

Table 3 頑健な統計量によるz-スコア

	分析値	1	2	3	4	5	6
P	2,3,7,8-TCDD	-1.051	0.317	-0.556	9.048	-0.336	0.127
C	1,2,3,7,8-PeCDD	-0.451	-0.179	-1.139	2.872	-0.056	0.326
D	1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.052			0.080	-1.105	-0.027
D	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-0.158	-0.212	0.968	-1.322	1.023	-0.299
s	1,2,3,7,8,9-HxCDD						
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-0.987	-0.247			0.100	1.134
	OCDD	-0.394		-0.277		-0.632	1.304
	2,3,7,8-TCDF	-0.606	0.595	-1.392	1.047	0.364	-0.008
	1,2,3,7,8-PeCDF	-0.538	-0.277	-0.685	1.206	-0.734	1.029
P	2,3,4,7,8-PeCDF	-0.107	0.397	-0.803	2.448	-0.908	-0.077
C	1,2,3,4,7,8-HxCDF	-0.527	-0.338	2.095	0.652	-0.670	-0.615
D	1,2,3,6,7,8-HxCDF	-0.573	0.708	1.478	-0.478	-0.565	-0.571
F	1,2,3,7,8,9-HxCDF						
s	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.102	-0.271	1.458	-1.115	-0.545	0.372
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF						
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF						
	OCDF						
ノ	3,3',4,4'-TCB	0.455	0.678	-1.254	-0.761	1.024	-0.141
ン	3,4,4',5'-TCB	0.785	0.850	-7.900	0.344	-0.053	-0.428
オ	3,3',4,4',5'-PeCB	0.527	-0.086	-1.391	-0.267	1.263	-0.045
ルト	3,3',4,4',5',5'-HxCB	0.272	-0.281	-1.222	-0.643	1.128	0.746
	2,3,3',4,4'-PeCB	0.263	1.233	-0.629	-1.279	-0.095	0.508
モ	2,3,4,4',5'-PeCB	-0.189	0.788	-1.341	0.151	-0.491	1.081
ノ	2,3',4,4',5'-PeCB	0.205	-0.006	-1.219	2.737	-0.262	-0.217
オ	2',3,4,4',5'-PeCB	-0.016	-0.569	44.500	0.383	-1.056	-0.241
ルト	2,3,3',4,4',5'-HxCB	0.474	0.929	-1.952	-0.455	-0.038	0.588
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	0.483	0.686	-1.348	0.415	-0.881	0.645
	2,3',4,4',5',5'-HxCB	0.627	1.094	-0.928	-0.705	-0.728	0.641
	2,3,3',4,4',5',5'-HpCB	-0.095	-0.049	0.919	-0.770	-1.107	1.102
	TEQ	0.076	0.021	-2.093	1.227	0.328	-0.154

