

リアルタイム PCR を用いたコメ加工品における 遺伝子組換えコメの混入実態調査

鶴田小百合・本田己喜子

福岡市保健環境研究所保健科学課

Actual Condition Survey on Contamination of Genetically Modified Rice in Processed-rice Food by Real-time PCR

Sayuri TSURUDA and Mikiko HONDA

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

要約

福岡市内に流通しているコメ加工品 17 検体について、安全性が未審査である遺伝子組換えコメ（Bt コメ）混入の実態調査を実施した。コメ加工品からの DNA 抽出は、通知試験法であるシリカゲル膜タイプキット法とイオン交換樹脂タイプキット法を比較検討し、後者の方法が DNA 収濃度と精度が良好であることが分かった。抽出した DNA 溶液から通知の最終確認試験法であるリアルタイム PCR 法により Bt 遺伝子の検出を行ったところ、いずれの検体からも Bt コメは検知されなかった。

Key Words：リアルタイム PCR real-time PCR, コメ加工品 processed-rice food
遺伝子組換えコメ genetically modified rice

1 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^{1, 2)}、表示についても法的に義務化された^{3, 4)}。平成 21 年 3 月末現在では、日本では遺伝子組換え 7 作物 97 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、厚生労働省は「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」⁵⁾によって遺伝子組換え食品の検査方法を定め、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している。

安全性未審査の遺伝子組換え農作物である遺伝子組み換えコメ（以下 Bt コメ、土壌細菌 *Bacillus thuringensis* 由来の Bt 遺伝子が組み込まれており、害虫抵抗性を有する）は、平成 18 年 9 月に環境団体であるグリーンピースが EU に輸出された中国産米加工品（ビーフン、はるさめ）から検出されたと公表した。日本においても平成 19 年 1 月の検疫所による輸入時モニタリング検査において、中国産コメ加工品 6 件（ビーフン 5 件、もち米の粉 1 件）

から、Bt コメが検出され、廃棄および積み戻しの措置がとられた

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/yunyu/tp0130-1ae.html>)。

それに伴い、厚生労働省から通知⁶⁾にて当該食品の検査法が示され、Bt コメの検査法として定性 PCR 法、最終確認試験法としてリアルタイム PCR 法が定められた。

今回、福岡市内で入手したアジア諸国および日本のコメ加工品 17 検体について、通知法のリアルタイム PCR 法による Bt コメの実態調査を実施したので、その結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試料

平成 18 年から 20 年に福岡市内の百貨店、量販店などで入手したコメ加工品 17 検体を供試した（表 1）。

表1 供試したコメ加工品

No.	食品分類	生産国	検体数
1～3	ビーフン	中国	3
4	ビーフン	台湾	1
5～7	ビーフン	タイ	3
8	ビーフン	不明	1
9～10	ライスペーパー	ベトナム	2
11	ライスペーパー	タイ	1
12	フォー	ベトナム	1
13～14	フォー	不明	2
15～16	米菓	不明	2
17	上新粉	日本	1
合計			17

2.2 使用機器

- ・インキュベーター：(株) IWAKI 製 ALB-221, (株) アステック製 BI-525
- ・振とう式恒温水槽：ヤマト科学(株) 製 BW201
- ・マイクロ冷却遠心機：(株) 久保田製作所製 KUBOTA3700
- ・分光光度計：NanoDrop Technologies 社製 ND-1000
- ・リアルタイム PCR 装置：アプライドバイオシステムズ(株) 製 ABI PRISM® 7900HT

2.3 試薬

2.3.1 DNA 抽出

DNA 抽出キットとして、シリカゲル膜タイプキット法は(株) ニッポンジーン製 GM quicker 2, イオン交換樹脂タイプキット法は(株) キアゲン製 Genomic-Tip 20/G を用いた。イオン交換樹脂タイプキット法で用いる α -アミラーゼは(株) ニッポンジーン製 α -Amylase Ultrapure (至適温度 100 °C 前後) を用いた。イソプロピルアルコールとエタノールは和光純薬工業(株) 製を使用した。

