

## 遺伝子組換え大豆の検査結果

- 平成13年～平成25年 -

吉光真人\*<sup>1</sup> 清田恭平\*<sup>1</sup> 野村千枝\*<sup>1</sup> 栗津薫\*<sup>1</sup> 山口瑞香\*<sup>1</sup> 柿本幸子\*<sup>1</sup>  
阿久津和彦\*<sup>1</sup> 高取聡\*<sup>1</sup> 梶村計志\*<sup>1</sup> 尾花裕孝\*<sup>2</sup>

平成13年度から平成25年度までの13年間の遺伝子組換え大豆 RoundupReady Soybean(RRS)の検査結果をまとめた。遺伝子組換えに関する表示義務のない、もしくは「遺伝子組換えでない」等の任意表示のある大豆および大豆加工食品を検査対象とした。総検体数294のうち、RRSが検出された検体数は42、検査不能とした2検体を減じた総検体数に対するRRSが検出された検体の割合は14.4%であった。非遺伝子組換え大豆の分別生産流通管理の適切さの基準となる、5%を超えるRRSが混入した検体はなかった。

キーワード：遺伝子組換え大豆、表示義務、定量ポリメラーゼ連鎖反応、DNA抽出

Keywords: genetically modified soybean, mandatory labeling, quantitative polymerase chain reaction, DNA extraction

平成13年4月から、遺伝子組換え食品に関する新たな表示制度<sup>1), 2)</sup>が導入された(表1)。この制度では、分別生産流通管理が行われた非遺伝子組換え農産物およびこれを原材料とする加工食品については、従来の食品と同等であることから、遺伝子組換えに関する表示の義務はない。さらに、大豆およびとうもろこしでは非意図的な場合に限り、分別生産流通管理された非遺伝子組換え農産物への遺伝子組換え農産物の5%以下の混入は許容される。一方、5%を超える混入が確認された場合には、非遺伝子組換え農産物の分別生産流通管理が適切に行われていない疑いが生じ、その検証が必要となる。

遺伝子組換えに関する表示のない、もしくは「遺伝子組換えでない」等の任意表示のある食品は、前述の表示義務のない食品に該当する(表1)。そのような食品の表示の正しさを検証するための手段の一つとして、通知<sup>3)</sup>記載の「安全性審査済みの組換えDNA技術応用食品の検査法」が挙げられる。当該検査法を用いれば、食品の原材料に含まれる検査対象の農産物中の遺伝子組換え農産物の混入率を算出できる。すなわち、遺伝子組換えに関する表示のない、大豆あるいはとうもろこしを原材料とする食品を検査し、原材料の遺伝子組換え農産物の混入が5%を超えるかどうかを確認することで、分別生産流通管理体制の適切さを検証することができる。

平成13年度より、当所では通知<sup>3), 4)</sup>に従い、遺伝子組換えに関する表示のない、もしくは「遺伝子組換えでない」等の任意表示のある大豆および大豆加工食品を対象に検査を行ってきた。検査の内容は、原材料の大豆に含まれる遺伝子組換え大豆 RoundupReady Soybean(以下 RRS)混入率が5%を超えるかどうかを確認するものである。今回、平成13年度から平成25年度までのRRSの検査結果をまとめたので報告する。

\*<sup>1</sup>大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 食品化学課\*<sup>2</sup>大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部

Detection of Approved Genetically Modified Soybean in Foods (2001-2013)

by Masato YOSHIMITSU, Kyohei KIYOTA, Chie NOMURA, Kaoru AWAZU, Mizuka YAMAGUCHI, Sachiko KAKIMOTO, Kazuhiko AKUTSU, Satoshi TAKATORI, Keiji KAJIMURA and Hirota OBANA

表1. 遺伝子組換え食品に関する表示制度

表示の対象となる食品	表示の必要性	表示例
分別生産流通管理された非遺伝子組換え農産物およびそれらを原材料に使用した加工食品	表示義務なし (表示してもよい)	遺伝子組換えでない
分別生産流通管理された遺伝子組換え農産物およびそれらを原材料に使用した加工食品	義務表示	遺伝子組換え
分別生産流通管理されていない農産物およびそれらを原材料に使用した加工食品	義務表示	遺伝子組換え不分別

## 方法

### 1. 試料

平成 13 年から平成 25 年にかけて大阪府内の製造所および小売店で収去された 294 検体について検査を行った。

### 2. 試料の調製

固形試料はミルサーIFM-700G(イワタニ製)、もしくはファイバーミキサーMX-X103-D(Panasonic 製)を用いて粉碎した。粉末状、もしくは液体状試料はそのまま DNA 抽出に供した。

