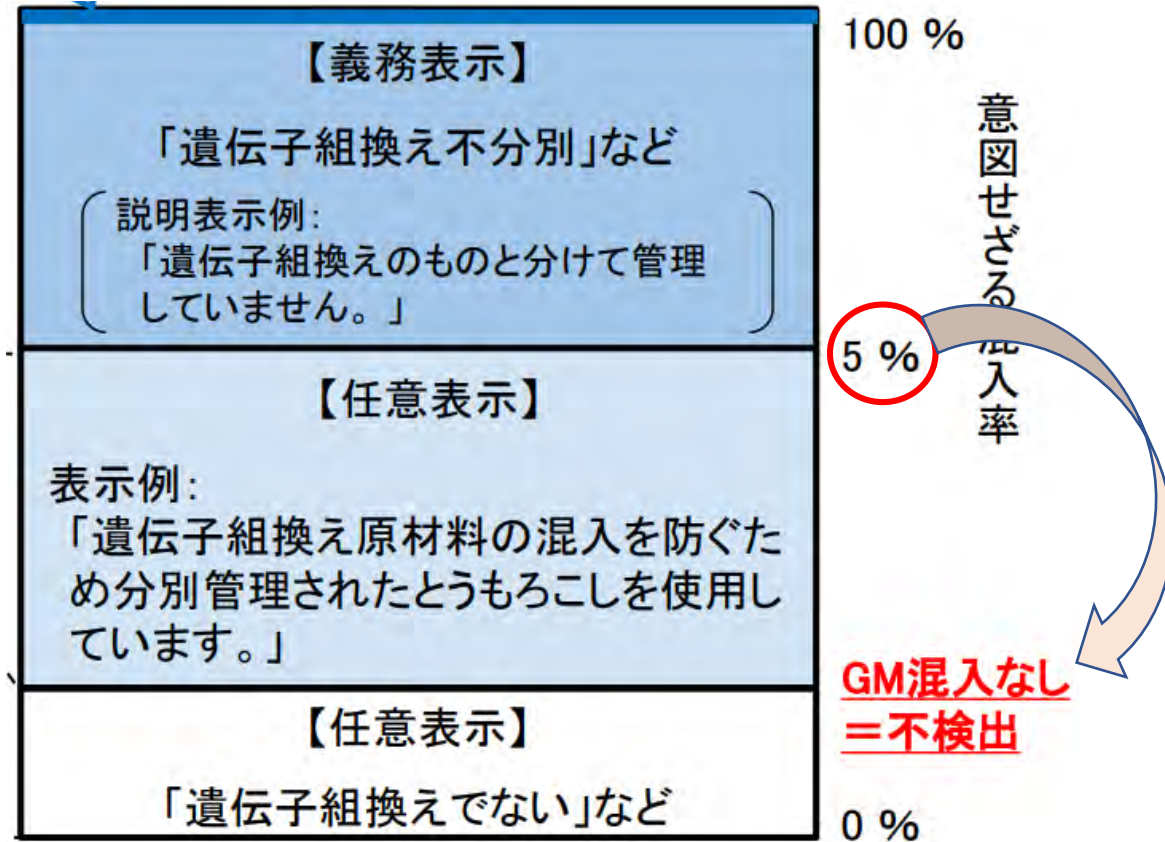


遺伝子組換え表示制度に関する 新たな公定検査法

国立医薬品食品衛生研究所

新しい「遺伝子組換えでない」表示では不検出を想定



現在

5%は精度良く定量できる

しかし

不検出を精度良く判定するには

課題：試験室間や検出限界付近のばらつきをどう改善

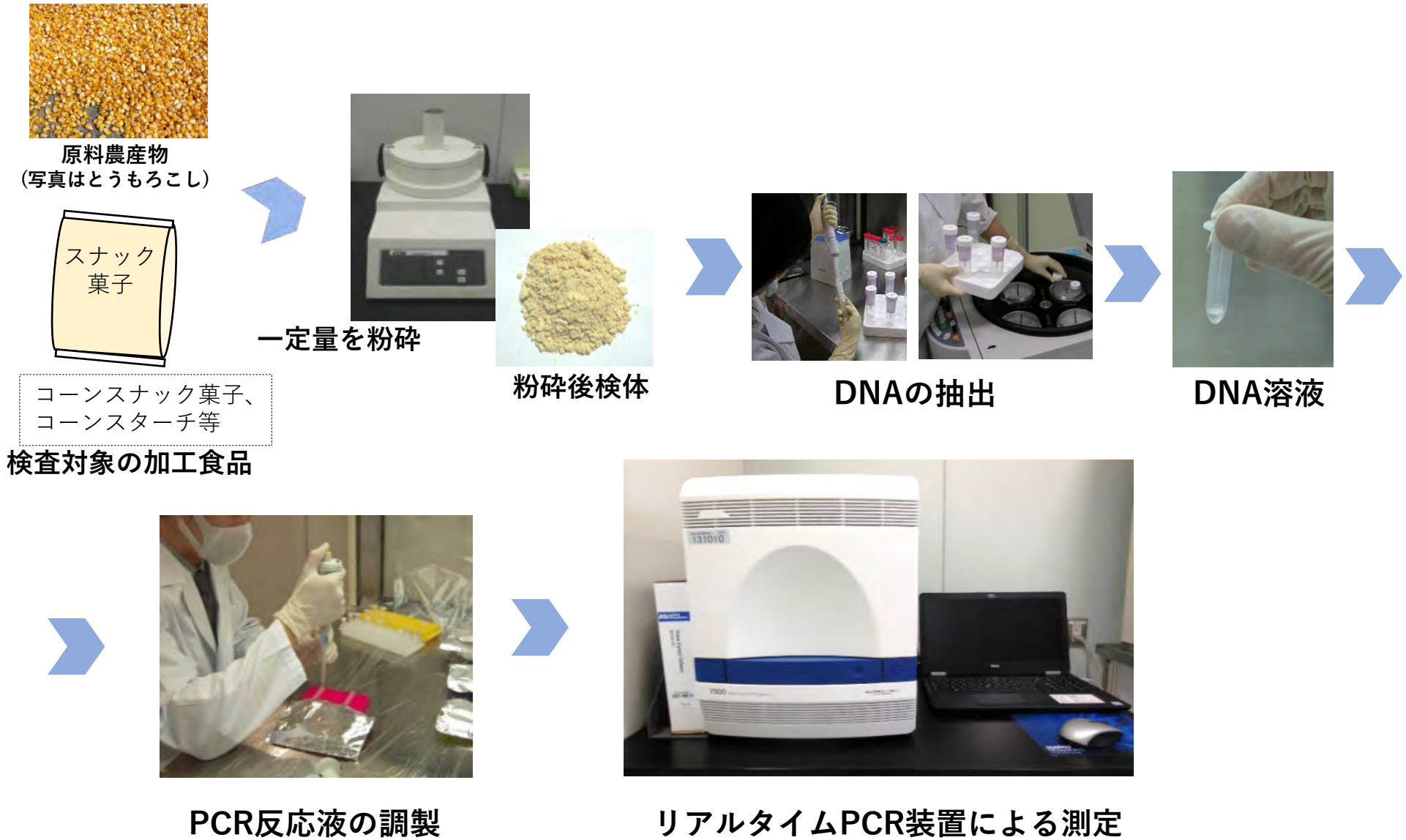
