

技術報告

LightCycler[®]480を用いた遺伝子組換え食品検査の検討

赤星 千絵¹, 垣田 雅史², 本田 裕子^{3**}, 佐藤 英子¹, 内山 陽介², 大森 清美², 濟田 清隆³,
吉田 裕一¹, 佐藤 弘樹^{3**}, 関戸 晴子^{2*}

Study on examination of genetically modified foods by LightCycler[®]480

Chie AKABOSHI, Masashi KAKITA, Yuko HONDA, Eiko SATO, Yosuke UCHIYAMA,
Kiyomi OHMORI, Kiyotaka SAITA, Yuichi YOSHIDA, Hiroki SATO and Haruko SEKIDO

Synopsis

Chie AKABOSHI, Masashi KAKITA, Yuko HONDA, Eiko SATO, Yosuke UCHIYAMA, Kiyomi OHMORI, Kiyotaka SAITA, Yuichi YOSHIDA, Hiroki SATO and Haruko SEKIDO (Kawasaki City Institute for Public Health, 3-25-13 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-0821, Japan). Study on examination of genetically modified foods by LightCyclerr[®]480

The testing methods for genetically modified (GM) foods according to national notifications in Japan mention the recommended models of the Real-time PCR machine and also define the protocol. We compared the performance of two models, LightCycler[®]480 System II (LC480, Roche Diagnostics) and ABI PRISM[®] 7900HT (7900, Applied Biosystems) in the inspection of GM foods at the three public health institutes in Kanagawa Prefecture. We compared items of sensitivity, repeatability, difference between wells, and amplification efficiency, for the results, LC480 had the same performance as 7900. In the sensitivity of GM rice, GM papaya, and GM potato, the LC480 was equal to or higher than 7900. On the other hand, in the inspections using LC480, several problems were raised in analyzing the results. The three institutes considered and unified the solutions to these problems. This study contributes to ensure the reliability of our inspection using LC480.

Key Words : Real-time PCR, genetically modified foods, validation

緒言

神奈川県内の地方衛生研究所の中で、遺伝子組換え（以下、GM）食品検査は神奈川県衛生研究所、横浜市衛生研究所、川崎市健康安全研究所の3機関が実施している。3機関とも、検出機器（リアルタイムPCR装置）

の機種変更を平成29-30年度に行い、メーカーのサポート体制が終了するApplied Biosystems製ABI PRISM[®] 7900HT（以下、7900）からRoche Diagnostics製Light Cycler[®]480 System II（以下、LC480）を使用するようになった。GM食品検査では、用いる検出機器の機種について厚生労働省通知¹⁾及び消費者庁通知²⁾（以下、両通知法）で言及されており、解析方法についても定められている。GM食品検査の定性試験においては、感度、繰り返し再現性、well間差、増幅効率等の同等性を確認すれば両通知法に記載されていない機種を使用できる旨が記されている。7900及びLC480は、ともに両通知法

1 川崎市健康安全研究所 食品担当
〒210-0821 川崎市川崎区殿町3-25-13
akaboshi-c@city.kawasaki.lg.jp

2 神奈川県衛生研究所 理化学部

* 現 企画情報部

3 横浜市衛生研究所

** 現 保土ヶ谷福祉保健センター

に記載されている機種であるが、収去検査でLC480を使用するにあたり検査結果の信頼性を確保するため、7900と比較検証した。またLC480を用いた結果において、7900を用いた結果では見られなかった現象について、3機関で検討した。

方法

安全性未審査のGMコメ (63Bt, NNBt, CpTI), GM パパイヤ (PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 及びGM バレイショ (F10, J3) の検知試験については厚生労働省通知¹⁾に準じ、安全性審査済みのGMダイズ (RRS, LLS, RRS2) の定量試験については消費者庁通知²⁾に準じた。リアルタイムPCR装置は、LC480及び7900を用いた。リアルタイムPCR装置の測定値 (Cq値: Quantification Cycle値) は、PCR増幅反応液の蛍光シグナルがリアルタイムPCR反応の閾値 (Threshold Line) に達した時点の増幅サイクル数である。Threshold Lineの設定を含む解析方法は両通知法に沿って行い、Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments [MIQE] guidelines³⁾に準じてLC480での測定値 (Cp値: Crossing Point値) 及び7900における測定値 (Ct値: Threshold Cycle値) をCq値として結果に表示した。LC480を用いたPCR増幅反応は、各試験において両通知法に記載のサイクル数より5サイクル増やして測定した。