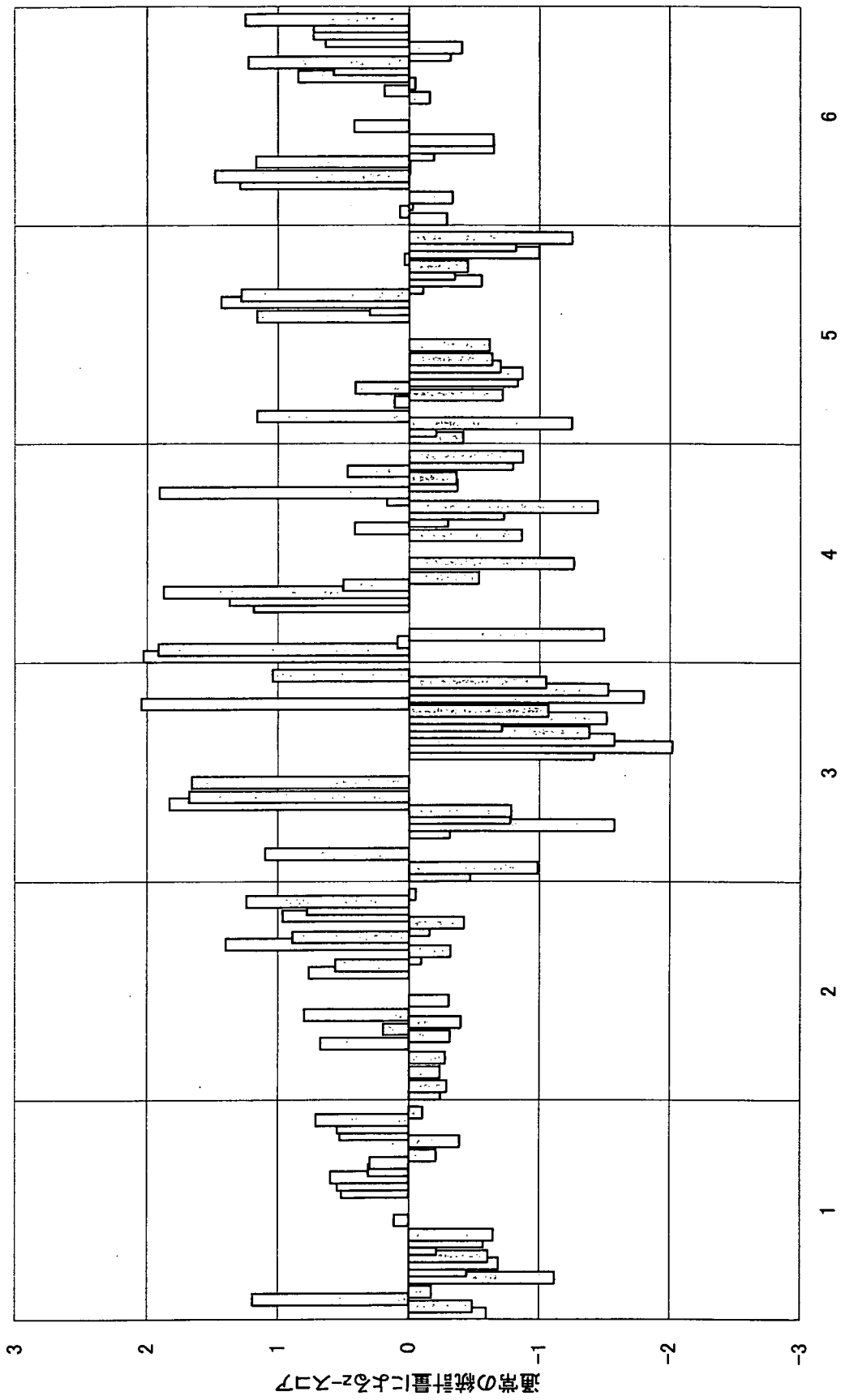


Figure 1 通常の統計量から計算した各参加機関のzスコア

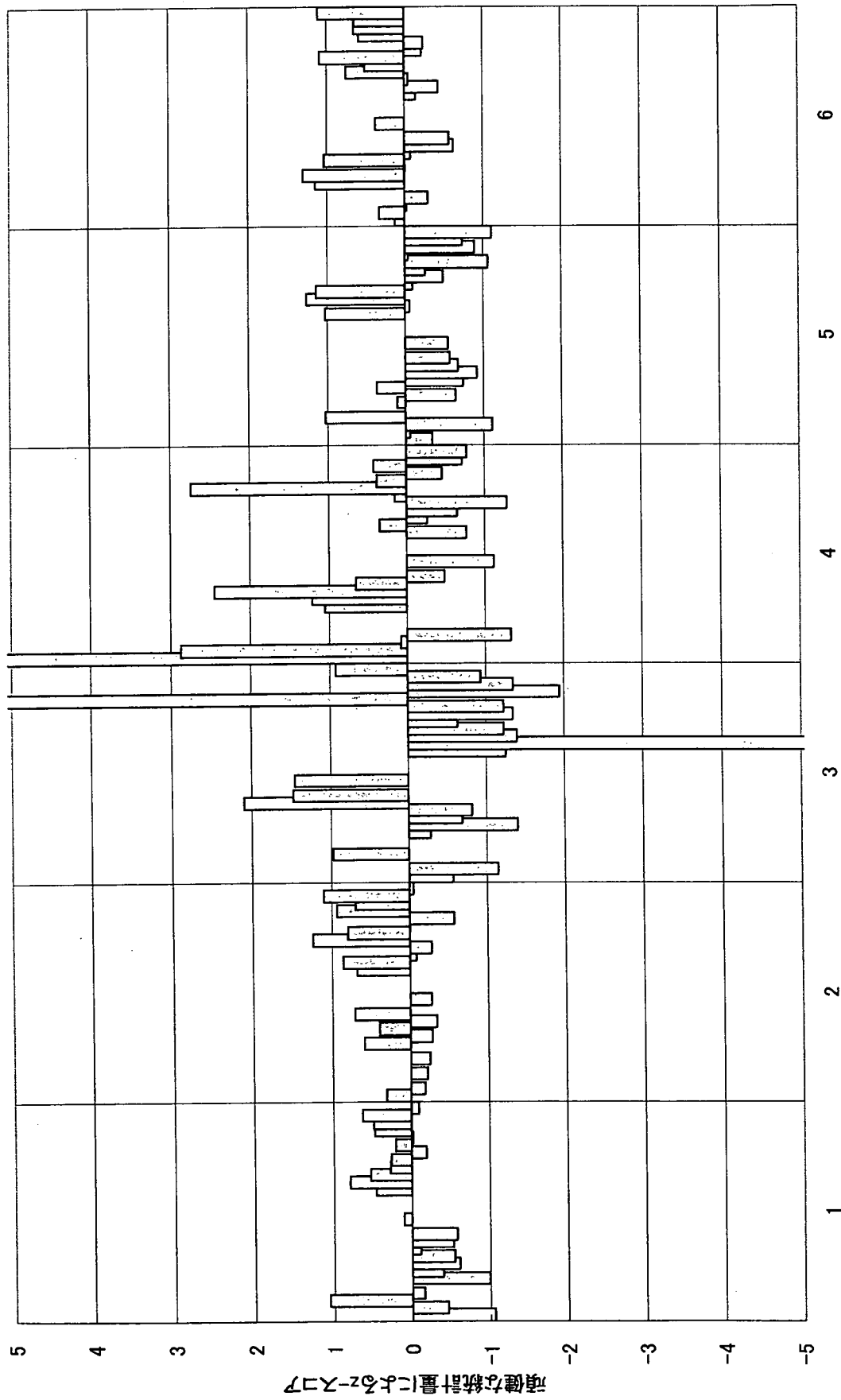


Figure 2 頑健な統計量から計算した各参加機関の z スコア

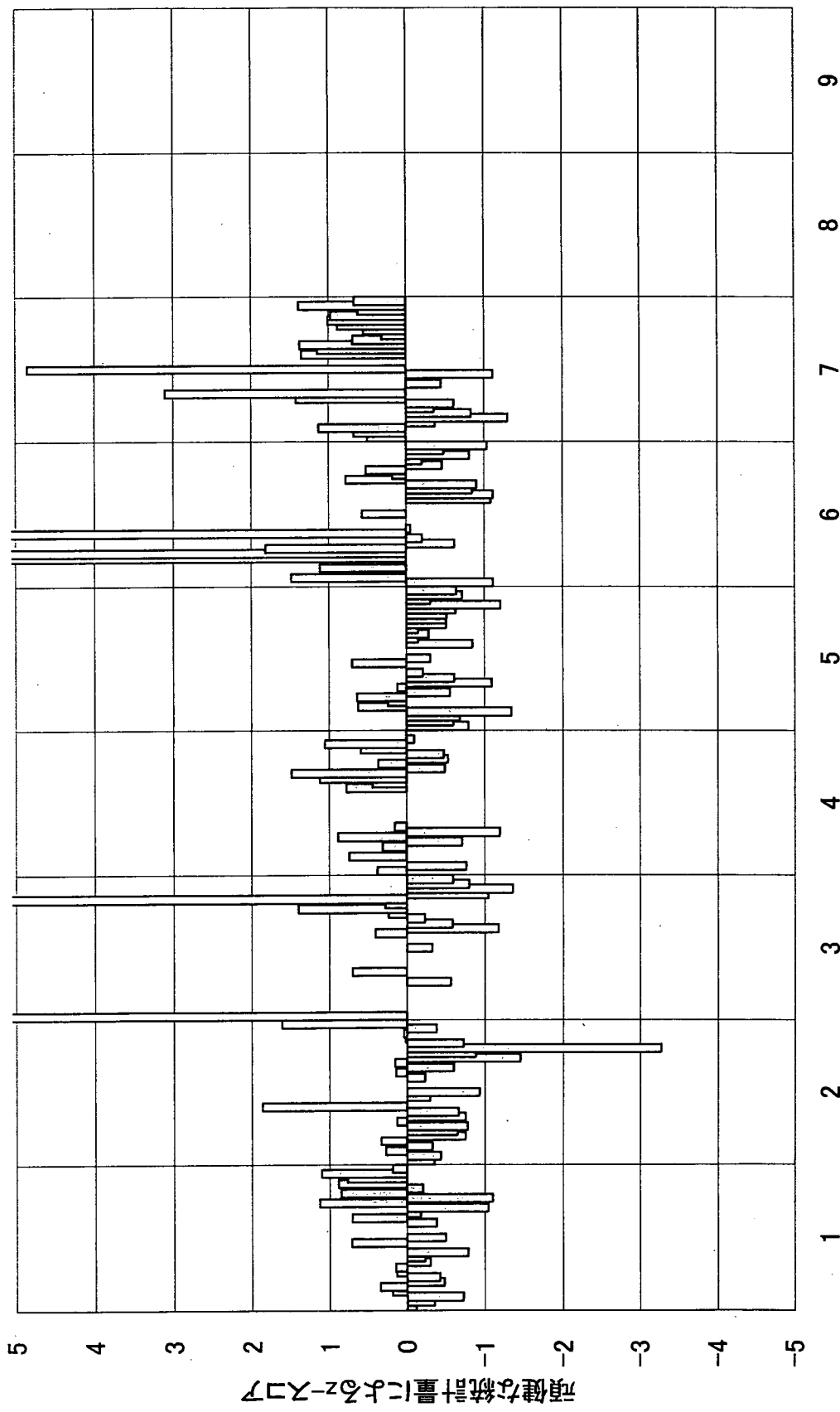


Figure 3 頑健な統計量から計算した各参加機関のzスコア (平成17年)

