

短報

食品中で発見された種子様異物の 鑑定について

大森清美, 岸 弘子, 藤巻照久

Analytical method on the discrimination of a foreign matter looked like a seed in food.

Kiyomi OHMORI, Hiroko KISHI
and Teruhisa FUJIMAKI

はじめに

異物試験は、通常、目視および実体顕微鏡などを用いた形態観察の後に、理化学試験として、赤外分光光度計を用いた有機物等の分析ならびに蛍光 X 線分析装置を用いた無機元素等の分析が行われる^{1,2)}。しかし、形態観察により動物由来もしくは植物由来の一部であることが疑われ、さらに異物が微小である場合には、生物種に特異的な成分を分析し、種の特特定を行うことは極めて困難となる。そのような場合、種の特特定に結びつく特徴的な器官、組織および細胞等を観察することにより生物種の鑑別を行うことになる。しかしながら、その手法により鑑別を行うためには、豊富な知識と経験を要するとともに、異物の状態として、種の特特定につながる特徴的な形態が保持されていることが必須条件となる。一方、近年、目覚ましく発展した遺伝子増幅反応 (PCR) 法では、試料が微小である場合、また形態が保持されていない場合でも、PCR で増幅可能な DNA が採取され、種に特異的な DNA 配列を増幅するプライマーなどの適切な PCR 条件が決定されれば、客観的に種の鑑別を行うことができる。厚生労働省の食品検査に係る通知試験法においても PCR 法が採用されており、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(食安発第0618001号, 平成20年6月18日)、「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(食安監発0220001号, 平成19年2月20日) および「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食安発第0122001号, 平成21年1月22日) では、種に特異的な DNA 配列を PCR 法により検出する方

法が用いられている。これらの試験法は、異物試験における種の鑑別法としても応用が可能であると考えられる。実際に平成20年度には、当所での異物試験において PCR 法により種の鑑別を行った事例があった。異物は、苦情者が食品を喫食中に発見した一粒の種子様異物であり、苦情者が在住する県の衛生研究所では、形態観察により「トマトの種子」に類似している結果が得られていたが、「トマト」であることの鑑別には至っていなかった。本県では、種の特特定を植物の専門家に依頼した。しかし、形態観察のみにより「トマト」であることを同定することは不可能との回答であったことから、当所において、PCR 法を用いることにより、異物が「トマト」に由来する物質であることの証明を試みた。本報では、その事例における検討事項および試験結果について報告する。

材料および方法

1. 異物および対照品

異物：発酵乳 (ヨーグルト) を喫食中に発見された種子様異物 (図 1 a)。

対照品 1：トマト栽培用種子 (図 1 b)。

対照品 2：トマト青果から採取した種子 (トマト青果種子, 図 1 c)。

対照品 3：ピーマン青果から採取した種子 (ピーマン青果種子, 図 1 d)。

対照品 4：ナス青果から採取した種子 (ナス青果種子, 図 1 e)。

対照品 5：シシトウ青果から採取した種子 (シシトウ青果種子, 図 1 f)。

対照品 6：キュウリ青果から採取した種子 (キュウリ青果種子, 図 1 g)。

上記のトマト栽培用種子は、神奈川県立かながわ農業アカデミーより譲渡を受けた。また、トマト青果は、自家栽培の完熟トマトを使用し、ピーマン、ナス、シシトウおよびキュウリは、横浜市内の青果店から購入したものをを用いた。

