

表4 にんじん中の農薬濃度の均一性

クロルピリホス 単位 (ppm)			フェニトロチオン 単位 (ppm)		
試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	0.240	0.133	1	1.43	1.30
2	0.232	0.125	2	1.43	1.26
3	0.231	0.136	3	1.45	1.36
4	0.230	0.132	4	1.40	1.36
5	0.240	0.134	5	1.39	1.34
6	0.229	0.133	6	1.29	1.39
7	0.236	0.135	7	1.28	1.39
8	0.237	0.129	8	1.35	1.28
9	0.239	0.126	9	1.33	1.29
10	0.234	0.118	10	1.31	1.20
平均値	0.235		平均値	0.137	
標準偏差	0.005		標準偏差	0.008	
変動係数	2.0		変動係数	5.9	
F比	1.13		F比	0.93	
有意水準 5%	1.39		有意水準 5%	3.02	

表5 とうもろこし中の農薬濃度の均一性

クロルピリホス 単位 (ppm)			フェニトロチオン 単位 (ppm)		
試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	0.0707	0.0712	1	0.302	0.310
2	0.0707	0.0705	2	0.312	0.296
3	0.0720	0.0713	3	0.311	0.299
4	0.0724	0.0691	4	0.314	0.295
5	0.0683	0.0725	5	0.297	0.298
6	0.0715	0.0732	6	0.311	0.313
7	0.0703	0.0719	7	0.320	0.301
8	0.0706	0.0654	8	0.308	0.326
9	0.0706	0.0698	9	0.308	0.346
10	0.0706	0.0671	10	0.302	0.329
平均値	0.0700		平均値	0.310	
標準偏差	0.002		標準偏差	0.013	
変動係数	2.67		変動係数	4.13	
F比	0.860		F比	0.77	
有意水準 5%	3.02		有意水準 5%	3.02	

表6 液卵中のフルベンダゾール濃度の均一性

試験①			試験②		
単位 (ppm)			単位 (ppm)		
試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	0.343	0.358	1	0.493	0.494
2	0.365	0.367	2	0.484	0.489
3	0.384	0.361	3	0.478	0.476
4	0.377	0.345	4	0.485	0.514
5	0.361	0.336	5	0.507	0.497
6	0.345	0.360	6	0.516	0.503
7	0.360	0.345	7	0.500	0.500
8	0.344	0.342	8	0.478	0.516
9	0.361	0.351	9	0.461	0.496
10	0.360	0.352	10	0.504	0.519
平均値	0.356		平均値	0.496	
標準偏差	0.012		標準偏差	0.015	
変動係数	3.4		変動係数	3.02	
F比	1.00		F比	1.38	
有意水準 5%	3.02		有意水準 5%	3.02	

表7 混合試料中のデオキシニバレノール濃度の均一性試験

試験①			試験②		
単位 (ppm)			単位 (ppm)		
試料番号	測定①	測定②	試料番号	測定①	測定②
1	1.44	1.51	1	1.31	1.38
2	1.66	1.54	2	1.29	1.34
3	1.55	1.47	3	1.30	1.27
4	1.75	1.55	4	1.37	1.35
5	1.50	1.35	5	1.37	1.33
6	1.55	1.42	6	1.35	1.35
7	1.48	1.63	7	1.31	1.36
8	1.65	1.61	8	1.39	1.36
9	1.54	1.60	9	1.34	1.40
10	1.56	1.54	10	1.38	1.32
平均値	1.55		平均値	1.34	
標準偏差	0.091		標準偏差	0.036	
変動係数	5.92%		変動係数	2.71%	
F比	1.53		F比	1.20	
有意水準 5%	3.02		有意水準 5%	3.02	

表8 混合試料中のニバレノール濃度の均一性試験の結果

試料番号	単位 (ppm)	
	測定①	測定②
1	0.73	0.74
2	0.71	0.68
3	0.73	0.63
4	0.68	0.69
5	0.77	0.70
6	0.77	0.71
7	0.67	0.71
8	0.75	0.80
9	0.72	0.84
10	0.77	0.75
平均値	0.73	
標準偏差	0.049	
変動係数	6.67%	
F比	1.72	
有意水準 5%	3.02	

資料4-4 (1)

厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全性高度化推進研究事業)

ダイオキシン類等の化学物質の食品及び生体試料検査における信頼性確保と  
生体曝露モニタリング法の確立に関する研究

分担総合研究報告書 (平成14~16年度)

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および  
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究/食品衛生検査精度管理調査  
における適正調査試料作製と質的向上に関する研究 (その4-1)  
一 遺伝子組換え DNA 食品検査外部精度管理調査と検査法の検討一

主任研究者	柳澤 健一郎	(財)食品薬品安全センター 特別参事
分担研究者	松木 容彦	(財)食品薬品安全センター 特別参事
分担研究者	大島 赴夫*	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 部長
協力研究者	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所 食品部長
	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所 食品第三室長
	渡邊 敬浩**	国立医薬品食品衛生研究所 研究員
	笠間 菊子	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 研究員
	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 室長補佐

(\*平成16年度は分担研究者、\*\*平成16年度の分担報告書は資料4-4 (2) 参照)

研究要旨

平成14年度には安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤ (55-1) を、また平成15年度には安全性審査済みの遺伝子組換えダイズ (ラウンドアップレディ) を検査対象とし、外部精度管理調査を行った。さらに、平成14年度はパパイヤ果実の保存安定性およびにゲル撮影装置の機種間の感度の差について、平成15年度は抽出 DNA の品質が定量 PCR に与える影響について基礎的検討を行った。

A. 研究の目的

遺伝子組換え食品を対象とした食品衛生外部精度管理調査を行い、各参加機関における検査水準について検討した。これに加え食品衛生外部精度管理調査の実施に必要な事項について基礎的な検討を行った。