解決法： $\Delta\Delta Cq$ 法

遺伝子組換え表示制度に関する 新たな公定検査法説明流れ

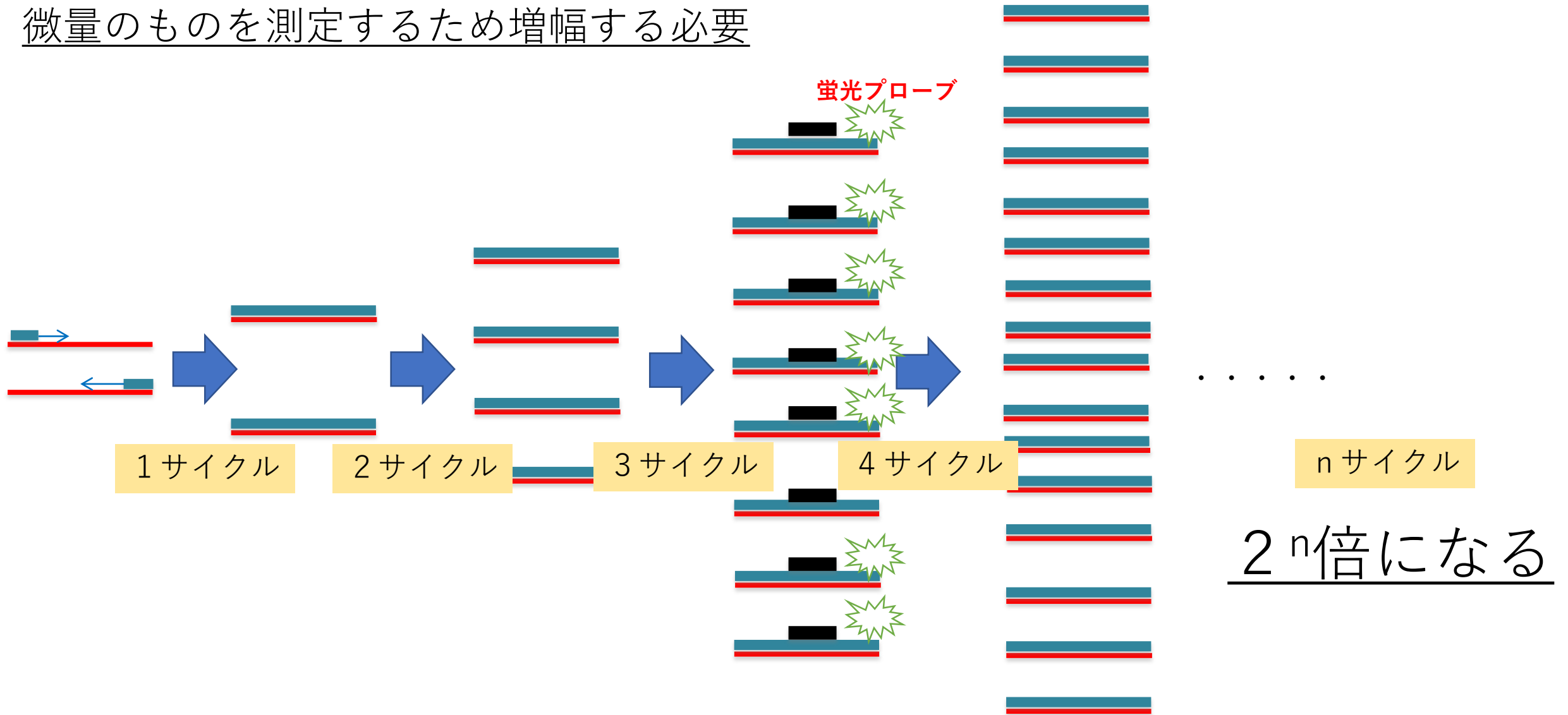
- I 検査法の基礎
- II 試験室間共同試験による検出限界の評価
- III **$\Delta\Delta Cq$** 法の開発
- IV 妥当性評価