2. 方法

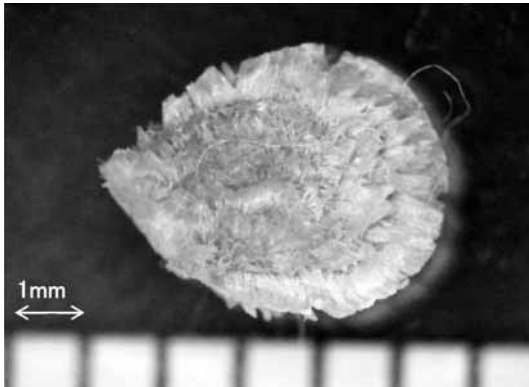
(1) 形態観察

異物および対照品について、肉眼および実体顕微鏡 (SZX9, オリンパス社製) を用いて観察を行った。

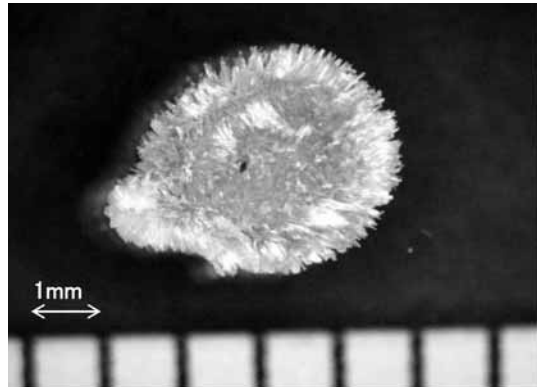
(2) PCR 法による植物 DNA およびトマト DNA の検出

GM quicker 2 (ニッポンジーン社製) プロトコール、「ナタネ一粒からの DNA 抽出」を参考とし、より高濃度な DNA 試料原液を得るために、65℃での抽

