

安全性審査済の遺伝子組換え食品の検査法の 標準化

平成29年3月

消費者庁

本報告書は、消費者庁の委託を受け、国立医薬品食品衛生研究所が調査を行い取りまとめたものである。

I 高度加工食品からの DNA 検出の検討

1 目的

我が国においては、安全性審査済み遺伝子組換え (GM) 食品の中で、しょうゆ、コーンフレーク、デキストリン、液糖、植物油 (大豆油、コーン油、なたね油及び綿実油)、てん菜を主な原料とする砂糖及び水飴 (本研究ではこれらを総称して「高度加工食品」と呼ぶ。) は GM 表示不要の品目となっている¹⁾。これらが GM 表示不要となった背景は、平成 11 年 7 月に発表された「遺伝子組換え食品部会における技術的検討のための小委員会報告 (平成 11 年報告)」にある²⁾。つまり、平成 11 年報告では、これらの高度加工食品から DNA の検出ができなかったためである。平成 11 年報告において、加工食品試料からの DNA 抽出には CTAB 法 (DNA の検出には通常の PCR により増幅した断片をアガロースゲル電気泳動にて分析する方法) が用いられていた。しかし、近年主流となっている DNA 精製キットやリアルタイム PCR を用いることにより、当時 GM 表示不要と判断された高度加工食品から DNA 検出できる可能性が考えられた。そこで本研究では、GM 食品の検査に使用されている DNA 精製キットを用い、リアルタイム PCR による高度加工食品からの DNA 検出を試みた。

2 実験方法

2-1 試料

しょうゆ 20 製品 (表 1) はしょうゆ情報センターを通して入手した。コーンフレーク 5 製品 (表 2)、デキストリン 6 製品 (表 3)、液糖 4 製品 (表 4)、穀物酢 3 製品 (表 5)、植物油 16 製品 (表 6)、てん菜糖 8 製品 (表 7)、水飴 7 製品 (表 8) はスーパーマーケット又はインターネットを通して入手した。

2-2 試料の前処理

しょうゆは 3 製品 (S01、S11、S27) に対し、遠心式限外濾過ユニットによる濃縮 (10 倍又は 25 倍) を行い、前処理試料とした。コーンフレークは全試料に対し、超純水で数回洗うことでコーティングされた糖類やチョコレートを取り除いた後、十分に乾燥させた。穀物酢は全試料に対し、5 mol/L 水酸化ナトリウムを加えて pH7~8 になるようにした。植物油は全試料に対し試料 20 mL、抽出バッファー (Genomic-tip : G2 緩衝液、DNeasy Plant Maxi Kit : AP1 緩衝液) 10 mL、n-ヘキサン 10 mL を、50 mL チューブ中で 65°C、30 分間震とうし、遠心分離後、抽出バッファー層を回収した。更に、クロロホルム 5 mL とよく混合し、遠心分離後、回収した抽出バッファー層を前処理試料とした。

2-3 試料の粉碎

コーンフレーク試料はフードミキサー (IFM-720GYMILLSER、iwatani 社) を使用し、30 秒間粉碎した。

2-4 DNA 抽出 (しょうゆ、液糖)

前処理をしていないしょうゆ試料は、Genomic-tip 100/G (QIAGEN)、GM quicker 4 (ニ

ッポンジーン)、DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN)、Quick Gene SP kit (KURABO) 及び Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI (ジューエルサイエンス) を用いて DNA 抽出を行った。Genomic-tip 100/G 及び GM quicker 4 では 20 製品全て、DNeasy Plant Maxi Kit、Quick Gene SP kit 及び Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI では 6 製品 (S01、S11、S27、S30、S33、S34) から DNA 抽出を行った。前処理をしたしょうゆ試料は、3 製品とも Genomic-tip 100/G 及び GM quicker 4 を用いて DNA 抽出を行った。ただし、Genomic-tip 100/G については S11 のみ 25 倍濃縮試料から DNA 抽出を行った。液糖試料は、4 製品とも Genomic-tip 100/G、GM quicker 4 及び DNeasy Plant Maxi Kit を用いて DNA 抽出を行った。また、E01 及び E04 においては、Genomic-tip 100/G を用いてスケールアップした DNA 抽出も行った。各試料につき 2 併行で抽出操作を行った。

2-4-1 Genomic-tip 100/G

試料 4 mL (液糖試料は 4 g) に G2 緩衝液 30 mL、Proteinase K 200 μ L、及び RNase A 20 μ L を加えてよく転倒混和させ、50°C で 1 時間加温した (15 分ごとにボルテックスミキサーで混合した)。遠心分離し (8,000 \times g、4°C、15 分間)、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL で平衡させておいた Genomic-tip 100/G に上清を負荷した。その後、QC 緩衝液 7.5 mL を負荷し、カラムを洗浄した。この洗浄作業は 3 回行った。50°C に温めておいた QF 緩衝液を 1 mL 負荷し、溶出液を廃棄した。その後、更に QF 緩衝液 2 mL を加え DNA を溶出した。溶出液にイソプロパノール 2 mL (一部のしょうゆ試料及び液糖試料には更に 20 mg/mL グリコーゲン溶液 4 μ L) を加え、よく混合し室温で 5 分間静置した後、1.5 mL 容チューブに 1 mL ずつ分注し、遠心分離した (12,000 \times g、4°C、15 分間)。上清を捨て、70%エタノールを各チューブ 1 mL 加え、更に遠心分離した (12,000 \times g、4°C、3 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた。チューブ 4 本分の沈殿を、50°C に温めておいた TE 緩衝液 50 μ L に溶解し、DNA 試料液とした。

液糖試料のスケールアップした DNA 抽出では、試料 30 g に TE 緩衝液を総量 100 mL になるように加え、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL で平衡させておいた Genomic-tip 100/G に全量を負荷した。その後の操作は上述と同様に行った。

2-4-2 GM quicker 4

試料 1 mL (液糖試料は 1 g) に、1 mL の GE1 Buffer、10 μ L の RNase A、20 μ L の Proteinase K を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、65°C で 30 分間加温した (10 分ごとにボルテックスミキサーで混合した)。200 μ L の GE2-M Buffer を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、遠心分離した (4,000 \times g、4°C、10 分間)。上清に 0.75 倍量の GB3 Buffer を添加し、10 回転倒混和した後、混合液を Spin Column に 700 μ L 移し、遠心した (10,000 \times g、4°C、1 分間)。混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。600 μ L の GW Buffer を Spin Column に添加し、遠心した (10,000 \times g、4°C、1 分間)。Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、50 μ L の TE 緩衝液をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置した。その後遠心し (10,000 \times g、4°C、1 分間)、ろ液を DNA 試料液とした。

2-4-3 DNeasy Plant Maxi Kit

試料 1 mL (液糖試料は 1 g) にあらかじめ 65°C に温めておいた AP 緩衝液 5 mL と RNase A 10 µL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで混合し、65°C で 1 時間加温した (15 分ごとに転倒混和した。)。P3 緩衝液 1.8 mL を加えボルテックスミキサーで混合し、氷上に 15 分間静置した後、遠心分離した (8,000 ×g、室温、15 分間)。次いでその上清全量を QIAshredder spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (2,300 ×g、室温、5 分間)。溶出液に 1.5 倍量の AW1 緩衝液を加えボルテックスミキサーで混合した後、DNeasy spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (2,300 ×g、室温、5 分間)。最終的に混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。次いで AW2 緩衝液 12 mL を負荷し、遠心することで (2,300 ×g、室温、15 分間) カラムを洗浄した。あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌水 1 mL を加え、5 分間静置した後、遠心し (2,300 ×g、室温、10 分間)、DNA を溶出した。溶出液と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置した。遠心分離 (12,000 ×g、4°C、15 分間) 後、上清を捨て 70%エタノールを 500 µL 加え、更に遠心分離した (12,000 ×g、4°C、3 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた沈殿を TE 緩衝液 50 µL に溶解させ、DNA 試料液とした。

2-4-4 Quick Gene SP kit

1.5 mL 容チューブに、ヌクレアーゼフリー水で溶解した EDB 30 µL、試料 200 µL、LDB 250 µL を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、56°C で 2 分間加温した。エタノール 250 µL を添加し、ボルテックスミキサーで混合し、これをライセートとした。カートリッジにライセートの全量を添加し、遠心した (6,000 ×g、室温、1 分間)。カートリッジに WDB を 750 µL 添加し、遠心した (6,000 ×g、室温、1 分間)。この作業は 2 回行った。カートリッジを新しい 1.5 mL 容チューブに移し、200 µL の CDB を滴下した後、遠心し (6,000 ×g、室温、1 分間)、ろ液を DNA 試料液とした。

2-4-5 Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI

試料 0.16 mL に、1.6 mL の Buffer A11、8 µL の Proteinase K を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、65°C で 10 分間加温した (2 分ごとにボルテックスミキサーで混合した。)。Buffer A11 を 240 µL 添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、遠心分離した (7,500 ×g、室温、10 分間)。更に全ての上清を 2 mL 容チューブに移し、遠心分離 (16,400 ×g、室温、10 分間) 後、全ての上清を 5 mL 容チューブに移した。上清の 0.45 倍量の Buffer C11 を添加し、10 回転倒混和した後、混合液をスピнкаラムに 1 mL 移して遠心した (20,000 ×g、室温、30 秒間)。混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。500 µL の Buffer D11 をスピнкаラムに添加し、遠心した (20,000 ×g、室温、30 秒間)。55 µL の Buffer E11 を 27.5 µL ずつスピнкаラムに添加し、2 回に分けて遠心し (6,000 ×g、室温、1 分間)、ろ液を DNA 試料液とした。

2-5 DNA 抽出 (コーンフレーク、デキストリン)

コーンフレーク及びデキストリン試料全てにおいて、全製品とも Genomic-tip 100/G、

GM quicker 4 及び DNeasy Plant Maxi Kit を用いて DNA 抽出を行った。各試料につき 2 併行で抽出操作を行った。

2-5-1 Genomic-tip 100/G

試料 1 g に G2 緩衝液 37.5 mL、Proteinase K 50 μ L、及び RNase A 5 μ L を加えてよく転倒混和させ、50°C で 1 時間加温した (15 分ごとにボルテックスミキサーで混合した。)。遠心分離し (8,000 \times g、4°C、15 分間)、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL で平衡させておいた Genomic-tip 100/G に上清を負荷した。その後、QC 緩衝液 7.5 mL を負荷し、カラムを洗浄した。この洗浄作業は 3 回行った。50°C に温めておいた QF 緩衝液を 1 mL 負荷し、溶出液を廃棄した。その後、更に QF 緩衝液 2 mL を加え DNA を溶出した。溶出液にイソプロパノール 2 mL、グリコーゲン溶液を 4 μ L 加え、よく混合し室温で 5 分間静置した後、1.5 mL 容チューブに 1 mL ずつ分注し、遠心分離した (12,000 \times g、4°C、15 分間)。上清を捨て、70%エタノールを各チューブ 1 mL 加え、更に遠心分離した (12,000 \times g、4°C、3 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた。チューブ 4 本分の沈殿を、50°C に温めておいた TE 緩衝液 50 μ L に溶解し、DNA 試料液とした。

