

えられた。

使用基準が無い食品においては、定量限界レベルでの結果から不確かさを推定した。このレベルでは、真度が 100%から離れており補正が必要な場合もあり、また室内精度の値が大きく非常に大きな拡張不確かさとなる場合も見られた。しかし、同一のアナライズでも食品により真度及び精度の値が変動するため、不確かさの一般的な値を求めることは困難であった。このような食品と食品添加物の組み合わせでは、いわゆる公定法を一部改良し、不確かさが妥当であることを確認して分析する必要がある。

食品添加物は使用基準がない食品に使用してはならないとされているが、その判定は明文化されていない。今回の不確かさ推定では、分析法の定量限界とされている濃度を添加濃度とし、定量結果から不確かさを推定した。しかし、分析機器の進歩により、定量限界は低濃度化している。一方、食品製造の現場ではキャリーオーバーによる添加物の混入の可能性もあり、機器分析の定量限界で違反と判定する必要性には疑問がある。

現在、食品中の食品添加物分析法の妥当性を評価する基準は設けられていない。本研究では、金属分析法の評価目標値を適用しているが、添加物分析は複雑なマトリクスを持つ加工食品に適用されることを考慮すれば、必ずしも同じ目標値が現実的とは言えない。特に使用基準の無い添加物の分析の目的の明確化と、それに即した適切な分析法性能あるいは不確

かさ範囲の設定が、添加物の検査における分析法の評価において重要と考えられる。

## 参考文献

- 1) Guide to the expression of uncertainty in measurement:GUM, (1993)
- 2) ISO/IEC 17025:2005; General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- 3) CODEX guideline CAC/GL54-2004; Guidelines on measurement uncertainty
- 4) 食発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課長通知別添、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」

## E. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし.
2. 実用新案登録  
なし.
3. その他  
なし.

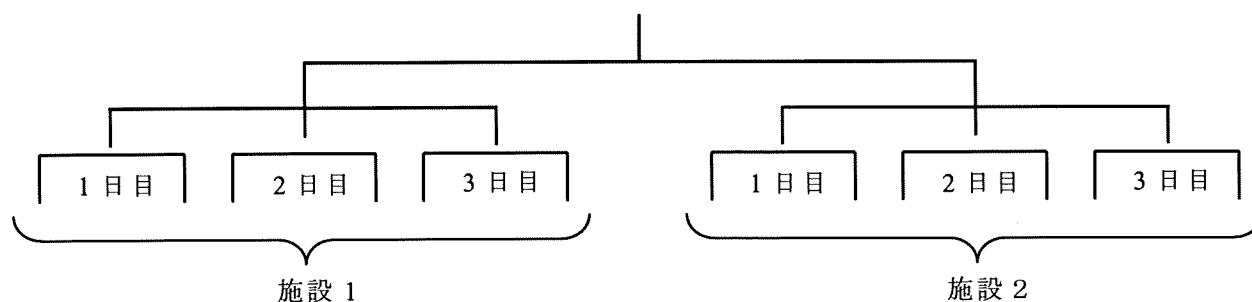


Fig. 1 室内妥当性評価実験計画

Table 1 性能評価した分析法概略

分析対象	抽出・精製	測定
安息香酸	水蒸気蒸留	HPLC
パラオキシ安息香酸 エステル類	メタノール抽出・逆相及び陰イオン交換	HPLC
ソルビン酸	水蒸気蒸留	HPLC
サッカリンナトリウム	透析	HPLC
亜硝酸ナトリウム	アルカリ性抽出・除タンパク	ジアゾ反応で発色 させ吸光度測定

Table 2 性能評価に使用した食品

	食品	使用基準	
安息香酸	マーガリン	あり	
	清涼飲料水	あり	
	シロップ	あり	
	リキュール	なし	
	ジャム	なし	
パラオキシ安息香酸 エステル	清涼飲料水	あり	
	シロップ	あり	
	しょう油	あり	
	海草含有食品	なし	カプセル状健康食品
	クッキー	なし	
ソルビン酸	ケチャップ	あり	
	シロップ	あり	
	練り製品	あり	ちくわ
	清涼飲料水	なし	
	しょう油	なし	
サッカリンナトリウム	チョコレート	なし	
	しょう油	あり	
	清涼飲料水	あり	
	シロップ	あり	
	ソース	あり	中濃ソース
	果実酒	なし	ワイン
亜硝酸ナトリウム	乾燥梅	なし	
	ソーセージ	あり	
	筋子	なし	
	乾燥マグロ	なし	

Table 3 安息香酸分析の性能評価結果

食品名	添加濃度 (g/kg)	定量結果(g/kg)						平均値	真度 %	併行		室内	
		施設A			施設B					SD(g/kg)	RSD(%)	SD(g/kg)	RSD(%)
		1日	2日	3日	1日	2日	3日						
マーガリン	1	0.922	0.972	0.925	0.968	0.944	0.946	0.952	95.2	0.0184	1.9	0.0184	1.9
		0.979	0.970	0.942	0.951	0.944	0.961						
清涼飲料水	0.6	0.605	0.594	0.594	0.590	0.579	0.588	0.588	98.0	0.0112	1.9	0.0118	2.0
		0.591	0.596	0.558	0.589	0.579	0.592						
シロップ	0.6	0.596	0.574	0.589	0.589	0.579	0.578	0.585	97.4	0.0050	0.8	0.0084	1.4
		0.596	0.573	0.589	0.577	0.590	0.585						
リキュール	0.005	0.00582	0.00564	0.00534	0.00548	0.00548	0.00576	0.00557	111.5	0.0001	2.0	0.0002	3.3
		0.00565	0.00558	0.00526	0.00540	0.00578	0.00567						
ジャム	0.005	0.00537	0.00469	0.00514	0.00493	0.00528	0.00510	0.00513	102.7	0.0001	2.1	0.0003	5.2
		0.00549	0.00477	0.00542	0.00493	0.00519	0.00528						

Table 4 パラヒドロキシ安息香酸エステル分析の性能評価結果 (1)