1. 使用試薬

コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI), パパイヤ (Q-Chy, 35S, PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN), バレイショ (APRT, F10, J3) 及びダイズ (Le1, LLS, RRS2) の各陽性コントロールプラスミド (以下, PC) は株ニッポンジーン (以下, NG) 製を用いた。ただし方法2の試験では、copy数の明らかなPLD遺伝子のPCとしてThermo Fisher Scientific (以下, TFS) 製合成依頼品を用いた。各プライマー対及びプローブは、NG製、TFS製又は株ファスマック製を用いた。マスターミックスはTFS製のUniversal PCR Master Mix (以下, UMM) とTaqMan Gene Expression Master Mix (以下, GMM), Roche Diagnostics製のEagle Taq Master Mix (Rox) (以下, EMM) とFastStart Universal Probe Master (Rox) (以下, FM) を使用した。水は滅菌水又はQIAGEN製Nuclease Free Waterを用いた。

2. 機種同等性の確認

2-1. 検出限界の比較

PLD又はLe1のPCを2-1000 copy/wellとなるよう水で希釈し、対応する各プライマー対及びプローブ、並びにUMMを用いてPCR用反応液を調製し、2機種を用い

て10 well併行でPCR増幅させた。PCR条件は両通知法に従った。

2-2. well間差の比較及び繰り返し再現性の確認

PLD又はRRS2のPCを、500又は100 copy/wellとなるよう水で希釈し、対応する各プライマー対及びプローブ、並びにUMM (PLD) 又はEMM (RRS2) を用いてPCR用反応液を調製し、LC480 (PLD及びRRS2) 及び7900 (PLD) を用いて96 well併行でPCR増幅させた。500 copy/wellを用いた試験については3回繰り返し測定を行った。PCR条件は両通知法に従った。

2-3. 増幅効率の比較

Le1のPCを各濃度 (10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ copy/well) となるよう水で希釈した液、Le1用プライマー対及びプローブ並びにUMMを用いてPCR用反応液を調製し、2機種を用いて10 well併行でPCR増幅させ、それぞれの解析ソフトを用いて得られた検量線の傾きから増幅効率を算出した。PCR条件は消費者庁通知²⁾に従った。

3. 安全性未審査GM食品検査の妥当性確認

3-1. 各遺伝子の検知における検出限界の比較

コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI), パパイヤ (Q-Chy, 35S, PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 及びバレイショ (APRT, F10, J3) のPCを水で10-1000倍希釈した液、対応するプライマー対及びプローブ、並びにUMM (コメ), EMM (パパイヤ, LC480), GMM (パパイヤ, 7900) 又はFM (バレイショ) を用いてPCR用反応液を調製した。その反応液について、2機種を用いて10 well併行で測定した。試験に用いたNG製PCは、含まれるcopy数が明らかにされていないため、各試験において同ロットのPCを水で希釈した溶液を用いた。PCR条件は厚生労働省通知¹⁾に従った。

3-2. PCの測定値の比較及び繰り返し再現性の確認

コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI), パパイヤ (Q-Chy, 35S, PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 及びバレイショ (APRT, F10, J3) のPCについて、2機種を用いて2 well併行で3回測定 (7900を用いたパパイヤの試験のみ2回測定) した。PCR条件は厚生労働省通知¹⁾に従った。PCR用反応液の調製には、3-1の試験と同じ試薬を使用した。また、コメ (PLD, 63Bt, NNBt, CpTI) のPC (3-1で使用したPCとは異なるロットのPC) を水で10倍希釈した液について、LC480を用いて10 well併行で3回繰り返し測定を行った。同様の操作により、7900においても1回測定を行った。

4. LC480を用いた試験における課題の検証

3機関でそれぞれLC480を用いて検証した。

4-1. バレイショF10検知試験の増幅曲線

PC, ブランク試料液 (NTC: Non Template Control)

