

# トウモロコシ加工品における組換え遺伝子の混入実態調査

福崎睦美・宮崎悦子・林原亜樹

福岡市保健環境研究所保健科学部門

## Survey on the Rate of Contamination of Recombinant DNA in Processed-corn Food

Mutsumi FUKUZAKI, Etsuko MIYAZAKI and Aki HAYASHIBARA

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

### 要 約

福岡市内に流通しているトウモロコシ加工品 35 検体について組換え遺伝子混入の実態調査をした。その結果、安全性未審査の組換え遺伝子 (CBH351 及び Bt10) は、いずれの検体からも検知されなかった。また、安全性審査済みの組換え遺伝子 (Mon810, GA21, Bt11, T25, Event176) については、スクリーニング法で検査したところ、混入率は 0.02 ~ 1.9%の範囲で、非意図的混入率の許容値 5%を下回る結果であったことから、適切に分別生産流通管理されていると推察された。

**Key Words** : 定量 PCR Quantitative PCR , トウモロコシ加工品 Processed-corn food ,  
遺伝子組換えトウモロコシ Genetically modified maize , IP ハンドリング  
Identity Preserved Handling

### はじめに

平成 13 年 4 月より、組換え DNA 技術応用食品 (遺伝子組換え食品) の安全性審査が義務づけられるとともに<sup>1)2)</sup>、表示についても法的に義務化された<sup>3)4)</sup>。これにより、平成 18 年 2 月現在、日本では遺伝子組換え 7 作物 75 品種の安全性審査が既に終了し、食品として商品化が可能となっている。

これに関連し、遺伝子組換え食品の検査方法が定められ、安全性審査の進捗状況および検知技術の改良にあわせて順次改訂されている。平成 18 年 6 月現在、安全性審査の終了していない遺伝子組換え食品として 3 品目 (トウモロコシ : CBH351, Bt10, パパイア : 55-1), 審査の終了した食品として 6 品目 (トウモロコシ 5 系統 : Mon810, GA21, Bt11, T25, Event176, 大豆 1 系統 : ラウンドアップレディ大豆) を対象とした検査方法が規定されている。

本市では、厚生労働省より示された「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(以下、通知法とする)<sup>5)</sup>

に従って、平成 14 年から遺伝子組換え食品の検査を実施している。トウモロコシ加工品に関しては、安全性未審査の組換え遺伝子 CBH351 が検出されなかったことを既報にて報告した。<sup>6)</sup>

平成 17 年 3 月、米国において遺伝子組換えトウモロコシ Bt11 の種子と混同して、安全性未審査の Bt10 の種子が誤って栽培され流通した事例が判明した。(http://www.nature.com/news/2005/050321/full/nature03570.html) 同年 5 月、日本においても輸入時検査で、米国産の飼料用トウモロコシから Bt10 が検出され、積戻しの措置がとられた。この事例を機に、輸入時のトウモロコシについて Bt10 の検査が強化されている。

今回、福岡市内で入手したトウモロコシ加工品について、安全性未審査の組換え遺伝子 (CBH351 及び Bt10) の検査を実施した。また、安全性審査済みの組換え遺伝子 (Mon810, GA21, Bt11, T25, Event176) については、スクリーニング法で検査を実施したので、あわせてその結果について報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

平成 17 年に福岡市内の百貨店、量販店などで入手したトウモロコシ加工品の 35 検体を用いた。

No.1 ~ 3 は、トウモロコシ半加工品のグリッツ、ミール、フラワーを、No.4 は、コーンスナック菓子(23 検体)を、No.5 は、ポップコーン(2 検体)を、No.6 その他の検体としては、コーンスープ中のコーン、ミックス粉(小麦/トウモロコシ混合粉)、コーンスターチを試料とした。詳細を表 1 に示す。

表1. 試料

No.	種類	検体数
1	コーングリッツ	2
2	コーンミール	2
3	コーンフラワー	1
4	コーンスナック菓子	23
5	ポップコーン	2
6	その他	5
計		35

### 2. 使用機器

インキュベーター：IWAKI 社製 ALB-221，(株)アステック製 BI-525，マイクロ冷却遠心機：(株)久保田製作所製 KUBOTA3700，分光光度計：日本分光(株) V-530，PCR 増幅装置：バイオラッド社製 iCycler，定量 PCR：アプライドバイオシステムズ社製 ABI PRISM™ 7900HT，電気泳動装置：コスモバイオ社製 Mupid-21，画像解析装置：UVP 社製 BioDoc-It System

### 3. 試薬

DNA 抽出キットは QIAGEN Genomic-tip，緩衝液はキットに付属のもの，Protease-K，RNase は(株)キアゲン製，イソプロピルアルコール，エタノールは和光純薬工業(株)製を使用した。