食品名	添加濃度 (g/kg)	定量結果(g/kg)						平均値	真度 %	併行		室内	
		施設A		施設B		SD(g/kg)	RSD(%)			SD(g/kg)	RSD(%)		
メチル	0.02	1日	0.0212	0.0202	0.0205	0.0211	0.0202	0.0212	103.8	0.0008	3.9	0.0008	3.9
		2日	0.0208	0.0226	0.0201	0.0209	0.0204	0.0199					
エチル	0.02	1日	0.0236	0.0244	0.0229	0.0269	0.0255	0.0263	102.5	0.0009	3.5	0.0014	5.5
		2日	0.0235	0.0255	0.0230	0.0256	0.0252	0.0238					
プロピル	0.02	1日	0.0276	0.0280	0.0265	0.0278	0.0266	0.0278	103.9	0.0009	3.4	0.0010	3.9
		2日	0.0273	0.0291	0.0265	0.0264	0.0266	0.0251					
イソプロピル	0.02	1日	0.0279	0.0284	0.0267	0.0280	0.0266	0.0279	104.8	0.0010	3.5	0.0012	4.5
		2日	0.0274	0.0300	0.0266	0.0265	0.0267	0.0254					
ブチル	0.02	1日	0.0279	0.0291	0.0270	0.0312	0.0321	0.0312	103.5	0.0012	4.2	0.0018	6.1
		2日	0.0273	0.0287	0.0270	0.0300	0.0294	0.0282					
イソブチル	0.02	1日	0.0290	0.0297	0.0280	0.0301	0.0295	0.0300	102.8	0.0011	3.8	0.0011	3.8
		2日	0.0281	0.0306	0.0284	0.0284	0.0282	0.0271					
メチル	0.02	1日	0.0210	0.0216	0.0207	0.0205	0.0198	0.0195	102.5	0.0003	1.3	0.0007	3.3
		2日	0.0206	0.0213	0.0204	0.0207	0.0196	0.0202					
エチル	0.02	1日	0.0242	0.0250	0.0238	0.0261	0.0256	0.0243	102.6	0.0003	1.4	0.0008	3.2
		2日	0.0242	0.0247	0.0236	0.0256	0.0246	0.0247					
プロピル	0.02	1日	0.0272	0.0282	0.0269	0.0273	0.0267	0.0256	103.0	0.0004	1.4	0.0008	3.0
		2日	0.0269	0.0273	0.0266	0.0279	0.0260	0.0258					
イソプロピル	0.02	1日	0.0277	0.0278	0.0271	0.0273	0.0269	0.0255	103.3	0.0004	1.4	0.0009	3.2
		2日	0.0273	0.0279	0.0271	0.0267	0.0260	0.0257					
ブチル	0.02	1日	0.0276	0.0281	0.0272	0.0303	0.0300	0.0283	100.6	0.0005	1.9	0.0013	4.6
		2日	0.0275	0.0274	0.0260	0.0296	0.0290	0.0286					
イソブチル	0.02	1日	0.0288	0.0294	0.0287	0.0290	0.0287	0.0271	101.0	0.0004	1.4	0.0007	2.6
		2日	0.0283	0.0286	0.0278	0.0288	0.0282	0.0272					
メチル	0.05	1日	0.0563	0.0633	0.0563	0.0520	0.0532	0.0523	109.8	0.0025	4.5	0.0042	7.7
		2日	0.0599	0.0567	0.0568	0.0513	0.0496	0.0507					
エチル	0.05	1日	0.0649	0.0718	0.0635	0.0663	0.0612	0.0592	106.6	0.0029	4.5	0.0039	6.0
		2日	0.0697	0.0638	0.0639	0.0644	0.0595	0.0617					
プロピル	0.05	1日	0.0735	0.0802	0.0712	0.0696	0.0651	0.0632	107.8	0.0025	3.6	0.0056	8.0
		2日	0.0773	0.0732	0.0723	0.0686	0.0632	0.0661					
イソプロピル	0.05	1日	0.0739	0.0814	0.0727	0.0702	0.0649	0.0631	108.7	0.0027	3.8	0.0063	8.8
		2日	0.0790	0.0748	0.0736	0.0684	0.0630	0.0662					
ブチル	0.05	1日	0.0728	0.0812	0.0734	0.0772	0.0707	0.0684	105.4	0.0033	4.4	0.0041	5.5
		2日	0.0805	0.0745	0.0743	0.0750	0.0687	0.0725					
イソブチル	0.05	1日	0.0764	0.0835	0.0765	0.0753	0.0697	0.0676	106.7	0.0031	4.1	0.0055	7.4
		2日	0.0841	0.0780	0.0761	0.0738	0.0677	0.0720					

Table 4 パラヒドロキシ安息香酸エステル分析の性能評価結果 (2)

メチル	0.005	0.00457	0.00449	0.00455	0.00458	0.00439	0.00433	0.00446	89.1	0.0001	2.9	0.0001	3.0
		0.00440	0.00465	0.00459	0.00421	0.00435	0.00436						
エチル	0.005	0.00574	0.00540	0.00565	0.00625	0.00589	0.00565	0.00576	95.8	0.0002	3.2	0.0002	3.5
		0.00562	0.00584	0.00569	0.00585	0.00577	0.00583						
プロピル	0.005	0.00599	0.00594	0.00588	0.00625	0.00603	0.00562	0.00593	91.0	0.0001	2.1	0.0002	3.2
		0.00595	0.00620	0.00591	0.00595	0.00586	0.00563						
インプロピル	0.005	0.00575	0.00566	0.00570	0.00618	0.00576	0.00566	0.00575	88.2	0.0002	3.0	0.0002	3.0
		0.00590	0.00574	0.00569	0.00563	0.00563	0.00575						
ブチル	0.005	0.00680	0.00689	0.00679	0.00696	0.00671	0.00605	0.00670	95.3	0.0002	2.5	0.0003	4.4
		0.00693	0.00697	0.00689	0.00664	0.00641	0.00638						
インブチル	0.005	0.00696	0.00690	0.00695	0.00702	0.00646	0.00629	0.00675	96.0	0.0002	2.3	0.0003	3.9
		0.00687	0.00685	0.00703	0.00661	0.00646	0.00660						
メチル	0.005	0.00446	0.00467	0.00432	0.00443	0.00460	0.00463	0.00449	89.7	0.0001	2.5	0.0002	3.5
		0.00450	0.00474	0.00443	0.00423	0.00435	0.00445						
エチル	0.005	0.00558	0.00547	0.00525	0.00583	0.00601	0.00581	0.00557	92.7	0.0002	3.4	0.0002	3.9
		0.00559	0.00546	0.00538	0.00549	0.00559	0.00543						
プロピル	0.005	0.00620	0.00600	0.00594	0.00601	0.00609	0.00625	0.00603	92.4	0.0001	2.4	0.0001	2.5
		0.00617	0.00620	0.00586	0.00584	0.00591	0.00588						
インプロピル	0.005	0.00602	0.00593	0.00576	0.00588	0.00599	0.00605	0.00589	90.4	0.0002	3.1	0.0002	3.2
		0.00615	0.00611	0.00593	0.00552	0.00567	0.00574						
ブチル	0.005	0.00680	0.00709	0.00665	0.00651	0.00676	0.00658	0.00667	94.9	0.0002	2.3	0.0003	4.1
		0.00693	0.00697	0.00674	0.00615	0.00643	0.00650						
インブチル	0.005	0.00685	0.00682	0.00641	0.00658	0.00663	0.00649	0.00657	93.4	0.0002	2.8	0.0003	4.1
		0.00692	0.00688	0.00653	0.00616	0.00627	0.00624						