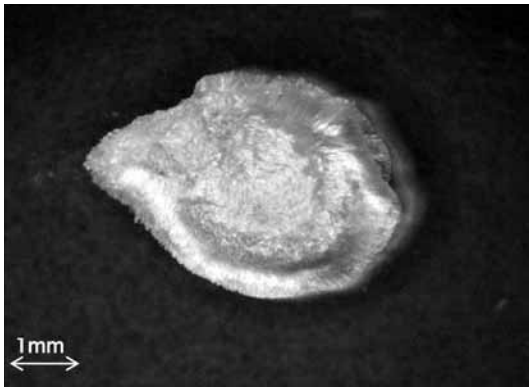
a. 異物



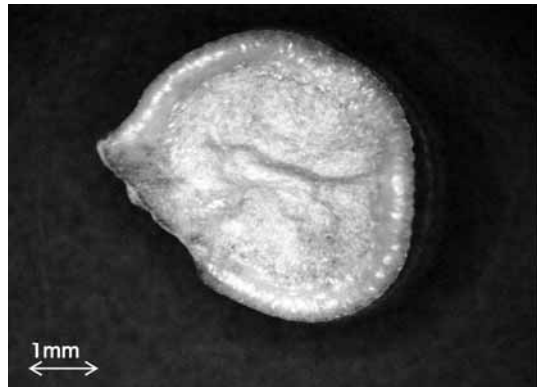
b. 対照品 1 : トマト栽培用種子



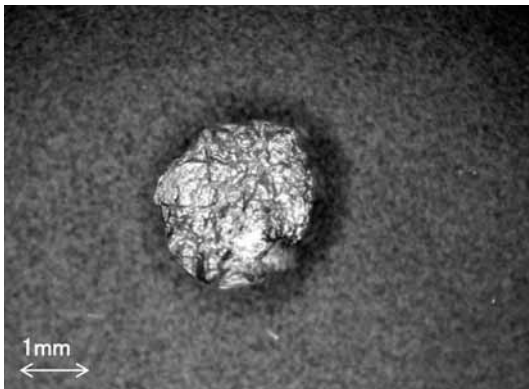
c. 対照品 2 : トマト青果種子



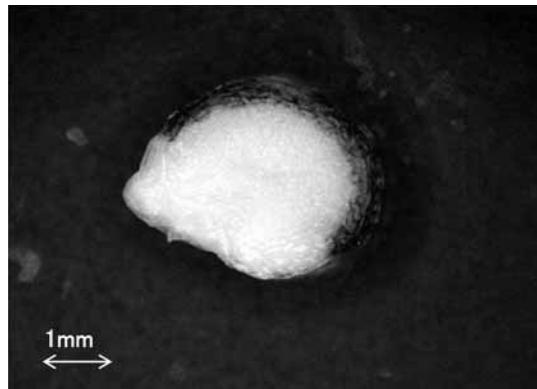
d. 対照品 3 : ピーマン青果種子



e. 対照品 4 : ナス青果種子



f. 対照品 5 : シシトウ青果種子



g. 対照品 6 : キュウリ青果種子

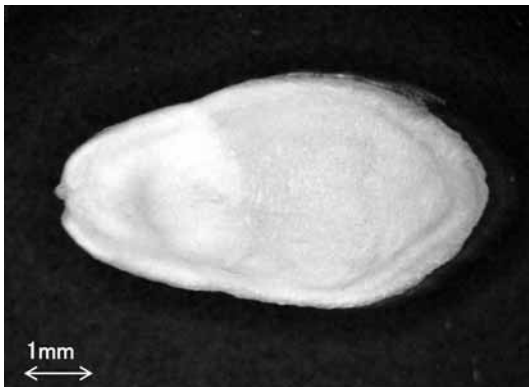


図 1 異物および対照品の実体顕微鏡像

出時間を15分から30分に延長した。異物および対照品から DNA の抽出精製は、以下のとおり行った。異物は、滅菌水1.5ml で10回洗浄し、250 μ l の GE 1 Buffer を加えてよくすりつぶした。10 μ l の Proteinase K, 2 μ l の α -Amylase, 5 μ l の RNase A をそれぞれ添加し、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌した。30分間、65 $^{\circ}$ C で加温した後、40 μ l の GE 2 -K Buffer を添加しよく混和した。以下、GM quicker 2 プロトコル、「ナタネ一粒からの DNA 抽出」に従った。対照品は、滅菌水1.5ml で5回洗浄し、以下、異物と同様に DNA の抽出精製を行った。トマト栽培用種子およびトマト青果種子については、それぞれ1粒から DNA の抽出精製を行い、ピーマン青果種子については5粒、ナス青果種子については10粒から DNA の抽出精製を行った。得られた DNA 試料原液は、DNA の濃度および純度 (260nm/280nm 吸光度比) を測定後、10ng/ μ l に TE 緩衝液で希釈し、PCR に用いる DNA 試料液とした。DNA 試料原液が10ng/ μ l に満たないものについては、原液のまま PCR に用いた。PCR プライマー、PCR 反応組成および PCR 条件を次ぎに記す。

植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対は、「アレルギー物質を含む食品の検査法について(一部改正)」(食安発第0122001号, 平成21年1月22日)に掲載されているプライマー配列に従った。なお、PCR 増幅 DNA の長さは124bp である。

トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対 (Lat 1 および Lat 2)³⁾ は以下のとおりであり、PCR 増幅 DNA の長さは92bp である。

F-primer (Lat 1) : 5' - AGA CCA CGA GAA CGA TAT TTG C - 3'

R-primer (Lat 2) : 5' - TTC TTG CCT TTT CAT ATC CAG ACA - 3'

PCR 反応液の組成および PCR 条件は、植物 DNA 検出用プライマー対およびトマト DNA 検出用プライマー対ともに、「安全性未審査の中国産米加工品の検知法について」(食安監発0220001号, 平成19年2月20日)の Bt コメ検出用プライマー対を用いた場合の条件に従った。PCR のブランク反応液として、プライマー対を加えないもの (プライマー (-)) 及び DNA 試料液を加えないもの (DNA (-)) についても同時に調製し、PCR 増幅を行った。

PCR 後の DNA 増幅産物は、「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(食安発第0618001号, 平成20年6月18日), 2.1.1.2.1.2. アガロースゲル電気泳動に従い、3%アガロースゲルを用いて検出を行っ

た。

試薬類は PCR buffer II, dNTP, 塩化マグネシウム溶液, AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼはアプライドバイオシステムズジャパン(株), 植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対は(株)ベックスへの合成依頼品, トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対はアプライドバイオシステムズジャパン(株)への合成依頼品を用いた。

機器類は、DNA 濃度および純度の測定装置として NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologie (株)), 遺伝子増幅装置として GeneAmp PCR System9700 (アプライドバイオシステムズジャパン(株)), 電気泳動装置に Mupid ミニゲル泳動装置 (アドバンス(株)), ゲル撮影装置として BIOINSTRUMENT AE-6905H Image Saver HR (ATTO (株)), 遺伝子定量装置として ABI PRISM7900HT (Applied Biosystems (株)) を用いた。

