

食安監発0222第4号
平成23年2月22日

各検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部監視安全課長
(公印省略)

安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の
暫定検査法について

このたび、国立医薬品食品衛生研究所において、台湾で開発され、国内においては安全性未審査である遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検査法を検討し、その暫定検査法を別添のとおり策定しましたので、検査にあたっては本検査法により実施してください。

安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)の検査

1. 検体採取方法

1.1 生鮮パパイヤの検体採取

生鮮パパイヤの検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行うこと。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量(個)
≦ 50	2	2
51 ~ 500	3	3
501 ~ 35,000	5	5
≧ 35,001	8	8

1.2 パパイヤ加工食品の検体採取

パパイヤ加工食品の検体採取については、対象となるロットの大きさに応じて以下の表に従い検体採取を行うこと。

以下の表に従って検体採取を行う。

ロットの大きさ	検体採取のための開梱数	検体採取量(g) ^{※1}	検体数
≦ 15	2	120	1
16 ~ 50	3	120	1
51 ~ 150	5	120	1
151 ~ 500	8	120	1
501 ~ 3,200	13	120	1
3,201 ~ 35,000	20	120	1
35,001 ~ 500,000	32	120	1
≧ 500,001	50	120	1

※1 果汁・飲料製品、氷菓等製品については、検体採取量を480gとする。

また、パパイヤの含有量が少ない加工品について実施する場合は、製品分類ごとに複数回の前処理試行が可能となるよう適宜検体採取量を増やして採取する。

2. 検査原則

当検査は、生鮮パパイヤ及び種々の加工食品が検査対象検体として想定されるため、その性状により測定結果は変動する。これらを縮小するための原則について記す。

- ・ 検査対象検体は、一検体数を一単位とする。
- ・ 検査対象検体の食さない部分を廃棄した可食部を試料とする。（生鮮パパイヤについては種子・果皮を除いた果肉部分）

- ・ 試料中の成分は、不均一に分布すると考えられるため、検査に供する前に試料全量を粉砕器等^{*1}で十分に破碎し、均質混和して調製試料とする。
- ・ 検査に供する調製試料は固体や液体の性状に関わらず、重量測定にて一定量を採取する。
- ・ 試料調製を含む検査全般は、空気の動きがなく温度・湿度の変動が少ない区切られた空間で行い、コンタミネーションを防ぐよう実施する。
- ・ 微量測定のため、粉砕用器具^{*1}容器、秤量用器具、凍結乾燥瓶は中性洗剤等で洗浄後、アルカリ洗剤に一晩浸け置きする。あるいは超音波洗浄機を用い、30分間の超音波処理を行う。

^{*1} レッチェ GM200 (レッチェ社製)、Millser (Iwatani 社製)、磁製乳鉢・乳棒及び同等の結果が得られるものを用いる。

3. リアルタイム PCR 法を用いた定性 PCR 法

本法では生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工食品を検査対象とし、DNA抽出精製は、以下の陰イオン交換樹脂タイプキット法 (QIAGEN社製 Genomic-tip 100/G) を用いる。1検体からDNAを抽出し、DNA試料液を得る。そのDNA試料液を用いてリアルタイムPCRを用いた定性PCR法を実施する。生鮮パパイヤおよびパパイヤ加工食品は以下の7種類の製品に細分類し、「3.1 試料前処理」に示したそれぞれの試料前処理プロトコルに従ってDNA抽出精製前の試料調製を行う。

- ① 生鮮および調味漬け製品 (生鮮パパイヤ、缶詰、漬物など乾固されていないある程度パパイヤの原型を保持している試料)
- ② 乾物製品 (乾燥パパイヤ)
- ③ 砂糖漬け乾燥製品 (ドライフルーツ)
- ④ 乾燥製品 (健康食品、お茶など)
- ⑤ 果肉含有ゲル状製品 (ジャム、ピューレなど)
- ⑥ 果汁・飲料製品 (フルーツミックスジュース、ドリンク剤など)
- ⑦ 氷菓等製品 (アイス、シャーベットなど)

