

資料

コメの組換えDNA検査方法 におけるマスターミックスの 同等性確認について

大森清美, 垣田雅史, 田中由紀子, 関戸晴子

Evaluation of equivalence of master mix in a test method for the detection of the recombinant DNA in rice.

Kiyomi Ohmori, Masasi Kakita, Yukiko Tanaka
and Haruko Sekido

平成28年8月, 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法 (以下, 通知検査法)¹⁾が改正され, 「検査方法の同等性確認方法」が新たに定められた。これに伴い, 「個別検査方法」に記載のないマスターミックスであっても同等性が確認されていれば通知検査法での使用が可能となった。当所では, 遺伝子組換えコメ (63Bt, NNBt, CpTI) の行政検査において, 通知検査法に記載のあるアプライドバイオシステムズ社製の7900HT (以下, 7900HT) とTaqMan universal PCR Master Mix (以下, TMU) を使用してきた。しかし, リアルタイムPCR装置としてロシュ社製LC480 II (以下, LC480 II) を導入したことから, 安全性審査済みのダイズ定量試験²⁾で使用されている比較的安価なEagle Taq Master Mix with ROX (ロシュ社製) (以下, Eagle Taq) を通知検査法でも適用することで検査費用等の削減を図れるものと考えた。そこで, LC480 IIを用いた安全性未審査のコメ検査法におけるTMU及びEagle Taqの同等性の評価を行った。

内在性遺伝子 (PLD) 検知法試験では, シリカゲル膜タイプの抽出精製キット (GM quicker2, ニッポンジーン社製) を用いて, コメ加工品である白玉粉から2並行でDNAを抽出精製しDNA試料原液を調製した。さらにDNA試料原液を滅菌水で10ng/ μ Lに希釈しDNA試料液とした。各DNA試料液に各々TMU及びEagle Taqを

加えて調製したリアルタイムPCR用反応液を2ウェル並行, 合計4ウェルを繰り返し3回測定した。組換えDNA (63Bt2, NNBt2及びCpTI2) の検知は, 市販の陽性プラスミド (ニッポンジーン社製) 原液から2本のリアルタイムPCR用反応液を調製し, PLDと同様に各反応液から2ウェル並行で合計4ウェルを3回測定した。

各々の組換えDNA検知での3回の測定結果についてCp値 (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, =Ct値) 及びエンドポイント (PCR増幅の最大値) を算出し, 4ウェルごとの平均を集計した (表1)。なお, エンドポイントについては, 「検査方法の同等性確認方法」¹⁾には「大きな差のないことを確認する」と記載があるが, 具体的な数値の基準がないことから判定は行わなかった。一方, Ct値の差の判定基準は, 「Ct値に最大でも1以上の差がない」と記載があるが, 「Ct値の差」については具体的な集計方法の記載がなく, 複数の可能性が考えられた。そこで, 以下の3通り (①~③) の集計方法を想定し, 判定結果を比較した (表1)。

- ① TMU及びEagle Taq各々の最大値と最小値との差
- ② TMU及びEagle Taq各々の平均値同士の差
- ③ TMUの平均値とEagle Taqの個別の測定値との差

各測定値について①~③の集計を行った結果, コメ検査法で検知対象となる全ての遺伝子について, ①~③のいずれの集計方法でも全3回の繰り返し測定結果で「Ct値の差が1未満」の評価基準を満たす検知対象は63Btのみであった。NNBtでは②の集計方法のみが3回の繰り返し測定結果で「Ct値の差が1未満」であったが, PLDおよびCpTIでは①~③のいずれの集計方法でも3回の繰り返し測定結果のうち1回以上はCt値の差が1以上であり, 判定基準を満たさなかった。今回, 同等性確認試験を実施したEagle Taqは, 安全性審査済みのダイズ定量試験で使用されているマスターミックスであり, 検知対象は異なるが通知検査法で使用されている製品である。また, ①~③の集計方法については, 最も厳格なものが①であるが, ②は他と比べて寛容である。それにも関わらずこのような結果が得られたことから, ①~③のいずれの集計方法でも, 3回の繰り返し測定結果の全てで「Ct値の差が1未満」となることは容易ではなく, それはコメ検査法の検知対象に限らず他の検査法においても同様であることが推察された。同等性確認試験の意図は, 検証データに基づいて使用可能な試薬および機器の範囲拡大である。今回の考察を踏まえ, 確認試験がなお「Ct値の差が1未満」であることを必須とするならば, ①~③の集計方法の中では最も寛容な②を適用することが妥当であると考えられた。しかしながら, ②のみでは

