

## 短報

### ダイズ穀粒の組換えDNA定量検査における解析方法の検討

垣田雅史, 内山陽介, 田中由紀子,  
関戸晴子, 大森清美

#### Study on analytical method for DNA quantitative examination of the genetically modified soybean

Masashi KAKITA, Yosuke UCHIYAMA,  
Yukiko TANAKA,  
Haruko SEKIDO and Kiyomi OHMORI

#### 緒言

我が国における大豆の自給率は平成27年の統計では約7%であり、ほとんどが輸入に頼っている<sup>1)</sup>。遺伝子組換えダイズに関しては、承認済であるRoundReady Soybean (以下, RRS) が海外で収穫され国内に流通しているが、近年, Liberty Link Soybean (以下, LLS) 及びRoundup Ready 2 Yield (Event MON89788) (以下, RRS2) についても承認され、海外で収穫されている状況である<sup>2)</sup>。そのため、遺伝子組換え表示のない大豆に遺伝子組換えダイズが混入し、県内市場に流通する可能性があり、当所においてもダイズ穀粒の組換えDNA定量検査 (RRS, LLS, RRS2) を実施している。

消費者庁通知「食品表示基準について」における(別添)「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」<sup>2)</sup>では、リアルタイムPCR装置の機種やマスターミックス等の試薬が検査方法ごとに定められている。現通知<sup>2)</sup>のダイズ穀粒の検査法では、ABI PRISM7900HT (以下, 7900HT) 及びLightCycler 480 (以下, LC480) のいずれの機種も使用可能であり、TaqMan Universal PCR Master Mix (以下, TMU) もEagle Taq Master Mix (以下, Eagle Taq) も両方使用可能である。そこで、LC480及びEagle Taqを用いて定量検査を行ったところ、LC480の解析方法である2nd Derivative Max法を用いた場合に、LLSのNo template control (以下, NTC)

において、PCR増幅産物が既定の閾値に達したときのサイクル数を示すCrossing Point値 (以下, Cp値) が得られる事例が認められた。本件のような事例は、7900HTを用いた定量検査では一度も認められず、検査結果の信頼性を損なう問題として危惧された。LC480の解析方法にはCp値の算出方法が2種 (2nd Derivative Max法・Fit Point法) ある。そこで、これらの解析方法を用いた場合に、NTCでCp値が得られる事例が認められるかを検証した。また、7900HT及びLC480のそれぞれの解析方法による定量PCR結果を比較検討し、LC480の各種解析方法の特性について評価した。

#### 方法

##### 1. 試料

ダイズ穀粒由来DNA試料液6検体 (1検体につき3抽出) を用いた。なお、全検体について、予め7900HT及びTMUを用いてDNA定量検査を行い、LLSのコピー数がすべて0であることを確認した。

##### 2. 試薬

プライマー及びプローブはダイズ内在性DNA Le1 オリゴヌクレオチドセット及びGMダイズ (LLS) 系統別DNA LLS オリゴヌクレオチドセット (共にニッポンジーン)、陽性対照プラスミドはGMダイズ (LLS) プラスミドセット -ColE1/TE- (ニッポンジーン)、マスターミックスはTMU (Thermo Fisher Scientific) 及びEagle Taq (Roche Diagnostics) を用いた。

##### 3. 装置

リアルタイムPCR装置は7900HT (Applied Biosystems) 及びLC480 (Roche Diagnostics) を用いた。

##### 4. LLS陽性DNA試料液の調製

DNA試料液について、3検体ずつ抽出No. ごとに等量混合し、各々、A及びBの抽出No. 1~3とした。このDNA試料液に適宜、TE緩衝液で希釈したLLSのコントロールプラスミドを添加し、5% (H)、0.5%程度 (L) のLLS陽性DNA試料液を調製した。5%の混入率は不適切な分別流通管理が行われた可能性がある<sup>2)</sup>とみなされる値であり、0.5%は暫定的な当所の定量下限値である。LLS陰性のDNA試料液及びLe-1のDNA試料液には、コントロールプラスミドの添加量と同容量のTE緩衝液を添加し、DNA試料液中の夾雑成分の割合を一定にした。

