

新たな任意表示制度に伴う 新規遺伝子組換え大豆検査法（ $\Delta\Delta\text{Cq}$ 法）と従来法の比較検討

Comparative Study of New Genetically Modified Soybean Testing Method ($\Delta\Delta\text{Cq}$ Method) in
Accordance with the New Voluntary Labeling System and Conventional Method

細川 葵 菅野 陽平

Aoi HOSOKAWA and Yohei SUGANO

Key words : genetically modified soybean (遺伝子組換え大豆) ; voluntary labeling system (任意表示制度) ;
 $\Delta\Delta\text{Cq}$ ($\Delta\Delta\text{Cq}$ 法) ; realtime PCR (リアルタイム PCR)

緒 言

遺伝子組換え（以下「GM」と略記）作物は有用な性質をもつ遺伝子を別の作物に組み込み、新しい性質を獲得させた作物である。日本では安全性審査済みの GM 作物 9 種類（333 品種）（2023 年 5 月 13 日現在）¹⁾ の流通・販売が認められている。これら GM 作物及びそれを原材料とした GM 加工食品には「遺伝子組換え」等の表示をする必要がある（義務表示）。GM 食品に関する表示制度には義務表示とその他に任意表示があるが、令和 5 年 4 月より新たな任意表示制度²⁾ が施行された。従来の任意表示制度では、分別生産流通管理（IP ハンドリング）された非 GM 作物を原材料とする加工食品について、意図せざる GM 作物の混入率が 5% 以下であれば「遺伝子組換えでない」等の表示が認められていた。一方、新任意表示制度では GM 作物が不検出の場合のみ「遺伝子組換えでない」等の表示が認められることとなった。

当所では、これまでダイズ穀粒の検査法（分別生産流通管理の判定に係る検査法³⁾、以下「従来法」と略記）により、定量 PCR 法による GM 大豆検査を行ってきた。しかし、新たな任意表示制度施行後は、定性 PCR 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⁴⁾、以下「 $\Delta\Delta\text{Cq}$ 法」と略記）により混入判定検査を行う必要がある。そこで、当所での $\Delta\Delta\text{Cq}$ 法導入に向けた基礎データの収集を目的に、従来法の GM 大豆の混入率と $\Delta\Delta\text{Cq}$ 法の混入判定結果について比較検討を行った。

方 法

1. 試料

当所で平成 25 年度から令和 3 年度まで GM 大豆検査を

実施した検体から、GM 混入率 0%～約 1% の 18 検体を選定した。DNA 試料液は、大豆穀粒から CTAB 法^{3, 5)} に準じて 1 検体につき 2 併行抽出した。

2. 定量 PCR による GM 大豆混入率判定方法（従来法）

従来法に従い、各 DNA 試料液に対し、GM 大豆（Roundup Ready Soybean（以下「RRS」と略記）、Liberty Link Soybean（以下「LLS」と略記）及び Roundup Ready 2 Yield（以下「RRS2」と略記））の混入率を算出した。リアルタイム PCR 装置は ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System（Applied Biosystems 製）もしくは QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 製）を用いた。

3. 定性 PCR による GM 大豆混入判定方法（ $\Delta\Delta\text{Cq}$ 法）

$\Delta\Delta\text{Cq}$ 法では、DNA 試料液と標準試料液の比較を行うことで GM 大豆の混入を判定する。各 DNA 試料液に対し、大豆内在性遺伝子であるレクチン 1（以下「Le1」と略記）、RRS 及び LLS に共通する GM 配列である *Cauliflower mosaic virus* 由来の 35S プロモーター（以下「P35S」と略記）ならびに RRS2 を標的としたリアルタイム PCR による検知試験を行う。リアルタイム PCR は各 DNA 試料液に対して 2 ウェル併行で行い、標準試料液用の標準プラスミド（GM Soy $\Delta\Delta\text{Cq}$ Standard Plasmid Set : NIPPON GENE 製）は、Le1 検知試験用に 100,000 コピー/ μL 、P35S 及び RRS2 検知試験用に 50 コピー/ μL を使用する。リアルタイム PCR では DNA の増幅に伴う蛍光シグナル (ΔRn) がある一定の値 (Threshold Line=0.2⁴⁾) に到達するまでに要したサイクル数を Cq 値と定義するが、P35S と RRS2 についてそれぞれの Cq 値から Le1 の Cq 値を引いて ΔCq 値とする [$\Delta\text{Cq} = \text{Cq}$ (組換え遺伝子 P35S or RRS2) - Cq (内在性遺伝子 Le1)]。さらに DNA 試料液の ΔCq 値から標準試料液の ΔCq 値を引いて $\Delta\Delta\text{Cq}$ 値を求