3.1 試料前処理

① 生鮮および調味漬け製品

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、Millser等で粉砕する (生鮮パパイヤに関しては果肉を洗浄せず粉砕する)。粉砕した試料10gをポリプロピレン製遠沈管 (50mL容) に量りとり、G2緩

衝液*130 mL を加え、よく転倒混和して均質とする。イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い、以下の「3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製」に従い DNA を抽出精製する。

なお、生鮮パパイヤについては、平成 13 年 3 月 27 日付食発第 110 号「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」の 2.2.2. に示す方法により DNA 抽出精製を行うことも可能である。

② 乾物製品

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、Millser 等で粉砕する。粉砕した試料 2g をポリプロピレン製遠沈管 (50mL 容) に量りとり、G2 緩衝液*130mL を加え、よく転倒混和して均質にする。イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い以下の「3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製」に従い DNA を抽出精製する。

③ 砂糖漬け乾燥製品

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、その重量の 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、Millser 等で粉砕する。粉砕した試料 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*1 を加え、よく転倒混和して均質にする。イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い、以下の「3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製」に従い DNA を抽出精製する。

④ 乾燥製品

Millser 等で粉砕し均質にした試料 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*1 を加え、よく転倒混和して均質にする。イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い以下の「3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製」に従い DNA を抽出精製する。

⑤ 果肉含有ゲル状製品

Millser 等で粉砕し均質にした試料 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*1 を加え、よく転倒混和して均質にする。イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip) を用い以下の「3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製」に従い DNA を抽出精製する。

⑥ 果汁・飲料製品

開封前によく転倒混和して均質にした製品 100mL をメスシリンダーで量りとり、凍結乾燥用容器（500mL 容）に移し、傾けた状態で-80℃冷凍庫中で 2 時間凍結させる。その後、凍結乾燥機にセットし、24 時間乾燥後、試料 30g を乳鉢に量りとり G2 緩衝液^{*1}20mL に乳棒を用いて溶解させる。次いで全量をポリプロピレン製遠沈管（50mL 容）に移し、乳鉢と乳棒の残存試料を新たに G2 緩衝液^{*1}10mL を追加し洗いいれ、よく転倒混和して均質にする。イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip）を用い、以下の「3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製」に従い DNA を抽出精製する。

⑧ 氷菓等製品

試料 100g を凍結乾燥用容器に量りとり、24 時間凍結乾燥する。その後、試料 10g を先に G2 緩衝液^{*1}30mL を入れたポリプロピレン製遠沈管（50mL 容）に少しずつ加えながら溶解させ、よく転倒混和して均質にする。イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット（QIAGEN Genomic-tip）を用い、以下の「3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製」に従い DNA を抽出精製する。

^{*1}G2 緩衝液は QIAGEN 社（Cat. No. 19060）に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

3.2 パパイヤ試料からの DNA の抽出精製

3.2.1 DNA の抽出精製

「3.1 試料前処理」を行った試料に、100mg/mL RNase^{*1} 20 μ L、cellulase^{*2} 500 μ L を加えて（なお⑤果肉含量ゲル状製品のジャム製品に限り、 α -Amylase^{*3} 20 μ L も同時に加える）、転倒混合し均質化した後、50°Cで1時間放置する。その間2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いでProteinase K^{*4} 200 μ Lを加え50°Cで1時間放置する。その間も2~3回遠沈管を反転させて試料を転倒混和する。次いで、その遠沈管を3,000 \times g、低温下(4°C)、20分間遠心し、得られた上清（約25mL~35mL）を採取し、あらかじめQBT緩衝液^{*5}4mLを用い平衡化したQIAGEN Genomic-tip 100/Gに負荷する。次いで、100/GをQC緩衝液^{*5}で7.5mLずつ3回洗浄した後、あらかじめ50°Cに温めておいたQF緩衝液^{*5}1mLを負荷し、はじめの溶出液は捨てる。新しい遠沈管に移し、再度50°Cに温めておいたQF緩衝液^{*5}2mLを負荷し、DNAを溶出する。溶出液と等量のイソプロピルアルコールを加えよく混合し、遠沈管（1.5mL容もしくは2.0mL容）に移し、10,000 \times g以上で、低温下（4°C）15分間遠心後、上清を捨てる。この際、上清を極力除去する^{*6}。70%エタノール1mLを加え、さらに10,000 \times g以上で、低温下（4°C）5分間遠心する。さらに上清を捨て^{*6}、残った沈殿物を、乾燥させた後、予め50°Cに温めた滅菌蒸留水50 μ Lに溶解し、DNA試料原液とする。