(種子) の測定データについて集計を行った。

B. 研究方法

1. 平成14年度外部精度管理

パパイヤの果肉または種子を各機関に送付し、定性 PCR 法 (果肉) および GUS 法

2. 確認試験

外部精度管理試料配布時に配布に使用したパパイヤ全個体につき、果肉および種子の一部をサンプリングし、厚生労働省の通知法 (GUS法および定性PCR法) に従って、組換え体、非組換え体の別が表示通りであるか否かについて検討した。

(1) GUS法

分取した種子から無作為に1粒をとり、胚を取り出した。これに基質溶液を加え、37℃、10～15時間加温後、それぞれの検体について、青色を呈した胚の数を数えた。1個体につきそれぞれ12個の種子を試験し、GUS発現率が30%以上の場合、遺伝子組換えパパイヤと判定した。

## (2) 定性 PCR 法

果肉を凍結乾燥後、ミキサーミルにて粉碎し、通知法のシリカゲル膜タイプキット法により DNA を抽出した。次にこの DNA 溶液について、対照用、検出用および確認用のそれぞれのプライマー対を用いて PCR 増幅を行った後、アガロースゲル電気泳動を行い、増幅バンドの有無を観察した。対照用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検知され、かつ検出用プライマーで予定長の PCR 増幅バンドが検出され、さらに確認用プライマー対で予定長の PCR 増幅バンドが検出された場合、遺伝子組換えパパイヤと判定した。

## 3. 安定性試験

配布試料として使用しなかった残りの組換え体および非組換え体のパパイヤ各 1 個についてそれぞれ果肉および種子を分割し、室温 (19～22℃)、冷蔵 (約 4℃)、冷凍 (約 -20℃) の各条件下で保存した。種子については保存第 0 日、3 日、9 日および 16 日めに GUS 法で、果肉については保存第 0 日、3 日、7 日および 14 日めに凍結乾燥に付した後定性 PCR 法で試験し、保存条件および保存期間が試験結果に与える影響について検討した。

## 4. ゲル撮影装置の機種間差の検討

定性 PCR 法の解析に使用する各種のゲル撮影装置について性能を比較した。DNA 分子量マーカーを段階希釈し、エチジウムブロミド 0.5 μg/mL を含む 3% のアガロースゲルで電気泳動した。これを各種ゲル撮影装置を用いて撮影し、100bp のバンドについてどの濃度までバンドが確認できるか比較した。

## 5. 平成 15 年度外部精度管理

国立医薬品食品衛生研究所にて作製された遺伝子組換えダイズ (ラウンドアップレディ) 擬似混入試料 (混合重量比 0%、1%、5%) を参加機関に送付し、ELISA 法または定量 PCR 法により測定された結果について結果の集計を行った。

## 6. DNA 抽出が定量 PCR 測定に与える影響についての検討

国産ダイズ試料から「JAS 分析ハンドブック 遺伝子組換え食品検査」に従って DNA を抽出した。この抽出 DNA について、内在性遺伝子レクチンのコピー数を定量 PCR 法で測定し、DNA 抽出の再現性および定量 PCR の再現性について検討した。

## 倫理面への配慮

遺伝子組換え作物の取り扱いには特定の区域内で行った。また、遺伝子組換え作物が周囲の自然環境に放出されないよう安全性未確認の遺伝子組換え作物は全て、また安全性確認済みの遺伝子組換え作物においても種子等の栽培可能な実験廃棄物は焼却処分に付した。

## C. 結果

### 1. 平成 14 年度外部精度管理

遺伝子組換えおよび非組換えパパイヤ外部精度管理試料の定性 PCR 法 (果肉) および GUS 法 (種子) の測定データについてそれぞれ集計を行ったところ、いずれの測定法においても全ての参加機関で遺伝子組換えパパイヤと非組換えパパイヤが正しく判定された (表 1)。

### 2. 確認試験

配布に使用するパパイヤ全個体の一部をサンプリングし、種子 (GUS 法) と果肉 (定性 PCR 法) のそれぞれを測定した結果、GUS 法、定性 PCR 法のいずれにおいても遺伝子組換えパパイヤは全て遺伝子組換えパパイヤと判定され、非組換えパパイヤと表示された試料においてはいずれも全て非遺伝子組換えパパイヤと判定された (表 2)。

### 3. 安定性試験

外部精度管理実施期間における配布試料の安定性を検討した結果、GUS 法、定性 PCR 法のいずれでも検討した全ての保存条件、保存期間を通して遺伝子組換えパパイヤは陽性、非組換えパパイヤは陰性と判定された (表 3)。

### 4. ゲル撮影装置の検討

検討した 4 種類の CCD カメラでは、いずれも 1 ウェルあたりの 100bp の DNA のアプライ量が 1.875 ng 以上のとき 100bp のバンドを確認でき、機種間差も認められなかった。一方、ポラロイドカメラでは 3.125 ng 以上アプライしないと 100bp のバンドを確認できなかった。以上の結果から、CCD カ

メラはポラロイドカメラに比べて感度が約 2 倍優れていることが明らかになった。

### 5. 平成 15 年度外部精度管理

ELISA 法に参加した 17 機関の測定値の平均は表 4-1 に示したように、5%濃度試料でやや高値を示したものの、混合重量比に近い測定結果であった。一方、定量 PCR 法に参加した 22 機関の測定値の平均は 5%濃度で  $3.759 \pm 0.671$ 、1%濃度で  $0.695 \pm 0.176$  といずれも混合重量比よりも 20%以上低い測定結果であった。定量 PCR 法の測定結果を詳細に検討した結果、DNA 抽出法にシリカゲル膜タイプキット法 (以下キット法とする) を用いた 18 機関の測定値 (表 4-2) が重量混合比よりも低い結果であったのに対して、これ以外の抽出法を用いた 4 機関の測定値 (表 4-3) はより混合重量比に近く、DNA 抽出法により測定値に差が生ずることが判明した。このため、統計解析は ELISA 法による測定値と定量 PCR 法で DNA 抽出にキット法を使用した機関の測定値の 2 種類について別々に実施した。ELISA 法に参加した 17 機関の測定値のうち、z-スコアが 2 を超えたのは 1 機関の 1%濃度の 1 測定のみで、施設内の測定値のばらつきを示す R 管理図で管理限界を超えた機関も 1 測定、1 機関のみであった。一方、定量 PCR 法でキット法により DNA 抽出を行った 18 機関の測定値のうち、z-スコアが 2 を超えたのは 1 機関の 1%濃度の 1 測定のみであったが、R 管理図で管理限界を超えた機関が 3 測定、3 機関あった。