遺伝子組換え表示制度に関する 新たな公定検査法説明流れ

- I 検査法の基礎
- II 試験室間共同試験による検出限界の評価
- III $\Delta\Delta Cq$ 法の開発
- IV 妥当性評価

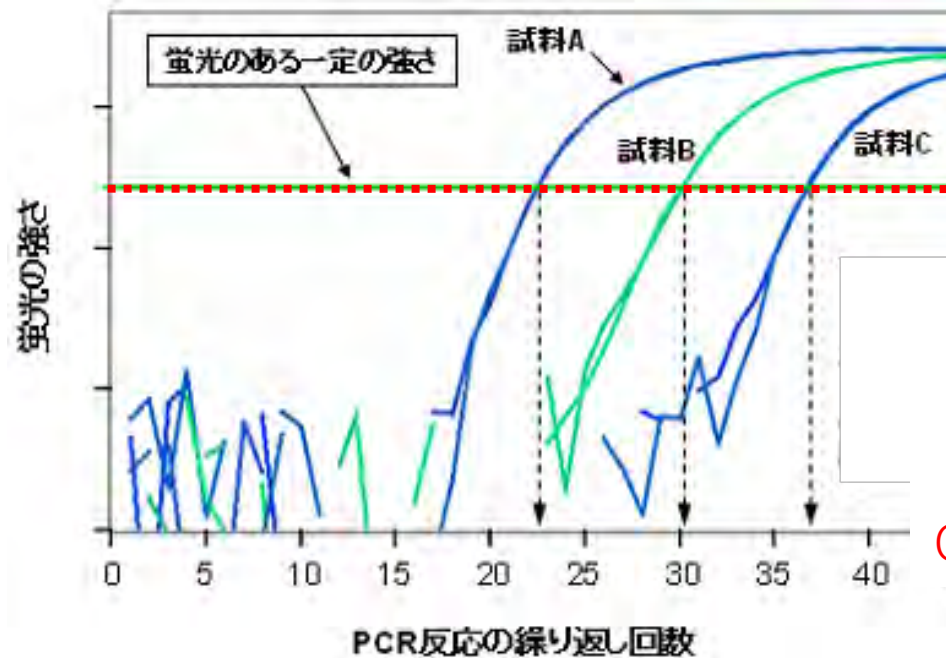


微量のものを測定するため増幅する必要



理論的には一回のサイクルで量が2倍になる

測定結果の画面



このラインを超えたら陽性試料

濃度が高いほど早く増幅曲線が立ち上がる

*試料A > 試料B > 試料C

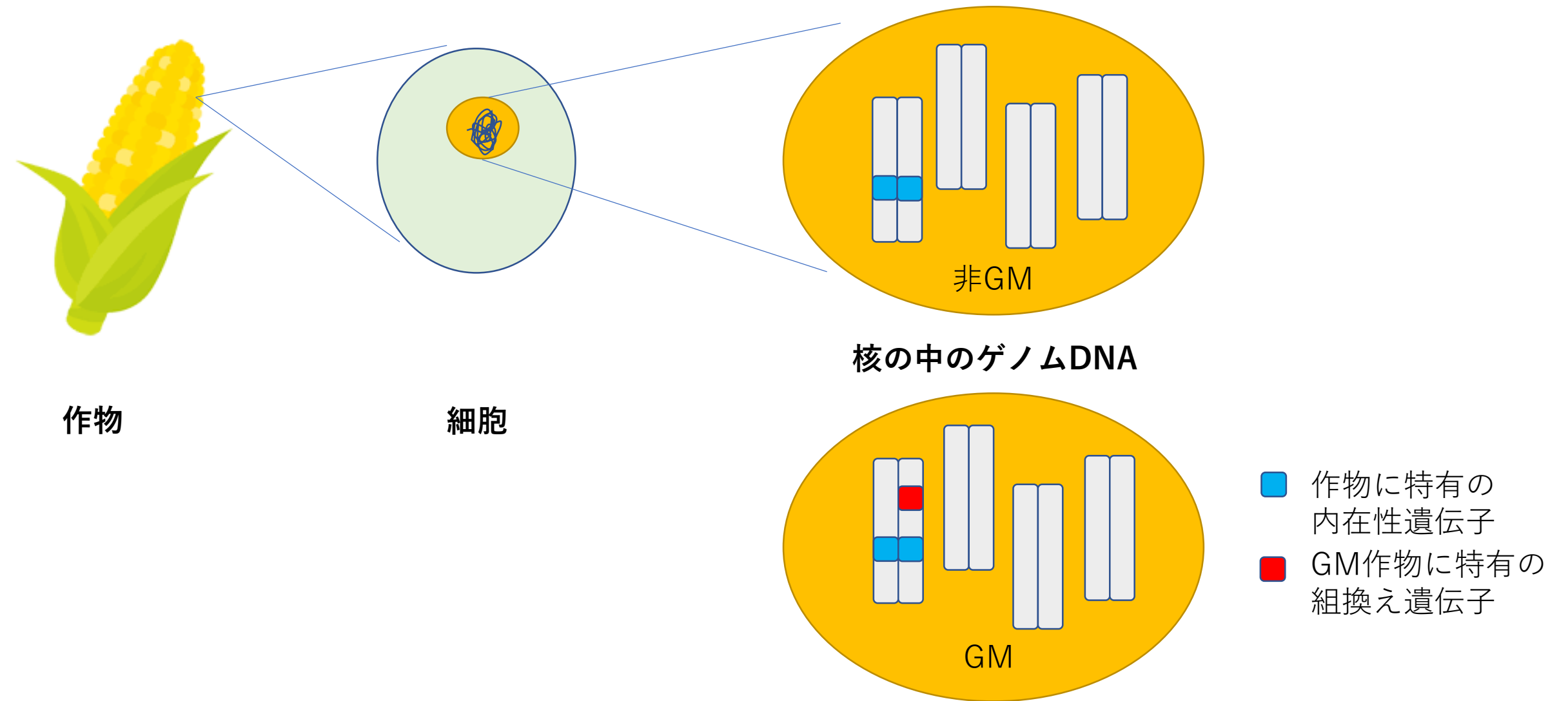
Cq = 増幅が認められるサイクル数

Point

☑ GM混入量が多いほどCq値は低い

遺伝子組換え表示制度に関する 新たな公定検査法説明流れ

- I 検査法の基礎
- II 試験室間共同試験による検出限界の評価
- III $\Delta\Delta Cq$ 法の開発
- IV 妥当性評価



PCRによって「作物に特有の内在性遺伝子」を検出し、かつ「GM作物に特有の組換え遺伝子」を検出する

流通を確認した品種を網羅できる方法を選択

作物に特有の内在性遺伝子

とうもろこし



- ・デンプン合成酵素 II b (SS II b)