Table 5 ソルビン酸分析の性能評価結果

食品名	添加濃度 (g/kg)	定量結果(g/kg)						平均値	真度 %	精度			
		施設A		施設B		併行				室内			
		1日	2日	3日	1日	2日	3日			SD(g/kg)	RSD(%)	SD(g/kg)	RSD(%)
ケチャップ	0.5	0.478	0.475	0.476	0.487	0.484	0.486	0.481	96.2	0.0028	0.6	0.0058	1.2
		0.484	0.476	0.471	0.485	0.488	0.482						
シロップ	1	0.960	0.961	0.973	0.956	0.970	0.952	0.962	96.2	0.0084	0.9	0.0084	0.9
		0.956	0.963	0.972	0.957	0.951	0.973						
練り製品	2	1.790	1.750	1.760	1.866	1.787	1.780	1.796	89.8	0.0227	1.3	0.0463	2.6
		1.790	1.760	1.810	1.891	1.749	1.819						
清涼飲料水	0.005	0.00482	0.00501	0.00489	0.00492	0.00479	0.00512	0.00492	98.3	0.0001	1.9	0.0001	2.2
		0.00497	0.00490	0.00471	0.00495	0.00494	0.00499						
しょう油	0.005	0.00520	0.00491	0.00441	0.00487	0.00448	0.00459	0.00470	93.9	0.0001	3.1	0.0003	7.4
		0.00496	0.00484	0.00438	0.00513	0.00414	0.00445						
チョコレート	0.005	0.00484	0.00460	0.00453	0.00572	0.00589	0.00517	0.00509	101.9	0.0001	1.7	0.0006	11.3
		0.00476	0.00455	0.00459	0.00572	0.00586	0.00489						

Table 6 サッカリンナトリウム分析の性能評価結果

食品名	添加濃度 (g/kg)	定量結果(g/kg)						平均値	真度 %	精度			
		施設A		施設B		併行				室内			
		1日	2日	3日	1日	2日	3日			SD(g/kg)	RSD(%)	SD(g/kg)	RSD(%)
しょう油	0.5	0.506	0.488	0.495	0.505	0.512	0.491	0.500	100.1	0.0086	1.7	0.0129	2.6
		0.490	0.485	0.489	0.525	0.516	0.504						
清涼飲料水	0.3	0.292	0.283	0.292	0.278	0.288	0.294	0.290	96.6	0.0048	1.7	0.0072	2.5
		0.290	0.291	0.305	0.282	0.289	0.295						
シロップ	0.3	0.293	0.288	0.291	0.288	0.301	0.300	0.294	98.0	0.0014	0.5	0.0063	2.1
		0.291	0.290	0.290	0.290	0.303	0.303						
ソース	0.3	0.299	0.282	0.296	0.282	0.289	0.289	0.285	95.0	0.0082	2.9	0.0082	2.9
		0.282	0.287	0.288	0.272	0.274	0.278						
果実酒	0.01	0.01007	0.01020	0.00984	0.00877	0.00884	0.00875	0.00940	94.0	0.0002	1.7	0.0007	7.8
		0.01046	0.00989	0.00978	0.00854	0.00880	0.00881						
乾燥梅	0.01	0.00669	0.00660	0.00665	0.00741	0.00738	0.00751	0.00693	69.3	0.0003	4.1	0.0004	6.1
		0.00688	0.00620	0.00674	0.00663	0.00734	0.00710						

Table 7 亜硝酸ナトリウム分析の性能評価結果

食品名	添加濃度 (g/kg)	定量結果(g/kg)						平均値	真度 %	併行		室内	
		施設A		施設B		SD(g/kg)	RSD(%)			SD(g/kg)	RSD(%)		
		1日	2日	3日	1日	2日	3日						
ソーセージ	0.05	0.046	0.047	0.045	0.048	0.049	0.051	0.047	94.7	0.0007	1.6	0.0022	4.6
		0.044	0.048	0.045	0.047	0.049	0.050						
筋子	0.005	0.00386	0.00430	0.00389	0.00428	0.00443	0.00454	0.00422	84.3	0.0000	1.1	0.0003	6.2
		0.00386	0.00426	0.00399	0.00432	0.00443	0.00444						
乾燥マグロ	0.005	0.00158	0.00146	0.00173	0.00089	0.00084	0.00055	0.00121	24.2	0.0001	6.7	0.0005	38.1
		0.00162	0.00150	0.00173	0.00085	0.00109	0.00065						

Table 8 室内妥当性評価実験から推定した不確かさ

安息香酸					
食品	マーガリン	清涼飲料水	シロップ	リキュール	ジャム
添加濃度 mg/g	1	0.6	0.6	0.005	0.005
不確かさ %	1.9	2.0	1.4	3.3	5.2
拡張不確かさ %	3.9	4.0	2.9	6.7	10.4

パラオキシ安息香酸エステル						
食品	清涼飲料水	シロップ	しょう油	海藻含有食品	クッキー	
添加濃度 mg/g	0.02	0.02	0.05	0.005	0.005	
不確かさ %	メチル	3.9	3.3	7.7	3.0	3.5
	エチル	5.5	3.2	6.0	3.5	3.9
	プロピル	3.9	3.0	8.0	3.2	2.5
	イソプロピル	4.5	3.2	8.8	3.0	3.2
	ブチル	6.1	4.6	5.5	4.4	4.1
	イソブチル	3.8	2.6	7.4	3.9	4.1
	拡張不確かさ %	メチル	7.7	6.6	15.4	6.1
エチル		11.0	6.4	12.0	7.1	7.7
プロピル		7.7	6.0	15.9	6.5	4.9
イソプロピル		9.0	6.4	17.6	6.0	6.4
ブチル		12.2	9.3	11.1	8.8	8.1
イソブチル		7.7	5.1	14.7	7.8	8.2

ソルビン酸						
食品	ケチャップ	シロップ	練り製品	清涼飲料水	しょう油	チョコレート
添加濃度 mg/g	0.5	1	2	0.005	0.005	0.005
不確かさ %	1.2	0.9	2.6	2.2	7.4	11.3
拡張不確かさ %	2.4	1.7	5.2	4.4	14.7	22.7

サッカリンナトリウム						
食品	しょう油	清涼飲料水	シロップ	ソース	果実酒	乾燥梅
添加濃度 mg/g	0.5	0.3	0.3	0.3	0.01	0.01
不確かさ %	2.6	2.5	2.1	2.9	7.8	6.1
拡張不確かさ %	5.2	5.0	4.3	5.8	15.5	12.2

亜硝酸ナトリウム			
食品	ソーセージ	筋子	乾燥マグロ
添加濃度 mg/g	0.05	0.005	0.005
不確かさ %	4.6	6.2	38.1
拡張不確かさ %	9.2	12.3	76.2



平成 21 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）  
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

研究代表者 松岡英明 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻教授  
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

食品に定められた規格基準への適合判定を行う際の科学的根拠となる測定値を得るために分析(検査)が行われる。これを得るための一連の過程を通じて、またその過程に応じた大きさのばらつきを測定値は伴う。近年では、このばらつきに基づき推定される真値の存在する範囲を「不確かさ」という用語で表現するようになってきている。この不確かさは、測定値の信頼性を保証するための一つの表現手段として用いられるにとどまらず、規格基準への適合判定時に考慮されるべきパラメータとしての運用についても国際的な議論が進行しているところである。

