神奈川県衛生研究所研究報告　No. 47 (2017)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

コメ加工品中の組換えDNA検査におけるシリカベースタイプキットによるDNA抽出精製の検討

大森　清美，清水 碧※，田中　由紀子，
土屋　久世※※

Study on DNA extraction and purification method of rice processed foods using the silica-base type kit for the detection of the genetically modified organism

Kiyomi OHMORI, Midori　SHIMIZU,
Yukiko TANAKA and Hisayo TSUCHIYA

緒言

平成17年４月13日付けの環境保護団体グリーンピースのウェブサイト[1]において，未承認の遺伝子組換え米が中国湖北省で栽培および販売されていたことが報道された．また，同年９月５日付けの同ウェブサイトでは，グリーンピース等がコメ加工品（ビーフン等）を検査したところ，中国からの遺伝子組換え米がフランス，ドイツ及びイギリスの食品に含まれていたと公表された[2]．そこで，国立医薬品食品衛生研究所は神奈川県衛生研究所などとともに安全性未審査の中国産米加工品の検知法を開発し[3,4]，厚生労働省は検疫所でのモニタリング検査を実施した．その結果，平成19年１月26日に中国産コメ加工品（ビーフン等）において安全性未審査の遺伝子組換えコメが混入していた事例が確認され，その旨が公表された[5]．その際，コメ加工品からのDNA抽出精製法として開発されたものがニッポンジーン社のGM quicker 2を用いる方法であり，安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法として通知され[6]，同DNA抽出精製法は現行の通知検査方法[7]においても，コメ（63Bt，NNBt，CpTI）の検査方法の「シリカゲル膜タイプのDNA 抽出精製キット法（NIPPON GENE GM quicker 2)」として掲載されている．しかしながら，加工品には検知目的の作物であるコメ以外にも複数の原料を含む場合があり，加熱などの加工によりPCRによる検出が可能なコメDNAが減少している可能性が考えられる．そこで，加工程度の高い試料に適用が可能とされる[8] QIAGEN社のGenomic-tipについて，現行の通知法では20/Gよりも試料の高負荷が可能な100/Gを用いて，DNA収量を上げたDNA抽出精製法が第一選択とされている[7]．一般にGenomic-tip でのDNA抽出精製では最後にイソプロピルアルコールによるDNAの沈殿を行うため時間を要し，特にコメ加工品でのGenomic-tip 100/GによるDNA抽出精製では60分間の冷却工程があるため５時間以上を要する．一方，GM quicker 2を用いるDNA抽出精製は２時間程度で完了するため，Genomic-tip 100/GよりもGM quicker 2を用いる方法のほうが明らかに迅速である．そこで，各種コメ加工品のDNAの抽出精製におけるGM quicker 2法の使用の可否について検討した．

方法

試料として用いたコメ加工品は，スープなどの調味料とともに即席麺として販売されているライスヌードル８種，麺単品として販売されている調理用乾麺のライスヌードル10種，ライスペーパー２種および米粉類３種であり，いずれも神奈川県内の食料品店で購入した．試料の前処理について，ライスヌードル（即席めんおよび調理用乾麺），ライスペーパーおよび白玉粉は，ラボミルサー（大阪ケミカル）を用いて均質に細粉砕した．その他の試料については，包装された袋内で均質になるよう混合した．DNA抽出精製法は，均質な粉状の各試料500 mgを採取し，ニッポンジーン社のGM quicker 2を用いて，通知の検査方法1.2. シリカゲル膜タイプのDNA 抽出精製キット法（NIPPON GENE GM quicker 2）（別法，コメおよび非加熱加工品に適用）に従い実施した．抽出DNAの評価は，微量分光器（NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer（NanoDrop Technologies）を用いて吸光度測定を行い，260nmにおける吸光度からDNA濃度を算出した．また，通知法の記載のとおり，260 nm/280 nmの吸光度比（A260/A280）が1.7～2.0であればDNA が十分に精製されているとされる純度の指標とした．260 nm/230 nmの吸光度比（A260/A230）は通知法については記載がないが，低波長側の不純物を確認するための参考値とした．コメ内在性遺伝子Sucrose Phosphate Synthase（SPS）のPCR