### 3. DNA 抽出法

A) CTAB-JAS : JAS 分析試験ハンドブック<sup>5)</sup>、3.3 CTAB を用いた DNA の抽出、の乳鉢での磨砕処理を省略した手順に従った。

B) CTAB-JAS 短縮 : CTAB-JAS の RNase A 処理以降の手順を省略し、RNase A 処理の代わりに 100 μL Tris-EDTA (TE) 緩衝液 [10 mmol/L 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris)-HCl (和光純薬工業 製), 1 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (同仁化学研究所製), pH 8.0] を添加し、65°C、10 分間インキュベートした。

C)-a Genomic-tip : JAS 分析試験ハンドブック<sup>5)</sup>、3.2 QIAGEN Genomic-tip 20/G による DNA の抽出、に従った。

C)-b Genomic-tip : 抽出操作前に、粉碎試料 2 g を 50 mL PP 遠沈管にとり、滅菌水 20 mL で振とう洗浄後、5,000rpm、10 分間遠心し、上清を除く操作を 3 回繰り返した。得られた沈澱を抽出に用いた。以降の操作は C)-a に従った。

C)-c Genomic-tip : カラム洗浄用の QC 緩衝液の通液量を通常の 3 倍量の 18 mL とした以外、C)-a に従った。

D) DNeasy Plant Mini Kit : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.2. シリカゲル膜タイプキット法」に従った。

E) Wizard DNA Clean-up System : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.6. シリカベースレジジンタイプキット法」に従った。

F) QIAamp® DNA Stool Mini Kit(キアゲン製) : キットのプロトコールに従った。

G) Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food(プロメガ製) : キットのプロトコールに従った。

H) CTAB : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.1. CTAB 法」に従った。

I) GM quicker : 消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.1.5. シリカゲル膜タイプキット法」に従った。

A)、B)、C)-a~c、D)~G)は大豆穀粒以外の試料、H)、I)は大豆穀粒に用いた。通常の検査では、A)、C)-a、H)、I)を用いた。

### 4. DNA 抽出液の評価

消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.3.2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存」に従った。

### 5. 定量 PCR 法

消費者庁通知<sup>4)</sup>「2.1.2. 定量 PCR 法」に従った。測定対象は RRS とした。リアルタイム PCR 装置は ABI PRISM™ 7900HT 384well(Life Technologies 社製)を用いた。黒豆茶からの DNA 抽出液については、DNA 抽出原液、および TE 緩衝液を用いて DNA 抽出原液を 10、100 倍希釈したものを測定した。味付け油揚げからの DNA 抽出液については、DNA 抽出法の C)-a 以外では、DNA 抽出原液、および DNA 抽出原液を TE 緩衝液で 2、10 倍希釈したものを測定した。

DNA抽出法のC)-aでは、DNA抽出原液をTE緩衝液で2、10倍希釈したものを測定した。

## 6. RRS混入率の算出

以下の式に従い、算出した。

$$\text{RRS混入率(\%)} = (\text{RRS遺伝子コピー数} / \text{レクチン遺伝子コピー数} \times \text{内標比} 1.00) \times 100$$

## 結果および考察

### 1. RRS検出率、混入率の傾向

表2.に年度別検体数とRRS検出検体数/検体数×100(RRS検出率)を示した。平成13年度を除き、検体数は21～27であった。RRS検出率は経年的な減少傾向を示した。平成23年度から25年度の検査ではRRSが検出されなかった。

表3.に検体の種類別RRS検出率を示した。検体数は豆腐、大豆穀粒、厚揚げ、豆乳、油揚げ、きな粉が10検体以上であった。大豆加工食品の中では豆腐および豆腐関連製品の検体数が多かった。検体数10以上の検体の中で、RRS検出率は豆腐、厚揚げ、油揚げ、きな粉が高く、大豆穀粒、豆乳が低かった。大豆穀粒や豆乳と比較し、豆腐、厚揚げ、油揚げ、きな粉にはRRSが含まれる確率が高いと考えられた。

RRSが検出された検体のRRS混入率の分布を調べた(図1.)。全体の90%が混入率0.5%未満であった。最も高い混入率を示した検体は豆腐の1.8%であった。当所で検査したすべての検体について、RRSは混入

