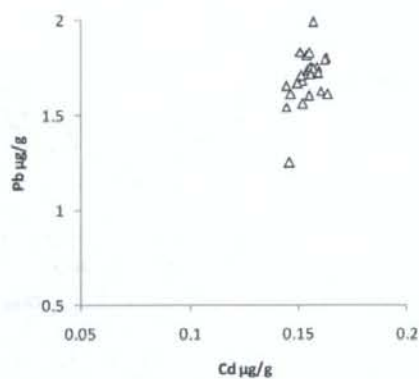
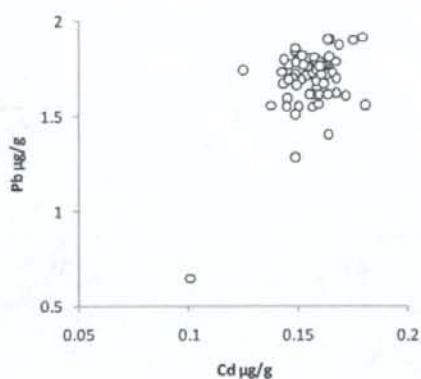


Fig. 4 清涼飲料水中のカドミウムと鉛の測定値

平成18年



平成19年

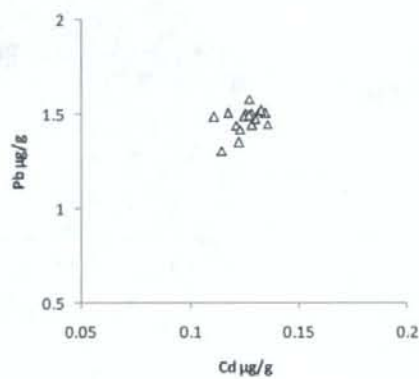
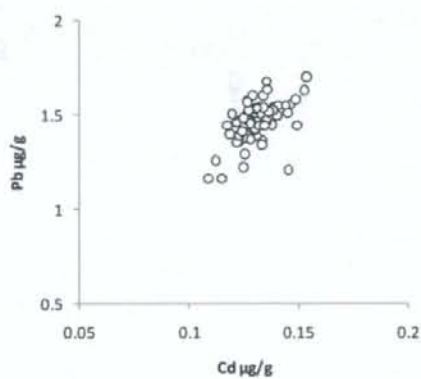


Fig. 4 清涼飲料水中のカドミウムと鉛の測定値 (続き)

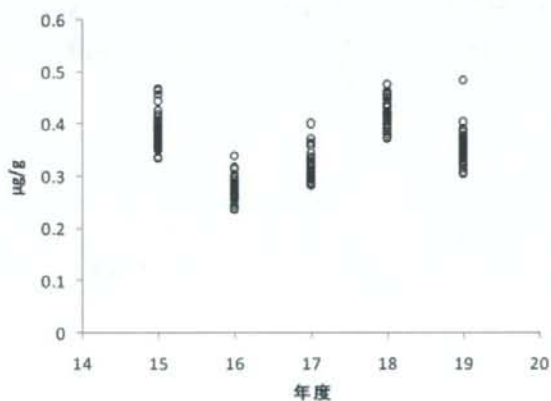
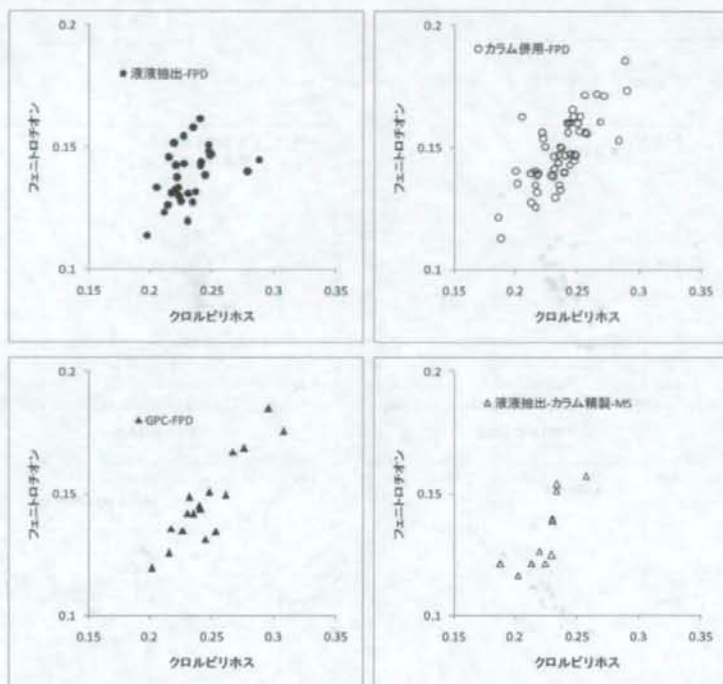


Fig.5 玄米中カドミウムの技能試験結果

平成15年



平成16年

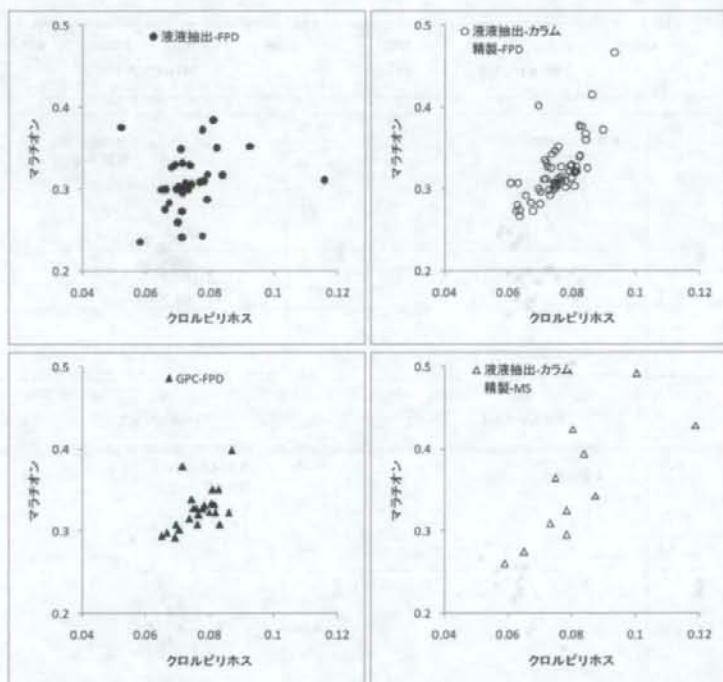
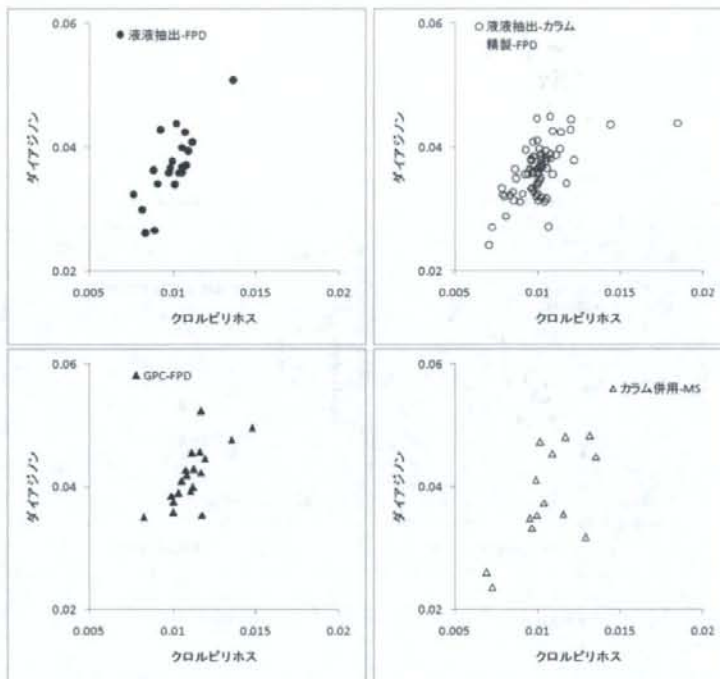