１神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1
※　神奈川県保健福祉局薬務課
〒231-8588　横浜市中区日本大通1
※※　前　理化学部

およびアガロースゲル電気泳動による検知は旧通知[9]に従い，遺伝子増幅装置（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems），電気泳動装置（Mupid ミニゲル泳動装置，アドバンス）およびゲル撮影装置（BIOINSTRUMENT AE-6905H Image Saver HR, ATTO）を用いて実施した．コメ内在性遺伝子phospholipase D（PLD）のリアルタイムPCRによる検知は，現行の通知[7]に従い，リアルタイムPCR装置（7900HT, Applied Biosystems）を用いて実施した．それらのコメ内在性遺伝子として，検体No.1からNo.16はSPS遺伝子について，また検体No.6からNo.8およびNo.17からNo.23はPLD遺伝子についてPCRを行い，各試料２抽出ずつのDNA試料液で検出の可否を検討した．

結果および考察

各種コメ加工品について，GM quicker 2を用いるDNA抽出精製法（GM quicker 2法）によりDNAを採取し，得られたDNA試料原液の濃度，純度指標値，DNA抽出効率および内在性遺伝子のPCR結果を表１に示した．まず，コメ加工品のうち，流通製品数が多いライスヌードルについてGM quicker 2法の適用性を検討した結果，即席麺のNo.1～8では，260nm/230nm値は0～16まで様々であったが，純度指標値（260nm/280nm値）については全て1.7以上であった．DNA試料原

