

豆腐原料大豆の定量検査及び味噌の定性検査について

小林 淑子 松渕亜希子

平成16年1月から平成17年3月にかけて、県内の豆腐製造施設及びスーパーマーケット等で入手した豆腐の原料輸入大豆7検体、調合味噌2検体及び県内産味噌22検体について遺伝子組換え検査を実施した。豆腐原料大豆の遺伝子組換え体の混入率は0.1～0.4%とかなり低いレベルにあることがわかった。味噌の定性試験の結果、検査不能の1検体を除く23検体には遺伝子組換え体は検出されなかった。大豆穀粒のDNA抽出方法として、イオン交換樹脂法とシリカゲル膜法について関連をみたところ、2法は良好な相関（ $p < 0.05$ ）が見られた。

キーワード：遺伝子組換え体、輸入原料大豆、味噌、DNA抽出法、定性PCR法、定量PCR法

I はじめに

遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物が一般的に流通するようになり、厚生労働省では平成13年から安全性の審査や表示の義務^{1, 2)}を設けている。

遺伝子組換え（以下GMと略す）作物は生産者側の利便性が強調される一方で、健康³⁾や環境⁴⁾に対する不安材料も多い。そのため、消費者側から抵抗なく受け入れられていないのが現状である。そこで、県内の市場に巡回している豆腐類について遺伝子組換え体（以下GMOと略す）の定性試験を実施したところ、ほとんどの豆腐製品にGMOが検出されることがわかった。これについては前報で報告した。これを受け、豆腐製造業者の輸入原料大豆についてGMO定量試験を、また県内で販売されている味噌のGMO定性検査を実施した。併せて大豆穀粒からのDNA抽出法についての検討を行ったので報告する。

II 材料及び実験方法

1. 材料：

県内の味噌製造施設及びスーパーマーケット等で平成16年1月～平成17年3月にかけて入手した豆腐の輸入原料大豆7検体、県内産コメ味噌22検体ならびに県外産調合味噌2検体（からし味噌、味噌漬け用味噌）を検査に供した。これらの検体の中で、市販の味噌については原料にGM農作物を使用した旨の表示はなかった。

DNA抽出法の検討を行った輸入大豆11検体は、行政検査で用いたものを検査に供した。

2. 検査対象GMO

定性試験及び定量試験ともにラウンドアップレディ遺伝子（以下RRSと略す）を対象とした。

3. 検査方法

厚生労働省の通知⁵⁾及び「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」に準じた。

4. 試薬

プライマー及びプローブは厚生労働省の通知に記載のあるものを使用した。定性及び定量試験に使用するレクチン遺伝子用プライマー（Lel02-5'とLel02-3'）及びプローブ（Lel-Taq）のセット、組換え遺伝子用のプライマー（RRS01-5'とRRS01-3'）及びプローブ（RRS-Taq）のセット、定性試験の陽性対照に用いるRRS陽性コントロールプラスミド及び定量試験の検量線作成に使用するダイズ用のGMダイズプラスミドセット、100bpラダーマーカー及びローディング緩衝液はニッポンジーン㈱製を用いた。Universal PCR Master Mix、DNAポリメラーゼはアプライドバイオシステムスジャパン㈱製のAmpli Taq Gold™ DNA Polymeraseを、dNTP、10×PCR緩衝液Ⅱ及び塩化マグネシウムは付属のものをを用いた。アガロースは宝酒造㈱製のL03「TAKARA」を用いた。DNAの抽出キットはキアゲン社製のGenomic-tip20/GとDNeasy Plant Maxi Kitを用いた。これらのキットに使用する緩衝液はキットに付属したもの又はキットの説明書に従って調製したものを用いた。エチルアルコール（特級）、EDTA-2Na、MOPS、2-プロパノール、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、グアニジン塩酸塩、TE（pH8.0、遺伝子工学用）、5×TBE（遺伝子工学用）、Tween20及びTritonX-100は和光純薬工業㈱製を用いた。

5. 装置

インキュベーター：ヤマト科学恒温水槽BK500、遠心機：日立高速冷却遠心機CR-20形、クボタテーブルトップ遠心機5420、シグマ社製マイクロ冷却遠心機1-15K、