*1 QIAGEN 社 (Cat. no. 1018048) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*2 Sigma-Aldrich 社 (Cat. no. C2730-50ML) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*3 ニッポン・ジーン社 (Cat. no. 312-06671) のもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*4 Promega 社 (Cat. no. V3021) 100mg を滅菌水 5mL に溶解したもの又は同等の効力を持つものを用いる。

*5 QBT 緩衝液、QC 緩衝液及び QF 緩衝液は QIAGEN 社 (Cat. No. 19060) に付属しているが、足りない場合には単品で購入するかキットの説明書に従って調製可能である。

*6 沈殿物が見えない場合でも、遠沈管内の底部付近にはできるだけ触れないように、上清を除去する。

3.2.2 DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA 試料液の調製と保存

DNA試料原液の適当量を取り、滅菌蒸留水を用いて適宜希釈^{*1}し、200~320nmの範囲で紫外部吸収スペクトルを測定し、260nm及び280nmの吸光度^{*2}（O. D. 260及びO. D. 280）を記録する。次いでO. D. 260の値1.0を50ng/ μ L DNAと換算し、DNA濃度を算出する。またO. D. 260/O. D. 280を計算する。この比が1.7~2.0になれば、DNAが十分に精製されている

ことを示す^{*3}。得られたDNA濃度から、DNA試料原液を10ng/ μ Lに滅菌蒸留水で希釈して調製し、DNA試料液とする。DNA試料液は40 μ Lごとにマイクロ試料管に分注後、 -20°C 以下で冷凍保存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度が10ng/ μ Lに達しないときは、そのままDNA試料液として用いる。

^{*1} 希釈する場合には、滅菌蒸留水を用いる。また、希釈倍率は、吸光度測定装置により適切な測定に要する液量及び濃度域が異なるため、適宜とする。

^{*2} O. D. 260 が DNA 由来の吸光度、O. D. 280 がタンパク質等不純物由来の吸光度と考える。

^{*3} O. D. 260/O. D. 280の比が1.7~2.0の範囲外であっても精製等の更なる操作は要さない。

3.3 リアルタイム PCR 法

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験用として、カリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーター配列とPapaya Ringspot Virus coat protein (PRSV-cp) 遺伝子の境界領域を検知するプライマー、プローブを用いる。カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター配列 (CaM) 検知試験用として、CaMを検知するプライマー対、及び、プローブを用いる。また、パパイヤ陽性対照試験用として、Chymopapain (Chy) 遺伝子配列を検知するプライマー、プローブを用いる。各プライマー、プローブは滅菌蒸留水に溶解する。プライマー、プローブの塩基配列は以下のとおりである。

遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験用プライマー対、及び、プローブ

YK-2F: 5' -ACA CGG GGG ACT CTA GAG -3'

YK-2R: 5' -ACC GGT ATC CAC AGC TTC -3'

YK-2P: 5' -FAM- TCC CTT CCA TGG CGT C-TAMRA-3'

CaM配列検知試験用プライマー対、及び、プローブ

35S-F: 5' -GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R: 5' -AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C-3'

35S-P: 5' -FAM- CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3'

パパイヤ陽性対照試験用プライマー対、及び、プローブ^{*1}

Q-Chy-1F2: 5' -CCA TGC GAT CCT CCC A-3'

Q-Chy-2R: 5' -CAT CGT AGC CAT TGT AAC ACT AGC TAA-3'

Q-Chy-P: 5' -FAM-TTC CCT TCA T(BHQ1)CC ATT CCC ACT CTT GAG A-3'

^{*1} Q-Chy-Pプローブのクエンチャー (消光物質) は、T-baseのblack-hole quencher 1

(BHQ1)を使用する。

3.3.1 リアルタイム PCR 法 (Applied Biosystems 7900HT, Applied Biosystems 7500)

