

【調査研究】

## 遺伝子組換えダイズ混入の判定に係る検査法の導入に関する検討

Investigation on application of a new official analytical method for detecting genetically modified soybean contamination

金子英史, 難波順子, 佐藤 淳, 藤本佳恵, 繁田典子

KANEKO Hidefumi, NAMBA Junko, SATO Atsushi, FUJIMOTO Kae, SHIGETA Noriko

### 要 旨

遺伝子組換えダイズの検査において、公定法として新設された、ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）（令和3年9月15日付消食表第389号）（以下「新通知法」という。）を導入するための検討を行った。模擬試料及びダイズ穀粒試料を用い、新通知法に従って定性PCRを行った結果、ダイズ穀粒の検査法（平成27年3月30日付消食表第139号）（以下「従来法」という。）で検出した組換え遺伝子混入率（以下「混入率」という。）0%の試料は「陰性」、0.1%以上の試料は「陽性」という結果であった。他方、混入率0.01%~0.1%の試料は、8件中4件でウェル判定結果がばらつくことによる「PCR用反応液の調製以降を再操作」又は「DNAの抽出精製以降を再操作」（以下「再操作」という。）が必要となった。このことから、新通知法は、混入率0.01%~0.1%の試料で再操作が高頻度で必要となるおそれがあり、従来法と比較すると検査結果の判定に時間を費やすと考えられた。

[キーワード：遺伝子組換え食品, ダイズ, 定性PCR]

[Key words: Genetically modified food, Soybean, Qualitative PCR]

## 1. はじめに

遺伝子組換え食品の表示は、食品表示法に基づいて実施されており、令和5年4月より、「遺伝子組換えでない」等の表示の基準が、現行の「意図せざる混入を5%以下に抑えている場合」から「遺伝子組換えの混入がないと認められる場合」へと厳格化された（以下「改正食品表示基準」という。）。令和5年4月以前は、ダイズ穀粒の検査法（平成27年3月30日付消食表第139号）（以下「従来法」という。）に従い、定量PCR法で混入率が5%以下であることを確認していたが、令和5年4月以降は「遺伝子組換えの混入がないと認められる場合」を精度良く判定するため、課題である試験室間や検出限界付近のばらつきに対処でき、改正食品表示基準に対応可能である $\Delta\Delta$ Cq法を用いた定性PCR法が導入された。

岡山県では、食の安全・安心事業の一環として、県内で製造されたダイズ加工食品とその原料ダイズを中心に、表示が適正に行われていることを確認する目的で、遺伝子組換え食品の表示が義務化された翌年の平成14年度から検査を行ってきた。今回ダイズ穀粒の検査法（遺伝子組換え農産物混入の判定に係る検査法）（令和3年9月15日付消食表第389号）（以下「新通知法」という。）の導入を目的とした検証を行ったので報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

試料を表1に示す。

模擬試料は、遺伝子組換え不分別ダイズ(P35S:87.2%)と遺伝子組換え混入率0%のダイズを用いて4検体(P35S混入率:0.12%, 0.06%, 0.012%, 0%)作成した。模擬試料は、当初、粉碎したダイズを重量比で混合調整して作成を試みたが、その方法では求める混入率の試料

表1 試料一覧

	No.	GM混入率(%)		備考
		P35S (RRS+LLS)	RRS2	
模擬試料	1	0.12	0	0.1%以上
	2	0.060	0	0.01% ~ 0.1%(高)
	3	0.012	0	0.01% ~ 0.1%(低)
	4	0	0	0%
ダイズ穀粒試料	5	0.055	0	
	6	0.061	0	
	7	0	0.037	
	8	0	0.070	
	9	0.074	0.56	
	10	0.030	0	
	11	0	0.086	

を作成することが困難であることが判明した（重量比5.0 %，定量検査結果2.7 %）。そこで，粉碎したダイズのDNA抽出液を重量比で混合調整する方法で試みたところ，良好な結果が得られた（重量比0.1 %，定量検査結果0.12 %）ので，本法に従い調整した。

また，ダイズ穀粒試料は，令和3年度に検査したダイズ穀粒試料の7検体（混入率0 %～0.56 %）を用いた。

## 2.2 試薬等

QIAGEN製：DNeasy Plant Mini Kit，RNaseA（100 mg/mL），AP1緩衝液，P3緩衝液，AW1緩衝液，AW2緩衝液

滅菌水（超純水を滅菌）

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

組換えDNA P35S オリゴヌクレオチドセット

GMダイズ(RR2)系統別DNA RR2 オリゴヌクレオチドセット

GMダイズ混入判定用プラスミドセット

## 2.3 装置

分光光度計：Thermo Fisher Scientific製 NanoDrop One

リアルタイムPCR：Roche Diagnostics製 LightCycler 96

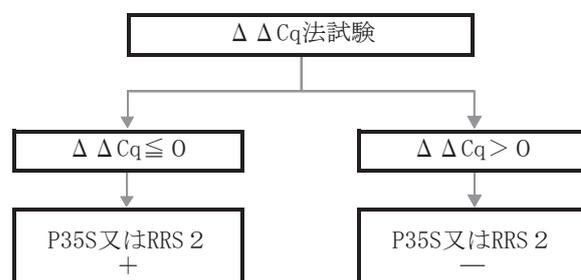
## 2.4 測定

シリカゲル膜タイプキット法（QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit）で抽出精製したDNA試料原液を希釈調製し，新通知法に従い実施した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 新通知法

