

市販キットを用いた豆腐からの DNA 抽出法比較 及び装置の同等性確認

小出石千明・永井里苗・坂本智徳

福岡市保健環境研究所保健科学課

Consideration of DNA Extraction Methods from Tofu using commercially available kits and Equivalency Test of Real-Time PCR Devices

Chiaki ODEISHI, Satomi NAGAI and Tomonori SAKAMOTO

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

安全性審査済みの遺伝子組換え食品に関する任意表示については、令和 5 年（2023 年）4 月 1 日から大豆及びとうもろこし並びにこれらを原材料とする加工食品において、「遺伝子組換えでない」等と表示する際には、分別生産流通管理を行った上で、遺伝子組換え農産物の混入がないと認められることが必要となった。大豆加工品の組換え遺伝子の定性検査法は通知検査法で定められているが、DNA の抽出に用いるキットの種類及び試料採取量については、各試験所で定める必要がある。そこで、通知に記載されている市販キットによる DNA 抽出法について、PCR に用いるために必要な DNA 抽出量、純度及び操作性を比較検証した結果、使用キットは Genomic-tip 20/G、試料採取量は 5 g とした。また、「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」では、定性検査に用いる装置が定められており、記載されていない装置を用いる場合は、記載されている装置との同等性を確認する必要がある。そこで、福岡市保健環境研究所で用いている装置について、通知に記載されている装置との同等性を確認した。

Key Words : 遺伝子組換え食品 genetically modified food, 豆腐 tofu, 大豆加工品 processed soy food, リアルタイム PCR real-time PCR (qPCR), 装置の同等性確認 equivalency test of device

1 はじめに

我が国では、食品衛生法及び昭和 34 年 12 月 28 日付け厚生労働省告示第 370 号¹⁾に基づき、組換え DNA 技術応用食品（遺伝子組換え食品）を輸入及び販売する際には、厚生労働省の安全性審査を受ける必要がある²⁾。安全性審査を経て流通が認められた食品は、令和 6 年（2024 年）3 月現在で、9 農産物及びこれらを原材料とした 33 加工食品群である。これらについては、食品表示法に基づいて表示基準が定められている³⁾。具体的には、遺伝子組換え農産物及び遺伝子組換え農産物と分別生産流通管理をしていないものを使用している場合はその旨の表示が義務づけられている。また、遺伝子組換え大豆及びとうもろこしが混入しないように分別生産流通管理が行われたことを確認したものを使用している場合は、「遺伝子組換えでない」等を任意で表示（以下、「任意表示」

とする。）することができる。大豆及びとうもろこし並びにこれらを原材料とする加工食品において、任意表示する際には、従前は、分別生産流通管理を行った上で、意図せざる混入が 5%以下であることとされていた。しかし、平成 31 年（2019 年）4 月 25 日に公布され、令和 5 年（2023 年）4 月 1 日に施行された食品表示基準の一部を改正する内閣府令⁴⁾によって、任意表示する際には、分別生産流通管理を行った上で、遺伝子組換え農産物の混入がないと認められることが必要となった。遺伝子組換え農産物の混入がないことを確認するための定性検査法として、平成 27 年 3 月 30 日付け消食表第 139 号消費者庁次長通知「食品表示基準について」の別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」（最終改正令和 3 年（2021 年）9 月 15 日）（以下、「通知検査法」とする。）⁵⁾が定められている。大豆加工品である豆腐の検査法についても通知検査法で定められているものの、

DNA の抽出に用いるキットの種類は複数例示され、試料採取量については適量と記載されているため、これらの条件は各試験所で定める必要がある。そこで、通知検査法に記載されている市販キットによる DNA 抽出法を比較検証した。また、通知検査法では、定性検査に用いる装置が定められており、記載されていない装置を用いる場合は、記載されている装置との同等性を確認する必要がある。福岡市保健環境研究所で用いている装置は、Thermo Fisher Scientific 製の Quant Studio5 (以下、「QS5」とする。) であり、通知検査法の定性検査法には記載がないことから、通知検査法に記載された装置 (Applied Biosystems 製 ABI PRISM® 7900HT (以下、「7900HT」とする。)) との同等性を確認したので、合わせて報告する。

2 実験方法

2.1 試料

福岡市内で流通していた豆腐 3 種を、通知検査法に従い粉碎したものを試料とした。試料の遺伝子組換えに関する表示を表 1 に示す。

表 1 試料の遺伝子組換えに関する表示

豆腐	遺伝子組換えに関する表示
A	遺伝子組換えでない (アメリカ産, カナダ産)
B	分別生産流通管理済み (アメリカ産, カナダ産)
C	遺伝子組換えでない (国産)