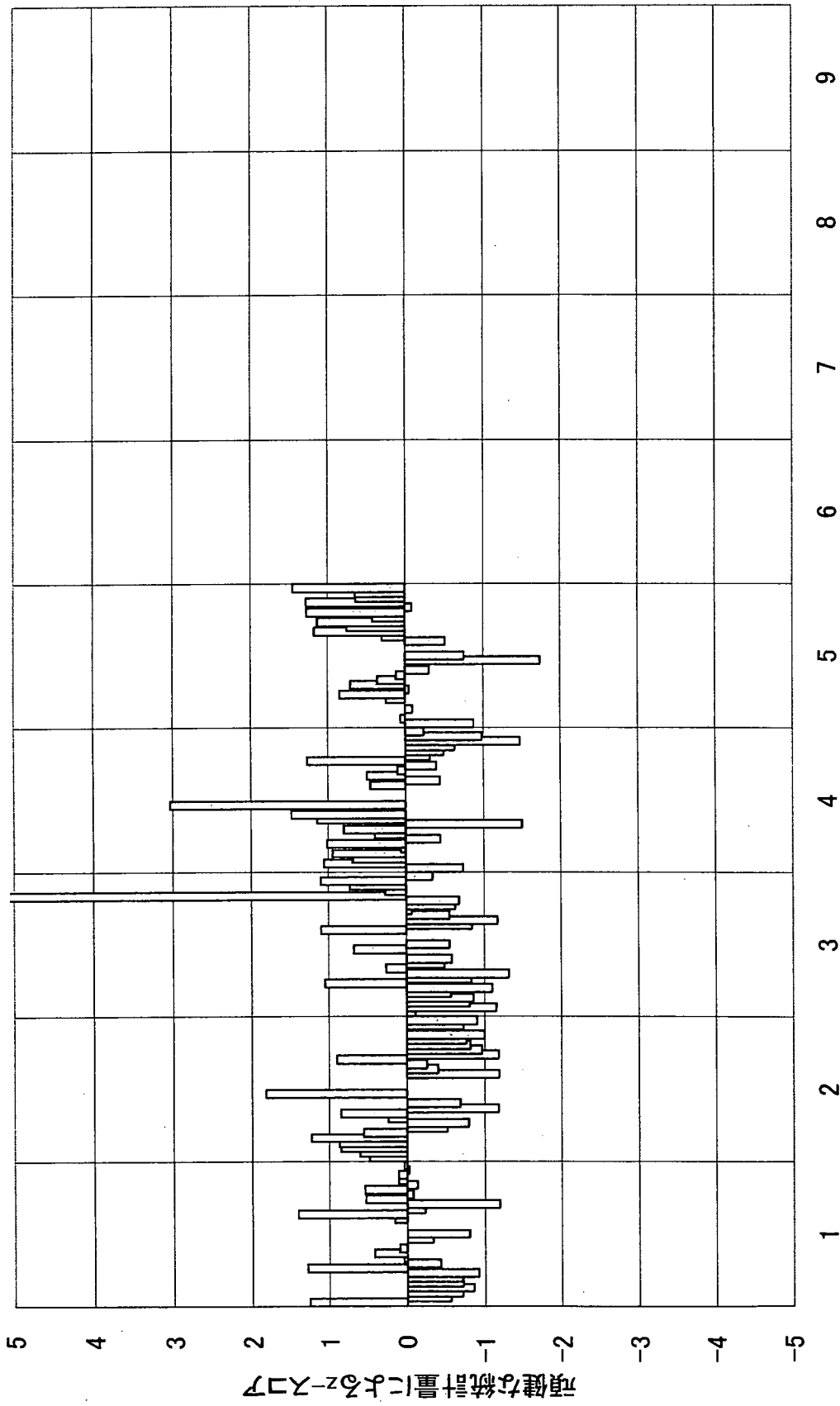


Figure 4 頑健な統計量から計算した各参加機関のzスコア (平成18年)

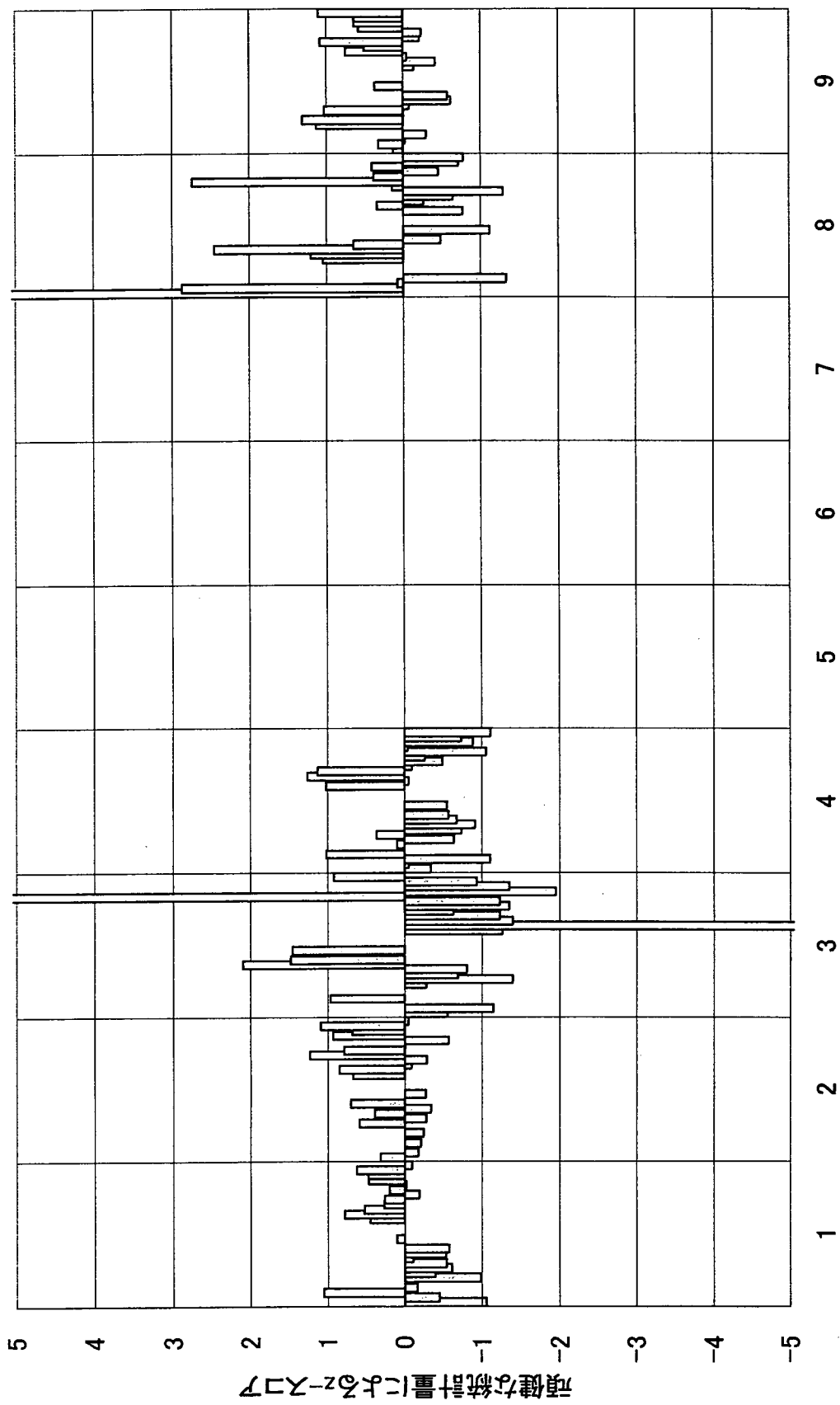


Figure 5 頑健な統計量から計算した各参加機関のz-スコア (平成19年)

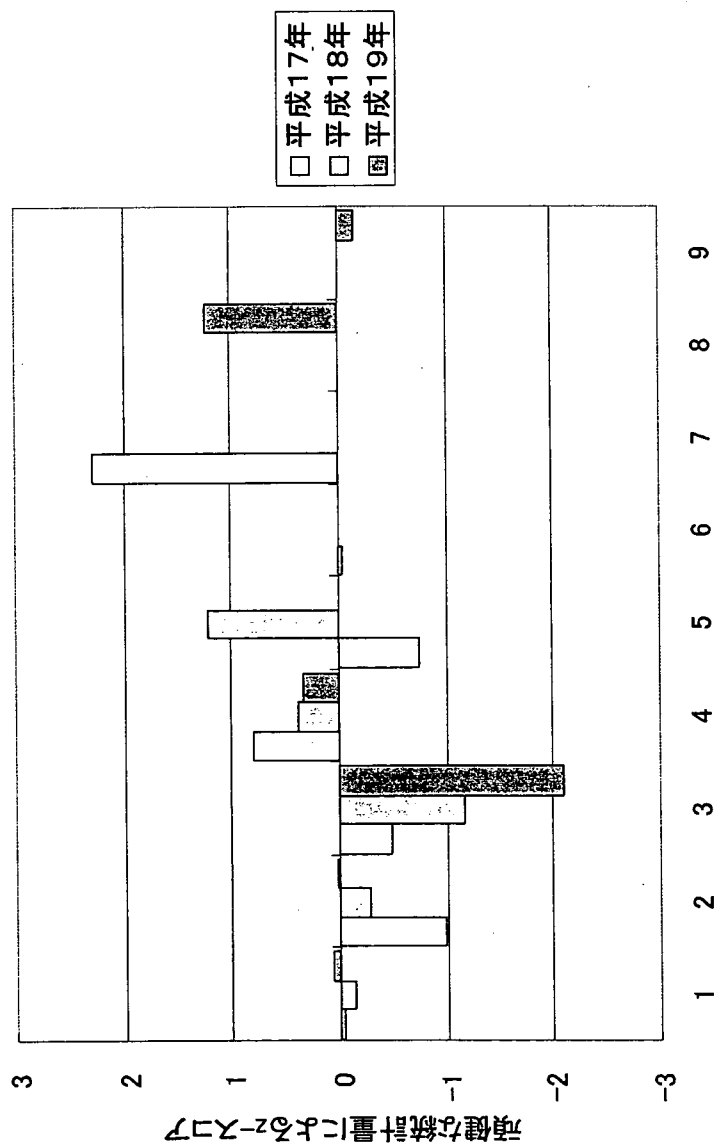


Figure 6 頑健な統計量から計算した各参加機関のTEQのz-スコア

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 19 年度 分担研究報告書

- 1) 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究
- 2) フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究

