

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

本資料はロシュ・ダイアグノスティックス株式会社と共同で作成しました。

背景

遺伝子組換え食品の安全性審査は、食品衛生法上の義務となっている。安全性未審査の遺伝子組換え作物の食品への混入に関する検査は、「遺伝子組換え食品検査方法」に従って実施される。検査に用いられるリアルタイムPCR装置は、既に記載されている機種以外にも同等の性能を有するものを用いる事ができる。

同等の性能を有するかどうかは、「(別添) 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法」の「Ⅲ. 検査方法の同等性確認方法」に掲載されている方法に則って実施し、確認することができる。

「Ⅲ. 検査方法の同等性確認方法」の「2. リアルタイムPCR 装置について」より引用

「Ⅱ. 個別検査方法」で主に用いられているABI PRISM 7900 又はLightCycler96/480 の他にも同等の性能を有する機種を用いる事ができる。同等の性能の確認は、感度、繰り返し再現性、ウェル間差及び増幅効率（特に定量する場合）などを考慮して行う。例えば、市販陽性対照プラスミド（例えば、コメ用）を用意し、現行機種（ABI PRISM 7900 等）を用いて検出限界より少し高い濃度（10 回中10 回すべて検出される最低濃度）の希釈溶液を作製する。その溶液を用いて、確認したい機種で同様の試験を行い、また、日を変えて3 回以上行った結果、すべて検出されること。96 ウェル間で差がないことを確認する（Ct 値に最大でも1 以上の差がない。）。

目的

上記背景を踏まえ、LightCycler 480® SystemⅡとLightCycler 96® Systemは、厚生労働省より通知されている「安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法」に用いられるリアルタイムPCR装置の取載機種と定義できる。

本試験では、LightCycler 480® SystemⅡとLightCycler 96® Systemの「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法」で通知された試験法に基づきデータを得たので報告する。

試験の流れ

検出限界濃度の決定	現行機種	
↓		
増幅効率の算出	現行機種	評価装置
↓		
繰り返し再現性およびウェル間差	現行機種	評価装置

方法

(別添) 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法 (http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/identsh/kensa/kensa.html) に掲載されている「2. リアルタイムPCR 装置について」に沿って、リアルタイムPCR 装置の同等性試験を次の2法について実施した。現行機種はLightCycler 480® SystemⅡ、評価機種はLightCycler 96® Systemとした。

【現行機種】 LightCycler® 480 SystemⅡ (以下LC480) (Cat.No. 05015278001) : ロシュ・ダイアグノスティックス社

【評価装置】 LightCycler® 96 System (以下LC96) (Cat.No. 05815916001) : ロシュ・ダイアグノスティックス社

1. ロシュ社より供給されている機器精度管理の為の、コントロールキットを用いた方法
 - (1) 検出限界

コントロールキット添付プラスミド溶液を1 ~ 10コピー / 5 μL濃度に調製し、LC480にてそれぞれの濃度を10 well併行で測定した。10well全てでサイクル数 (Cp値) が得られた濃度を検出限界濃度とした。
 - (2) 増幅効率

コントロールキット添付プラスミド溶液を5 ~ 100,000 コピー / 5 μL 濃度に調製し、LC480およびLC96 にて10 well 併行で測定した。得られた検量線より、装置の増幅効率を算出した。
 - (3) 繰り返し再現性およびウェル間差
 - (1) の検出限界の約100 倍 (500 コピー) 濃度のn=96 well/プレートの反応プレートを準備し、LC480およびLC96にてそれぞれ1日1回とし、計3 回繰り返し実施した。それぞれの繰り返し再現性 (RSD) およびサイクル数の値の差 (ΔCp, ΔCq) を検討した。
2. コメPLD 遺伝子合成DNA断片を用いたコメ陽性対照遺伝子検出の方法
 - (1) 検出限界

コメPLD 遺伝子合成DNA断片溶液を2 ~ 10コピー / 5 μL濃度に調製し、LC480にてそれぞれの濃度を10 well併行で測定した。10well全てでサイクル数 (Cp値) が得られた濃度を検出限界濃度とした。
 - (2) 増幅効率

コメPLD 遺伝子合成DNA断片溶液を5 ~ 500,000 コピー / 5 μL 濃度に調製し、LC480およびLC96 にて10 well 併行で測定した。得られた検量線より、装置の増幅効率を算出した。
 - (3) 繰り返し再現性およびウェル間差
 - (1) の検出限界の約100 倍 (500 コピー) 濃度のn=96 well/プレートの反応プレートを準備し、LC480およびLC96にてそれぞれ1日1回とし、計3 回繰り返し実施した。それぞれの繰り返し再現性 (RSD) およびサイクル数の値の差 (ΔCp, ΔCq) を検討した。

