

の量に方法間に有意な差があることが明らかになった。また、DNA の測定法には吸光光度法を用いることが指示されているが、本法を用いて測定される DNA 量と、より DNA を特異的に計測可能な蛍光光度法を用いて測定される量にも有意な差があり、その差の大きさが抽出法によって異なっていた。蛍光光度法により得られた濃度に基づき、分析法に規定された DNA の量を調整しリアルタイム PCR に供することで、得られるコピー数の抽出法間での差が小さくなることが示唆された。リアルタイム PCR の一義的な測定値であるコピー数の不確かさを、内在性遺伝子ならびに特異的 DNA 配列ごとに、DNA の併行抽出間、抽出日間の変動として推定した。その結果、併行抽出間に比べ測定間の効果を含む抽出日間での変動がより大きい事が明らかになった。さらに、規格基準値である混入率を、真のコピー数のよりよい推定値と考えられる 15 well 併行測定の平均値に基づき算出し、その変動を推定した結果、抽出法によってその大きさが異なり、RSD%として、mini 法で 27.3%、resin 法で 23.9%、quicker 法で 12.2%、maxi 法で 13.1%となった。この結果は、採用する DNA 抽出法によって得られる混入率の不確かさが異なることを強く示唆している。

本研究の目的ではないため、混入率の抽出法間比較および認証標準試料の付与値との差についてはあえて考察していない。また、本研究で推定された不確かさは、あくまで規定した実験計画に従い単一試験室内により得られたデータに基づき推定された大きさであるため、

異なる実験計画および他の試験室での推定結果と異なることが容易に予想され、それは自明の事である。ただし、何を目的にどのようにして不確かさを推定すべきか、その方法の一例が示されたものと考ええる。

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

「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, 50(1), 1-5 (2009)

渡邊敬浩、松田りえ子

「TaqMan Chemistry に基づくリアルタイム PCR により得られるデータの新規解析ソフトウェア(GiMlet)の開発とそれを用いた Ct 値変動要因の検討」

食品衛生学雑誌, 50 (5), 208-215(2009)

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	NTC		STD1 20コピー			STD2 125コピー			STD3 1.5kコピー			Le1	
B	STD4 20kコピー			STD5 250kコピー									
C	抽出1												
D	抽出2												
E	NTC		STD1 20コピー			STD2 125コピー			STD3 1.5kコピー			RRS	
F	STD4 20kコピー			STD5 250kコピー									
G	抽出1												
H	抽出2												

図 1-1 プレート内多重測定試験で規定したプレート上の測定位置

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	NTC		STD1 20コピー			STD2 125コピー			STD3 1.5kコピー			Le1	
B	STD4 20kコピー			STD5 250kコピー			1日目-1		1日目-2				
C	2日目-1		2日目-2		3日目-1		3日目-2						
D	4日目-1		4日目-2		5日目-1		5日目-2						
E	NTC		STD1 20コピー			STD2 125コピー			STD3 1.5kコピー			RRS	
F	STD4 20kコピー			STD5 250kコピー			1日目-1		1日目-2				
G	2日目-1		2日目-2		3日目-1		3日目-2						
H	4日目-1		4日目-2		5日目-1		5日目-2						

図 1-2 プレート間繰り返し測定試験で規定したプレート上の測定位置

表1-1 抽出されたDNAの吸光度法ならびに蛍光光度法による測定結果(mini法)