規格基準適合判定のための測定値を得るための分析法としては、理化学的分析法等がよく知られ、不確かさの推定も含めた種々の検討が進められている。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)もまた、同じ目的から使用される場合があるが、開発およ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、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、これまでに、リアルタイム PCR 機器による計測の過程のみを抽出しても、理化学分析に比べ測定値のばらつきが大きく、その程度は、使用する機器の種類、さらには個体によっても変わりうることを示した。今年度は、遺伝子組換え大豆認証標準試料(認証値は重量比として2%)を単一試験室内で繰り返し分析することにより得られた測定値に基づき、分析の全工程を通じて得られる測定値の不確かさの推定方法について検討した。検討に当たっては、DNA 抽出に複数の方法を採用し、これらを同一の試験計画中で実行する事により、抽出法ごとの不確かさの推定を試みた。その結果、1) DNA の測定値に 2 種の測定方法間での有意差が認められること、2)DNA 抽出法間で DNA の収量に差が認められること、3)リアルタイム PCR 法により得られる測定値であるコピー数の変動は、併行抽出間に比べ測定間の効果を含む抽出日間で大きい事、4)コピー数に基づき算出される混入率の変動は 4 種の DNA 抽出法の間で 12.2~27.3%(RSD%)と推定され、これを真値の存在範囲ととらえれば不確かさとなる。

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

## A. 研究目的

食品の規格基準適合判定に使用される測定値を得るための分析法として、理化学的分析法はよく知られている。理化学分析法の例としては、残留農薬等の分析が挙げられ、その不確かさの推定方法についても検討が進められており、WHO/FAO 合同国際食品規格計画 (Codex) において策定されているガイドライン (CAC/GL59) に従えば、実際に推定も可能である。これに対し、生化学分析法は、同じく規格基準適合判定の目的に使用される場合があるものの、その開発や運用の歴史が浅いため、得られる測定値に偏りやばらつきを与える因子についての検討も十分とは言えず、不確かさについては推定方法も含め、全く検討されていないのが現状である。

本研究課題では、生化学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 法を取り上げる。昨年度は、本法において検量線作成用の標準物質として規定されている一定量の DNA 配列 (標準プラスミド) のリアルタイム PCR による計測に付随する測定値のばらつきについて検討した。この検討は、リアルタイム PCR 機器の種類および個体による影響についても評価する事を目的に、25 の研究機関が参加する共同試験として実施した。その結果、リアルタイム PCR 法は、機器による計測の過程のみを抽出しても理化学分析に比べ測定値のばらつきが大きく、その程度は、使用する機器の種類、さらには個体によっても変わりうることを示されている。

本年度は、安全性審査を終了した遺

伝子組換え大豆 (ラウンドアップレディー大豆; RRS) の定量を目的としたリアルタイム PCR 法へと検討対象を拡大し、単一試験室内で本法を用いて得られる測定値に付随する不確かさの推定方法の検討を目的とした。また、検討に当たっては、測定対象化学物質である DNA を抽出するための方法として、農林水産省ならびに厚生労働省から複数の方法が示されていることから、これら抽出法間の不確かさの比較も試みた。なお、昨年度の検討結果を踏まえ、一義的な測定量である蛍光光度 (検量線によりコピー数に変換される) の計測には、ABI 7900 HT の特定の個体を校正した上で用い、リアルタイム PCR 機器の機種ならびに個体の差が不確かさの要因とならないよう、実験計画を策定した。

## B. 研究方法

### B-1. 認証標準試料

安全性審査を終了した遺伝子組換え大豆 (RRS) の認証標準試料には、Institute for reference material and measurements (IRMM) が提供している RRS を重量比率として 2% 含有する試料 (ERM-BF410e) を用いた。本試料に付与された認証値は、20.0 g/kg、拡張不確かさ 2.6 g/kg である。なお、認証値は試料の説明書に記載の複数機関によって付与されたものと推測されるが、その方法については不明であり、妥当性は評価できない。

### B-2. DNA の抽出

RRS のリアルタイム PCR 法を用いた定量分析に適用可能であるとして国が示す DNA 抽出法には、maxi 法、シリカゲ

ル膜タイプキット法 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit を使用 ; mini 法)、シリカゲル膜タイプキット法 (NIPPON GENE GM quicker を使用 ; quicker 法)、シリカベースレジンタイプキット法 (Promega Wizard DNA Clean-up System を使用 ; resin 法)、CTAB 法の計 5 種が挙げられる。事前検討の結果、CTAB 法を用いて場合、リアルタイム PCR に供するに足りる量の DNA を安定して抽出することができないことが明らかとなったため、これを除く 4 種の抽出法について検討することとした。

Maxi 法による DNA 抽出は、JAS 分析ハンドブック(第二版)に準拠して実施し、試料重量は他の抽出法を用いた検討に合わせ 1g と規定した。1 日あたり 4 試料からの抽出を併行して行い、これを 5 日間繰り返した。その他 3 種の抽出法については、食安発第 0629002 号(以下、通知)の 2.2 項に記載された方法に準拠した。通知に記載された方法には、いずれも最初に試料を抽出液に懸濁し、その一部を以後の操作に用いると指示されている。本検討では、上記手順には変更を加えず、一部分の分取以降の操作を 6 併行で実施した。これにより同一試料から 6 点の DNA 抽出液を得た。得られた DNA 抽出液は、下記の DNA 測定法を用いて 6 点を個別に測定した後、混合し、混合した溶液 (composite) についても測定した。リアルタイム PCR に供する DNA の量は、composite の DNA 濃度に基づき調整した。一日あたり 2 試料からの抽出(抽出される DNA の点数としては一日あたり 12)を併行して行い、これを 5 日間繰り返す事を実験計画とした。

### B-3. DNA の測定

DNA 濃度の算出は、通知 2.2.4 項に従い 260 nm の吸光度に基づき行った(吸光度法)。またこれとは別に、二本差 DNA に特異的なインターカレーターが放出する蛍光の強度を測定する方法(蛍光光度法)によっても行った。

### B-4. リアルタイム PCR によるコピー数の計測

リアルタイム PCR による内在性遺伝子 (*Le1*) ならびに RRS 特異的遺伝子 (RRS) のコピー数の計測は、通知 3.1.2 項に従い行った。ただし、mini 法および maxi 法では、通知に規定された濃度の半量となる 25 ng をリアルタイム PCR に供した。

リアルタイム PCR により得られたデータを Ct 値に変換する際に規定する条件である Th. Line の数値は、amplification plot curve としてプロットされる  $\Delta R_n$  値が PCR の原理上の理論値である  $2^n$  により近い割合で増加しており、この  $\Delta R_n$  値の増加割合の変化が測定間で小さいことを上記 curve の接線の傾きとして確認した上で、一律 0.256 に設定した。なお、解析は独自に解析したリアルタイム PCR データの解析用ソフトウェア (*GiMlet*) を用いて行った。