分担研究者 渡邊 敬浩

平成19年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

組換えDNA技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究

主任研究者 遠藤 明 (財)食品薬品安全センター 理事長

分担研究者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部 主任研究官

研究要旨

安全性審査を終了した組換えDNA技術応用食品を対象とした定量分析法が、厚生労働省により公開されている。本分析法はリアルタイムPCRの原理を応用した検知技術によって構成されており、定量PCR法と呼ばれる。定量PCR法の精度に関しては、分析法に求められる要件としての明確な規定がない。これは、精度に影響を与える主要因の特定も含めた研究が十分に行われていないためであろうと思われる。そこで、まず、リアルタイムPCRにより得られる一義的な測定値である蛍光データを、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション(*GiMlet*)を開発した。さらに、定量PCR法は、絶対検量線を要する相対定量法であるため、機器の性能および精度に加え、検量点の濃度ならびにそのばらつき、およびベースラインの補正方法が分析結果(定量値)に影響を及ぼすと考えられる。そこで、現行の定量PCR法に従い作成された検量線に由来する定量値への影響について、*GiMlet*を用いて検討した。その結果、1)ベースラインの補正方法を検量点の各点に応じ変動させることにより、蛍光強度をより正確に補正することが可能であること、2)不良な結果を算出する機器においては、各wellにおけるPCR効率が均一でない可能性が示唆された。さらに、リアルタイムPCRにより得られる測定値の解析法として指示されているTh. lineの決定を適切に行う事が、より正確な測定値を得るために必要であることが明らかにされた。このように、リアルタイムPCRデータを*GiMlet*により高い自由度をもって解析することで、分析法の精度に関する運用管理上重要な知見が得られ、作業手順の見直しや試薬の管理、また得られた定量値の正当性を主張することが可能になると考えられた。

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 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部 食品部第三室長

A. 研究目的

リアルタイムPCRは、遺伝子の発現量解析、微生物や組換えDNA技術応用食品の分析等、幅広い分野において近年活発に用いられるようになった技術である。本技術は、DNAの酵素(DNA polymerase)による複製、つまりは生化学反応を基本原理としていることから、生化学的分析法に分類される。物理化学の原理に基づく理化学分析法に比べると、開発、運用され始めてからの期間が短いため、信頼性確保の研究事例はわずかである。一方で、厚生労働省ならびに農林水産省の両省により、組換え

学反応を基本原理としていることから、生化学的分析法に分類される。物理化学の原理に基づく理化学分析法に比べると、開発、運用され始めてからの期間が短いため、信頼性確保の研究事例はわずかである。一方で、厚生労働省ならびに農林水産省の両省により、組換え

DNA 技術応用食品を対象とした公定分析法としてリアルタイム PCR を応用した定量 PCR 法が公開され、すでに運用されている事実を照らせば、早急に信頼性確保に資する研究がなされるべきである。

リアルタイム PCR は、特定領域の DNA 配列が PCR により増幅されるのに伴い、これに相補鎖を形成するオリゴヌクレオチド(プローブ)が分解されるために生じる蛍光を経時的に計測することを基本原理としている。組換え DNA 技術応用食品の分析法に採用されている定量 PCR 法では、まず、蛍光が生じた場合には、Ct 値が得られる。リアルタイム PCR により生じる蛍光には 2 種類があり、1 種は特定の DNA 配列の増幅に対応して強度が増加する reporter 色素由来の蛍光であり、もう 1 種は試験区(well)間の位置効果の補正に使用される reference 色素由来の蛍光である。Ct 値とは、reporter 色素由来の蛍光値を reference 色素の蛍光値によって除した値(Rn 値)をベースライン補正して得られる値(ΔRn 値)の経時的変動を、縦軸を ΔRn 値、横軸を PCR のサイクル数として示した amplification plot curve 上で、目的の ΔRn 値(threshold line; Th. line として規定)に達したサイクル数を意味する。さらに、定量 PCR 法では、得られた Ct 値を標準プラスミド DNA により作成されたコピー数と Ct 値の関係を表す検量線に内挿する。標準プラスミド DNA の量はコピー数として規定されているため、試験区から得られた Ct 値はコピー数に変換される(最終的な組換え DNA 技術応用食品の含有率は本コピー数に基づく算術によって求められる)。

このように、定量 PCR 法においては、一義的な測定値が複数の変換を経た後に最終的な分析結果(定量値)として

取り扱われる。また、その変換は、機器に付属のソフトウェアによってされるため、精度に影響を与える要因の特定が困難であり、また、ソフトウェア上の制限により適切な解析に不都合を生じる場合があることも考えられる。

本研究においては、定量 PCR 法により得られる定量値の精度の評価やそれに影響を与える要因を特定することを目的とし、リアルタイム PCR により得られる蛍光データを、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション(*GiMlet*)を開発した。さらに、本アプリケーションを用い、実験計画に基づき実際に採取した検量線データおよび、平成 17 年度に厚生労働省により実施された組換え DNA 技術応用食品検査外部精度管理調査において参加機関から報告された検量線データを解析することにより、分析法のうち検量点の濃度および測定値解析法に含まれる誤差要因について検討した。

B. 研究方法

B-1. *GiMlet* の開発

リアルタイム PCR データ解析用アプリケーション(*GiMlet*)は、汎用性を考慮し、Microsoft 社製 Excel 上で実行可能なマクロとして開発した。本アプリケーションは、食安発第 0629002 号 3.1.2 項に指定されている、定量 PCR 法を実施可能な定量 PCR 機器のうち、ABI 社製、ABI PRISM 7000、7500、7700、7900HT によりエクスポートされる測定データ(multi component data)を解析対象としている。*GiMlet* の主な機能は、以下の通り。

- I. multi component を基本データとした Rn 値、 ΔRn 値の算出
- II. Rn 値の描画
- III. ΔRn 値を基本データとした増幅曲線(amplification curve)の描画

IV. Th. line の自動変更(最適 Th. line 決定支援)

V. Th. line の自動変更に伴った検量線から求められる PCR 増幅効率および増幅効率変動率の算出と描画

VI. 任意の Th. line 入力値に対する PCR 増幅効率(well)の算出

VII. 適切な base line 補正

VIII. 任意の Th. line 値に対する Ct 値の算出

IX. 検量線に照らしての測定値(コピー数)算出

X. Ct 値、コピー数および PCR 増幅効率の平均値、標準偏差、相対標準偏差の算出

B-2. 定量 PCR 法

食安発第 0629002 号 3.1.2 項に記載された定量 PCR 法に準拠し、検量線用標準プラスミドより得られるダイズ内在性遺伝子 (*Le1*) および遺伝子組換えダイズ(RRS)特異的 DNA 配列を測定した。すなわち、*Le1* あるいは RRS オリゴヌクレオチドセットにより、GM ダイズプラスミドセット-ColE1/TE (0、20、125、1,500、20,000、250,000 コピーの濃度に調製された 6 点の検量点を含む)を対象とした定量 PCR を実施した。

定量 PCR 機器としては、ABI PRISM 7500、7700、7900HT を使用した。

B-3. 実験計画

定量 PCR 機器の精度を評価する一つの手法として、計測されるプレート上の well の位置による測定値への影響を検討する場合には、GM ダイズプラスミドセット-ColE1/TE に含まれる 1,500 コピーの濃度に調製された検量点用プラスミドを使用した。1回の測定により、1プレート上に存在する全ての well(96 well)から測定値が得られるよう、試験を行った。また、試薬調製や分注の方法、異なる試験者による測定値への影響を避ける目

的から、全ての測定は一試験者が実施し、試薬調製手順を規定し一括調製した上で multi-channel ピペットを用いて分注した。測定は、1つの定量 PCR 機器当たり 4 回繰り返した。

検量点の濃度(コピー数)および測定値解析法に含まれる要因について検討する場合には、1プレート当たり 5 本の検量線が作成できるように計画した。この際にも、全ての測定は一試験者が実施し、試薬調製手順を規定し一括調製した。測定は、1つの定量 PCR 機器当たり 3 回繰り返した。実験計画の概略を Fig.1 に示す。