として水、及びGM食品陰性検体についてバレイショF10検知試験を、2 well併行で測定した。PCR条件及び試薬は厚生労働省通知¹⁾に従った。

4-2. ダイズLLS定量試験のNTCにおける微量増幅

NTCとして用いるNG製5ng/μL ColE1/TE溶液について、ダイズLLSの定量試験を実施した。消費者庁通知²⁾に従い、マスターミックスはUMM又はEMMを用いてPCR用反応液を調製し、PCR増幅を行った。

4-3. バレイショF10検知試験のNTCにおける微量増幅

NTCとして水を用いたバレイショF10検知試験を実施した。厚生労働省通知¹⁾に従いF10検知用プライマー対及びプローブ (NG製又はTFS製)、並びにFMを用いてPCR用反応液を調製し、PCR増幅を行った。

結果及び考察

1. 機種同等性の確認

両通知法の定性用リアルタイムPCR装置の同等性確認方法に従い、任意のプライマーを用いて実施した。方法2-1の結果を表1に示した。表1(1)から、コメPLD検知試験において、LC480を用いた試験では4 copy以上で10 well中10 well検出された。本結果は、同じ

くLC480を用いたコメPLD検知試験において10 well中10 well検出された最低濃度が4 copyであったとのメーカー技術資料⁴⁾と一致していた。一方、7900を用いた試験では、2 copy及び5 copy以上では10 well, 4 copyでは9 well検出されたことから、4copy以下では検出が不安定と考えられた。また、ダイズLe1検知試験において、2機種とも10 copy以上で10 well中10 well検出された(表1(2))。よって、LC480は7900と同等の感度であると認めた。

次に、方法2-2の結果を表1(3)に示した。well間差の比較及び繰り返し再現性については、検出限界より少し高い濃度の溶液を用いてCq最大値と最小値の差(ΔCq)が1より低いことを確認するため、表1(1)(2)のΔCqの結果及び既報⁴⁾から500 copyを用いることとした。コメPLD及びダイズRRS2検知試験において500 copyを96 well併行で3回繰り返し測定を行ったところ、LC480を用いた測定で3回ともすべてのwellで検出され、繰り返し測定の平均値の差及び96 well間のΔCqは1より低かった。既報⁴⁾のコメPLD検知試験における同様の試験では、3回のCq平均値が29.67, 相対標準偏差(RSD)が0.13~0.18%, ΔCqが0.17~0.23と報告されており、本結果の方がCq平均値は少し高く、ばらつきは少し大きかったが、7900を用いた同様のコメPLD検知試験において得られた結果と同等であった。

LC480を用いたダイズRRS2検知試験において100 copyについても96 well併行で測定したところ、96 well間のΔCqは1より低く、96 well間で差がないことを確認した。

また、方法2-3を実施し、2機種から得られた検量線及び算出した増幅効率を図1に示した。LC480は7900より増幅効率が100%に近く、良好であった。

これらの結果から、LC480は、7900と同等の性能を有することを確認した。

表1 低コピー濃度溶液におけるPCR増幅結果
(1) コメPLDの測定結果 (10 well併行)

溶液中の copy数	LC480			7900		
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率
2	(38.40)	(2.03)	9/10	38.22	1.89	10/10
4	36.95	3.08	10/10	(37.40)	(2.62)	9/10
5	36.72	2.85	10/10	37.07	2.10	10/10
7	36.28	1.91	10/10	36.26	1.44	10/10
10	35.90	1.53	10/10	35.83	1.52	10/10
500	29.77	0.25	10/10	30.00	0.09	10/10

(2) ダイズLe1の測定結果 (10 well併行)

溶液中の copy数	LC480			7900		
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率
2	(39.03)	(1.55)	4/10	(38.84)	(2.67)	7/10
5	(37.10)	(0.88)	7/10	(38.37)	(2.12)	9/10
10	37.02	2.42	10/10	37.99	2.61	10/10
100	33.21	0.68	10/10	33.95	0.54	10/10
1000	29.74	0.18	10/10	30.52	0.31	10/10

(3) 繰り返し再現性及びwell間差の確認 (96 well併行)

検知した 遺伝子	溶液中の copy数	試行回数	LC480			7900		
			Cq平均値	RSD(%)	ΔCq	Cq平均値	RSD(%)	ΔCq
コメ PLD	500copy	1回目	29.73	0.20	0.29	29.96	0.20	0.30
		2回目	29.84	0.20	0.34	30.05	0.23	0.34
		3回目	29.81	0.20	0.32	30.05	0.23	0.33
ダイズ RRS2	500copy	1回目	30.22	0.26	0.40			未実施
		2回目	30.22	0.23	0.36			
		3回目	30.94	0.24	0.35			
	100copy	1回目	32.62	0.53	0.90			

ΔCq : Cqの最大値-最小値. RSD : 相対標準偏差.