結果および考察

異物は、長径約 4 mm 径の涙型の平板状物質であり、淡黄褐色を呈していた。表面には一面に細かい毛状形態が認められた (図 1 a)。トマト栽培用種子 (図 1 b) およびトマト青果から採取した種子 (図 1 c) も異物と同様の形態および色を呈し、表面には一面に細かい毛状形態が認められた。トマトと同様のナス科に属するピーマン、ナス、シシトウ、キュウリの青果から種子を採取し形態観察を行った結果、ピーマン青果種子については、大きさ、形態および色は異物と類似していたが、実体顕微鏡観察の結果、表面に毛状形態は認められなかった (図 1 d)。ナス青果種子、シシトウ青果種子およびキュウリ青果種子 (図 1 e, f および g) は、いずれも大きさおよび色ともにトマト種子とは異なり、表面の毛状形態も認められなかった。よって、異物の形態および色は、ナス科の種子5種の中でトマトに極めて類似しており、他の4種の種子とは異なっていた。

さらに異物の特定を行うため、植物 DNA 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対を用いて、異物がトマト由来の物質であることの証明を行うこととした。その際、異物が一粒のみであり、繰り返し試験を行えないことから、まず、対照品 1 および 2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) を用いて、それぞれトマト種子一粒から3抽出 (n = 3) で実験を行った。その結果、それらの DNA 試料原液の濃度は、トマト栽培用種子は4.7~6.8ng/ μ l, 青果種子は7.5~9.4ng/ μ l であった。純度の指標

とされる260nm/280nm 吸光度比は、260nm および280nm における吸光度が0.1以上の DNA 試料原液では、良好な精製状態の目安とされる1.7から2.0の範囲内にあった。また、いずれの DNA 試料原液についても濃度は10ng/μl 以下であったことから、原液をそのまま PCR 用 DNA 試料液とし、植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対を用いて PCR を行った。その結果、トマト青果および栽培用種子の各1粒から抽出精製された DNA 試料原液では、それぞれ3抽出とも CPO の124bp および Lat52の92bp の PCR 増幅バンドが検出され、植物特異的 DNA およびトマト特異的 DNA の PCR 増幅が可能な状態で DNA が抽出されていることが確認された (図2 a および図2 b)。

そこで、この DNA 抽出精製法を用いて、異物、対照品3および4 (ピーマン青果種子およびナス青果種子) から DNA を採取した。その際、試料を用いずに試薬のみで操作を行う抽出ブランクの調製も同時に行った。その結果、異物から得られた DNA 試料原液の濃度は、21ng/μl、260nm/280nm 吸光度比は1.9であった。また、ピーマン青果種子およびナス青果種子から得られた DNA 試料原液の濃度は、68および23 ng/μl、260nm/280nm 吸光度比は1.8および1.7であり、いずれも PCR 反応に供する DNA 試料原液として良好な値であった。これらの DNA 試料原液を10ng/μl に希釈した DNA 試料液と、前述の検討で得られた対照品1および2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) の DNA 試料原液について、それぞれ植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対による PCR 増幅を行った (図3 a)。その結果、異物および対照品1~4 (トマト栽培用種子、トマト青果種子、ピーマン青果種子およびナス青果種子) から得られた DNA 試料液については、124bp 付近に植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対による明瞭な PCR 増幅バンドが検出され、異物および対照品1~4の DNA 試料液は、PCR 増幅が可能な状態の植物 DNA を含むことが示された。また、抽出ブランク、DNA (-) およびプライマー (-) では、124bp 付近に PCR 増幅バンドは検出されず、DNA 抽出精製および PCR 反応において植物 DNA 等のコンタミネーションが無いことも確認された。

次いで、トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対によるトマト DNA の検出ならびに Lat52検出用プライマーによる PCR 増幅の特異性について検討を行った。Litao らの報告では³⁾、Lat52検出用プライマー対の特異性として、16品種のトマトすべてにおいて92

bp の PCR 増幅バンドが検出され、大麦、綿実、トウモロコシ、米、菜種、小麦、ヒマワリ、大豆、ジャガイモ、唐辛子、コショウおよびタバコ等では PCR 増幅バンドは検出されないことが確認されている。しかし、同報告では、トマトが属するナス科の植物種子については、Lat52検出用プライマー対による PCR 増幅の特異性について検討が行われていない。そこで、異物および対照品1および2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) の DNA 試料原液での Lat52検出用プライマー対による PCR と同時に、ナス科の植物種子における PCR 増幅の特異性検討として、ピーマンおよびナス青果から得られた DNA 試料液についても PCR を行った。その結果、Lat52検出用プライマー対による PCR 増幅バンド (92bp) は、異物および対照品1および2 (トマト栽培用種子およびトマト青果種子) のみで検出され、ピーマンおよびナス青果では検出されなかった。したがって、Lat52検出用プライマー対による PCR 増幅は、トマトに特異的な反応であることが確認され、異物はトマトに由来する物質であることが明らかとなった (図3 b)。その際、抽出ブランク、DNA (-) およびプライマー (-) では92bp 付近に PCR 増幅バンドは検出されず、DNA 抽出精製および PCR 反応におけるトマト DNA のコンタミネーションが無いことも確認された。

