

大豆加工食品中の遺伝子組換え DNA 検査における PCR 装置の同等性確認試験

吉田真平, 中野陽子, 原 有紀, 内山恵美, 吉村英基

Equivalence Study on PCR for Genetically Modified DNA testing
in Processed Soybean foods

Shinpei YOSHIDA, Yohko NAKANO, Yuki HARA,

Emi UCHIYAMA and Hideki YOSHIMURA

わが国における遺伝子組換え食品の表示については、大豆等の農産物およびこれらの加工食品が対象となっている。遺伝子組換え食品の表示が適正であるかについては、「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法 (以下、「公定法」)」にて科学的に検証する方法が示されており、リアルタイム PCR による DNA 検査法が基本となっている。大豆加工食品中の DNA 検査に用いられる PCR 装置として、公定法には代表的なものが示されているが、これら以外の装置についても、従来装置との同等性が確認できれば、検査での使用が認められている。本研究では、PCR 装置 Quant Studio®5 と、公定法で既使用が認められている ABI PRISM®7900 との同等性確認試験を行った。この結果、QuantStudio®5 は ABI PRISM®7900 との同等性が確認され、大豆加工食品の DNA 検査に適用可能であると考えられた。

キーワード：大豆, 遺伝子組換え食品, リアルタイム PCR, 同等性確認試験, RR2

はじめに

わが国の遺伝子組換え食品の表示は、2001 年 4 月より食品衛生法¹⁾および日本農林規格等に関する法律 (JAS 法)²⁾に基づき義務化されており、現在は食品表示法³⁾に基づく食品表示基準⁴⁾で規定されている。2024 年 11 月現在、表示の対象となっているのは、大豆、とうもろこし、ばれいしょ、なたね、綿実、アルファルファ、てん菜、パイヤ、からしなの 9 農産物およびこれらを主な原材料とする 33 の加工食品群であり、加工食品においては約半数の 15 加工食品群が大豆を原材料としたものである⁴⁾。主な原材料とは、全原材料に占める重量割合が上位 3 位以内で、かつ重量割合が 5%以上である原材料のことであり⁴⁾、加

工食品では遺伝子組換え農産物が主な原材料である場合のみ表示義務が発生する。遺伝子組換え食品である場合は、「遺伝子組換え農産物である」旨、または「遺伝子組換え不分別である」旨の表示が義務付けられており、食品表示の内容が全て正しいと仮定すれば、消費者や事業者も表示を確認することで遺伝子組換え食品を識別できるようになっている。これら遺伝子組換え食品に関する表示の信頼性を確認するために、「安全性審査済みの遺伝子組換え食品の検査方法 (以下、「公定法」)」⁵⁾に基づき行政検査が実施されている。公定法には大豆加工食品の検査法に用いる PCR 装置として、代表的なものが複数示されているが、以下に記載の通り、検査方法の同等性が確認できれば、別の

PCR 装置の使用も認められている⁵⁾。

検査方法の同等性の確認は、感度、繰り返し再現性、ウェル間差および増幅効率（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 回全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、全て検出され、96 ウェル間で差がないことを確認する（Cq 値に最大でも 1 以上の差がない。）⁵⁾。

本試験では、PCR 装置 Quant Studio[®]5 について、公定法⁵⁾で大豆加工食品の DNA 検査での使用が認められている ABI PRISM[®]7900 との同等性を確認したので、報告する。

実験方法

1. リアルタイム PCR 装置

ABI PRISM[®]7900 (ThermoFisher SCIENTIFIC 社) および Quant Studio[®]5 (appliedbiosystems 社) を用いた。