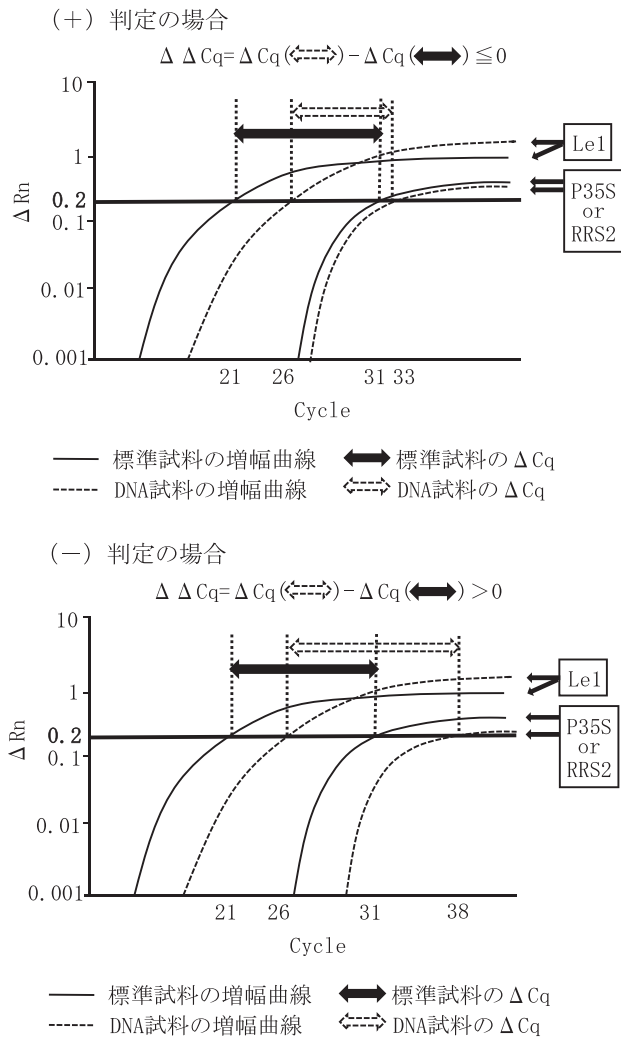


図1 PCR増幅曲線と ΔCq 及び $\Delta \Delta Cq$ 値の例

める $[\Delta \Delta Cq = \Delta Cq (\text{DNA 試料液}) - \Delta Cq (\text{標準試料液})]$ 。求めた $\Delta \Delta Cq$ 値が0以下の場合 $[\Delta \Delta Cq \leq 0]$ はそのウェルのDNA試料液を(+)、0より大きい場合 $[\Delta \Delta Cq > 0]$ は(-)と判定する(図1)。また、DNA試料液の Cq 値が得られず ΔCq 値が算出できない場合もそのウェルは(-)と判定する。以上の判定方法を用いて、2ウェル共に(+)と判定された場合「試料液陽性」、2ウェル共に(-)と判定された場合「試料液陰性」と判定する。2ウェルの判定が一致しない場合は当該試料液を再操作とする。また $\Delta \Delta Cq$ 法では、2併行抽出した試料液の判定結果が一致なかった場合、再度検体からDNA抽出を行う(再抽出)こととされている。

結果及び考察

1. P35S及びRRS2検知試験結果

P35S及びRRS2検知試験について、従来法によるGM混入率と $\Delta \Delta Cq$ 法によるGM混入判定結果を各々表1及び表2に示した。また、 Cq 値が得られた試料液について、GM混入率と $\Delta \Delta Cq$ 値(2ウェルの平均値)の関係を