Fig. 6 有機リン系農薬2種の分析結果

平成17年



平成18年

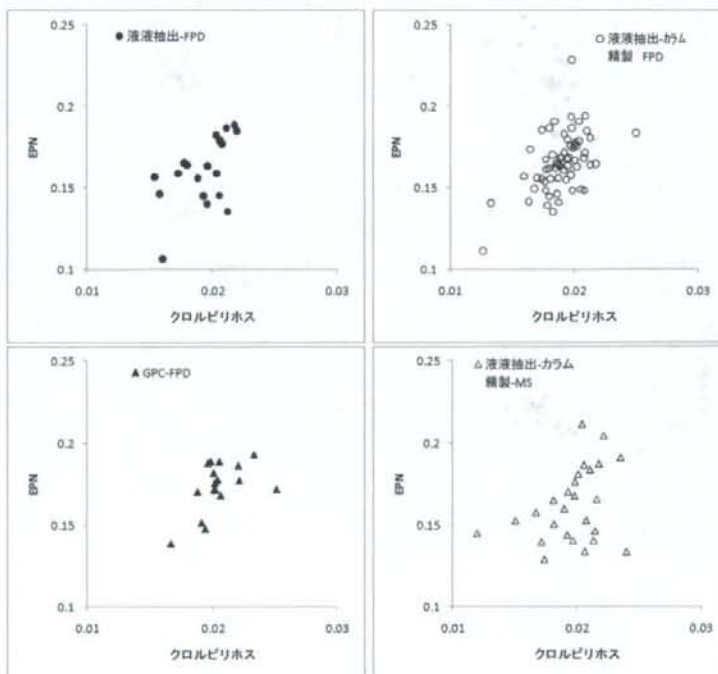


Fig.6 有機リン系農薬2種の分析結果(続き)

平成19年

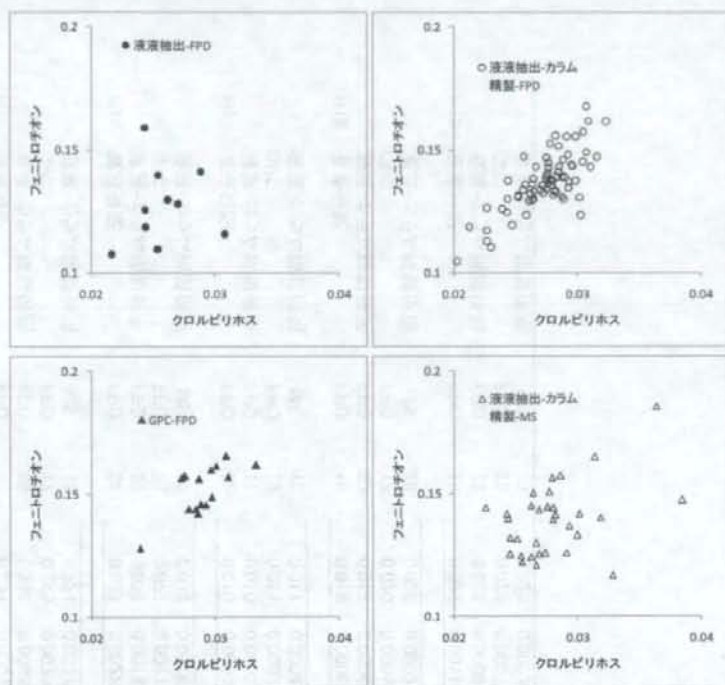


Fig.6 有機リン系農薬2種の分析結果(続き)



Table 7 野菜ペースト中農薬の技能試験結果

年度	前処理	検出器	n	平均	併行精度		空間精度		平均	併行精度		空間精度	
					SD	RSD	SD	RSD		SD	RSD	SD	RSD
H15	液液分配	FPD	30	0.231	0.00586	2.5	0.0166	7.2	0.139	0.00420	3.0	0.0125	9.0
	液液-カラム精製併用	FPD	55	0.235	0.00656	2.8	0.0232	9.8	0.149	0.00448	3.0	0.0160	10.7
	GPC	FPD	17	0.245	0.00709	2.9	0.0281	11.5	0.146	0.00407	2.8	0.0190	13.0
	液液-カラム精製併用	MS	11	0.224	0.00779	3.5	0.0180	8.0	0.134	0.00422	3.2	0.0172	12.9
H16	液液分配	FPD	34	0.073	0.00223	3.0	0.0067	9.1	0.308	0.00876	2.8	0.0352	11.4
	液液-カラム精製併用	FPD	59	0.076	0.00188	2.5	0.0074	9.8	0.317	0.00834	2.6	0.0297	9.4
	GPC	FPD	23	0.077	0.00210	2.7	0.0068	8.9	0.323	0.00784	2.4	0.0226	7.0
	液液-カラム精製併用	MS	12	0.079	0.00167	2.1	0.0149	18.8	0.336	0.00945	2.8	0.0854	25.4
H17	液液分配	FPD	22	0.010	0.00046	4.6	0.0012	11.9	0.037	0.00142	3.9	0.0051	13.8
	液液-カラム精製併用	FPD	71	0.010	0.00037	3.7	0.0010	10.2	0.036	0.00107	3.0	0.0042	11.5
	GPC	FPD	19	0.011	0.00035	3.2	0.0010	9.1	0.042	0.00123	2.9	0.0052	12.4
	液液-カラム精製併用	MS	15	0.011	0.00043	4.0	0.0024	22.2	0.037	0.00110	3.0	0.0100	27.1
H18	液液分配	FPD	19	0.019	0.00061	3.2	0.0023	11.8	0.161	0.00503	3.1	0.0209	13.0
	液液-カラム精製併用	FPD	63	0.019	0.00063	3.3	0.0016	8.6	0.165	0.00565	3.4	0.0177	10.7
	GPC	FPD	17	0.020	0.00056	2.7	0.0015	7.6	0.175	0.00395	2.3	0.0149	8.5
	液液-カラム精製併用	MS	28	0.020	0.00072	3.6	0.0027	13.2	0.165	0.00597	3.6	0.0280	17.0
H19	液液分配	FPD	10	0.026	0.00114	4.3	0.0038	14.2	0.123	0.00448	3.6	0.0217	17.7
	液液-カラム精製併用	FPD	72	0.028	0.00084	3.0	0.0025	8.9	0.137	0.00413	3.0	0.0118	8.6
	GPC	FPD	15	0.029	0.00077	2.6	0.0018	6.0	0.152	0.00369	2.4	0.0103	6.8
	液液-カラム精製併用	MS	33	0.028	0.00093	3.4	0.0029	10.6	0.138	0.00484	3.5	0.0139	10.1

