

未承認遺伝子組換えパパイヤ種子検査法(種子3粒法)

妥当性確認試験 結果報告書概要

1 背景

昨年12月、厚生労働省から、国立医薬品食品衛生研究所（以下「国衛研」という。）が、食品衛生法上で未審査である遺伝子組換えパパイヤの検査法を開発する過程において、生果実、種苗及び加工品を試験的に検査したところ、未承認の遺伝子組換えパパイヤが混入している可能性を示す分析結果が得られたとの情報提供があった。このパパイヤは、台湾で研究中である遺伝子組換えパパイヤ（PRSV-YK）の導入遺伝子と同様の塩基配列を持っており、カルタヘナ法でも未承認である。そのため、この結果が事実であれば、農林水産省がカルタヘナ法に基づく対応を行う必要がある。そこで、国衛研で開発中の検査法を、種子の検査に最適化すること及びその検査法の妥当性確認試験を実施したものである。

なお、その後、国衛研から、遺伝子組換えではないパパイヤ生果実（果肉）から抽出したDNA溶液を試料としてリアルタイムPCRを行った際に、未承認の遺伝子組換えパパイヤのみ検知するはずのDNA検出試薬「YK-1」で非特異的な増幅が認められたとの情報提供があった。国衛研で試験的に実施した分析の結果は、この試薬を用いたものであったため、この結果を基に科学的に陽性・陰性を判定できないことが判明した。また、この状況を踏まえ、DNA検出試薬「YK-1」の代わりに「YK-2」を試験的に種子の分析に用いたところ、検出感度が不足する傾向が認められた。

2 目的

PCRを用いた、遺伝子組換え作物の有無を調べる定性分析は、「試料の磨砕」、「DNA抽出」及び「リアルタイムPCR」の3つの過程から構成される。国衛研が開発中の検査法について、カルタヘナ法に基づく種子の検査法に適した検査試薬の組合せを決定し、検査の各過程を種子検査に最適化するため、以下の点について検討するとともに、妥当性確認を行う。

- (1) 種子から抽出するDNAがリアルタイムPCRに供試できる純度・濃度であるか。
- (2) リアルタイムPCRで目的とする遺伝子配列の増幅を適切に検出するため、検出・不検出を判断する検出境界線を、試験毎に適切に設定可能にする。

- (3) DNA 検出試薬「YK-1」の擬似陽性反応や DNA 検出試薬「YK-2」の検出感度が不足する可能性を排除し、陽性・陰性の判定を正しく行う方法を確立する。

3 試験概要

妥当性確認試験を行うため、下記の4検体を参加機関には内訳を伏せて配布した。参加機関は本検査法の試験作業手順書にしたがい、4検体についてそれぞれ2回繰り返し試験を行った。

試料1：国衛研の分析で陽性の反応を示した種子

試料2：国衛研の分析で陽性の反応が認められなかった種子

試料3・4：市販の種子又は市販の果実から取得した種子

本検査法において、リアルタイム PCR で検出対象となる遺伝子配列は4種類あり、それぞれの検出には、「Chy」、「YK-1」、「YK-2」及び「CaM」の4種類の DNA 検出試薬を用いる。なお、「Chy」は、パパイヤが持つ遺伝子配列を検出するための試薬であり、検査した試料に組換え・非組換えに関わらずパパイヤの遺伝子が存在することを確認するものである。また、「YK-1」、「YK-2」及び「CaM」は、遺伝子組換え技術により導入された遺伝子配列を検出するためのものであり、検査した試料に組換えパパイヤの遺伝子が含まれているか否かを確認するものである。

各機関で検査を行った結果、試料1において、「Chy」、「YK-1」、「YK-2」及び「CaM」の4種類の検出試薬で陽性反応が認められ、かつ、試料2～4において、「Chy」のみ陽性反応が認められた場合、試料の陽性・陰性を正しく判定できたと評価する。また、全ての機関で正しく陽性・陰性を判定できた場合、この方法が科学的に信頼できる検査法であると評価する。