大豆

- ・レクチン 1 (Le1)

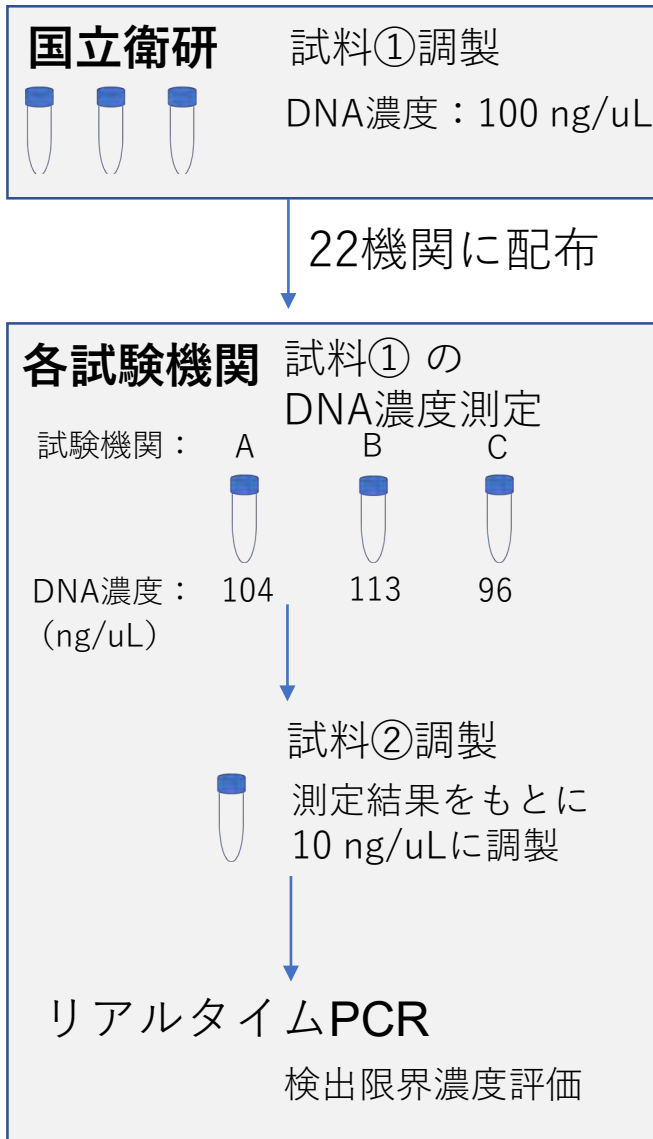
GM作物に特有の組換え遺伝子

GMとうもろこし

- ・カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (P35S)
- ・ノパリン合成酵素のターミネーター (TNOS)

GM大豆

- ・カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (P35S)
- ・GM大豆RRS2系統特異的 (RRS2)



国立衛研において調製した試料①を各試験機関に配布



各試験機関において試料①のDNA濃度を再測定、その結果をもとに試料①を10 ng/uLに調製（試料②）



試料②を用いて各試験機関における検出限界濃度*を評価

* 高い信頼性をもって検出される際の最も低い遺伝子組換え混入率



検出限界濃度が試験機関により異なる結果が得られた

検出限界濃度：0.01～0.1%

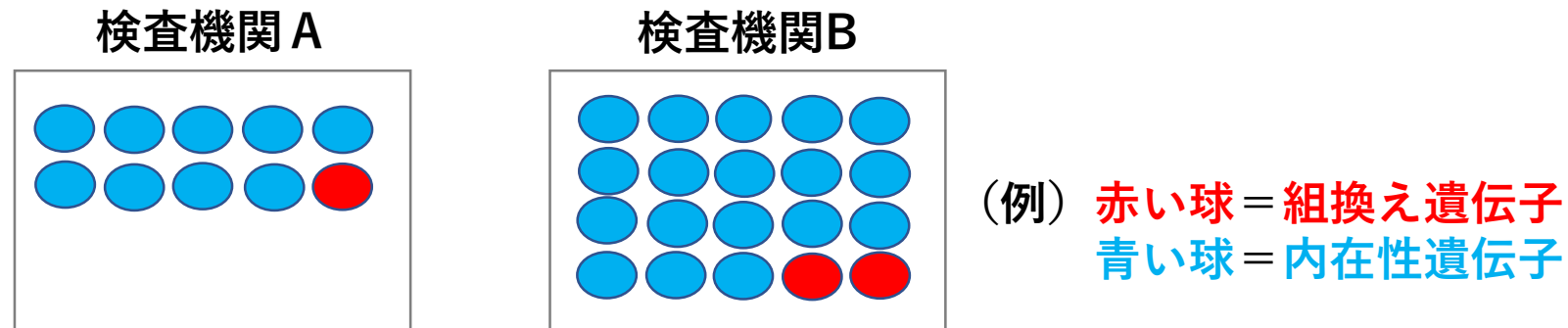
検出限界濃度の違いは、各試験機関において試料①のDNA濃度を測定した際の結果の違いに起因していることが示唆された