新通知法で採用されている $\Delta\Delta Cq$ 法は，調べたい遺伝子の量をコントロール遺伝子の量で補正し，サンプルごとに比較することで相対的に判定する方法である。具体的には，標的遺伝子（P35S又はRRS2）の $Cq$ 値から内在性コントロール（Le1）の $Cq$ 値を引いたものを $\Delta Cq$ 値とし，更に，各サンプルの $\Delta Cq$ 値から基準となるサンプルの $\Delta Cq$ 値を引いたものを $\Delta\Delta Cq$ 値とする。従って， $\Delta\Delta Cq$ 値が0以下の場合には基準となるサンプルより増幅が早いので「ポジティブ（+）」， $\Delta\Delta Cq$ 値が0より大きい場合は，増幅が遅いので「ネガティブ



$$\Delta Cq = Cq(\text{P35S又はRRS2}) - Cq(\text{Le1})$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{DNA試料液}) - \Delta Cq(\text{標準プラスミドDNA溶液})$$

DNA試料液の $Cq$ 値は1ウェルごとの値、  
標準プラスミドDNA溶液の $Cq$ 値は2ウェルの平均値を用いる

図1 リアルタイムPCR試験結果の各ウェルの判定スキーム（ダイズ）

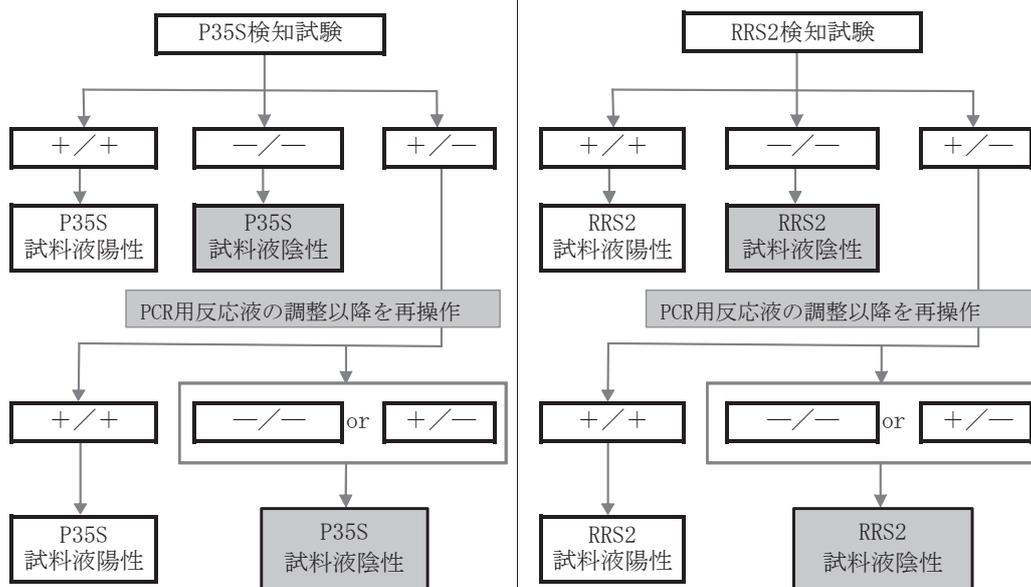


図2 リアルタイムPCR試験結果の各試料液の判定スキーム（ダイズ）

(-)」と判定することができる。詳細な判定は、新通知法に示された判定図（以下「判定図」という。）に基づき行う。判定図を図1、図2、図3-1及び図3-2に示す。

### 3.2 模擬試料による検証

今回検証に当たり、模擬試料を作成したが、既報告をもとに特に判定に疑義の生じる可能性のあるP35Sの混入率が0.12% (0.1%以上), 0.06% (0.01%~0.1% (高)), 0.012% (0.01%~0.1% (低)), 0%の4検体を作成した。すなわち、改正食品表示基準に対応した遺伝子組換えダイズ混入の判定に係る定性PCR検査法の開発<sup>1)</sup>で行われた試験室間共同試験において示された結果（以下「試験室間共同試験結果」という。）では、混入率0.5%, 0.2