4 実施機関

(試料配布者) 農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課

(参加検査施設) 横浜植物防疫所

(独) 種苗管理センター

(独) 農林水産消費安全技術センター本部 (表示監視部)

(独) 農林水産消費安全技術センター本部 (肥飼料検査部)

(独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター

計5検査施設

5 実施期間

平成23年1月17日～2月14日

6 試験結果概要(別添1、別添2)

- 種子から抽出した DNA 濃度・純度については、4つの試験室で DNA の濃度・純

度が規定した範囲（濃度 10 ng/μL 以上、純度 A 260 nm/A 280 nm=1.7~2.0）に入らなかった事例があったが、リアルタイム PCR では適正な結果が得られた。

- 陽性・陰性の結果が全ての参加機関で一致した率は 100%であり、そのことは偽陽性率及び偽陰性率が 0%であることを示している。
- 試料 1 については、「Chy」、「YK-1」、「YK-2」及び「CaM」全ての DNA 検出試薬で目的の遺伝子配列の増幅が認められた。
- 試料 2~4 については、全て「Chy」のみ目的の遺伝子配列の増幅が認められた。
- 「YK-2」については、調整なしに目的の遺伝子配列の増幅を検出できたが、検出境界線を調整することにより、より正確な解析をすることが可能となった。

7 考察

（1）種子から抽出した DNA の純度・濃度について

本妥当性確認試験において、抽出した DNA 溶液の濃度については、10 ng/μL に満たなかったものがあり、また、DNA 純度については、A260 nm/A280 nm が 1.7 未満のものがあった。しかしながら、全検体の DNA 溶液において「Chy」による目的遺伝子配列の増幅を検出し、組換え・非組換えに関わらず全てのパイプが持っている遺伝子の存在を確認できた。また、試料 1 から抽出した DNA 溶液においてのみ、「YK-1」、「YK-2」及び「CaM」による遺伝子配列の増幅を検出し、組換え体特有の遺伝子の存在を確認できた。以上のことから、本 DNA 抽出法は、リアルタイム PCR に供試するに十分な濃度・純度を持つ DNA を抽出できる方法であると評価した。

（2）使用した試薬について

（ア）目的とする遺伝子配列の検出について

本妥当性確認試験において、全ての DNA 検出試薬が、それぞれの目的外の遺伝子配列を検出することがなかったことから、今回使用した試薬は、目的とする遺伝子配列のみを正確に検出できるものであると評価した。

（イ）検出境界線の調整について

本試験において、「Chy」、「YK-1」及び「CaM」については、測定機器の機能を用い、自動的に設定した検出境界線によって、目的とする遺伝子配列の指数関数的増幅を検出できた。一方で、「YK-2」については、検出境界線を自動的に選択するように設定したままでは、目的とする遺伝子配列の指数関数的増幅を正確に検出できなかった。このため、検出境界線を調整することにより、より正確な「YK-2」の指数関数的増幅を検出できた。このことから、「YK-2」は、検出境界線を調整することにより、目的とする遺伝子配列を正確に検出できると評価した。

8 結論

本検査法を用いた場合、全ての参加機関で陽性・陰性の結果が一致した。この結果は、偽陽性・偽陰性率が0%であることを示している。すなわち、本検査法は、陽性・陰性を正確に判定する目的を達成できる方法であることが示された。

これにより、試料1が遺伝子組換え体であることが確認された。

ただし、プロトコル確立のための予備試験を実施した一部の参加機関において、遺伝子組換えでないパパイヤ生果実から抽出したDNA溶液を試料として、リアルタイムPCRを行った際、本検査法で検出対象とする遺伝子組換えパパイヤのみ検知するはずの「YK-1」で非特異的な増幅が認められた。この結果は、国衛研から提供があった結果と同様であるため、検出試薬「YK-1」は擬似陽性反応を示しやすい試薬であると判断した。したがって、今回の検討で非特異的な増幅が認められた事例は他にはなかったものの、判定の正確性を期すため、「Chy」、「CaM」、「YK-1」及び「YK-2」の4種類のDNA検出試薬を用いて陽性・陰性を判定することが妥当であるとした。

