strategic Diagnostics), トウモロコシ半生製品は Trait Bt9 Corn Grain Test Kit(Strategic Diagnostics)を用いて検査した。試料は約 400 粒或いは 115g 程度を, 厚労省法⁴⁾に準拠して処理した。

4 定性PCR法

(1)対象遺伝子

使用したプライマーのリストを表1に示した。ダイズ試料に対しては, 松岡ら⁸⁾, 門間ら⁹⁾の用いたグリホサート耐性遺伝子及びレクチン遺伝子検出用プライマーを用いた。トウモロコシ試料に対しては, 厚労省法⁴⁾に示してある CBH351 遺伝子及びツエイン遺伝子検出用プライマーを用いた。

(2)DNA 溶液の調整

ダイズ穀粒, トウモロコシ半生製品は, 厚労省法⁴⁾ (2.2.1. トウモロコシ及びダイズ穀粒からの DNA 抽出精製)を準用し, ダイズ, トウモロコシ加工品につい

ては, 農林水産省農林水産消費技術センターが作成した 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⁷⁾個別品目編」(以下 JAS 法と略記)に記載されている方法を準用した。

即ち, 穀粒及び半生製品は, 厚労省法⁴⁾に準拠して粉砕或いはブレンドした試料 2g を試験に供した。加工製品は JAS 法に準拠して粉砕処理した試料の約 100mg を試験に供した。これらは全て厚労省法⁴⁾に示されたシリカゲル膜タイプのキット(QIAGEN DNeasy Plant Mini)を用いてDNAの抽出を行った。抽出後分光光度計により DNA 量を測定し, 約 10 µg/ml に調製した溶液を PCR 反応に供した。

(3)PCR 反応液の調製

HotStarTaq mastermix(Qiagen)12.5 µl, 5 µM プライマー対混合液 1 µl, mastermix 添付蒸留水 9 µlの割合で, 試験数に陰性対照分を加えた数量を調整し, 0.2ml マイクロチューブに 22.5 µlづつ分注した。(2)で調製した DNA 溶液 2.5 µlを入れ PCR 反応を行った。

(4)PCR 条件

95 °C 15 分の熱変性の後, 95 °C 0.5 分間, 60 °C 0.5 分間, 72 °C 0.5 分間を 1 サイクルとして 40 サイクルの増幅反応を行った後, 72 °C 7 分間の伸長を行った。