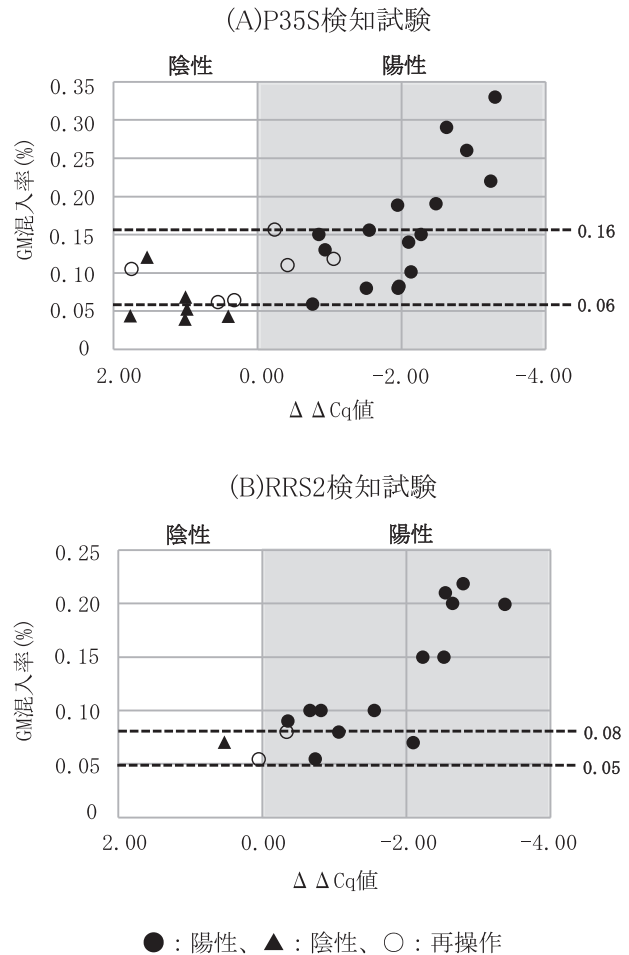


図2 試料液のGM混入率と $\Delta \Delta Cq$ 値の関係

(A)(B): Cq 値が算出された試料液のみ記載
 (B): GM混入率0.3%以上の試料液については省略

グラフにまとめたものを図2に示した。P35S検知試験では、従来法でDNA試料液のRRSとLLSの合計混入率が0.05%以下はすべて「試料液陰性」、0.06%以上0.16%以下は「試料液陽性」、「試料液陰性」または「再操作」とばらつきが認められ、0.19%以上はすべて「試料液陽性」であった。この結果から、0.2%以上の混入によりP35S検知試験結果が「試料液陽性」になると推測した。RRS2検知試験では、従来法でDNA試料液のRRS2混入率が0%はすべて「試料液陰性」、0.05%以上0.08%以下はP35S検知試験と同様に判定にばらつきが認められ、0.09%以上はすべて「試料液陽性」という結果となった。この結果から、0.1%以上の混入によりRRS2検知試験結果が「試料液陽性」になると推測した。いずれの検知試験でもGM混入率0%の場合は「試料液陰性」の判定となり、偽陽性は認められなかった。以上の結果から、従来法と $\Delta \Delta Cq$ 法の判定結果は概ね一致することがわかった。なお、今回の検討結果は、 $\Delta \Delta Cq$ 法を用いたGM大豆検査の妥当性確認のために行われた15機関による試験室間共同試験結果とほぼ一致していた⁶⁾。