Sample	Test portion	Day	Optical densitometry					Chemiluminescence				
			1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	1		80.6	76.2	70.8	72.4	75.4	17.7	21.4	14.2	12.3	14.2
	2		73.6	72.6	73.5	69.2	82.6	14.3	20.4	15.1	10.6	20.5
	3		79.4	70.5	66.8	56.3	75.5	17.2	20.1	15.3	10.0	15.0
	4		68.3	76.3	74.2	71.2	70.4	14.2	23.7	17.7	14.8	13.3
	5		76.8	73.3	65.7	70.1	77.6	14.8	25.3	12.7	12.1	18.9
	6		64.7	66.4	63.4	58.2	55.8	15.3	20.0	13.1	11.6	9.5
Composite			74.5	74.1	70.7	67.7	75.8	15.5	24.9	16.7	10.4	16.3
2	1		74.8	70.3	72.2	63.8	78.0	20.2	21.7	15.8	14.4	20.1
	2		52.6	72.2	61.6	61.6	67.0	8.4	16.0	14.4	9.1	18.8
	3		65.9	66.7	58.3	69.0	79.0	12.7	16.5	12.8	13.7	20.7
	4		73.8	80.4	73.9	65.7	78.8	16.3	26.7	18.7	15.6	26.0
	5		69.2	75.0	66.0	62.6	76.8	14.5	20.4	12.4	11.5	17.8
	6		71.1	71.9	61.2	54.7	75.6	14.4	19.8	13.0	9.3	15.5
Composite			68.4	73.6	65.4	64.8	76.9	14.0	24.3	18.3	10.3	19.7

ng/ μ L

表1-2 抽出されたDNAの吸光光度法ならびに蛍光光度法による測定結果 (res in法)

Sample	Test portion	Optical densitometry					Chemiluminescence					
		Day	1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	1		293.4	320.9	256.7	354.2	307.9	122.3	110.3	86.3	126.8	99.3
	2		346.7	346.5	293.2	302.6	240.9	126.2	109.9	91.5	95.5	99.1
	3		307.1	326.5	298.4	322.4	311.3	109.1	113.5	91.4	102.5	97.1
	4		287.6	306.7	213.2	318.0	274.6	110.1	105.2	80.3	98.7	103.0
	5		288.5	319.3	278.7	318.3	277.6	111.2	112.9	89.4	107.9	112.3
	6		301.3	312.4	297.6	329.2	285.4	118.6	105.1	87.7	109.5	124.1
Composite			304.0	321.8	273.0	324.8	283.6	125.6	123.9	85.8	112.4	98.5
2	1		322.4	324.5	376.1	331.5	265.4	113.0	110.6	111.5	100.2	122.4
	2		334.3	344.0	347.4	369.8	268.7	110.9	122.4	105.5	112.3	105.7
	3		290.1	328.3	345.7	335.1	295.8	104.1	118.3	109.5	108.4	106.0
	4		338.3	306.9	353.3	357.6	292.2	133.6	92.6	103.7	107.0	111.2
	5		299.5	388.3	367.0	337.5	288.0	107.1	124.5	104.8	107.1	110.7
	6		340.4	332.0	331.0	289.9	311.0	129.7	102.1	103.4	97.9	115.3
Composite			317.1	339.4	350.9	336.3	282.2	120.4	124.4	105.8	102.9	104.5

ng/μL

表1-3 抽出されたDNAの吸光光度法ならびに蛍光光度法による測定結果(quick法)

Sample	Test portion	Day	Optical densitometry					Chemiluminescence				
			1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	1		86.3	82.1	86.2	82.0	81.9	87.4	85.5	85.0	75.1	107.4
	2		100.6	89.3	102.7	89.0	77.2	90.0	87.1	101.0	82.0	84.4
	3		92.1	95.0	91.3	96.3	83.4	85.1	91.6	90.4	91.8	85.3
	4		111.9	89.6	101.4	93.6	84.9	86.7	89.4	92.0	87.8	90.1
	5		94.8	81.2	99.6	89.7	80.9	81.3	81.1	88.5	89.8	84.0
	6		99.8	112.1	88.2	95.8	82.4	94.8	108.5	86.8	96.2	89.9
Composite			97.6	91.9	93.6	88.3	86.6	94.1	100.7	102.0	98.0	97.0
2	1		62.8	96.5	68.8	78.9	89.7	46.0	103.7	58.6	76.5	90.7
	2		59.9	84.4	81.1	78.0	93.7	50.4	80.0	78.3	76.4	78.0
	3		60.8	85.9	85.4	90.0	90.9	47.5	83.7	81.0	83.6	90.1
	4		67.6	114.9	65.2	85.8	98.7	51.7	109.4	55.9	82.0	99.3
	5		58.5	85.7	67.7	79.8	84.6	48.0	80.8	60.0	74.8	80.6
	6		85.1	74.2	78.1	69.1	87.5	56.0	68.1	62.4	63.6	94.0
Composite			67.0	90.8	74.3	81.0	92.0	59.4	95.2	75.1	94.4	90.8

ng/μL

表1-4 抽出されたDNAの吸光度法ならびに蛍光光度法による測定結果(maxi法)