()内は検出されたCqのみを使用して算出した。

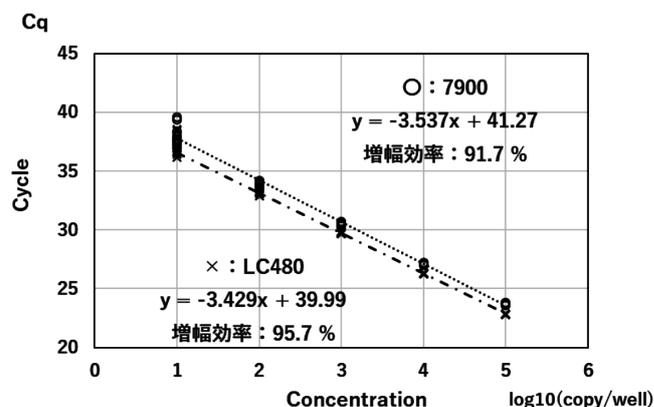


図1 ダイズLe1の検量線 (10 well併行)

表2 安全性未審査遺伝子組換え食品の検出下限の比較

(1) コメ (63Bt, NNBt, CpTI) 試験

PCの希釈率	LC480			7900			
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率	
PLD	1/100	(37.49)	(1.42)	9/10	(38.01)	(2.25)	8/10
	1/50	36.43	1.57	10/10	36.77	1.33	10/10
	1/20	35.51	1.66	10/10	35.49	0.67	10/10
	1/10	34.66	1.06	10/10	34.81	0.92	10/10
63Bt	1/100	37.49	1.73	10/10	38.40	2.85	10/10
	1/50	36.98	2.55	10/10	37.36	2.33	10/10
	1/20	35.34	1.05	10/10	36.23	1.57	10/10
	1/10	34.61	1.01	10/10	35.08	0.98	10/10
NNBt	1/100	37.52	1.57	10/10	(38.26)	(1.43)	9/10
	1/50	36.90	1.50	10/10	37.73	3.19	10/10
	1/20	35.82	1.47	10/10	36.35	2.51	10/10
	1/10	34.74	0.69	10/10	35.60	1.04	10/10
CpTI	1/100	38.11	2.85	10/10	(40.18)	(3.35)	9/10
	1/50	37.23	1.23	10/10	38.93	2.65	10/10
	1/20	36.85	1.23	10/10	38.41	1.16	10/10
	1/10	36.05	0.73	10/10	37.04	0.93	10/10

(2) パパイヤ (PRSV-YK, PRSV-SC, PRSV-HN) 試験

PCの希釈率	LC480			7900			
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率	
Q-Chy	1/1000	38.61	2.33	10/10	未実施	-	
	1/500	36.87	2.64	10/10	38.28	1.33	10/10
	1/100	34.50	0.70	10/10	37.24	0.99	10/10
	1/50	33.47	0.57	10/10	36.02	0.82	10/10
35S	1/1000	(38.70)	(2.74)	7/10	未実施	-	
	1/500	37.73	2.20	10/10	38.68	1.57	10/10
	1/100	35.62	1.15	10/10	37.24	0.81	10/10
	1/50	34.68	0.74	10/10	36.24	0.44	10/10
PRSV-YK	1/1000	(39.55)	(3.08)	8/10	未実施	-	
	1/500	37.27	1.08	10/10	-	0/10	
	1/100	35.80	0.46	10/10	39.89	1.37	10/10
	1/50	34.67	0.70	10/10	38.81	1.23	10/10
PRSV-SC	1/1000	(39.94)	(1.97)	9/10	未実施	-	
	1/500	38.28	2.12	10/10	(39.58)	(0.62)	6/10
	1/100	36.28	1.82	10/10	37.98	1.06	10/10
	1/50	35.11	0.62	10/10	37.05	0.69	10/10
PRSV-HN	1/1000	(37.93)	(2.10)	7/10	未実施	-	
	1/500	36.54	1.18	10/10	-	0/10	
	1/100	34.71	1.09	10/10	41.69	1.82	10/10
	1/50	33.73	0.73	10/10	39.67	1.84	10/10