B-4. 精度管理データの採取

平成 17 年度に厚生労働省により実施された、組換え DNA 技術応用食品検査外部精度管理調査において参加機関から報告された検量線データを、定量 PCR の機種別に抽出し採取した。具体的には、当該調査で各参加機関から報告された、トウモロコシ内在性遺伝子 (*SSI1b*)を対象とした検量線データの内、3 点の検量点(20、1,500、250,000 コピー)を対象に得られた 4 回繰り返し測定データを ABI PRISM7700、7900HT およびそれ以外(7900HT-384、7000)の機種別に採取した。

B-5. 測定データの解析

ベースライン補正ならびに Th. line の各パラメーターを *GiMlet* 上で変動させ解析し、その結果を、Ct 値あるいはその変換値であるコピー数、または規定のコピー数に対する bias として示した。

C. D. 研究結果および考察

C. D. -1. 定量 PCR 機器の精度

定量 PCR 機器により得られる測定値の精度が良好でなければ、それに基づき算出される組換え DNA 技術応用食品の定量値のばらつきの根本的な原因と

なる。また、定量 PCR では、96 well プレートに分析試料を含む反応試薬を分注し、これを PCR により増幅しながら、増幅に伴い生じる蛍光を測定する。この際、96 well プレート上の well の位置に依らず均等な増幅反応と蛍光の測定が行われることが、定量 PCR 機器により得られる測定値の精度を良好に保つ上での前提となる。そこで、RRS を対象とした定量 PCR 法を一例に、規定量の測定試料をプレートの全ての well で同時に測定し、得られる測定値のばらつきを評価した。具体的には、GM ダイズプラスミドセット-CoIE1/TE に含まれる 1,500 コピーの濃度に調製された検量線用プラスミドを測定試料とし、ダイズ内在性遺伝子 (*Le1*) ならびに RRS 特異的 DNA 配列をそれぞれ 4 回繰り返し測定した。測定結果は、Ct 値ならびに、amplification plot curve の傾きに基づき算出した PCR 効率 (m) として示した。また、Ct 値を別途作成した検量線に内挿することで変換したコピー数についても示した。なお、Ct 値の算出の際、Th. line は全ての解析を通じて 0.128 とした。

その結果、ABI PRISM 7500 を定量 PCR 機器に用いた場合には、*Le1* ならびに RRS 特異的 DNA 配列の測定に共通して、Ct 値の大きさに 12 well を 1 サイクルとした周期性が認められた (Fig.2A、Fig.3A)。周期幅が 96 well プレート長辺の well 数 (12) に一致し、ABI PRISM 7500 の蛍光検出の仕様が、プレート全体を一括して非駆動型の CCD カメラによって検出するものであるため、蛍光検出に関する機器の仕様を反映した結果だと考えられた。ABI 7700 に関しては、*Le1* を測定した場合に、well 番号の始まりと終わり、96 well プレートで言い換えるとプレート短辺の両端から得られる Ct 値が小さくなる結果 (グラフとしては well 番

号 45 付近を頂点とした弓状) が得られた (Fig.2B)。ABI 7700 は、各 well にファイバーをのぼし、このファイバーを通じて蛍光を検出する仕様となっているため、蛍光検出が Ct 値変動の原因にはなりにくいと考えられる (蛍光検出後の回折等が影響した可能性は考えられるが)。一方で、PCR の温度制御を行うサーマルサイクラーは、クーラントを使用し、また温度制御は、設定温度と実測温度との間に一定の幅を持たせた仕様となっている。このため、サーマルサイクラー部の温度制御の特性を反映した結果だと考えられた。

PCR 効率 (m) については、原理的に達成される最大効率の 2.0 に対し、ABI PRISM 7500 を用いて *Le1* を測定した場合には約 1.8 と最小であり、それ以外については、測定の異常によると考えられる well を除き約 2.0 となった。*GiMlet* を用いた解析により得られた PCR 効率が 2.0 を中心としたばらつきをもった値であることは、本アプリケーションに組み込まれた算出のアルゴリズムが正しく機能した結果である。また、ABI PRISM 7500 を用いた *Le1* コピー数の測定のように (Fig.2D)、96 全ての well を通じて、また繰り返し測定して常に PCR 効率が 2.0 を明らかに下回っていると判断されたならば、これを目安として反応系を改良することも考えられる。一方で 2.0 を大きく超える PCR 効率が算出された well では、PCR により増幅された DNA 断片の量を正確に反映していない強度の蛍光が生じているか、蛍光の検出異常が推測される。また、特定の well から理論値との差異が大きな PCR 効率が繰り返し得られる場合には、特にリアルタイム PCR 機器に含まれるサーマルサイクラーや蛍光検出部の異常が疑われる。

組換え DNA 技術応用食品の分析に

おける最終的な分析結果は、Ct 値を検量線に内挿し、変換することで得られるコピー数に基づく定量値である。そこで、これまでに検討した Ct 値のばらつきをコピー数のばらつきとして評価した。Fig.4 ならびに Fig.5 にその代表例を示したが、Ct 値に対する解析結果と同様に、ABI PRISM 7500 では well 間のばらつきが大きく、最大値と最小値の差は 550 コピーほどであった。また *LeI* を ABI PRISM 7700 を用いて測定した場合に観察された Ct 値の変動についても、プレートの中心部でのコピー数が低いという結果に反映されており、最大値と最小値の差は 500 コピーほどであった。なお、ABI PRISM 7900HT により RRS 特異的 DNA 配列を測定した場合に、well 間のコピー数のばらつきは最小となり、コピー数の最大値と最小値の差は 200 コピーほどであった。また、Fig.4 あるいは Fig.5 に示した結果の機器間比較を通じて、等量の検量線プラスミドを測定した場合にも、測定機器が異なることにより得られるコピー数に差が生じることが明確に示された。本研究では、機器ごとに検量線を作成し、該当する Ct 値を内挿することでコピー数に変換した。それでもなお、機器間でコピー数に差が生じた結果は、検量線の傾きやばらつきが各機器により異なることを意味しており、定量値に対する影響については、検量線の信頼区間の推定といった今後の検討により、明らかにすべき課題である。

機器の性能あるいは仕様が原因となり、well 間で測定値が変動する可能性について言及した。また、反応系と定量 PCR 機器の組み合わせによっては、PCR 効率が理論値を明らかに下回る場合があることおよび、特定の well において理論値との大きな差異が観察された場合には、PCR あるいは蛍光検出の異常が

疑われることについて言及した。しかし現状では、得られた測定値の大きさやそのばらつきが、機器の仕様に起因する変動の幅に含まれているのか、含まれず異常な値であるのかを判断するための基準がない。また、定量 PCR 法に使用される反応系の改良についても同様である。今後、最終的な分析結果である定量値に許容される不確かさの検討とあわせ、明確な基準を設定することにより、定量 PCR 機器の管理手法の一つとして、内部精度管理等に役立てられることが期待される。

C. D. -2. ベースライン補正方法の検討

Ct 値を得るまでの解析手順には、reporter 色素由来の蛍光値を reference 色素の蛍光値によって除した値 (Rn 値) をベースライン補正することが含まれている。また、定量 PCR 法では、どのような Rn 値が得られた場合にも、一定の条件で作成されたベースラインによって全ての well から得られた値を一様に補正することが指示されている。これは機器付属のソフトウェア上の制限によるものであると考えられ、本来的には、反応や測定が進行するに従って、ベースラインが変動する可能性も考えられることから、得られた Rn 値の大きさを指標として補正に使用するベースラインを変更すべきと考える。*GiMlet* には、各 well から得られた Rn 値の大きさに応じてベースライン作成に使用するデータの採取内容を変更し、独立して補正するためのアルゴリズムを組み入れた。Fig.3 に示したデータを一例とし、本アルゴリズムにより解析した結果を Fig.6 に示した。ABI PRISM 7700 により測定された Ct 値は、定量 PCR 法に規定されたベースライン補正を行った場合には、同一の well であっても繰り返し測定間での Ct 値に明らかな差が認められた (Fig.3) のに対し、アルゴリ