1. ロシュ社より供給されている機器精度管理の為の、コントロールキットを用いた方法

実験条件

キットのプロトコルに沿って、反応溶液ミックスはn=10又はn=96に必要な体積の10%増しにて調製し、20 µL容量にて反応を行った。

- Primer/Probeおよびプラスミド…LightCycler® 480 Control Kit (Cat.No.04710924001) : ロシュ・ダイアグノスティックス社
- 試薬…FastStart Universal Probe Master (Rox) (Cat.No.04913949001) : ロシュ・ダイアグノスティックス社
- 反応組成…キットのプロトコルに従って、反応溶液ミックスを調製した。

反応液組成	容量/反応	最終濃度
template DNA	5 µL	
FastStart Universal Probe Master (Rox)	10 µL	1x
Primer Mix, 20× (vial 9)	1 µL	1x
Quantification Probe, 10×(vial 11)	2 µL	1x
Water, PCR Grade	2 µL	
Total Volume	20 µL	

- 反応条件…機器登録の標準プログラムを使用。

95°C	10分] 45 サイクル
95°C	10秒	
60°C	30秒	

結果の詳細・考察

(1) 検出限界

感度の評価として、コントロールキット添付プラスミド溶液を1～10コピー/5 µL濃度に調製し、LC480にてそれぞれの濃度を10 well 併行で測定した。10well全てでサイクル数(Cp値)が得られた濃度を検出限界濃度とした。その結果、検出限界(感度)は、5コピーと判断された(表1)。

表 1 : 現行機種 LC480 による検出限界試験の結果

コピー数	Cp値		平均値	SD	RSD (%)	ΔCp
1.00	35.14	Negative				
	36.12	37.53				
	36.46	35.04				
	35.58	35.99				
	35.41	Negative				
2.00	38.31	36.21				
	36.51	Negative				
	Negative	36.54				
	36.30	36.86				
	33.83	35.04				
5.00	34.36	33.73	34.18	0.38	1.12	1.08
	34.46	34.81				
	34.02	34.15				
	34.70	33.84				
	33.99	33.78				
10.00	32.70	33.62	32.97	0.35	1.06	1.10
	32.90	33.00				
	32.91	33.52				
	32.52	32.73				
	32.78	33.00				

(2) 増幅効率

増幅効率の評価として、コントロールキット添付プラスミド溶液を5～100,000コピー/5μL濃度に調製し、LC480およびLC96にて10well併行で測定した。得られた検量線よりそれぞれの装置の増幅効率を算出した(表2, 3)。その結果、各装置の増幅効率はLC480:1.926、LC96:2.01となり、同等の良好な増幅効率となった。

表2: 増幅効率試験の結果 (LC480)

コピー数	Cp 平均値	Cp STD	conc 平均値 (コピー)	Conc SD	RSD (%)	ΔCp	増幅効率
5	33.78	0.35	5.48	1.96	35.77	1.03	1.926
10	32.93	0.29	10.65	2.14	20.08	1.00	
100	29.59	0.07	93.91	4.10	4.36	0.21	
1,000	25.95	0.06	1,022.60	41.27	4.04	0.17	
10,000	22.40	0.09	10,431.00	616.02	5.91	0.26	
100,000	19.01	0.07	96,340.00	4,196.61	4.36	0.18	

表3: 増幅効率試験の結果 (LC96)

コピー数	Cq 平均値	Cq STD	conc 平均値 (コピー)	Conc SD	RSD (%)	ΔCq	増幅効率
5	34.98	0.31	5.02	1.00	19.84	1.14	2.01
10	34.02	0.19	9.72	1.38	14.23	0.55	
100	30.82	0.12	90.53	7.54	8.33	0.40	
1,000	27.21	0.08	1,124.00	64.20	5.71	0.26	
10,000	23.66	0.08	13,440.00	765.00	5.69	0.24	
100,000	21.14	0.33	79,550.00	20,230.00	25.43	1.07	