Sample	Optical densitometry					Chemiluminescence					
	Day	1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1		240.3	136.9	119.7	130.9	154.1	88.1	56.5	59.1	53.9	40.0
2		202.1	189.8	132.6	130.1	115.5	85.5	83.4	56.6	54.7	40.9
3		112.0	143.0	139.1	115.0	89.6	64.2	63.0	46.0	43.1	36.9
4		92.6	157.8	157.1	114.9	97.6	45.1	68.3	53.0	49.0	32.7

ng/ μ L

図2 DNA濃度の散布図 (左: 吸光度法、右: 蛍光光度法)

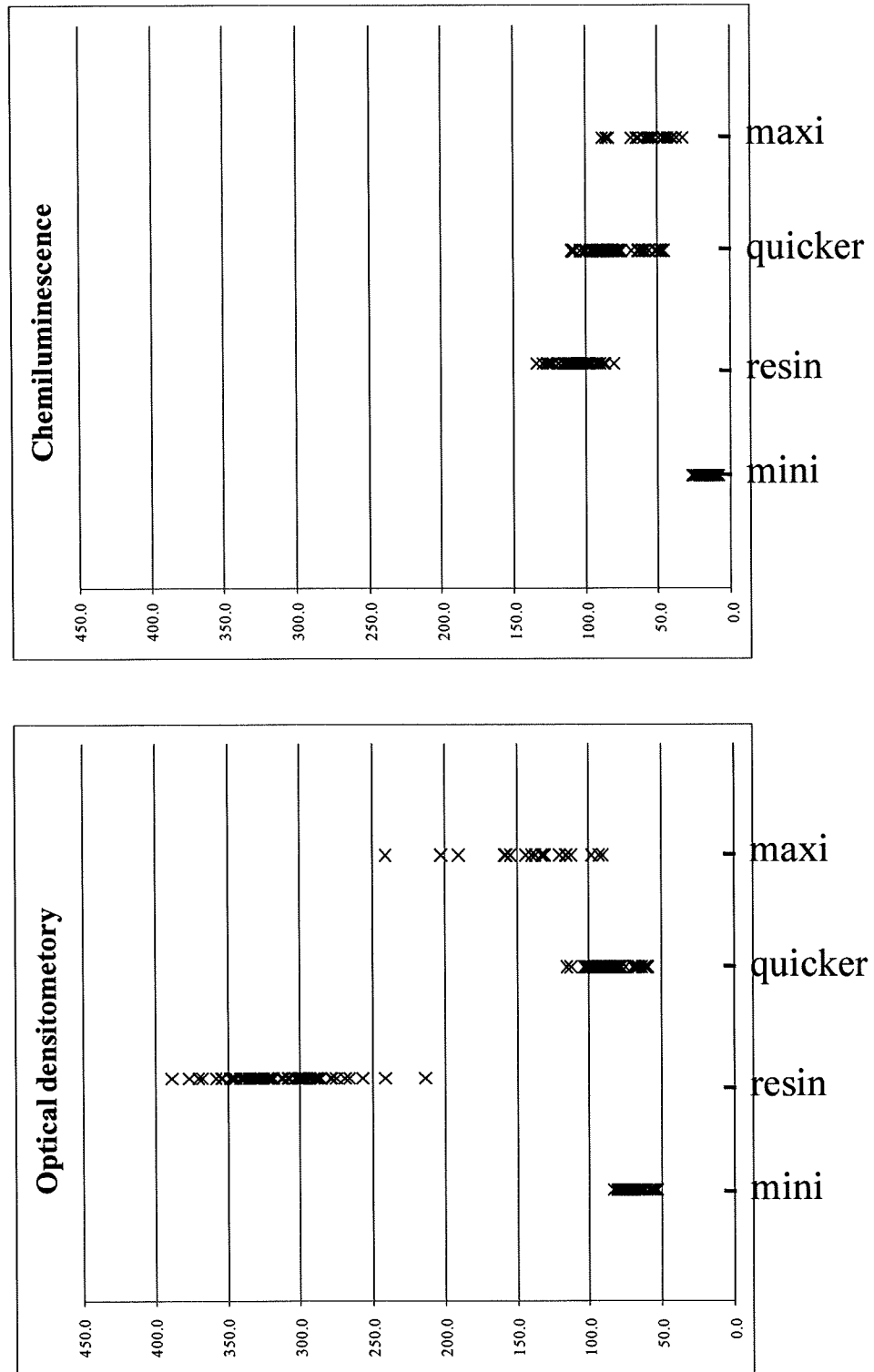


表2 吸光度法と蛍光光度法により得られるDNH濃度の平均値の差の検定

抽出法	測定法			t値	P (%)
	Optical densitometry	Chemiluminescence	平均値の差		
mini	69.9	16.0	53.9	84.1	-
resin	314.1	107.8	206.3	53.7	-
quicker	85.8	81.5	4.4	4.1	0.01(0.006)
maxi	138.5	56.0	82.5	90.3	-

測定結果の単位はng/μL
 maxi法を除く3抽出法のデータ数はn=60
 maxi法のデータ数はn=20

表3 4種のDM抽出法の併行並びに室内精度

	Optical densitometry				Chemiluminescence			
	mini	resin	quicker	maxi	mini	resin	quicker	maxi
総平均(ng/μL)	71.2	313.3	86.3	138.5	17.0	110.4	90.7	56.0
Repeatability	3.9	8.3	13.7	26.5	7.7	6.7	15.7	19.8
Reproducibility	6.4	8.5	13.7	28.3	30.9	12.5	15.7	36.9

Repeatability、ReproducibilityともにRSD%として示した。
 maxi法を除く抽出法については、compositeの濃度をデータとし、1日2併行抽出、5日間繰り返しのセットとして解析した。
 maxi法については、1日4併行抽出、5日間繰り返しのデータセットとして解析した。

表4-1 プレート内多重測定試験により得られた全測定値 (DN抽出法 : mini法)

Sample	well position	Day	Le1					RRS				
			1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	B7		33608	35049	28680	43860	26479	1173	733	705	740	452
	B8		35696	37910	26799	48154	30762	1223	667	729	719	484
	B9		35537	41275	26705	47559	28299	1271	826	649	809	455
	B10		34976	40270	25668	41458	27199	1158	740	656	755	468