ズムを使用して再解析することにより、その差が小さくなった (Fig.6)。この結果は、繰り返し測定間でベースラインが変動しており、新たなベースライン補正方法によりその変動の影響が解消あるいは軽減されていることを示唆している。また、他の定量 PCR 機器により得られた測定値についても、若干ではあるが、Ct 値のばらつきが小さくなっている (Fig.6)。このように、ベースライン補正の方法を変更することによって、得られる測定値の精度が向上する可能性が示された。

C. D. -3. 検量点および Th. line 解析条件が測定値の精度に与える影響

食安発第 0629002 号により通知されている組換え DNA 技術応用食品を対象とした定量 PCR 法では、0、20、125、1,500、20,000、250,000 コピーの濃度に調製された 6 点の検量点から検量線を作成し、これに被検査試料から得られた Ct 値を内挿してコピー数に変換する。また、Ct 値を得るためには、横軸をサイクル数として ΔRn 値をプロットした amplification plot curve に対して「 ΔRn 値が指数関数的に増加している領域に Th. line を引く」事が規定されている。これは、Ct 値が amplification plot curve と Th. line との交点として得られ、「 ΔRn 値が指数関数的に増幅している領域」つまりは、PCR 効率 (実際には検出される蛍光強度の増加率) が安定し、増幅対象となった DNA 配列の初期量が正確に反映されているサイクル数を Ct 値としているためである。従って、Th. line の設定に当たっては、DNA 配列の初期量を真度よく推定するために、「 ΔRn 値が指数関数的に増幅している領域」をどのように決定するかが重要である。また、Th. line 設定の方法を規定した上で、各検量点から得られる測定値のばらつきを明らかにすることが、検量線の信頼区間の

推定、ひいては検量線に内挿することで得られる被検査試料のコピー数の不確かさを推定する上で必要である。

そこで、一試験室一試験者により検量線用標準プラスミドの繰り返し測定を行い、得られたデータを Th. line 値を変動させて解析することで、Th. line 値が測定値の真度とばらつきに与える影響について検討した。結果には、各検量点に規定されたコピー数を真値とし、真値と解析の結果得られた測定値 (コピー数) との bias (%) を算出し、bias の大きさを区分とした頻度をヒストグラムに示した。なお、Ct 値をコピー数に変換する際には、変換する検量点を含む検量線をまず作成し、これに解析対象にする Ct 値を内挿した。その結果、1,500 コピー以上のプラスミドを含む検量点については、規定コピー数と測定値 (実測コピー数) との bias が、絶対値として 15% 以内となる頻度が高く、特に、ある一定以上の大きさの Th. line 値により解析された場合に、より小さな bias が観測される頻度が高くなった (Fig.7)。また、ある一定以上に大きな Th. line 値により解析した結果を検量点間で比較した結果、高コピー数の検量点ほど、特定の bias が観測される頻度が高くなり、これは実測コピー数のばらつきが小さくなることを意味している。つまり、高コピー数のプラスミドから得られる測定値ほどばらつかず、また不適切な Th. line 値の設定が、定量値のばらつきを大きくする要因の一つであることが明らかになった。一方、20 ならびに 125 コピー、特に 20 コピーのプラスミドを含む検量点に顕著であるが、bias は一様に分布しており、高コピー数を含む検量点のように規定コピー数を中心とした分布は見られなかった。また、Th. line 値と特定の大きさの bias が観測される頻度との相関は、検量点に含まれるコピー数が少ないほど

弱かった。これらの結果から、20あるいは125コピーのプラスミドを含む検量点には、測定対象物質が少量であるために生じる原理的なばらつきが含まれており、解析条件の最適化等によって除くことができないことが明らかになった。低コピー数のプラスミドは、連続量ではなく離散量として考えられるべき測定量であり、試薬溶液中での分布は、ポアソン分布あるいは二項分布に従うため、そこから分取され、定量 PCR の反応系に加えられたプラスミドの数は、当該分布に従ってばらつき、結果として、得られる測定値のばらつきは大きくなり、頻度の分布は一様になるのではないかと考えられる。

さらに、外部精度管理調査において報告された検量線データを、定量 PCR の機種別に抽出し、上記と同様に解析した結果を、Fig.8 から 10 に示した。その結果、検量点に含まれるプラスミドのコピー数に依存したばらつきや、測定値のばらつきが小さくなる Th. line 値については、一試験室一試験者により実施した試験の結果に一致した解析結果が得られた。また、適切な Th. line 値を設定しても、なお測定値のばらつきが小さくならないなど、試験室間データの特性も明らかになった。最適な Th. line 値が設定され、多数の機関での bias が最小となる解析条件でなお、大きな bias を示す機関については、試験法の運用に問題があることが疑われる。このように、本解析法を用いることにより、技能試験上有益な指摘を行える可能性についても示された。

本研究により、Th. line 値が、測定値のばらつきに影響を与える要因の一つであることが明確に示されが、どのような値に設定すべきかについては、一般化して示すことができない。これは、使用する定量系（プライマーならびにプローブ）、試薬、定量 PCR 機器により、その最適値が

変動すると考えられるためである。最適な Th. line 値に関しては、各試験者が検量線作成時に本研究で行われたような解析を実施し、規定コピー数を目安にするなどして、用時設定すべきと考える。また、低コピー数のプラスミドを含む検量点を検量線の作成に使用することで、当該検量点に含まれる原理的なばらつきにより、検量線が不正確となり、結果、測定値の真度を下げる結果につながりかねない。今後、検量線の信頼区間等の検討を通じて定量値への影響を明確にすることにより、検量点として規定すべき最小コピー数について明らかにすべきと考える。

E. 結論

リアルタイム PCR により得られる一義的な測定量である蛍光データを、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション (*GiMlet*) を開発した。組換え DNA 技術応用食品を対象とした定量 PCR 法により得られる蛍光データを *GiMlet* により解析した結果、使用する定量 PCR 機器の性能あるいは仕様が原因となり、well 間で測定値が変動する可能性が示された。今後、機器の上を判定するための基準を明確にする事によって、定量 PCR 機器の管理手法の一つとして、内部精度管理等に役立てられることが期待される。

また、Ct 値を取得する際に設定される Th. line 値が測定値にばらつきを生じる一要因であり、適切な値を設定すべきであることが示された。さらに、検量線を構成する検量点として、低コピー数のプラスミドを規定した場合、そこに含まれる原理的なばらつきにより、検量線の正確性が損なわれる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

渡邊敬浩:PCRを応用した分析法。

～PCR分析法の要素と性質～ 第20回バイオ
メディカル分析化学シンポジウム (2007年7
月1～2日;東京都)

TAKAHIRO WATANABE, RIEKO MATSUDA,
YUKO SHIRAMASA, HIDEAKI MATSUOKA,
TAKASHI KODAMA, YASUTAKA MINEGISHI,
SATOSHI FUTO, SATOSHI FURUI, KAZUMI
KITTA, TAMIO MAITANI : Examination of
factors related to the uncertainty of the
measurements obtained from real-time PCR
using the newly developed software (GiMlet).
The 121th AOAC INTERNATIONAL Annual
Meeting (2007年9月15～21日;アナハイム)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

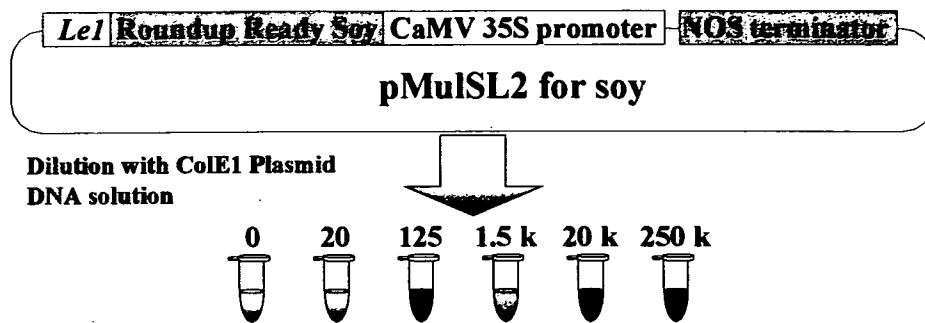
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

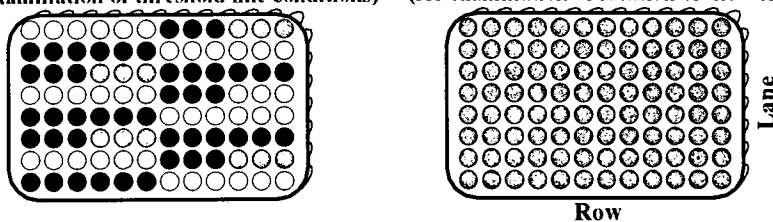


Experimental procedure

To reduce the variances derived from the experimental procedure, all experiments were conducted alone. PCR mixtures were prepared for whole plates at a time and placed in the specified wells with a multi-channel micropipette.