2. 試薬

2.1 プライマー対および標識プローブ

GM サイズ (RR2) 系統別 DNARR2 オリゴヌクオチドセット (Nippon Gene 社) を用いた。

2.2 標準プラスミド

GM サイズ (RR2) プラスミドセット (Nippon Gene 社) を用いた。

2.3 マスターミックス

TaqMan Universal PCR Master Mix (appliedbiosystems 社) を用いた。

3. PCR 用反応液の組成および増幅条件

PCR 用反応液の組成および増幅条件は、公定法⁵⁾に記載の大豆加工食品の検査法に従った。PCR 用反応液は、マスターミックス 12.5 μ L, 対象プライマー対溶液（各プライマー, 25 μ M) 0.5 μ L, 対象プローブ溶液 (10 μ M) 0.5 μ L, 水 9 μ L, 20 ng/ μ L DNA 試料液 2.5 μ L (50 ng) または滅菌水（ブランク試料液 : NTC) 2.5 μ L の組成で調製した。PCR は 50 $^{\circ}$ C 2 分間の条件で保持したあと、95 $^{\circ}$ C 10 分間加温しホットスタート法で反応を開始する。その後、95 $^{\circ}$ C 30 秒間、59 $^{\circ}$ C 60 秒間を 1 サイクルとして 45 サ

イクルで増幅させた。結果の解析は、リアルタイム PCR 装置に付属のソフトウェアで行った。

4. 同等性確認試験

4.1 検出限界試験

標準プラスミドを希釈して、1~40 copy/well (1, 2, 5, 10, 20, 40 copy/well) になるように反応液と調製し、ABI PRISM[®]7900 および Quant Studio[®]5 を使用し、各濃度 10 ウェル併行で測定した。その際、10 ウェル併行全てで Ct 値が得られた濃度を、ABI PRISM[®]7900 および Quant Studio[®]5 それぞれの検出限界濃度とし、各装置の感度を比較した。

4.2 増幅効率試験

標準プラスミドの希釈系列 20 ~ 250,000copy/well (20, 125, 1,500, 20,000, 250,000copy/well) を反応液と調製し、各濃度 10 ウェル併行で ABI PRISM[®]7900 および Quant Studio[®]5 にて測定した。その際、得られた検量線の傾きから、増幅効率を算出し、各装置の増幅効率を比較した。

4.3 繰り返し再現性およびウェル間差試験

繰り返し再現性およびウェル間差の評価として、現行機種である ABI PRISM[®]7900 の検出限界濃度 (5 copy/well) の 100 倍濃度 (500copy/well) を 84 ウェル、検量線用に 2,000, 20,000, 200,000copy/well をそれぞれ 3 ウェル、コンタミの有無を確認するために NTC を 3 ウェル調製し、ABI PRISM[®]7900 および Quant Studio[®]5 にて 1 日 1 回を計 3 日間繰り返し実施した。また、それぞれの濃度における繰り返し再現性 (RSD) およびウェル間差を示すサイクル数の差 ($\Delta Cq = \Delta Ct = Ct_{\text{最大値}} - Ct_{\text{最小値}}$) を算出した。ここで、84 ウェル分の希釈溶液の濃度を、現行機種の検出限界濃度の 100 倍濃度とした理由は、日本ジェネティクスの Technical Note⁶⁾ および野村ら⁷⁾ の同種試験でも 100 倍濃度を基準に測定していたので、本試験でも 100 倍濃度を採用し、残りの 12 ウェルと合わせて計 96 ウェルで各装置の繰り返し再現性およびウェル間差を比較した。

結果および考察

1. 検出限界試験

ABI PRISM[®]7900 の検出限界試験の結果を表 1 に示した。標準プラスミドの希釈反応液

(1, 2, 5, 10, 20, 40 copy/well) にて, 10 ウェル併行全てで Ct 値が得られたのは, 5, 10, 20, 40 copy/well の濃度であった. この結果から, 現行機種 ABI PRISM®7900 の検出限界濃度は, 5 copy/well と考えられたため, 「3. 繰り返し再現性およびウェル間差試験」の繰り返し再現性およびウェル間差試験における, コンタミ確認および検量線作成用の 12 ウェルを除く 84 ウェルには, 100 倍濃度の 500copy/well を使用し試験することとなった.