(3) 繰り返し再現性およびウェル間差

繰り返し再現性およびウェル間差の評価として、検出限界の約100倍(500コピー)濃度のn=96well/プレートの反応プレートを準備し、LC480およびLC96にてそれぞれ1日1回とし、計3回繰り返し実施した。それぞれの繰り返し再現性(RSD)およびサイクル数の値の差(ΔCp, ΔCq)を検討した。その結果、LC480では3回のCp平均値は26.74～27.66、RSDは0.32～0.46%、Cp値のウェル間差(ΔCp)については0.40～0.55と1未満であった(表4)。LC96では3回のCq平均値は27.86～29.03、RSDは0.33～0.46%、Cq値のウェル間差(ΔCq)については0.46～0.71と1未満であった。全てのサイクル数データは、[別添]技術資料 Technical Data Sheet (補足資料)に示す。

表4: 繰り返し再現性およびウェル間差の結果 (LC480)

コピー数	測定回	Cp 平均値	Cp SD	RSD (%)	ΔCp
500	1回	26.74	0.09	0.32	0.40
	2回	27.43	0.13	0.46	0.51
	3回	27.66	0.11	0.40	0.55

表5: 繰り返し再現性およびウェル間差の結果 (LC96)

コピー数	測定回	Cq 平均値	Cq SD	RSD (%)	ΔCq
500	1回	27.86	0.09	0.33	0.46
	2回	28.68	0.13	0.46	0.71
	3回	29.03	0.12	0.43	0.68

2. コメPLD 遺伝子合成DNA断片を用いたコメ陽性対照遺伝子検出の方法

実験条件

通知試験法に準じた容量にて、反応溶液ミックスはn=10又はn=96に必要な体積の10%増しにて調製し、25 µL容量にて反応を行った。

- Primer/Probe… コメ内在性DNA PLDオリゴヌクレオチド 2 (Cat.No. R11-1M) : ファスマック社
 コメ内在性DNA PLDプローブ 2 (Cat.No. R11-2P) : ファスマック社
 PLD3959F : 5' -GCT TAG GGA ACA GGG AAG TAA AGTT-3'
 PLD4038R : 5' -CTT AGC ATA GTC TGT GCC ATC CA-3'
 PLD-P : FAM-TGA GTA TGA ACC TGC AGG TCGC-TAMRA
- サンプル… コメPLD遺伝子合成DNA断片をGeneArt® StringsR™ DNA Fragments (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) にて合成
 合成した配列 : *Oryza sativa* Japonica Group gene for phospholipase D, complete cds (GenBank accession no.AB001919)
- 試薬…TaqMan® Universal PCR Master Mix (Cat.No. 4304437) : サーモフィッシャーサイエンティフィック社
- 反応組成…通知試験法に準じた。
- 反応条件…通知試験法に準じた。

95°C 10分
 95°C 20秒
 60°C 1分 } 50 サイクル

結果の詳細・考察

(1) 検出限界

感度の評価として、コメPLD 遺伝子合成DNA断片溶液を2～10コピー / 5 µL濃度に調製し、LC480にてそれぞれの濃度を10 well併行で測定した。10well全てでサイクル数(Cp値)が得られた濃度を検出限界濃度とした。その結果、検出限界(感度)は、4コピーと判断された(表4)。

表 6 : 現行機種 LC480 による検出限界試験の結果

コピー数	Cp値		平均値	SD	RSD (%)	ΔCp
2	Negative	38.61				
		37.96				
		37.26				
		37.13				
		37.83				
4		37.36	36.88	0.63	1.70	2.20
		36.08				
		36.69				
		36.19				
		36.70				
5		35.54	36.16	0.40	1.10	1.25
		36.79				
		36.20				
		36.25				
		36.63				
7		35.91	35.66	0.36	1.02	1.25
		36.29				
		35.47				
		35.04				
		35.43				
10		35.30	35.09	0.35	0.99	1.02
		34.96				
		34.54				
		35.17				
		35.46				

(2) 増幅効率

増幅効率の評価として、コメPLD 遺伝子合成DNA断片溶液を5～500,000 コピー / 5 μL 濃度に調製し、LC480およびLC96にて10 well 併行で測定した。得られた検量線よりそれぞれの装置の増幅効率を算出した (表7, 8)。その結果、各装置の増幅効率はLC480：1.968、LC96：1.97となり、同等の良好な増幅効率となった。

表7：増幅効率試験の結果 (LC480)

コピー数	Cp 平均値	Cp STD	conc 平均値 (コピー)	Conc SD	RSD (%)	ΔCp	増幅効率
5	36.85	0.53	4.24	1.31	30.94	1.73	1.968
50	33.17	0.18	48.95	5.90	12.06	0.62	
500	29.77	0.05	487.70	15.19	3.11	0.13	
5,000	26.30	0.02	5,098.00	73.15	1.43	0.05	
50,000	22.87	0.01	52,280.00	379.47	0.73	0.04	
500,000	19.58	0.01	483,700.00	2,406.01	0.50	0.02	