### 6. 抽出 DNA の品質が定量 PCR 測定に与える影響についての検討

異なる 2 日に抽出した DNA の収量および 260nm/280nm の吸光度比を比較した結果、日間差が認められた (表 5-1)。次にこの DNA のうち 1 抽出について内在性遺伝子 *Lel* を定量 PCR 法により  $n=5$  で 3 ラン繰り返し測定した。その結果、同一ラン内の RSD は 4.8~8.5%、であった (表 5-2)。さらに異なる 2 日に抽出した計 8 抽出の DNA についてそれぞれ  $n=1$  で 3 ランの測定を行った結果、それぞれの抽出のラン間の RSD は 0.6~6.7%であったのに対し、それぞれのランにおける 8 抽出の DNA 間の RSD はいずれも 25%前後であった (表 5-3)。

#### D. E. 考察・結論

株式会社ダイヤモンドスターより入手したハワイ産パパイヤについて確認試験を行い、組換え体、非組換え体の別を試験し、表示通りであることを確認した。現在、遺伝子組換えパパイヤ (55-1) は安全性未審査であるため、日本国内での流通が禁止されているが、本試験の結果より、ハワイ産パパイヤは両者が混合しないよう適切に分別されていることが推察された。

安定性試験の結果、種子を用いる GUS 法では、冷蔵保存で 16 日後まで試験結果に影響を与えないことが明らかになり、外部精度管理で指定した測定期間 (冷蔵で試料送付し、試料到着後冷蔵保存し 2 週間以内に試験) での種子の安定性が確認された。また、果肉を用いる PCR 法でも、冷蔵および冷凍保存で 14 日後まで、試験結果に影響を与えないことが明らかになり、同じく外部精度管理で指定した測定期間 (冷蔵で試料送付し、試料到着後直ちに凍結乾燥し、2

週間以内に試験) での果肉の安定性が確認された。また、試料送付および参加機関での保存中の事故を想定し、種子 (GUS 法) では室温保存で 16 日後まで、果肉 (定性 PCR 法) では室温保存で 7 日後まで安定性を検討したが、いずれも安定性が確認された。しかし室温で保存した果肉は、冷蔵で保存した場合と比べ、果肉が軟化すると共に DNA 抽出液の 230nm の吸光度 (糖に由来) が高くなる傾向が認められ、果実の成熟がより進みやすいことがうかがわれた。

定性 PCR 法の解析に使用する各種のゲル撮影装置について性能を比較した結果、CCD カメラの感度がポラロイドカメラに比べて優れていることが明らかになった。パパイヤ試料の場合は、混入率が 100%または 0%のいずれかであるため問題は少ないが、CBH351 トウモロコシなど混入率がごくわずかな試料を分析する場合などは、ゲル撮影装置によって、判定が異なってくる可能性が示唆された。

ダイズ外部精度管理において ELISA 法に参加した機関の測定値の平均は混合重量比に近い測定結果であったのに対し、定量 PCR 法に参加した機関の測定値の平均は混合重量比よりも 20%以上低い測定結果であった。定量 PCR 法の測定結果を詳細に検討した結果、DNA 抽出法にキット法を用いた場合、定量 PCR の測定値が重量混合比よりも低くなるものと考えられた。このようにダイズ外部精度管理の測定結果には参加機関の技量だけでなく、測定法 (ELISA 法または定量 PCR 法)、DNA 抽出法が影響を与えていたことが判明したため、結果を解析する際には測定された数値だけでなく測定条件等についても吟味する必要があるこ

とが明らかになった。ELISA 法では参加した17機関のうち z スコアが2を超えたのは1機関の1測定、また R 管理図で管理限界を超えた機関も1測定、1機関のみであり、各機関ともおおむね良好な測定精度を保っているものと考えられた。一方、定量 PCR 法 (DNA 抽出:キット法) では18機関のうち、z スコアが2を超えたのは1機関の1測定のみであったが、R 管理図で管理限界を超えた機関が3測定、3機関あり、測定の再現性が十分でない機関があることが明らかになった。

ダイズ抽出 DNA 中の内在性遺伝子 Lel のコピー数を定量 PCR 法により繰り返し測定したときの同一ラン内の RSD は4.8~8.5%であった。また別々に抽出した8抽出の DNA の3ラン間の抽出ごとの RSD は0.6~6.7%の範囲であり、同一 DNA 試料のラン内、ラン間の RSD はいずれも10%程度であると考えられた。一方、別々に抽出した8抽出の DNA を同一ランで測定したときの抽出間の RSD はいずれのランでも25%前後と大きかった。また、抽出 DNA を抽出日ごとに比較したところ、収量、吸光度比のみでなく、Lel のコピー数にも日間差が認められた。従って定量 PCR 法では DNA の品質が測定値に大きく影響を及ぼ

すもの考えられ、DNA 抽出操作の細部にわたる検討の必要性を感じた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

渡邊敬浩、笠間菊子、和久井千世子、渋谷雅明、松木容彦、穂山 浩、米谷民雄 (2003) 遺伝子組換えトウモロコシ (CBH351) ならびにジャガイモ (NewLeaf Plus および NewLeaf Y) 定性検査方法を対象とした外部精度管理方法の検討 食品衛生学雑誌 第44巻 第6号 p281-288

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



表1-1 PCR法正答率

参加機関名	定性PCR法正答率(%)
A	100
B	100
C	100
D	100
E	100
F	100
G	100
H	100
I	100
J	100
K	100
L	100
M	100
N	100
O	100
P	100
Q	100
R	100
S	100
T	100
U	100