	B11		36591	36391	27974	44172	28553	1239	755	716	756	487
	B12		37429	35445	28766	43312	30034	1207	732	772	822	434
	C1		32614	34412	26243	40511	23274	1315	781	624	881	479
	C2		37338	38054	27294	44792	24134	1187	760	766	798	449
	C3		34703	35624	31600	39174	25790	1260	680	760	872	435
	C4		35522	37088	26972	42457	25016	1270	684	778	859	466
	C5		38475	34574	28075	42529	22842	1163	745	659	802	480
	C6		33585	34208	27103	44598	25589	1185	673	691	860	488
C7		36507	36428	27899	40705	22996	1230	764	674	825	455	
C8		33362	35871	29689	41963	25130	1214	734	641	772	453	
C9		38041	36836	29324	42896	24501	1199	724	644	874	388	
2	F7		38051	35238	27715	47836	28203	1178	769	767	992	506
	F8		39753	36302	26669	44928	30922	1155	726	668	936	484
	F9		36302	37269	28247	48291	28202	1231	685	678	962	491
	F10		35866	37413	27695	45950	26026	1126	828	589	894	469
	F11		34558	37129	24620	46728	26940	1210	832	631	861	485
	F12		35637	35257	29930	50511	29148	1028	797	588	846	497
	G1		39148	35908	26159	52025	24694	1181	661	696	872	528
	G2		37856	35802	27969	50774	29434	1186	802	607	876	444
	G3		36933	34977	27088	47453	27730	1168	802	510	878	473
	G4		39193	38060	24831	47213	26566	1165	743	523	767	468
	G5		37764	34385	24313	46880	29139	1166	782	504	911	518
	G6		35492	37838	27196	49443	26811	1184	773	692	927	501
G7		40931	38115	26422	44674	28421	1220	796	641	949	456	
G8		38431	40925	29994	47535	29870	1086	750	637	891	499	
G9		38645	37028	28694	49064	28361	1195	702	587	806	447	

copies

表4-2 プレート内多量測定試験により得られた全測定値(DM抽出法：resin法)