##### 5. 定量PCR及び解析方法

検知対象はLe-1及びLLSとし、各々のコピー数を定量した。解析方法 (1) は7900HTを用い、解析方法 (2) ~ (4) はLC480を用いた。

(1) Th.Line法

1 神奈川県衛生研究所 理化学部  
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

表1 Th.Line決定表 (Le-1)

m	2 <sup>m</sup>	Th. Line	Slope	y-intercept	備考	Error	採用値
0	1	0.010	-2.429	22.550		0.113	
1	2	0.020	-2.523	24.720		0.103	
2	4	0.040	-2.617	26.880		0.094	
3	8	0.080	-2.710	29.050		0.087	
4	16	0.160	-2.817	31.270		0.081	
5	32	0.320	-2.947	33.580		0.077	
6	64	0.640	-3.077	35.880		0.078	解析方法(3)
7	128	1.280	-3.199	38.170		0.082	
8	256	2.560	-3.324	40.520		0.061	解析方法(4)
9	512	5.120	-3.418	42.660		0.101	
10	1024	10.240	-3.518	44.840		0.109	
11	2048	20.480	-3.613	47.010		0.115	
12	4096	40.960			plot out		
13	8192	81.920					

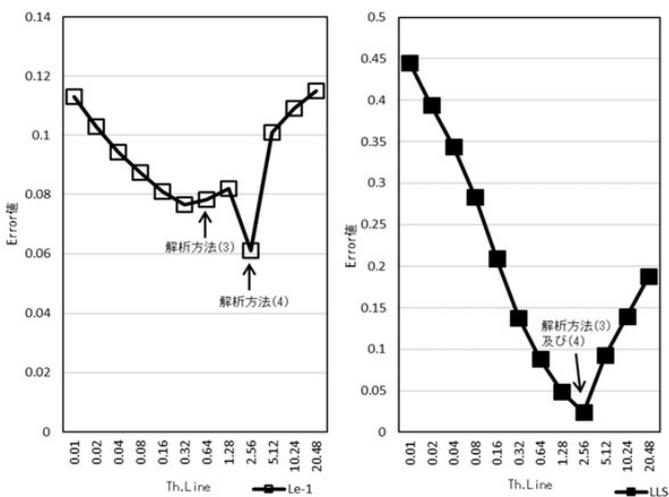


図1 Fit Point法におけるTh.Line及びError値の相関図

通知<sup>2)</sup>のとおりJAS 分析試験ハンドブック<sup>3)</sup>のTh.Line決定表を用いて定量した。

(2) 2nd Derivative Max法

LC480の2nd Derivative Max法は Amplification Curvesを2回微分し、その極大値のサイクル数をCp値として自動的に算出する方法である。

通知<sup>2)</sup>に従い、NTCでCp値が得られていないことを確認した後、検量線においては「Error値」を確認し、0.2未満であった場合に定量した。モードはHigh Confidenceモード及びHigh Sensitivityモードの2種で行った。

(3) Fit Point法 (中点)

LC480のFit Point法は7900HTの解析方法(1)と同様に、縦軸の蛍光強度が対数表記であり、Amplification CurvesとTh.Lineとの交点にCp値を算出する方法である。Fit Point法によるコントロールプラスミドの蛍光強度の最大値が解析方法(1)によるコン

トロールプラスミドの蛍光強度の最大値の10倍以上であった。そこで、解析方法(1)のTh.Line決定表<sup>3)</sup>をLC480に適用するためTh.Lineの値を10倍とし、Error値等を項目に入れた表1を作成した。NoisebandはAutoとし、Backgroundは解析方法(1)のManual Baselineと同様、3~15サイクルとした。以降の手順はTh.Line決定表の入力方法<sup>3)</sup>のとおりとした。表1のTh.Line決定表を用いて、Error値が0.2未満かつ「NTC」及び「Plot out」ではないTh.Lineについて中点のTh.Lineを決定し、定量値を求めた。その際、中点が上下のTh.Lineに挟まれる場合、下段のTh.Lineを採用した。

(4) Fit Point法 (Error値最小)

Th.Line決定表の入力方法は解析方法(3)と共通とした。表1のTh.Line決定表を用いて、Error値が最小かつ「NTC」及び「Plot out」ではないTh.Lineを決定し、定量値を求めた。