2.2 試薬, 装置及び器具

2.2.1 試薬

DNA 抽出キット: (株) キアゲン製 DNeasy Plant Maxi Kit (シリカゲル膜タイプキット法) (以下、「Plant Maxi Kit」とする。), (株) キアゲン製 Genomic-tip 20/G (イオン交換樹脂タイプキット法) (以下、「Genomic-tip 20/G」とする。)

2-プロパノール: 富士フィルム和光純薬 (株) 製分子生物学用 2-プロパノール

エタノール: 富士フィルム和光純薬 (株) 製分子生物学用エタノール (99.5)

TE buffer: (株) ニッポンジーン製遺伝子工学研究用 TE (pH8.0)

マスターミックス: Thermo Fisher Scientific 社製 TaqMan Universal PCR Master Mix

Le1 プライマー対及びプローブ: (株) ニッポンジーン製ダイズ内在性 DNA Le1 オリゴヌクレオチドセット

P35S プライマー対及びプローブ: (株) ニッポンジーン

製組換え DNA P35S オリゴヌクレオチドセット

RRS2 プライマー対及びプローブ: (株) ニッポンジーン製 GM ダイズ (RRS2) 系統別 DNA RR2 オリゴヌクレオチドセット

陽性コントロールプラスミド (以下、「PC」とする。): (株) ニッポンジーン製 GM Soy $\Delta\Delta$ Cq Standard Plasmid Set (Le1, R35S, LLS2)

超純水: アドバンテック東洋 (株) 製 RFU666HA で製造した超純水を用いた。

滅菌超純水: オートクレーブを用いて 121°C, 15 分加熱した超純水を用いた。

2.2.2 装置

qPCR 装置: QS5

冷却遠心機: 久保田商事 (株) 製 6200, 久保田商事 (株) 製 3780, (株) トミー精工製 CAX-571

分光光度計: Thermo Fisher Scientific 製 NanoDrop One

超純水製造装置: アドバンテック東洋 (株) 製 RFU666HA

オートクレーブ: (株) トミー精工製 BS-305

ホモジナイザー: (株) キアゲン製 TissueRuptor II

2.3 分析方法

2.3.1 DNA 抽出法の比較

1) Plant Maxi Kit による抽出

試料 A 及び B について、試料採取量を 2 g, 5 g, 10 g 又は 20 g とし、通知検査法に示された DNA 抽出精製法に従い、DNA 試料原液を調製した。ただし、API 緩衝液及び RNase A 添加後にホモジナイズ工程を追加した。

2) Genomic-tip 20/G による抽出

試料 A~C について、試料採取量を 2 g, 5 g 又は 10 g とし、通知検査法に示された DNA 抽出精製法に従い、DNA 試料原液を調製した。ただし、G2 緩衝液添加後にホモジナイズ工程を追加した。

2.3.2 DNA 試料原液中の DNA の濃度及び純度

調製した DNA 試料原液について 230, 260 及び 280 nm の吸光度を測定し、260 nm の吸光度から DNA 濃度を求めた。

また、280 nm の吸光度に対する 260 nm の吸光度の比 (A260/A280) 及び 230 nm の吸光度に対する 260 nm の吸光度の比 (A260/A230) から DNA の純度を確認した。なお、純度の目標は、A260/A280 が通知検査法に記載のとおり 1.7~2.0, A260/A230 が糖、フェノール等の夾雑物の影響が少ないとされる⁶⁾ 2.0 以上とした。

2.3.3 qPCR

2.3.1 で抽出した試料 C の DNA 試料原液を滅菌超純水で 20 ng/ μ L に希釈調製し DNA 試料溶液とした。通知検査法に記載の ABI PRISM7900HT 96well 及び 384well を用

いた定性 PCR に従い、PCR 用反応溶液を調製し、QS5 にて、qPCR 及び測定結果の解析を行った。

2.3.4 測定結果の判定

通知検査法に記載の測定結果の判定に従い、qPCR の測定結果から判定を行った。

2.3.5 装置の同等性確認

通知検査法に記載の検査方法の同等性確認の方法に、通知記載機種のほかにも「同等の性能を有する機種を用いることができる」とあるが、当所では通知記載機種を保有していないため、当所と同一試薬を用いた文献⁷⁾と比較し、装置の同等性の確認を行った。また、確認項目は通知検査法に記載にある感度、繰り返し再現性及び well 間差とし、増幅効率については QS5 が通知検査法の定量検査に記載されている装置であるため省略した。