Sample	well position	Day	Le1					RRS				
			1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	B7		61716	51906	66824	65338	51130	1162	1082	1285	1058	1092
	B8		64889	53068	58229	60610	64515	1168	941	1309	1176	1222
	B9		66793	51782	66455	80717	62541	1351	1037	1339	1214	1088
	B10		71995	53654	57910	64303	70047	1257	1021	1264	1235	1185
	B11		68040	60480	65065	63660	74926	1207	1090	1352	1293	1228
	B12		70592	55460	56335	60627	71017	1270	1003	1424	1211	1245
	C1		56357	68067	52321	66459	85113	1292	907	1147	1032	1018
	C2		63578	68902	48171	63841	84982	1278	1018	1106	1110	1201
	C3		58266	72914	48759	65098	89995	1323	1052	1224	1098	1199
	C4		68227	70557	47848	67504	95702	1216	1006	1218	1167	1088
	C5		62269	63494	46389	63224	98305	1242	1040	1136	1234	1251
	C6		60547	67092	40132	63456	87179	1110	956	1133	1152	1196
C7		58201	67021	46891	60688	87438	1111	948	1291	1113	1128	
C8		62885	65768	43664	62032	89650	1219	998	1096	1144	1218	
C9		62176	65369	49204	62439	102252	1270	1003	1323	1158	1274	
2	F7		74913	72186	51300	72516	98827	1331	1145	1250	1279	1339
	F8		76002	72265	50839	80682	100229	1273	1156	1218	1245	1285
	F9		71691	75567	51871	73193	98812	1264	1076	1266	1261	1188
	F10		67474	69968	52164	68603	105352	1108	1116	1096	1234	1187
	F11		69519	75207	48486	68124	100107	1256	1078	1277	1328	1219
	F12		67381	75063	47115	64618	99614	1173	983	1228	1278	1110
	G1		71928	75503	51389	72876	102853	1207	985	1204	1240	1102
	G2		68041	76293	50199	65883	100169	1211	1004	1297	1125	1140
	G3		71568	74455	50911	71886	100610	1089	978	1215	1135	1086
	G4		67586	74518	50387	65400	99242	1068	993	1129	1173	1094
	G5		71552	74400	49654	72559	107836	1180	1098	1243	1202	1111
	G6		71656	75860	50326	66058	107240	1283	1111	1185	1220	1150
G7		71054	77756	50118	71355	103069	1227	1035	1219	1197	1157	
G8		73717	78925	52653	75103	105267	1164	1059	1226	1285	1152	
G9		72356	75377	51222	64980	100672	1153	964	1246	1291	1167	

copies

表4-3 プレート内多重測定試験により得られた全測定値(DNA抽出法: quicker法)