まとめ

発酵乳中で発見された種子様異物について、肉眼および実体顕微鏡により形態観察を行い、対照品1~4 (トマト栽培用種子、トマト青果種子、ピーマン青果種子およびナス青果種子) との比較を行った結果、大きさ、色、形および表面の毛状形態などの特徴から、異物はトマト種子に極めて類似していた。さらに、PCR 法により種の特特定を行うため、GM quicker 2を用いて DNA の抽出精製を行い、植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対により PCR 増幅を行った。その結果、異物はトマトに特異的な DNA を含むことが確認された。以上の形態観察および PCR 法による結果から総合的に判断し、異物はトマト種子であることが鑑定された。

謝 辞

対照品として、栽培用のトマト種子を譲渡いただきました神奈川県立かながわ農業アカデミーに深謝いたします。

(平成21年8月11日受理)

a. 植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対

b. トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対

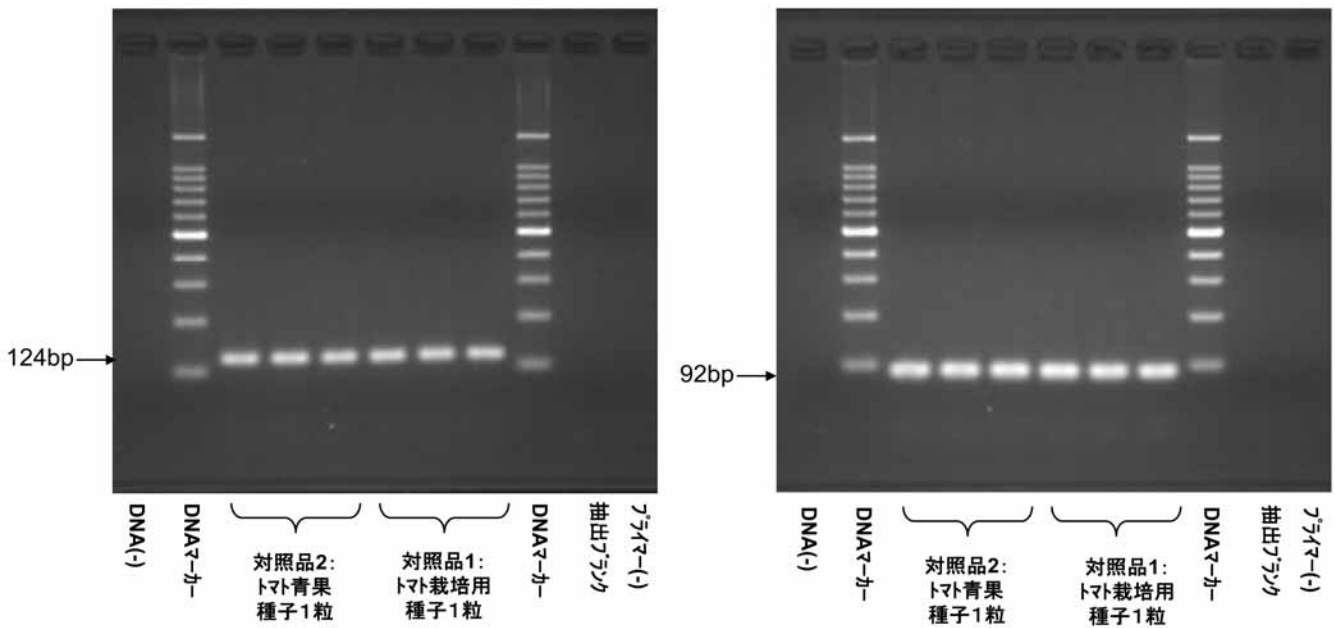


図2 1粒の種子からの植物 DNA (CPO) 検出およびトマト DNA (Lat52) 検出に関する検討結果

