

**技術レポート****3 遺伝子組換え小麦 (MON71800) の 1 %混入判定試験法の検討**

橋本 仁康\*, 笠原 正輝\*, 會田 紀雄\*

**Study of Detection Test for Contamination of Genetically Modified Wheat (MON71800)**

Yoshiyasu HASHIMOTO\*, Masaki KASAHARA\* and Norio AITA\*

(\* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

**1 緒 言**

日本では安全性未確認である除草剤耐性遺伝子組換え小麦 MON71800 が、平成 25 年 5 月米国で自生していることが確認され、飼料安全法<sup>1)</sup>に基づくリスク管理手法として、モンサント・カンパニーから提供された定性試験法を参考に、定性試験法の通知<sup>2)</sup>が发出された。

MON71800 は、日本で飼料としての安全性が確認されていないが、日本と同等以上の安全性確認審査制度を有する米国において、商業化はされなかったが食品及び飼料としての安全性が確認されているため、飼料安全法に基づく告示<sup>3)</sup>に基づき、1 %の混入基準が適用されることとなっている。

1 %の混入基準に基づくリスク管理を実地で行うためには、MON71800 の混入率が 1 % を上回るかどうか判定するための試験法が必要である。今回、MON71800 由来の DNA 濃度を 1 % に調製した DNA 試料液 (1 %陽性試料液) を用いた 1 % 混入判定試験法について検討したので、その概要を報告する。なお、当分析法は、平成 25 年 9 月 9 日付けで定性試験法の通知に追加収載された<sup>4)</sup>。

**2 実験方法****2.1 試 薬**

- 1) DNA 抽出キット : QIAGEN 製 QIAGEN DNeasy Plant Maxi kit 及び QIAGEN DNeasy Plant Mini kit
- 2) PCR 反応用酵素 : Roch Diagnostics 製 FastStart Universal Probe Master (ROX).
- 3) プライマー及びプローブ : Life Technologies 製 MON71800 検知用プライマー (SQ0718 & SQ0719) 及びプローブ (PB0101)<sup>2)</sup>, 小麦陽性対照試験用プライマー (PRP8F & PRPds6R) 及びプローブ (PRP-Taq5)<sup>2)</sup>
- 4) エタノール及びイソプロパノールは、特級を用いた。
- 5) TE バッファー : ニッポンジーン製 TE (pH8.0)
- 6) 水は、滅菌した超純水 (電気伝導率 5.6  $\mu\text{S}/\text{m}$  以下 (比抵抗 18  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  以上)) を用いた。

---

\*独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

## 2.2 装置及び器具

- 1) 分光光度計 : Thermo Fisher Scientific 製 NanoDrop 1000
- 2) リアルタイム PCR 装置 : Life Technologies 製 ABI7900HT

## 2.3 試料

### 1) 陰性試料液の調製

平成 23 年産の国産小麦 (非遺伝子組換え) を 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎したものを、通知<sup>2)</sup>に従って QIAGEN DNeasy Plant Maxi kit を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA 溶液は、分光光度計で 280, 260, 230 nm の波長における吸光度を測定することにより DNA の濃度及び純度を確認した後、水で 10 ng/ $\mu$ L に調製したものを陰性試料液とした。

### 2) 陽性試料液の調製

モンサント・カンパニーより提供された陽性試料 (MON71800 の種子 1 粒に対し 14 粒の非遺伝子組換え小麦を混合したものから DNA を抽出し、乾燥させたもの) は、粗精製した DNA を乾燥したものであり、1%混入判定試験の陽性試料液としてそのまま用いるには不十分と考えられたため以下の方法により再精製を行い、陽性試料液とした。

#### i) 溶解

陽性試料として提供された乾燥 DNA に 200  $\mu$ L の TE バッファーを添加し、攪拌して十分混和した後、室温で 24 時間静置し、DNA を溶解した。

#### ii) 精製

溶解した DNA を QIAGEN DNeasy Plant Mini kit を用いて (操作方法はキット添付のマニュアルから改良した方法) 精製した。手順は、以下のとおりである。なお、水以外の試薬は、キット付属のものを使用した。