Table 10 技能試験結果から推定した不確かさ

分析対象物	分析法		マトリクス	平均値	空間精度	空間精度 予測値	HorRat	拡張不確かさ		
	前処理	定量							μg/g	RSD%
サッカリンナトリウム	直接測定	HPLC	しょう油	469	5.5	6.3	0.87	11.1		
			シロップ	151	3.3	7.5	0.44	6.6		
			ジャム	60.0	4.2	8.6	0.49	8.5		
	溶媒抽出	HPLC	しょう油	451	9.2	6.4	1.44	18.3		
			シロップ	142	6.2	7.6	0.82	12.4		
			ジャム	57.4	6.1	8.7	0.70	12.2		
	透析	HPLC	しょう油	470	4.7	6.4	0.73	9.3		
			シロップ	149	6.2	7.5	0.83	12.4		
			ジャム	60.9	5.4	8.6	0.63	10.8		
パラオキシ安息香酸 ブチル	水蒸気蒸留	HPLC	清涼飲料水	18.1	7.7	10.3	0.74	15.4		
	直接		清涼飲料水	19.5	4.7	10.2	0.46	9.3		
	溶媒抽出		清涼飲料水	19.8	5.4	10.2	0.53	10.9		
	透析		清涼飲料水	19.1	6.1	10.3	0.59	12.2		
安息香酸	水蒸気蒸留	HPLC	清涼飲料水	176	3.2	7.3	0.43	6.3		
	直接		清涼飲料水	181	2.2	7.3	0.30	4.4		
	溶媒抽出		清涼飲料水	174	5.8	7.4	0.78	11.5		
	透析		清涼飲料水	180	3.1	7.3	0.43	6.3		
鉛	湿式分解-溶媒抽出	フレイム 原子吸光	清涼飲料水	1.71	6.2	14.8	0.42	12.4		
			清涼飲料水	1.58	6.1	14.9	0.41	12.1		
			清涼飲料水	1.40	6.3	15.2	0.42	12.6		
			清涼飲料水	1.72	7.3	14.7	0.49	14.5		
	湿式分解	フレイム 原子吸光	清涼飲料水	1.47	6.5	15.1	0.43	12.9		
			清涼飲料水	1.64	9.5	14.8	0.64	19.0		
			清涼飲料水	1.59	6.7	14.9	0.45	13.5		
			清涼飲料水	1.39	6.2	15.2	0.41	12.5		
			清涼飲料水	1.70	6.7	14.8	0.45	13.3		
			清涼飲料水	1.48	3.8	15.1	0.26	7.7		
			湿式分解-溶媒抽出	フレイム 原子吸光	清涼飲料水	0.179	4.8	20.7	0.23	9.6
					清涼飲料水	0.140	6.6	21.5	0.31	13.2
清涼飲料水	0.147	5.0			21.3	0.24	10.0			
清涼飲料水	0.157	6.1			21.1	0.29	12.2			
清涼飲料水	0.131	6.5			21.7	0.30	12.9			
玄米	0.388	7.5			18.4	0.41	15.0			
カドミウム	湿式分解	フレイム 原子吸光	玄米	0.271	6.6	19.5	0.34	13.2		
			玄米	0.313	7.2	19.0	0.38	14.4		
			玄米	0.419	6.3	18.2	0.35	12.6		
			玄米	0.352	6.5	18.7	0.34	12.9		
			清涼飲料水	0.171	5.6	20.9	0.27	11.2		
			清涼飲料水	0.137	5.3	21.6	0.25	10.6		
湿式分解	フレイム 原子吸光	清涼飲料水	0.144	4.4	21.4	0.21	8.8			
		清涼飲料水	0.154	4.3	21.2	0.20	8.7			
		清涼飲料水	0.126	5.7	21.8	0.26	11.3			
		清涼飲料水								

分析対象物	分析法		マトリクス	平均値	室間精度	室間精度 予測値	HorRat	拡張不確かさ
	前処理	定量						
クロルピリホス	液液分配	GC-FPD	ニンジンペースト	0.231	7.2	19.9	0.36	14.4
			トウモロコシペースト	0.073	9.1	22.0	0.42	18.3
			ホウレンソウペースト	0.010	11.9	22.0	0.54	23.9
			カボチャペースト	0.019	11.8	22.0	0.54	23.7
			カボチャペースト	0.026	14.2	22.0	0.65	28.4
	液液分配+カラム精製	GC-FPD	ニンジンペースト	0.235	9.8	19.9	0.50	19.7
			トウモロコシペースト	0.076	9.8	22.0	0.44	19.6
			ホウレンソウペースト	0.010	10.2	22.0	0.47	20.5
			カボチャペースト	0.019	8.6	22.0	0.39	17.2
			カボチャペースト	0.028	8.9	22.0	0.41	17.8
	液液分配+カラム精製	GC-MS	ニンジンペースト	0.224	8.0	20.0	0.40	16.1
			トウモロコシペースト	0.079	18.8	22.0	0.86	37.6
			ホウレンソウペースト	0.011	22.2	22.0	1.01	44.4
			カボチャペースト	0.020	13.2	22.0	0.60	26.4
			カボチャペースト	0.028	10.6	22.0	0.48	21.2
	GPC	GC-FPD	ニンジンペースト	0.245	11.5	19.8	0.58	22.9
トウモロコシペースト			0.077	8.9	22.0	0.40	17.8	
ホウレンソウペースト			0.011	9.1	22.0	0.41	18.2	
カボチャペースト			0.020	7.6	22.0	0.35	15.2	
カボチャペースト			0.029	6.0	22.0	0.27	12.0	
フェニトロチオン	液液分配	GC-FPD	ニンジンペースト	0.139	9.0	22.0	0.41	18.1
			カボチャペースト	0.123	17.7	22.0	0.80	35.3
	液液分配+カラム精製	GC-FPD	ニンジンペースト	0.149	10.7	22.0	0.49	21.4
			カボチャペースト	0.137	8.6	22.0	0.39	17.3
	液液分配+カラム精製	GC-MS	ニンジンペースト	0.134	12.9	22.0	0.59	25.8
			カボチャペースト	0.138	10.1	22.0	0.46	20.2
GPC	GC-FPD	ニンジンペースト	0.146	13.0	22.0	0.59	26.1	
		カボチャペースト	0.152	6.8	22.0	0.31	13.6	
マラチオン	液液分配	GC-FPD	トウモロコシペースト	0.308	11.4	19.1	0.60	22.8
	液液分配+カラム精製	GC-FPD	トウモロコシペースト	0.317	9.4	19.0	0.49	18.8
	液液分配+カラム精製	GC-MS	トウモロコシペースト	0.336	25.4	18.8	1.35	50.8
	GPC	GC-FPD	トウモロコシペースト	0.323	7.0	19.0	0.37	14.0
ダイアジノン	液液分配	GC-FPD	ホウレンソウペースト	0.037	13.8	22.0	0.63	27.7
	液液分配+カラム精製	GC-FPD	ホウレンソウペースト	0.036	11.5	22.0	0.52	23.0
	液液分配+カラム精製	GC-MS	ホウレンソウペースト	0.037	27.1	22.0	1.23	54.3
	GPC	GC-FPD	ホウレンソウペースト	0.042	12.4	22.0	0.56	24.7
EPN	液液分配	GC-FPD	カボチャペースト	0.161	13.0	22.0	0.59	25.9
	液液分配+カラム精製	GC-FPD	カボチャペースト	0.165	10.7	22.0	0.49	21.4
	液液分配+カラム精製	GC-MS	カボチャペースト	0.165	17.0	22.0	0.77	34.0
	GPC	GC-FPD	カボチャペースト	0.175	8.5	22.0	0.39	17.0
フルベンダゾール	液液分配+カラム精製	HPLC	凍結鶏卵	0.335	10.6	18.9	0.56	21.2
			鶏卵	0.252	11.0	19.7	0.56	22.0
			液卵	0.210	11.6	22.0	0.53	23.1
			液卵	0.183	11.0	22.0	0.50	21.9
			液卵	0.283	11.4	19.3	0.59	22.8



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）  
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究  
分担研究報告書

生化学的試験法の不確かさの推定

分担研究者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部 第三室長

研究要旨

食品中に含まれる種々の化学物質に基準が定められており、これへの適合を図るにおいて分析（試験）が行われる。分析により得られる測定値は、真値の推定値であるが、これは、用いる分析法の特性や性能に応じた偏り及びばらつきをもつ。これらのパラメーターに基づき「真値の存在する範囲」としての不確かさを推定すること並びに、測定値の信頼性を保証し、ひいては測定値に基づく判断の正当性の根拠とすることが国際的に求められている。

物理化学的原理に基づいた分析法（理化学分析法）は、これまでに蓄積された知見に基づき、不確かさを推定するための方法が複数の国際機関によって考案されている。一方、生化学反応を基本原理とする分析法（生化学的分析法）に関しては、開発及び運用の歴史が浅く、偏りやばらつきに影響を与える因子についても未だ明確にされていない。また、不確かさの推定を試みた報告はない。