3.3.1.1 PCR 用反応液の調製

PCR用反応液は25 μ L/wellとして調製する。組成は以下のとおりである。TaqMan Gene Expression Master Mix^{*1} 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0.4 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5 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量25 μ Lに調製する。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製する^{*2}。分注操作終了後、真上からシール^{*3}し、完全にウェルを密閉する。このとき、しわが寄らないよう注意し、専用のシーリング用アプリケーションャーを用いて行う。最後にウェルの底を観察し、底に気泡がある場合は、プレートの縁を軽く叩いて気泡を抜いておく。プレートの確認後、ABI PRISM Optical Cover Compression Pad^{*4}を茶色の面が上になるよう、プレートの上面にセットする。DNA試料液あたりパパイヤ陽性対照試験、遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知試験、およびCaM配列検知試験をそれぞれ2ウェル並行して行うものとする。

*1 TaqMan Gene Expression Master Mix

本試薬は粘性が高いため、混合操作を行う際には、混合が確実に行われるように注意する。不十分な場合には、PCRがうまくいかない場合がある。使う直前には必ず軽く攪拌後、遠心し、溶液を試料管の底に集めておいてから使用する。また、ウェルに分注する際は、以後攪拌、遠心が困難なことを考慮し、ウェルの底に確実に入れる。

*2 Non-Template Control (NTC)

DNA 試料液の添加の際、NTC には DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水をウェルに 5 μ L 添加する。

*3 96 ウェルプレート、シール、及び、シーリングアプリケーションャー

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies 社)、及び、ABI PRISM Optical Adhesive Cover (Life Technologies 社) を使用する。シーリングの詳細については製品付属のマニュアルを参考のこと。

*4 ABI PRISM Optical Cover Compression Pad

ABI PRISM Optical Cover Compression Pad (Life Technologies 社) を使用する。Applied Biosystems 7500 では使用しない。

3.3.1.2 プレート情報の設定

反応に際しては、プレート情報の設定を行わなければならない。設定を行う項目は、検体の配置と種類、及び、プローブ特性である。具体的には新規シート上で、調製したプレートの配置に対応するように気を付けながら、検体の種類（「NTC」：Non-Template

Control、「UNKN」: DNA 試料液) の設定を行う。またプローブ特性に関しては、YK-2P、35S-P、Q-Chy-P とともに Reporter が「FAM」、Quencher が YK-2P は「TAMRA」、35S-P は「TAMRA」、Q-Chy-P は「Non Fluorescent」となるように設定する。また、Passive Reference は「ROX」に設定する。なお、ランモードの設定は 9600 emulation モードを選択する。Sample Volume は 25 μ L に設定する。

3.3.1.3 PCR 増幅

装置にプレートを設定し、反応とデータの取り込みを開始する。反応条件は以下のとおりである。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する。その後、95°C 15 秒間、60°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う。Remaining time が 0 分となっていることを確認し、反応を終了させた後、測定結果の解析を行う。

3.4 結果の解析と判定

遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知試験、CaM配列検知試験およびパパイヤ陽性対照試験のいずれについても、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う。

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目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)陽性を疑う。次いで、ベースライン(3サイクルから15サイクル)の ΔR_n 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)を選択する^{*1}。そのTh. lineからCt値が得られるか否かを解析する。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(①)に、当該試料は陽性と判定する。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(②)には、遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)陰性と判定する(図1参照)。

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)検知試験あるいはCaM配列検知試験の結果の組み合わせが①又は②のいずれにも該当しない場合は、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目^{*2}のDNA抽出精製を行い、さらに「3.3 リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。2回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性又は陰性の判定が得られない場合には、改めて3回目^{*2}のDNA抽出精製を行い、さらに「3.3 リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。3回目のDNA試料液を用いた場合でも陽性の判定が得られない場合には、遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)陰性と判定する。なお上記により陽性と判定された結果についてmulticomponentを解析し、目視でFAMの蛍光強度の指数関数的な増加が観察でき、ROXの蛍光強度の明確な下降やFAMの蛍光強度の緩やかな上昇がないことを確認する(図1参照)。