規格基準値である混入率の算出時には内標比と呼ばれる係数を用いることが指示され、またその数値も通知中に示されているが、内標比とされる数値は DNA 抽出法に maxi 法を採用し実施された共同試験で得られた実測値に基づいており、他の DNA 抽出法を採用した場合に適用できることは確認されていない。また、共同試験で得られた実測値に

に基づき規定された数値であるため、これに参加した各試験室間のばらつきの影響が含まれているとも考えられ、国が通知として示す試験法の運用上の規定としては有効であるが、特定の単一試験室での混入率の算出に使用される係数として最善であるかには疑問がある。一方で、RRSの理論上の内標比は1であり、これは通知に示された内標比が1.04であることから分析による影響を加味しても、確からしい数値と考えられる。以上の点を総合的に考慮し、単一試験室内において多数のDNA抽出法により抽出されたDNAを特定のリアルタイムPCR機器を用いて計測することを実験計画とした本研究においては、混入率の算出には、便宜的に理論上の内標比である1を係数として一律で使用する事とした。なお、仮に、内標比にDNA抽出法間で差がある場合、混入率にバイアスを与える事となるが、その点は通知に従った混入率の算出と変わりがない。また、補正を要因として考慮していないため、不確かさの推定への影響はない。

リアルタイムPCRによる計測は、2つの実験計画に従い実行した。1つは、1試料から抽出されたDNAの15 well 併行測定であり(プレート内多重測定試験)、もう1つは通知に規定された3 well 併行測定を異なるプレートで3回繰り返し行うもの(プレート間繰り返し測定試験)である。リアルタイムPCRに使用するプレートのwell数は96であり、これが測定計画を立てる上での制約となる。そのため、プレート内多重測定試験では、同日に特定の方法により併行して抽出された2試料由来のDNAを測定し、またプレート

間繰り返し測定試験では、特定の方法により5日間を通じて抽出された全10試料由来のDNAを計測した。コピー数の測定計画および、DNAのプレート上での測定位置の概略を図1に示す。

#### B-5. 試薬

DNAの抽出には、DNeasy Plant Mini Kit ならびに maxi kit (いずれも QIAGEN 社製)、Wizard DNA Clean-Up Resin System (Promega 社製)、GM quicker (ニッポンジーン社製)を用いた。DNAを測定するための蛍光試薬には、Pico Green dsDNA quantitation kit (Invitrogen 社製)を用いた。リアルタイムPCRによるコピー数の計測には、GM ダイズプラスミドセット・ColE1/TE、Le1 オリゴヌクレオチドセット、RRS オリゴヌクレオチドセット(いずれもニッポンジーン社製)、2 x universal master mix(ABI社製)を用いた。

#### B-6. 機器

恒温槽：ドライサーモユニット DTU-1B (タイテック社製)、冷却遠心機：Avanti HP25 (Beckman 社製)、卓上遠心機：KR-1000 (フナコシ社製)、タッチミキサー：MT-51 (ヤマト社製)、分光光度計：ND-1000 (Thermo Scientific 社製)、蛍光測定計 ND-3300 (Thermo Scientific 社製)。定量PCR装置には、ABI PRISM® 7900HT (ABI社製)を使用した。

#### B-7. 統計解析

##### B-7-1. 抽出されたDNAの濃度

DNAを吸光光度法および蛍光光度法により測定し得られたDNA濃度の差は、抽出法ごとに得られたn=60のデータ

(maxi 法のみ n=20)を対象に、paired-t により検定した。さらに、蛍光光度法により求めた濃度を対象として、抽出法間で得られる DNA 濃度の比較を目的とした一元配置の分散分析を行った。その際には上述の n=60(maxi 法については n=20)のデータセットを用いた。

各 DNA 抽出法の精度は、composite の濃度として 1 日 2 併行 5 日繰り返し試験の結果として得られた n=10(maxi 法のみ 4 併行 5 日間繰り返し; n=20)のデータを対象に一元配置の分散分析を行い、算出された分散から併行精度ならびに室内精度として推定した。

#### **B-7-2. リアルタイム PCR により計測されたコピー数および混入率**

測定値の誤差の構造として、以下をモデルとして想定した。

測定値 (a) = 真値 ( $\mu$ ) + 抽出法 (e) + 日間 (e) + 併行抽出間 (e) + well 間 (e) + plate 間 (e)

ここで測定値として扱うのは、内在性遺伝子ならびに RRS 特異的 DNA 配列のコピー数である。それらの比に係数を乗じて算出される混入率の変動については、本来、個々のコピー数の相関を考慮しなければならない。しかし、これは本研究の検討範囲を超えるため、考慮していない。本研究において実施したプレート内多重測定試験およびプレート間繰り返し測定試験の結果からは、1) 特定の抽出法により 1 日内で併行した 2 試料から得られた測定値の変動、2) これを 5 日間繰り返した事による日間の変動、3) 15 well を用いた多重測定による well 間の変動、4) 同一の DNA を 3

plate で繰り返し測定した際の plate 間での変動といった多数の変動要因についての検討が可能である。これら要因には、実験計画の規定により明示的に取り扱う事が可能な要因と、1 つの水準に複合して現れる非明示的な要因とが含まれる。それらについて詳細を検討するため、複数の仮定に基づくデータセットを準備し、それらデータセットを二元配置もしくは一元配置の分散分析により解析した。その結果として算出される個々の分散に基づく変動の大きさを、標準偏差 (SD) および相対標準偏差 (RSD%) として推定した。推定された変動から不確かさが推定されるが、通知に規定されている試験手順や実際にされているであろう分析を鑑み、最も現実的な不確かさの推定について検討を進め、抽出法の種類による不確かさの差についても比較した。

#### **C.D. 研究結果および考察**

##### **C.D.-1. 抽出法および測定法に依存した DNA 濃度とその変動**

遺伝子組換え大豆認証標準試料 (ERM-BF410e) から、4 種の方法を用いて抽出された DNA の濃度を、吸光光度法および蛍光光度法によって測定した全結果を表 1 に、またそれら測定結果の散布図を図 2 に示す。表 1 には、Mini 法、resin 法、quicker 法については 1 試料から併行して得られた 6 点の抽出液およびそれらを混合した composite 中の DNA 濃度を、1 日あたり 2 試料、5 日間に亘って測定した結果を示している。また maxi 法については、他の方法のように 1 試料についての併行抽出が不可能