試料液判定が再操作となったDNA試料液について、2

表 1 P35S 検知試験結果

従来法			新通知法				
RRS+LLS 混入率(%)	RRS 混入率(%)	LLS 混入率(%)	Cq	ΔCq	ΔΔCq	ウェル 判定	試料液 判定
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0	0	0	0			-	陰性
0.04	0.04	0	36.96	10.78	0.49	-	陰性
			37.99	11.80	1.51	-	
0.04	0.04	0	39.22	13.33	3.04	-	陰性
			36.66	10.77	0.48	-	
0.07	0.07	0	38.02	11.43	0.84	-	陰性
			38.35	11.74	1.15	-	
0.04	0.04	0	37.83	11.28	0.69	-	陰性
			37.24	10.69	0.11	-	
0.05	0.05	0	38.99	11.59	1.30	-	陰性
			38.39	10.94	0.65	-	
0.06	0.06	0	37.11	9.96	-0.32	+	再操作
			38.35	11.25	0.96	-	
0.06	0.06	0	36.66	9.34	-0.95	+	陽性
			36.99	9.70	-0.59	+	
0.06	0.06	0	36.87	9.98	-0.30	+	再操作
			38.56	11.68	1.40	-	
0.08	0	0.08	34.44	8.45	-1.85	+	陽性
			34.21	8.24	-2.06	+	
0.08	0	0.08	34.94	8.86	-1.44	+	陽性
			34.82	8.72	-1.59	+	
0.11	0.02	0.09	33.89	7.77	-2.52	+	陽性
			34.68	8.54	-1.75	+	
0.08	0.01	0.07	34.66	8.31	-1.98	+	陽性
			34.68	8.32	-1.96	+	
0.12	0.12	0	35.40	9.53	-0.75	+	陽性
			34.78	8.92	-1.36	+	
0.11	0.11	0	37.58	10.92	0.63	-	陰性
			39.79	13.15	2.86	-	
0.12	0	0.12	38.61	11.89	1.60	-	陰性
			38.49	11.75	1.46	-	
0.11	0	0.11	36.14	8.95	-1.33	+	再操作
			37.96	10.78	0.50	-	
0.15	0.15	0	35.56	9.23	-1.07	+	陽性
			35.95	9.66	-0.64	+	
0.13	0.13	0	35.18	9.13	-1.17	+	陽性
			35.68	9.60	-0.71	+	
0.14	0.02	0.12	34.79	8.41	-1.89	+	陽性
			34.34	7.98	-2.32	+	
0.15	0.02	0.13	34.60	8.17	-2.14	+	陽性
			34.37	7.89	-2.41	+	
0.16	0.16	0	35.48	8.85	-1.46	+	陽性
			35.34	8.65	-1.65	+	
0.16	0.16	0	35.89	9.70	-0.60	+	再操作
			35.17	10.43	0.13	-	
0.19	0.19	0	34.71	8.15	-2.44	+	陽性
			34.66	8.05	-2.53	+	
0.19	0.19	0	34.92	8.48	-2.11	+	陽性
			35.28	8.79	-1.79	+	
0.29	0.10	0.19	33.99	7.99	-2.59	+	陽性
			33.90	7.92	-2.67	+	
0.22	0.08	0.14	33.10	7.08	-3.50	+	陽性
			33.56	7.60	-2.98	+	
0.33	0.12	0.21	33.65	7.24	-3.07	+	陽性
			33.30	6.77	-3.53	+	
0.26	0.09	0.17	33.83	7.44	-2.86	+	陽性
			33.76	7.34	-2.96	+	

※各検体のデータごとに罫線を引いた。

表 2 RRS2 検知試験結果

従来法	新通知法				
RRS2 混入率(%)	Cq	ΔCq	ΔΔCq	ウエル 判定	試料液 判定
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0	0			-	陰性
0.05	37.38	11.01	-0.56	+	再操作
	38.60	12.23	0.66		
0.05	36.88	10.68	-0.89	+	陽性
	37.17	10.99	-0.58	+	
0.08	37.27	10.74	-0.33	+	再操作
	0			-	
0.07	38.42	11.89	0.82	-	陰性
	37.83	11.30	0.23	-	
0.09	37.52	10.79	-0.37	+	陽性
	37.56	10.81	-0.34	+	
0.07	35.53	8.35	-2.81	+	陽性
	36.95	9.77	-1.38	+	
0.08	36.63	10.31	-0.76	+	陽性
	36.01	9.72	-1.35	+	
0.10	35.85	9.80	-1.27	+	陽性
	35.32	9.24	-1.83	+	
0.10	36.85	10.44	-0.63	+	陽性
	36.60	10.07	-1.00	+	
0.10	37.14	10.75	-0.32	+	陽性
	36.49	10.08	-0.99	+	
0.15	35.72	9.35	-1.72	+	陽性
	34.70	8.34	-2.73	+	
0.15	35.08	8.65	-2.42	+	陽性
	34.93	8.45	-2.62	+	
0.20	34.24	8.25	-2.82	+	陽性
	34.58	8.61	-2.46	+	
0.21	34.10	8.02	-3.05	+	陽性
	35.15	9.04	-2.03	+	
0.22	35.82	8.53	-3.03	+	陽性
	36.34	9.04	-2.53	+	
0.20	34.36	7.39	-4.18	+	陽性
	36.02	9.02	-2.55	+	
0.79	32.73	6.72	-4.85	+	陽性
	32.80	6.82	-4.75	+	
0.86	32.68	6.66	-4.91	+	陽性
	32.85	6.89	-4.68	+	