表１　GM quicker 2法によるコメ加工品の抽出DNA評価

No.	検体	抽出No.	260nm /230nm	平均値	260nm /280nm	平均値	DNA試料原液濃度 (ng /μL)	平均値	DNA抽出効率 DNA（μg）/ 試料(g)	平均値	SPS	PLD (Ct 値)
1	ライスヌードル(即席めん)A	1	3.46	4.39	2.03	2.03	71.0	52.8	6.9	5.1	+	NT
		2	5.31		2.03		34.5		3.4		+	NT
2	ライスヌードル(即席めん)B	1	0.00	3.50	2.00	1.98	14.0	19.3	1.4	1.9	+	NT
		2	7.00		1.96		24.5		2.4		+	NT
3	ライスヌードル(即席めん)C	1	6.50	11.00	1.95	2.01	19.5	17.5	1.9	1.7	+	NT
		2	15.50		2.07		15.5		1.5		+	NT
4	ライスヌードル(即席めん)D	1	4.47	4.02	2.00	1.99	38.0	45.8	3.7	4.5	+	NT
		2	3.57		1.98		53.5		5.3		+	NT
5	ライスヌードル(即席めん)E	1	5.57	5.05	1.95	1.99	19.5	24.5	1.9	2.4	+	NT
		2	4.54		2.03		29.5		2.9		+	NT
6	ライスヌードル(即席めん)F	1	0.00	5.75	2.00	1.96	10.0	10.8	1.0	1.1	+	NT
		2	11.50		1.92		11.5		1.1		+	NT
		3	1.53	1.58	1.79	1.82	32.8	34.6	3.3	3.5	NT	23.92
		4	1.63		1.84		36.4		3.6		NT	23.71
7	ライスヌードル(即席めん)G	1	0.00	0.00	1.91	1.86	10.5	10.3	1.0	1.0	+	NT
		2	0.00		1.82		10.0		1.0		+	NT
		3	1.78	1.73	2.03	2.02	17.1	15.8	1.7	1.6	NT	23.08
		4	1.68		2.01		14.4		1.4		NT	23.07
8	ライスヌードル(即席めん)H	1	−	−	2.00	2.00	8.0	9.0	0.8	0.9	+	NT
		2	−		2.00		10.0		1.0		+	NT
		3	1.74	1.85	1.94	2.41	24.1	15.8	2.4	1.6	NT	23.95
		4	1.95		2.87		7.5		0.8		NT	24.43
9	ライスヌードルI	1	2.77	2.69	1.95	1.95	95.5	102.0	9.5	10.1	+	NT
		2	2.61		1.95		108.5		10.7		+	NT
10	ライスヌードルJ	1	2.51	2.45	2.01	1.98	215.5	180.0	21.5	17.8	+	NT
		2	2.39		1.95		144.5		14.2		+	NT
11	ライスヌードルK	1	2.42	2.40	1.96	1.96	166.0	154.8	16.3	15.2	+	NT
		2	2.37		1.95		143.5		14.2		+	NT
12	ライスヌードルL	1	2.41	2.37	1.88	1.89	103.5	100.3	10.3	9.9	+	NT
		2	2.34		1.90		97.0		9.5		+	NT
13	ライスヌードルM	1	2.35	2.36	2.02	2.02	289.5	291.3	28.7	28.9	+	NT
		2	2.37		2.01		293.0		29.0		+	NT
14	ライスヌードルN	1	2.42	2.38	2.07	2.05	417.5	315.5	41.3	31.1	+	NT
		2	2.33		2.02		213.5		21.0		+	NT
15	ライスヌードルO	1	2.35	2.35	2.01	2.01	287.5	286.5	28.5	28.3	+	NT
		2	2.36		2.01		285.5		28.0		+	NT
16	ライスヌードルP	1	2.27	2.29	1.98	1.97	216.0	207.5	21.4	20.6	+	NT
		2	2.31		1.96		199.0		19.8		+	NT
17	ライスヌードルQ	1	1.71	1.77	1.94	1.93	44.8	53.5	4.5	5.4	NT	22.75
		2	1.82		1.92		62.2		6.2		NT	22.66
18	ライスヌードルR(コーンスターチ)	1	0.16	0.08	−0.22	6.85	−0.1	0.1	0.0	0.0	NT	29.52
		2	0.00		13.92		0.2		0.0		NT	29.31
19	ライスペーパー(タピオカ)	1	0.67	0.67	1.14	1.57	2.3	2.7	0.2	0.3	NT	32.68
		2	−		2.00		3.1		0.3		NT	33.02
20	ライスペーパー(タピオカ)	1	1.71	1.41	2.02	1.99	21.3	18.2	2.1	1.8	NT	23.72
		2	1.11		1.96		15.0		1.5		NT	24.13
21	上新粉	1	2.29	2.29	2.08	2.08	441.3	456.9	44.1	45.7	NT	24.28
		2	2.29		2.08		472.4		47.2		NT	24.56
22	白玉粉	1	2.16	2.16	1.83	1.81	111.7	92.5	11.2	9.3	NT	21.78
		2	2.16		1.79		73.3		7.3		NT	21.79
23	上新粉、白玉粉混合物	1	1.96	2.10	1.85	1.85	50.7	71.2	5.1	7.1	NT	21.88
		2	2.24		1.84		91.6		9.2		NT	21.82