The experiment was repeated three or four times for each instrument.

(for examination of threshold line conditions) (for examination of location of the well)



These figures show the plate design used in the experiment to examine the effects of instruments (location of the well) and threshold line conditions on the variance of the measurements.

Fig. 1 一試験室一試験者による試験の実験計画

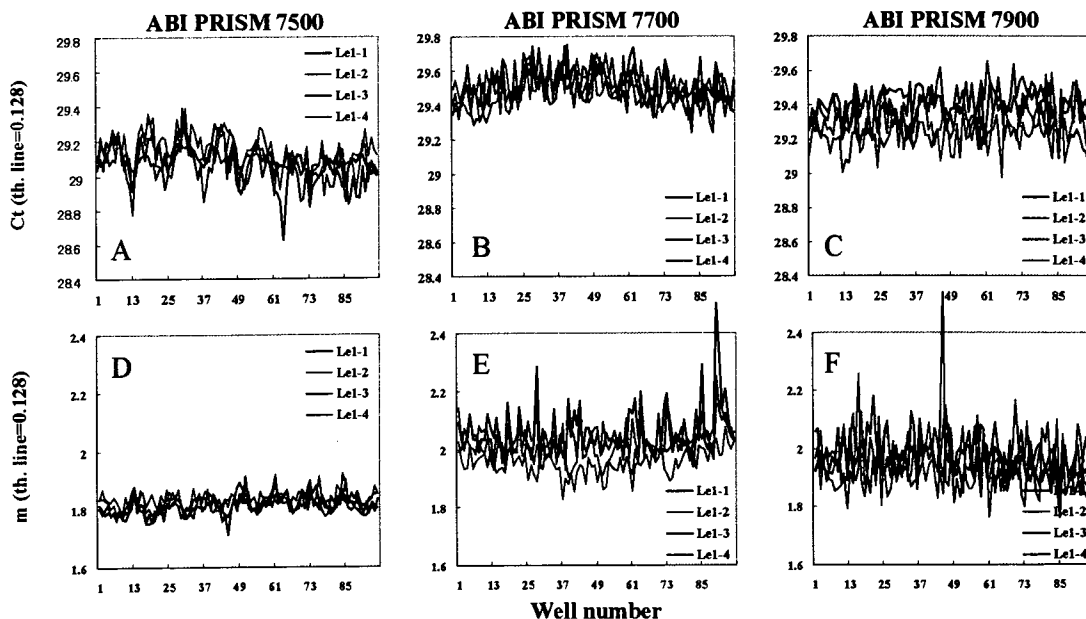


Fig. 2 測定値(Ct値)及びPCR効率のwell間差(Lel)

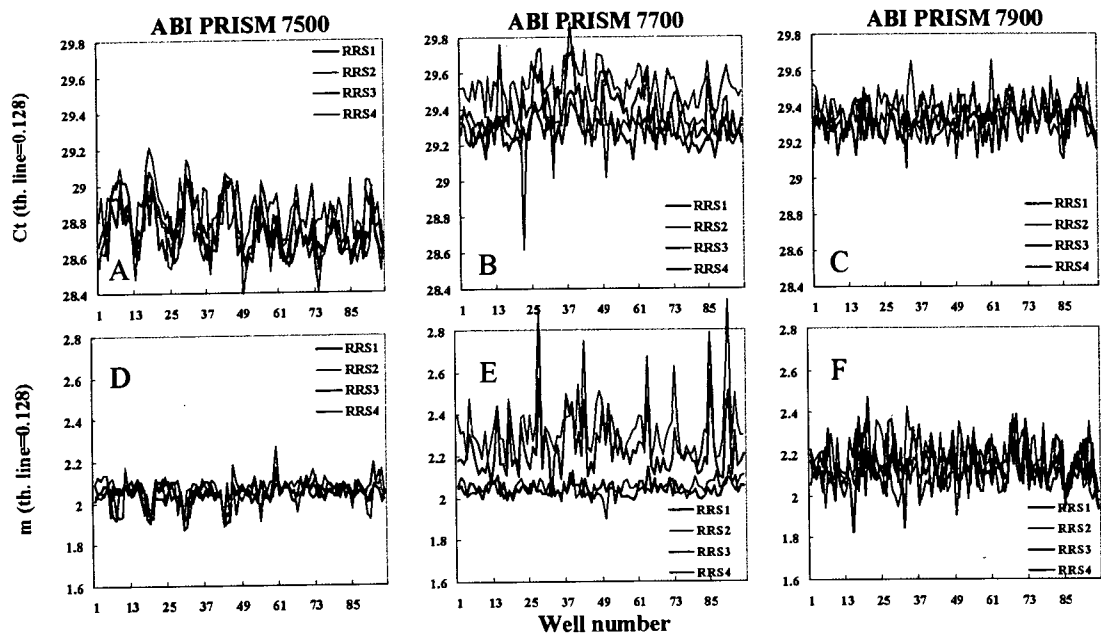


Fig. 3 測定値(Ct値)及びPCR効率のwell間差(RRS)

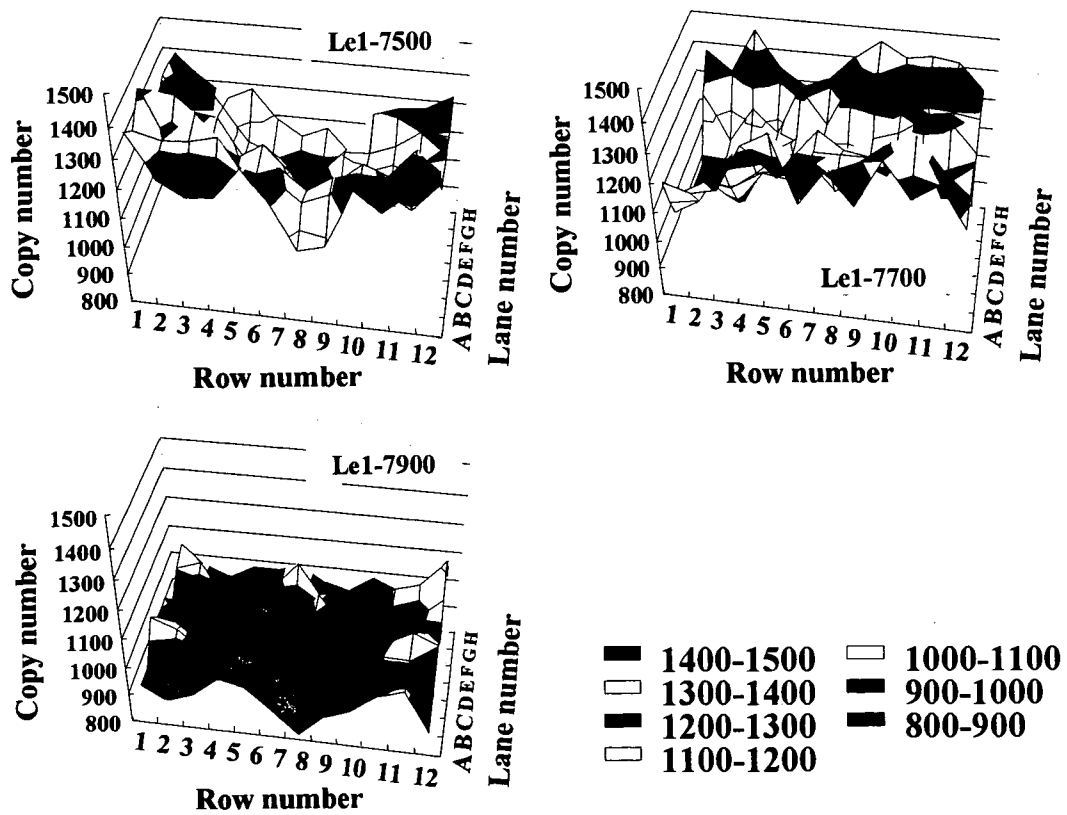


Fig. 4 コピー数のwell間差 (Le1)

