



Technical Data

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

評価製品

LightCycler® PRO System
(ロシュ・ダイアグノスティックス社, Cat.No. 09541713001)

概要

LightCycler® PRO Systemは、LightCycler® 480 System IIの後継機として発売された。LightCycler® 480 System II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装置の収載機種と定義でき、LightCycler® PRO Systemも同様に定義できると考えられる。本資料では、「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LightCycler® 480 System IIとLightCycler® PRO Systemの同等性試験を行った。

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、既に収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® PRO SystemとLightCycler® 480 System II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装置の収載機種と定義できる。

本試験では、LightCycler® PRO SystemとLightCycler® 480 System II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。

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方法で実施した。現行機種はLightCycler® 480 System II、評価機種はLightCycler® PRO Systemとした。

【現行機種】 LightCycler® 480 System II (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® PRO System (以下LCPRO) (Cat.No. 09541713001) : ロシュ・ダイアグノスティックス社

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及びLCPROにてそれぞれの濃度を10 well 併行で測定した。10 well 全てでサイクル数 (Cq 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LCPRO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LCPRO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(ΔCq)を検討した。

実験条件

- Primer/Probe … Primer/Probe共に日本遺伝子研究所にて合成
 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断片を日本遺伝子研究所にて合成
 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) : サーマ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 10min
 95°C 20sec
 60°C 1 min } 50サイクル

結果

(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、LightCycler® PRO Systemにてそれぞれの濃度を10 well併行で測定した。10 well全てでサイクル数(Cq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。

LightCycler® PRO System

コピー数	Cq値		平均値	SD	RSD (%)	ΔCq
2	Negative	39.51				
	38.78	37.50				
	37.27	38.96				
	37.66	39.08				
	37.66	37.05				
4	36.73	37.03	36.75	0.56	1.62	1.73
	36.88	37.60				
	36.16	36.94				
	35.96	36.21				
	37.69	36.33				
5	36.12	36.42	36.18	0.22	0.64	0.73
	35.96	36.31				
	36.23	35.93				
	36.56	36.10				
	35.83	36.30				
7	35.15	35.52	35.64	0.36	1.07	1.19
	35.00	35.41				
	35.70	36.19				
	35.85	35.98				
	35.56	35.99				
10	35.37	34.90	35.25	0.28	0.84	0.78
	35.11	35.21				
	34.91	35.52				
	35.13	35.67				
	35.68	35.01				

LightCycler® 480 System II

コピー数	Cq値		平均値	SD	RSD (%)	ΔCq
2	Negative	38.61				
	37.96	38.27				
	37.26	38.07				
	37.13	36.51				
	37.83	39.53				
4	37.36	36.97	36.88	0.63	1.70	2.20
	36.08	36.99				
	36.69	36.51				
	36.19	37.03				
	36.70	38.28				
5	35.54	36.52	36.16	0.40	1.10	1.25
	36.70	35.89				
	36.20	36.01				
	36.25	35.78				
	36.63	35.98				
7	35.91	35.99	35.66	0.36	1.02	1.25
	36.29	35.48				
	35.47	35.47				
	35.04	35.60				
	35.43	35.95				
10	35.30	35.56	35.09	0.35	0.99	1.02
	34.96	35.44				
	34.54	34.75				
	35.17	34.98				
	35.46	34.75				

(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/5μL濃度に調製し、LightCycler® PRO Systemにて8 well併行で測定した。得られた検量線より、増幅効率は94.8%となり、良好な増幅効率となった。

LightCycler® PRO System

コピー数	Cq 平均値	Cq STD	Conc 平均値	Conc SD	RSD (%)	ΔCq	増幅効率
5	38.17	0.46	5.90	1.75	31.69	1.55	94.8% *
50	35.07	0.10	44.55	3.04	7.29	0.28	
500	31.47	0.09	488.82	27.61	6.04	0.27	
5000	27.97	0.05	5,064.59	175.8	3.71	0.16	
50000	24.54	0.06	49,719.61	2078.64	4.47	0.16	
500000	21.05	0.02	509,636.22	5834.29	1.23	0.05	

LightCycler® 480 System II

コピー数	Cq 平均値	Cq STD	Conc 平均値	Conc SD	RSD (%)	ΔCq	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	
5000	26.30	0.02	5,098.00	73.15	1.43	0.05	
50000	22.87	0.01	52,280.00	379.47	0.73	0.04	
500000	19.58	0.01	483,700.00	2406.01	0.50	0.02	

* 増幅効率の表記は各SWの表示に則る

(3) 繰り返し再現性及びウェル間差

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、1日1回、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(ΔCq)を検討した。その結果、LightCycler® PRO Systemでは3回のCq平均値は30.83～31.54、RSDは0.52～0.69%、Cq値のウェル間差(ΔCq)については0.71～0.88と1未満であった。

LightCycler® PRO System

コピー数	測定回	Cq 平均値	SD	RSD (%)	ΔCq
500	1回目	30.83	0.17	0.57	0.74
	2回目	31.54	0.16	0.52	0.71
	3回目	31.30	0.22	0.69	0.88

LightCycler® 480 System II

コピー数	測定回	Cq 平均値	SD	RSD (%)	ΔCq
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

まとめ

今回の結果から、「(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® PRO 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。