分光光度計：ナノドロップ ND-1000、遺伝子定量装置：ABI PRIMS 7000、遺伝子増幅装置：アステック PC-700、電気泳動装置：ミュービッド α 、粉碎器：(株)レッチェ製ミキサーミル MN301、オスターブレンダー OB-1

6. DNA溶液の調製

1) 試料の前処理

- (1) 大豆穀粒：大豆500 g、約2000粒を小型粉碎器のオスターブレンダーで粉末状にした後、プラスチック製の袋に取り、袋の中でよく混和した。その中から粉末を金属製のセルに移し、金属ボールの振とうによって微細粉末としたものを抽出に供した。
- (2) 味噌：味噌を乳鉢に採り試料重量と同重量の滅菌水を加え、乳棒でよく混和し、均質な状態になったものを抽出に供した。試料の前処理に使用する機材は、すべて塩素系の洗浄剤に浸漬し、DNAフリーにした後乾燥したものを使用した。

2) DNAの抽出

- (1) 大豆穀粒
前項で調製した試料 1 g を用い、キアゲン社の DNeasy Plant Maxi kit を用いて DNA 溶液を調製した。
- (2) 味噌及び大豆穀粒
前項で調製した試料 1 g (味噌は0.5 g に相当) を用いてキアゲン社の Genomic-tip20/G を用いて、DNA 溶液を調製した。

3) 抽出DNAの濃度及び純度の確認

抽出したDNA溶液 2 μ l を用いて分光光度計で、DNAの濃度を測定した。純度の指標として O.D.260/O.D.230及び O.D.260/O.D.280を算出した。また、大豆穀粒は定量PCR用に20ng/ μ l、味噌は定性PCR用に10ng/ μ lになるようにTEで希釈し、検査まで -20°C で保存した。

7. 組換えDNAの検出

厚生労働省で定める方法⁵⁾にしたがった。以下にその概要を示した。

1) ダイズ穀粒の定量試験

(1) PCR 反応液の調製

Universal PCR Master Mix にプライマー対とプローブを加えたマスターミックスを、大豆内在性遺伝子レクチン用とRRS遺伝子用の2種あらかじめ調製した。この時プライマー対とプローブの混合溶液と Universal PCR Master Mix の比率は 1 : 1.25となるようにした。マスターミックスの調製液量は余剰分を考慮し、1 DNA試料液 (3 ウェル分) 当たり81 μ l とした。混合時にミキサーを用いて十分に攪拌し、攪拌後軽く遠心した。次いでマスターミックスを必要数のマイクロチューブに78.75 μ l (3 ウェル分) ずつ分

注した。分注後、各マイクロチューブに対応するDNA溶液を8.75 μ l 加え (マスターミックスとDNA溶液の比率を 9 : 1 にした)、ミキサーを用いて十分に混合した後、軽く遠心した。このようにして調製した混合溶液を25 μ l/well として96ウェルプレート上のウェルに分注した (25 μ l/well のPCR 反応液は、Universal PCR Master Mix 12.5 μ l、プライマー (25 μ mol/L) 及びプローブ (10 μ mol/L) 溶液各0.5 μ l、滅菌蒸留水 9 μ l 及び50ng のDNA試料を含有している)。また、検量線用標準プラスミドDNA溶液についても同様に操作してPCR 反応液を調製した。分注操作終了後、真上からシールし、完全にウェルを密閉した。終わりに、ウェルの底を観察し、気泡のないことを確認後 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad を茶色の面が上になるようにセットした。

(2) 定量PCR条件と混入率の算出

装置に反応プレートをセットし、 50°C 2分の条件で保持した後、 95°C で10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、 95°C 30秒、 59°C 1分を1サイクルとし、40サイクルの増幅反応を行い、測定結果の解析をした。RRS 遺伝子の増幅曲線が得られないものを不検出とし、大豆穀粒のGMO混入率は [RRS 遺伝子のコピー数/内在性遺伝子レクチンのコピー数 $\times$ 1/0.95 (測定機器特有の内標比)] $\times$ 100 から算出した。定量限界は0.1%とした。