2-5-2 GM quicker 4

試料 1 g に、4 mL の GE1 Buffer、10 μ L の RNase A、20 μ L の Proteinase K を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、65°C で 30 分間加温した (10 分ごとにボルテックスミキサーで混合した。)。400 μ L の GE2-M Buffer を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、遠心分離した (4,000 \times g、4°C、10 分間)。上清に 0.75 倍の GB3 Buffer を添加し、10 回転倒混和した後、混合液を Spin Column に 700 μ L 移し、遠心した (10,000 \times g、4°C、1 分間)。混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。600 μ L の GW Buffer を Spin Column に添加し、遠心した (10,000 \times g、4°C、1 分間)。Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、50 μ L の TE 緩衝液をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置した。遠心分離し (10,000 \times g、4°C、1 分間)、ろ液を DNA 試料液とした。

2-5-3 DNeasy Plant Maxi Kit

試料 1 g にあらかじめ 65°C に温めておいた AP 緩衝液 5 mL と RNase A 10 μ L を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで混合し、65°C で 1 時間加温した (15 分ごとに転倒混和した。)。P3 緩衝液 1.8 mL を加えボルテックスミキサーで混合し、氷上に 15 分間静置した後、遠心分離した (8,000 \times g、室温、15 分間)。次いでその上清全量を QIAshredder spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (2,300 \times g、室温、5 分間)。溶出液に 1.5 倍の量の AW1 緩衝液を加えボルテックスミキサーで混合した後、DNeasy spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (2,300 \times g、室温、5 分間)。最終的に混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。次いで AW2 緩衝液 12 mL を負荷し、遠心することで (2,300 \times g、室温、15 分間) カラムを洗浄した。あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌水 1 mL を加え、5 分間静置した後、遠心し (2,300 \times g、室温、10 分間)、DNA を溶出した。溶出液の 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム、溶出液

と酢酸ナトリウムの合計量と等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、5 分間室温で静置した。遠心分離 (12,000 ×g、4°C、15 分間) 後、上清を捨て 70%エタノールを 500 μL 加え、更に遠心分離した (12,000 ×g、4°C、3 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた沈殿を TE 緩衝液 50 μL に溶解させ、DNA 試料液とした。溶解しなかった試料は 60°C に加温し、溶解させて DNA 試料液とした。

2-6 DNA 抽出 (穀物酢)

穀物酢全製品とも Genomic-tip 100/G、GM quicker 4 及び DNeasy Plant Maxi Kit を用いて DNA 抽出を行った。各試料につき 2 併行で抽出操作を行った。

2-6-1 Genomic-tip 100/G

前処理をしていない試料 2 mL に G2 緩衝液 45 mL、Proteinase K 50 μL、及び RNase A 5 μL を加えてよく転倒混和させ、50°C で 1 時間加温した (15 分ごとにボルテックスミキサーで混合した。)。遠心分離し (5,000 ×g、4°C、15 分間)、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL で平衡させておいた Genomic-tip 100/G に上清を負荷した。その後、QC 緩衝液 7.5 mL を負荷し、カラムを洗浄した。この洗浄作業は 3 回行った。50°C に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を加え DNA を溶出した。溶出液にイソプロパノール 2 mL、グリコーゲン溶液を 4 μL 加え、よく混合した後、1.5 mL 容チューブに 1 mL ずつ分注し、遠心分離した (12,000 ×g、4°C、15 分間)。上清を捨て、70%エタノールを各チューブ 1 mL 加え、更に遠心分離した (12,000 ×g、4°C、3 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた。チューブ 4 本分の沈殿を、50°C に温めておいた TE 緩衝液 50 μL に溶解し、DNA 試料液とした。

2-6-2 GM quicker 4

前処理を行った試料 1 mL に、4 mL の GE1 Buffer、10 μL の RNase A、20 μL の Proteinase K を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、65°C で 30 分間加温した (10 分ごとにボルテックスミキサーで混合した。)。400 μL の GE2-M Buffer を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、遠心分離した (4,000 ×g、4°C、10 分間)。上清に 0.75 倍の GB3 Buffer を添加し、10 回転倒混和した後、混合液を Spin Column に 700 μL 移し、遠心した (10,000 ×g、4°C、1 分間)。混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。600 μL の GW Buffer を Spin Column に添加し、遠心した (10,000 ×g、4°C、1 分間)。Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、50 μL の TE 緩衝液をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置した。遠心分離し (10,000 ×g、4°C、1 分間)、ろ液を DNA 試料液とした。

2-6-3 DNeasy Plant Maxi Kit

前処理を行った試料 1 mL にあらかじめ 65°C に温めておいた AP 緩衝液 5 mL と RNase A 10 μL を加え、試料塊がないようにボルテックスミキサーで混合し、65°C で 1 時間加温した (15 分ごとに転倒混和した。)。P3 緩衝液 1.8 mL を加えボルテックスミキサーで混合し、氷上に 15 分間静置した後、遠心分離した (8,000 ×g、室温、15 分間)。次いで

その上清全量を QIAshredder spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (2,300 ×g、室温、5 分間)。溶出液に 1.5 倍の量の AW1 緩衝液を加えボルテックスミキサーで混合した後、DNeasy spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (2,300 ×g、室温、5 分間)。最終的に混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。次いで AW2 緩衝液 12 mL を負荷し、遠心することで (2,300 ×g、室温、15 分間) カラムを洗浄した。あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌水 1 mL を加え、5 分間静置した後、遠心し (2,300 ×g、室温、10 分間)、DNA を溶出した。

2-7 DNA 抽出 (植物油)

植物油試料は前処理を行った後、全製品とも Genomic-tip 20/G (QIAGEN) 及び DNeasy Plant Maxi Kit を用いて DNA 抽出を行った。各試料につき 2 併行で抽出操作を行った。

2-7-1 Genomic-tip 20/G

前処理を行った試料約 20 mL (50 mL チューブでの前処理 2 本相当) を、あらかじめ QBT 緩衝液 2 mL で平衡させておいた Genomic-tip 20/G に全量負荷した。その後、QC 緩衝液 1 mL を負荷し、カラムを洗浄した。この洗浄作業は 3 回行った。QF 緩衝液を 250 μL 負荷し、溶出液を廃棄した後、QF 緩衝液 750 μL を加え DNA を溶出した。更に QF 緩衝液 750 μL を加え DNA を溶出した。2 回の溶出液にそれぞれイソプロパノール 525 μL、5 mg/mL リニアポリアクリルアミド (LPA) 溶液を 2.5 μL 加え、よく混合し 4°C で一晩静置した後、遠心分離した (20,000 ×g、4°C、30 分間)。上清を捨て、70%エタノールを各チューブ 1 mL 加え、更に遠心分離した (20,000 ×g、4°C、5 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた。チューブ 2 本分の沈殿を、0.1xTE 緩衝液 25 μL に溶解し、DNA 試料液とした。

2-7-2 DNeasy Plant Maxi Kit

前処理を行った試料約 10 mL (50 mL チューブでの前処理 1 本相当) に P3 緩衝液 3.6 mL を加えボルテックスミキサーで混合し、氷上に 10 分間静置した後、遠心分離した (3,450 ×g、室温、5 分間)。次いでその上清を QIAshredder spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (3,450 ×g、室温、5 分間)。最終的に混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。溶出液に 1.5 倍の量の AW1 緩衝液を加えボルテックスミキサーで混合した後、DNeasy spin column に負荷し、スイング式遠心分離機で遠心した (3,450 ×g、室温、5 分間)。最終的に混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。次いで AW2 緩衝液 12 mL を負荷し、遠心することで (3,450 ×g、室温、10 分間) カラムを洗浄した。緩衝液 AE を 0.75 mL 加え、5 分間静置した後、遠心し (3,450 ×g、室温、5 分間)、DNA を溶出した。溶出液の 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム、溶出液と酢酸ナトリウムの合計量の 0.7 倍量のイソプロパノール、3 μL の LPA 溶液を混合した後、4°C で一晩静置した。混合液を遠心分離 (20,000 ×g、4°C、30 分間) 後、上清を捨て 70%エタノール 1 mL を加え、更に遠心分離した (20,000 ×g、4°C、5 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた後、沈殿を 0.1xTE 緩衝液 25 μL に溶解し、DNA 試料液とした。

2-8 DNA抽出(てん菜糖、水飴)

てん菜糖、水飴試料は、全製品とも Genomic-tip 100/G、及び GM quicker 4 を用いて DNA 抽出を行った。各試料につき 2 併行で抽出操作を行った。

2-8-1 Genomic-tip 100/G

試料 30 g に 1 M Tris-HCl (pH8.0) 1 mL、0.5 M EDTA 200 μ L を加え、滅菌水で 100 mL にメスアップしてよく混和した後、65°C で 30 分間加温した (10 分ごとにボルテックスミキサーで混合した)。遠心分離し (12,000 \times g、室温、10 分間)、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL で平衡させておいた Genomic-tip 100/G に上清全量を負荷した。その後、QC 緩衝液 7.5 mL を負荷し、カラムを洗浄した。この洗浄作業は 2 回行った。QF 緩衝液を 1 mL 負荷し、溶出液を廃棄した。その後、更に QF 緩衝液 4 mL を加え DNA を溶出した。溶出液にイソプロパノール 2.8 mL、LPA 溶液を 13.6 μ L 加え、よく混合し 4°C で一晩静置した。混合液を遠心分離 (15,000 \times g、4°C、30 分間) 後、上清を捨て、70%エタノールを 3 mL 加え、更に遠心分離した (15,000 \times g、4°C、5 分間)。上清を完全に廃棄し、乾燥させた。沈殿を、0.1xTE 緩衝液 25 μ L に溶解し、DNA 試料液とした。