Sample	well position	Day	Lel					RRS				
			1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	B7		41134	44206	41476	45703	60874	1049	958	1282	1104	1262
	B8		40781	41103	46022	35570	61714	1148	1002	1200	1048	1274
	B9		46561	45235	40129	46711	67137	1229	999	1318	1159	1332
	B10		42692	38645	42381	44353	56811	1068	1032	1316	1053	1193
	B11		47647	41954	43144	46953	55591	1150	972	1229	1034	1316
	B12		37645	29694	35502	40540	51489	980	786	1324	1025	1300
	C1		28587	38315	30435	36799	36676	1077	912	952	1014	1287
	C2		35197	39762	35672	42445	44680	1080	988	1200	956	1295
	C3		35312	41969	41080	48668	48520	1128	1105	1423	1095	1261
	C4		39545	43988	38899	47549	51376	1239	995	1244	1160	1466
	C5		36127	47715	41467	47365	49184	1153	981	1233	1103	1289
	C6		39598	44914	44080	45935	46063	1315	1047	1336	954	1237
C7		38383	43338	38281	48407	49570	1236	1071	1304	1051	1316	
C8		38394	50292	43600	51873	50913	1115	1013	1213	1060	1229	
C9		38113	40279	45080	51576	50707	1202	974	1158	1044	1320	
F7		37692	47031	49397	44414	61923	1265	1065	1433	1072	1597	
F8		39840	55009	50002	47063	61670	1185	1007	1319	931	1575	
F9		33294	37913	39421	36809	52324	1002	904	1256	995	1531	
F10		32277	31905	29232	31129	41506	855	700	1014	791	1341	
F11		36973	32640	34378	37208	52383	1027	884	1158	1017	1392	
F12		34405	30939	39575	38560	54764	1008	945	1177	915	1339	
G1		37989	41312	41809	40499	57388	1062	991	1343	1012	1470	
G2		40291	40056	42321	43106	60885	1002	970	1288	1078	1440	
G3		37056	42184	46280	44421	58054	1017	908	1362	1022	1344	
G4		41472	39165	41788	45067	59051	970	918	1321	1041	1472	
G5		37410	38517	46217	41219	55267	1048	984	1244	941	1394	
G6		39355	36550	45971	42711	65633	1032	886	1213	937	1404	
G7		40930	40810	43946	44240	60535	1006	926	1243	988	1384	
G8		42050	43448	46767	44278	62090	958	876	1219	864	1309	
G9		32390	33152	38667	41877	56451	838	602	980	865	1261	

copies

表4-3 プレート内多重測定試験により得られた全測定値(DNA抽出法：quicker法)

Sample	well position	Day	Le1					RRS				
			1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	B7		21480	20897	25170	20348	44838	269	359	480	380	750
	B8		21393	21826	26917	19252	43819	327	366	466	390	844
	B9		21985	22238	25992	21950	46792	288	425	486	388	813
	B10		22248	21547	24564	20418	47624	293	474	478	486	736
	B11		21212	20631	25106	20291	44189	265	488	497	413	812
	B12		21876	22011	25651	20405	40278	289	465	560	372	795
	C1		20754	20702	22576	19665	42795	332	411	413	397	827
	C2		19014	21686	23218	22027	45499	320	395	479	507	774
	C3		21301	20173	25779	22343	45927	246	461	527	475	792
	C4		20332	22863	23586	22156	42954	275	543	509	502	775
	C5		20655	22181	22964	20889	42808	329	457	434	407	866
	C6		19986	21794	24202	22309	44563	307	426	465	480	741
C7		19961	21086	25482	20479	42805	297	367	484	460	825	
C8		21822	21676	26484	21836	45933	303	425	452	429	766	
C9		20931	22982	26039	22107	40211	309	474	502	453	805	
F7		26464	26468	26865	30018	38306	439	421	464	606	789	
F8		27317	25240	26884	29392	41059	456	512	490	638	698	
F9		28119	23261	25746	30078	15451	349	502	497	629	756	
F10		25644	24668	24028	29584	39144	446	479	483	616	656	
F11		28179	25407	24832	28007	37438	392	445	469	623	621	
F12		26506	28370	25079	29216	38525	410	412	486	522	689	
G1		26317	27053	25759	28305	39234	378	440	460	638	748	
G2		28468	24437	26213	30351	40213	410	373	504	592	719	
G3		32179	17878	23663	28870	32104	395	437	531	647	674	
G4		26929	26144	27544	27385	38354	402	398	498	558	723	
G5		29160	27604	26706	29165	35625	432	412	544	545	716	
G6		26310	23085	23531	28110	39273	353	460	450	570	632	
G7		30884	23695	24008	32654	43268	464	427	504	570	666	
G8		30160	27160	27293	30770	39122	396	472	516	483	701	
G9		28954	26718	25205	27301	37114	434	486	510	611	722	