また、パパイヤ陽性対照試験の2ウェル並行の両方で48未満のCt値が得られないDNA試料液については、再度、粉碎・均質後の当該試料から改めて2回目のDNA抽出精製を行い、さらに「3.3 リアルタイムPCR法」以降の操作を行い、それでもパパイヤ陽性対照試験の2ウェル並行の両方で48未満のCt値が得られない場合には、粉碎・均質後の当該試料から改めて3回目のDNA抽出精製を行い、さらに「3.3 リアルタイムPCR法」以降の操作を実施して、判定を行う。3回目のDNA試料液を用いた場合でもパパイヤ陽性対照試験の2ウェル並行の両方で48未満のCt値が得られない場合には、本試料からの検知は不能とする(図1参照)。

^{*1} 個々の機種の状態によってAmplification plot上の ΔR_n が変動することから、普遍的なTh.

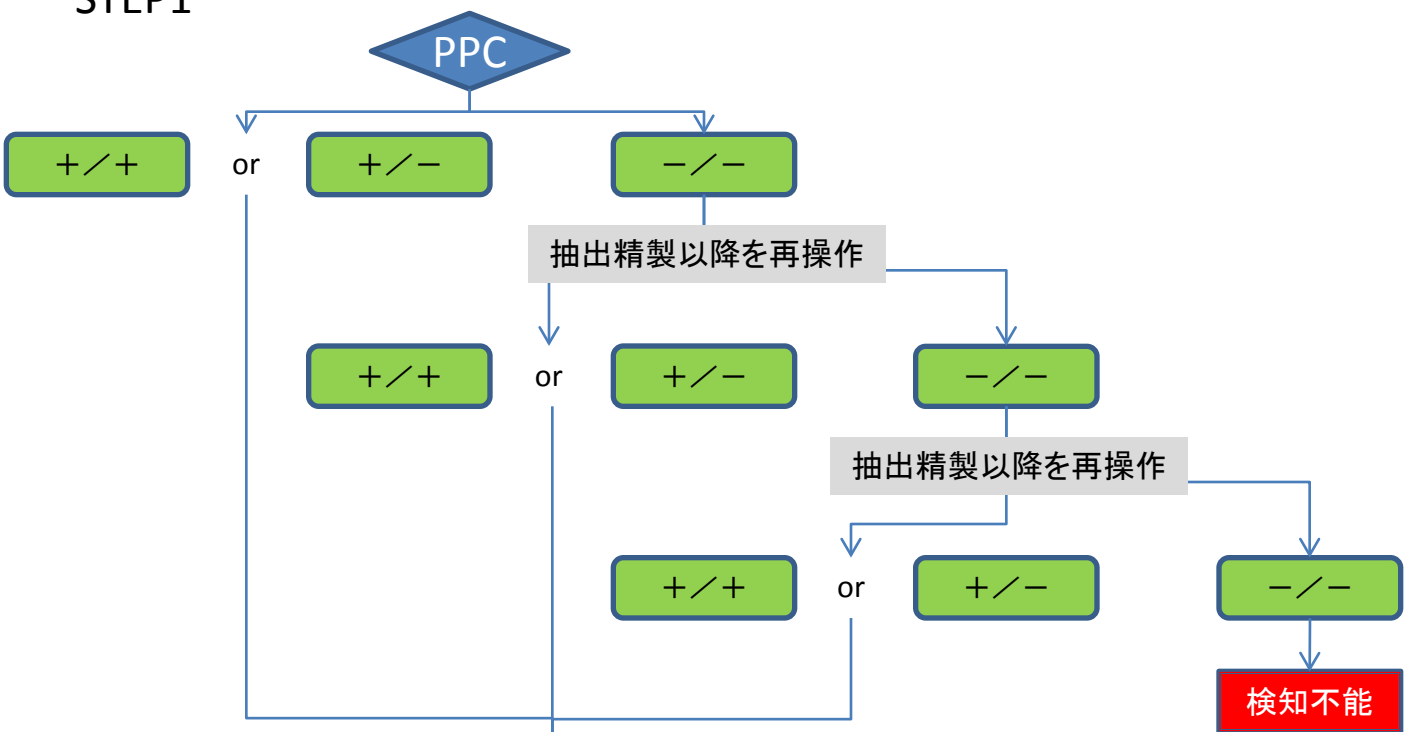
lineの設定の数値を示すことが困難である。従ってAmplification plot上でベースライン(3サイクルから15サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるTh. lineを選択する。参考としてApplied Biosystems 7900HT, 及びApplied Biosystems 7500ともに0.2-0.5の範囲であると考えられる。

