

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 暫定試験法の検証と実態調査

鶴田小百合・岩佐泰恵・内山亜喜子・赤木浩一

福岡市保健環境研究所保健科学課

Validation of the Tentative Examination Method of Genetically Modified Papaya and Actual Condition Survey

Sayuri TSURUDA, Yasue IWASA, Akiko UCHIYAMA, Kouichi AKAKI

Health Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要約

福岡県内に流通するパパイヤ製品について、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 暫定試験法の検証と遺伝子組み換えパパイヤの混入実態調査を行った。生鮮パパイヤおよびその加工品 8 検体について検査を行った結果、生鮮パパイヤおよび乾燥パパイヤのような加工度の低い検体は DNA 収量が高く、ドライフルーツや缶詰のような加工度の高い検体は DNA 収量が低かった。パパイヤ陽性対照試験では、ドライフルーツ 1 検体を除くすべての検体で、検査可能の判定基準である Ct 値 < 48 を満たし、遺伝子組み換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験およびカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (CaM) 配列検知試験では、検査可能であるすべての検体で Ct 値は得られなかった。これらの結果から、パパイヤ製品 8 検体のうち 7 検体は遺伝子組み換えパパイヤ (PRSV-YK) 陰性、ドライフルーツ 1 検体は検査不能と判定し、暫定試験法は加工度の高い一部の製品を除いた様々なパパイヤ製品に適用できることが示された。

Key Words : パパイヤ papaya, パパイヤ加工品 processed papaya, 遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) Genetically modified papaya (PRSV-YK), リアルタイム PCR real-time PCR

1 はじめに

平成 23 年 2 月に農林水産省は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)で国内未承認の遺伝子組換えパパイヤの種子が沖縄県内のホームセンターで販売されていたことを明らかにした。また宮崎県は、宮崎県内で栽培し製造したパパイヤ茶に国内未承認の遺伝子組み換えパパイヤが混入していたとして、製造者に回収を命じた。

これに伴い、厚生労働省から、この遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の暫定試験法¹⁾が通知され、リアルタイム PCR による定性 PCR 法が定められた。

そこで、流通する生鮮パパイヤおよびその加工品を通知法に基づいて試験し、暫定試験法の検証と遺伝子組換

えパパイヤ (PRSV-YK) の実態調査を行った。

2 実験方法

2.1 試料

平成 23 年に福岡県内の百貨店、量販店等で入手した生鮮パパイヤおよびその加工品 8 検体を供試した (表 1)。

2.2 試薬

2.2.1 DNA 抽出

- ・ RNase (100mg/mL) : ニッポンジーン社製
Cat. No.1018048
- ・ Cellulase : シグマアルドリッチ社製

Cat. No.C2730-50ML

- ・ α -Amylase : ニッポンジーン社製 Cat. No.312-04753
- ・ Proteinase K : QIAGEN 社製 Cat. No.19133
- ・ G2 緩衝液・QBT 緩衝液・QC 緩衝液・QF 緩衝液 : QIAGEN 社製 Cat. No.19060
- ・ Genomic-tip 100/G Kit : QIAGEN 社製
- ・ 2-プロパノール : SIGMA 社製, 分子生物学用
- ・ エタノール : 和光純薬工業 (株) 製, 特級

2.2.2 リアルタイム PCR

- ・ TaqMan Gene Expression Master Mix : ライフテクノロジーズ社製
- ・ 遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験用プライマーおよびプローブ, CaM 配列検知試験用プライマーおよびプローブ, パパイヤ陽性対照試験用プライマーおよびプローブ : シグマアルドリッチジャパン (株) に合成を依頼, 塩基配列は暫定試験法に記載の通り
- ・ 滅菌超純水 : 超純水をオートクレーブ処理したもの

表 1 供試した生鮮パパイヤおよびその加工品

No.	検体名	原産国・県
1	生鮮果実パパイヤ	宮崎
2	生鮮野菜パパイヤ	沖縄
3	乾燥パパイヤ	沖縄
4	カレー	沖縄
5	缶詰	タイ
6	缶詰	タイ
7	ドライフルーツ	沖縄
8	ドライフルーツ	タイ
合計		8 検体

2.3 使用機器

- ・ ミルミキサー : 岩谷産業株式会社製 IFM-720G
- ・ インキュベーター : (株) IWAKI 製 ALB-221, (株) アステック製 BI-525
- ・ 高速冷却遠心分離機 : (株) 久保田製作所製 KUBOTA6200
- ・ マイクロ冷却遠心分離機 : (株) 久保田製作所製 KUBOTA3700
- ・ 分光光度計 : NanoDrop Technologies 社製 ND-1000
- ・ リアルタイム PCR 装置 : アプライドバイオシステムズ製 ABI 7900HT