結果及び考察

解析方法(3)及び(4)では、解析方法(1)と同様に検知対象ごとにTh.Line決定表が必要となるため、Le-1及びLLSについてそれぞれTh.Line決定表を作成した。なお、Le-1について表1に示した。Th.Line決定表から得られたTh.Line及びError値を用いて、解析方法(4)で決定したTh.Lineの値を確認し、解析方法(3)で決定したTh.Lineの値と比較した。その結果、Le-1では解析方法(4)で決定したTh.Lineの値の方が解析方法(3)で決定したTh.Lineの値よりも高くなった(図1)。一方、LLSでは解析方法(3)及び(4)で決定したTh.Lineの値が一致した(図1)。解析方法(3)によるLe-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves(中点)(図2)では、Noisebandよりも低い範囲のAmplification Curvesは引かれず非表示となるため、Th.LineとコントロールプラスミドのAmplification Curvesの延長線上との交点にCp値が得られた。解析方法(4)によるLe-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves(Error値最小)(図3)では、Th.LineとコントロールプラスミドのAmplification Curvesの直線部分との交点にCp値が得られた。解析方法(3)及び(4)によるLLSのコントロールプラスミドのAmplification Curves(中点及びError値最小)(図4)では、解析方法(4)によるLe-1の場合(図3)と同様にCp値が得られた。一方、解析方法(3)及び(4)において、Le-1及びLLSのいずれのNTCのAmplification CurvesもNoisebandまで達しなかったため、グラフには表示されずCp値が得られなかった(図2~4)。

7900HT及びTMUを用いた場合の定量PCR結果を基

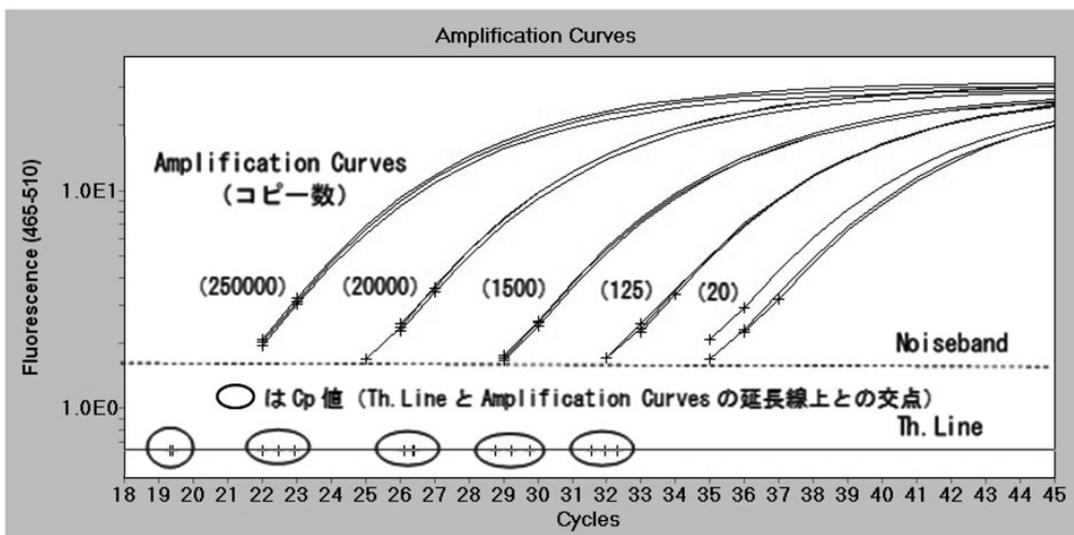


図2 Le-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves (中点) 解析方法(3) Th=0.640