%及び0.1%が「陽性」、0.01%及び0%が「陰性」であり、高い信頼性をもって陽性と判定される最低濃度は0.1%であった。また、細川らの報告<sup>2)</sup>では、P35Sの混入率が0.05%以下は全て「陰性」、0.06%~0.16%は「陽性」、「陰性」又は「PCR用反応液の調製以降を再操作」（以下「PCR再操作」という。）と判定にばらつきが認められ、0.19%以上は全て「陽性」となった。一方、RRS2の混入率が0%は「陰性」、0.05%~0.08%は判定にばらつきが認められ、0.09%以上は全て「陽性」であった。これらの報告から、新通知法導入にあたり、混入率0.01%~0.1%は「陽性」又は「陰性」と判定がばらつくことが予想されたことによる。

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組み合わせ				検知結果
	P35S		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	DNAの抽出精製以降を再操作(※)
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

※試料液1及び2共に試料液陰性の検知試験については、DNAの抽出精製以降の再操作は不要とする。

図3-1 2併行抽出試験結果の判定スキーム (ダイズ)

パターン	2併行抽出リアルタイムPCR判定結果の組み合わせ				検知結果
	P35S		RRS2		
	試料液1	試料液2	試料液1	試料液2	
①	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	検体陽性
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	
②	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	検体陰性
③	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	検体陰性
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陽性	
	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	試料液陰性	
	試料液陰性	試料液陰性	試料液陰性	試料液陽性	

図3-2 2併行抽出試験結果の判定スキーム (DNA再抽出時) (ダイズ)

表2 模擬試料の定性PCRの結果

検体	標準試料液		Le1 検知試験 Cq	P35S (RRS+LLS) 検知試験						RRS2 検知試験						総合判定
	ΔCq (P35S)	ΔCq (RRS2)		P35S 混入率 (%)	Cq	ΔCq	ΔΔCq	ウェル 判定	試料液 判定	RRS2 混入率 (%)	Cq	ΔCq	ΔΔCq	ウェル 判定	試料液 判定	
1	10.8	11.3	0.12	25.3	34.4	9.10	-1.70	+	陽性	0	-	-	-	-	陰性	
				25.3	34.4	9.10	-1.70	+			-	-	-	-		
				25.3	35.1	9.80	-1.00	+			-	-	-	-		
				25.3	34.3	9.00	-1.80	+			-	-	-	-		
2	10.8	11.3	0.06	25.3	35.4	10.1	-0.70	+	陽性	0	-	-	-	-	陰性	
				25.3	35.6	10.3	-0.50	+			-	-	-	-		
				25.3	35.1	9.80	-1.00	+			-	-	-	-		
				25.3	35.3	10.0	-0.80	+			-	-	-	-		
3	10.8	11.3	0.012	25.3	37.9	12.6	1.80	-	陰性	0	-	-	-	-	陰性	
				25.3	36.4	11.1	0.30	-			-	-	-	-		
				25.2	36.9	11.7	0.90	-			-	-	-	-		
				25.3	38.1	12.8	2.00	-			-	-	-	-		
4	10.8	11.3	0	25.3	0			-	陰性	0	-	-	-	-	陰性	
				25.3	0			-			-	-	-	-		
				25.8	0			-			-	-	-	-		
				25.8	0			-			-	-	-	-		

模擬試料の定性PCRを行った結果を表2に示す。今回の検証において、混入率0.01%～0.1%において、明確に「陽性」又は「陰性」と判定され、報告されたばらつきは確認されなかった。

### 3.3 ダイズ穀粒試料による検証

ダイズ穀粒試料の定性PCR結果を表3に示す。P35Sの混入率0%で「陰性」、0.030%及び0.055%で「PCR再操作」、0.061%及び0.074%で「陽性」であった。また、RRS2の混入率0%で「陰性」、0.037%及び0.070%で「PCR再操作」、0.086%及び0.56%で「陽性」であった。総合判定は、混入率が0.1%を超えていた1検体は「陽性」となり、0.1%未満の場合では、6検体中、2件は「陽性」、4件はウェル判定が「+」と「-」となり判定図により「PCR再操作」となった。

次に、この「PCR再操作」となった4件について、再度、定性PCRを行った結果を表4に示す。4件全てで総合判定が「DNAの抽出精製以降を再操作」（以下「DNA抽出再操作」という。）となった。今回、DNA抽出再操作以降の検証はできていないが、「DNA抽出再操作」となった検体の最終判定は、DNA抽出再操作以降の結果を、図3-2に基づき判定することとなる。