−：吸光度実測値が0以下のため評価不能　　NT：PCRを実施せず

液の濃度は，No.1～5は十分な濃度が得られたが，No.6～8は定性PCRに用いられるDNA試料液の濃度である10ng/μlとほぼ一致もしくはそれに満たないものもあった．ライスヌードルのうち，コメ粉100％の調理用乾麺（No.9～17）では，いずれにおいてもDNA試料原液の260nm/280nm値および260nm/230nm値はすべて1.7以上であった．一方，調理用乾麺であってもコーンスターチを含むNo.18は，260nm/280nm値，260nm/230nm値およびDNA試料原液の濃度のいずれの値も通知法の目安には満たない値であった．コーンスターチからはトウモロコシのDNAがほとんど抽出されないことが報告されていることから[10]，細粉砕した試料中のコメDNA量がコメ粉100％のライスヌードルよりも少ないことがDNA試料原液の濃度が低い原因の一つと考えられた．また，No.18のDNA試料原液の濃度は0.1ng/μlとコメ粉100％の調理用ライスヌードルに比べて極端に低い値であることから，No.18の含有成分がDNAの抽出を妨害している可能性も考えられた．次に，タピオカ入りのライスペーパー２種（No.19，20）について検討を行った．その結果，No.20は260nm/280nm値は適切な値でありDNA試料原液の濃度も10ng/μl以上であったが，No.19ではDNA試料原液の濃度は2.7ng/μlと低値であり，260nm/280nm値もばらつきが大きかった．260nm/230nm値はNo.19およびNo.20ともにばらつきが大きく再現性が低かった．これらの試料についてもタピオカの混合による粉砕試料中のコメDNA量の減少および含有成分によるコメDNAの抽出妨害がDNA試料原液の低濃度の要因として推察された．コメ粉類は非加熱加工品であるため，現行通知法[7]でもGM quicker 2法が適用されている．表１でのコメ粉類（No.21～23）の結果においても 260nm/280nm値および260nm/230nm値は1.7以上であり，DNA試料原液の濃度は50ng/μl以上であった．以上，23種のコメ加工品からGM quicker 2法により得られたDNA試料原液の濃度および260nm/280nm値の大方は十分かつ適切であったが，加工度の高い即席麺やコメ以外のでんぷんを添加した製品のDNA試料原液の濃度および260nm/280nm値は，目安とされる値に満たないものがあった．しかしながら，内在性遺伝子のPCR結果においては，SPSのPCRを実施した試料については全て＋（検出）であった．またPLDのリアルタイムPCR結果でも実施した試料のCt値は全て34未満であり検出基準となるCt値の48未満であることから全て＋（検出）であった．このことから，コーンスターチを含むライスヌードル（No.18）およびタピオカ入りのライスペーパー２種（No.19，20）から抽出精製されたコメDNAは，少量ながらもPCR増幅が可能なDNAの質を保持していることが示唆された．以上によりGM quicker 2法は，各種コメ加工品のDNAの抽出精製法として使用可能であると考えられた．

結論

GM quicker 2法では，コメ粉100％の調理用ライスヌードルおよび米粉類については，40ng/μl以上のDNA試料原液が得られ，純度指標である260nm/280nm値も全て1.7以上であり適用可能であった．一方，即席麺など加工度の高い製品やコーンスターチ，タピオカなどのコメ以外のでんぷんが添加された製品ではDNA試料原液の濃度が10ng/μlに満たないものや260nm/280nm値が目安の範囲に入らないものもあったが，内在性遺伝子のPCR結果は，いずれも検出が可能であった．したがって，GM quicker 2法はコメおよび非加熱加工品以外のコメ加工品について行政処分などを伴う検査のDNA抽出精製法としては使用できないが，迅速性を優先するスクリーニング試験などには使用可能であることが示唆された．

文献

１）国際環境保護NGOグリンピースホームページ：Scandal, Greenpeace discovers illegal GE rice in China＜http://www.greenpeace.org/international/news/scandal-greenpeace-exposes-i＞（2016/06/12アクセス）

２）国際環境保護NGOグリンピースホームページ：Releases, http://www.greenpeace.org/international/press/releases/illegal-genetically-engineered

３）厚生労働省　医薬食品局　食品安全部　監視安全課長，安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について，食安監発第0126005号通知，平成19年１月26日．

４）Akiyama H et al., Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products., J Agric Food Chem., **55**, 5942-5947 (2007).

５）厚生労働省ホームページ，報道発表資料，安全性未審査の中国産遺伝子組換え米の混入事例について，http://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/01/h0126-3.html（2016/06/12アクセス）

６）医薬食品局食品安全部監視安全課長，安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について，食安監発第0126006号平成19年１月26日．

７）厚生労働省医薬　生活衛生局　生活衛生・食品安全

部長，安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法の一部改正について，生食発0824 第２号，平成28年８月24日.
８）消費者庁次長，アレルギー物質を含む食品の検査方法について，消食表第36号，平成26年３月26日.
９）厚生労働省　医薬食品局　食品安全部　監視安全課長，安全性未審査の中国産米及び米加工品の検知法について，食安監発第0220001号，平成19年２月20日.
10）大森清美ほか：トウモロコシ加工品からのイオン交換樹脂タイプキットを用いたDNA抽出精製法の検討，食品衛生学雑誌，49，45-50（2008）