*2DNA 抽出精製を行うために必要な試料量が不足している場合には、「3.1 試料前処理」から実施する。

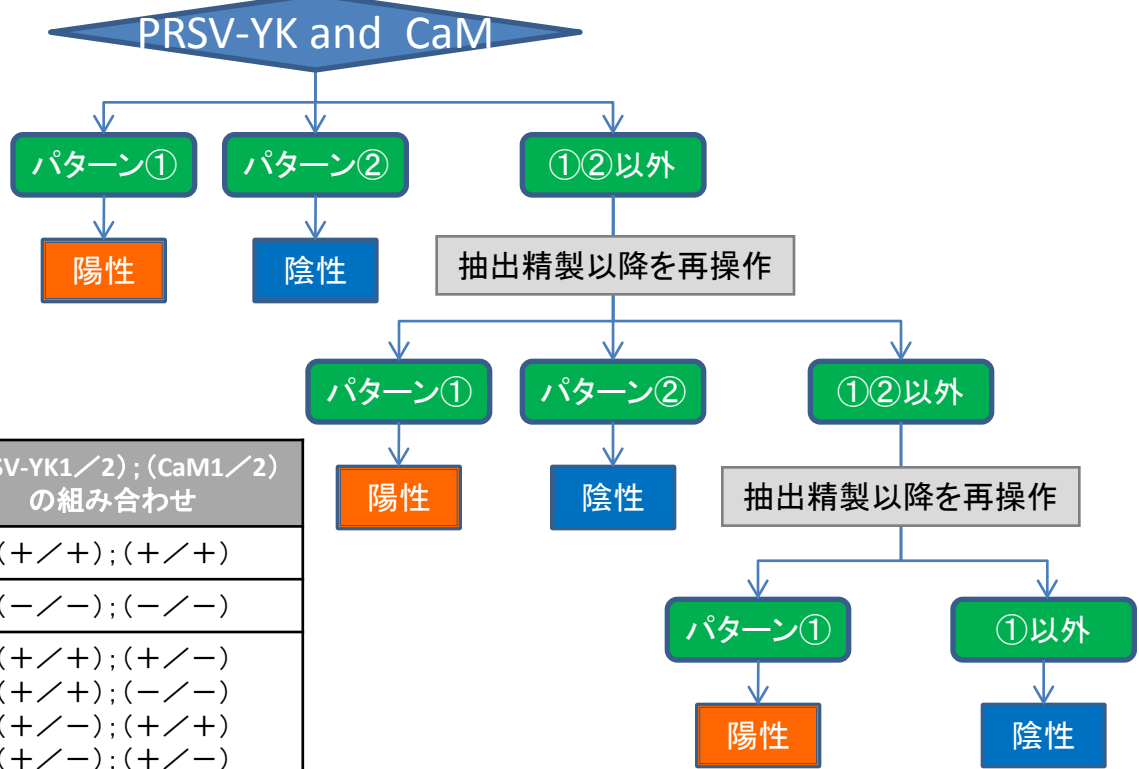
図1 結果の判定スキーム

PPC; パパイヤ陽性対照試験
 PRSV-YK; 遺伝子組換えパパイヤ(PRSV-YK)検知試験
 CaM; CaM配列検知試験

STEP1



STEP2



PCR判例	(PRSV-YK1/2); (CaM1/2) の組み合わせ
パターン①	(+ / +); (+ / +)
パターン②	(- / -); (- / -)
①②以外	(+ / +); (+ / -) (+ / +); (- / -) (+ / -); (+ / +) (+ / -); (+ / -) (+ / -); (- / -) (- / -); (+ / +) (- / -); (+ / -)