(3) バレイショ (F10, J3) 試験

PCの希釈率	LC480			7900			
	Cq平均値	ΔCq	検出率	Cq平均値	ΔCq	検出率	
APRT	1/1000	36.91	2.43	10/10	(36.82)	(3.13)	9/10
	1/500	35.66	1.26	10/10	35.87	1.63	10/10
	1/200	34.66	1.09	10/10	34.84	1.05	10/10
	1/100	33.44	0.77	10/10	33.79	1.09	10/10
F10	1/1000	39.83	3.43	10/10	41.04	3.09	10/10
	1/500	38.68	1.41	10/10	39.73	1.99	10/10
	1/200	36.97	1.19	10/10	37.62	1.71	10/10
	1/100	36.04	1.32	10/10	36.87	1.40	10/10
J3	1/1000	(37.78)	(2.07)	9/10	38.70	2.14	10/10
	1/500	36.86	2.45	10/10	37.75	2.33	10/10
	1/200	35.54	0.87	10/10	36.67	1.05	10/10
	1/100	34.30	0.48	10/10	35.29	1.10	10/10

ΔCq : Cqの最大値-最小値.

()内は検出されたCqのみを使用して算出した.

2. 安全性未審査GM食品検査の妥当性確認

2-1. 各遺伝子検知における検出下限の比較

GMコメ, GMパパイヤ及びGMバレイショの検査で用いる各遺伝子の検知について, LC480が7900と同等以上の感度を有するかを調べるため, 方法3-1を実施した. コメ検知試験で用いるすべての遺伝子の検知において10 well中10 well検出した最大希釈率を比較したところ, 2機種とも1/50であった(表2(1)). パパイヤ検知試験でも同様に比較したところ, LC480は1/500, 7900は1/100であり, LC480の方が7900より低濃度から検出された(表2(2)). バレイショ検知試験では2機種とも1/500であった(表2(3)). よってLC480は, コメ及びバレイショの検知試験において7900と同等の感度を有し, パパイヤにおいては同等以上の感度を有していることが確認された.

2-2. PCの測定値の比較及びコメの繰り返し再現性の確認

方法3-2を実施した結果を表3に示した. PCのCq平均値は, すべての検知遺伝子で7900よりLC480が小さく, その差はパパイヤの検知遺伝子で大きかった.

コメの検知試験において, PCの1/10希釈液を用いた2機種の感度比較及びLC480における繰り返し試験を行った結果を表4に示した. 測定値の平均は, すべての検知遺伝子で7900よりLC480が小さく, RSDとΔCqを比較すると, ばらつきは概ね同等であった. LC480を用いた10 wellの平均値の3回繰り返し測定による差は1より低く, 再現性も良好であった.

コメとバレイショの内在性遺伝子(PLD及びAPRT)では, 米加工食品13検体及びばれいしょ加工食品8検体を用いた検査において, 測定値は2機種でほぼ同等であり, すべて陰性判定で一致した(データ不記載).

2-1と2-2の結果からGMコメ, GMパパイヤ及びGMバレイショの検査において, LC480を用いた検査の妥当性が確認された. 用いるプライマーによって, 機種による測定値の差が大きいものがあったため, 各遺伝子の検知試験における機種の同等性を比較する意義は大きかった.

表3 PC原液のCq平均値の比較

測定機種	コメ				パパイヤ					バレイショ		
	PLD	63Bt	NNBt	CpTI	Q-Chy	35S	PRSV-YK	PRSV-SC	PRSV-HN	APRT	F10	J3
LC480	30.92	30.69	31.36	32.74	27.84	28.70	28.67	29.25	28.11	26.63	28.17	27.39
	±0.45	±0.48	±0.41	±0.52	±0.15	±0.14	±0.05	±0.16	±0.07	±0.07	±0.18	±0.09
7900	31.22	31.43	32.44	34.16	*30.42	*30.47	*33.98	*31.45	*36.58	26.81	28.92	28.55
	±0.39	±0.53	±0.46	±0.64	±0.19	±0.28	±0.96	±0.24	±2.14	±0.18	±0.38	±0.10
平均値の差	0.30	0.74	1.08	1.42	2.58	1.77	5.31	2.20	8.47	0.18	0.75	1.16

2wellずつ3回測定のCq平均値(上段) ±標準偏差(下段). ただし, *は2wellずつ2回測定のCq平均値 ±標準偏差.