Quant Studio®5 の検出限界試験の結果を表 2 に示した. 標準プラスミドの希釈反応液 (1, 2, 5, 10, 20, 40 copy/well) にて, 10 ウェル併行全てで Ct 値が得られたのは, 10, 20, 40 copy/well の濃度であった. この結果から, 新

規機種 Quant Studio®5 の検出限界濃度は, 10 copy/well と考えられた.

ABI PRISM®7900 および Quant Studio®5 の検出限界試験の結果を比較すると, ABI PRISM®7900 の方が, 若干感度が高い結果となったが, Quant Studio®5 の 5 copy/well の結果では, あと 1 ウェルのみ Ct 値が得られていたら ABI PRISM®7900 と同じ検出限界であったこと, および 2 機種 of 検出限界濃度も 2 倍程度の差であることから, Quant Studio®5 の感度は ABI PRISM®7900 とほぼ同等であると考えられた.

表 1 検出限界試験の結果 (ABI PRISM® 7900)

コピー数 (copy/well)	Ct	Ct Mean ± SD	ΔCt	コピー数 (copy/well)	Ct	Ct Mean ± SD	ΔCt
1	39.7	39.2 ± 0.6	1.2	10	36.2	36.8 ± 0.8	2.2
1	n.d			10	36.2		
1	n.d			10	38.4		
1	n.d			10	36.9		
1	n.d			10	36.7		
1	38.6			10	36.2		
1	n.d			10	37.3		
1	n.d			10	36.6		
1	n.d			10	38.1		
1	n.d			10	37.2		
2	39.2	39.4 ± 1.0	2.9	20	35.2	35.4 ± 0.7	2.4
2	n.d			20	35.0		
2	41.6			20	35.7		
2	38.7			20	34.9		
2	39.7			20	37.4		
2	n.d			20	35.3		
2	38.8			20	35.4		
2	38.9			20	35.4		
2	39.2			20	36.1		
2	n.d			20	35.7		
5	40.5	38.2 ± 1.1	4.0	40	34.8	34.7 ± 0.4	1.3
5	38.9			40	34.5		
5	38.7			40	34.4		
5	37.2			40	34.7		
5	37.8			40	35.5		
5	36.5			40	34.7		
5	38.7			40	34.5		
5	37.9			40	35.0		
5	37.8			40	35.7		
5	37.8			40	34.6		

表 2 検出限界試験の結果 (Quant Studio®5)

コピー数 (copy/well)	Ct	Ct Mean±SD	ΔCt	コピー数 (copy/well)	Ct	Ct Mean±SD	ΔCt
1	38.4	38.1 ± 0.9	2.2	10	34.9	34.9 ± 0.6	1.8
1	37.1			10	34.7		
1	n.d			10	35.3		
1	n.d			10	36.3		
1	38.4			10	35.1		
1	n.d			10	36.5		
1	n.d			10	35.1		
1	37.3			10	35.2		
1	39.3			10	35.4		
1	n.d			10	35.5		
2	37.9			37.9 ± 1.0	3.2		
2	n.d	20	34.7				
2	37.8	20	34.8				
2	n.d	20	34.6				
2	36.5	20	34.8				
2	35.8	20	33.7				
2	37.2	20	33.8				
2	39.1	20	34.8				
2	n.d	20	35.3				
2	37.1	20	34.2				
5	36.6	36.6 ± 1.4	4.3			40	33.3
5	35.8			40	32.8		
5	n.d			40	33.9		
5	37.8			40	33.6		
5	40.0			40	33.5		
5	36.2			40	34.1		
5	38.5			40	33.0		
5	36.6			40	34.3		
5	35.7			40	33.2		
5	36.4			40	33.2		

2. 増幅効率試験

ABI PRISM® 7900 による増幅効率試験の結果を表 3 に示した。標準プラスミドの希釈系列 (20, 125, 1,500, 20,000, 250,000copy/well) から得られた増幅効率は 93.0% であり、適正値の 90%~110% の範囲内であることから、ABI PRISM® 7900 にて良好な増幅効率の結果を示すことが考えられた。