本研究では、まず、生化学的分析法の一例として組換え DNA 技術応用食品を対象としたリアルタイム PCR 法を取り上げ、1) 検量線の繰り返し測定、2) 規定濃度の組換え DNA 配列を含む溶液の多重測定を、全国 25 機関の地方衛生研究所等の協力の下、複数種のリアルタイム PCR 機器を用いた共同試験として実施した。共同試験の結果は、リアルタイム PCR データ（第一義的な測定量として得られる蛍光データ）として回収し、本データを高い自由度をもって解析することを目的に開発したアプリケーション（*GiMet*）により種々の条件下で解析した。その結果、人的要因とは別に、リアルタイム PCR 機器の性能や、検量線のデザインが測定値の偏りやばらつきに影響を与える主要因の一つとなっていることが明らかになった。また、その大きさはリアルタイム PCR 機器によって異なっており、機器を個別に考えた場合には推定される不確かさもまた異なると予測された。

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 食品部長

協力研究者 大森清美 神奈川県衛生研究所理化学部 主任研究員

なお、共同試験は下記25の研究機関の協力の下実施した。

愛知県衛生研究所、石川県保健環境センター、岩手県環境保健研究センター、大阪府立公衆衛生研究所、岡山県環境保健センター、香川県環境保健研究センター、神奈川県衛生研究所、川崎市衛生研究所、北九州市環境科学研究所、高知県衛生研究所、京都府保健環境研究所、埼玉県衛生研究所、滋賀県衛生科学センター、仙台市衛生研究所、東京都健康安全研究センター、千葉県衛生研究所、鳥取県衛生環境研究所、長野県環境保全研究所、奈良県保健環境研究センター、福岡市保健環境研究所、福井県衛生環境研究センター、広島県総合技術研究所・保健環境センター、宮城県保健環境センター、山口県環境保健センター、横浜市衛生研究所（あいうえお順）。

## A. 研究目的

食品に含まれる種々の化学物質に基準が定められており、これへの適合を図る目的において分析(試験)が行われる。分析により得られる測定値は、真値の推定値であるが、これは、用いる分析法の特性や性能に応じた偏り及びばらつきをもつ。これらのパラメーターに基づき「真値の存在する範囲」としての不確かさを推定すること並びに、測定値の信頼性を保証し、ひいては測定値に基づく判断の正当性の根拠とすることが国際的に求められている。

農薬等を含む低分子化合物は、ガスクロマトグラフ(GC)あるいは高速液体クロマトグラフ(HPLC)のような物理化学的原理に基づいた分析法(理化学分析法)により主に測定値が得られる。また、理化学分析法に関しては、その長い歴史と経験により蓄積された知見に基づき、分析法のバリデーションデータや内部精度管理データから不確かさを推定する方法も考案されている。理化学分析法に対し、タンパク質や DNA といった生体高分子を主たる標的化合物とし、その基本原理を生化学反応によっている分析法は生化学的分析法と呼ばれる。具体的に言えば、抗原抗体反応を基本原理とする ELISA 法や、DNA ポリメラーゼによる特定の DNA 断片の増幅を基本原理とする polymerase chain reaction(PCR)法が代表例として挙げられる。これら生化学的分析法に関しては、開発及び運用の歴史が浅く、偏りやばらつきに影響を与える因子についても未だ明確にされていない。また、不確かさの推定を試みた報告はない。

我が国においてすでに運用が始められている生化学分析法の代表例としては、組換え DNA 技術応用食品や、特定原材料を対象とする種々の分析法が挙げられる。これら分析法の内、不確かさを推定可能な計量値が得られる分析法は、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リアルタイム PCR 法並びに、当該食品及び特定原材料を対象とした ELISA 法となる。本研究では、生化学分析法の一例として上記リアルタイム PCR 法を取り上げ、測定値の偏りやばらつきに影響を与える因子を明らかにすること及び不確かさの推定を目的とした。

## B. 研究方法

### B-1. リアルタイム PCR データの採取

#### 1) 試薬及び試料

検量線の繰り返し測定には、食安発第 0629002 号 3.1.2 項(以下、通知)に記載された検量線用標準プラスミド溶液・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)を試料として用いた。また、リアルタイム PCR 機器の性能評価の一環として実施した PCR プレートの全てのウェルを用いた多重測定には、上記 GM ダイズプラスミドセットに含まれる検量点の内、1,500 コピー相当になるようバルク調製した全ウェル測定用検液(全ウェル検液)を試料として用いた。これらの試料はニッポンジーン社の協力の下、同一ロット品として製造・調製した。

上記試料中のダイズ内在性遺伝子(*LeI*)を通知に記載の定量 PCR 法を用いて測定した。そのための試薬として、LeI オリゴヌクレオチドセット(ニッポンジーン社製)、2x universal master mix(ABI 社製)を用いた。これらの試薬についても同一ロット品を用いた。

#### 2) 共同試験

上記試料並びに試薬を用いて、全国 25 の地方衛生研究所等の協力の下、共同試験を実施した。測定に使用するリアルタイム PCR 機器の機種は ABI PRISM 7000, 7500, 7700, 7900HT とした(全て 96 ウェルタイプの PCR プレートを使用。ABI PRISM 7900HT につい



ては 384 ウェルタイプの PCR プレートを用いた測定を一部機関で実施したが、解析用アプリケーション *GIMlet* による解析対象外であったため解析は行わず、また本報告には含めていない。試験期間は平成 20 年 8 月 20 日～9 月末日までのおよそ 40 日間として設定した。試験内容、測定手順、結果の報告方法等を詳細に定め、共同試験プロトコル(別紙；共同試験プロトコル)として配布し、これに従い測定を実施していただいた。以下、共同試験プロトコルに記載した内容の一部を簡略化した上で抜粋する。

なお、共同試験時の測定の失敗等の理由により、最終的に解析したデータ数は 23 機関分である。なお、各データは機関名をコード化した上で管理、解析した。

## 2)-1 試験内容

共同試験では、大きく分けて 2 つの測定を実施した。まず 1 つめは、検量線の繰り返し測定である。本試験では、1 枚の PCR プレート中で通知に準拠した検量線を 5 本作成するための測定を行うものであり、PCR 用試験液を分注するウェルは指定した。2 つめは、全ウェル多重測定である。本試験では、PCR プレートに含まれる全てのウェルを使用して同一の試験液を測定するものであり、そのための試料として全ウェル検液を使用した。

## B-2. リアルタイム PCR データ(蛍光データ)の解析

### 1) 全般事項

リアルタイム PCR により得られる第一義的なデータは、PCR に伴って分解する蛍光標識されたオリゴヌクレオチド(プローブ)由来の蛍光である。通常、この蛍光データは、リアルタイム PCR 機器付属のソフトウェアによって段階的に解析され、最終的には、検量線由来のデータとの比較により、通知・定量 PCR 法に規定されたコピー数に変換される。しかし、上記機器付属のソフトウェアでは、それに組み込まれたアルゴリ

ズムの制約により、十分に適切な解析を行う事ができない場合もあると考えられた。そこで我々が開発したソフトウェア(*GIMlet*)を用いて解析を行い、結果を集計した。なお、*GIMlet* は Microsoft Visual Basic で記述した Microsoft 社製 Excel 上で実行可能なマクロであり、リアルタイム PCR の蛍光データを集積したマルチコンポーネントファイルを解析対象とする。