内在性遺伝子 Zein 用プライマー，組換え遺伝子 CBH351 用プライマー及び Bt10 用プライマー，陽性対象コントロールプラスミドは，(株)ニッポンジーンの遺伝子組換え食品検査用試薬を使用した。PCR 緩衝液 dNTP，MgCl<sub>2</sub>，Taq DNA ポリメラーゼはアプライドバイオシステムズ社製を使用した。100bp DNA Ladder，Loading Buffer は宝酒造(株)製，エチジウムブロミド，アガロース，TE 緩衝液，TAE 緩衝液は(株)ニッポンジーン製を使用した。

内在性遺伝子(SS b-3)オリゴヌクレオチドセット，

組換え遺伝子 P35S オリゴヌクレオチドセット，組換え遺伝子 GA21 オリゴヌクレオチドセット，トウモロコシ用標準プラスミドセットは，(株)ニッポンジーンの遺伝子組換え食品検査用試薬を使用した。Universal PCR Master Mix はアプライドバイオシステムズ社製を使用した。

水は，すべて超純水をオートクレーブ処理したものを使用した。

### 4. 検査方法

#### 1) DNA 溶液の調製

通知法に従って，イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出キット (QIAGEN-Genomic-Tip) を用い DNA を抽出精製した。次に DNA 試料原液中の DNA の純度を確認し，TE 緩衝液を用い適宜希釈し，20ng/μL DNA 試料液を調製した。抽出した DNA の濃度が 20ng/μL 以下の場合は抽出液をそのまま DNA 試料液とした。

なお，DNA が全く抽出できなかった試料については，シリカゲル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit) 及び CTAB 法にて抽出精製を試みた。

#### 2) PCR の条件と組換え遺伝子の検知

##### (1) 定性 PCR

通知法に従って定性 PCR 法を行った。PCR 反応液は PCR 緩衝液，0.20mmol/L dNTP，3.0mmol/L 塩化マグネシウム，0.2μmol/L プライマー及び 0.625units Taq DNA ポリメラーゼを含む液に，20ng/μL DNA 試料液 2.5μL を加え，全量を 25μL とした。PCR 反応条件は，95 で 10 分間保持後，95 30 秒，60 30 秒，72 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルの PCR 増幅を行い，72 7 分間保持後，4 で保存し PCR 反応液とした。

組換え遺伝子の検知は，PCR 反応液 8μL をローディング緩衝液 2μL と混合し，3.0% アガロースゲルのウェルに注入後，TAE 緩衝液中で 100V 定電圧で電気泳動を行った。泳動後エチジウムブロミドでゲルを染色した。

次いで，ゲルに紫外線を照射し，ゲルイメージ解析装置により，トウモロコシに本来含まれる内在性遺伝子 (Zein) の検出バンドと組換え遺伝子 (CBH351，Bt10) の検出バンドによって結果を判定した。

##### (2) 定量 PCR

トウモロコシでは分析対象が複数系統存在するため，まず一次スクリーニングを実施し，得られた結果に基づきさらに系統毎の分別定量を行い，組換え系統毎の定量値を合計して結果の判定を行うこととなっている。今回は，通知で示されたスクリーニング法として，CaMV 35S promoter 検知用及び GA21 specific 検知用のプライマー

及びプローブを用い、CaMV 35S promoter の測定を Mon810 換算して定量し、GA21 の定量と合算して定量する方法により、定量 PCR を行った。

PCR 反応液 75 $\mu$ L あたり、Universal Master Mix 37.5 $\mu$ L、プライマー 0.5 $\mu$ mol/L、プローブ 0.2 $\mu$ mol/L (P35S-Taq の場合 0.1 $\mu$ mol/L) を混合し、0.625units DNA ポリメラーゼになるよう混合し、検量線用標準プラスミド DNA 溶液又は DNA 試料液 20ng/ $\mu$ L を 7.5 $\mu$ L 加え、全量を 75 $\mu$ L とした。これを 25 $\mu$ L ずつ DNA 定量用の反応プレート 3 ウェルに分注した。PCR 反応条件は、50 2 分間保持し、95 10 分間保持後、95 30 秒、59 1 分を 1 サイクルとして 45 サイクルの増幅を行った。

反応終了後、通知法及び JAS 分析試験ハンドブック<sup>7)</sup> に準じて、試料中の内在性遺伝子及び組換え遺伝子のコピー数をもとめ、試料中の組換え遺伝子混入率を算出した。

## 結果及び考察

### 1. 安全性未審査の組換え遺伝子の検知

安全性未審査の組換え遺伝子 (CBH351, Bt10) の検知結果を表 2 に示した。

試料とした 35 検体のうち、コーンスナック菓子 3 検体からは、トウモロコシ内在性遺伝子 (Zein) が検知されず検査を行うことができなかった。

Zein を検知した検体からは、組換え遺伝子 (CBH351 及び Bt10) はすべて検知されなかった。

表2. トウモロコシ加工品からの組換え遺伝子 (CBH351, Bt10) の検知結果

No	種 類	検体数	組換え遺伝子	
			CBH351	Bt10
1	コーングリッツ	2	( - )	( - )
2	コーンミール	2	( - )	( - )
3	コーンフラワー	1	( - )	( - )
4	コーンスナック菓子	20	( - )	( - )
5	ポップコーン	2	( - )	( - )
6	その他	5	( - )	( - )
	検査不能	3		
	計	35		