遺伝子組換え表示制度に関する 新たな公定検査法説明流れ

- I 検査法の基礎
- II 試験室間共同試験による検出限界の評価
- III **$\Delta\Delta Cq$ 法の開発**
- IV 妥当性評価

検査法の実行性

試験機関で検査に用いるDNA濃度がばらつく => 赤だけ目的に検査をすると結果が大きく異なる



- ・しかし、内在性遺伝子に対する組換え遺伝子の割合は不変

赤い球の**数**で調べる方法
(標的DNA混入量)
検査機関A < 検査機関B

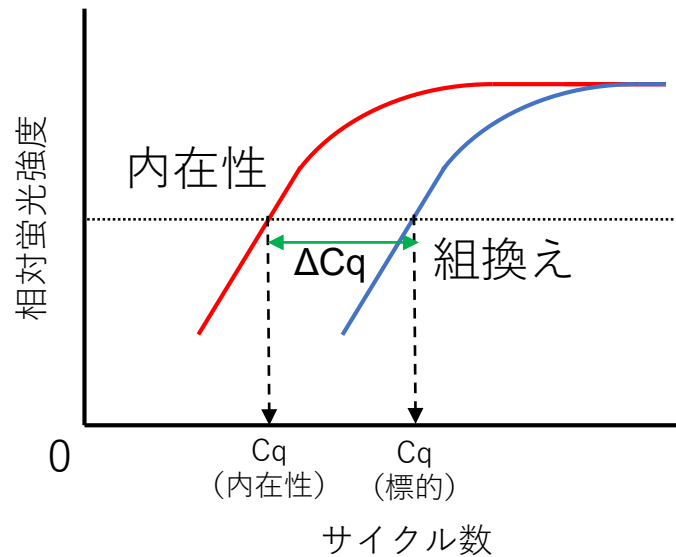
赤い球の**割合**で調べる方法
(標的DNA混入割合)
検査機関A ≒ 検査機関B