表8：増幅効率試験の結果 (LC96)

コピー数	Cq 平均値	Cq STD	conc 平均値 (コピー)	Conc SD	RSD (%)	ΔCq	増幅効率
5	34.80	0.52	5.32	1.97	37.01	1.85	1.97
50	31.44	0.16	49.82	5.43	10.89	0.58	
500	28.04	0.05	496.60	17.27	3.48	0.16	
5,000	24.65	0.01	4,972.00	42.27	0.85	0.03	
50,000	21.19	0.02	52,410.00	792.00	1.51	0.08	
500,000	17.91	0.02	485,500.00	7217.00	1.49	0.07	

(3) 繰り返し再現性およびウェル間差

繰り返し再現性およびウェル間差の評価として、検出限界の約100倍 (500 コピー) 濃度のn=96 well/ プレートの反応プレートを準備し、LC480およびLC96それぞれ1日1回とし、計3回繰り返し実施した。それぞれの繰り返し再現性 (RSD) およびサイクル数の値の差 (ΔCp, ΔCq) を検討した。その結果、LC480では3回のCp平均値は29.67、RSDは0.13～0.18%、Cp値のウェル間差 (ΔCp) については0.17～0.23と1未満であった (表9)。LC96では3回のCq平均値は27.91～27.95、RSDは0.19～0.22%、Cq値のウェル間差 (ΔCq) については0.25～0.50と1未満であった (表10)。全てのサイクル数データは【別添】技術資料 Technical Data Sheet (補足資料) に示す。

表9：繰り返し再現性およびウェル間差の結果 (LC480)

コピー数	測定回	Cp 平均値	Cp SD	RSD (%)	ΔCp
500	1回目	29.67	0.04	0.13	0.17
	2回目	29.67	0.04	0.14	0.20
	3回目	29.67	0.05	0.18	0.23

表10：繰り返し再現性およびウェル間差の結果 (LC96)

コピー数	測定回	Cq 平均値	Cq SD	RSD (%)	ΔCq
500	1回目	27.91	0.05	0.19	0.25
	2回目	27.95	0.06	0.22	0.50
	3回目	27.92	0.06	0.21	0.26

まとめ

1. ロシユより供給されている機器精度管理の為の、コントロールキットを用いた方法

(1) 検出限界：5 コピー / 反応 well

(2) 増幅効率

LC480 : 1.926

LC96 : 2.01

同等の良好な増幅効率となった。

(3) 繰り返し再現性およびウェル間差

• 3回のCpおよびCq平均値

LC480 (Cp平均値) : 26.74 ~ 27.66

LC96 (Cq平均値) : 27.86 ~ 29.03

• RSD (繰り返し再現性)

LC480 : 0.32 ~ 0.46%

LC96 : 0.33 ~ 0.46%

• CpおよびCq値のウェル間差

LC480 (Δ Cp) : 0.40~0.55

LC96 (Δ Cq) : 0.46~0.71

2. コメPLD遺伝子合成DNA断片を用いたコメ陽性対照遺伝子検出の方法

(1) 検出限界：4 コピー / 反応 well

(2) 増幅効率

LC480 : 1.968

LC96 : 1.97

同等の良好な増幅効率となった。

(3) 繰り返し再現性およびウェル間差

• 3回のCpおよびCq平均値

LC480 (Cp平均値) : 29.67

LC96 (Cq平均値) : 27.91 ~ 27.95

• RSD (繰り返し再現性)

LC480 : 0.13 ~ 0.18%

LC96 : 0.19 ~ 0.22%

• CpおよびCq値のウェル間差

LC480 (Δ Cp) : 0.17~0.23

LC96 (Δ Cq) : 0.25~0.50

全てのサイクル数データは【別添】技術資料Technical Data Sheet(補足資料)に示す。

以上の結果から、LightCycler® 480 System IIおよびLightCycler® 96 Systemは、「遺伝子組換え食品検査方法」に用いられるリアルタイムPCR装置として、「安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法」収載機種と定義されうる所であるが、「(別添) 安全性未審査の組換えDNA 技術応用食品の検査方法」「Ⅲ. 検査方法の同等性確認方法」に掲載されている方法に則ってLightCycler® 480 System IIを現行機と仮定し、LightCycler® 96 Systemの同等性試験を実施したところ、「2. リアルタイムPCR装置について」に定められる感度、繰り返し再現性、ウェル間差及び増幅効率において、同等であると判断された。