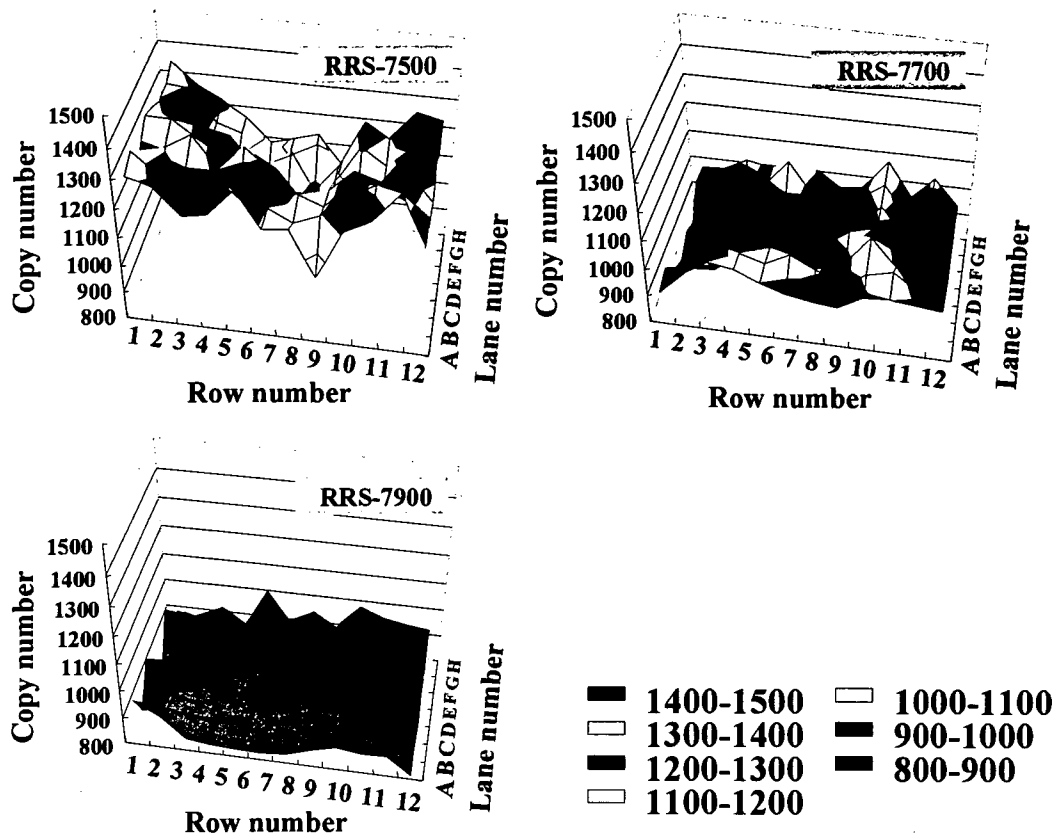


Fig. 5 コピー数のwell間差 (RRS)

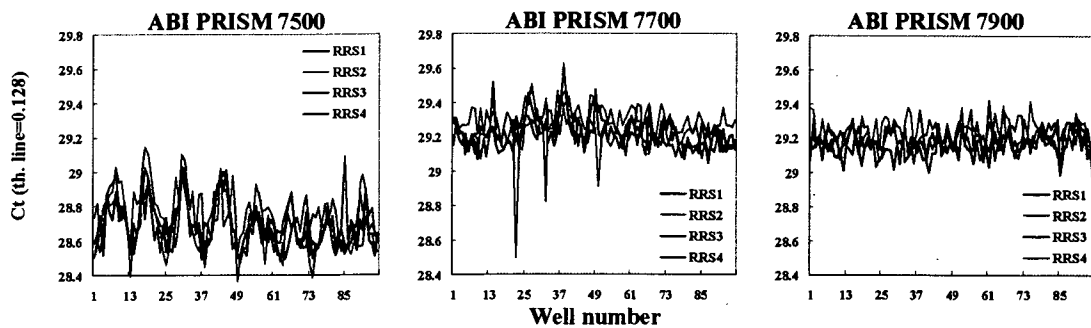


Fig. 6 新規ベースライン補正方法の効果

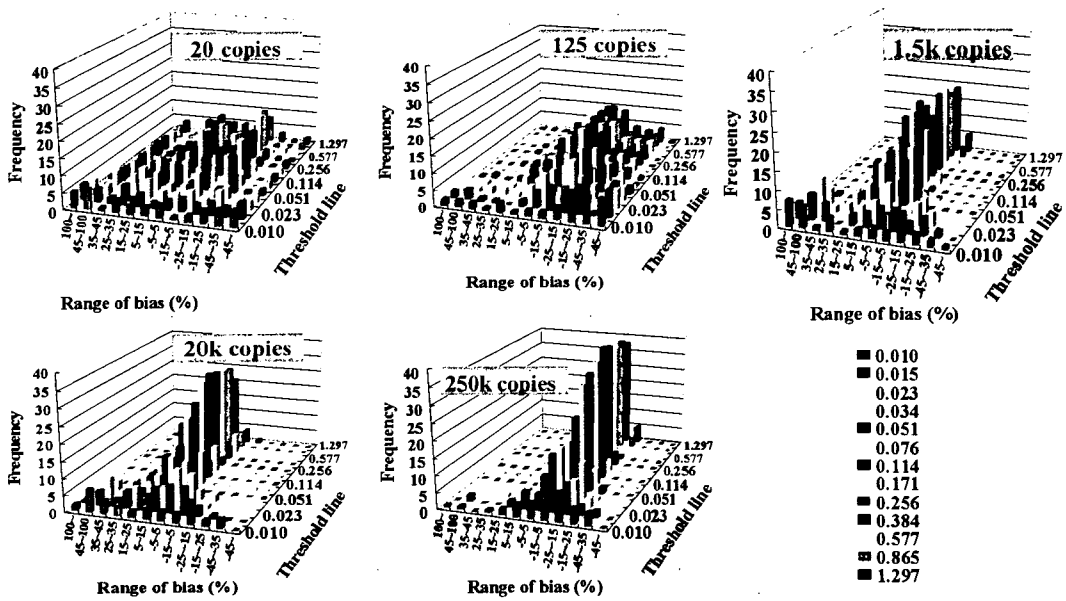


Fig. 7 一試験室一試験者による検量線データの解析

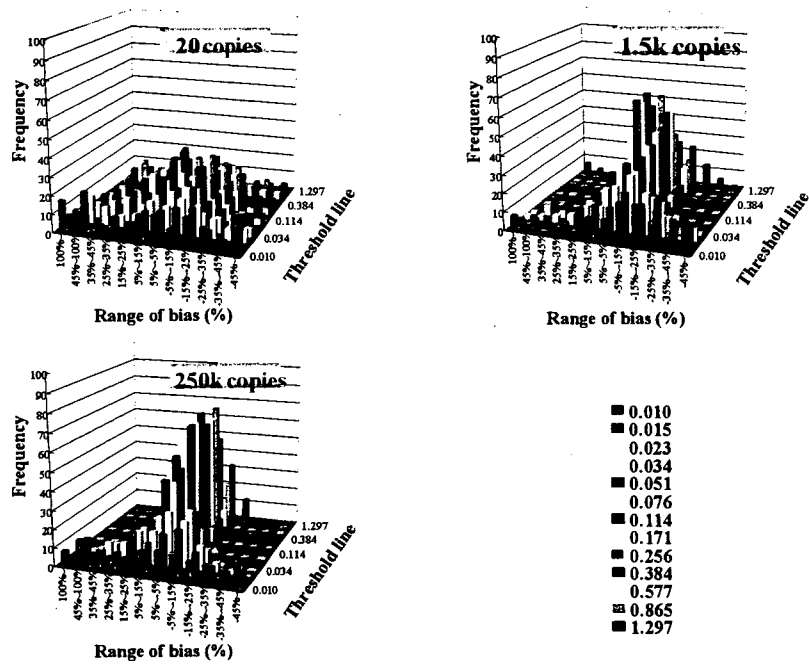


Fig. 8 外部精度管理試験調査により得られた検量線データの解析(ABI PRISM 7900)