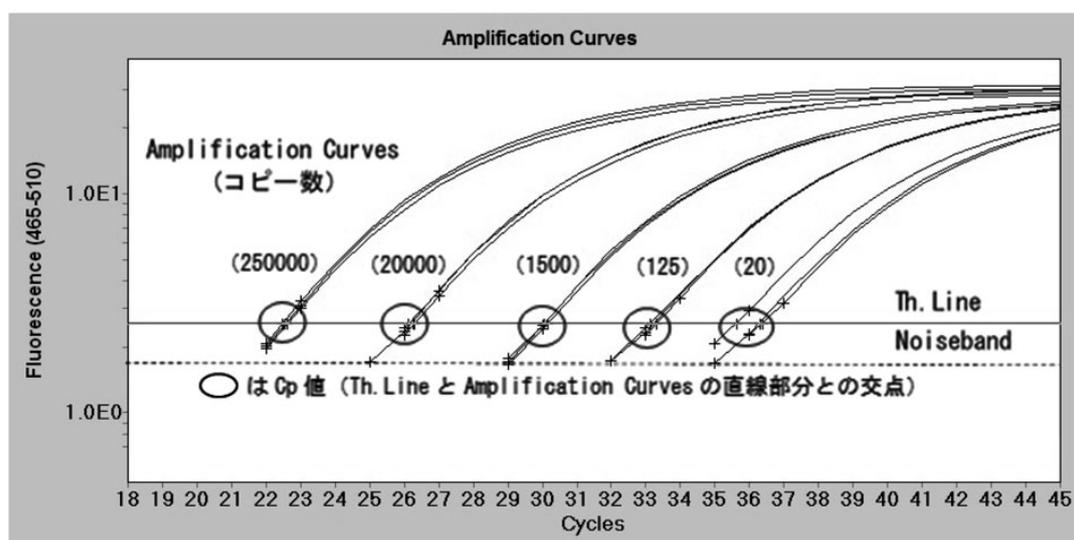


図3 Le-1のコントロールプラスミドのAmplification Curves(Error値最小) 解析方法(4) Th=2.560

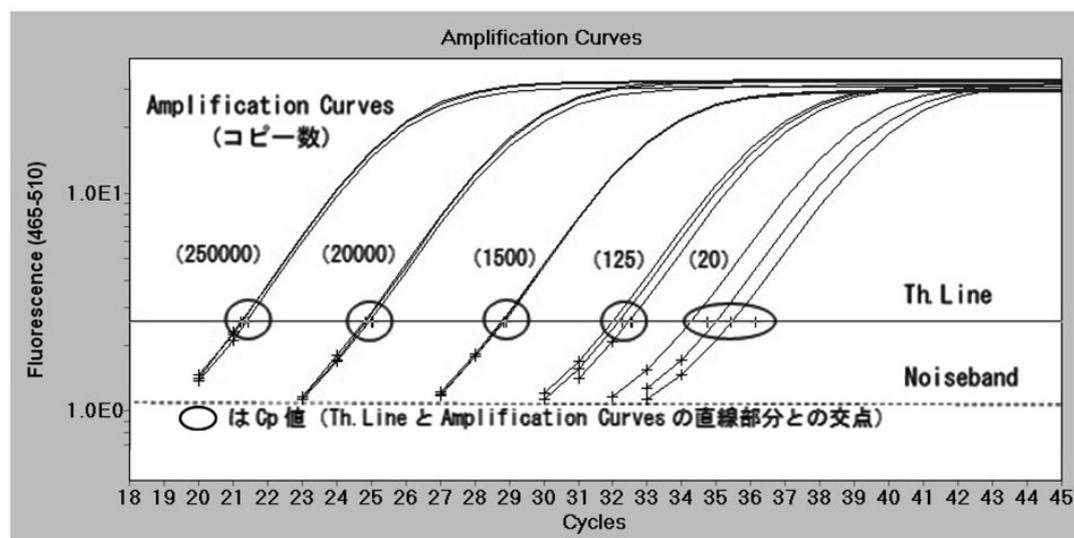


図4 LLSのコントロールプラスミドのAmplification Curves (中点及びError値最小) 解析方法(3)及び(4) Th=2.560

表 2 解析方法別のLLSの含有率の結果

LLS陽性 DNA試料液	抽出No.	LLS添加 量	解析方法(1)		解析方法(2)		解析方法(3)		解析方法(4)	
			含有率(%)	平均含有率 (%)±標準偏 差	含有率(%)	平均含有率 (%)±標準偏 差	含有率(%)	平均含有率 (%)±標準偏 差	含有率(%)	平均含有率 (%)±標準偏 差
A	1	L	0.161		0.125		0.130		0.129	
	2		0.182	0.150±0.037	0.139	0.128±0.009	0.117	0.138±0.025	0.154	0.142±0.012
	3		0.109		0.120	[0.85]	0.167	[0.91]	0.145	[0.94]
	1	H	3.034		2.977		3.161		3.147	
	2		3.081	2.881±0.306	2.906	2.853±0.156	2.099	2.762±0.578	2.770	2.844±0.273
	3		2.528		2.678	[0.99]	3.028	[0.95]	2.615	[0.98]
B	1	L	0.106		0.120		0.162		0.136	
	2		0.144	0.130±0.021	0.151	0.131±0.017	0.118	0.142±0.022	0.164	0.145±0.016
	3		0.142		0.122	[1.00]	0.147	[1.08]	0.136	[1.11]
	1	H	2.732		2.449		3.051		2.570	
	2		3.434	3.040±0.358	3.325	2.835±0.447	2.205	2.825±0.543	3.065	2.874±0.266
	3		2.956		2.732	[0.93]	3.220	[0.92]	2.987	[0.94]

LLSの内標比=0.98 (7900HT), 1.07(LC480)