Quant Studio®5 による増幅効率試験の結果を表 4 に示した。標準プラスミドの希釈系

列 (20, 125, 1,500, 20,000, 250,000copy/well) から得られた増幅効率は 94.9% であり、適正値の範囲内であることから、Quant Studio®5 でも良好な増幅効率の結果を示すことが考えられた。

ABI PRISM®7900 および Quant Studio®5 の増幅効率試験の結果を比較すると、増幅効率はそれぞれ 93.0% および 94.9% であり、Quant Studio®5 の増幅効率は、ABI PRISM®7900 と同等であると考えられた。

表3 増幅効率試験の結果 (ABI PRISM® 7900)

コピー数 (copy/well)	Ct Mean±SD	ΔCt	R ²	増幅効率 (%)
20	36.7 ± 0.4	1.2	0.989	93.0
125	34.0 ± 0.2	0.7		
1,500	30.9 ± 1.0	2.5		
20,000	26.2 ± 0.0	0.1		
250,000	22.4 ± 0.1	0.2		

表4 増幅効率試験の結果 (Quant Studio®5)

コピー数 (copy/well)	Ct Mean±SD	ΔCt	R ²	増幅効率 (%)
20	34.9 ± 0.2	0.7	0.999	94.9
125	31.7 ± 0.1	0.4		
1,500	28.3 ± 0.1	0.2		
20,000	24.4 ± 0.1	0.2		
250,000	20.4 ± 0.1	0.2		

3. 繰り返し再現性およびウェル間差試験

ABI PRISM® 7900 による繰り返し再現性およびウェル間差試験の結果を表5に示した。計3日間の試験であったが、どの試験日においても、NTCのCtは不検出であり、ウェル間でコンタミがないことが確認できた。また、表に示していないが、検量線の決定係数(R²)の値はどの試験日においても0.99以上で、検量線の直線性に問題なかった。3日間におけるCtの平均値は、500 copy/wellで32.4~32.8、2,000 copy/wellで29.8~30.1、20,000 copy/wellで26.4~26.6、200,000 copy/wellで22.6~23.0であった。繰り返し再現性(RSD)は、500 copy/wellで0.5~0.6%、2,000 copy/wellで0.2~0.3%、20,000 copy/wellで0.1~0.3%、200,000 copy/wellで0.2~0.3%と全ての濃度で1%未満と良好な結果であった。ウェル間差を示すサイクル数の差(ΔCt)は、500 copy/wellで0.8~1.2、2,000 copy/wellで0.1~0.2、20,000 copy/wellで0.1~0.2、200,000 copy/wellで0.1であり、500 copy/wellにて公定法⁵⁾で定義するウェル間差の目標値(ΔCt<1)を満たしていなかった。

Quant Studio® 5による繰り返し再現性およびウェル間差試験の結果を表6に示した。計3日間の試験であったが、どの試験日においても、NTCのCtは不検出であり、

ウェル間でコンタミがないことが確認できた。また、表に示していないが、検量線の決定係数(R²)の値はどの試験日においても0.99以上で、検量線の直線性に問題なかった。3日間におけるCtの平均値は、500 copy/wellで30.7~32.4、2,000 copy/wellで28.5~30.3、20,000 copy/wellで24.9~26.8、200,000 copy/wellで21.4~23.1であった。繰り返し再現性(RSD)は、500 copy/wellで0.3~0.4%、2,000 copy/wellで0.4~0.5%、20,000 copy/wellで0.1~0.8%、200,000 copy/wellで0.1~0.2%と全ての濃度で1%未満と良好な結果であった。ウェル間差を示すサイクル数の差(ΔCt)は、500 copy/wellで0.5~0.7、2,000 copy/wellで0.2~0.3、20,000 copy/wellで0.0~0.4、200,000 copy/wellで0.0~0.1と全ての濃度で1未満の差しかなく、公定法⁵⁾で定義するウェル間差の目標値(ΔCt<1)を満たしていた。