実行性を考慮すると「検査機関A ≒ 検査機関B」となる方法が望ましい

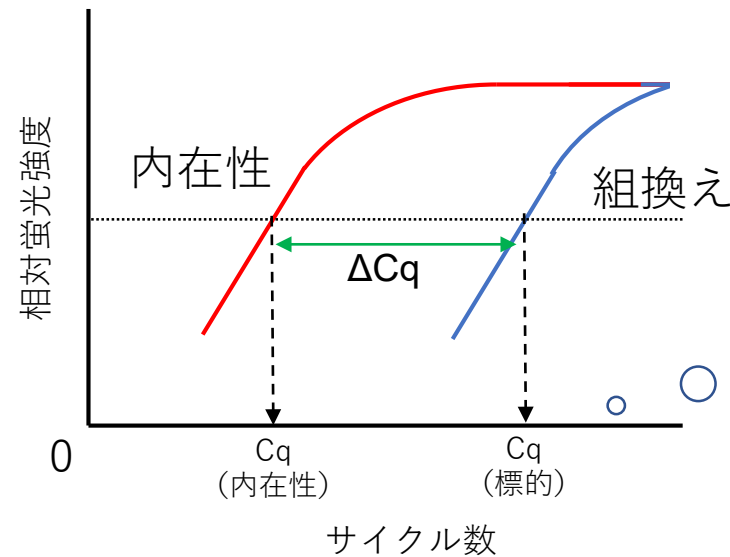
ΔCq とは

Cq 値は増幅が認められるサイクル数であることから、

「 $\Delta Cq = Cq$ (組換え遺伝子) - Cq (内在性遺伝子)」 とすると
割合を求めることができる



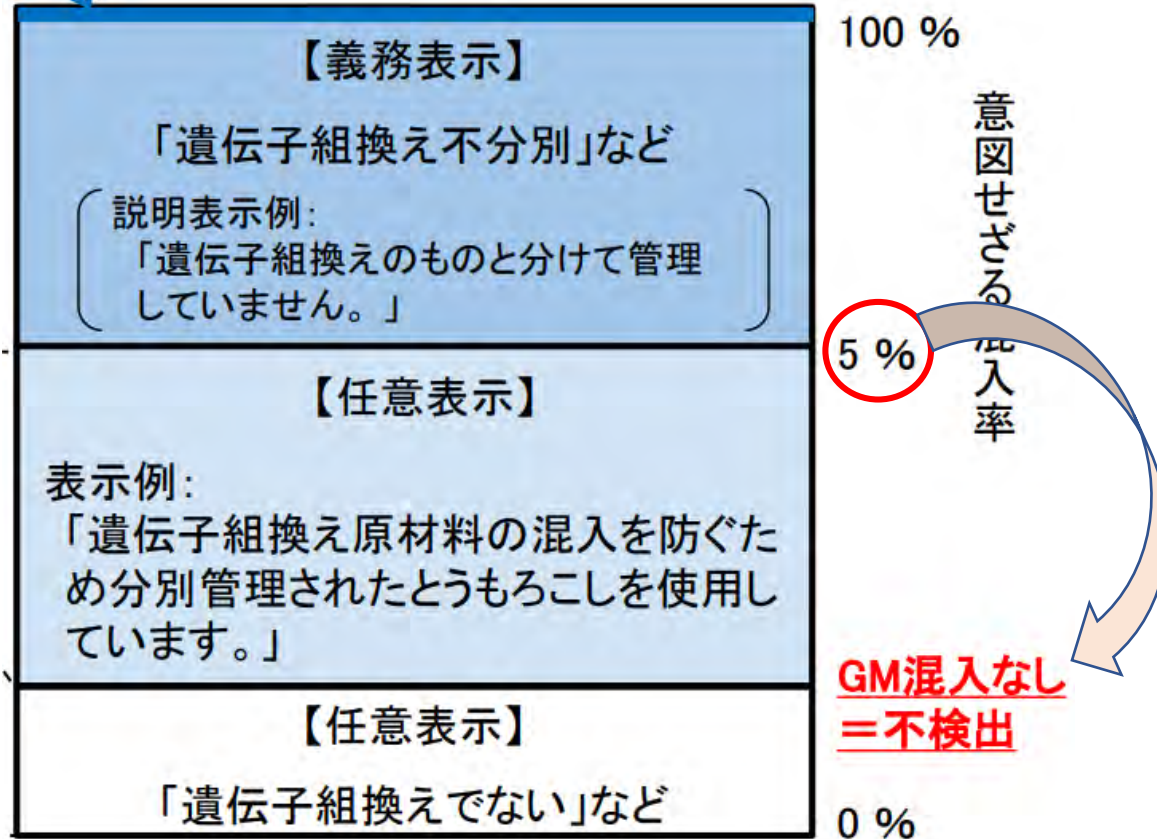
ΔCq : 小
組換え遺伝子の混入割合 : 大



ΔCq : 大
組換え遺伝子の混入割合 : 小

元の量が少ない
と閾値を越える
までに必要なサイ
クル数が多い

新しい「遺伝子組換えでない」の検査法では



不検出を想定するが
各機関で異なる結果となる可能性



そこで、
基準ライン (%) を設定して
それ以上か未満かを判定する
方法を構築する

それが $\Delta\Delta Cq$ 法

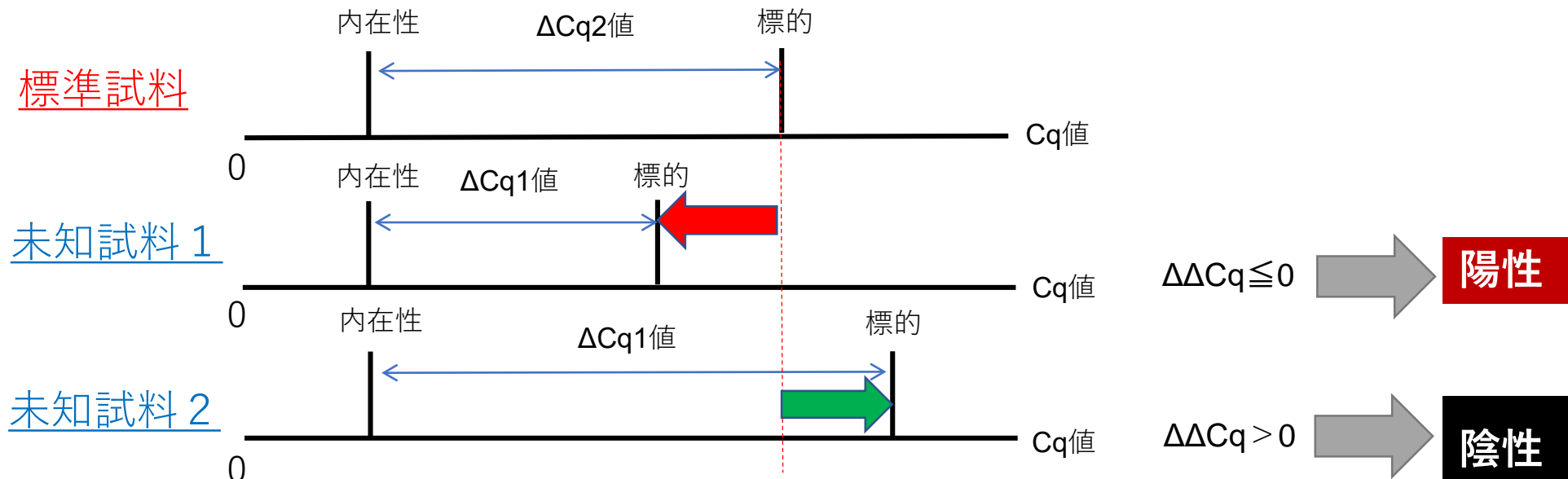
基準ライン ($\alpha\%$)

標準試料濃度と比較してそれ以上か未満かを判断する

⇒ $\Delta\Delta Cq$ 法 (ΔCq を比較する)