2.3.2 リアルタイム PCR

コメ陽性対照用オリゴヌクレオチドセット⁶⁾ (プライマー:SPSF および SPSR, コメ陽性対照用プローブ:SPS-Taq), Bt コメ検出用オリゴヌクレオチドセット⁶⁾ (プライマー:T51-SF および OsNOS-R2, 63Bt コメ検出用プローブ:GM63-Taq, NN Bt コメ検出用プローブ:NGMr-Taq) はアプライドバイオシステムズジャパン(株) に合成を依頼した。標準プラスミド溶液は(株) ニッポンジーン製を, TaqMan® Universal PCR Master Mix はアプライドバイオシステムズ(株) 製を, TE 緩衝液は(株) ニッポンジーン製遺伝子工学用を用いた。水は全て超純水をオートクレーブ処理したものを使用した。

2.4 検査方法

2.4.1 DNA 溶液の調製

コメ加工品をミルミキサーで均質に粉碎し、通知法⁶⁾ に基づき、シリカゲル膜タイプキット法およびイオン交換樹脂タイプキット法を用いて、DNA の抽出を行った。なお、イオン交換樹脂タイプキット法における α -アミラーゼ処理は、70°C で 1 時間の振とう加温とした。キット抽出により得られた DNA 溶液の吸光度を 230 nm から 320 nm の波長域で連続的に測定し、260 nm/280 nm の比を求めることで DNA 精製度の確認を行った。また DNA 溶液の濃度は 260 nm の吸光度 1.0 を 50 ng/ μ L DNA として算出し、滅菌超純水で 10 ng/ μ L, 5 ng/ μ L に希釈した。

2.4.2 リアルタイム PCR 反応溶液の調製

1) 陽性対照試験

PCR 用反応液は 25 μ L/ウェルとして調製した。その組成は Universal PCR Master Mix 12.5 μ L, SPSF プライマー溶液 (25 μ mol/L) 0.75 μ L, SPSR プライマー溶液 (25 μ mol/L) 0.75 μ L, SPS-Taq プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.75 μ L, 滅菌超純水 5.25 μ L, DNA 試料液 (10 ng/ μ L) 5 μ L とした。試験は DNA 抽出液あたり 2 ウェルを用いて PCR を行った。

2) Bt コメ検出用試験

PCR 用反応液は 25 μ L/ウェルとして調製した。その組成は Universal PCR Master Mix 12.5 μ L, T51-SF プライマー溶液 (25 μ mol/L) 0.75 μ L, OsNOS-R2 プライマー溶液 (25 μ mol/L) 0.75 μ L, GM63-Taq プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.375 μ L, NGMr-Taq プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.375 μ L, 滅菌超純水 5.25 μ L DNA 溶液 (10 ng/ μ L, 5 ng/ μ L) 5 μ L とした。DNA 抽出液から 10 ng/ μ L および 5 ng/ μ L の DNA 溶液を調製し、各濃度あたり 2 ウェルを用いて PCR を行った。

2.4.3 リアルタイム PCR 条件

50°C で 2 分間の UNG 処理を行った後、95°C で 10 分間加温し、その後 50 サイクル (95°C, 20 秒 → 60°C, 1 分) の増幅反応を行った。

2.4.4 解析

1) Threshold Cycle 値 (Ct 値)

リアルタイム PCR 後のデータは SDS2.1 ソフトウェアを使用して解析した。Amplification Plot 上で Threshold Line と増幅曲線との交点におけるサイクル数を Ct 値とした。Threshold Line は陽性コントロールの指数関数的増幅領域である 0.2 に設定した。

2) 判定

陽性対照試験で 50 サイクル未満の Ct 値が得られた場合は、Bt 遺伝子の検出を可能と判定した。Bt コメ検出用試験では、10 ng/ μ L および 5 ng/ μ L の DNA 溶液で 50 サイクル未満の Ct 値が得られたウェルがない場合は陰性とした。Ct 値が得られたウェルがある場合は、