( - ): 検出せず

### 2. 安全性審査済み組換え遺伝子の混入率

安全性審査済みの組換え遺伝子の混入率をスクリーニング法で定量した結果を表 3 に示した。

試料とした 35 検体のうち、コーンスナック菓子 8 検体、コーンスターチ 1 検体からは、トウモロコシ内在性遺伝子 (SS b) が定量するのに十分なコピー数を得られず検査ができなかった。そのうち定性 PCR は可能であったが、定量 PCR ができなかった検体が 6 検体あった。

SS b を検知した 26 検体中 18 検体から組換え遺伝子が検知され、検出率は約 70% であった。検知された検体の混入率の平均は 0.54% で、範囲は 0.02 ~ 1.9% であった。

No.1 ~ 3 トウモロコシ半加工品は、5 検体中 4 検体 (80%) から組換え遺伝子が検知され、混入率は 0.20 ~ 0.24% であった。No.4 コーンスナック菓子は、15 検体中 12 検体 (80%) から組換え遺伝子が検知され、混入率

表3. トウモロコシ加工品からの組換え遺伝子 (スクリーニング検査) の混入率

No	種 類	検体数	検知数	検出率 (%)	混入率 (%)	
					平均	範囲
1	コーングリッツ	2	1	50	0.20	0.20
2	コーンミール	2	2	100	0.23	0.21 ~ 0.24
3	コーンフラワー	1	1	100	0.22	0.22
4	コーンスナック菓子	15	12	80	0.47	0.02 ~ 1.7
5	ポップコーン	2	0	0	-	-
6	その他	4	2	50	1.7	1.4 ~ 1.9
	検査不能	9	-	-	-	-
	計	35	18	69	0.54	0.02 ~ 1.9

は 0.02 ~ 1.7%であった。No.5 ポップコーンは 2 検体ともに組換え遺伝子が検知されなかった。遺伝子組換えトウモロコシの多くはデント種であり、ポップコーンの原料であるポップ種とは栽培地域が異なることが多いことから、遺伝子組換えトウモロコシの混入が避けられているものと推察された。No.6 その他の検体は、定量 PCR が可能であった 4 検体中 2 検体(50%)から組換え遺伝子が検知され、混入率は 1.4 ~ 1.9%であった。

なお、検知された組換え遺伝子は 35Spromoter (CaM) 配列が組み込まれた組換え系統であり、GA21 はすべての検体で検知されなかった。

また、26 検体のうち 5 検体は「遺伝子組換え不分別」の表示であったが、混入率は平均 0.26%で、範囲は 0 ~ 0.73%であり、分別生産流通管理されていたものと同レベルの混入率であった。

本方法において、定量下限は農林水産省が入手した標準的な各 GM 系統種子を使用した場合、0.1 ~ 0.5%とされている。また、トウモロコシに関する適用範囲はデント種トウモロコシ乾燥品、トウモロコシ半加工品（グリッツ、ミール、フラワー）である。加工食品中の組換え遺伝子の混入率は、試料中のトウモロコシ中の内在性遺伝子と組換え遺伝子の加工に伴う分解率が同じであると仮定した場合の値であり、加工食品で得られる値は現在 Validate されておらず、混入率は目安の値である。

今回は、増幅した組換え遺伝子のコピー数が定量用プラスミドの最小コピー数である 20 コピー数を下回っていた検体も混入率を算出した。組換え遺伝子が検知され

た 18 検体のうち 6 検体は 20 コピーを下回るものであった。定量値としては参考値としての取扱いが妥当なものであるが、いずれも意図せざる混入の目安である 5%より低い値であり、分別生産流通管理（IP ハンドリング）は適正に行われたものと推察された。

## 文 献

- 1)厚生省告示第 232 号：食品，添加物の規格基準の一部改正，平成 12 年 5 月 1 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續きに関する告示，平成 12 年 5 月 1 日
- 3)厚生労働省通知食発第 79 号：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を一部改正する省令等の施行について，平成 13 年 3 月 15 日
- 4)農林水産省通知 12 食流第 599 号：加工食品品質表示基準等の設定について，平成 12 年 4 月 4 日
- 5)厚生労働省通知食安発第 0517001 号：組換え DNA 技術応用食品の検査方法について（一部改正），平成 17 年 5 月 17 日
- 6)宮崎悦子，他：トウモロコシ加工品における CBH351 の検査について，福岡市保健環境研究所所報，28，152 ~ 154，2003
- 7)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・分析マニュアル改訂第 2 版，平成 14 年 6 月 20 日