1) 感度 (検出限界) の比較

Le1, P35S 及び RRS2 の PC を滅菌超純水で希釈し、2, 5, 10 及び 100 copy/well となるよう調製し、検出限界測定用 DNA 溶液とした。検出限界測定用 DNA 溶液を対応する各プライマー対及びプローブ並びにマスターミックスを用いて PCR 用反応液を調製し、10well 並行で日を変えて 3 回測定した。測定結果を文献と比較した。

2) 繰り返し再現性及び well 間差の確認

Le1 の PC を滅菌超純水で希釈した 500 copy/well の DNA 溶液、対応する各プライマー対及びプローブ並びにマスターミックスを用いて PCR 反応液を調製し、96well 併行で PCR 測定し、 ΔCt が 1.0 未満であることを確認した。また、日を変えて 3 回測定し、いずれも ΔCt が 1.0 未満であることを確認した。

3 結果及び考察

3.1 DNA 抽出法の検討

通知検査法に記載の Plant Maxi Kit 及び Genomic-tip 20/G の DNA 抽出キットについて検討した。2.3.1 に従い、試料 A~C について各 2 併行 ($n = 2$) で抽出し、DNA 抽出量及び吸光度比 (A260/A280) を測定した結果を表 2 に示す。

まず、試料 A 及び B について Plant Maxi Kit を用い DNA 抽出したところ、試料採取量 5 g 以上で DNA 抽出量 20 ng/ μ L 以上であったが、A260/A230 が 2.0 未満のものが多く、目標とした純度の DNA 抽出液が安定して得られなかった。そこで試料 A 及び B について Genomic-tip 20/G を用い DNA 抽出したところ、試料採取量 2 g で DNA 抽出量 500 ng/ μ L 以上、A260/A230 が 2.1 以上と良好な結果が得られた。よって、Plant Maxi Kit より Genomic-tip 20/G が本検査に適していると判断した。試料 C は Genomic-tip

20/G で抽出し、試料採取量 2 g 及び 5 g で DNA 抽出量及び純度について良好な結果が得られた。また、キットの種類にかかわらず、試料採取量が 2 g の場合、70%エタノール沈殿で得られる沈殿 DNA の視認性が低く、操作性が悪かったため、DNA 抽出量、純度及び操作性を考慮し、試料採取量は 5 g が適当と判断した。

表 2 DNA の抽出量及び吸光度比 ($n = 2$)

試料	キット種類	採取量 (g)	DNA抽出量 (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230	
A	Plant Maxi Kit	2	22	1.74	1.17	
			6	2.10	1.42	
		5	38	1.87	1.81	
			34	1.86	1.51	
		10	56	1.82	1.54	
			36	1.98	2.12	
		20	55	1.85	1.40	
			48	1.92	1.93	
		Genomic-tip 20/G	2	567	1.89	2.15
				579	1.91	2.33
B	Plant Maxi Kit	2	11	1.89	1.53	
			25	1.86	1.17	
		5	39	1.91	1.68	
			45	1.92	1.71	
		10	36	2.07	2.24	
			39	2.00	2.40	
		20	66	1.96	2.05	
			119	1.93	1.96	
		Genomic-tip 20/G	2	679	1.92	2.30
				592	1.87	2.33
C	Genomic-tip 20/G	2	570	1.93	2.39	
			522	1.94	2.45	
		5	674	1.90	2.30	
			806	1.92	2.25	
		10	737	1.88	1.84	
			742	1.89	1.68	

3.2 qPCR

2.3.1 で抽出した試料 C について、2.3.3 及び 2.3.4 に従い qPCR を行い、結果の判定を行った結果を表 3 に示す。すべての試料採取量において陰性であり、試料の遺伝子組換えに係る表示どおりの結果が得られた。

3.3 機器の同等性確認

3.3.1 感度 (検出限界) の比較

2.3.5 の 1) に従い、QS5 を用いて得られた結果を表 4 に示す。7900HT を用いてダイズ Le1 について 10 併行試験を行った文献⁷⁾と比較した結果、両機種とも 10 copy/well 以上で 10 well 全てにおいて検出され、同等の感度であることを確認した。また、P35S, RRS2 の感度についても Le1 と同程度であることが確認できた。