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq 1 - \Delta Cq 2$$

$\Delta Cq 2$ 値は一定



Δ Δ Cq法のとうもろこし標準試料

判定の基準となる試料が必要



確実に検出される混入率α%濃度で設定する



2018年度試験室間試験結果より、どの試験室でも確実に検出された
0.1%のMON863系統を基準とする*

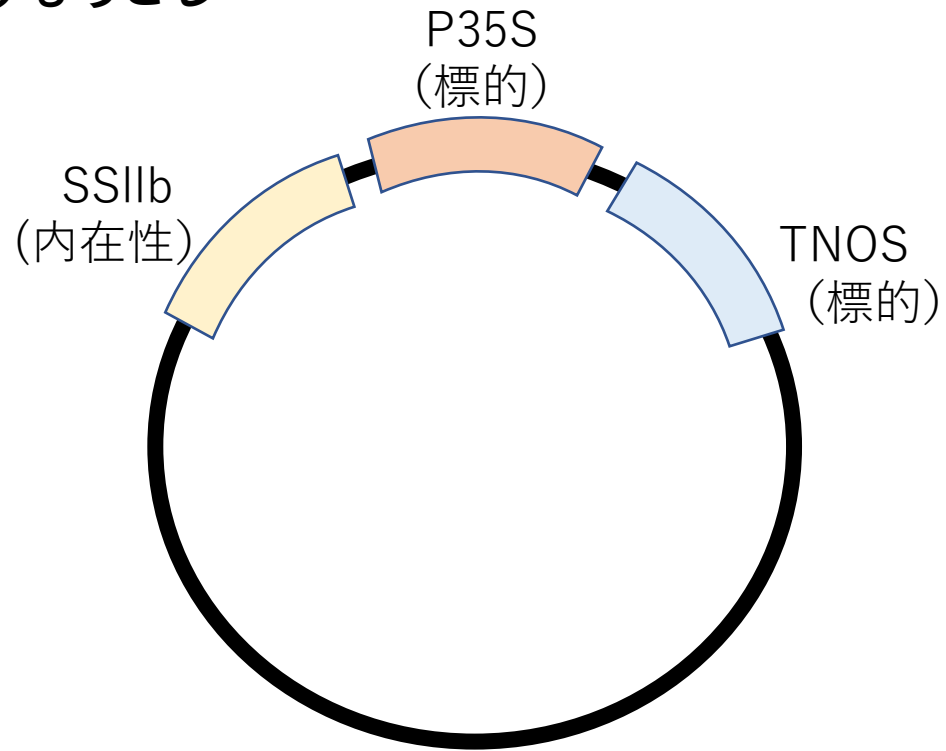
(MON863はゲノム中にP35S及びTNOS配列を1コピーだけ含む)



	認証標準物質 MON863 (0.1%)	プラスミド (コピー数：低)	プラスミド (コピー数：高)
生産場所	現状海外のみ	国内可能	国内可能
品質管理	通常	難	通常
標準試料Cq値誤差	大	大	小

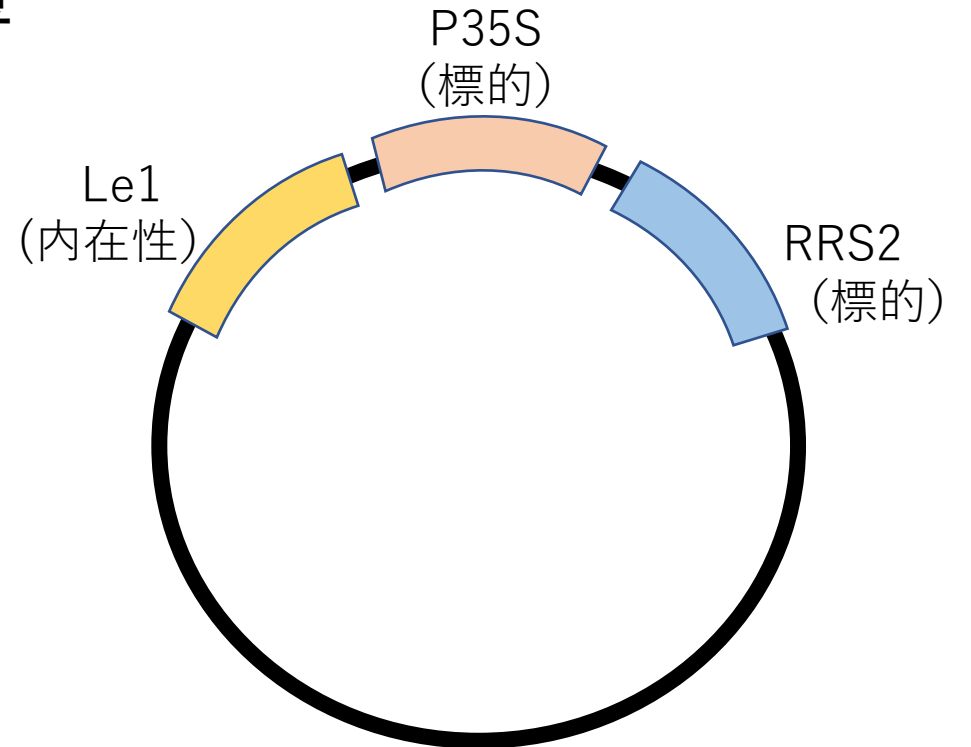
※大豆は、2019年度試験室間試験結果より、0.05%のRRS又はRRS2系統を基準とする
(半数体ゲノム中にP35S又はRRS2配列を1コピーだけ含む)