※各検体のデータごとに罫線を引いた。

ウェル併行で再度 PCR を行ったところ、1 回目のウェル判定と異なった事例がいくつか認められた。そのため、検知試験において再操作となりうる範囲の GM 混入率（P35S 検知試験：0.06～0.16 %、RRS2 検知試験：0.05～0.08 %）の検体ではウェル判定結果及びそれに伴う試料液判定結果が必ずしも一定でないことがわかった。以上のことから、実際的大豆検体 GM 混入率がこれら範囲内にある場合は、検体判定確定のための再操作や再抽出の操作が必要になり、検査時間が増大する可能性が高いという点を留意する必要が示唆された。

2. 従来法による検査結果の数値（GM混入率）を用いた $\Delta\Delta Cq$ 法による判定結果の予想

従来法で「遺伝子組換えでない」の任意表示が可能な検体（当所での GM 大豆検査により GM 混入率 5%以下と判明した大豆全 144 検体）の GM 混入率の数値を、前述した

「試験液陽性」、「試験液陰性」となりうる推定 GM 混入率及び「判定にばらつきが生じる恐れ」のある推定 GM 混入率にあてはめ、P35S 及び RRS2 検知試験による試料液判定を行った。そして、その 2 つの検知試験の試料液判定結果の組み合わせから、 $\Delta\Delta Cq$ 法の検体判定法に従い模擬的に検体判定を試みた（図 3）。その結果、「検体陰性」となりうるものが 109 検体（75.7%）、「検体陽性」となりうるものが 17 検体（11.8%）、「判定にばらつきが生じる恐れ」のあるものが 18 検体（12.5%）となった。このことから、従来法では「遺伝子組換えでない」の表示が可能であった検体でも、新たな任意表示制度の基準では 2 割以上が表示違反になる可能性が示唆された。よって、大豆及び大豆加工食品販売業者は任意表示「遺伝子組換えでない」等を表示する際には、従来よりもより一層の注意が必要と考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省：安全性審査の手続を経た旨の公表がなされた遺伝子組換え食品及び添加物一覧，https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/bio/identshi/index.html（確認：2023 年 5 月 18 日）
- 2) 内閣府令第 24 号「食品表示基準の一部を改正する内閣府令」，平成 31 年 4 月 25 日
- 3) 消費者庁食品表示企画課第 139 号「食品表示基準について」別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」，平成 27 年 3 月 30 日
- 4) 消費者庁次長通知消食表第 389 号「「食品表示基準について」の一部改正について」，令和 3 年 9 月 15 日
- 5) 農林水産省消費技術センター（FAMIC）：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 第 3 版，http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/_doc/manual_3.pdf（確認：2023 年 5 月 18 日）
- 6) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）：新たな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公定検査法，https://www.naro.go.jp/project/results/5th_laboratory/nfri/2021/21_001.html（確認：2023 年 5 月 18 日）

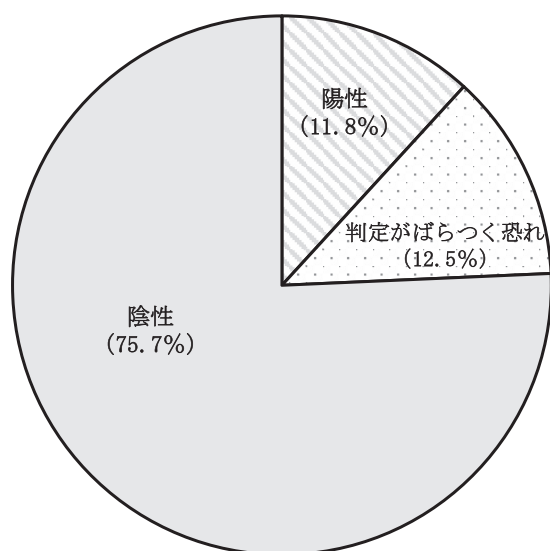


図 3 検査済み（従来法で陰性）検体の $\Delta\Delta Cq$ 法による判定予想