Multicomponent グラフにおいて、Rn 比 (FAM/ROX および VIC/ROX の 50 サイクル目/10 サイクル目の比)を確認し、1 ウェルでも 1.5 以上であれば陽性とした。また陽性対照試験および Bt コメ検出用試験はブランク (滅菌超純水) および陽性コントロール (標準プラスミド溶液) の確認を行った。

3 結果および考察

3.1 DNA 抽出

試料とした 17 検体についてシリカゲル膜タイプキットにより DNA 抽出を行ったところ、17 検体中 13 検体で、DNA 濃度が 10 ng/μL 以上となった。No.2, 3, 4, 12 で DNA 濃度が不足した原因として、食品加工処理により DNA が断片化されたことおよび検体から DNA が十分に抽出されなかったことが考えられた。そこで加工食品からの DNA 抽出に広く用いられ、希薄な DNA の回収に優れたイオン交換樹脂タイプキットにより DNA 抽出を行った。その結果、すべての検体で 10 ng/μL 以上の DNA 濃度が得られた。さらに No.2 を除くすべての検体の精製度は 1.7~2.0 の範囲に入っており、十分に精製されていた (表 2)。イオン交換樹脂タイプキットにより得られた DNA 溶液はすべての検体で 10 ng/μL 以上の濃度であったため、この DNA 溶液を後述のリアルタイム PCR に用いることとした。

3.2 陽性対照試験

陽性対照用プライマーおよびプローブを用いたリアルタイム PCR では、すべての DNA 溶液で良好な増幅曲線が得られた (図 1)。また Ct 値は 28.2~32.6 であり、すべての DNA 溶液で 50 未満の Ct 値が得られた (表 3)。この結果により、すべての試料から Bt コメの検知を可能と判定した。

3.3 Bt コメ検出用試験

Bt コメ検出用プライマーとプローブを用いたリアルタイム PCR では、No.2 のみ Ct 値が得られ、他の試料では Ct 値は得られなかった (図 2 および表 3)。Ct 値が得られたビーフンにおいて Rn 比を確認したところ、1.5 未満であったため陰性とした (表 3)。従って 17 検体すべてが Bt コメ陰性と判定した (表 3)。

表 2 コメ加工品における DNA 抽出結果

No.	シリカゲル膜タイプキット		イオン交換タイプキット	
	DNA 濃度	精製度	DNA 濃度	精製度
1	56.2	1.97	98.4	1.70
2	3.2	1.24	10.1	1.36
3	<0.1	4.26	50.4	1.86
4	7.2	1.44	19.9	1.74
5	62.6	1.97	115.7	1.81
6	94.4	2.03	81.9	1.75
7	140.8	1.49	151.9	1.86
8	26.3	1.50	105.7	1.86
9	16.7	1.93	72.7	1.82
10	92.0	1.53	63.2	1.87
11	159.1	2.10	124.1	1.88
12	5.4	1.50	101.1	1.88
13	410.0	1.73	34.8	1.85
14	108.0	1.66	28.6	1.87
15	13.8	1.58	43.7	1.84
16	50.0	1.48	85.7	1.82
17	197.3	1.93	205.4	1.84