であったため、1日あたり4試料、5日間の測定結果を示した。吸光光度法で測定した場合、compositeを除く全測定値から算出されるDNA濃度の平均値と相対標準偏差(RSD%)は、mini法で69.9 ng/μL (10.0%)、resin法で314.1 ng/μL (10.5%)、quick法で85.8 ng/μL (14.5%)、maxi法で138.5 ng/μL (44%)であった。一方、蛍光光度法による測定結果は、mini法で16.0 ng/μL (26.2%)、resin法で107.8 ng/μL (10.2%)、quicker法で81.5 ng/μL (18.8%)、maxi法で56.0 ng/μL (28.3%)であった。これらの結果を概観しても、採用する抽出法および測定法によって、求められるDNA濃度に差があることが疑われた。そこでまず、異なる測定法を用いることによるDNA濃度の差をpaired-t検定を用い検定した。その結果、表2に示したとおり、平均値の差が4.1 ng/μLで最小であったquicker法により得られるDNA濃度でさえp値が0.01未満であり、測定法間で得られる測定値に有意の差があることが確認された。その他resin法の206.3 ng/μLを最大として、maxi法では82.5 ng/μL、またmini法では53.9 ng/μLの差が測定法間の平均値の差として観測されており、いずれの方法により抽出されたDNAであっても、測定法を吸光光度法とするか蛍光光度法とするかによって得られる濃度が異なることが明確に示された。また、全ての抽出法において、吸光光度法により得られる測定値がより高い値となった。

吸光光度法では、DNAに含まれる各種塩基が有する紫外光の吸収極大で

ある260 nmの吸光度に基づきDNA濃度を算出する。当然、測定対象とする溶液中に260 nmに吸収を持つ他の物質が含まれていた場合には、DNA濃度は正の影響を受ける。また抽出操作は、DNAの分子としての状態にも影響を与えることが知られており、細胞内での最も安定した状態といえる無傷の二本鎖DNA以外にも、切断により分子量の小さくなったDNAや、水素結合が切れた一本鎖DNAが抽出溶液中には含まれる。しかし、これら分子状態の異なるDNAを260 nmの吸光度により区別することはできない。一方、蛍光光度法では、二本鎖DNAに特異的なインターカラーターを使用し、これが発する蛍光の強度に基づきDNA濃度を算出する。よって、吸光光度法で挙げた目的外物質による影響や、分子状態の変化による影響が排除され、二本鎖DNAの濃度のみが測定される。分子状態の変化がリアルタイムPCRにより得られる測定量に対して与える影響を一概に評価する事はできない。しかし低分子量化や一本鎖化によって、測定されるDNA配列の分解が不規則に進行する可能性を考慮すれば、リアルタイムPCRに供するDNAは無傷の二本鎖DNA重量として規定することとし、これを満足させることの可能な方法を抽出法として採用するべきと考える。この考えに従い、蛍光光度法により得られた全測定値を対象に分散分析を行った結果、抽出法法によって抽出されるDNAの濃度に有意な差( $p < 0.01$ )があることも確認された。これらの結果は、1)抽出方法によって抽出されるDNAの量が異なり、かつ、2)同一のDNA溶液であっ

ても、測定法によって算出される濃度が異なることを明確に示したものである。

通知に示されたリアルタイム PCR 法による遺伝子組換え食品の定量においては、内在性遺伝子と組換え特異的 DNA 配列と呼ばれる 2 つの DNA 配列のコピー数を計測し、その比を当該食品の混入率算出に使用する。また、リアルタイム PCR には、吸光光度法により算出される DNA 濃度に基づき、1 反応 (well) あたり 50 ng の DNA を供する事が規定されている。しかし、供した DNA 重量の正確さは混入率算出の際に考慮されない。また、正しく一定量の DNA がリアルタイム PCR に供されていれば、それに応じた一定のコピー数が計測されるはずであるが、これについても規定がない。これらの事を背景とするためか、リアルタイム PCR に供される DNA 量について、抽出法や測定法間での比較検証をした報告は少ない。しかし、リアルタイム PCR により得られるコピー数を本定量分析の一義的な測定値とする以上、同一試料の分析を通じてこの測定値が一定の範囲内に含まれていることを保証せずして、複数の DNA 抽出法を選択肢に含めることはできないと考える。

表 3 には、各抽出法の性能として、得られる DNA 濃度の変動を併行および室内精度として示した。Maxi 法を除く抽出法については、composite の濃度を 1 日 2 併行、5 日間実行のデータセットとして (n=10)、maxi 法に付いては 1 日 4 併行 5 日間実行のデータセット (n=20) として一元配置の分散分析を行い、算出された分散から推定される併行および室内精度を相対標準偏差 (RSD%) として

示したものである。吸光光度法により得られた DNA 濃度は、前述の考察により真の DNA 濃度とすることに疑問が残る。蛍光光度法により得られる DNA 濃度を真の DNA 濃度とし、抽出法の性能である室内精度を加味してもなお、規定された DNA 量を抽出可能であるが、DNA 抽出法の適用性を判断する上での重要な指標の一つとなると考える。

### C.D.-2. リアルタイム PCR によるコピー数の計測

リアルタイム PCR によるコピー数の計測は、通知に準拠して行った。ただし、mini 法と maxi 法を抽出法に採用した場合には、実験計画に照らして十分な量の DNA を抽出することができなかったため、規定の半量となる 25 ng をリアルタイム PCR に供した。プレート内多重測定試験により得られた全測定値を表 4 に、またその散布図を図 3(上段)として示した。上述の通り、mini 法と maxi 法により抽出された DNA については、その収量による制限から、resin 法ならびに quicker 法により抽出された DNA の半量をリアルタイム PCR に供した。リアルタイム PCR に供した DNA の量からすれば、計測されるコピー数もまた半数となると考えられる。そこで便宜的に、mini 法と maxi 法により抽出した DNA の測定値に 2 を乗じた結果についても併せて図 3(図下段)に示した。表 5 には同一の DNA 試料に由来する測定値の平均値、SD および RSD% を抽出法、抽出日、試料により整理し示した。これに加えて、DNA 抽出法ごとに得られた全測定値の平均と RSD% を算出した。内在性遺伝子である *Le1* のコピー数 (RSD%) は、mini 法

を採用した場合に、34696 コピー(21%)、resin 法を採用した場合に 69355 コピー(22%)、quicker 法を採用した場合に 43723 コピー(18%)、maxi 法を採用した場合に 27774 コピー(27%)となった。さらに mini 法および maxi 法により抽出された DNA から得られた個々のコピー数に 2 を乗じた後に算出した平均と RSD%はそれぞれ、69393 コピー(21%)、および 55547 コピー(22%)となった。同様に RRS 特異的 DNA 配列である RRS のコピー数の平均値と RSD%は、mini 法を採用した場合に、785 コピー(31%)、resin 法を採用した場合に 1169 コピー(9%)、quicker 法を採用した場合に 1127 コピー(16%)、maxi 法を採用した場合に 508 コピー(29%)となった。さらに同様に、mini 法および maxi 法により得られた個々のコピー数に 2 を乗じた後に算出した平均と RSD%はそれぞれ 1569 コピー(31%)、および 1017 コピー(29%)となった。