リアルタイム PCR は、特定の 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蛍光標識された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。リアルタイム PCR で計測される蛍光には 2 種類あり、1 種は特定領域の 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、もう 1 種はウェルの位置による蛍光強度(蛍光値)への影響の補正に使用される reference 色素由来の蛍光である。reporter 色素由来の蛍光値を reference 色素由来の蛍光値によって除した値( $R_n$  値)をベースライン補正することで  $\Delta R_n$  値が得られる。 $\Delta R_n$  値を PCR のサイクル数に対してプロットした amplification curve が、規定した値(threshold line; Th. line として規定)に達したサイクル数が Ct 値である。また、分析対象となる特定 DNA 配列のコピー数と Ct 値の間には、コピー数が大きければ Ct 値は小さくなり、逆にコピー数が小さければ Ct 値は大きくなるという負の相関が成立する。リアルタイム PCR 法では、この相関に基づき、コピー数の対数値と Ct 値との線形関係を利用して検量線が作成され、Ct 値のコピー数への変換が行われる。*GIMlet* にはリアルタイム PCR により得られる蛍光値の解析に関連して、ウェルごとに最適なベースライン補正を行うためのアルゴリズムを組み込んであるが、本研究では使用せず、基本的な解析条件は通知に従った。ただし、Th. Line は、ABI PRISM

7000 については 0.512 を、それ以外の機種については 0.256 を規定の値として解析を行った。

## 2) 検量線データの解析

まず、各機関から報告された検量線データをもとに、試験プロトコルに規定した NTC を除く 5 点濃度の検量点(各検量点ごとに 3 ウェル測定)を一組とし、通知に従い最小自乗法による一次関数を求めることで 5 本分の検量線を作成した。これを 5 点個別検量線とする。また、1 プレート上で測定した同濃度の検量点データの全て(15 ウェル)を併行測定としてとらえ、これらのデータの一組を基にする 1 本の検量線も作成した。これを 5 点多重検量線とする。個別検量線及び多重検量線の傾き、切片、相関係数を表 1-1 にまとめた。さらに 5 点濃度の検量点の内、20 コピーの検量点を除外したうえで同様に作成した検量線(4 点個別検量線及び 4 点多重検量線)の傾き、切片、相関係数を表 1-2 にまとめた。

上記 5 点並びに 4 点の検量点を含むそれぞれ 6 本の検量線に、1 プレート上で測定した同濃度の検量点データ(検量点ごとに 15 ウェル)の平均値を内挿し、推定コピー数に変換した。さらに、検量線の濃度として規定されるコピー数を期待値(actual)として、推定コピー数(estimate)と期待値との比を求めた。

## 3) 全ウェル多重測定データの解析

全ウェル多重測定によって得られたデータのコピー数への変換は、前述の 5 点多重検量線に内挿することで行った。

### C. D. 研究結果および考察

#### C. D. -1. 検量線の繰り返し測定結果

機関ごとに作成した、5 点個別検量線及び多重検量線の傾き、切片、相関係数を Table 1-1 に示した。通知に規定されている検量線の採用基準である「相関係数が 0.990 以上」を条件に全データを評価すると、機関 A と F においてそれぞれ 4 番目に測定された検量

線が条件を満たさないことになる。これらの検量線の相関係数が基準を満たさなかった原因として、20 コピーを測定した 3 ウェル中の 1 ウェルが、残りの 2 ウェルでの測定値と大きく乖離したためであることが判明している。実験操作中のコンタミネーションなど、人的要因も疑われるが乖離の原因は不明である。偶然にも、報告されたデータの検量線が採用基準を満たさない原因も 20 コピーでの測定値のばらつきであったが、原理的にも 20 コピーの測定値のばらつきは大きくなると考えられる。これは、20 コピーといった極少量の測定対象は連続した計量として計測することはできず、計数的に「数える」しかないためである。また、その分布はポアソン分布に従う。そのため、一括調製した反応液を分注して複数回の繰り返し測定を行えば、得られる測定値は分布に従い原理的にばらつく。そこで、この 20 コピーのばらつきが検量線の変動幅(信頼区間)に与える影響について検証するため、各機関から報告された全ての検量線データから 20 コピーの測定結果を除いて 4 点検量線を作成した。その結果、表 1-2 に示したとおり、おおむね全ての検量線の相関係数がより 1 に近くなった。検量線作成に使用する検量点の数が変わっているため、自由度についても考慮しなければ正確ではないが、この結果は 20 コピーの測定値のばらつきが、検量線の信頼区間に及ぼす影響が大きいことをしめす明確な証拠である(特に、前述の機関 A と F の 4 番目に測定された検量線の相関係数はそれぞれ、- 9.30 から -0.997、-0.932 から -1.00 となった)。

検量線の相関係数は最小自乗法における残差から算出される値であるため、測定値のばらつきを評価するための指標としては不十分である。そこで、検量点を 5 点並びに 4 点とした個別及び多重検量線(それぞれ 6 本の検量線)に、1 プレート上で測定した同濃度の検量点データ(検量点ごとに 15 ウ



ェル)の平均値を内挿することで推定コピー数に変換し、検量点に規定したコピー数(期待値; 20, 125, 1500, 20000, 250000 コピー)との比を求めてグラフにプロットした。検量線の傾き、重心、切片による影響を受けるが、理想的な比は、各検量点に共通して1となる。なお、4点検量線を用いて20コピー由来のCt値を変換する場合には、外挿によった。

Fig. 1に、定量PCR機器にABI 7000を用いた5機関の結果をまとめた。Fig. 1-1が5点個別並びに多重検量線、Fig. 1-2が4点個別並びに多重検量線に基づく結果である。他機関に比較して測定値のばらつき、特に20コピー由来のCt値のばらつきが大きかった機関A、C、Dに関しては、20コピー検量点を除いて作成した4点検量線を用いてコピー数に変換することにより、全検量点を通じて推定値と規定値との比のばらつきが小さくなっている。ただし、20コピーの検量点以外にも大きなばらつきの認められた機関Aに関しては(4点多重検量線の相関係数の1からの乖離の程度が機関Eに次いで2番目に大きい)、20コピーを除くことで検量線の信頼区間を狭めてもなお、他の検量点由来のCt値のばらつきを反映し、特に重心がずれた影響だと思われるが、20000コピーでのばらつきが増加している。機関Bの結果は、20コピーを検量点に含めるあるいは含めないことの影響を余り受けていない。これは20コピー由来のCt値のばらつきが他機関に比べて特に小さく、これを除くことが検量線の信頼区間に大きな変化をもたらさなかったためと考えられる。機関Eは、20コピーに限らず全検量点を通じてCt値のばらつきが大きかったため、20コピーの削除による検量線の信頼区間を狭める効果が明確ではない。また、重心のずれを反映して特に20コピーでの推定値と規定値との比が1から大きくずれる結果となった。このように、機関ごとに検量線の信頼区間

の幅また、それに及ぼすCt値のばらつき方が異なっているが、他のリアルタイムPCR機器に比べ、ABI 7000を用いて得られる測定値のばらつきは、総じて大きいということが強く示唆される。この点については、全ウェル多重測定の結果とあわせて後ほど再考察する。

Fig. 2に、定量PCR機器にABI 7500を用いた4機関の結果をまとめた。Fig. 2-1が5点個別並びに多重検量線、Fig. 2-2が4点個別並びに多重検量線に基づく結果である。5点検量線と4点検量線のそれぞれによって変換されたコピー数の推定値と規定値との比のばらつきを比較すると、機関Hを除き、4点検量線で変換した場合のばらつきが全検量点を通じて小さい。7000の場合には、20コピーを削除してもなお、その他の検量点のばらつきが検量線の信頼区間に明らかな影響を与えるほどに大きいことが観察されていた。この点について比較をするならば、7500は7000に比べ、蛍光検出等の機構を含む機器としての精度が高く、極微少のコピーの分布という原理的なばらつき要因を除くことによって、検量線の信頼区間の幅が効果的に狭まり、全検量点を通じてコピー数の推定精度が向上すると推測される。考察から除外した機関Hの結果については、ABI PRISM 7000をリアルタイムPCR機器として用いた機関Bと同様に、全検量点を通じてCt値のばらつきが小さく、同様の考察が可能である。