2-8-2 GM quicker 4

試料 1 g に 1 mL の GE1 Buffer を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、65°C で 30 分間加温した (10 分ごとにボルテックスミキサーで混合した)。100 μ L の GE2-M Buffer を添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、遠心分離した (10,000 \times g、4°C、10 分間)。次いで上清に 0.75 倍の GB3 Buffer を添加し、10 回転倒混和した後、遠心分離した (10,000 \times g、4°C、5 分間)。上清を Spin Column に 700 μ L 移し、遠心した (10,000 \times g、4°C、1 分間)。混合液が全て無くなるまで同様の操作を繰り返した。600 μ L の GW Buffer を Spin Column に添加し、遠心した (10,000 \times g、4°C、1 分間)。Spin Column を新しい 1.5 mL 容チューブに移し、50 μ L の TE 緩衝液をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置した。遠心分離し (10,000 \times g、4°C、1 分間)、ろ液を DNA 試料液とした。

2-9 リアルタイム PCR

しょうゆ試料及び大豆油試料ではダイズ内在性遺伝子 lectin (Le1)、コーンフレーク試料、デキストリン試料、液糖試料、穀物酢試料、コーン油試料及び水飴試料ではトウモロコシ内在性遺伝子 starch synthase (SSIb)、なたね油試料では high-mobility-group protein (HMG)、綿実油試料では Sinapis Arabidopsis Homolog 7 (SAH7)、てん菜糖試料ではテンサイ内在性遺伝子 glutamine synthetase (GS)、全製品に対し 18S rDNA、PCR 阻害確認試験には Internal Positive Control (IPC) を検出するプライマー・プローブを用いた (表 9)。リアルタイム PCR 機器には ABI PRISM™ 7900HT (Thermo Fisher Scientific) を用いた。PCR 用反応液の組成は以下のとおりである。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 12.5 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.25 μ L、対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.5 μ L を混合し、DNA 試料液、標準陽性コントロールプラスミド DNA 溶液 [GM ダイズ (LLS) プラスミド (ニッポンジーン)

1,500 copies/2.5 μ L 及び GM トウモロコシプラスミド (ニッポンジーン) 1,500 copies/2.5 μ L]、ダイズ、トウモロコシ、ナタネ、綿実若しくはてん菜粉砕試料から抽出したゲノム DNA 溶液 (10~20 ng/ μ L)、又は滅菌水 (NTC) 2.5 μ L を添加し、滅菌水で全量 25 μ L に調製した。各 DNA 試料液当たり 2 ウェルに分注後、真上からシールし、完全にウェルを密閉した。装置にプレートを設定し、以下の条件で反応とデータの取込みを開始した。50°C、2 分間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 秒間、59°C・1 分間を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。判定は Threshold line を 0.2 に設定し、43 未満の C_q 値が得られたウェルを陽性とし、2 併行抽出 2 ウェル反応の計 4 ウェル全てで陽性となった場合、その試料を DNA 検出可能とした。

2-10 しょうゆ試料からの DNA 抽出における添加回収試験

しょうゆ 1 製品 (S01) 及び蒸留水にダイズから精製したゲノム DNA (4 mL 当たり 2 μ g) を添加し、Genomic-tip 100/G、DNeasy Plant Maxi Kit、GM quicker 4、Quick Gene SP kit 及び Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI それぞれの方法で DNA 抽出を行った。得られた DNA 試料液及びゲノム DNA を添加せずに抽出した DNA 試料液に対し、GM ダイズ (LLS) プラスミドセット (ニッポンジーン) を検量線にしてリアルタイム PCR による LeI の定量試験を行った。この場合、反応は 3 ウェル併行で行い、平均 C_q 値を用いてコピー数を算出した。各 DNA 抽出キットにつき 2 併行で抽出操作を行い、回収率の平均を算出した。

2-11 DNA 抽出液中の PCR 阻害確認

しょうゆ試料のうち IPC 測定で阻害が見られ、Genomic-tip 100/G で抽出した S34 及び S01 の 10 倍濃縮試料、S11 の 10 倍及び 25 倍濃縮試料並びに S27 の 10 倍濃縮試料を、滅菌水で 2、5、10、20、50 及び 100 倍に希釈し、リアルタイム PCR を実施した。

3 結果及び考察

3-1 しょうゆ試料

ダイズのゲノム DNA を添加したしょうゆ試料 S01 及び蒸留水を用いて、各 DNA 抽出法の添加回収試験を行った。その結果、しょうゆ試料では GM quicker 4 で最も高い回収率 (45.4 \pm 2.5%) が得られた (表 10)。次いで Quick Gene SP kit (35.6 \pm 2.2%) 及び Genomic-tip 100/G (33.6 \pm 9.1%) で比較的良好な回収率が得られたが、Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI (2.8 \pm 0.8%) 及び DNeasy Plant Maxi Kit (0.46 \pm 0.49%) では回収率が非常に低かった (表 10)。蒸留水ではしょうゆ試料と同様に GM quicker 4 で最も高い回収率 (69.8 \pm 15.6%)、Quick Gene SP kit (50.2 \pm 4.9%) 及び Genomic-tip 100/G (21.8 \pm 11.4%) で比較的良好な回収率が得られた (表 10)。一方で、しょうゆ試料とは異なり Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI では 1 抽出において比較的良好な回収率 (45.1%) であったが、もう 1 抽出では回収率が非常に低く (0.011%)、抽出のばらつきが大きかった (表 10)。DNeasy Plant Maxi Kit ではしょうゆ試料と同様に回収率が非常に低かった (1.1 \pm 0.9%、表 10)。Genomic-tip 100/G を除き、しょうゆ試料では蒸留水よりも回収率

が低く、これはしょうゆ試料中の成分が影響したものと考えられる。

しょうゆ 20 製品からの DNA 検出を試みた結果、前処理をしていないしょうゆ試料において、全ての抽出方法で DNA 検出可能と判定された試料はなかった(表 11~15)。GM quicker 4 で抽出した S01、S35 の 2 抽出中 1 抽出、更に 2 ウェル中 1 ウェルでのみ陽性であったが、判定基準(4 ウェル全てで陽性)は満たさなかった(表 12)。Quick Gene SP kit で抽出した試料に Le1 が検出された試料があったが、これらでは ROX の減少が観察され(図 1)、それによって FAM の相対値が増加したために 43 未満の C_q 値が得られたと考えられた(表 14)。18S rDNA は一部の試料(Genomic-tip 100/G で抽出した S23、S34、DNeasy Plant Maxi Kit で抽出した S11、Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI で抽出した S27)を除いた全ての試料で検出されたことから、これらについて DNA 自体は抽出できていると考えられた。また、一部の試料(Genomic-tip 100/G で抽出した S23、S34、Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI で抽出した S01、S34)では、IPC が検出されなかったことから、DNA 試料液中に PCR 阻害物質が混入していると推測された。

前処理(濃縮)を行ったしょうゆ試料において、Le1 を検出したのは Genomic-tip 100/G で抽出した S11 の 10 倍濃縮試料、GM quicker 4 で抽出した S27 の 25 倍濃縮試料の 2 試料であったが、どちらも 2 抽出中 1 抽出、更に 2 ウェル中 1 ウェルでのみの検出であったため、DNA 検出可能とは判定されなかった(表 16、17)。18S rDNA は Genomic-tip 100/G で抽出した S01 の 10 倍濃縮試料、S11 の 25 倍濃縮試料の 2 試料を除いた全ての試料で検出された。この 2 試料は IPC も検出されなかったことから、PCR 阻害物質の混入が推測された。同じく S11 の 10 倍濃縮試料も、1 抽出において IPC が検出されなかったため、PCR 阻害物質の混入が推測された。

IPC が検出できなかった一部の試料に対して、PCR 阻害物質の混入を確認するため、蒸留水による希釈を行った DNA 試料液を用いて、リアルタイム PCR を実施した。その結果、試料の希釈倍率が上がるにつれて、IPC 測定 の C_q 値が小さくなった(表 18)。このことから、これらの試料では DNA 抽出液中に PCR 阻害物質が混入したと考えられた。しかし、PCR 阻害が見られなくなる希釈倍率では Le1 は検出されなかったことから、希釈により Le1 が検出限界以下にまで減少したか、元々含まれる Le1 が検出限界以下であったと考えられた。

イソプロパノール沈殿における DNA 回収率を上げるために、Genomic-tip 100/G でのイソプロパノール沈殿時にグリコーゲン溶液を加えて、一部の試料(S01、S17、S18、S19、S24、S29、S33)から 1 併行で DNA 抽出を行ったが、Le1 が検出された試料はなかった(表 19)。

前処理の有無、DNA 抽出キットの種類にかかわらず、しょうゆ試料において DNA 検出可能と判定された試料はなかった。一部の試料で 43 未満の C_q 値が得られ、陽性となったウェルがあったが、これらの C_q 値(38.9~40.7)は、GM ダイズ(LLS)プラスミドセットの検量線から推量すると標的配列 1~4 コピーに相当する。これは、リアルタイム PCR の通常の検出限界を大きく下回っており、DNA を再現性良く検出することは不可能であると考えられる。

3-2 コーンフレーク試料

前処理をしていないコーンフレーク試料において、4 ウェルとも SSIIB が検出されず、DNA 検出可能と判定された試料はなかった（表 20~22）。DNeasy Plant Maxi Kit 及び GM quicker 4 で抽出したチョココーティング試料（C04 及び C05）からは IPC が検出されず、PCR 阻害物質の混入が推測された。一方で、Genomic-tip 100/G を用いた場合、PCR 阻害物質の混入はほとんどないと推測された。Genomic-tip 100/G による DNA 抽出におけるイソプロパノール沈殿時の DNA 回収率を上げるために、イソプロパノール沈殿時にグリコーゲン溶液を加えて、DNA 抽出を行った。その結果、C01、C03 及び C04 において SSIIB が 4 ウェルとも検出され、DNA 検出可能と判定された（表 23）。ただし、IPC 測定結果から、C05 には若干の PCR 阻害物質の混入が推測された（表 23）。

前処理（超純水による洗浄）を行い、プロパノール沈殿時にグリコーゲン溶液を加えて DNA 抽出を行った結果、全ての試料から SSIIB が 4 ウェルとも検出され、DNA 検出可能と判定された（表 24）。また、IPC 測定結果から、PCR 阻害物質の混入はほとんどないと推測された（表 24）。以上の結果から、コーンフレークをコーティングしていた糖類やチョコレートを洗い流すことによって、トウモロコシ原料からの DNA 抽出量が上がり、更に PCR 阻害物質を除くことができたと考えられた。

試料の前処理及びプロパノール沈殿時にグリコーゲン溶液を加えた場合のリアルタイム PCR の C_q 値（30.3~36.8）は、同時に測定した GM トウモロコシプラスミド（1,500 copies/2.5 μ L）の C_q 値（30.1）から推量すると 14~1,300 コピーに相当し、その大部分は、リアルタイム PCR の通常の検出限界を上回っており、DNA を再現性良く検出することが可能であると考えられる。