とうもろこし



GM標的を
「500コピー」
内在性を
「1000000コピー」

大豆



GM標的を
「250コピー」
内在性を
「500000コピー」

認証標準物質

MON863 0.1%



内在性
SS II b

25

標的

P35S or TNOS

35

Cq

ΔCq

↔: 誤差の大きさ

プラスミド
コピー数: 高



20

30

Cq

ΔCq

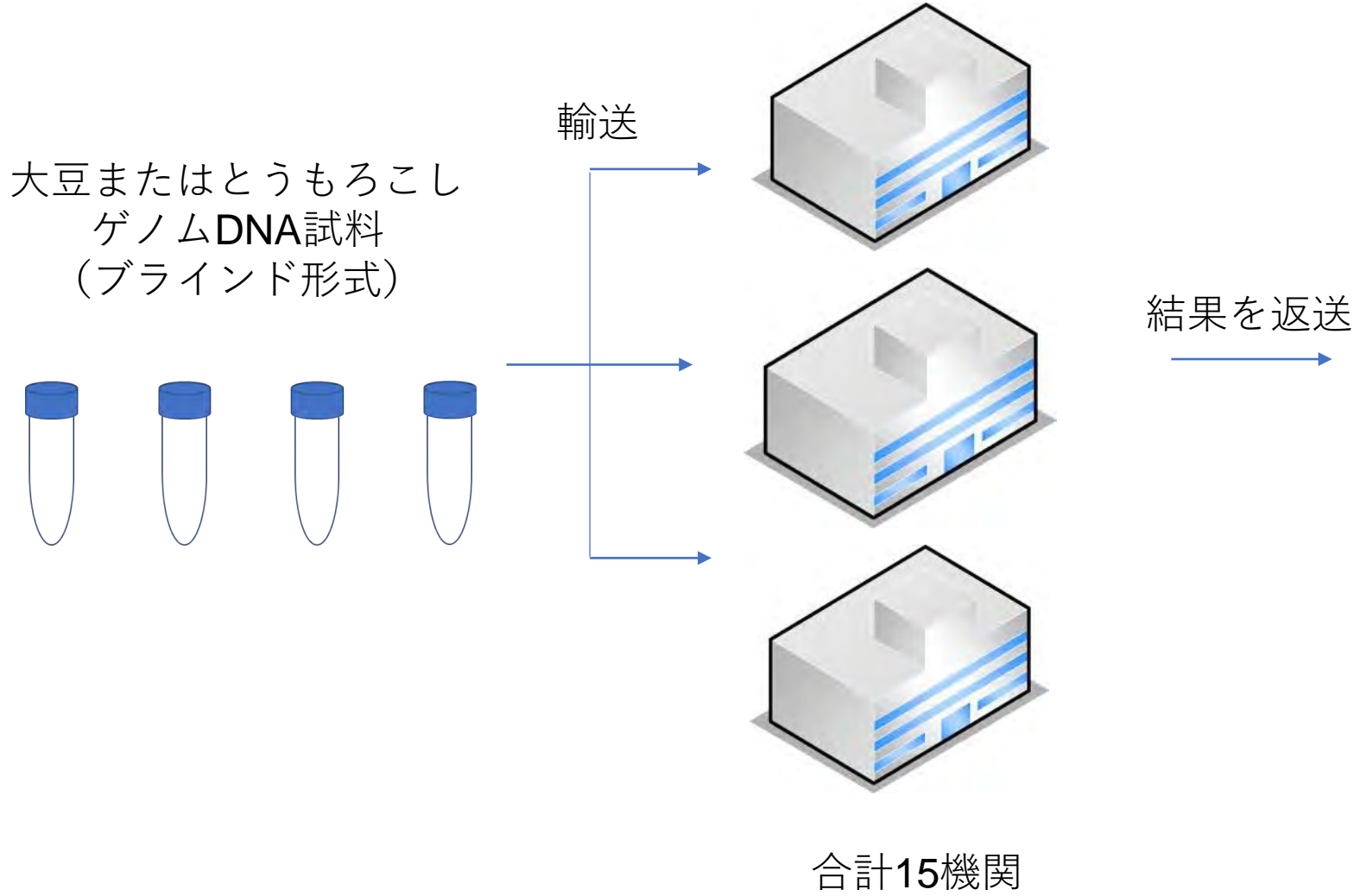
P35S及びTNOSの
Cq値の誤差を小さくする

ΔCq 誤差が小さくなる

遺伝子組換え表示制度に関する 新たな公定検査法説明流れ

- I 検査法の基礎
- II 試験室間共同試験による検出限界の評価
- III $\Delta\Delta Cq$ 法の開発
- IV 妥当性評価

試験室間共同試験方法



国立衛研又は農研機構
で結果を集計

試験室間共同試験結果

6 試料 × 15 機関 = 90 分試料分の判定結果を集計

とうもろこし

ゲノムDNA試料	P35S				TNOS			
	非GM (偽陽性率)	0.05%	0.20%	0.50%	非GM (偽陽性率)	0.05%	0.20%	0.50%
陽性率 (%)	0	1	97	100	0	18	100	100

0.2%が高い信頼性をもって陽性と判定される最低濃度と考えられる

大豆

ゲノムDNA試料	P35S					RRS2				
	非GM (偽陽性率)	0.01%	0.10%	0.20%	0.50%	非GM (偽陽性率)	0.01%	0.10%	0.20%	0.50%
陽性率 (%)	0	0	98	100	100	0	0	100	100	100

0.1%が高い信頼性をもって陽性と判定される最低濃度と考えられる

新たな公定検査法

- **標準プラスミドを用いた $\Delta\Delta Cq$ 法**

判定結果の試験室間差が小さい

- **偽陽性率**

とうもろこし、大豆共に、非遺伝子組換え試料では、全試験室で不検出

- **高い信頼性をもって陽性と判定される最低濃度**

(「遺伝子組換えでない」表示を行う際に許容される遺伝子組換え作物の混入率を示すものではない)

0.2%GMとうもろこし模擬試料において、
全試験室集計データでP35Sで97%、TNOSで100%陽性と判定

0.1%GM大豆模擬試料において、
全試験室集計データでP35Sで98%、RRS2で100%陽性と判定

定性検査法として、実用的かつ妥当な
偽陽性率及び高い信頼性をもって陽性と
判定される最低濃度であることが確認された