1. 溶解した DNA に 100 mg/mL の RNase A 8  $\mu$ L 及び Buffer AP1 800  $\mu$ L を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した後、65  $^{\circ}$ C で 10 分間保温した (この間チューブを 2~3 回ボルテックスミキサーで攪拌した。 ) 。
2. Proteinase K 20  $\mu$ L を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した後、65  $^{\circ}$ C で 10 分間保温した (その間、チューブを 2~3 回ボルテックスミキサーで攪拌した。 ) 。
3. Buffer P3 260  $\mu$ L を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した後、氷中に 5 分間放置した。
4. 遠心分離 (20000 $\times$ g, 5 分間, 室温) 後、上澄みを QIA shredder Mini Spin Column に負荷し、遠心分離 (20000 $\times$ g, 5 分間, 室温) 後、カラムのろ液を 50 mL チューブに移した (液がなくなるまで繰り返した。 ) 。
5. ろ液の 1.5 倍量の Buffer AW1 を添加し、攪拌した。
6. DNeasy Mini spin column に混合液を負荷し、遠心分離 (6000 $\times$ g 以上, 室温, 1 分間) し、ろ液を廃棄した (混合液がなくなるまで繰り返した。 ) 。
7. Buffer AW2 を 500  $\mu$ L 負荷後、遠心分離 (6000 $\times$ g 以上, 室温, 1 分間) し、ろ液を廃棄した。
8. カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、水を 50  $\mu$ L を負荷し、室温で 5 分間放置した。
9. 遠心分離 (6000 $\times$ g 以上, 室温, 1 分間) 後、そのろ液を DNA 溶液とした。

精製した DNA 溶液は、分光光度計にて 280, 260, 230 nm の波長における吸光度を測定することにより DNA の濃度及び純度を確認した後、水で希釈して 10 ng/ $\mu$ L に調製したものを

6.67 % MON71800 含有陽性試料液（以下「6.67 %陽性試料液」とする）とした。

### 3) 1 %標準液の調製

6.67 %陽性試料液を陰性試料液で希釈して1 %陽性試料液（以下「1 %標準液」とする）を調製した。調製した1 %標準液は、30  $\mu$ L ずつ290本に分注した。

## 2.4 試験方法

### 1) PCR 反応

PCR 反応液は25  $\mu$ L/well として調製した。その組成は次のとおりである。FastStart Universal Probe Master (Rox) 12.5  $\mu$ L, 各対象プライマー溶液（各50  $\mu$ mol/L）各0.25  $\mu$ L, 対象プローブ溶液（10  $\mu$ mol/L）0.5  $\mu$ L を混合し、水で全量20  $\mu$ L に調製後、DNA 試料液5  $\mu$ L（10 ng/ $\mu$ L）を添加した。

試料溶液の入ったPCR プレートを実タイム PCR 装置に入れ、50  $^{\circ}$ C で2分間保持した後、95  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C で15秒間、60  $^{\circ}$ C で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。なお、PCR 反応は、試料液1点につきMON71800 検知試験用及び陽性対照試験用について各2 well 並行で行った。

### 2) PCR 反応による増幅の判定

結果の判定は Amplification plot 上で指数関数的な増幅曲線と Ct 値の確認、及び multicomponent 上での対象蛍光色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。ベースラインを3サイクルから15サイクルで設定し、 $\Delta$ Rn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わる Threshold line (Th. line) として0.2 に設定した。その Th. line から Ct 値が得られるか否かを解析し、43未満の Ct 値が得られた場合にPCR 反応による増幅があったと判定した。

## 2.5 測定値の確定方法

リアルタイム PCR より得られた結果については、以下の2つの方法で測定値を確定した。

#### ①Ct 比率法

MON71800 検知試験の Ct 値と小麦陽性対照試験の Ct 値を求め、（MON71800 検知試験の Ct 値） / （小麦陽性対照試験の Ct 値）を算出した（Ct 値比率）。なお、この方法で測定値を求めると、MON71800 濃度が高いほど Ct 値比率は小さくなる。

#### ②比較 Ct 法

MON71800 検知試験の Ct 値と小麦陽性対照試験の Ct 値との差（ $\Delta$ Ct 値）を算出した。なお、この方法で測定値を求めると、MON71800 濃度が高いほど  $\Delta$ Ct 値が小さくなる。