3-3 デキストリン試料

デキストリン試料において、D05 で全ての抽出法にて 4 ウェルとも SSIIB が検出され、DNA 検出可能と判定された（表 25~27）。また、DNeasy Plant Maxi Kit で抽出した D04 で SSIIB が 4 ウェルとも検出され、DNA 検出可能と判定された（表 27）。他の試料では DNA 検出可能と判定されたものはなかった（表 25~27）。18S rDNA は一部の試料（Genomic-tip 100/G 及び DNeasy Plant Maxi Kit で抽出した D06、GM quicker 4 で抽出した D01）を除いた全ての試料で検出されたことから（表 25~27）、これらについては DNA 自体は抽出できていると考えられた。18S rDNA が検出できなかった 3 試料は IPC も検出されなかったことから（表 25~27）、PCR 阻害物質の混入が推測された。

DNA 検出可能と判定された試料のうち、D04 のリアルタイム PCR の C_q 値（40.3~41.3）は、同時に測定した GM トウモロコシプラスミド（1,500 copies/2.5 μ L）の C_q 値（30.7）から推量すると 1~2 コピーに相当し、これはリアルタイム PCR の通常の検出限界を大きく下回っており、DNA を再現性良く検出することは難しいかもしれない。一方で、D05 のリアルタイム PCR の C_q 値（31.6~38.0）は、10~800 コピーに相当する。これらの大部分、特に、GM quicker 4 による抽出では、リアルタイム PCR の通常の検出限界を上回っており、DNA を再現性良く検出することが可能であると考えられる。

3-4 液糖試料

液糖試料において、SSIIb が検出されて陽性となったウェルはなく、DNA 検出可能と判定された試料はなかった（表 28~30）。また、E01 及び E04 においてスケールアップして Genomic-tip 100/G にて DNA 抽出を行った結果、E01 の 2 抽出中 1 抽出、更に 2 ウェル中 1 ウェルでのみ陽性であり、DNA 検出可能と判定された試料はなかった（表 31）。18S rDNA は一部の試料（GM quicker 4 で抽出した E03 の 2 抽出中 1 抽出、更に 2 ウェル中 1 ウェル）を除いた全ての試料、全てのウェルで検出されたことから、これらについては DNA 自体は抽出できていると考えられた（表 28~31）。

液糖試料で唯一陽性のウェルが観察された E01 のスケールアップ試料のリアルタイム PCR の C_q 値 (42.8) は、同時に測定した GM トウモロコシプラスミド (1,500 copies/2.5 μ L) の C_q 値 (30.4) から推量すると 1 コピー以下に相当し、DNA を再現性良く検出することは不可能であると考えられる。

3-5 穀物酢試料

穀物酢試料において、SSIIb が検出されて陽性となったウェルはなく、DNA 検出可能と判定された試料はなかった（表 32~34）。18S rDNA は一部の試料（GM quicker 4 で抽出した K01 の 2 抽出中 1 抽出、更に 2 ウェル中 1 ウェル）を除いた全ての試料、全てのウェルで検出されたことから、これらについては DNA 自体は抽出できていると考えられた（表 32~34）。穀物酢試料では陽性のウェルは観察されず、DNA を再現性良く検出することは不可能であると考えられる。

3-6 植物油試料

植物油試料において、大豆油試料及び大豆油を主原料とした調合油試料の一部の抽出試料（A03、A04、A06）において内在性遺伝子が検出されたものの、他品目を含めて内在性遺伝子配列が安定して検出されたウェルはなく、DNA 検出可能と判定された試料はなかった（表 35~36）。今回の分析したなたね油試料のうち、A07~A09 は比較的精製度の高いいわゆるサラダ油タイプであり、A10~A13 の 4 試料は比較的精製度が低い赤水タイプの試料であったが、いずれの試料においても内在性遺伝子が検出されなかったため、なたね油試料においては精製度にかかわらず、残存する DNA が非常に少ないことが推測された。一方、大豆油試料についてはいずれもサラダ油タイプであるにもかかわらず、一部の試料において内在性遺伝子が検出された。陽性反応として行った各原料植物からの抽出ゲノム DNA を用いた結果では、他の植物種の内在性遺伝子に比べ大豆 *Le1* の C_q 値が比較的早い傾向にあったため、大豆油試料での内在性遺伝子の検出については、大豆油における DNA 残存の可能性と共に、検出に用いたプライマー性能によることが推測された。

3-7 てん菜糖試料

てん菜糖試料において、てん菜含蜜糖を Genomic-tip 100/G で抽出した試料 1 点において内在性遺伝子が検出されたものの、他品目を含めて内在性遺伝子配列が安定して検出されたウェルはなく、DNA 検出可能と判定された試料はなかった（表 37、38）。砂糖の製造工程において、糖液を濃縮し結晶化させ分蜜したものがグラニュー糖や上白糖で

あり、糖液そのまま濃縮・乾燥させたものが含蜜糖であるため、一般的には含蜜糖の方が核酸を含む不純物を多く含むと考えられる。今回の結果では、いずれの試料においても安定的な DNA 検出はできなかったことから、濃縮工程での加熱によって、DNA が高度に分解されたものと考えられる。

3-8 水飴試料

水飴試料において、SSIIb が検出されて陽性となったウェルはなく、DNA 検出可能と判定された試料はなかった（表 39、40）。水飴はその製造工程において、コーンスターチを原料に酵素分解、ろ過、脱色、イオン交換による精製、濃縮の工程を経るため、残存する DNA が非常に少ないことが考えられた。一方、水飴使用食品として分析を行った各種ジャム試料（M04～07）では IPC が検出されない場合が多かったため、色素成分を含む PCR 阻害物質の影響が考えられた。

3-9 全品目に対する考察

今回試験した試料は、数多く販売されている加工食品のごく一部であり、同じ品目でも加工工程の違いにより DNA 検出の可否は変わる可能性がある。しかしながら、しょうゆ製品に関しては、比較的多くのメーカーの製品（全 20 製品）を試験したにもかかわらず DNA 検出には至らなかったため、加熱や発酵を伴う基本的なしょうゆの加工工程において DNA が高度に分解していることが予想され、品目全体で DNA 検出は困難であると考えられる。しょうゆと同様に加工工程において加熱や発酵を伴う穀物酢製品でも品目全体で DNA 検出は困難であると考えられる。また、液糖製品、植物油製品、てん菜糖製品、水飴製品いずれも、製造工程における加熱により DNA が高度に分解し、更に精製工程で DNA が除去されることが推測される。そのため、これらの製品においても品目全体で DNA 検出は困難であると考えられる。一方で、コーンフレーク製品及びデキストリン製品では加工工程で加熱や圧縮が行われるが、しょうゆなどに比べ穏やかであるため、分解されずに残った DNA が存在すると推測される。平成 11 年報告では CTAB 法を用いていたため、コーンフレーク試料やデキストリン試料にてアルコール沈殿時に多糖類の沈殿が観察された。多糖類は PCR 阻害を起こすことが知られており、これによって DNA 検出ができなかった可能性が考えられる。一方、本研究では DNA 抽出キットを使用しているため、多糖類の混入は極力抑えられ、DNA 検出が可能になったと考えられる。また、コーンフレーク試料においては超純水による洗浄により、あらかじめ PCR 阻害物質を除去することができたと考えられる。実際にこれらの試料では PCR 阻害は観察されなかった。

4 結論

GM 食品の検査に使用されている DNA 精製キットを用い、リアルタイム PCR による高度加工食品から DNA 検出を試みた結果、コーンフレーク試料及びデキストリン試料の一部において DNA 検出可能と判定された。一方で、しょうゆ試料、液糖試料、穀物酢試料、植物油試料、てん菜糖試料、水飴試料においては DNA 検出可能と判定された試料はなかった。

参考資料

- 1) 消費者庁、食品表示基準 Q&A について（平成 27 年 3 月 30 日消食表第 140 号）別添 遺伝子組換え食品に関する事項
- 2) 農林水産省、遺伝子組換え食品部会における技術的検討のための小委員会報告（平成 11 年 7 月 13 日）

表 1 本研究で使したしょうゆ試料

試料番号	品目 (名称)	原材料
S01	こいくちしょうゆ	脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、大豆 (遺伝子組換えでない)、アルコール
S02		脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、大豆 (遺伝子組換えでない)、アルコール
S03		脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、大豆 (遺伝子組換えでない)
S11		脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、アルコール
S12		大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩
S13		脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、みりん、大豆 (遺伝子組換えでない)、アルコール
S17	うすくちしょうゆ	大豆 (国産)、食塩 (国産)、小麦 (国産)、米 (国産)、米発酵調味料 (国産米)
S18		食塩、脱脂加工大豆、小麦、ぶどう糖、米、大豆、アルコール
S19		脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、果糖ぶどう糖液糖、米、大豆 (遺伝子組換えでない)、アルコール
S22		大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、みりん、アルコール
S23		大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、米
S24	さいしこみしょうゆ	大豆 (国産 100%) (遺伝子組換えでない)、小麦 (国産 100%)、食塩、砂糖、みりん、アルコール、調味料 (アミノ酸等)
S25		大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、アルコール
S27		大豆 (遺伝子組換えでない)、小麦、食塩、アルコール
S28		大豆、小麦、食塩
S29	たまりしょうゆ	脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、食塩、糖類 (水飴、砂糖、ぶどう糖)、小麦、大豆 (遺伝子組換えでない)、アルコール
S30		脱脂加工大豆、食塩、小麦、大豆、アルコール、調味料 (アミノ酸等)、カラメル色素
S33		脱脂加工大豆 (遺伝子組換えでない)、食塩、小麦、大豆 (遺伝子組換えでない)、アルコール
S34		大豆 (国産 100%) (遺伝子組換えでない)、食塩
S35	しろしょうゆ	小麦、食塩、大豆、アルコール、調味料 (アミノ酸等)、酸味料