表1-2 GUS法正答率

参加機関名	GUS法正答率(%)
K	100
L	100
M	100
N	100
O	100
P	100
Q	100
R	100
S	100
T	100
U	100
V	100
W	100

表2-1 確認試験結果(GUS法)

試料番号	非組換えパパイヤ										
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
青色を示した胚の数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GUS陽性率(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

  

試料番号	組換えパパイヤ										
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
青色を示した胚の数	11	10	9	9	10	6	9	9	9	5	9
GUS陽性率(%)	91.7	83.3	75.0	75.0	83.3	50.0	75.0	75.0	75.0	41.7	75.0
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

表2-2 確認試験結果(定性PCR法)

試料番号	非組換えパパイヤ										
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11
対照用プライマー	2/2 <sup>a)</sup>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
検出用プライマー	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
確認用プライマー	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性

  

試料番号	組換えパパイヤ										
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
対照用プライマー	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
検出用プライマー	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
確認用プライマー	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性

a): 分母 ;試験数  
分子 ;陽性数

表3-1 安定性試験結果(GUS法)

保存条件	非組換えパパイヤ							
	冷蔵				室温			
	0	3	9	16	3	9	16	
保存日数	0	3	9	16	3	9	16	
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12	
青色を示した胚の数	0	0	0	0	0	0	0	
GUS陽性率(%)	0	0	0	0	0	0	0	
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	

  

保存条件	組換えパパイヤ							
	冷蔵				室温			
	0	3	9	16	3	9	16	
保存日数	0	3	9	16	3	9	16	
調査した胚の数	12	12	12	12	12	12	12	
青色を示した胚の数	11	10	8	9	7	9	7	
GUS陽性率(%)	91.7	83.3	66.7	75.0	58.3	75.0	58.3	
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	

表3-2 安定性試験結果(定性PCR法)

保存条件	非組換えパパイヤ									
	冷蔵					室温			冷凍	
	0	3	7	10	14	3	7	14	14	
保存日数	0	3	7	10	14	3	7	14	14	
対照用プライマー	2/2 <sup>a)</sup>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
検出用プライマー	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	
確認用プライマー	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	
判定	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	

  

保存条件	組換えパパイヤ									
	冷蔵					室温			冷凍	
	0	3	7	10	14	3	7	14	14	
保存日数	0	3	7	10	14	3	7	14	14	
対照用プライマー	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
検出用プライマー	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
確認用プライマー	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	
判定	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	

a): 分母 ;試験数  
分子 ;陽性数

表4-1 ELISA法によるの測定値

機関名	混合重量比		
	0%	1%	5%
1	-0.08	1.05	5.61
2	ND	1.12	5.58
4	0	1.29	6.60
6	-0.11	0.90	5.34
7	-0.02	1.07	5.93
13	-0.04	0.88	5.56
14	-0.04	1.35	7.62
15	0	1.00	7.04
17	0	0.99	5.67
23	-0.07	1.16	3.82
25	0.01	0.83	3.82
29	ND	1.10	5.42
30	-0.06	0.99	4.09
32	-0.03	1.11	6.40
33	-0.06	0.97	5.89
34	-0.01	1.04	6.26
35	ND	1.13	5.54
平均		1.058	5.661
標準偏差		0.140	1.067

表4-2 定量PCR法の測定値  
(DNA抽出法:シカゲル膜タイプキット法)

機関名	混合重量比		
	0%	1%	5%
1	0	0.87	3.75
3	0	0.77	4.14
5	0	0.79	4.08
6	0	0.61	3.72
8	0	0.49	3.71
9	0	1.09	3.98
10	0	0.60	3.16
11	0	0.48	3.14
12	0	0.56	3.09
16	0	0.72	2.91
17	0	0.76	3.72
18	0	0.48	3.62
21	0	0.57	3.04
24	0	0.62	3.88
26	0.02	0.56	3.06
27	0	0.73	3.65
28	0	0.58	3.41
30	0	0.55	3.53
平均	0.001	0.657	3.533
標準偏差	0.005	0.158	0.385

表4-3 定量PCR法の測定値  
(DNA抽出法:シカゲル膜タイプキット法以外)

機関名	混合重量比		
	0%	1%	5%
19	0	0.71	3.92
20	0	0.96	5.64
22	0	0.74	4.33
31	0	1.05	5.22
平均	0	0.865	4.778
標準偏差	0	0.166	0.791

表5-1 DNA抽出の日間差

第1日		第2日	
ラン番号	吸光度比 (260nm/280nm)	DNA ( $\mu$ g)	Lel コピー数
1	1.763	23.8	22667
2	1.768	26.7	19802
3	1.792	21.5	31764
4	1.771	25.5	24948
5	1.776	27.7	24975
Mean	1.77	25.00	24831.2
S.D.	0.01	2.46	4418.0
RSD	0.6	9.8	17.8

  

ラン番号	吸光度比 (260nm/280nm)	DNA ( $\mu$ g)	Lel コピー数
6	1.890	15.5	42017
7	1.835	15.6	37008
8	1.904	13.9	32593
Mean	1.88	15.00	37206.0
S.D.	0.04	0.95	4715.1
RSD	1.9	6.4	12.7

表5-2 同一DNAを同時に5回測定したときの再現性

ラン番号	測定数					Mean (ラン内)	S.D. (ラン内)	RSD(% (ラン内))
	1	2	3	4	5			
1	33144	28007	28397	29330	26588	29093	2470	8.5
2	30785	32866	35028	33902	32723	33061	1574	4.8
3	33849	35702	37648	37393	33891	35697	1828	5.1

表5-3 異なった抽出を同一ランで測定した時の再現性および同一DNAを異なったランで3回測定したときの再現性

ラン番号	抽出番号										
	1	2	3	4	5	6	7	8			
1	22780	18911	29783	23957	25212	39730	35039	33144	28570	7052	24.7
2	22689	20411	31473	24506	24729	41984	37733	30785	29289	7612	26.0
3	22532	20083	34036	26382	24985	44335	38252	33849	30557	8406	27.5
Mean (ラン間)	22667	19802	31764	24948	24975	42017	37008	32593	29472		
S.D. (ラン間)	126	789	2141	1271	242	2303	1725	1604	1006		
RSD%(ラン間)	0.6	4.0	6.7	5.1	1.0	5.5	4.7	4.9	3.4		