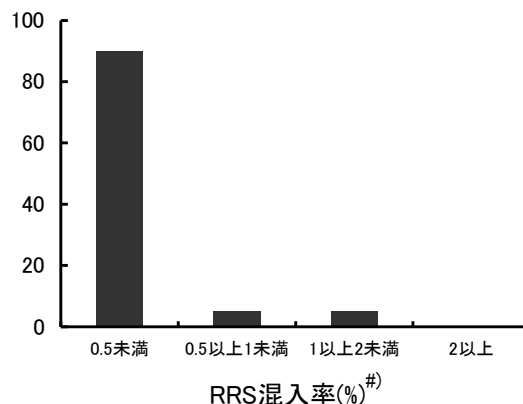


図1. RRS混入率の分布

<sup>#)</sup>: (RRS遺伝子コピー数/レクチン遺伝子コピー数 × 内標比1.00) × 100

していなかったか、あるいは混入していても基準となる5%よりも十分に低かった。

平成23年度から25年度の検査ではRRSは検出されなかった。また、現在までに当所や他の自治体の検査機関の検査において、遺伝子組換え食品に関する義務表示がない原材料を使用した食品でRRS混入率が5%を超えた事例はない。今後も同様の傾向が続くのであれば、遺伝子組換え食品に関する義務表示がない原材料を使用した食品で、表示義務違反が疑われる事例の発生の可能性は低いと考えられる。

### 2. 検査不能検体について

A) 黒豆茶：本検体は黒豆を煎り、粗挽きしたものをティーバッグに詰めたものであった。本検体の黒

表3. 検体の種類別RRS検出率

製品の種類	検体数	RRS検出検体数	RRS検出率 <sup>1)</sup> (%)
豆腐	115	18	15.7
大豆穀粒	49	2	4.1
厚揚げ	35	9	25.7
豆乳	24	1	4.2
油揚げ	22	8	36.4
きな粉	19	3	15.8
おから	7	1	14.3
凍豆腐	7	0	0
ゆば	7	0	0
大豆タン白	2	0	0
脱脂大豆	2	0	0
大豆水煮	1	0	0
大豆煮豆	1	0	0
納豆	1	0	0
黒豆茶	1	- <sup>2)</sup>	-
味付け油揚げ	1	-	-
計	294	42	14.4 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>: RRS検出検体数/検体数×100

<sup>2)</sup>: 検査不能

<sup>3)</sup>: 検体数合計から検査不能2検体を減じた検体数での検出率

表2. 年度別検体数とRRS検出率

年度	検体数	RRS検出検体数	RRS検出率 <sup>1)</sup> (%)
13	15	5	33.3
14	23	7	30.4
15	22	5	22.7
16	27	9	33.3
17	27	4	14.8
18	27	1	3.8 <sup>2)</sup>
19	22	2	9.1
20	22	2	9.1
21	22	4	18.2
22	22	3	13.6
23	22	0	0
24	21	0	0
25	22	0	0 <sup>2)</sup>
計	294	42	14.4

<sup>1)</sup>: RRS検出検体数/検体数×100

<sup>2)</sup>: 検査不能1検体を減じた検体数での検出率

豆は焦げた状態で、強く加熱された可能性が考えられた。DNA抽出法のA)、B)、C)-a、D)~G)を用いてDNA抽出を行ったが、得られたすべてのDNA抽出液で、DNA由来の260 nmをピークとする吸光度スペクトルは得られなかった。定量PCRで測定したところ、大豆の内在性遺伝子であるレクチン遺伝子は検出されなかった。本検体に含まれるDNAは加工時の加熱により、分解、断片化し<sup>6)、7)</sup>、鋳型DNAとしてPCRに必要なDNA鎖長を満たさなかったと考えられた。

B) 味付け油揚げ：本検体は油揚げを調味液中で加熱調理し、包装、加熱殺菌したものであった。DNA抽出法のA)、C)-a~cを用いて検査を行った。調味液中の糖類等のPCR阻害物質を除去する目的でC)-bを、PCR阻害物質等の除去効果を高める目的でC)-cを用いた。抽出はすべて3併行で行った。定量PCRでレクチン遺伝子を測定した。結果はすべて、3併行のデータを平均した値で示した(表4)。

DNA由来の260 nmをピークとする吸光度スペクトルはすべてのDNA抽出原液で確認された。DNAの精製度は260/280 nm吸光度比で判断され、1.7~2.0程度が望ましいとされている<sup>4)</sup>。抽出法C)-aで吸光度比が1.38であった以外は良好な結果であった。抽出法C)-b、C)-cで抽出法C)-aに追加した操作手順は吸光度比の改善に効果があったと考えられた。