表4 PCの1/10希釈液を用いたコメ検知試験の感度比較及び繰り返し再現性 (10well併行)

検知した遺伝子	試行回数	LC480			7900		
		Cq平均値	RSD(%)	ΔCq	Cq平均値	RSD(%)	ΔCq
PLD	1回目	33.69	0.87	0.99	33.80	0.97	0.88
	2回目	33.59	1.04	1.24	未実施		
	3回目	33.65	1.11	1.32			
63Bt	1回目	33.82	0.55	0.63		34.17	0.82
	2回目	33.68	0.55	0.68	未実施		
	3回目	33.34	0.49	0.48			
NNBt	1回目	34.06	0.42	0.48		34.98	0.92
	2回目	33.99	0.77	1.01	未実施		
	3回目	34.04	0.63	0.74			
CpTI	1回目	35.01	0.67	0.80		35.79	0.79
	2回目	35.04	0.85	0.85	未実施		
	3回目	35.07	0.90	1.03			

ΔCq : Cqの最大値-最小値. RSD : 相対標準偏差.

3. LC480を用いた試験における課題の検証結果と対応

1, 2の試験実施の際, LC480を用いた試験では以下の課題が挙げられたため, 3機関の収去検査における対応を検討した.

3-1. PCR増幅反応の設定サイクル数

LC480の2nd Derivative Max法による解析では, PCR増幅反応の設定サイクルのラスト5サイクルで増幅するCq値について, [設定サイクル数-5]で算出される. 例えば45を設定サイクルとし, 40~45のCq値となる増幅がある場合, Cq値>40と算出される仕様となっている. 両通知法の陽性基準はCq値が「設定サイクル数-2」未満であるため, 各検知試験においてその判定ができるよう, 設定サイクル数を両通知法より5サイクル増加して分析することとした.

3-2. バレイシヨF10検知試験の直線的な増幅曲線

LC480を用いたF10検知試験において, DNA試料液の代わりに水を用いたNTC及び7900を用いた測定で陰性を確認した食品からのDNA抽出液を測定したところ, 右肩上がりの直線的な増幅曲線が認められた (図2). その解析結果で, 陽性に該当するCq値が得られたwellがあった (データ不記載). この現象は, 3機関で共通

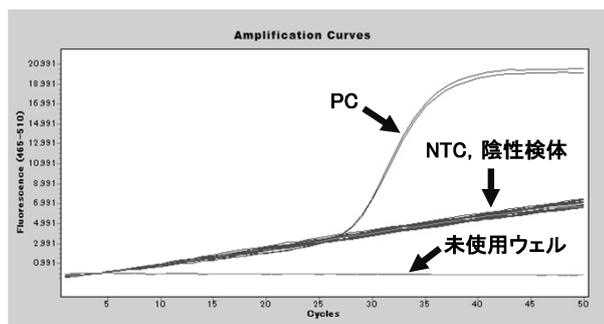


図2 LC480を用いたバレイシヨF10増幅曲線

表5 LC480を用いたダイズLLS定量試験におけるNTCの増幅検出 (well数)

マスターミックス 機関記号	EMM			UMM		
	A	B	C	A	B	C
40以上45未満	9	1	6	0	0	0
Cq値表示 45以上	4	6	8	0	0	0
Negative*	20	23	10	15	12	12
計	33	30	24	15	12	12

*Cq値のstatusに”?”が表示されている場合を含む.

EMM: Eagle Taq Master Mix, UMM: Universal PCR Master Mix

表6 LC480を用いたバレイシヨF10検知試験におけるNTCの増幅検出 (well数)

プライマー・プローブ製造元 機関記号	株ニッポンジーン			Thermo Fisher Scientific株	
	A	B	C	A	C
40以上43未満	1	0	0	0	1
Cq値表示 43以上	3	0	0	1	4
Negative*	50	36	12	15	67
計	54	36	12	16	72

*Cq値のstatusに”?”が表示されている場合を含む.

使用したNTC: 滅菌水 (機関A及びB) またはQIAGEN製Nuclease Free Water (機関C)

して認められた.