資料4-4 (2)

厚生科学研究費補助金 (食品の安全性高度化推進研究事業)

ダイオキシン類等の化学物質の食品および生体試料検査における信頼性確保と  
生体暴露モニタリング法の確立に関する研究

分担総合研究報告書 (平成16年度分)

生体試料中ダイオキシンの簡易モニタリング法の実用性評価および  
臭素化ダイオキシン ELISA 確立に関する研究/食品衛生検査精度管理調査  
における適正調査試料作製と質的向上に関する研究 (その4-2)  
—組換えDNA技術応用食品検査の信頼性確保に関わる研究—

主任研究者	柳澤 健一郎	(財)食品薬品安全センター 特別参事
分担研究者	松木 容彦	(財)食品薬品安全センター 特別参事
分担研究者	渡邊 敬浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部 研究員
協力研究者	米谷 民雄	国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品部長
協力研究者	穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品第三室長
協力研究者	笠間 菊子	(財)食品薬品安全センター 研究員
協力研究者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター 室長補佐

研究要旨

安全性審査を終了した遺伝子組換え(GM)トウモロコシを対象とした定量分析法として、厚生労働省から通知された「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(平成 13 年 3 月 27 日、食発第 110 号、一部改正:平成 16 年 6 月、食安発第 0628001 号)において定量 PCR 法が定められている。昨年度実施した GM ダイズを対象とした試験に引き続き、本年は上記 GM トウモロコシ(Mon810 系統)を対象とした外部精度管理試験を試験的に実施した。また、実施に際し、Mon810 系統試験用試料調製方法の妥当性、ならびに調製試料の均一性および安定性についても検討をおこなった。重量混合比として 5%となるよう調製した試料については、 $5.15 \pm 0.33\%$ の定量値が得られており、試料調製方法の妥当性が確認された。また、6 検体から得られた定量値に対し一元配置の分散分析を行った結果、検体間での有意差は確認されず、試料の均一性が確認された。また、 $-20^{\circ}\text{C}$ で1ヶ月間保存した場合にも定量値に有意な変動は認められず、試料の安定性が確認された。外部精度管理試験の結果からは、全体として良好な測定精度をもって試験が行われたことが明らかになった一方で、機関特異的また使用機種特異的な問題があることも明らかになった。

A.研究目的

厚生労働省では「組換え DNA 技術応用食品の検査方法について」(平成 13 年 3 月 27 日、食発第 110 号、一部改正:平成 16 年 6 月、食安発第 0628001 号)を通知し、遺伝子組換え(GM)食品に関する検査法を定めた。GM 食品については検査方法としての歴史が浅いことから、外部精度管理体制の整

備そのものが立ち後れており、現在、精度管理用試料を含む標準試料についても国際的な議論が開始された段階である。これまでに我々は GM ジャガイモ、トウモロコシ(CBH351 系統)、ダイズ(RRS)を対象に試験用試料調製方法についての検討を行い、また外部精度管理試験方法の検討を目的とした協同試験を実施してきた。本年度は、前出の厚生労働

省通知に記載されている検査方法のうち、トウモロコシ Mon810 系統を対象とし、試験用試料調製後、均一性及び安定性について確認した上で、定量 PCR 法の外部精度管理調査を試験的にを行い、参加機関から報告されたデータを基にばらつきの要因、試験法の問題点について検討した。

## B. 研究方法

### B-1. 試料の調製

GM トウモロコシ・Mon810 試料は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課を通じて入手した。また、非混入試料および疑似混入試料調製時のマトリクスとして使用した非遺伝子組換え (non-GM) トウモロコシ試料 (アメリカ産トウモロコシ) は Quality Technology International 社から入手した。入手した全てのトウモロコシ試料を粒径が均一に 500  $\mu\text{m}$  となるよう粉碎した。Non-GM トウモロコシ試料については粉碎後、GM トウモロコシの混入がないことを確認するため定量 PCR 法を用いた分析を行ったが、0.3% 程度の GM トウモロコシの混入が認められたため、低濃度試料として扱うことにした。また、低濃度試料をマトリクスとし、これに Mon810 試料を重量換算で 5.0% となるよう混入させた試料を高濃度試料とした。試料調製後、低濃度試料を 7 g、高濃度試料を 20 g となるよう、それぞれ 50 mL 容遠沈管 50 本に秤量分注し小分け試料とした。

### B-2. 均一性試験

低濃度試料および高濃度試料のそれぞれに対し、50 本の小分け試料の 12% に相当する 6 本の小分け試料を使用して、均一性確認試験を実施した。各小分け試料から 2 g のトウモロコシ検体を秤量分取し、厚生労働省通知法食安発第 1113001 号記載のシリカゲル膜タイプ

キット法を用いて DNA を抽出した。濃度を調整した抽出 DNA を定量 PCR 法における DNA 試料溶液とし、分析を行った。スクリーニング法および、Mon810 系統特異的定量法の両法を用い、また、2 回の繰り返し測定を行うことで Mon810 混入率を算出した。得られた混入率は一元配置の分散分析および t 検定を用いて解析した。

### B-3. 安定性試験

試料送付直後、低濃度試料および高濃度試料のそれぞれから 2g の検体を  $n=4$  で秤量分取し、厚生労働省通知法食安発第 1113001 号記載のシリカゲル膜タイプキット法を用いて DNA を抽出した。濃度を調整した抽出 DNA を定量 PCR 法における DNA 試料溶液とし、分析を行った。分析に際しては、CaM 定量系を用いたスクリーニング法および Mon810、GA21 系統特異的定量法を用い、それぞれの混入率を算出した。また、上記試験試料について約  $-20^{\circ}\text{C}$  で 1 ヶ月間保存した後にも同様の方法にて試験を行い、低濃度試料と高濃度試料のそれぞれについて、保存前後の測定値を比較した。