ABI PRISM®7900およびQuant Studio®5の繰り返し再現性およびウェル間差試験の結果を比較すると、繰り返し再現性は同等程度であったが、ウェル間差を示す指標については、Quant Studio® 5のみが公定法⁵⁾の目標値(ΔCt<1)を満たしており、Quant Studio® 5は、ABI PRISM® 7900よりもウェル間差については同等以上の結果が得られた。

表5 繰り返し再現性およびウェル間差試験の結果 (ABI PRISM® 7900)

コピー数 (copy/well)	試験日	Ct Mean±SD	RSD (%)	ΔCt
NTC	Day1	— (コンタミなし)		
	Day2	— (コンタミなし)		
	Day3	— (コンタミなし)		
500	Day1	32.7 ± 0.2	0.5	0.8
	Day2	32.8 ± 0.2	0.6	1.2
	Day3	32.4 ± 0.2	0.5	0.8
2,000	Day1	30.1 ± 0.1	0.2	0.1
	Day2	30.0 ± 0.1	0.3	0.2
	Day3	29.8 ± 0.0	0.2	0.1
20,000	Day1	26.5 ± 0.1	0.3	0.2
	Day2	26.6 ± 0.0	0.1	0.1
	Day3	26.4 ± 0.0	0.2	0.1
200,000	Day1	23.0 ± 0.1	0.3	0.1
	Day2	22.8 ± 0.1	0.2	0.1
	Day3	22.6 ± 0.0	0.2	0.1

表6 繰り返し再現性およびウェル間差試験の結果 (Quant Studio®5)

コピー数 (copy/well)	試験日	Ct Mean±SD	RSD (%)	ΔCt
NTC	Day1	— (コンタミなし)		
	Day2	— (コンタミなし)		
	Day3	— (コンタミなし)		
500	Day1	30.7 ± 0.1	0.4	0.7
	Day2	32.4 ± 0.1	0.3	0.7
	Day3	31.5 ± 0.1	0.3	0.5
2,000	Day1	28.5 ± 0.1	0.4	0.2
	Day2	30.3 ± 0.1	0.4	0.2
	Day3	29.7 ± 0.1	0.5	0.3
20,000	Day1	24.9 ± 0.0	0.1	0.0
	Day2	26.8 ± 0.2	0.8	0.4
	Day3	25.7 ± 0.0	0.2	0.1
200,000	Day1	21.4 ± 0.0	0.1	0.0
	Day2	23.1 ± 0.0	0.2	0.1
	Day3	22.5 ± 0.0	0.1	0.0

まとめ

大豆加工食品中の遺伝子組換え DNA 検査に、リアルタイム PCR 装置 Quant Studio®5 の適用が可能かを検証した。本試験の結果、現行で公定法⁵⁾での使用が認められている ABI PRISM® 7900 との同等性が確認されたので、Quant Studio®5 は大豆加工食品中の遺伝子組換え DNA 検査に適用可能であると考えられた。

文献

1) 食品衛生法第十九条第一項の規定に基づく表示の基準に関する内閣府令 (平成 23 年内閣

府令第 45 号)。

2) 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第七条第一項および生鮮食品品質表示基準第七条第一項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準(平成 12 年 3 月 31 日農林水産省告示第 517 号)。

3) 食品表示法 (平成 25 年法律第 70 号)。

4) 食品表示基準 (平成 27 年内閣府令第 10 号)。

5) 消費者庁：食品表示基準について (平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号消費者庁通知) の別添「安全性審査済みの遺伝子組換え食品

の検査方法」(最終改正 2021 年 9 月 15 日) .

6) 日本ジェネティクス社, 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 (Technical Note 2024<02>ver.1),

<https://n-genetics.com/resource/detail/20777/> (最終アクセス 2025 年 1 月 8 日) .

7) 野村千枝, 角谷直哉 : GM ダイズ検査におけるリアルタイム PCR 装置の同等性試験の結果. Ann. Rep. Osaka. Inst. Pub. Health, 4, 43-53 (2020) .