表 2 本研究で使用したコーンフレーク試料

試料番号	品目 (名称)	原材料
C01	朝食シリアル (コーンフレーク) (プレーン)	コーングリッツ、砂糖、食塩、麦芽エキス、乳化剤、ビタミン C、クエン酸鉄 Na、酸化防止剤(ビタミン E)、カゼイン Na(乳由来)、ナイアシン、パントテン酸 Ca、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B6、ビタミン A、葉酸、ビタミン D、ビタミン B12
C02	朝食シリアル (コーンフレーク) (プレーン)	コーングリッツ(遺伝子組換えでない)、砂糖(三温糖)、食塩、麦芽エキス、モルトシロップ、ビタミン C、炭酸カルシウム、ピロリン酸鉄、乳化剤、ナイアシン、酸化防止剤(ビタミン E)、ビタミン B6、パントテン酸カルシウム、ビタミン B1、ビタミン A、葉酸、ビタミン B2、ビタミン B12
C03	朝食シリアル (コーンフレーク) (プレーン)	有機とうもろこし(遺伝子組換えではない)、有機砂糖、食塩(赤穂の天塩)
C04	朝食シリアル (コーンフレーク) (チョコレート)	コーングリッツ、砂糖、ココアパウダー、食塩、麦芽エキス、準チョコレート、乳等を主要原料とする食品、乳化剤(大豆を含む)、ビタミン C、クエン酸鉄 Na、香料、酸化防止剤(ビタミン E)、ナイアシン、パントテン酸 Ca、ビタミン B1、ビタミン B6、ビタミン B2、ビタミン A、葉酸、ビタミン D、ビタミン B12
C05	朝食シリアル (コーンフレーク) (チョコレート)	とうもろこし(遺伝子組換えではない)、砂糖(北海道産てんさい糖)、ココアパウダー、全粉乳(北海道産)、食塩、カカオマス、麦芽エキス、乳化剤

表 3 本研究で使用したデキストリン試料

試料番号	品目 (名称)	原材料
D01	難消化性デキストリン	難消化性デキストリン
D02	難消化性デキストリン	難消化性デキストリン(原料: トウモロコシ)
D03	マルトデキストリン	とうもろこし由来マルトデキストリン
D04	α -シクロデキストリン含有食品	α -シクロデキストリン
D05	乾燥スープ	水溶性食物繊維、デキストリン、食塩、タマネギエキス、乳糖、シヨ糖、酵母エキス、食用油脂、チキンエキス、香辛料、調味料(アミノ酸等)、クチナシ色素
D06	パウダールイボスティ	難消化性デキストリン、デキストリン、ルイボス

表 4 本研究で使用した液糖試料

試料番号	品目 (名称)	原材料
E01	ガムシロップ	糖類(ぶどう糖果糖液糖、砂糖)、メタリン酸 Na、香料、増粘剤(キサンタンガム)
E02	ガムシロップ	果糖ぶどう糖液糖
E03	コーンシロップ	コーンシロップ、食塩、バニラエクストラクト(バニラビーンズ、水、エタノール)
E04	果糖ぶどう糖液糖: 果糖含有率 55%	でん粉

表 5 本研究で使用した穀物酢試料

試料番号	品目 (名称)	酸度	原材料
K01	穀物酢	4.2%	穀類(小麦、米、コーン)、アルコール、酒かす
K02	穀物酢	4.3%	穀類(米、コーン)、アルコール、酒かす、食塩
K03	穀物酢	4.3%	アルコール、米、コーン、小麦、酒かす、砂糖・ぶどう糖果糖液糖、食塩

表 6 本研究で使用した植物油試料

試料番号	品目 (名称)	原材料
A01	食用とうもろこし油	食用とうもろこし油
A02	食用とうもろこし油	食用とうもろこし油
A03	食用大豆油	食用大豆油
A04	食用大豆油	食用大豆油
A05	食用調合油	食用大豆油、食用なたね油
A06	食用調合油	食用大豆油、食用なたね油
A07	食用なたね油	食用なたね油
A08	食用なたね油	食用なたね油
A09	食用なたね油	食用なたね油
A10	食用なたね油	食用なたね油
A11	食用なたね油	食用なたね油
A12	食用なたね油	食用なたね油
A13	食用なたね油	食用なたね油
A14	食用綿実油	食用綿実油
A15	食用綿実油	食用綿実油
A16	食用綿実油	食用綿実油

表 7 本研究で使用したてん菜糖試料

試料番号	品目 (名称)	原材料
T01	てん菜含蜜糖	てん菜 (ビート)
T02	てん菜含蜜糖	てん菜 (ビート)
T03	てん菜含蜜糖	ビート糖液、ビート糖蜜
T04	てん菜含蜜糖	てん菜 (ビート)
T05	上白糖	てん菜 (ビート)
T06	上白糖	てん菜
T07	グラニュー糖	てん菜 (ビート)
T08	グラニュー糖	てん菜

表 8 本研究で使用した水飴試料

試料番号	品目 (名称)	原材料
M01	水あめ	水あめ
M02	水あめ	水あめ
M03	水あめ	澱粉
M04	いちごジャム	砂糖類 (水あめ、砂糖)、いちご、ゲル化剤 (ペクチン)、酸味料
M05	いちごジャム	砂糖類 (水あめ、砂糖)、いちご、ゲル化剤 (ペクチン)、酸味料
M06	ブルーベリージャム	砂糖類 (水あめ、ぶどう糖果糖液糖、砂糖)、ブルーベリー、ブランデー、ゲル化剤 (ペクチン)、酸味料、pH 調整剤
M07	ブルーベリージャム	糖類 (水あめ、砂糖)、ブルーベリー、ゲル化剤 (ペクチン)、酸味料

表 9 本研究で使用したプライマー・プローブ

Name	Sequence (5' -3')	amplicon size (bp)
<i>Le1</i>		
Le1n 02-5'	GCCCTCTACTCCACCCCA	118
Le1n 02-3'	GCCCATCTGCAAGCCTTTTT	
Le1-Taq	FAM-AGCTTCGGCGCTTCCTTCAACTTCAC-TAMRA	
<i>SSI1b</i>		
SSI1b3-5'	CCAATCCTTTGACATCTGCTCC	114
SSI1b3-3'	GATCAGCTTTGGGTCCGGA	
SSI1b-Taq	FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA	
<i>HMG</i>		
hmg-F	GGTCGCCTCCTAAGGCGAAAG	99
hmg-R	CTTCTTCGGCGGTCCAC	
hmg-P	FAM-CGGAGCCACTCGGTGCCGCAACTT-TAMRA	
<i>SAH7</i>		
Sah7-uni-f1	AGTTTGTAGGTTTTGATGTTACATTGAG	123
Sah7-uni-r1	GCATCTTTGAACCGCCTACTG	
SAH7	FAM-AAACATAAAATAATGGGAACAACCATGACATGT-TAMRA	
<i>GS</i>		
GluA3-F	GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG	118
GluA3-R	GAGTAATTGCTCCATCCTGTTCA	
GluD1	FAM-CTACGAAGTTTAAAGTATGTGCCGCTC-TAMRA	
<i>18S rDNA</i>		
18S rRNA-F	GTTGGCCTTCGGGATCGGAGTA	100
100-R	TTGTTTCGTCTTTCATAAATCCAAGAATTCACC	
18SrRNA 2-3'	GCTTTCGAGTTGTTCTGCTTTCA	111
18S rRNA-Probe	FAM-TCGGGGGCATTTCGTATTTTCATAGTCAGA-TAMRA	
<i>IPC</i>		
IPC1-5'	CCGAGCTTACAAGGCAGGTT	100
IPC1-3'	TGGCTCGTACACCAGCATACTAG	
IPC1-Taq	FAM-TAGCTTCAAGCATCTGGCTGTCGGC-TAMRA	

表 10 しょうゆ試料の添加回収試験結果

DNA抽出キット	添加回収率, %		平均, %	標準偏差, %
	1回目	2回目		
<i>しょうゆ試料</i>				
Genomic-tip 100/G	27.1	40.0	33.6	9.1
GM quicker 4	47.1	43.6	45.4	2.5
DNeasy Plant Maxi Kit	0.81	0.11	0.46	0.49
Quick Gene SP kit	34.0	37.1	35.6	2.2
Mono Fas 加工食品DNA抽出キットXI	2.2	3.3	2.8	0.8
<i>蒸留水</i>				
Genomic-tip 100/G	29.8	13.7	21.8	11.4
GM quicker 4	80.8	58.8	69.8	15.5
DNeasy Plant Maxi Kit	0.48	1.7	1.1	0.9
Quick Gene SP kit	53.7	46.7	50.2	4.9
Mono Fas 加工食品DNA抽出キットXI	0.011	45.1	22.6	31.9

表 11 前処理していないしょうゆ試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	Le1			18S rDNA			IPC		
	抽出1	抽出2		抽出1	抽出2		抽出1	抽出2	
S01	- / -	- / -	- / -	35.7 / 35.5	34.9 / 34.7	- / -	34.2 / 34.3	34.3 / 34.8	- / -
S02	- / -	- / -	- / -	31.0 / 31.1	31.4 / 31.4	- / -	35.4 / 35.2	35.5 / 35.6	- / -
S03	- / -	- / -	- / -	35.4 / 35.5	37.5 / 37.5	- / -	38.2 / 37.9	40.8 / 40.7	- / -
S11	- / -	- / -	- / -	37.0 / 36.8	36.0 / 36.1	- / -	34.1 / 34.5	34.2 / 34.1	- / -
S12	- / -	- / -	- / -	35.1 / 35.1	34.0 / 34.0	- / -	34.7 / 34.4	34.6 / 33.8	- / -
S13	- / -	- / -	- / -	34.4 / 34.3	35.3 / 34.9	- / -	34.2 / 34.5	34.7 / 35.1	- / -
S17	- / -	- / -	- / -	15.3 / 15.3	15.3 / 15.4	- / -	34.4 / 35.2	34.4 / 35.0	- / -
S18	- / -	- / -	- / -	25.1 / 25.5	25.3 / 25.4	- / -	34.5 / 34.6	34.6 / 35.0	- / -
S19	- / -	- / -	- / -	28.6 / 28.4	28.6 / 28.6	- / -	34.1 / 34.5	34.7 / 34.3	- / -
S22	- / -	- / -	- / -	35.9 / 35.8	35.4 / 35.4	- / -	34.4 / 34.3	34.8 / 35.4	- / -
S23	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
S24	- / -	- / -	- / -	29.0 / 29.2	28.8 / 28.9	- / -	34.2 / 34.2	34.7 / 34.3	- / -
S25	- / -	- / -	- / -	32.0 / 32.3	31.1 / 31.2	- / -	34.5 / 34.3	34.6 / 34.8	- / -
S27	- / -	- / -	- / -	35.3 / 35.3	36.1 / 36.9	- / -	34.0 / 34.4	33.9 / 34.8	- / -
S28	- / -	- / -	- / -	33.8 / 33.2	33.9 / 33.6	- / -	38.3 / 37.3	39.1 / 37.7	- / -
S29	- / -	- / -	- / -	27.9 / 27.9	27.8 / 27.7	- / -	34.6 / 34.2	34.1 / 34.3	- / -
S30	- / -	- / -	- / -	32.3 / 32.6	33.9 / 33.5	- / -	34.5 / 33.9	34.4 / 34.0	- / -
S33	- / -	- / -	- / -	25.0 / 24.9	26.3 / 26.4	- / -	34.4 / 34.5	34.4 / 34.8	- / -
S34	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
S35	- / -	- / -	- / -	20.4 / 20.2	20.3 / 20.2	- / -	35.2 / 38.2	36.1 / 36.0	- / -