2) 味噌の定性試験

(1) PCR 反応液の調製

PCR 反応液は反応終濃度が 1 $\times$ PCR 緩衝液、0.2mmol/L dNTP、3 mmol/L MgCl₂、0.2 μ mol/L プライマー、0.625U. Taq DNA ポリメラーゼ及び 1 ng/ μ l 鋳型DNAになるように調製し、全量を25 μ l とした。その後ミネラルオイルを1滴層積し遺伝子増幅装置にセットした。

(2) 定性PCR条件

装置のヒートブロックとの密着性を良くするため、ミネラルオイルを滴下し、マイクロチューブをセットした。その後、 95°C に10分保った後、 95°C 30秒、 60°C 30秒、 72°C 30秒を1サイクルとして40サイクルの増幅反応を行った後、 72°C で7分間伸長反応させた後、 4°C で冷却保存した。

(3) 電気泳動

PCR 反応液の 5 μ l を 4 % アガロースゲルにより TBA 緩衝液³⁾ 中で100V の定電圧で電気泳動した。ゲルローディング緩衝液中の BTB が、1/2から2/3になったところで泳動を終了とした。次に、ゲルをTBA 緩衝液にエチジウムブロマイド溶液を加えた容器に15分間浸して染色した。その後、UV 照射装置上で、大

豆内在性遺伝子レクチンの118bpの増幅産物を確認後、写真撮影した。同様に RRS 遺伝子の121bpの増幅産物を確認したものを陽性とした。

Ⅲ 結 果

1. 抽出DNA

大豆穀粒の粉碎試料1gから得られたDNA量を表1に、味噌0.5gから得られたDNA量を表2に示した。大豆穀粒はすべて20μg以上得られた。しかし、味噌はNo.10の試料が15.1μgを示したものの、ほとんどが3μg前後と少量であった。最も少ないものは1.2μgであった。

2. 大豆穀粒のGMO混入率

表1 大豆穀粒の抽出DNA量

試料No.	μg	260/230	260/280
1	50.8	1.3	1.7
2	50.0	1.2	1.7
3	41.4	1.5	1.7
4	48.0	1.6	1.7
5	45.1	1.3	1.7
6	37.2	1.4	1.7
7	21.0	1.8	1.8

表2 味噌の抽出DNA量

試料No.	μg	260/230	260/280
1	2.0	4.1	1.8
2	4.3	1.7	1.9
3	3.1	1.8	2.0
4	2.7	1.0	1.7
5	3.1	1.5	1.9
6	5.1	1.9	1.9
7	4.3	1.3	1.7
8	3.7	1.3	1.8
9	2.6	2.2	1.9
10	15.1	2.1	1.9
11	3.6	2.1	1.9
12	4.1	1.6	1.8
13	2.1	1.3	1.7
14	1.2	1.9	1.9
15	3.5	1.5	1.9
16	1.8	2.1	2.0
17	2.8	2.4	1.9
18	1.8	1.9	1.7
19*	1.2	0.8	1.7
20	1.7	2.4	1.9
21	1.3	1.8	2.0
22*	9.3	2.0	1.9
23×	5.0	1.9	1.9
24	1.2	1.1	1.8

* 調合味噌

× 検査不能

表3 大豆穀粒定量結果

試料 No.	大豆名	定量値%
1	トップビーン	0.4
2	ランドマーク	0.1
3	ファイブスター	0.1
4	ビントン81	不検出
5	オーバーサイズ	0.4
6	ビントン81	不検出
7	中国大豆	不検出

定量限界 0.1%

大豆穀粒の定量結果を表3に示した。今回の大豆試料はすべて分別生産流通管理（Identity Preserved Handling:IP ハンドリング）されたものであった。混入率は最高値で米国産のトップビーンの0.4%と、かなり低いレベルにあることがわかった。また、中国産大豆と米国産のビントン81はGMOを含んでいなかった。