Fig. 3に、定量PCR機器にABI 7700を用いた2機関の結果をまとめた。Fig. 3-1が5点個別並びに多重検量線、Fig. 3-2が4点個別並びに多重検量線に基づく結果である。5点検量線と4点検量線のそれぞれによって変換されたコピー数のばらつきは、両機関ともに4点検量線で変換した場合に、全検量点を通じて小さくなった。この効果は、特に機関Kの20並びに125コピー検量点で顕著に観察される。機関Jについては、先

述の機関 B 並びに H と同様の考察となる。特に、全検量点を通じて、推定値と規定値の比が 1 を中心として均等に、狭い範囲に分布していることから判断すれば、全 23 機関から報告されたデータのうち最も理想的な計測がされていると考えられた。

Fig. 4 に、定量 PCR 機器に ABI 7900HT を用いた 12 機関の結果をまとめた。Fig. 4-1a 並びに 1b が 5 点個別並びに多重検量線、Fig. 4-2a 並びに b が 4 点個別並びに多重検量線に基づく結果である。本機種を用いた機関が多数であるためまず傾向を述べると、7000 や 7500 に比べ、全検量点を通じ得られる測定値のばらつきは小さいといえる。また、全機関(全機体)を通じてばらつきが小さいため、その効果が ABI 7000 等に比べて明確ではないが、5 点検量線と 4 点検量線のそれぞれによって変換されたコピー数の推定値と規定値との比のばらつきを比較すると、おおむね全機関を通じて 4 点検量線で変換した場合のばらつきが全検量点を通じて小さい。特に、機関 L や S の結果については、ABI 7700 を用いて得られた機関 J の結果に類似しており、全検量点を通じて、推定値と規定値の比が 1 を中心として均等に分布していることがわかる。

平均値が 20 のポアソン分布の 95%信頼区間は 11~29 である。この分布がリアルタイム PCR によって 20 コピー検量点から得られる計測値がばらつく大きな要因であり、原理的なものでもある。さらにこの原理的要因に計測時の要因が加わり、測定値のばらつきの大きさは決定される。全ウェル多重測定データに基づき後ほど考察するが、各機種に機体として計測時のばらつき要因が小さいと考えられるリアルタイム PCR 機器が認められることから(例えば機関 B、H、J、L、S が保有の機体)、これらの機体で達成される精度を、各機種の機器管理における目標値として設定することは、分析値の

信頼性を担保する上で実際のかつ有益であると考えられる。また、そのような状態に管理された機体を用いて、20 コピー検量点溶液の多重測定あるいは、繰り返し測定を行う事により、極微少なコピー数の分布をより良い精度で推定可能と考えられる。

#### C. D. -2. 全ウェル多重測定結果

検量線の繰り返し測定結果に基づき、リアルタイム PCR によって得られる測定値のばらつきの主要因として、20 コピーといった極微少の測定対象物質の分布に起因する原理的な要因と、機器計測時の要因とを指摘した。コピーの分布に起因する測定値のばらつきについては、20 コピーを含まない 4 点検量線の信頼区間の幅がこれを含む 5 点検量線の信頼区間の幅に比べ狭くなり、その結果、コピー数の推定精度の向上が全機種で確認されたことから、原理的要因であることが明確となった。しかし、20 コピーの検量点を削除しても推定コピー数はばらつきをもっており、その程度には、機種ごとに差が認められた。この差が機種による(あるいは機体による)計測時のばらつき要因であると考えられる。この計測に起因するばらつきがどれほどの大きさをもつかについて検証するため、全ウェル多重測定試験を実施した。PCR プレートの全ウェルに、一括調製した全ウェル検液を含む反応液を分注し計測するため、計測時にばらつきの要因が含まれていなければ、基本的に全ウェルを通じて一定の測定値が得られることが期待される。全ウェル検液は、検量点の 1500 コピー相当のコピー数を含むため、20 コピーについて考察したようなポアソン分布に基づく原理的なばらつきは無視することができると考える。なお、通知に規定されている検量線により変換して得られた推定コピー数のばらつきとしても評価するため、Ct 値からコピー数への変換は各機関ごとに作成した 5 点多重検量線によった。各リアルタイム PCR 機器により得られた結果を



Fig. 5~Fig. 8 に示し、全機関の集計結果を Table 2 に示した。

Fig. 5 に、定量 PCR 機器に ABI 7000 を用いた 5 機関の結果をまとめた。一見して明らかのように、機関 A、D、E でのウェル間での Ct 値のばらつきは、機関 B 並びに C に比べて大きい (Fig. 5-1)。また当然の結果ではあるが、5 点多重検量線によって変換した推定コピー数のばらつきも機関 A、D、E で大きかった (Fig. 5-2)。Fig. 5 に示した結果から、機関 D の 24 番ウェルでは、他のウェルに比べ明らかに小さな Ct 値が測定されており、異常値であると判断されたため、このデータを除き、ABI 7000 を使用した各機関のコピー数の平均値、標準偏差 (SD)、相対標準偏差 (RSD)、最大値、最小値およびその差を求め、全機関分の集計結果とともに Table 2 にまとめた。機関 B、C の RSD が 10% 程度であるのに対し、先述の機関 A、D、E の RSD はそれぞれ 29.5、17.9、22.9% となった。コピー数推定値の最大値と最小値の差を見ると、機関 B、C では 1000 コピー未満であるのに対し、機関 A、D、E では約 2000 ~ 2500 コピー程度であった。以上の結果から、機関ごとの Ct 値及び推定コピー数のばらつきの傾向は、Fig. 1-2 に示した 4 点検量線に基づき推定された各検量点の推定コピー数のばらつきと類似していることを指摘することができる (Fig. 5-1)。また、推定コピー数の全機関平均値は 1904.42 であり、RSD は 21.9% であった。

Fig. 6 に、定量 PCR 機器に ABI 7500 を用いた 4 機関の結果をまとめた。Fig. 6-1 に Ct 値を Fig. 6-2 に推定コピー数を示したが、ABI 7000 を用いた一部機関に観察されたような大きさのばらつきはいずれの機関からも観察されなかった。ただし、機関 F の 23 及び 33 番ウェルでは、他のウェルに比べて明らかに大きなあるいは小さな Ct 値が測定されており、異常値であることが疑われるが、測定の偶然であるか機器の異常である

かは繰り返し測定により確認し、判断の上対処する必要がある。また、機関 I の結果に顕著であるが、ウェルの位置に応じて計測される Ct 値が周期性をもって変動する傾向が認められる。これは、国立衛研で実施した同実験計画に従った繰り返し測定の結果からも強く示唆されるが、変動周期が 96 ウェルプレート長辺のウェル数 (12) に一致しており、ABI PRISM 7500 では各ウェルからの蛍光を非駆動型の CCD カメラによりプレート全体として一括して検出することから、この Ct 値の変動は蛍光検出に関する機器の仕様を反映していると考えられる。推定コピー数のばらつきは機関 H で最も小さく RSD として 6.4%、また最も大きかった機関 I でも 11.6% であった (Table 2)。なお、機関 F の 23 及び 33 番ウェルは異常値と判断し計算には含めていない。全機関を通じて、コピー数推定値の最大値と最小値の差は約 1000 コピーであった。また、推定コピー数の全機関平均値は 1860.11 であり、RSD は 9.9% であった。

Fig. 7 に、定量 PCR 機器に ABI 7700 を用いた 2 機関の結果をまとめた。Fig. 7-1 に Ct 値を Fig. 7-2 に推定コピー数を示した。2 機関の結果に共通して、ウェル番号の始まりと終わり付近から得られる Ct 値が小さく、中央部分で大きくなる (グラフとしてはウェル番号 45 付近を頂点とした上向きの弓状となる) 傾向が認められた (Fig. 7-1)。また、コピー数は Ct 値とは逆に、ウェル番号 45 付近を谷とした下向きの弓状となる傾向が認められた (Fig. 7-2)。この傾向は、国立衛研で実施した同実験計画に従った繰り返し測定によっても確認されている。ABI PRISM 7700 は、各ウェルにファイバーをのばし、これ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。一方で、PCR の温度制御を行うサーマルサイクラーにはクーラントが使用されており、また温