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 12 前処理していないしょうゆ試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	Le1		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
S01	- / -	38.9 / -	32.9 / 33.6	34.1 / 34.1	33.7 / 34.5	34.9 / 34.4
S02	- / -	- / -	33.9 / 34.1	34.1 / 34.4	34.8 / 34.0	33.8 / 33.7
S03	- / -	- / -	35.2 / 35.0	34.8 / 34.3	34.1 / 34.9	34.0 / 33.6
S11	- / -	- / -	32.5 / 32.4	32.9 / 32.9	34.0 / 34.0	33.9 / 33.5
S12	- / -	- / -	33.6 / 33.8	32.8 / 32.8	33.9 / 33.8	33.7 / 34.3
S13	- / -	- / -	33.7 / 33.8	34.3 / 35.0	33.8 / 35.0	34.3 / 34.2
S17	- / -	- / -	19.3 / 19.4	19.4 / 19.4	34.8 / 34.1	33.0 / 34.3
S18	- / -	- / -	29.9 / 30.0	30.2 / 30.2	34.6 / 34.2	34.4 / 33.9
S19	- / -	- / -	28.5 / 28.6	29.5 / 29.6	33.9 / 33.8	33.8 / 34.0
S22	- / -	- / -	34.6 / 34.8	34.2 / 34.2	34.0 / 34.3	33.8 / 34.0
S23	- / -	- / -	30.4 / 30.5	31.0 / 31.2	37.1 / 36.9	37.7 / 38.0
S24	- / -	- / -	32.8 / 32.9	33.0 / 33.0	34.1 / 34.2	34.5 / 33.9
S25	- / -	- / -	35.3 / 35.0	34.9 / 34.4	34.4 / 33.4	33.9 / 35.0
S27	- / -	- / -	34.6 / 35.4	32.8 / 33.2	33.7 / 33.5	33.7 / 33.8
S28	- / -	- / -	34.3 / 33.9	33.1 / 32.9	34.0 / 34.5	34.0 / 34.6
S29	- / -	- / -	29.0 / 29.1	29.4 / 29.3	34.3 / 34.8	34.7 / 34.4
S30	- / -	- / -	33.5 / 33.5	33.9 / 34.0	34.0 / 34.7	34.3 / 34.4
S33	- / -	- / -	25.0 / 25.0	27.5 / 27.4	34.2 / 34.6	34.2 / 35.0
S34	- / -	- / -	31.1 / 31.1	32.1 / 32.1	34.5 / 34.1	34.1 / 34.3
S35	- / -	- / 40.7	22.2 / 22.2	21.9 / 22.0	34.5 / 34.6	34.5 / 35.0

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 13 前処理していないしょうゆ試料のリアルタイム PCR 結果 (DNeasy Plant Maxi Kit)

試料	Le1		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
S01	- / -	- / -	35.1 / 35.2	38.9 / 38.1	33.9 / 33.8	33.6 / 34.4
S11	- / -	- / -	38.5 / -	37.7 / 37.3	33.9 / 34.2	34.5 / 33.9
S27	- / -	- / -	35.8 / 35.5	39.5 / 41.3	34.6 / 34.7	34.2 / 34.0
S30	- / -	- / -	34.6 / 35.0	34.4 / 34.2	34.4 / 34.9	34.6 / 34.7
S33	- / -	- / -	33.8 / 33.8	30.7 / 30.8	34.0 / 35.5	34.0 / 34.9
S34	- / -	- / -	34.0 / 33.8	36.1 / 36.7	34.8 / 35.0	34.8 / 34.6

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 14 前処理していないしょうゆ試料のリアルタイム PCR 結果 (Quick Gene SP kit)

試料	Le1		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
S01	- / -	- / -	39.3 / 40.2	38.8 / 38.8	34.1 / 34.0	34.3 / 34.0
S11	- / -	- / -	35.0 / 35.3	34.9 / 34.7	33.6 / 33.7	34.1 / 33.6
S27	38.3 ^a / 32.4 ^a	37.3 ^a / 44.2 ^a	35.9 / 35.7	37.3 / 36.6	33.2 / 33.5	33.4 / 33.2
S30	- / 30.4 ^a	29.9 ^a / 28.0 ^a	29.5 / 31.8	30.8 / 29.6	33.2 / 33.1	30.9 / 32.3
S33	- / -	- / 36.3 ^a	31.4 / 31.6	31.6 / 31.7	32.7 / 34.0	33.1 / 33.4
S34	- / -	- / -	37.8 / 38.2	37.1 / 37.2	34.6 / 33.8	33.9 / 34.4

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

^aROX が減少していたため、FAM が相対的に増加していた。

表 15 前処理していないしょうゆ試料のリアルタイム PCR 結果 (Mono Fas 加工食品 DNA 抽出キット XI)

試料	Le1			18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2		抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
S01	- / -	- / -	-	32.0 / 32.4	40.8 / 35.0	37.0 / 36.7	- / -
S11	- / -	- / -	-	36.9 / 37.9	38.1 / 38.5	34.1 / 34.2	33.9 / 34.5
S27	- / -	- / -	-	38.4 / 39.2	- / 40.9	34.2 / 33.9	39.5 / 37.7
S30	- / -	- / -	-	37.2 / 37.8	37.1 / 39.6	35.3 / 34.2	35.3 / 34.8
S33	- / -	- / -	-	34.3 / 26.8	36.5 / 36.3	38.0 / 37.9	39.0 / 40.3
S34	- / -	- / -	-	39.3 / 39.3	43.1 / 43.8	35.2 / 35.2	- / 44.8

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 16 前処理したしょうゆ試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	Le1			18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2		抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
S01(x10)	- / -	- / -	-	- / -	- / -	- / -	- / -
S11(x10)	43.5 / -	- / -	-	32.9 / 33.0	39.1 / 39.7	38.4 / 38.2	- / -
S27(x10)	- / -	- / -	-	27.0 / 27.0	25.5 / 25.6	41.1 / 40.6	38.1 / 38.7
S11(x25)	- / -	- / -	-	- / -	- / -	- / -	- / -

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 17 前処理したしょうゆ試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	Le1			18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2		抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
S01(x10)	- / -	- / -	-	27.0 / 27.0	27.7 / 27.8	33.6 / 34.0	33.3 / 34.0
S11(x10)	- / -	- / -	-	31.1 / 31.0	31.1 / 30.9	33.8 / 33.6	33.9 / 33.7
S27(x10)	- / -	- / -	-	24.9 / 25.0	25.0 / 25.0	34.0 / 33.9	33.8 / 34.3
S01(x25)	- / -	- / -	-	25.3 / 25.2	25.0 / 25.0	34.3 / 34.3	34.3 / 34.8
S11(x25)	- / -	- / -	-	31.1 / 31.0	31.4 / 31.2	34.1 / 34.1	34.7 / 34.7
S27(x25)	- / 40.1	- / -	-	24.8 / 24.8	24.3 / 24.4	33.9 / 34.5	34.0 / 34.0

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 18 PCR 阻害確認試験結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	IPC	
	抽出1	抽出2
S34		
原液	- / -	- / -
2倍希釈	43.6 / 42.8	37.4 / 37.3
5倍希釈	35.3 / 35.6	34.9 / 34.1
10倍希釈	34.7 / 34.8	33.7 / 35.0
20倍希釈	34.5 / 34.5	33.7 / 34.2
50倍希釈	33.8 / 34.1	34.9 / 34.5
100倍希釈	33.9 / 34.0	33.5 / 34.2
S01(x10)		
原液	- / -	- / -
2倍希釈	- / -	39.6 / 38.6
5倍希釈	37.9 / 37.0	34.7 / 34.6
10倍希釈	35.7 / 34.5	34.3 / 35.2
S11(x10)		
原液	38.4 / 38.2	- / -
2倍希釈	34.6 / 35.1	34.4 / 34.7
5倍希釈	34.2 / 34.3	34.0 / 34.4
10倍希釈	34.5 / 34.5	34.4 / 34.2
S27(x10)		
原液	41.1 / 40.6	38.1 / 38.7
2倍希釈	35.1 / 34.2	34.8 / 34.7
5倍希釈	34.1 / 33.7	34.8 / 34.9
10倍希釈	33.6 / 33.7	33.8 / 34.7
S11(x25)		
原液	- / -	- / -
2倍希釈	- / -	- / -
5倍希釈	37.2 / 38.1	37.6 / 37.3
10倍希釈	36.2 / 35.7	34.6 / 34.2

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 19 前処理していないしょうゆ試料からグリコーゲンを用いて DNA 抽出したもののリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	Le1	18S rDNA	IPC
S01	- / -	34.0 / 34.3	33.1 / 33.0
S17	- / -	15.1 / 15.1	34.2 / 34.0
S18	- / -	25.9 / 26.0	34.0 / 34.3
S19	- / -	29.9 / 29.8	34.3 / 34.9
S24	- / -	30.8 / 30.7	38.9 / 39.0
S29	- / -	28.0 / 27.9	35.0 / 34.5
S33	- / -	34.3 / 35.0	34.6 / 34.2

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 20 前処理していないコーンフレーク試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
C01	- / 42.1	40.6 / 42.4	26.4 / 26.3	26.5 / 26.5	34.1 / 34.0	34.6 / 34.7
C02	- / -	- / -	32.9 / 32.5	32.1 / 32.3	34.8 / 34.2	34.9 / 34.2
C03	- / -	- / -	32.7 / 32.6	30.9 / 30.9	34.5 / 34.8	35.1 / 35.4
C04	- / -	- / -	20.1 / 20.1	20.3 / 20.3	34.5 / 34.1	36.2 / 36.9
C05	- / -	- / -	18.9 / 18.9	18.7 / 18.8	34.7 / 34.4	34.1 / 34.2