なお、1回目の定性PCR検査で「陽性」又は「陰性」と判定された試料を確認したところ、1回目と同じ判定結果が得られ、再現性が確認できた。

測定機種が異なるので一概には判断できないが、細川らの報告<sup>2)</sup>と同等程度の結果であった。

今回、ダイズ穀粒試料と模擬試料の結果で、ばらつきに違いが生じた理由として、今回検証したデータ数が少ないので断定はできないが、組換え遺伝子混入率が高い検体ほど、ばらつきが低くなる傾向が見受けられた。模擬試料は、組換え遺伝子混入率が高い検体を用いて調整したため、ばらつきを生じる反応が抑えられたのではないかと考えられた。

## 4 まとめ

岡山県で令和2年度から令和4年度に従来法で検査したダイズ穀粒は、53検体であり、これらを混入率別（0%、0.01%～0.1%、0.1%）に分類した結果を表5に示す。混入率0.01%～0.1%の試料は15件で新通知法の導入時に判定が困難と思われる検体が3割を占めた。これらの試料は「PCR再操作」、「DNA抽出再操作」となる可能性が高いため、新通知法の導入時には、従来法よりも検査結果の判定に時間を費やすと考えられた。

表3 ダイズ穀粒試料の定性PCRの結果

検体	P35S (RRS+LLS) 検知試験			RRS2検知試験			総合判定
	P35S混入率 (%)	ウェル判定	試料液判定	RRS2混入率 (%)	ウェル判定	試料液判定	
5	0.055	+	陽性	0	-	陰性	総合判定の前にPCR再操作
		+	PCR再操作		-	陰性	
		+	PCR再操作		-	陰性	
		-	PCR再操作		-	陰性	
6	0.061	+	陽性	0	-	陰性	陽性
		+	陽性		-	陰性	
		+	陽性		-	陰性	
		+	陽性		-	陰性	
7	0	-	陰性	0.037	+	陽性	総合判定の前にPCR再操作
		-	陰性		+	PCR再操作	
		-	陰性		+	PCR再操作	
		-	陰性		-	PCR再操作	
8	0	-	陰性	0.070	+	PCR再操作	総合判定の前にPCR再操作
		-	陰性		-	PCR再操作	
		-	陰性		+	陽性	
		-	陰性		+	陽性	
9	0.074	+	陽性	0.56	+	陽性	陽性
		+	陽性		+	陽性	
		+	陽性		+	陽性	
		+	陽性		+	陽性	
10	0.030	-	陰性	0	-	陰性	総合判定の前にPCR再操作
		-	陰性		-	陰性	
		+	PCR再操作		-	陰性	
		-	PCR再操作		-	陰性	
11	0	-	陰性	0.086	+	陽性	陽性
		-	陰性		+	陽性	
		-	陰性		+	陽性	
		-	陰性		+	陽性	

PCR再操作となった場合

表4 PCR再操作のダイズ穀粒試料の定性PCRの結果

検体	P35S (RRS+LLS) 検知試験			RRS2検知試験			総合判定
	P35S混入率 (%)	ウェル判定	試料液判定	RRS2混入率 (%)	ウェル判定	試料液判定	
5	0.055	-	陽性*	0	-	陰性*	DNA抽出再操作
		-	陰性*		-	陰性*	
		+	陰性*		-	陰性*	
7	0	-	陰性*	0.037	-	陽性*	DNA抽出再操作
		-	陰性*		-	陰性	
		-	陰性*		-	陰性	
8	0	-	陰性*	0.070	+	陰性	DNA抽出再操作
		-	陰性*		-	陽性*	
		-	陰性*		-	陽性*	
10	0.030	-	陰性*	0	-	陰性*	DNA抽出再操作
		+	陽性		-	陰性*	
		+	陽性		-	陰性*	

※1回目でPCR再操作にならなかった試料液の結果

DNA抽出再操作となった場合

表5 ダイズ穀粒の混入率別の検体数(令和2年度～令和4年度)

年度	混入率			計
	0%	0.01%～0.1%	0.1%以上	
R2	17	3	1	21
R3	11	6	1	18
R4	7	6	1	14
計	35	15	3	53

## 文 献

- 1) 高畠令玉奈, 江木智宏, 曾我慶介, 峰岸恭孝, 成島純平, 吉場聡子, 柴田識人, 中村公亮, 近藤一成, 岸根雅宏, 真野潤一, 橘田和美: 改正食品表示基準に対応した遺伝子組換えダイズ混入の判定に係る定性PCR検査法の開発, 第117回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, 33, 2021
- 2) 細川葵, 菅野陽平: 新規遺伝子組換え大豆検査の導入に関する検討, 第59回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 94-95, 2022
- 3) 内閣府: 第65回食品表示部会 議事録, 29-41  
[https://www.cao.go.jp/consumer/history/07/kabusoshiki/syokuhinhyouji/doc/211223\\_gijiroku2.pdf](https://www.cao.go.jp/consumer/history/07/kabusoshiki/syokuhinhyouji/doc/211223_gijiroku2.pdf) (2023.12.6アクセス)