### B-4. 外部精度管理の実施

遠沈管に分注した高濃度試料および低濃度試料を、食品衛生外部精度管理調査参加 27 機関に報告書様式、実施要領および厚生労働省通知準拠マニュアルと共に各 1 本ずつ送付した。各機関での分析終了後、返送された分析結果およびアンケート項目について一覧を作成し、報告された定量値について統計処理 (基本統計量、順序統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、 $\bar{X}$ -R 管理図の作成および  $z$ -スコアの算出) を行った。また、統計処理の結果を検討した結果、定量 PCR 装置の機種によって定量値に差が生じた可能性が考えられたため、定量 PCR に機種 F を使用した機関の結果を除いた定量値についても同様に統計処

理を行った。

### C. 研究結果

#### C-1. 試料調製方法の妥当性と試料の均一性

低濃度試料および高濃度試料それぞれ6本の小分け試料を使用してCaM定量系、およびGA21特異的定量系ならびにMon810特異的定量系を用いた混入率算出試験を行った。その結果、低濃度試料に対しCaM定量系にて $0.37 \pm 0.04\%$ 、Mon810特異的定量系にて $0.30 \pm 0.08\%$ 、GA21特異的定量系にて $\text{tracc}$  (定量下限値以下)、また高濃度試料に対し、CaM定量系にて $5.91 \pm 0.94\%$ 、Mon810特異的定量系にて $5.15 \pm 0.33\%$ 、GA21特異的定量系にて $\text{tracc}$ の定量値を得た。これらの結果から、重量混合比率と定量値を比較した場合に有意な差があるとは判断されず、本試料調製方法の妥当性が確認された。また、CaM定量系ならびにMon810特異的定量系を用いて同一試料に対し、2回の繰り返し測定を行い、それぞれ算出された定量値を用いて一元配置の分散分析およびt検定による有意差検定を行った。その結果、得られた定量値が正規分布していること及び各検体間に認められた差違が、2回の繰り返し測定間に認められた差違に比べ、有意ではないことが明らかとなった(表1-1および1-2)。

#### C-2. 試料の安定性

高濃度試料および低濃度試料のそれぞれを $-20^{\circ}\text{C}$ で1ヶ月間保存し、保存の前後についてCaM定量系、Mon810定量系、GA21定量系を用いて定量値を算出した。得られた結果につき、保存の前後で定量値を比較した結果、いずれの定量系を用いた場合にも定量値に統計的有意差が認められなかった(表2-1および2-2)。またGA21定量系を用いた場合には検出限界値以下の測定値しか得られなかったた

め、定量値の算出および統計解析は行わなかった。

#### C-3. 外部精度管理試験

各参加機関から報告された試験結果を集計し、表3に「トウモロコシDNA抽出結果」を、表4に「トウモロコシ定量PCR結果(スクリーニング低濃度)」を、表5に「トウモロコシ定量PCR結果(スクリーニング高濃度)」を、表6に「Mon810系統特異的試験結果」を示した。

表3-2に示されるように、参加全27機関中、22機関がシリカゲル膜タイプキット法を、4機関がCTAB法を、そして残り1機関がシリカベースレジソタイプキット法をDNA抽出法として採用していた。高濃度試料から抽出された9点の検体につき解析を行った結果、同一のDNA抽出法を採用している機関間においても平均収量の大小が認められており、遠心機器、吸光度測定装置等の使用機器、また、遠心、加温等の処理条件が系統的な誤差を生じる要因となっている可能性が考えられた。さらに、抽出法間でDNA収量について比較した結果、シリカゲル膜タイプキット法による平均収量がCTAB法による収量に比べ3倍程度高いことが明らかとなった(表3-2)。また、DNA収量の検体間におけるばらつきについて、シリカゲル膜タイプキット法およびCTAB法を比較した場合、両法に明確な差は認められなかった(表3-2)。しかしながら機関別にみると、明らかにばらつきの大きい機関が複数機関認められた(表3-1)。この収量のばらつきの原因については、別に調査を行ったDNA抽出試薬のロットとの間に明確な相関が認められなかったことから、遠心上清の分離等、手技の習熟が操作上の誤差となり、それに依るところが大きいと考えられた。

スクリーニング試験結果においてGA21系統特異的定量系により得られた



測定値が検量線の最低濃度(機種 C において 16 コピー、機種 A、B、D、E において 20 コピー、機種 F において 40 コピー)を上回った機関はなかった。また系統特異的定量結果において GA21 系統特異的定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度を上回った機関は 1 機関の 1 測定のみであった。このためスクリーニング試験については、CaM 定量系により得られた定量値について、また、系統特異的定量については Mon810 系統特異的定量系により得られた定量値について統計解析を行うこととした。表 4 に示されるように低濃度試料を対象とした試験において、CaM 定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度を下回った機関が 4 機関認められた。これら機関から報告された結果については、定量 PCR 法において理論的に規定される絶対的定量下限値(absolute limit of quantification:  $^{abs}LOQ_{method}$ )を測定値が満たしておらず、この測定値に基づいて算出される定量値の信頼性を担保する事が出来ないため解析から除外した。

前述の 4 機関を除く 23 機関から報告された、低濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて得られた定量値について統計処理を行った結果については図 1~3 に示した。表 4 に示されるように、全ての機関から報告された低濃度試料を対象とした CaM 定量値の平均  $\pm$  S.D. は  $0.331 \pm 0.058\%$  であった。また、使用された定量 PCR 装置の機種に依存して定量値が変動するような傾向は認められなかった。さらに図 2 および 3 に示したように、管理限界を超える定量値を報告した機関はなかった。