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 21 前処理していないコーンフレーク試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
C01	41.3 / 38.8	- / -	24.8 / 24.9	24.9 / 25.0	33.4 / 33.8	33.6 / 34.3
C02	39.7 / 40.9	- / -	30.0 / 30.2	30.6 / 30.6	33.5 / 33.4	33.8 / 33.9
C03	- / 43.2	- / -	31.0 / 30.9	31.6 / 31.7	34.3 / 34.1	33.5 / 34.3
C04	- / -	- / -	23.4 / 23.4	32.1 / 36.0	- / -	34.7 / 35.2
C05	- / -	- / -	28.2 / 28.2	28.0 / 28.7	- / -	- / -

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 22 前処理していないコーンフレーク試料のリアルタイム PCR 結果 (DNeasy Plant Maxi Kit)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
C01	- / -	- / -	30.4 / 30.3	29.7 / 29.8	34.9 / 33.8	34.1 / 33.9
C02	- / -	- / -	34.6 / 34.4	33.0 / 33.0	34.8 / 34.0	34.0 / 34.2
C03	- / -	- / -	34.5 / 34.6	32.9 / 32.9	34.5 / 34.0	34.3 / 34.1
C04	- / -	- / -	36.9 / 37.3	31.4 / 32.5	- / -	- / -
C05	- / -	- / -	36.9 / 38.4	34.1 / 33.4	- / -	- / -

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 23 前処理していないコーンフレーク試料からグリコーゲンを用いて DNA 抽出したもののリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
C01	40.7 / 40.3	39.0 / 39.0	25.8 / 25.9	24.9 / 25.0	33.5 / 34.1	34.0 / 34.5
C02	- / -	- / 41.6	31.0 / 30.7	31.0 / 31.0	34.0 / 34.1	34.1 / 34.0
C03	34.8 / 34.7	37.7 / 37.5	31.0 / 30.8	30.9 / 30.8	33.9 / 34.1	34.5 / 34.3
C04	42.6 / 40.8	40.9 / 40.5	20.0 / 20.0	19.3 / 19.4	34.6 / 34.3	34.0 / 34.3
C05	- / -	- / -	20.2 / 20.2	20.1 / 20.2	38.8 / 38.6	39.5 / 38.7

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 24 前処理したコーンフレーク試料からグリコーゲンを用いて DNA 抽出したもののリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
C01	35.6 / 35.3	32.9 / 32.9	25.9 / 25.8	28.5 / 28.7	34.3 / 35.0	34.7 / 34.0
C02	32.9 / 32.6	30.3 / 30.3	34.0 / 34.1	31.8 / 31.6	34.5 / 33.9	33.9 / 34.5
C03	31.7 / 31.9	35.8 / 35.6	30.3 / 30.3	33.9 / 33.6	34.2 / 33.9	34.5 / 34.7
C04	35.4 / 35.0	36.8 / 35.8	25.9 / 25.7	25.6 / 25.7	34.3 / 34.5	34.3 / 34.2
C05	33.0 / 33.0	34.9 / 35.5	22.6 / 22.6	22.4 / 22.6	34.2 / 34.4	34.1 / 34.2

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 25 デキストリン試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
D01	- / -	- / -	36.9 / 36.7	35.3 / 34.6	34.9 / 36.0	34.7 / 35.3
D02	- / -	- / -	30.9 / 30.9	30.3 / 30.2	34.5 / 34.4	34.6 / 34.8
D03	- / -	34.6 / 34.4	35.7 / 35.7	32.7 / 33.1	34.8 / 35.2	35.3 / 34.7
D04	- / -	- / -	33.2 / 33.5	33.4 / 33.1	34.5 / 34.6	34.8 / 34.6
D05	35.1 / 34.1	36.6 / 37.2	16.1 / 16.0	16.1 / 16.2	34.2 / 34.1	34.9 / 34.7
D06	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 26 デキストリン試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
D01	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
D02	- / -	- / -	30.0 / 29.9	30.1 / 30.1	33.5 / 34.2	34.4 / 34.2
D03	- / -	- / -	35.3 / 35.7	35.2 / 35.2	34.6 / 33.8	33.8 / 33.9
D04	32.9 / 32.9	- / 44.0	35.4 / 34.4	34.1 / 34.7	34.4 / 34.2	34.3 / 33.9
D05	31.8 / 31.9	31.6 / 31.6	16.3 / 16.3	16.0 / 16.0	35.0 / 35.2	34.5 / 34.8
D06	- / -	- / -	32.4 / 32.5	30.1 / 30.3	40.1 / 39.8	36.8 / 36.1

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 27 デキストリン試料のリアルタイム PCR 結果 (DNeasy Plant Maxi Kit)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
D01	- / -	- / -	37.1 / 36.4	36.2 / 36.0	35.0 / 35.6	34.7 / 34.6
D02	- / -	38.1 / 38.1	34.6 / 34.6	34.8 / 34.8	34.4 / 34.8	34.8 / 34.8
D03	- / -	- / 41.7	34.6 / 35.5	35.7 / 36.9	34.3 / 34.3	34.8 / 34.7
D04	40.8 / 40.3	40.8 / 41.3	36.0 / 37.4	37.5 / 38.0	34.8 / 34.0	34.5 / 35.1
D05	37.2 / 38.0	36.8 / 37.2	17.1 / 17.1	17.4 / 17.4	35.0 / 34.4	34.2 / 34.5
D06	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 28 液糖試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
E01	- / -	- / -	35.2 / 35.2	38.5 / 37.8	34.3 / 34.7	34.5 / 34.5
E02	- / -	- / -	37.1 / 37.3	38.0 / 40.4	34.3 / 35.2	34.1 / 34.3
E03	- / -	- / -	35.0 / 35.4	37.4 / 36.2	34.5 / 34.3	34.7 / 35.0
E04	- / -	44.0 / -	35.5 / 36.9	33.1 / 33.3	34.0 / 34.5	33.4 / 34.3

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 29 液糖試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
E01	- / -	- / -	37.1 / 36.6	36.1 / 36.7	33.5 / 34.7	34.0 / 34.5
E02	- / -	- / -	38.5 / 38.9	36.9 / 37.5	33.9 / 34.1	33.9 / 33.9
E03	- / -	- / -	38.7 / -	40.1 / 37.7	34.2 / 33.7	34.4 / 34.2
E04	- / -	- / -	38.9 / 39.8	32.1 / 31.9	34.3 / 35.0	33.7 / 33.7

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 30 液糖試料のリアルタイム PCR 結果 (DNeasy Plant Maxi Kit)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
E01	- / -	- / -	37.3 / 36.3	37.5 / 37.5	34.8 / 34.6	35.1 / 34.5
E02	- / -	- / -	37.2 / 37.9	38.6 / 37.3	35.0 / 34.8	34.0 / 34.3
E03	- / -	- / -	36.2 / 36.3	37.5 / 36.9	35.2 / 34.5	34.9 / 34.8
E04	- / -	- / -	37.0 / 37.6	35.6 / 37.1	34.3 / 34.4	34.5 / 34.6

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 31 スケールアップして DNA 抽出した液糖試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
E01	- / -	- / 42.8	35.6 / 35.8	34.0 / 34.4	34.7 / 35.0	34.8 / 34.4
E04	- / -	- / -	33.5 / 32.9	36.1 / 35.7	36.0 / 35.7	37.2 / 36.8

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 32 穀物酢試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIb		18S rDNA	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
K01	- / -	- / -	38.7 / 37.0	37.0 / 36.6
K02	- / -	- / -	39.1 / 40.9	37.3 / 36.4
K03	- / -	- / -	37.9 / 37.7	35.6 / 35.0

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 33 穀物酢試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	SSIb		18S rDNA	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
K01	- / -	- / -	40.5 / -	36.1 / 36.4
K02	- / -	- / -	37.7 / 37.6	38.1 / 37.4
K03	- / -	- / -	37.2 / 36.5	35.9 / 36.7

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 34 穀物酢試料のリアルタイム PCR 結果 (DNeasy Plant Maxi Kit)

試料	SSIb		18S rDNA	
	抽出1	抽出2	抽出1	抽出2
K01	- / -	- / -	40.2 / 38.8	38.0 / 38.0
K02	- / -	- / -	38.0 / 38.5	38.5 / 38.7
K03	- / -	- / -	39.4 / 38.7	37.5 / 38.8

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 35 植物油試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 20/G)

試料	内在性遺伝子配列*				18S rDNA				IPC									
	抽出 1		抽出 2		抽出 1		抽出 2		抽出 1		抽出 2							
A01	-	/	-	-	39.1	/	38.4	36.8	/	35.9	34.5	/	34.2	34.0	/	34.0		
A02	-	/	-	-	37.4	/	36.6	39.3	/	38.5	33.6	/	34.9	34.5	/	34.0		
A03	-	/	-	42.4	/	42.5	36.9	/	39.7	37.4	/	36.3	34.5	/	33.8	34.9	/	34.1
A04	39.8	/	-	-	35.6	/	35.1	37.9	/	37.4	34.1	/	34.0	34.0	/	34.5		
A05	-	/	-	-	37.1	/	39.5	39.6	/	36.8	33.9	/	33.8	33.9	/	34.2		
A06	41.1	/	-	-	37.0	/	36.9	39.1	/	40.7	34.2	/	34.2	34.5	/	33.7		
A07	-	/	-	-	39.1	/	37.3	37.9	/	40.7	34.3	/	34.2	33.8	/	34.4		
A08	-	/	-	-	36.9	/	36.9	38.9	/	39.2	33.6	/	33.8	34.4	/	34.2		
A09	-	/	-	-	37.1	/	37.3	38.5	/	38.1	34.1	/	34.3	34.6	/	34.1		
A10	-	/	-	-	37.7	/	37.0	37.0	/	37.9	34.0	/	34.2	34.0	/	34.0		
A11	-	/	-	-	37.3	/	35.9	37.9	/	37.3	33.8	/	34.6	34.9	/	33.6		
A12	-	/	-	-	37.2	/	35.6	35.6	/	35.4	33.8	/	34.2	34.2	/	34.8		
A13	-	/	-	-	37.5	/	37.0	36.0	/	35.9	33.7	/	33.8	34.3	/	33.9		
A14	-	/	-	-	35.7	/	36.2	39.8	/	38.4	34.5	/	34.3	33.9	/	34.2		
A15	-	/	-	-	35.9	/	35.9	37.5	/	37.4	33.7	/	34.4	34.0	/	34.2		
A16	-	/	-	-	38.5	/	37.6	38.2	/	39.0	34.1	/	33.9	34.0	/	34.0		

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

*A01~02 は SSIIb (トウモロコシ)、A03~06 は Le1 (ダイズ)、A07~13 は HMG (ナタネ)、A14~16 は SAH7 (ワタ) を使用