先に示した DNA 濃度の抽出法間および測定法間での差を考慮すると、蛍光光度法により得られた DNA 濃度に基づきリアルタイム PCR に供する DNA 量を調整することで、計測されるコピー数の抽出法間での差が小さくなることが強く示唆される(図 3 下段)。例えば仮に、吸光光度法により算出された DNA 濃度に基づき DNA 量を規定した場合には、測定法間でほぼ同じ結果の得られる quicker 法を除き、mini 法では約 1/4、resin 法では約 1/3、maxi 法では約 1/2.5 のコピー数が得られることとなり、抽出法間での差が大きくなると推測される。この考察は、プレート間繰り返し測定試

験の結果(表 6)および、これらの測定値を散布図にプロットした結果(図 4 下段)からも支持される。

先にも言及したとおり、リアルタイム PCR により得られるコピー数を本定量分析の一義的な測定量とするのであれば、規定した一定量の DNA を供した場合に、方法によらず近似した測定値が得られる事を、ある DNA 抽出法を本定量分析法に適用可能と判断する上での指標とすべきと考える。なお、本研究においては、全ての DNA は蛍光光度法により算出された濃度に基づき調整し、リアルタイム PCR に供しているため、DNA 濃度の測定に付随したコピー数の変動は、不確かさを与える要因として他に比べ小さくなると考えられる。また、分析法の性能として検出に影響を与える濃度(コピー数)での計測は行っていないため、リアルタイム PCR に供する DNA の量に抽出法間で 2 倍の差がある場合にも、RSD%として不確かさを推定する上では、特に大きな影響にはならないと考えられる。

### C.D.-3. リアルタイム PCR により得られる測定値(コピー数)の不確かさの推定

食品の規格基準に照らせば、本分析法により明らかにすることを目的とされる数値は混入率と呼ばれる特定の遺伝子組換え食品が同種の非遺伝子組換え食品中に含まれる割合である。しかしあくまで、リアルタイム PCR により得られる一義的な測定量はコピー数であるため、混入率の算出とその解析に先立ち、コピー数の不確かさの推定を試みた。

#### C.D.-3.(1) プレート内多重測定試験結果に基づくコピー数の不確かさの推定



まず始めに、プレート内多重測定試験により得られたデータ(表 4 および表 5)を対象に、DNA 抽出法ごとに各コピー数の変動を推定した。多重測定した 15 well 個々のコピー数をデータとするデータセットの 1(総データ数  $n=150$ 、表 4)ならびに、同一の DNA 溶液に由来する 15 well 分のコピー数の平均値をデータとするデータセットの 2(総データ数  $n=10$ 、表 5)に分け解析を行った。データセットの 1 については well、1 日に併行抽出した 2 つの試料、また抽出日および測定(プレート)間を水準とした二元配置の分散分析により各分散を求め、SD ならびに RSD%として変動を推定した。なお、交互作用については水準間の相関が不明であるため、推定に含めなかった。一方のデータセットの 2 については、5 日間分をまとめた併行抽出と抽出日および測定(プレート)間を水準とし、一元配置の分散分析により変動を推定した(表 7)。同一試料に由来する DNA の異なるプレートによる測定は、本実験計画に含まれていないが、1 日に抽出した DNA を 1 枚のプレートで測定し、この測定を 5 日間分の抽出 DNA について繰り返したため、抽出日としての要因中に測定間の効果が非明示的に含まれることとなる。また、SD についても同表には示しているが、測定されることが期待されるコピー数は供した DNA 量により異なるため、RSD%について考察する。

まずデータセット 1 についてみると、同日内 2 併行抽出間の変動が推定できない場合があることが分かる。これは well 間の分散の自由度が 140 であるのに対し、2 併行抽出間の分散の自由度が 1

であり、算出される分散の信頼性の開きが大きいためである。逆に言えば、データセット 1 から推定される well 間の分散の信頼性は高いが、併行抽出間の変動の信頼性は低い。また、抽出日および測定(プレート)間の分散の自由度は 4 であり、より信頼性の高い推定が要求される場合もあるかも知れないが、5 日間の繰り返し分析という実行可能性を鑑みれば、必要最小限の信頼性は確保されているものと考ええる。データセット 2 では、1 試料に由来する 15 well 分の測定値の平均値をデータとして取り扱っている。Well 間での変動は推定することができないが、ある DNA から得られる真のコピー数を考えれば、十分な  $n$  数から算出された平均値は、より確からしい推定値と言える。併行抽出の分散の自由度は 5、抽出日および測定間の自由度は 4 であり、これは医薬食品局食品安全部長により通知された「残留農薬等試験法妥当性評価ガイドライン(食安発第 115001 号;平成 19 年 11 月 15 日)」に例示された実験計画に従い得られたデータから併行ならびに室内精度を推定するために行われる分散分析の自由度と同じである。分散分析の対象とする個々のデータの確からしさまた、変動を推定する水準が実際の分析で考慮すべき要因をより適切に反映していること、さらには自由度の点から言っても、本研究で計画したプレート内多重測定試験により得られたデータは、データセット 2 のように整えた後に、解析することがより適切であると考ええる。なお、データセット 2 から推定された抽出日および測定間の変動がセット 1 に比べ大きく推定されている。

これは先述の通り、15 well 分の測定値の平均をデータとして用いた事による well 間変動の除外効果と、二元配置の分散分析では交互作用として算出される分散が抽出日および測定間の変動に加わった影響の現れであると考ええる。

データセット 1 および 2 から推定された変動を俯瞰すると、測定対象となる DNA 配列の種別に依らず、プレート間の効果を含む抽出日間の変動は、well 間および併行抽出間の変動に比べ明らかに大きい。この結果から、測定値に付随し真値の存在する範囲を示すパラメータである「不確かさ」の成分として、プレート間の効果を含む抽出日間の寄与が大きいことが明らかとなった。

### C.D.-3.(2) プレート間繰り返し測定試験結果に基づくコピー数の変動

次に、プレート間繰り返し測定試験により得られたデータ(表 6)に基づき、DNA 抽出法ごとに各コピー数の変動を推定した(表 8)。なお、本実験計画においても、1つの DNA 試料の計測は、1プレート内 3 well 併行で行っているが、先の考察に従い平均値をデータとし、プレートごとのデータを対象に一元配置の分散分析を行い、併行抽出間および抽出日間の変動を推定した。これにより、推定される抽出日間の変動には測定(プレート)間の効果は含まれない。1プレート内で得られたデータの総数は  $n=10$ 、併行抽出間の分散の自由度は 5、抽出日間の分散の自由度は 4 である。