(5)電気泳動

2%アガロースゲルを用い, TAE 緩衝液中で 100V, 30 分間の条件で電気泳動した。泳動後, トランスイルミネーターおよび画像撮影装置で撮影した。

調査結果

1 製品の GM に関する表示

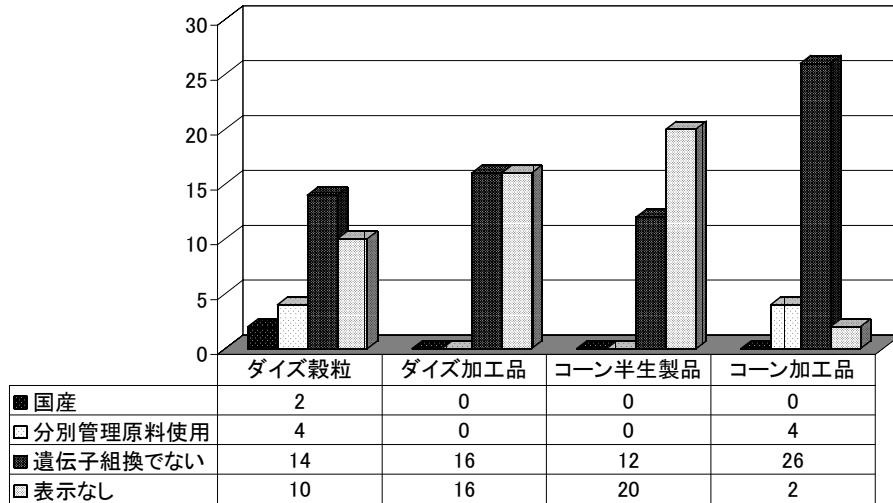


図2 項目ごとの遺伝子組換えに関する表示

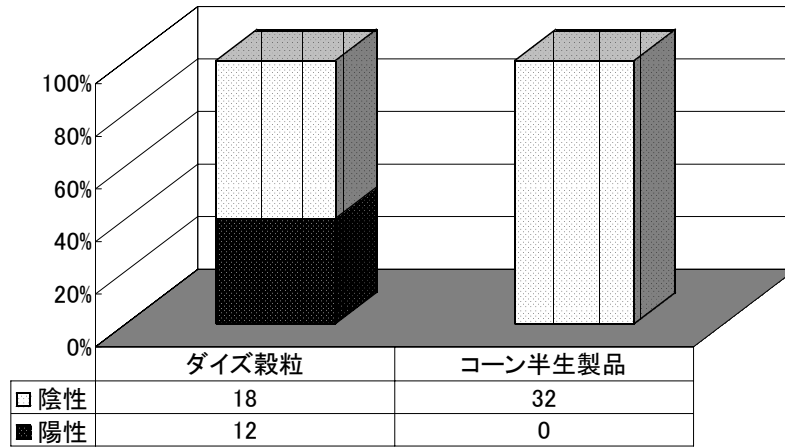


図3 イムノクロマト法成績

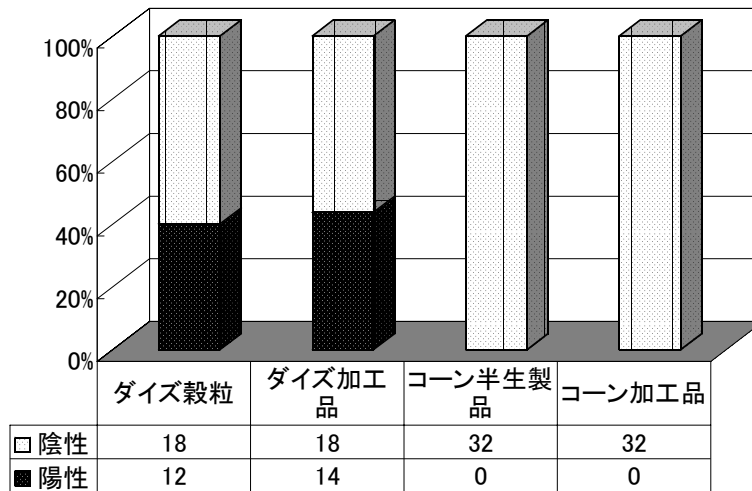


図4 定性PCR法成績

全 126 試料中、「国産」が 2 試料(2%),「分別流通管理原料使用」が 8 試料(6%),「遺伝子組換えでない」が 68 試料(54%)および「非表示」が 48 試料(38%)であり、「遺伝子組換え原料使用」や「不分別」の表

示は全くなかった。検査項目ごとの表示の別を図 2 に示した。

2 イムノクロマト法結果

雑穀粒は 30 試料の内 12 試料(40%)が陽性

を示した。トウモロコシ半生製品は全試料陰性であった(図3)。

3 定性 PCR 法結果

ダイズ穀粒は 30 試料中 12 試料(40%), ダイズ加工品は 32 試料中 14 試料(44%)が陽性を示した。トウモロコシ半生製品およびトウモロコシ加工品は全試料陰性であった(図4)。

考 察

(1) 全体の検出状況

今回の調査で、ダイズ製品には、穀粒、加工品共にグリホサート耐性遺伝子が、かなりの割合で含有されていた。一方でトウモロコシ製品には、半生製品、加工品共に CBH351 遺伝子は全く含有されていなかった。これは、前者が国の安全性審査が認められた品種であり、後者が未審査の品種であったことによると考えられた。

(2) イムノクロマト法および定性 PCR 法成績の比較

ダイズ穀粒においてイムノクロマト法と定性 PCR 法の成績は試料ごとに全て一致した結果であった(データ未掲載)。このことから、イムノクロマト法によるスクリーニングは有用であると考えられた。

(3) ダイズ製品におけるグリホサート耐性遺伝子検出状況

今回、ダイズの穀粒および加工品では共に 40% 強の高い検出率を示した。門間ら⁹⁾はダイズ製品のグリホサート耐性遺伝子検出状況調査で、ダイズ穀粒は 26 試料中 2 試料(8%)から、豆腐は 66 試料中 16 試料(24.2%)からグリホサート耐性遺伝子を検出したと報告している。我々の調査はこの数値をかなり上回る結果となった。しかし、今回の調査において、ダイズは穀粒の状態ではほとんど一般の市場に流通しておらず、ほとんどが豆腐店が原材料として使用していたものであった。さらに、ダイズ穀粒のうち 90% が輸入品で 10% のみが国産品であり(図5)、門間ら⁹⁾の試料の 62%(16/26)が国産品であることから、直接比較できないと考えられた。なお、国産品はイムノクロマト法、定性 PCR 法共に全て陰性であった。

豆腐についての成績では、今回供試したダイズ加工品の 82% が豆腐であり、前述のように 90% に達する輸入大豆が豆腐の原材料として用いられていたことが高い検出率の一因にあげられると考えられた。

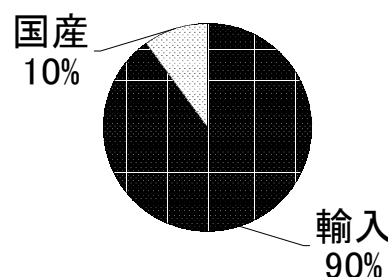


図5 ダイズ穀粒の輸入状況

(4) 表示ごとのグリホサート耐性遺伝子検出状況

表2に、製品の遺伝子組換えに関する表示において、「国産」、「分別流通管理原料使用」および「遺伝子組換えでない」を示した製品を「表示」として一括し、「非表示」と区分して、グリホサート耐性遺伝子検出率を比較した表を示した。両製品共に非表示のものが表示をやや上回る結果となった。

表2 ダイズ製品のグリホサート耐性遺伝子検出率

	ダイズ穀粒	ダイズ加工品
表示	7/20(35%)	6/16(35%)
非表示	5/10(50%)	8/16(50%)

文 献

- 1) 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準, 農林水産省告示第517号, (2000)
- 2) 食品, 添加物等の規格基準の一部改正, 厚生省告示第232号, (2000)
- 3) 組換えDNA技術応用食品および添加物の安全性審査の手続き, 厚生省告示第233号, (2000)
- 4) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について, 厚生労働省食品保健部長通知食発第110号, (2001)
- 5) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正), 厚生労働省食品保健部長通知食発第158号, (2001)
- 6) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について(一部改正), 厚生労働省食品保健部長通知食発第241号, (2001)

- 7) 東京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”, 2001年4月
- 8) 松岡猛, 他: 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), 食衛誌, 40, 149 ~ 157, (1999)
- 9) 門間公夫, 他: 国産及び輸入ダイズ並びに豆腐からのグリホサート耐性遺伝子の検出状況, 食衛誌, 41, 312 ~ 315, (2000)