## 3 結果及び考察

### 3.1 1 %標準液の均質性確認

2.3 3)で調製した1 %標準液の均質性を確認するため、分注したチューブからランダムに20本選択し、リアルタイム PCR を行った。PCR 反応は、試料液10点ずつを2回行った。測定した結果から①Ct 比率法及び②比較 Ct 法の2つの判定方法で測定値を算出し、その値について Cochran 検定により外れ値検定を行った後、一元配置分散分析にて確認した。

その結果、均質性に問題は認められなかった。また、①及び②の判定方法で得られた相対標準偏差は、それぞれ1.1%、6.1%であった。

この結果より、1%標準液の均質性に問題がないことが確認されたので、今回調製した1%標準液を今後、1%混入判定の基準とすることとした。なお、1%標準液は-20℃で保管し、使用毎に融解して使用し、再凍結等を行わないこととした。

3.2 1%標準液を用いた混入率の判定

6.67%陽性試料液を陰性試料液で希釈して、MON71800濃度として3%、2%、1.5%及び0.5%濃度の試料液を各濃度38本ずつ調製し、ランダムに20本選択し、1%標準液を判定基準としたリアルタイムPCRを行った。リアルタイムPCRは、各濃度の試料液を2点ずつ10回行い、毎回、1%標準液も反応を行った。測定した結果は、①及び②の測定値決定法により各試料の測定値を求め、1%標準液の測定値と比較した。なお、結果の判定において、測定値判定法①では、1%標準のCt値比よりもCt値比が小さい場合が1%以上の混入となり、②では、1%標準のΔCt値よりもΔCt値が小さい場合が1%以上の混入と判定される。

その結果は、表1及び2のとおりである。①及び②のどちらの測定値決定法を用いても、全てのサンプルで1%より混入濃度が高いかどうかの判定を正確に行うことができた。

表1：定性判定【Ct比率法】（1%以上を+、1%未満を-と判定）

反応	1%標準	0.50%*		1.50%*		2.00%*		3.00%*	
	Ct値の比**	Ct値の比**	判定	Ct値の比**	判定	Ct値の比**	判定	Ct値の比**	判定
1回目	1.208	1.256	-	1.191	+	1.181	+	1.144	+
		1.245	-	1.170	+	1.172	+	1.135	+
2回目	1.187	1.261	-	1.181	+	1.166	+	1.129	+
		1.222	-	1.178	+	1.167	+	1.124	+
3回目	1.196	1.234	-	1.179	+	1.171	+	1.123	+
		1.216	-	1.164	+	1.146	+	1.113	+
4回目	1.201	1.251	-	1.164	+	1.159	+	1.118	+
		1.257	-	1.180	+	1.157	+	1.113	+
5回目	1.189	1.224	-	1.167	+	1.180	+	1.117	+
		1.213	-	1.173	+	1.160	+	1.126	+
6回目	1.212	1.241	-	1.175	+	1.146	+	1.123	+
		1.277	-	1.178	+	1.154	+	1.124	+
7回目	1.196	1.209	-	1.167	+	1.161	+	1.129	+
		1.245	-	1.178	+	1.169	+	1.123	+
8回目	1.207	1.237	-	1.175	+	1.162	+	1.120	+
		1.255	-	1.188	+	1.165	+	1.124	+
9回目	1.218	1.249	-	1.165	+	1.151	+	1.117	+
		1.228	-	1.188	+	1.163	+	1.116	+
10回目	1.198	1.228	-	1.174	+	1.146	+	1.117	+
		1.229	-	1.165	+	1.150	+	1.134	+