3. 大豆穀粒におけるDNA抽出法の比較

食品衛生法における大豆穀粒の公定法であったシリカゲル膜法が、平成15年11月の改正によって適用できなくなった。そこで、シリカゲル膜法（DNeasy Plant Maxi kit）とイオン交換樹脂法（Genomic-tip 20/G）を比較検討した。その結果を図1に示したが、大豆穀粒においては、2法は良好な相関が見られた（ $p < 0.05$ ）。

4. 味噌からのRRSの検知

図2に大豆内在性遺伝子レクチンの増幅産物の一部を示した。24検体の味噌試料（表2）のうち、大豆内在性のレクチン遺伝子は23検体から検知された。しかし、No.23の試料からはレクチン遺伝子（118bp）が検出されず、検査不能であった。レクチン遺伝子の検出された味噌試料23検体すべてにおいてRRSは検出されなかった。

図1 DNA抽出法の比較

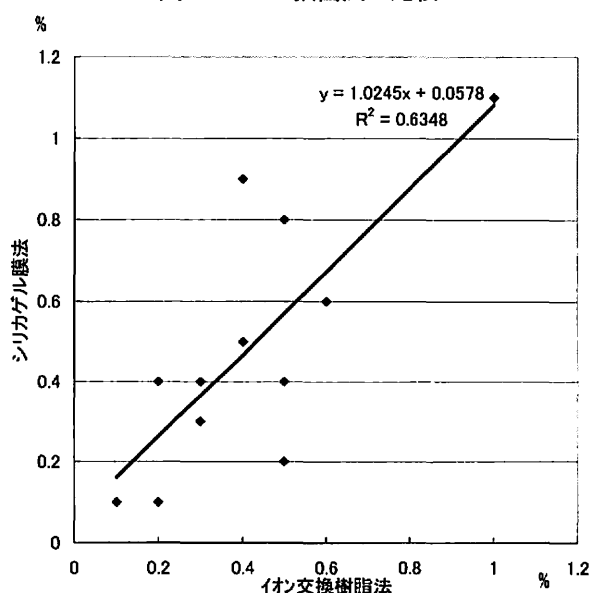
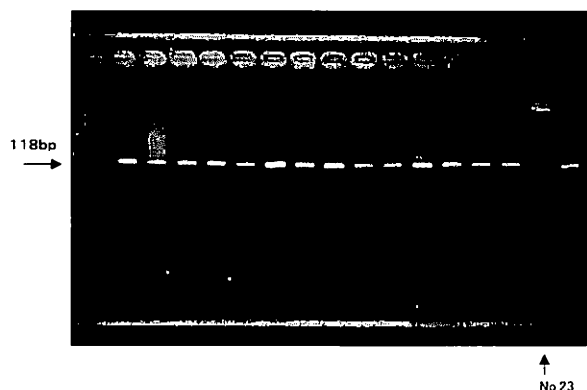


図2 味噌の大豆内在性遺伝子レクチンの増幅産物



IV 考 察

GM大豆は米国を中心に栽培され、年々栽培する国も面積も拡大している。このような状況下、国内消費大豆のほとんどを輸入に依存している我が国においては、GM Oの流通が今後益々増加することが予想される。

その一方で、安全性が確認されているにもかかわらず、豆腐、納豆及び味噌といった日常消費する食品に対してはGM Oに根強い抵抗感があり、消費者は食品表示によって非GM食品を選択する傾向が強い⁷⁾。

平成14年度の豆腐の定性試験の結果、ほとんどの豆腐類からGM Oが検出されることがわかった。その原因として、同一施設内で国内産大豆と輸入大豆を共に原料として豆腐の製造を行っていること、さらにその生産ラインが同じであることから、意図せざる混入の可能性が高いことが推察された。また、PCR検査法は痕跡程度のGM Oでも増幅するため、高感度な定性検査では極少量の混入であっても陽性になることがわかった^{3), 9)}。

そこで、輸入大豆穀粒のGM Oの混入率を検査した。中国産や米国産の一部に不検出のものもあったが、混入の程度は低く、意図せざる混入の範囲内であり、これらの混入率は我々が既に実施した行政検査や門間ら⁵⁾の報告と類似していた。現時点では、IPハンドリングは良好に働いていることがあらためて確認された。