【】内は解析方法(1)によるLLSの平均含有率(%)を基準とし、1としたときに、解析方法(2)~(4)による平均含有率(%)の比率を示す

準として、LC480及びEagle Taqを用いた場合の比較を行った。表2に解析方法別のLLSの含有率の結果を示した。LLSの含有率はLLS陽性DNA試料液の抽出No.ごとの3ウェルの含有率の平均値とした。解析方法(1)~(4)において、Le-1及びLLSのNTCのCp値(解析方法(1)ではCt値)がすべてのウェルで得られず、LLS陰性のDNA試料液のLLSがすべてのウェルで0コピーであったため、表2への記載を省略した。なお、解析方法(2)による定量値はデータの確実性を重要視し、High Confidenceモードの結果を採用した。High Sensitivityモードの結果では、LLSのNTCにおいて、3ウェル中、2ウェルでCp値が得られ、「最終の5サイクルでは、より不確実性が高い」と表示された。High Confidenceモードは信頼性の高いCp値を算出するために最適化されており、High Sensitivityモードと比べて偽陽性となるようなCp値の算出を減らしたモードであるからと考えられた。

解析方法(1)による定量値と解析方法(2)~(4)による定量値を次のように比較した。解析方法(1)によるLLSの平均含有率を基準とし、1としたときに、解析方法(2)~(4)によるLLSの平均含有率の比率は0.85~1.11となり、概ね良好な結果となった(表2)。よって、解析方法(2)~(4)で得られた定量値は解析方法(1)に近似した値であった。

解析方法(2)~(4)による定量値のばらつきを比

較したところ、解析方法(3)によるLLSの含有率の標準偏差が、NTC陽性DNA試料A及びBの両添加量で最も大きくなった(表2)。その原因の一つとして、解析方法(3)によるLe-1において、Noisebandの位置がTh.Lineよりも高かったため、Th.LineがいずれのAmplification Curvesとも交差せず、Cp値の算出過程で誤差が生じた可能性が考えられた。今回のFit Point法の解析条件では、解析方法の客観性を重視しNoisebandをAutoにしたため、決定したTh.Lineの位置に関わらずNoisebandの位置が固定された。そのため、解析方法(3)によるLe-1において、Noisebandの位置がTh.Lineよりも高くなる現象が起きたと考えられた。一方、解析方法(4)によるLLSの含有率の標準偏差は、NTC陽性DNA試料A及びBの両添加量で解析方法(1)よりも小さくなり(表2)、解析方法(4)では解析方法(1)と比較してもばらつきが小さい定量値が得られた。

解析方法(2)とFit Point法との特性について比較すると、解析方法(2)は全自動の解析方法であり、解析者の主観的要素が入らない反面、NTCが陽性判定となるような事例への対応が難しいと思われる。一方、Fit Point法は解析条件を任意に設定できる解析方法であり、自由度が高く、適用性が広い反面、解析データの客観性を確保するためには規定を設ける必要がある。今回の結果から、解析方法(3)及び(4)について、解析方法

(1) による定量値との差及び定量値の標準偏差を比較したところ、解析方法 (4) は解析方法 (3) よりも総合的に良好な解析方法であることが示唆された。

#### まとめ

ダイズ穀粒の組換えDNA定量検査について、LC480及びEagle Taqを用いて2nd Derivative Max法による解析を行ったところ、LLSのNTCにおいてCp値が得られる事例が認められた。そこで、その解決策を探るためLC480での3種の解析方法について比較を行った。その結果、2nd Derivative Max法の適切なモード選択及びFit Point法を用いることで、LLSのNTCにおいてCp値は得られなくなり、7900HTのTh.Line法と比較しても遜色ない定量値が得られた。

LC480による行政検査では、通知<sup>2)</sup>の記載どおりに2nd Derivative Max法を第一に選択する方針に変わりはない。しかし、今回の事例のように、2nd Derivative

Max法でNTCからCp値が得られた場合に備える上で、Fit Point法 (Error値最小) が代用できる可能性について示すことができた。

#### 文献

- 1) 農林水産省：大豆のまめ知識  
([http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d\\_tisiki/index.html#Q5](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_tisiki/index.html#Q5)) (2019/04/24アクセス)
- 2) 消費者庁次長通知 「食品表示基準について」 (消食表第139号,平成27年3月30日)(別添)「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法」,一部改正 (消食表第135号,平成31年3月28日)
- 3) 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」  
(農林水産消費安全技術センター 平成24年9月24日)