\*濃度はMON71800の混入濃度を示している

\*\*MON71800検知試験のCt値/小麦陽性対照試験のCt値

表 2：定性判定【比較 Ct 法】（1%以上を+, 1%未満を-と判定）

反応	1%標準	0.50%*		1.50%*		2.00%*		3.00%*	
	Ct値の差**	Ct値の差**	判定	Ct値の差**	判定	Ct値の差**	判定	Ct値の差**	判定
1回目	6.072	7.567	-	5.647	+	5.332	+	4.309	+
		7.246	-	5.053	+	5.087	+	4.033	+
2回目	5.499	7.622	-	5.328	+	4.884	+	3.869	+
		6.490	-	5.249	+	4.939	+	3.701	+
3回目	5.813	6.882	-	5.286	+	5.109	+	3.705	+
		6.344	-	4.873	+	4.374	+	3.420	+
4回目	5.964	7.371	-	4.861	+	4.711	+	3.542	+
		7.547	-	5.309	+	4.669	+	3.403	+
5回目	5.564	6.577	-	4.946	+	5.322	+	3.533	+
		6.303	-	5.136	+	4.733	+	3.778	+
6回目	6.240	7.083	-	5.204	+	4.367	+	3.713	+
		8.145	-	5.260	+	4.613	+	3.738	+
7回目	5.801	6.137	-	4.975	+	4.779	+	3.854	+
		7.177	-	5.266	+	5.040	+	3.706	+
8回目	6.113	6.983	-	5.174	+	4.800	+	3.625	+
		7.492	-	5.565	+	4.919	+	3.742	+
9回目	6.438	7.305	-	4.898	+	4.524	+	3.537	+
		6.708	-	5.573	+	4.828	+	3.505	+
10回目	5.847	6.701	-	5.145	+	4.349	+	3.513	+
		6.742	-	4.910	+	4.486	+	4.026	+

\*濃度はMON71800の混入濃度を示している

\*\*MON71800検知試験のCt値と小麦陽性対照試験のCt値との差(ΔCt値)

#### 4 まとめ

遺伝子組換え小麦 MON71800 について 1%混入判定法の検討を行い、次の結果を得た。

- 1) モンサント・カンパニーより提供された MON71800 混入 DNA 抽出液より 1%混入判定法における基準として用いる 1%標準液を調製した。これについて、均質性確認試験を行い、均質であることを確認した。
- 2) 6.67%陽性試料液を用いて調製した MON71800 濃度として 3, 2, 1.5 及び 0.5%濃度の試料液について、1%標準液を用いての混入判定試験を行ったところ、Ct 比率法及び比較 Ct 法のどちらの方法においても全ての濃度で正確に 1%より濃度が高いか低いかの判定をすることができた。
- 3) Ct 比率法及び比較 Ct 法のいずれの方法でも正確に 1%混入判定可能であることを確認できたが、比較 Ct 法の方が Ct 比率法よりも測定値が大きく判定をより明確にでき、判定法として望ましいと考えられたため、比較 Ct 法が通知には採用された<sup>4)</sup>。

#### 謝 辞

本分析法の開発にあたりご助言を頂きました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の内藤成弘博士、橘田和美博士、真野潤一博士に感謝の意を表します。また、試料の提供を頂きましたモンサント・カンパニーにお礼申し上げます。

※本レポートは情報提供のみを目的としたものです。「遺伝子組換え小麦 (MON71800) の 1%混入判定試験法の検討」と題されたこの公表文書はモンサント・カンパニーの所有する知的財産及び情報を含んでおり一件又はそれ以上の特許により保護されるもので、MON71800 系統特異的な検知法の公表によってその内容に関し農林水産省、独立行政法人農林水産消費安全技術センター及び公的試験機関以外による目的外の使用、応用を許諾するものではありません。またこの公表によってここに含まれ、引用される情報、材料、あるいは知的財産に関するいかなる使用権を

許諾するものでもありません。

## 文 献

- 1) 法律：飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律，昭和 28 年 4 月 11 日，法律第 35 号 (1953).
- 2) 農林水産省消費・安全局畜水産安全課長通知：遺伝子組換え小麦 (MON71800) の暫定検査法，平成 25 年 7 月 3 日，25 消安第 1707 号 (2013).
- 3) 農林水産省告示：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）別表第 1 の 1 の (1) のシただし書の規定に基づき，組換え DNA 技術によって得られた生物を含む飼料の安全性の確保に支障がないものとして農林水産大臣が定める基準を定める件，平成 23 年 9 月 1 日，農林水産省告示第 1674 号 (2011).
- 4) 農林水産省消費・安全局畜水産安全課長通知：遺伝子組換え小麦 (MON71800) の暫定検査法（追加），平成 25 年 9 月 9 日，25 消安第 1707-1 号 (2013).