表3 qPCR 結果

試料	試料採取量 (g)	Ct値			ダイズ陽性対象試験 (Le1)	P35S (RRS or LLS) 検知試験	RRS2 検知試験	遺伝子組換え	
		Le1	P35S	RRS2					
C	2	24.91	-	-	+	試験成立	-	陰性	陰性
		24.97	-	-	+		-		
	2	24.92	-	-	+	試験成立	-	陰性	
		24.81	-	-	+		-		
	5	24.84	-	-	+	試験成立	-	陰性	
		24.82	-	-	+		-		
	5	24.76	-	-	+	試験成立	-	陰性	
		24.72	-	-	+		-		
	10	26.44	-	-	+	試験成立	-	陰性	
		26.41	-	-	+		-		
	10	26.02	-	-	+	試験成立	-	陰性	
		25.97	-	-	+		-		

表4 ダイズ (Le1, P35S, RRS2) PC の感度確認

検出遺伝子	溶液中のコピー数	Ct平均値			ΔCt			検出率		
		1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目	1回目	2回目	3回目
Le1	2	(39.69)	(38.77)	(40.77)	(0.71)	(0.80)	(0.87)	3/10	4/10	4/10
	5	39.35	(39.90)	(39.89)	2.53	(2.61)	(3.08)	10/10	9/10	8/10
	10	37.89	38.54	38.5	2.58	3.32	1.89	10/10	10/10	10/10
	100	33.61	33.73	34.6	0.46	0.4	0.66	10/10	10/10	10/10
P35S	2	(38.85)	(38.30)	(39.20)	(2.57)	(2.34)	(3.61)	7/10	6/10	5/10
	5	38.02	37.54	37.2	2.88	2.91	3.34	10/10	10/10	10/10
	10	36.57	36.12	36.13	2.69	3.25	1.52	10/10	10/10	10/10
	100	32.6	32.47	32.4	0.42	0.48	0.65	10/10	10/10	10/10
RRS2	2	(39.80)	(39.34)	(38.49)	(2.57)	(2.91)	(2.10)	7/10	7/10	8/10
	5	(38.39)	37.96	38.21	(2.38)	3.83	2.94	8/10	10/10	10/10
	10	37.43	37.05	36.66	2.07	1.28	1.64	10/10	10/10	10/10
	100	33.35	33.09	32.84	0.51	0.34	0.43	10/10	10/10	10/10

ΔCt : Ct の最大値-最小値, () : 検出された Ct のみを使用し算出した.

3.3.2 繰り返し再現性及び well 間差の確認

2.3.5 の 2) に従い, 繰り返し再現性及び well 間差の確認を行った結果を表 5 に示す. 実施した 3 回ともすべての well で検出され, 繰り返し測定の前平均値の差及び 96well 間差の ΔCt も 1.0 未満であり, 通知検査法に記載の同等性確認方法の要件を満たしていた.

表5 繰り返し再現性及び well 間差の確認

	Ct 平均値	Ct SD	RSD (%)	ΔCt
1回目	30.80	0.093	0.30	0.43
2回目	30.77	0.093	0.30	0.41
3回目	30.86	0.085	0.28	0.43

Ct SD : Ct の標準偏差, RSD : 相対標準偏差

4 まとめ

安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法に基づき、市販キットを用いた豆腐の DNA 抽出法について、2 種の抽出法を比較検討した結果、当所では純度及び操作性の面から試料採取量 5 g とし、Genomic-tip 20/G による抽出が適当であった。また、通知試験法記載機種との同等性確認を行い、安全性審査済みの遺伝子組換え食品として豆腐の検査方法に対応可能であることを確認した。

文献

- 1) 厚生省告示第 370 号：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年（1959 年）12 月 28 日
- 2) 厚生省告示第 233 号：組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続，平成 12 年（2000 年）5 月 1 日
- 3) 内閣府令第 10 号：食品表示基準，平成 27 年（2015 年）3 月 20 日
- 4) 内閣府令第 24 号：食品表示基準の一部を改正する内閣府令，平成 31 年（2019 年）4 月 25 日
- 5) 消費者庁次長通知消食表第 139 号別添：安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法，平成 27 年（2015 年）3 月 30 日
- 6) 消費者庁次長通知消食表第 286 号別添 1：アレルギー物質を含む食品の検査方法，平成 22 年（2010 年）9 月 10 日
- 7) 赤星千絵，他：LightCycler®480 を用いた遺伝子組み換え食品検査の検討，神奈川県衛生研究所研究報告，51，2021