2.4 検査方法

2.4.1 試料前処理

1) 生鮮パパイヤ, 缶詰およびカレー

製品から目視でパパイヤと判断されるもののみを全て取り出し (生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分), その重量の 2 倍以上の滅菌蒸留水で 3 回洗浄した後, よく水分をきり, ミルミキサーで粉碎した (生鮮パパイヤに関しては果肉を洗浄せず粉碎) 粉碎した試料 10g

をポリプロピレン製遠沈管 (50mL 容) に量りとり, G2 緩衝液 30mL を加え, よく転倒混和して均質にした。

2) 乾燥パパイヤ

ミルミキサーで粉碎した試料 2g をポリプロピレン製遠沈管 (50mL 容) に量りとり, G2 緩衝液 30mL を加え, よく転倒混和して均質にした。

3) ドライフルーツ

試料重量の 2 倍以上の滅菌蒸留水で 3 回洗浄した後, 等重量分の滅菌蒸留水を加え, ミルミキサーで粉碎した。粉碎した試料 10g をポリプロピレン製遠沈管 (50mL 容) に量りとり, G2 緩衝液 30mL を加え, よく転倒混和して均質にした。

2.4.2 DNA 抽出

2.4.1 で調製した試料を暫定試験法に基づき, イオン交換樹脂タイプキット法 (Genomic-tip 100/G) を用いて, DNA 抽出を行った。得られた DNA 溶液の吸光度を 230nm から 320nm の波長域で連続的に測定し, 260nm/280nm の比を求めることで DNA 純度の確認を行った。また DNA 溶液の濃度は 260nm の吸光度 1.0 を 50ng/ μ L として算出し, 滅菌超純水で 10ng/ μ L に希釈したものを DNA 試料液とした。

2.4.3 リアルタイム PCR 反応液の調製

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下のとおりである。TaqMan Gene Expression Master Mix 12.5 μ L, 対象プライマー対溶液 (各プライマー, 50 μ mol/L) 0.4 μ L, 対象プローブ溶液 (10 μ mol/L) 0.25 μ L を混合し, DNA 試料液 (10ng/ μ L) 5 μ L を添加し滅菌蒸留水で全量 25 μ L に調製した。PCR のブランク反応液として, 滅菌超純水を 5 μ L 添加したものについても同時に調製した。

2.4.4 リアルタイム PCR 条件

50 $^{\circ}$ C, 2 分間の UNG 処理を行い, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱後, 95 $^{\circ}$ C 15 秒間, 60 $^{\circ}$ C 1 分間を 1 サイクルとして, 50 サイクルの増幅反応を行った。

2.4.5 結果の判定

リアルタイム PCR 後のデータは SDS2.3 ソフトウェアを使用して解析した。Amplification Plot 上で Threshold Line と増幅曲線との交点におけるサイクル数を Ct 値とした。Threshold Line は陽性試料の指数関数的増幅領域である 0.2 に設定した。

各 DNA 試料液においてパパイヤ陽性対照試験の 2 ウェル並行の少なくとも一方で 48 未満の Ct 値が得られ, かつ遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験および CaM 配列検知試験の両試験とも各 2 ウェル並行全てで 48 未満の Ct 値が得られた場合に陽性と判定した。

パパイヤ陽性対照試験の 2 ウェル並行の少なくとも一方で 48 未満の Ct 値が得られ, 遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験及び CaM 配列検知試験の両試験の 2 ウェル並行全てにおいて 48 未満の Ct 値が得られない場

合に陰性と判定した。

パパイヤ陽性対照試験の2ウェル並行全てにおいて、48未満のCt値が得られない場合は検査不能と判定した。

3 結果および考察

3.1 DNA抽出

試料とした8検体について、暫定試験法に基づきDNA抽出を行った(表2)。8検体中4検体(生鮮果実パパイヤ、生鮮野菜パパイヤ、乾燥パパイヤ、カレー)はDNA濃度が10ng/μL以上となり、十分なDNA収量が得られた。また、それらの4検体はDNA純度が1.82~1.86であり、PCRに適した純度であった。