表 36 植物油試料のリアルタイム PCR 結果 (DNeasy Plant Maxi Kit)

試料	内在性遺伝子配列*				18S rDNA				IPC									
	抽出 1		抽出 2		抽出 1		抽出 2		抽出 1		抽出 2							
A01	-	/	-	-	38.6	/	38.1	36.6	/	37.0	34.3	/	34.3	34.6	/	33.6		
A02	-	/	-	-	36.1	/	36.5	37.4	/	37.0	34.2	/	33.7	34.1	/	34.2		
A03	-	/	-	-	37.0	/	37.0	35.8	/	35.0	38.2	/	33.9	34.2	/	34.5		
A04	-	/	-	-	37.8	/	36.9	37.4	/	36.3	34.3	/	33.8	34.0	/	34.1		
A05	-	/	-	-	38.0	/	37.7	38.1	/	37.9	33.9	/	34.2	34.4	/	33.4		
A06	40.6	/	-	39.5	/	39.6	36.3	/	36.1	36.1	/	36.4	34.6	/	33.7	34.4	/	34.1
A07	-	/	-	-	35.9	/	35.5	37.6	/	38.1	34.3	/	34.1	33.8	/	34.3		
A08	-	/	-	-	38.2	/	37.5	36.7	/	37.1	34.2	/	34.0	33.9	/	33.5		
A09	-	/	-	-	37.8	/	36.9	36.9	/	37.4	34.3	/	34.4	34.5	/	34.5		
A10	-	/	-	-	38.0	/	36.8	36.5	/	36.1	33.9	/	33.8	34.1	/	34.2		
A11	-	/	-	-	31.4	/	31.5	36.5	/	37.1	34.6	/	33.6	33.8	/	34.5		
A12	-	/	-	-	34.4	/	34.0	38.0	/	37.1	34.1	/	34.3	33.7	/	33.9		
A13	-	/	-	-	35.8	/	35.3	35.7	/	35.9	33.9	/	34.9	33.8	/	33.9		
A14	-	/	-	-	38.4	/	37.5	36.4	/	36.0	33.9	/	34.0	33.7	/	34.4		
A15	-	/	-	-	37.1	/	36.9	34.9	/	35.6	34.0	/	34.4	33.9	/	34.7		
A16	-	/	-	-	36.9	/	37.0	37.4	/	38.4	34.5	/	34.3	34.2	/	34.5		

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

*A01~02 は SSIIb (トウモロコシ)、A03~06 は Le1 (ダイズ)、A07~13 は HMG (ナタネ)、A14~16 は SAH7 (ワタ) を使用

表 37 てん菜糖試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	GS				18S rDNA				IPC									
	抽出 1		抽出 2		抽出 1		抽出 2		抽出 1		抽出 2							
T01	-	/	40.2	39.0	/	-	30.9	/	31.0	33.7	/	33.4	34.4	/	34.8	34.2	/	34.7
T02	-	/	-	-	/	-	41.3	/	40.4	38.6	/	39.6	36.3	/	36.5	34.8	/	35.0
T03	-	/	-	-	/	-	29.7	/	30.1	29.9	/	30.0	36.0	/	36.0	35.5	/	36.6
T04	-	/	-	-	/	-	40.3	/	39.5	38.0	/	37.2	34.4	/	34.1	34.6	/	34.0
T05	-	/	-	-	/	-	38.4	/	37.1	39.4	/	40.5	34.2	/	35.3	34.3	/	34.1
T06	-	/	-	-	/	-	38.0	/	36.6	34.9	/	34.7	34.3	/	34.5	33.9	/	33.9
T07	-	/	-	-	/	-	34.5	/	34.9	37.0	/	37.6	34.4	/	34.1	34.0	/	33.7
T08	-	/	-	-	/	-	38.6	/	39.5	-	/	39.3	33.7	/	34.5	33.7	/	33.6

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 38 てん菜糖試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	GS		18S rDNA		IPC	
	抽出 1	抽出 2	抽出 1	抽出 2	抽出 1	抽出 2
T01	- / -	- / -	36.7 / 36.1	37.2 / 36.5	34.1 / 34.6	33.5 / 33.4
T02	- / -	- / -	39.9 / 39.6	- / 39.8	- / 33.6	33.5 / 33.4
T03	- / -	- / -	33.9 / 33.8	35.4 / 34.9	34.0 / 35.2	34.0 / 34.0
T04	- / -	- / -	39.2 / 39.8	35.5 / 35.5	33.8 / 34.2	33.8 / 34.2
T05	- / -	- / -	40.5 / 38.8	35.8 / 36.3	33.8 / 33.5	34.1 / 33.7
T06	- / -	- / -	36.4 / 36.9	31.9 / 32.2	34.1 / 33.6	34.1 / 33.7
T07	- / -	- / -	37.4 / 36.6	39.0 / 35.9	34.0 / 34.2	33.9 / 33.6
T08	- / -	- / -	37.1 / 37.6	39.5 / 39.1	34.0 / 33.7	34.0 / 33.4

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 39 水飴試料のリアルタイム PCR 結果 (Genomic-tip 100/G)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出 1	抽出 2	抽出 1	抽出 2	抽出 1	抽出 2
M01	- / -	- / 44.2	39.9 / 39.3	38.5 / 39.6	34.1 / 34.3	33.9 / 34.4
M02	- / -	- / -	- / 40.6	42.7 / 39.9	34.2 / 34.5	34.3 / 34.6
M03	- / -	- / -	36.6 / 36.0	39.9 / -	34.2 / 33.8	35.2 / 34.5
M04	- / -	- / -	- / -	38.6 / 38.7	- / -	34.5 / 34.4
M05	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
M06	- / -	- / -	43.3 / 41.3	40.3 / 41.2	36.4 / 36.1	34.9 / 34.5
M07	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

表 40 水飴試料のリアルタイム PCR 結果 (GM quicker 4)

試料	SSIb		18S rDNA		IPC	
	抽出 1	抽出 2	抽出 1	抽出 2	抽出 1	抽出 2
M01	- / -	- / -	38.1 / 38.9	38.9 / 38.8	33.8 / 33.9	33.6 / 34.3
M02	- / -	- / -	40.6 / 38.4	38.9 / 39.0	33.8 / 34.1	33.6 / 33.8
M03	- / -	- / -	32.8 / 33.0	- / 40.9	34.0 / 34.1	34.4 / 34.0
M04	- / -	- / -	33.5 / 33.7	33.1 / 33.2	33.8 / 34.0	33.8 / 33.9
M05	- / -	- / -	39.0 / 39.6	38.5 / 40.4	34.2 / 34.1	34.4 / 34.3
M06	- / -	- / -	37.5 / 38.9	- / -	33.9 / 35.0	- / -
M07	- / -	- / -	38.9 / 40.7	- / -	34.3 / 34.0	34.5 / 34.1

数値：リアルタイム PCR の C_q 値 - : 増幅曲線が得られなかったウェル

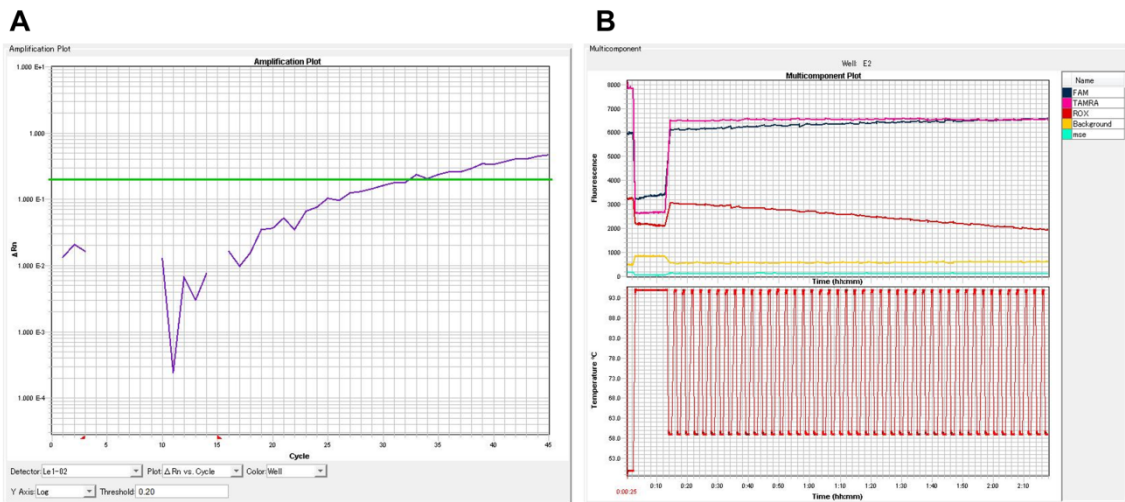


図1 Quick Gene SP kitで抽出したしょうゆ試料 S27 のリアルタイム PCR における Amplification Plot と Multicomponent Plot
 (A) Amplification Plot (Threshold line = 0.20)、(B) Multicomponent Plot。Multicomponent Plot の青線は FAM、ピンク線は TAMRA、赤線は ROX、黄色はバックグラウンド、水色線は msec を示す。

II 新しい遺伝子組換え作物の定量検査技術に関する調査

遺伝子検査の今後の在り方として、主に 2 つの重要な項目がある。1 つは、**cost-effective** であり、もう 1 つはマルチプレックス **multiplex** 化である。定量 PCR 法としては、現在定量リアルタイム PCR が主流であるが、上記条件を満たす技術として近年デジタル PCR (dPCR) が遺伝子組換え作物検査で注目されている。デジタル PCR であるため、検量線を必要としない絶対定量検査が可能であることに加えて、マルチプレックス測定 (多項目同時検出) が可能で、定量リアルタイム PCR では問題になる PCR 阻害の影響を受けないため、より正確な定量検査が可能と考えられているが、これまで詳細な検討は行われていなかった。

今回文献調査したところ、欧州のグループを中心にデジタル PCR の定量性に関する詳細な報告が 2 報あった。

文献 1 : Multiplex quantification of four DNA target in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. *Scientific Reports*, 6:35451 (2016)

要 約 : 2 つの異なる蛍光色素を用いる 8plex (内在性遺伝子の他に 7 GM 遺伝子を標的に) の定量 PCR を精度良く行うことができた。

文献 2 : Multiplex quantification of 12 EU authorized GM maize lines with droplet digital PCR. *Analytical Chemistry*, 87, 8218 (2015).

要 約 : 文献 1 の基礎となる論文である。12 種類の承認済 GM トウモロコシを用いて、Single と multiplex (4plex, 10plex) で性能比較した。定量性は 50 コピーから 100,000 コピーまで良好であった。