LC480では, 増幅曲線はReporter色素のFAMの蛍光強度を示す. 本検知試験では, 7900を用いた場合も同様にFAMの蛍光強度は増加していたが, Quencher色素のTAMRAも解析するため増幅曲線上では増加せず, 解析結果で陰性となっていた. LC480においてNTC及び陰性食品のCq値が陽性となった場合については, 厚生労働省通知¹⁾の陽性判定では「指数関数的な増加」を確認することとなっているため, 複数の目視で「指数関数的な増加」が認められない場合は陰性と判断することにした.

3-3. ダイズLLS定量試験のNTCにおける微量増幅

LLS定量試験において, NTCとしてColE1/TE溶液を用いて3機関で測定した結果を表5に示した. マスターミックスにEMMを用いたColE1/TE溶液の増幅結果において, サイクル数40以降に指数関数的な増幅 (微量増幅) が生じ, Cq値40以上の結果が得られた事例が, 3機関で認められた. そこで, マスターミックスをUMMに変更したところ, Cq値はすべてNegativeとなった. また, ColE1/TE溶液を水に代え, EMMを用いて3機関で計72試行繰り返したところ, Cq値はすべてNegativeであった (データ不記載). 以上のことから, ColE1/TE溶液とEMMを使用した場合にのみ発生することがある非特異的な増幅と考えられたため, 本試験ではマスターミックスにUMMを使用することにした.

3-4. バレイショF10検知試験のNTCにおける微量増幅

F10検知試験において、NTCとして水を用いて3機関で測定した結果を表6に示した。NTCでの微量増幅が2機関で確認され、「Cq値43以上」のwellは190 well中8 wellで、「Cq値43未満」のwellは190 well中2 wellであった。本試験は、使用するマスターミックスが厚生労働省通知¹⁾には1種のみ記載されており、変更するには同等性の確認が必要であるため、マスターミックスは変更せずプライマー・プローブについて製造元の異なる2種類を用いて実施し、いずれもこの微量増幅が認められた。

この微量増幅は改善には至らなかったが、出現頻度が低く、PCの希釈液で検出下限付近を測定した際に「Cq値43以上」で検出されたwellはなかった（データ不記載）ことも考慮し、非特異的増幅であると考え、適切な検査が行われていたこととした。NTCが「Cq値43未満」で検出された際は、再度PCR試験を実施することとした。上の3-1～3-4の課題について決めた対応を3機関で統一することで、神奈川県内におけるGM検査の整合性を保った。

まとめ

神奈川県内地方衛生研究所でGM検査を実施している3機関においてLC480と7900の併行設置期間を設け、コメ、パパイヤ、バレイショ及びダイズ試験について比較検討し、結果から得られた課題について検証した。各機関で検証結果を確認し、課題への対応策を統一できたことは、各機関における本検査結果への信頼性の向上にもつながった。

和文抄録

遺伝子組換え食品の検査の通知法は、用いる検出機器の機種について言及しており、解析方法についても定め

ている。神奈川県内の3地方衛生研究所において、Roche Diagnostics製LightCycler[®] 480 System IIとApplied Biosystems製ABI PRISM[®] 7900HTの2機種の遺伝子組換え食品検査における性能を比較した。本結果から、感度、繰り返し再現性、well間差、増幅効率において、LC480は7900と同等の性能を有していた。GMコメ、GMパパイヤ、GMバレイショの感度においては、LC480は7900と同等以上であった。一方、LC480を用いた試験では、結果を解析するうえでいくつかの課題が挙げられた。それらの課題についての対処方法を、3機関で考え統一した。本研究により、LC480を用いた我々の検査の信頼性の確保に貢献した。

文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長，安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について 別添 安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法，食安発1116第3号，平成24年11月16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139号，平成27年3月30日。
- 3) Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. et al.: The MIQE guidelines: minimum for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clinical Chemistry*, 55, 611-622 (2009).
- 4) 日本ジェネティクス株式会社：技術資料Technical Data Sheet Vol.01 FEB 2018 厚生労働省より通知されている「遺伝子組換え食品検査方法」に則った、ロシュ社製リアルタイムPCR装置の同等性試験の結果
<<https://www.n-genetics.com/products/1295/1024/16517.pdf>> (2021/6/11アクセス)