表 1 マスターミックスの同等性試験結果

検知対象	測定回	マスターミックス	DNA試料液	Ct値又はCp値	①マスターミックス群間での最大値と最小値の差	Ct値又はCp値の平均	②マスターミックス群間での平均値の差	③平均(TMU)と個別の反応(Eagle Taq)との差	RSD(%)	エンドポイント	エンドポイントの平均	マスターミックス群間での平均値の差				
PLD	1	TMU	1	21.89	0.97	21.88	0.93	0.09	0.09	30.75	30.24	2.58				
				21.88						31.41						
				21.88						29.17						
		** 21.87		29.62												
		Eagle Taq		2						22.81			22.81	0.93	0.93	28.18
										22.81						
	* 22.84		27.31													
	2	TMU	1	21.86	*** 1.04	21.87	*** 1.00	0.06	0.06	27.90	26.79	1.30				
				** 21.85						27.22						
				21.89						26.03						
		21.88		26.03												
		Eagle Taq		2						22.87			22.87	1.00	1.00	26.51
* 22.89										*** 1.02						
22.86	0.99		24.50													
3	TMU	1	** 21.86	0.95	21.89	0.90	0.07	0.07	27.52	26.64	3.27					
			21.87						27.29							
			21.91						25.87							
	21.9		25.87													
	Eagle Taq		2						22.79			22.79	0.90	0.90	23.86	
									* 22.81							0.92
22.78		0.89		22.75												
63Bt	1	TMU	1	30.02	0.72	29.92	0.47	0.46	0.46	18.69	17.84	4.21				
				29.98						17.81						
				29.86						16.94						
		** 29.8		17.94												
		Eagle Taq		2						* 30.52			30.39	0.60	0.60	22.74
										30.49						
	30.24		0.32		20.71											
	2	TMU	1	** 30.05	0.54	30.12	0.40	0.18	0.18	18.90	18.23	2.05				
				30.23						18.80						
				30.08						17.92						
		30.1		17.30												
		Eagle Taq		2						30.49			30.51	0.37	0.37	20.10
* 30.59										0.47						
30.46	0.34		20.21													
3	TMU	1	30.21	0.32	30.14	0.03	0.29	0.29	17.35	17.80	0.29					
			** 29.92						18.64							
			30.19						18.06							
	30.22		17.14													
	Eagle Taq		2						30.05			30.11	0.09	0.09	18.19	
									30.09							0.05
* 30.24		0.10		17.93												
2	TMU	1	30.06	0.08	30.11	0.08	0.08	0.08	16.94	18.09	0.29					
			30.06						16.94							
			30.06						16.94							

* : Ct 値又はCp値における最大値

** : Ct 値又はCp値における最小値

***: 1以上

表1 つづき

検知対象	測定回	マスターミックス	DNA試料液	Ct値又はCp値	①マスターミックス群間での最大値と最小値の差	Ct値又はCp値の平均	②マスターミックス群間での平均値の差	③平均(TMU)と個別の反応(Eagle Taq)との差	RSD(%)	エンドポイント	エンドポイントの平均	マスターミックス群間での平均値の差
NNBt	1	TMU	1	30.08	*** 1.22	30.04	0.97	0.75	0.75	0.75	13.36	1.30
				** 29.99							13.68	
				30.01							12.90	
		Eagle Taq	1	30.06		13.77						
				31.20		15.34						
				* 31.21		14.59						
	2	TMU	1	30.31	0.93	30.30	0.75	0.17	0.17	0.17	14.62	0.17
				30.32							14.59	
				** 30.20							14.35	
		Eagle Taq	1	30.36		13.64						
				* 31.13		14.61						
				31.03		14.90						
3	TMU	1	30.33	0.26	30.32	0.02	0.24	0.24	0.24	13.84	0.47	
			30.28							14.59		
			* 30.49							13.68		
	Eagle Taq	1	30.19		13.50							
			30.33		14.44							
			30.25		14.60							
CpTI	1	TMU	1	31.73	*** 1.26	31.54	*** 1.05	0.39	0.39	0.39	12.28	5.40
				31.57							12.45	
				** 31.49							11.71	
		Eagle Taq	1	31.38		12.14						
				32.55		17.81						
				32.45		18.34						
	2	TMU	1	31.81	*** 1.11	31.73	0.93	0.30	0.30	0.30	12.66	3.15
				31.79							12.04	
				31.69							11.63	
		Eagle Taq	1	** 31.62		12.03						
				32.68		16.16						
				32.52		15.70						
3	TMU	1	32.72	0.91	32.66	0.81	0.119	0.119	0.119	14.93	4.56	
			* 32.73							14.16		
			31.74							11.42		
	Eagle Taq	1	** 31.66		11.42							
			31.72		10.80							
			31.75		11.02							
2	TMU	1	32.56	0.26	30.30	0.02	0.07	0.07	0.07	14.43	0.47	
			* 32.75							14.43		
			30.39							14.01		
	Eagle Taq	1	0.01		14.44							
			0.07		14.60							
			0.09		14.43							
2	TMU	1	0.07	0.26	30.30	0.02	0.07	0.07	0.07	14.01	0.47	
			0.83							14.61		
			0.73							14.90		
	Eagle Taq	1	0.73		14.46							
			0.73		14.46							
			0.72		13.91							
2	TMU	1	0.81	0.26	30.30	0.02	0.07	0.07	0.07	14.01	0.47	
			0.73							14.46		
			0.72							13.91		
	Eagle Taq	1	0.81		14.44							
			0.85		15.70							
			0.77		15.56							
2	TMU	1	0.79	0.26	30.30	0.02	0.07	0.07	0.07	14.01	0.47	
			0.81							14.44		
			0.73							14.90		
	Eagle Taq	1	0.73		14.46							
			0.73		14.46							
			0.72		13.91							

精度が判定結果に反映されないことから、②の集計方法を用いる場合は、RSD（相対標準偏差）等の上限値を加えた判定基準の設定を要するものと考えられた。

文献

- 1) 厚生労働省医薬 生活衛生局 生活衛生・食品安全部長，安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法の一部改正について，生食発0824 第2号，平成28年8月24日。
- 2) 消費者庁次長，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，消食表第135号，平成31年3月28日。