抽出法C)-aは抽出原液を希釈することでレクチン遺伝子コピー数が増加し、他の抽出法では減少した。抽出法C)-aの抽出原液中にはPCR阻害物質が含まれていたことが推測された。また、抽出法C)-b、C)-cにおいて抽出法C)-aに追加した操作手順は、抽出原

液中に含まれるPCR阻害物質を減少させる効果があったと考えられた。

吸光度スペクトルおよび260 nmの吸光度値よりDNAが抽出されていることが示された。定量PCR溶液に添加したDNA量は規定量程度であった。しかし、レクチン遺伝子コピー数は他の大豆製品<sup>8)</sup>と比較して極めて低い値であった。大豆に含まれるDNAは加熱により分解、断片化する<sup>6)、7)</sup>。本検体の抽出原液に含まれるDNAは、検体由来のPCR阻害物質の影響に加え、前述の黒豆茶と同様に、加工工程により、定量PCRで検出困難な状態に分解、断片化していたと考えられた。

5%のRRS混入率を判定するために必要なレクチン遺伝子コピー数は、RRS遺伝子コピー数を定量下限値の16コピーとした場合に以下の式から算出される。 $5(\%) = (16 \text{ コピー} / \text{レクチン遺伝子コピー数} \times \text{内標比} 1.00) \times 100$

以上より、レクチン遺伝子のコピー数は320となる。本検体のレクチン遺伝子コピー数はすべての検討結果で320を下回った。5%のRRS混入率を判定不可能なため、検査不能とした。

遺伝子組換え大豆検査でのRRS検出率は低下傾向である。また、RRSが検出された検体のRRS混入率は、表示の基準となる5%よりも十分に低い検体がほとんどであった。今後、遺伝子組換え食品に関する義務表示がない原材料を使用した食品で、表示義務違反が疑われる事例の発生の可能性は低いと考えられる。一方、今回報告したような遺伝子組換え大豆検査が困難な食品は多種、存在する。これらの食品

表4. 味付け油揚げのDNA抽出法および大豆由来レクチン遺伝子定量結果

DNA抽出法	抽出原液中のDN濃度 (ng/μL)	260/280 nm 吸光度比	希釈率	レクチン遺伝子コピー数
CTAB-JAS : 抽出法A)	70	1.85	1	131
			2	82
			10	— <sup>#)</sup>
Genomic-tip : 抽出法C)-a	176	1.38	2	—
			10	179
			1	290
Genomic-tip : 抽出法C)-b	28	1.73	2	105
			10	—
			1	102
Genomic-tip : 抽出法C)-c	32	1.68	2	96
			10	—

#) : 16コピー未満

に対し、食品の安全性を担保し、あるいは表示の検証を行うため、継続的に検査法の検討、改良を行っていくことが重要である。

検査を立ち上げるにあたり、貴重なご助言、ご指導をいただいた、大阪市立環境科学研究所の中間昭彦研究主幹、紀雅美研究員に深謝致します。また、検体の搬入に御尽力いただいた、大阪府健康医療部食の安全推進課ならびに各保健所の食品衛生監視員の皆様に深謝致します。検査にご協力いただいた元食品化学課員の皆様に深謝致します。

## 文献

- 1) 食品衛生法第十九条第一項の規定に基づく表示の基準に関する内閣府令
- 2) 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七条第一項及び生鮮食品品質表示基準第七条第一項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準
- 3) 平成 13 年 3 月 27 日、厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第 110 号：組換え DNA 技術応用食品の検査方法について
- 4) 平成 24 年 11 月 16 日、消費者庁次長通知消食表第 201 号：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
- 5) 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 第 3 版、独立行政法人 農林水産消費安全技術センター、  
[http://www.famic.go.jp/technical\\_information/jashandbook/index.html](http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/index.html)
- 6) Ogasawara, T., Arakawa, F., Akiyama, H., Goda, Y. and Ozeki, Y. : Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans, *Jpn. J. Food Chem.*, **10**, 155-160 (2003)
- 7) Yoshimura, T., Kuribara, H., Matsuoka, T., Kodama, T., Iida, M., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Furui, S. and Hino, A. : Applicability of the quantification of genetically modified organisms to foods processed from maize and soy, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2052-2059 (2005)
- 8) 佐藤徳子, 杉浦義紹, 田中敏嗣 : GM サイズ検査における GM quicker の有用性について, *食品衛生学雑誌*, **53**, 39-44 (2012)