*1 DNA 濃度：単位 ng/μL

*2 精製度：吸光度 260nm/280nm

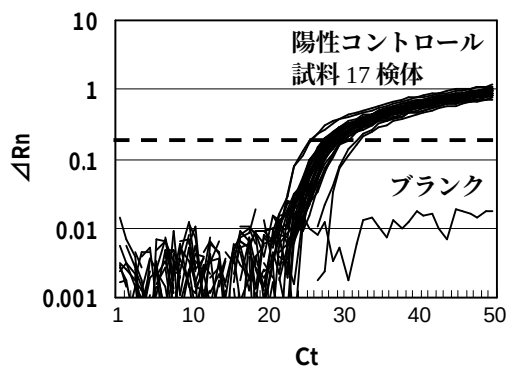


図 1 陽性対照試験の Amplification Plot

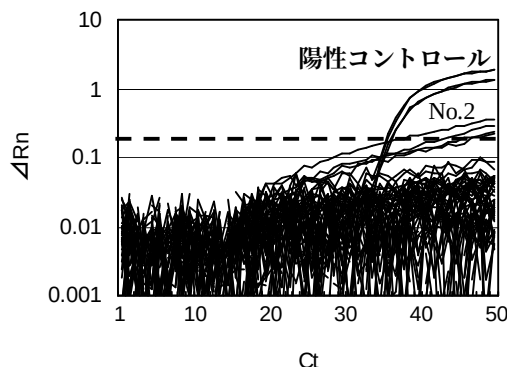


図 2 Bt コメ検出用試験の Amplification Plot

表3 陽性対照試験ならびに Bt コメ検出用試験での Ct 値および Rn 比

Bt コメ検出用試験										
No.	陽性 対照 試験	結果								
	Ct 値	63Bt コメ検出用				NNBt コメ検出用				Bt コメ
		10 ng/μLDNA 溶液		5 ng/μLDNA 溶液		10 ng/μLDNA 溶液		5 ng/μLDNA 溶液		
		Ct 値	Rn 比	Ct 値	Rn 比	Ct 値	Rn 比	Ct 値	Rn 比	
1	30.8	N.D.	1.06	N.D.	1.05	N.D.	1.06	N.D.	1.05	(－)
2	29.7	48.2	0.97	N.D.	1.06	44.6	0.89	N.D.	1.07	(－)
3	31.0	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.04	N.D.	1.05	(－)
4	30.2	N.D.	1.06	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.07	(－)
5	30.2	N.D.	1.06	N.D.	1.05	N.D.	1.06	N.D.	1.05	(－)
6	28.3	N.D.	1.05	N.D.	1.04	N.D.	1.05	N.D.	1.04	(－)
7	28.6	N.D.	1.05	N.D.	1.03	N.D.	1.05	N.D.	1.04	(－)
8	29.6	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.05	(－)
9	29.2	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.07	N.D.	1.04	(－)
10	32.6	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.04	N.D.	1.05	(－)
11	29.7	N.D.	1.04	N.D.	1.06	N.D.	1.04	N.D.	1.06	(－)
12	28.7	N.D.	1.04	N.D.	1.04	N.D.	1.04	N.D.	1.04	(－)
13	29.0	N.D.	1.04	N.D.	1.05	N.D.	1.04	N.D.	1.04	(－)
14	28.2	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.06	N.D.	1.05	(－)
15	28.3	N.D.	1.05	N.D.	1.06	N.D.	1.05	N.D.	1.05	(－)
16	28.8	N.D.	1.06	N.D.	1.05	N.D.	1.05	N.D.	1.05	(－)
17	28.9	N.D.	1.04	N.D.	1.05	N.D.	1.04	N.D.	1.06	(－)

*1 Ct 値および Rn 比は 2 ウェルの平均

*2 N.D.は Ct 値不検出

*3 (－) は Bt コメ陰性

*4 陽性対照試験は 10ng/μLDNA 溶液、Bt コメ検出用試験は 10 ng/μL および 5 ng/μLDNA 溶液で検査実施

4 まとめ

福岡市内に流通しているコメ加工品 17 検体について Bt コメの検査を行ったところ、いずれの検体にも混入は認められなかった。しかし、安全性未審査である遺伝子組換え農作物の食品への混入は世界中で度々発見されている。今後も食の安心と安全を確保するために、あらゆる食品について遺伝子組換え農作物の混入実態調査を実施する必要があると考える。

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続きに関する告示，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) 厚生労働省通知食安輸発第 0220002 号：安全性未審査の中国産米加工品の検知法について，平成 19 年 2 月 20 日