試験結果

別添1

実施機関	試料	純度(A260/A280)※1	濃度 (ng/μl)※2	リアルタイムPCR※3、※4			
				YK-1	YK-2	CaM	Chy
A	試料1(抽出1回目)	1.74	26.8	+	+	+	+
	試料1(抽出2回目)	1.97	23.6	+	+	+	+
	試料2(抽出1回目)	1.85	33.8	—	—	—	+
	試料2(抽出2回目)	1.81	34.3	—	—	—	+
	試料3(抽出1回目)	1.78	45.4	—	—	—	+
	試料3(抽出2回目)	1.81	80.2	—	—	—	+
	試料4(抽出1回目)	1.82	29.1	—	—	—	+
	試料4(抽出2回目)	1.89	39.5	—	—	—	+
B	試料1(抽出1回目)	1.28	35.6	+	+	+	+
	試料1(抽出2回目)	1.30	33.0	+	+	+	+
	試料2(抽出1回目)	1.36	33.6	—	—	—	+
	試料2(抽出2回目)	1.34	33.4	—	—	—	+
	試料3(抽出1回目)	1.32	67.6	—	—	—	+
	試料3(抽出2回目)	1.31	63.6	—	—	—	+
	試料4(抽出1回目)	1.36	31.3	—	—	—	+
	試料4(抽出2回目)	1.29	38.1	—	—	—	+
C	試料1(抽出1回目)	1.38	4.7	+	+	+	+
	試料1(抽出2回目)	1.44	5.0	+	+	+	+
	試料2(抽出1回目)	1.64	9.8	—	—	—	+
	試料2(抽出2回目)	1.46	6.0	—	—	—	+
	試料3(抽出1回目)	1.68	10.4	—	—	—	+
	試料3(抽出2回目)	1.75	27.7	—	—	—	+
	試料4(抽出1回目)	1.87	13.1	—	—	—	+
	試料4(抽出2回目)	1.67	11.9	—	—	—	+
D	試料1(抽出1回目)	1.92	7.7	+	+	+	+
	試料1(抽出2回目)	1.72	8.3	+	+	+	+
	試料2(抽出1回目)	1.76	19.1	—	—	—	+
	試料2(抽出2回目)	1.76	16.7	—	—	—	+
	試料3(抽出1回目)	1.89	13.2	—	—	—	+
	試料3(抽出2回目)	1.81	15.7	—	—	—	+
	試料4(抽出1回目)	1.64	13.7	—	—	—	+
	試料4(抽出2回目)	1.65	13.5	—	—	—	+
E	試料1(抽出1回目)	1.54	16.0	+	+	+	+
	試料1(抽出2回目)	1.42	44.5	+	+	+	+
	試料2(抽出1回目)	1.55	55.2	—	—	—	+
	試料2(抽出2回目)	1.59	28.2	—	—	—	+
	試料3(抽出1回目)	1.68	53.5	—	—	—	+
	試料3(抽出2回目)	1.66	67.4	—	—	—	+
	試料4(抽出1回目)	1.71	52.6	—	—	—	+
	試料4(抽出2回目)	1.71	29.9	—	—	—	+

※1 純度が低い(1.7未満)ものは、斜体

※2 濃度が低い(10 ng/μL未満)ものは、斜体

※3 「+」: 目的の遺伝子配列を検出、「—」: 不検出

※4 未承認遺伝子組換えパパイヤPRSV-YK株であれば、すべての試薬で「+」となる。また、非組換え体であれば「Chy」のみ「+」となる。

A PCRとは

DNAは、糖とリン酸のらせん状の2重の鎖の間を、4種類の塩基が「はしご段」のように並んで結合した構造をしている。1つの細胞が2つに分裂する際、2重らせんが一度ほどけ、それぞれの配列（塩基）に対し、対になる塩基を新たにつなぎ、コピーを作ることによって、細胞毎のDNAを一定に維持している。