本調査では、大豆穀粒のDNAの抽出にキアゲン社のDNeasy Plant Maxi kit (シリカゲル膜タイプキット法)を用いたが、従来使用されていた^{13), 14)} DNeasy Plant Mini kitが、大豆穀粒からのDNA抽出法として、食品衛生法から削除になった。そこで、大豆穀粒に、加熱等によって断片化したDNAの抽出に適しているといわれるイオン交換樹脂法とJAS法に適用されているMaxi kit (シリカゲル膜タイプキット法)を比較検討した。大豆穀粒について2つの方法は良好な相関 ($p < 0.05$)を示したが、いずれもJAS法による方法であり、食品衛生法には掲載されていない。食品衛生法では大豆穀粒

の定量に、CTAB法の他にシリカベースのレジソタイプのもの等市販の抽出キットの利用を認めている。しかし、CTAB法は操作の煩雑さのみならず使用試薬による環境負荷もあることから、今後、簡便で高精度なこの2法の食品衛生法への適用を期待したい。

GM Oの表示に関しては意図せざる混入を考慮して、国によって閾値が異なる。EUでは0.9%、オーストラリアやニュージーランドでは1%、韓国では3%以上の場合に表示が義務づけられている。平成14年度に秋田県で実施した行政検査、他の自治体で実施されている収去検査等の報告^{12), 15)}及び本調査の結果から考慮すると、現在の5%という閾値は高すぎるように考えられる。今後、この混入率がどのように推移していくのか不明であるが、閾値の低減化が望まれる。

また、混入率5%までは任意表示になっており、「GM Oは使用していない」旨の表記が出来る。しかし、消費者の立場では、この表示では全く検出しないものと受け取られ、信頼性を欠く原因になっている。EUで実施されているように全くGM Oを含まないもののみに、この表示を適用した方が消費者の理解が得られるものと考え。意図せざる混入といえども混入していることに変わりはない。

今回、中国産大豆からはGM Oは検出されなかった。鈴木ら¹⁶⁾の報告でも中国産大豆からはGM Oを検出してない。現在のところ、米国、カナダではGM Oの商業栽培は完成されているが、中国、パラグアイ、ブラジル等は、この技術導入による農作物の収穫はこれからの問題と推察された¹⁵⁾。また、米国産のピンソン81という種類からはGM Oは検出されなかった。輸入米国産大豆にはGM Oが全く混入していないものもあり、完全なIPハンドリングも可能なのではないのだろうか。

GM食品の検査は、抽出したDNAの精製度がブレイクスルーポイントになる。今回の調査においては、特に味噌からのDNAの抽出法に問題が残った。味噌の場合、DNA由来のO.D.260の吸光度が0.5以上¹⁶⁾になるように、最終液量を少なくしたが、DNAの濃度はこれまで実施した豆腐類や大豆穀粒に比べ低かった。精製度の指標であるO.D.260/O.D.280の値はすべて1.7~2.0の範囲におさまっていたが、夾雑物の指標であるO.D.260/O.D.230が2.0以上を示したものは24検体中8検体と少なく、PCR反応がうまくいかないことがあらかじめ予想された。また、吸光スペクトル上では、十分な精製と量が抽出されているように見られるにもかかわらず、定性PCR反応において大豆内在性遺伝子のレクチンを検出することができず、検査不能になるものがあった。

一方、大豆穀粒はO.D.260/O.D.230が2以上を示すものがなく、糖やタンパク等の影響によって、PCR反

応がうまく進行しないことが懸念されたが、大豆内在性遺伝子のレクチンのコピー数はいずれも40,000以上になり、RRSを検出するのに十分であった。

味噌は原料に「GMOを用いていない」という表示等のあるものは、24検体中7検体のみと表示による情報が少なかった。また、分析の結果、GMOは全く検出されず、豆腐類とは異なる結果となった。DNAの抽出に関しても豆腐類のように高濃度に精製することが出来なかった。その原因として、豆腐類に比べ高濃度に含まれる塩化ナトリウム等が、抽出時に用いる各種酵素の活性を阻害すること、加熱のみならず発酵過程を経ていること¹⁾、さらに発酵期間も製造所によって異なる等、製造所毎に独自の製造ノウハウが有り、それが影響していることも考えられた。味噌や納豆のような加工品については使用するプライマー等にも課題が残っている。