copies

表5 多重測定試験により得られたコピー数の平均値

Method	Day	Le1										RRS				
		Sample 1		Sample 2		Sample 1		Sample 2		Sample 1		Sample 2				
		Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)			
mini	1	35599	5.1	37637	4.8	1220	3.7	1165	4.5							
	2	36629	5.6	36776	4.5	733	5.9	765	7.0							
	3	27919	5.5	27169	6.4	698	7.6	621	12.0							
	4	43209	5.7	47954	4.4	810	6.5	891	6.6							
	5	26040	9.5	28031	5.8	458	5.7	484	5.2							
resin	1	63769	7.2	71096	3.8	1232	5.8	1199	6.3							
	2	62369	11.8	74890	2.9	1007	5.1	1052	6.2							
	3	52947	15.9	50576	2.8	1243	8.1	1220	4.3							
	4	64666	7.6	70256	6.5	1160	6.1	1233	4.7							
	5	80986	18.1	101993	3.0	1175	6.3	1166	6.1							
quicker	1	39048	11.9	37562	8.6	1145	7.7	1018	10.4							
	2	42094	11.3	39375	16.0	989	7.4	904	12.9							
	3	40483	10.3	42385	13.2	1249	8.6	1238	9.9							
	4	45363	10.5	41507	9.9	1057	5.7	958	8.3							
	5	52087	14.4	57328	10.1	1292	4.8	1417	6.9							
maxi	1	20997	4.3	28106	6.7	297	8.6	410	8.5							
	2	21620	3.7	25146	10.2	436	11.8	445	8.9							
	3	24915	5.4	25557	5.3	482	7.4	494	5.3							
	4	21098	5.0	29280	4.8	436	10.8	590	8.1							
	5	44069	4.9	36949	17.4	795	4.8	701	6.6							

copies

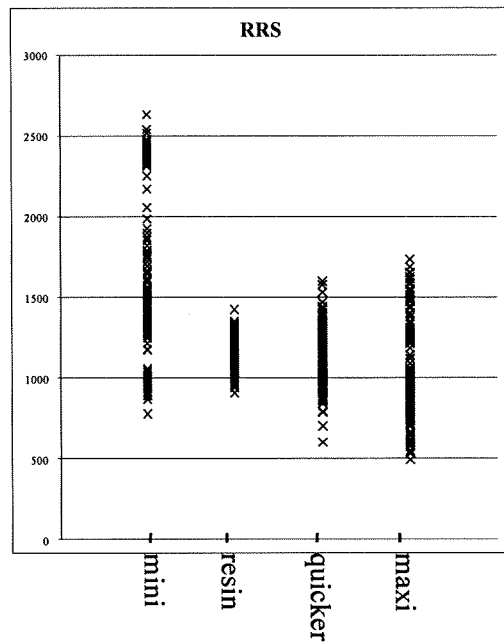
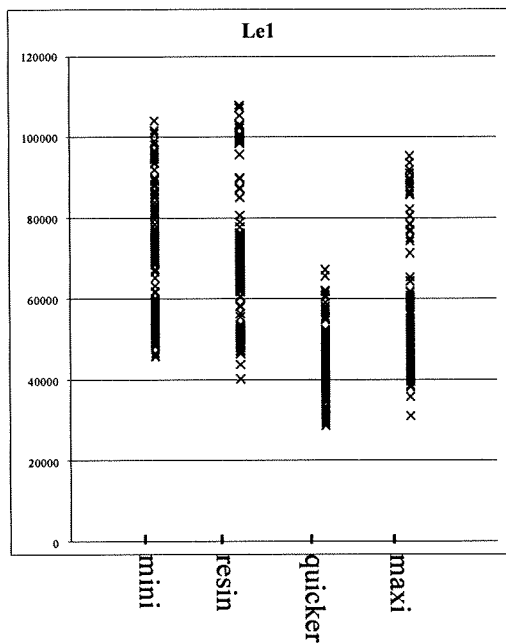
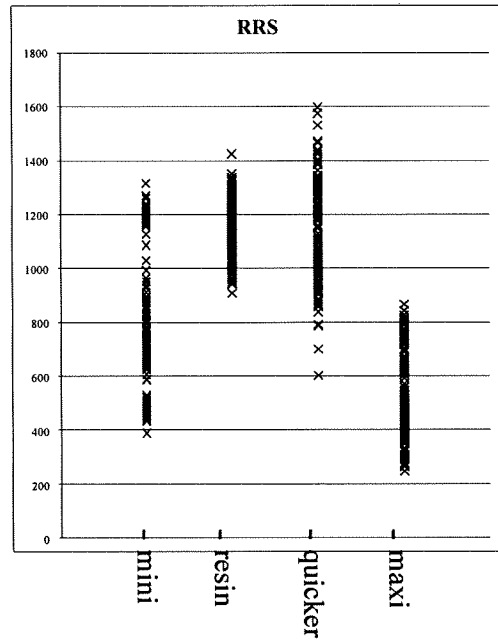
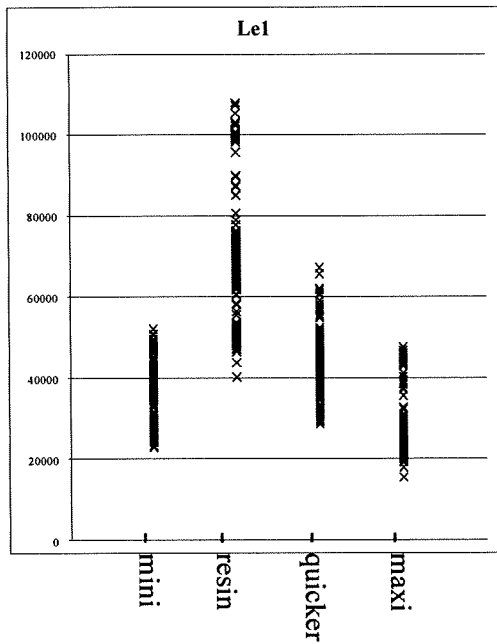