度制御機構は、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の温度制御の特性を反映した結果、Ct 値(コピー数)が変動したものと考えられた。機関 K の 94 番ウェルでは異常値が観察されているが、その確認と対策についてはこれまでに述べた通りである。推定コピー数のばらつき(RSD)は機関 J で 12.5%、前述の異常値を除いた後の機関 K では 7.6%であった。推定コピー数の平均値は 2 機関で近接しており、機関 J で 1745.17、異常値を除去後の機関 K で 1720.86 であった。また、両機関ともに、コピー数推定値の最大値と最小値の差は 1000 コピー未満であった。

Fig. 8 に、定量 PCR 機器に ABI 7900HT を用いた 12 機関の結果をまとめた。Fig. 8-1 に Ct 値を Fig. 8-2 に推定コピー数を示した。全体的な Ct 値並びに推定コピー数のばらつきは ABI7000 に比べ小さく、ウェル間の変動には、ABI 7500 や 7700 で認められた様な規則性は確認されなかった。機関 S の 3 番ウェルで異常値と判断される低い Ct 値が測定されたため、これを除き集計した推定コピー数の全機関平均値は 1891.59 であり、RSD は 11.6%であった。また、全機関を通じて、コピー数推定値の最大値と最小値の差は約 1000 コピーであった。データ数が不揃いなため、ABI PRISM 7500、7700、7900 のいずれの精度が高いかを考察することは難しい。しかし、Ct 値あるいは推定コピー数のばらつきの程度を同程度ととらえ、7500 や 7700 で観察されたようなウェルの位置に応じた測定値の周期性が観察されなかったことを加味すると、7900 により得られる測定値の信頼性は比較的高いと考えられる。また、20 コピー検量点が検量線の信頼区間に与える影響が他の機種に比べ小さかった事も、7900 により得られる計測時のばらつき要因が小さいことを反映した結果かもしれない。

#### C. D. -3. 計測値のばらつき要因と不確かさの推定について

本研究で実施した全ウェル多重測定においては、規定濃度の測定試料(全ウェル検液)を含む全試薬を同一ロット品として調製し、実験手順を詳細に規定したプロトコルとともに配付した。プロトコルでは、操作を介する人的誤差の影響を可能な限り低減させるために、反応液は一括調製することとし、その分注にも細心の注意を払うことを規定した。さらに、報告は機器により計測される第一義的な測定量である蛍光強度データとし、その解析は *Gimlet* を用いて一定の設定条件下で行った。よって、その他全ての誤差要因が除去されているとはいえないが、このようにして得られた測定値に含まれるばらつきの要因は、主に使用するリアルタイム PCR 機器の機種を含む計測上の要因であると考えられる。このような前提のもと、改めて全機関のデータを見返すと、リアルタイム PCR 機器の機種によって、得られる測定値のばらつきに明らかな差が認められる。また、同機種を使用した機関間で比較した場合には、ばらつきの小さい機関と大きい機関との差にもまた、機種間での差が認められる。最善であると判断する明確な根拠はないが、少なくとも同一機種のうち、最小のばらつきが得られた機体の数値を目標に、機器の精度を管理することが望まれる。20 コピー検量点のばらつきは、測定対象の分布に応じた原理的な要因ではあるが、このばらつきが分析法に求められる精度に重大な影響を与えうかは、上記のように管理された機体を用いた検討によって判断されるべきであり、その結果に基づき適切な対策が講じられるべきである。

不確かさの推定についても同様である。管理状態の良くない機体を含む複数の機体由来の測定値に基づき不確かさを推定した場合、推定される真値の存在範囲が余りに大きく、規格基準への適合判定が不能とな



る恐れすらある。また、ばらつきの大きさに機種依存性があることが強く示唆されることを勘案すれば、機種ごとに不確かさを推定すべきであると考え。そのようにして、機種ごとの不確かさが推定されれば、当該機種を使用する機関においては、それを目標値として機関としての不確かさを推定し、その時ごとに得られる測定値が日常の変動の範囲から逸脱しないように管理するといった室内精度管理の手法も開発が可能であろう。あるいは、分析法の性能として先に不確かさが設定されるのであれば、その基準を満たさない機種を使用しないとといった選択も可能になる。また、本研究では、リアルタイム PCR により得られる測定値の不確かさ要因を明らかにすること並びに不確かさの推定を目的としたため、取り扱った数値は、標準プラスミドに含まれる単一の DNA 配列を計測して得られた Ct 値あるいはその変換値であるコピー数である。今後、測定のための前提条件が整備された後に、同様の手法を用いて種々の DNA 配列を測定し、得られた測定値のばらつきを考慮した上で通知に規定された算術と併せて検討することにより、基準とされる定量値のばらつきを推定することも可能になるものと考えられる。ただし、これらの測定値のばらつきには、DNA の質(リアルタイム PCR に供される検液の純度)といった DNA 抽出法に由来するばらつき要因は含まれていないため、DNA 抽出を含む実試料の分析により得られる定量値の不確かさの推定についても検討していくことが、不確かさ推定方法の標準化や分析の信頼性保証の上で肝要と考える。

#### E. 結論

リアルタイム PCR により得られる測定値(Ct 値)は、PCR プレート上のウェルの位置によってばらつきをもち、その大きさはリアルタイム PCR 機器の機種及び各機体によって異なることが明らかとなった。また、

ポアソン分布の影響を大きく受ける 20 コピーを検量点に含めた場合、検量線の信頼区間が広がることにより、コピー数のばらつきが大きくなり、これはリアルタイム PCR に共通の原理的なばらつき要因となることが強く示唆された。この 2 つのばらつき要因の影響を軽減させるためには、機器精度の基準を設定し適切な管理を行う事や、20 コピーを検量点に含めない検量線をデザインすることが提案される。また、組換え DNA 技術応用食品を対象とした定量 PCR 法においては、本研究で検討した上記 2 点の計測に関するばらつき要因の他にも、DNA 抽出法、定量値算出法また、それに含まれる内標比にもばらつきまたはバイアスを与える要因が含まれていると考えられ、不確かさを推定するためには、今後これらについても検討を行うことが必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

渡邊敬浩、米谷民雄、松田りえ子 (2009)「リアルタイム PCR 法における検量線に基づき推定されるコピー数の変動要因」 食品衛生学雑誌 (in press) .

##### 2. 学会発表

渡邊敬浩、大森清美、松田りえ子 ; 第 97 回日本食品衛生学会学術講演会(2009 年 5 月 14~15 日 ; 東京都)