a. 植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対

b. トマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対

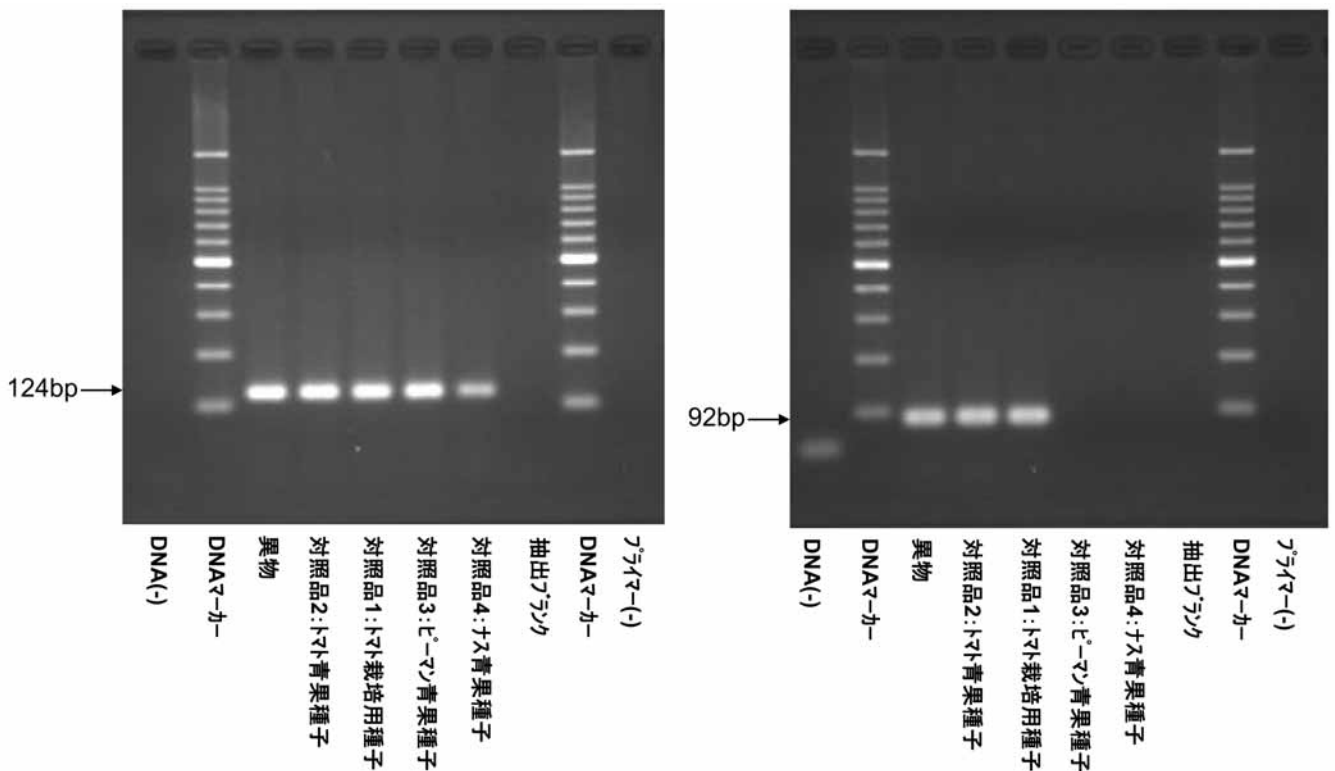


図3 異物および対照品からの抽出 DNA における植物 DNA (CPO) 検出用プライマー対およびトマト DNA (Lat52) 検出用プライマー対による PCR 増幅結果

文 献

1) 大森清美, 土屋久世, 岸 弘子, 山田利治, 平山クニ: 食品中の異物検査結果について (平成15年

度・16年度), 神奈川県衛生研究所研究報告, 35, 33-35 (2005)

2) 大森清美, 渡邊裕子, 関戸晴子, 岸 弘子, 土屋

久世, 山田利治: 食品中の異物検査結果について
(平成17年度・18年度), 神奈川県衛生研究所研究
報告, 37, 45-49 (2007)

3) Litao, Y. *et al.*: Validation of a tomato-specific

gene, LAT52, used as an endogenous reference
gene in qualitative and real-time quantitative
PCR detection of transgenic tomatoes, *J. Agric.
Food Chem.*, 53, 183-190 (2005)