次に高濃度試料を対象とした CaM 定量系および Mon810 系統特異的定量系を用いて得られた定量値について解析を行った。高濃度試料を対象とした試験

においては、測定値が  $^{abs}LOQ_{method}$  に満たない機関は認められなかった。CaM 定量系を用いて得られた定量値について統計処理を行った結果については図 4~6 に示した。表 5 に示されるように、高濃度試料を対象とした CaM 定量値の平均  $\pm$  S.D. は  $5.785 \pm 1.478\%$  であった。また、機種 F を使用した機関から報告された定量値については、他の定量 PCR 装置を使用した機関から報告された定量値に比べ有意に高い傾向が認められた。さらに、図 5 および 6 に示したように、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 2 機関、R が管理限界を超えた機関が 1 機関あった。

高濃度試料を対象とし、Mon810 系統特異的定量系を用いて得られた定量値について統計処理を行った結果については図 7~9 に示した。表 6 に示したように、各機関から報告された Mon810 特異的定量値の平均  $\pm$  S.D. は  $5.753 \pm 1.309\%$  であった。また CaM 定量系を用いた試験結果と同様に、機種 F を使用した機関から報告された定量値が他の定量機器を使用した機関から報告された定量値に比べ有意に高い傾向が認められた。さらに、図 8 および 9 に示すように、Xbar および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 1 機関、R が管理限界を超えた機関が 3 機関あった。

上記のとおり、参加機関から報告された全定量値を対象とした統計解析の結果、Xbar および Z-スコアが管理限界を超える定量値を報告した機関において使用されていた定量 PCR 装置がいずれも機種 F であったため、定量 PCR 装置の機種依存的に定量値に差が生じている可能性が考えられた。このため、機種 F を定量 PCR 装置に使用した機関から報告された定量値を除いたデータについても統計解析を行うこととした。

機種 F を使用した機関を除く 25 機関 (以下 F を除く機関とする) につき、高濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて得られた定量値の統計解析を行った(図 10~12)。前述の 25 機関から報告された CaM 定量値の平均  $\pm$  S.D. は  $5.404 \pm 0.572\%$  であった。また、図 11 および 12 に示したように、 $\bar{X}$  および Z-スコアが管理限界を超えた機関が 1 機関あり、この機関においては R の管理限界も上回っていた。

CaM 定量系と同様に、Mon810 系統特異的定量系を用いて得られた定量値についても統計解析を行った結果を図 13~15 に示した。25 機関から報告された定量値の平均  $\pm$  S.D. は  $5.459 \pm 0.588\%$  であった。また、図 14 および 15 に示すように、 $\bar{X}$  および Z-スコアが管理限界を超える定量値を報告した機関が 1 機関、R が管理限界を超える定量値を報告した機関が 2 機関あった。

#### D. 考察

低濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて実施されたスクリーニング試験の定量値については、 $\bar{X}$ -R 管理図および Z-スコア解析の結果、管理限界を超える定量値を報告した機関はなかった。しかし、CaM 定量系により得られた測定値が検量線の最低濃度を下回った機関が 4 機関あり、統計に含めることができなかった。これら機関から報告された結果について詳しくみると、測定値が  $^{abs}LOQ$  method に満たなかった要因には以下の 4 つが考えられた。1) 採用した DNA 抽出法依存的な要因。2) 定量 PCR 装置に依存した要因。3) 試験実施者の操作上の誤差に依存した要因。4) 上記 1)~3) の複合要因。上記 4 機関中、機関 6 は定量 PCR 装置に機種 F を使用しており、機種 F においては試験法としての検量

線の設定上、 $^{abs}LOQ$  method が他の PCR 装置に比べて高め(40 コピー)に設定されていることが結果に影響を与えている可能性も考えられた。さらに、詳細については後述するが、機種 F については、ラン間(異なる測定操作間)で作成される検量線に手技に依存すると判断される誤差が生じており、この事が、測定値がラン間で変動する要因の一つとなっている可能性が示唆される。また、さらにこの変動は操作上の誤差から  $^{abs}LOQ$  method がラン間で変動し得る事を意味しており、実測サンプルの定量値にも影響を及ぼしかねない。そのため、他の定量 PCR 装置を使用する場合に比べ、より技術的に習熟し、操作上の誤差を軽減させることが必要であると思われる。機関 6 以外の 3 機関においては、DNA 抽出法にシリカゲル膜タイプキット法以外の方法(CTAB 法:機関 21 および 26、シリカベースレジソタイプキット法:機関 17)が採用されていた。CaM 定量系と同時に測定されたトウモロコシ内在性遺伝子(*SSI1b*)定量系により得られた測定値についてみると、CTAB 法を採用した機関 21 および 26 から報告された測定値は、検体間でのばらつきが大きく、また、測定値は、シリカゲル膜タイプキット法を採用した機関に比べて小さい傾向が認められた。これらのことから、上記 2 機関においては抽出操作のばらつきおよび吸光度測定時の不備が原因となり、PCR 反応系に加えた DNA の量が十分でなかった、あるいは操作の不備により PCR 阻害物質を十分に除去することが出来なかったことが考えられ、それらの結果として、CaM 定量系で得られた測定値が検量線の最低濃度を下回ったものと思われた。機関 17 については同法を採用している機関が他にないため、データの比較から考察する事が出来ないが、DNA 抽出法依存的に定量

下限値が変動した可能性、および、高濃度試料と低濃度試料との間に *SSIIb* 測定値の差異が認められることから試料依存的な原因があったことの2点が推測される。なお、これまでの研究の成果として、同一試料を対象とした協同試験においては、実際の試料を対象とした定量PCR法の定量下限値( $^{rel}LOQ_{sample}$ )が0.1~0.5%(w/w:GMトウモロコシ重量混入率)という結果が得られている(上記  $^{rel}LOQ_{sample}$  は、DNeasy Plant Maxi法により抽出されたDNAを対象に機種Aを用いて行われた試験により求められた。DNA抽出法および定量PCR装置の選択によっては変動しうるものと考えられる)。