抽出日間の変動が推定できない場合があるが、これは先に考察したとおり、データ数の不足によるものである。また、測定対象となる DNA 配列の種別に依

らず、抽出日間の変動が、併行抽出間の変動に比べ明らかに大きい点については、プレート内多重測定試験のデータからの推定結果に一致する。さらに、maxi法により抽出された DNA の plate 3 での計測結果を除き、先に推定された plate 間の効果を含む抽出日間の変動に比べ、本データから推定される抽出日間の変動は小さくなっている。小さくなる程度が抽出法によって異なっているが、これは、同一の DNA を複数回繰り返し測定し得られる測定値の変動が、それを抽出した方法によって異なることを示唆しているのかも知れない。いずれにしても、表 7 と表 8 に示した結果の比較により、抽出日やプレート間での測定値の変動は、併行抽出間や well 間での測定値の変動に比べ大きい事が示された。昨年度は、1500 コピーに相当する RRS 特異的 DNA 配列を含む標準プラスミドを、異なるリアルタイム PCR 機器を有する 25 の試験研究機関において 1 プレート内の 96 well で測定し、得られたコピー数の変動について検討した。この検討において抽出の効果は含まれない。その結果から ABI PRISM 7900HT の結果を引用すれば、単一機関内での well 間のコピー数の変動は 5.9-10.4%(RSD)であったのに対し、一機関内で得られたコピー数の平均(機関代表値)の機関間での変動は 11.6%と推定されており、この結果も上記検討結果を補足する結果と考えられる。

実験上の分注といった操作が変動要因になることは理化学分析とも共通であると考えられる。しかしリアルタイム PCR により得られる測定値の変動はこれに比べ

て明らかに大きい。この変動には、PCR による DNA 配列の増幅および増幅に伴い生じる蛍光の検出というリアルタイム PCR に特徴的なプロセスが大きく寄与しているものと考えられる。PCR 時の酵素反応を制御する温度の管理、蛍光放射の特異性の向上、また蛍光計測の精密化などがこれらの寄与を減少させる方策として考えられるが、いずれも分析者によって実施することが難しい。

また、抽出法を1種に固定し各プレート内で推定された変動をプレート間で比較すると、抽出法間を比較した場合に比べその差が小さいことが分かる。これは、特に、繰り返し測定に伴うコピー数の変動と DNA 抽出法が相関を有する可能性を示唆しているものと考えられる。

#### C.D.-4. リアルタイム PCR 法により得られる混入率の不確かさの推定

これまでに、リアルタイム PCR 法により得られる一義的な測定量であるコピー数の不確かさを推定し、その要因について考察を重ねた。その結果は、特定の DNA 抽出法が本定量分析法に適用可能かの判断や、計測に伴う変動要因の特定およびその影響を小さくするための対応に方針を与え、推定された不確かさは、そのための指標となるものである。しかし、安全性審査を終了した遺伝子組換え食品の規格基準値は、コピー数により規定されているのではなく、これらを所定の算術式により変換して得られる混入率により定められている。従って、混入率の不確かさを推定する事が、本分析法により得られ、一般に取り扱われる「分析結果」の不確かさを推定する事となる。そこで、これまでに示したコピー数と

してのデータを混入率に変換した上で、その不確かさ推定について検討した。

表 9 には、プレート内多重測定試験によって得られた1つの試料に由来する15 well 分のコピー数の平均値(表 5)に基づき算出した混入率を、抽出法ならびに抽出日別にまとめた。Well 間でのコピー数の変動も無視できないほど大きいため、1つの試料(DNA)から得られる真のコピー数のよりよい推定値として15 well 分の平均値を使用し、混入率を算出することとした。表 10 には、プレート間繰り返し測定試験により得られたコピー数に基づき算出した混入率を、試料、抽出法、プレートの別に整理し示した。なお、プレート内多重測定試験により得られたコピー数に基づく混入率算出手順として述べたのと同じ理由から、表 6 に示した3 well 分の平均値を混入率の算出に使用した。

表 9 に示した結果から推定した混入率の変動を表 11 に示す。これは、DNA 抽出法別の  $n=10$  のデータを対象に、併行抽出間と抽出日および測定間を水準とした一元配置の分散分析によって得られた分散から推定した結果である。併行抽出と抽出日および測定に伴う分散の和を表中では「全体」として示した。また、表 10 に示した結果に基づき推定された混入率の変動を表 12 に示す。表 12 に示した結果は、併行抽出間と抽出日間を水準とした一元配置の分散分析の結果得られたそれぞれの分散から推定した結果であり、プレートごとの推定を行っているため、プレート(測定)間の効果は含まれていない。以下、表 11 と表 12 に示した混入率の変動について

考察する。

まず、表 12 をみると、混入率の変動は、抽出日間に比べ、併行抽出間で大きく推定される場合が散見される。通常の理化学分析の場合には、併行条件に比べ日間の変動はより大きく、表 12 に示した混入率を算出するために使用したコピー数についても、この傾向は維持されていた(表 10)。しかし、混入率の変動を推定する場合には、比とするそれぞれのコピー数の変動および変動間の相関が要因として加わる。プレート間繰り返し測定試験は、測定間の変動を含まないデータに基づき、併行抽出間および抽出日間の変動を明らかにすることを意図して計画した。上述した今回の推定結果からは、併行抽出間と抽出日間に分けて推定するためには、1 回の測定で得られるデータ数が不十分であったと考えざるを得ない。今後、より多数の計測を 1 回の測定で行えるようになれば、より信頼性の高いデータに基づく推定およびそれに基づく考察が可能になるかも知れない。また、混入率を重視し、それが日を変えた分析により継続して得られる実際に鑑みれば、測定間を要因に含むデータを対象に推定された不確かさが、混入率に付随する不確かさとしては、より適切であるとも考える。

表 11 に示した結果は、表 9 に示した 15 well 分のコピー数の平均値に基づき推定された混入率の変動である。結果を俯瞰すると、コピー数の変動について観察されたのと同様に、併行抽出間に比べ、抽出日および測定間の変動が明らかに大きい。また前述の計測機器の制限により、測定間の変動を含めず抽

出日間の変動を推定する事が困難なため、抽出法に付随する混入率の変動を純粹に評価する事はできない。しかし、併行抽出間と抽出日および測定間の変動の総和として得られる全体の変動を抽出法間で比較すれば、リアルタイム PCR 法に供する DNA をどの方法に従い抽出するかによって、混入率の変動が大きく変わることが強く示唆される。その大きさは RSD%として表 11 中に示しているが、mini 法で 27.3%、resin 法で 23.9%、quicker 法で 12.2%、maxi 法で 13.1%と推定される。さらに、単一試験室での日々の分析を考えた場合には、抽出法は同じものを採用し続けても、それを実施する日また測定が異なることという想定が、实际的であろう。この想定に従い、推定された RSD%を変動ではなく真値の存在する範囲として扱えば、上記の各抽出法ごとに推定された RSD%が、ある試験室が本分析法を実施して得られる混入率の標準不確かさを、採用する抽出法ごとに推定した結果となる。

## E. 結論

生化学分析法の不確かさを検討することを目的に、すでに運用されている分析法である、安全性審査を終了した遺伝子組換え大豆(RRS)を対象としたリアルタイム PCR 法を取り上げ、特に複数の方法が併記されている DNA 抽出法間の比較に重点を置き、不確かさの推定について検討した。

その結果、同一の認証標準試料から、通知されている 4 種の方法を用いて DNA を抽出した場合、抽出される DNA