PCRは、このコピーを作る過程を人工的に応用することにより、目的とする遺伝子配列のみを大量にコピーする方法である。理論的には一組(2本鎖)のDNAからスタートしてコピーするたびに2倍ずつ増幅していく(図1①)。1回コピーすれば $2^1=2$ 倍、10回コピーすれば $2^{10}=1024$ 倍、50回コピーすれば $2^{50}=112$ 兆倍に増幅する。しかし、実際には、ある一定以上に増えると増幅反応に制限がかかり(図1②)、最終的にはそれ以上は増えない(図1③)。

B リアルタイムPCRの結果から目的の遺伝子配列の増幅を検出する処理

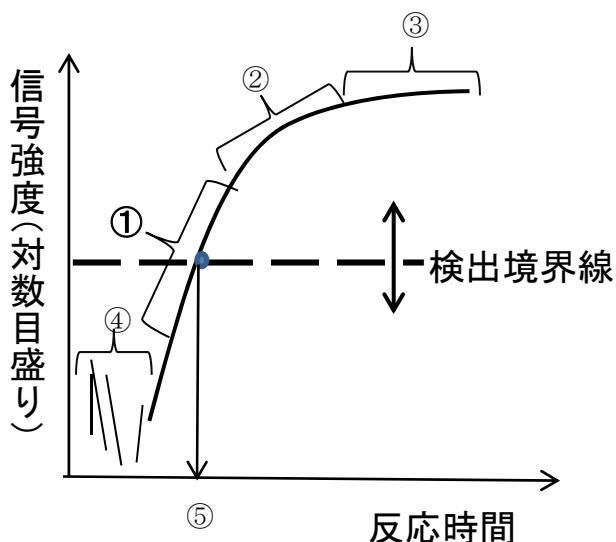


図1 リアルタイムPCRのイメージ図

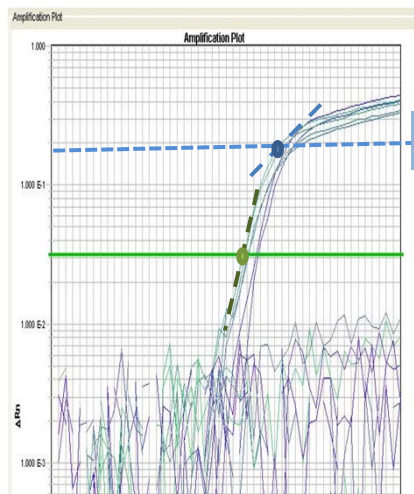
種子から抽出したDNA溶液中に検出対象の遺伝子が存在していれば、PCRにより、コピーがスタートする。コピーされたDNAを検出するための信号を検出器が捉え、信号の強さをリアルタイムでグラフ化する(図1)。

検出対象の遺伝子が存在していても、一定量のDNAがコピーされるまでの間は、信号が微弱過ぎるため、正確なグラフ化ができない(図1④)。

コピーされた遺伝子が一定以上の量に達し、コピーする度に2倍ずつ増幅(指数関数的増幅)していれば(図1①)、目的の遺伝子が検出されたと判断し、検出境界線を引き、反応時間のどのタイミングで検出されたのかを数値化する(図1⑤)。

C 「YK-2」の検出境界線の調整について

「YK-2」の代表的な結果



0.20

(増幅に制限がかかっている区間)

0.032

(2倍ずつ増幅されている区間)

測定機器の機能を用い、検出境界線を自動的に選択するよう設定した場合、指数関数的に増幅していない区間で設定されることがある（特に「YK-2」にこの傾向が認められた）。このような場合は、指数関数的増幅が認められる区間（この場合は、0.032付近）まで検出境界線を調整して目的の遺伝子配列の増幅を検出した。