味噌製造業者は醤油製造業を兼ねているものも多く、醤油の原料には、GMO脱脂ダイズが使用される場合が多いこともよく知られている。原材料の段階での混入が推測され、GMOの検出を予想したが、今回はすべて不検出であった。この結果が豆腐に比べ製品単価が高いことから原料に割高な国産大豆を使用していることによるものなのか、あるいは全く分析上の問題でGMOを検出できなかったのか、現段階での断言は難しい。また、今後は加工品から原料のGMO混入率を推測する方法¹⁸⁾も期待され、これらについてはこれからの検討課題としている。

大豆の外国産に対する依存度は高く、今後原材料の高騰等によって大豆加工品はどのような影響を受けるのか先行き不明である。さらなる追跡調査や監視体制の構築が必要なものと考察された。

V ま と め

県内で製造されている豆腐の輸入原料大豆のGMO混入率は低く、意図せざる混入の範囲内にあることがわかった。味噌試料からはGMOが検出されなかったが、検査不能になるものがあり、豆腐以外大豆加工食品のDNA抽出法に課題を残した。

JAS法に適用されているシリカゲル膜法とイオン交換樹脂法は、大豆穀粒のDNA抽出において良い相関が得られた。

文 献

- 1) 厚生省告示第232号(2000)“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(2000)“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) 伊藤啓志男, 第6回食品化学シンポジウム遺伝子組換え食品の現状と課題, FFI JOURNAL, 1998; 174: 115-129
- 4) 玉置雅紀, 遺伝子組換え生物の取り扱いに関する現状, 国立環境研究所ニュース, 2003; 22(3): 7-8
- 5) 厚生労働省医薬品食品保健部長通知食発第110号(2001)“組換えDNA技術応用食品の検査方法についての一部改正”平成13年3月27日
- 6) 中山広樹, 他, バイオイラストレイテッド②遺伝子解析の基礎, 東京: 榊潤社, 2001; 51-60
- 7) 西浦博, 他, 遺伝子組換え食品の受容性と安全性評価の現状と動向, 日本公衛誌, 2002; 49(11): 1135-1141.
- 8) 松岡猛, 他, ダイズ及びダイズ加工食品からの組換え遺伝子の検知法(第1報), 食衛誌, 1999; 40(2): 149-157.
- 9) 笹尾忠由, 他, 遺伝子組換え食品の検査法検討, 横浜衛研年報, 2002 41: 59-62.
- 10) 曾根美千代, 他, 遺伝子組換え食品検知法の検討, 宮城県保健環境センター年報, 2003 第21号: 70-74.
- 11) 大森清美, 他, 遺伝子組換え食品の分析結果(平成14年度), 神奈川県衛生研究所研究報告, 2003 No.33 111-113.
- 12) 門間公夫, 他, 食品からの遺伝子組換え体の検知状況, 食衛誌, 2004; 45(4): 184-190.
- 13) 小川美緒, 他, 遺伝子組換え農産物の食品原材料とその加工品実態調査, 鳥取県衛生環境研究所報, 2004; 44: 42-45.
- 14) 鈴木智宏, 他, 輸入ダイズ穀粒における遺伝子組換え体の混入率及びトウモロコシ加工品中のCBH351遺伝子の有無について, 道衛研所報, 2004; 54: 93-95.
- 15) 高橋邦彦, 他, 遺伝子組換え食品の調査結果について(第2報), 埼衛研所報, 2004 第38号: 152-154.
- 16) 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 理化学編, 2005 p314.
- 17) 門間公夫, 他, 大豆加工品からの組換え遺伝子検知法の検討, 東京健安研年報, 2003; 54: 136-141.
- 18) Kimio, M. et al. Detection of genetically modified organisms in foreign-made processed foods containing corn and potato. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), 2005; 46(3): 79-85