#### 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

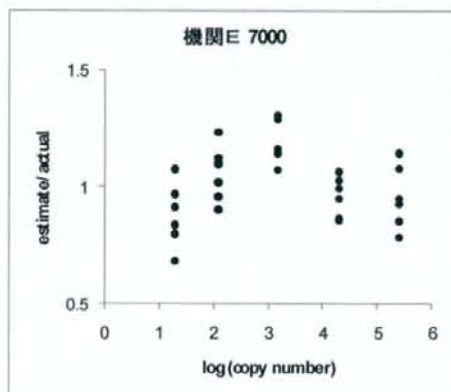
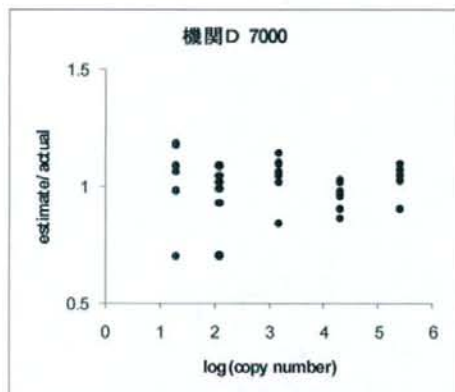
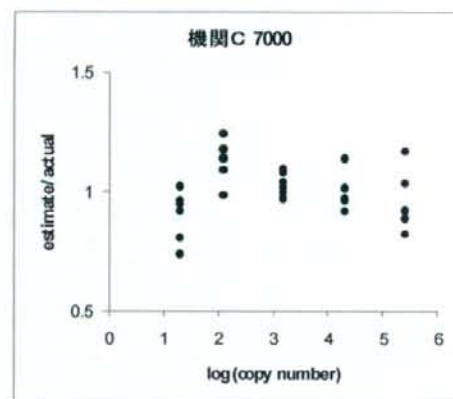
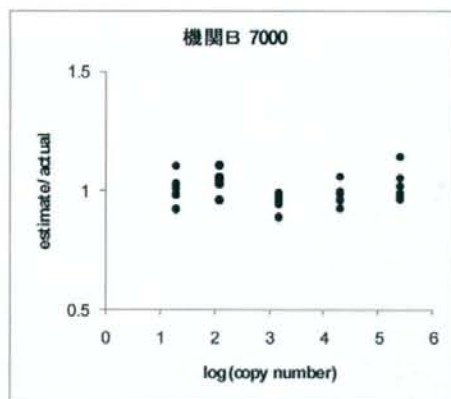
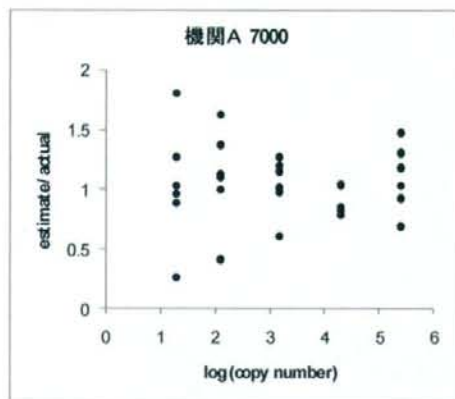


Fig. 1-1 コピー数算出に及ぼす検量線の影響  
(ABI PRISM 7000,  
5点検量線)

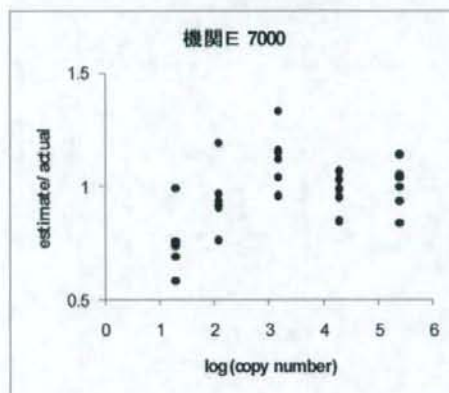
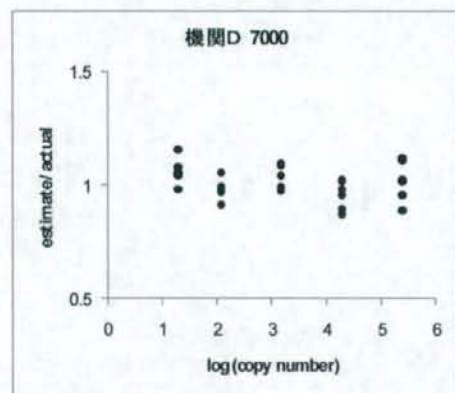
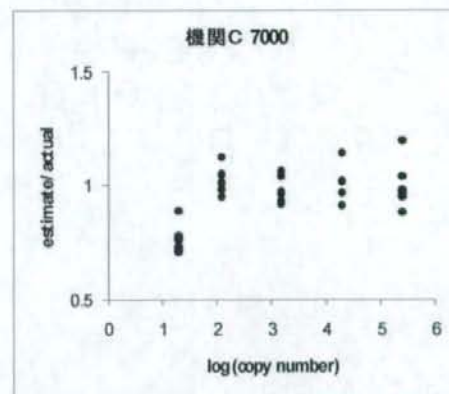
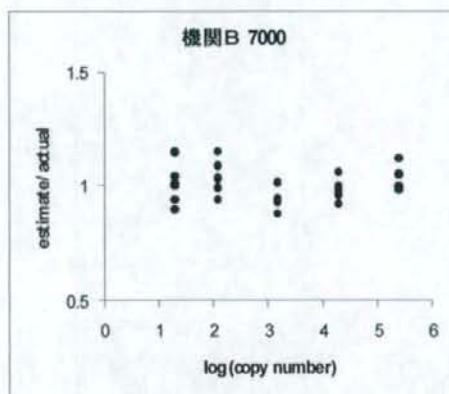
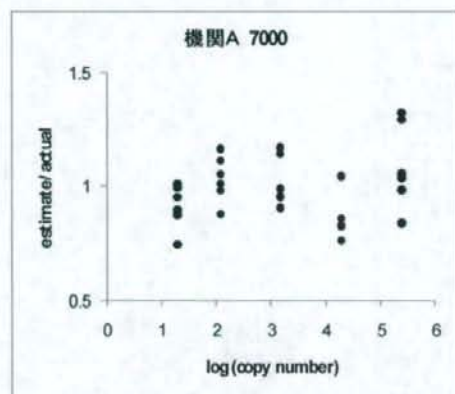


Fig. 1-2 コピー数算出に及ぼす検量線の影響  
(ABI PRISM 7000,  
4点検量線)

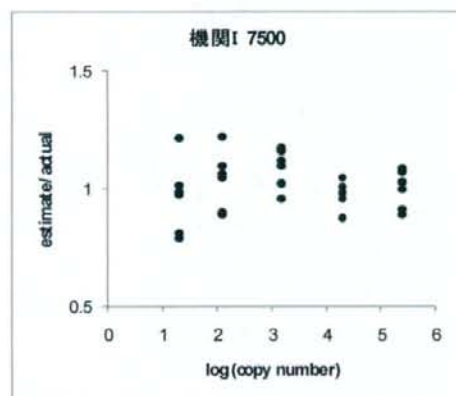
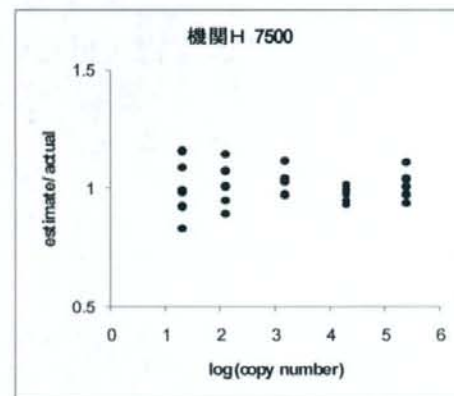
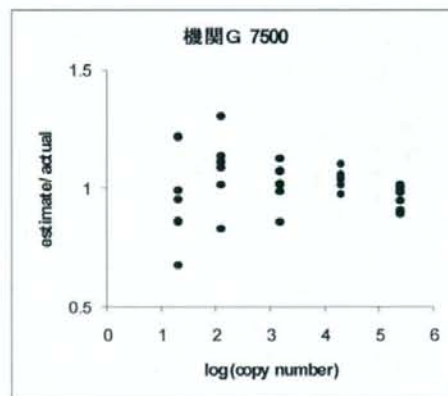
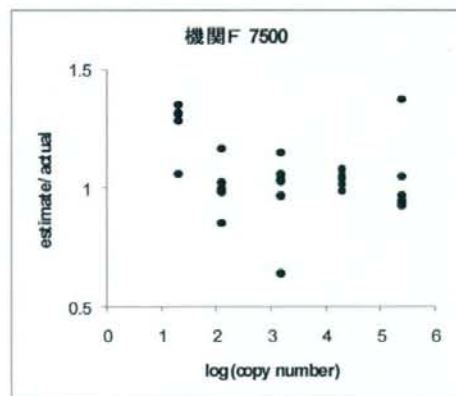


Fig. 2-1 コピー数算出に及ぼす検量線の影響  
(ABI PRISM 7500,  
5点検量線)