高濃度試料を対象とした試験においては、CaM 定量系および Mon810 系統特異的定量系のいずれを用いた試験においても、機種Fを定量PCR装置として使用した機関から報告された定量値が、 $\bar{X}$  および Z-スコアにおいて管理限界を越えていた。機関6から報告された測定値が定量下限値を下回った事についてすでに言及したが、高濃度試料を対象とした試験においても、機種Fを使用した機関については、それ以外の定量PCR装置を用いた機関に比べて、同一のDNAを異なったランで繰り返し測定した場合に、測定値が大きく変動していることが示唆された。そこで、抽出番号1~3の同一DNAを対象に行われたCaM定量ならびにGA21定量(スクリーニング)、および Mon810 系統特異的定量(系統特異的)を目的とした計3回のランについて、各機関から報告された測定値のうち、*SSIIb* の測定値を抽出し、相対標準偏差を求め比較した。その結果、表7に示したように、機種Fを用いた機関から報告された *SSIIb* 測定値の相対標準偏差は、各抽出DNAについて、機関6にお

いては 56.8%、53.8%、48.5%(相対標準偏差の平均;53.0%)、機関19においては 40.3%、38.5%、28.9%(同平均;35.9%)であった。これに対し、機関26を除くそれ以外の定量PCR装置を使用した機関におけるラン間再現性(相対標準偏差の平均 $\pm$ S.D.)は  $7.36 \pm 3.78\%$  であった。これらの結果から、機種Fを用いた場合、得られる測定値についてのラン間再現性が低い傾向が明らかとなった。また、Fを除く機関から報告された定量値が  $\bar{X}$  および Z-スコアの管理限界を超えた要因としては先に考察した検量線の誤差に起因するものと、それ以外のものと考えられた。まず、検量線について考察すると、検量線が正確に作成されず、またラン間で誤差を生じた場合、測定されるコピー数の大きさの違いから、内在性遺伝子と標的遺伝子とでは受ける影響の大きさが異なる(内在性遺伝子の測定値がより影響を受けやすいものと考えられる)。このため、内在性遺伝子と標的遺伝子の測定値の比として算出される定量値が、真値からはずれた値として算出されるものと考えられる。特に機種Fを用いた定量試験の場合には、検量線の1濃度あたり1反応系のみ反応に依って検量線を作成するため、わずかな誤差が結果に大きな影響を及ぼしかねない。しかしながら、検量線の誤差のみでは機種Fを使用した2機関から報告された定量値が真値と大きく異なっていた結果を十分に説明することが出来ない。そこで、その他の原因を明らかにするため、国立衛研において検証を行った。国立衛研で抽出された5点の抽出DNAを用いて3回繰り返し測定試験を行い、*SSIIb* 測定値について解析したところ、ラン間誤差が他の定量PCR装置と同等の大きさ(相対標準偏差の平均 $\pm$ S.D.が  $6.08 \pm 3.05\%$ )になることが確認された。

また、さらには機種 F 使用の参加機関から測定に使用した DNA を供与していただき、5 点の抽出 DNA を用いて 2 回の繰り返し測定を実施したが、測定値、ラン間再現性、および混入率の全てに関し問題がないと判断される数値が得られた。また、操作方法については担当者への聞き取り調査を行ったが、特別な問題を見つけることができなかった。これらの結果は、参加機関が使用した試薬あるいは機器に何らかの問題があったことを強く示唆するものと考えられた。

なお、先に示したラン間再現性の解析において、機関 26 からは、通知法とは異なり PCR プレートのフタにキャップを使用した旨報告されており、また、測定値も他の機関と同一に解析する事ができない大きな異常を示していたため、抽出 DNA に大きな問題が含まれていると考え解析から除外した（機関 26 に認められた問題については後述する）。

F を除く機関について解析を行った結果、前述の機関 26 から報告された高濃度試料を対象に CaM 定量系を用いて得られた定量値については、 $\bar{X}$  および Z-スコアが管理限界を超え、さらには R 管理図においても管理限界を上回っていた。また、Mon810 系統特異的定量系により得られた定量値の統計解析の結果においては、機関 12 から報告された定量値が  $\bar{X}$  および Z-スコアにおいて管理限界を超えており、また、R 管理図においては機関 12 および 21 から報告された定量値が管理限界を上回っていた。これら 2 機関について DNA 抽出の結果をみると、機関 12 については同一の DNA 抽出法を採用した他機関に比べ収量が少なく（高濃度試料から抽出された 9 検体の平均が 12.7  $\mu\text{g}$ ）、また、検体間で DNA 収量が大きく変動していること（相対標準偏差が 30.0%）が観察さ

れており、また、機関 21 については収量にばらつきは認められなかったものの、DNA の質を示す O.D.260/230 の値に明らかな異常（高濃度試料から抽出された 9 検体について O.D.260/230 値の平均が 2.47）が認められた。このように、F を除く機関のうち  $\bar{X}$  または Z-スコアが管理限界を超えた機関に共通して、抽出 DNA に問題があると考えられた。機種 F 以外の定量 PCR 装置を使用した場合には、高いラン間再現性が示されていることから、コピー数の測定に対する定量系の影響は少なく、抽出 DNA 由来の要因は、直接測定値に反映されるものと考えられる。そこで、Mon810 系統特異的定量試験において対象とされた抽出 DNA 9 点から得られた測定値のうち *SSIIB* 測定値を抽出し、相対標準偏差を求め、これを指標として、DNA 抽出の再現性について検討した。その結果、表 16 に示したように、*SSIIB* 測定値の相対標準偏差は機関 21 で 68.5%、機関 26 で 66.2% と非常に大きく、定量 PCR 法における測定値のばらつきからも DNA 抽出の並行再現性（量および質の両面において）に問題があることが明らかとなった（さらに報告データを精査した結果、機関 26 については、報告された定量値の解析方法に誤りが認められており、解析法についても改善が必要である）。一方、機関 12 の相対標準偏差は 28.6% であり、他機関と比較して顕著な差は認められなかった。しかし、先に言及したとおり、DNA 収量および質に日差変動が認められており、O.D.260/280 値が異常に高いと判断される検体が含まれる。また、測定された *SSIIB* の測定値も他の機関に比べ高めの傾向が認められる。これらの点から、抽出法の習熟が不十分であるためにおこる抽出間誤差、DNA 濃度測定、および定量 PCR 法に使用する