10検体中4検体(缶詰2検体、ドライフルーツ2検体)については、DNA濃度が10ng/μL以下となり、DNA収量が非常に低い結果となった。この原因として、缶詰は加熱殺菌によるDNAの損傷、ドライフルーツは糖分によるDNA抽出の競合阻害またはDNAの損傷などが推測された。ドライフルーツについてはより原因を明らかにするため、No.8の検体に生鮮果実パパイヤを10%の割合で添加しDNA抽出を行った(No.8-2)。その結果、生鮮果実パパイヤ由来と考えられるDNAが十分抽出されたことから、原因は糖分による競合阻害ではなく、DNAの損傷など他の原因によるものと推測された。

3.2 リアルタイムPCR

3.2.1 パパイヤ陽性対照試験

パパイヤ陽性対照試験用プライマーおよびプローブを用いて、各DNA試料液のリアルタイムPCRを行い、48未満のCt値が得られるかを確認した(表3)。その結果、No.8のドライフルーツを除くすべての検体で、2ウェル並

行の少なくとも一方で48未満のCt値が得られた。DNA濃度が10ng/μL以下の検体においても48未満のCt値が得られたが、DNA収量が高い検体と比較して、Ct値が高い傾向があった。カレーについてはDNA収量が高いにもかかわらずCt値は高いため、採取試料にパパイヤ以外のものが混在していたと推測される。No.8は2ウェル共Ct値が得られなかった。これらの結果より、No.8を除くすべての検体で検査可能であると判定した。

3.2.2 遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知試験およびCaM配列検知試験

遺伝子組換えパパイヤ検知試験用プライマーおよびプローブ、CaM配列検知用プライマーおよびプローブを用いて、リアルタイムPCRを行った(表3)。検査可能と判定したNo.1~7の検体は、遺伝子組換えパパイヤ検知試験およびCaM配列検知試験の2ウェル並行全てにおいて48未満のCt値は得られなかった。これらの結果から、No.1~7の検体は遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)陰性と判定した(表3)。

表2 各検体のDNA濃度および純度

No.	検体名	DNA濃度 (ng/μL)	DNA純度 (260/280)
1	生鮮果実パパイヤ	293.81	1.85
2	生鮮野菜パパイヤ	389.27	1.82
3	乾燥パパイヤ	184.73	1.86
4	カレー	274.95	1.84
5	缶詰	0.54	0.48
6	缶詰	4.05	1.32
7	ドライフルーツ	0.38	0.33
8	ドライフルーツ	-0.36	66.15
8-2	10%果実パパイヤ入り ドライフルーツ	57.60	1.86

表3 各検体のリアルタイムPCR結果と結果の判定

No.	検体名	パパイヤ 陽性対照試験	CaM配列 検知試験	遺伝子組換え パパイヤ検知試験	判定
1	生鮮パパイヤ	22.94 / 22.97	(-) / (-)	(-) / (-)	陰性
2	野菜パパイヤ	22.79 / 22.76	(-) / (-)	(-) / (-)	陰性
3	乾燥パパイヤ	23.00 / 23.07	(-) / (-)	(-) / (-)	陰性
4	カレー	40.56 / 48.74	(-) / (-)	(-) / (-)	陰性
5	缶詰	37.91 / 37.48	(-) / (-)	(-) / (-)	陰性
6	缶詰	26.33 / 26.26	(-) / (-)	(-) / (-)	陰性
7	ドライフルーツ	42.18 / (-)	(-) / (-)	(-) / (-)	陰性
8	ドライフルーツ	(-) / (-)			検査不能

(-) : Ct値 < 48

4 まとめ

生鮮パイヤおよびその加工品 8 検体を用いて、厚生労働省より通知された遺伝子組換えパイヤ（PRSV-YK）の暫定試験法の検証と実態調査を行った。DNA 抽出を行ったところ、生鮮果実・野菜パイヤ、乾燥パイヤなどの加工度の低いものは DNA 収量が高く、缶詰やドライフルーツなどの加工度の高いものは DNA 収量が低かった。ドライフルーツ 1 検体を除くすべての検体はパイヤ陽性対照試験により検査可能と判定し、検査可能であったすべての検体は遺伝子組換えパイヤ（PRSV-YK）検知試験および CaM 配列検知試験により遺伝子組換えパイヤ（PRSV-YK）陰性と判定した。

これらの結果から、暫定試験法は加工度の高い製品で一

部検査不能の場合があるが、様々なパイヤおよびその加工品に適用できることが分かった。今回の実態調査では、検査可能であったパイヤ製品のうち遺伝子組換えパイヤ（PRSV-YK）が混入したものはなかった。

文献

- 1)厚生労働省通知食安監発 0222 第 4 号：安全性未審査の遺伝子組換えパイヤ（PRSV-YK）の暫定試験法について、平成 23 年 2 月 22 日