図3 プレート内体重測定試験により得られたコピー数の散布図
 (上段:コピー数の散布図、下段:計測に供したDNA量を補正するためmini法とmaxi法については便宜的に係数2を乗じた結果)

表6 プレート間繰り返し測定試験により得られた全測定値
(1つのDMRに対し併行で測定された3 well分の測定値の平均値として示した)

Method	Plate No.	D1S1		D1S2		D2S1		D2S2		D3S1		D3S2		D4S1		D4S2		D5S1		D5S2																																
		B7-9		F7-9		B10-12		F10-12		C1-3		G1-3		C4-6		G4-6		C7-9		G7-9		C10-12		G10-12		D1-3		H1-3		D4-6		H4-6		D7-9		H7-9		D10-12		H10-12												
		LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS	LeI	RRS													
mini	1	32883	584	32170	628	25508	504	22701	476	25846	497	24747	511	24202	463	27035	509	34601	707	41026	777																															
	2	42214	625	37184	642	32095	531	30602	538	34728	482	28147	572	33273	513	34979	508	45549	795	52727	814																															
	3	39303	721	29242	707	39303	624	29242	596	29281	679	28120	696	25350	542	22301	584	37222	760	41440	858																															
resin	1	51409	1173	54850	1254	46662	1042	46746	1053	46362	1188	50363	1225	52059	1046	56416	1188	52158	1174	58169	1239																															
	2	63520	1289	70090	1308	64160	1262	64423	1188	60879	1232	61373	1232	68634	1133	72889	1330	74336	1289	78689	1340																															
	3	62708	1275	71704	1407	62708	1199	71704	1141	70122	1228	68663	1304	71494	1240	77584	1307	78841	1285	75547	1387																															
quicker	1	48316	1276	46072	1344	35610	1312	44711	1230	46827	1307	44540	1303	37147	1074	37502	1103	42218	1107	46700	1139																															
	2	71817	1376	76011	1376	67860	1251	77684	1336	74090	1265	82213	1385	70168	1153	68678	1122	70883	1163	81374	1297																															
	3	89124	1333	81067	1342	89124	1176	81067	1237	67248	1193	72632	1326	62905	1203	59486	1113	61318	1138	68726	1259																															
maxi	1	20390	377	26914	577	24413	508	28667	594	30522	570	34079	594	24850	510	32516	670	45458	912	40091	752																															
	2	19615	353	25500	550	22628	520	26078	553	30026	595	30825	601	23231	458	30501	602	42682	828	37830	740																															
	3	19958	329	26436	523	19958	487	26436	513	29961	520	29568	531	23380	455	31390	587	45340	806	38988	653																															

表中のDOSOはサンプル名を表しており、Dは抽出日、Sは同日中に併行抽出された試料を意味する。一例：D1S1は1日目抽出された試料を表す。

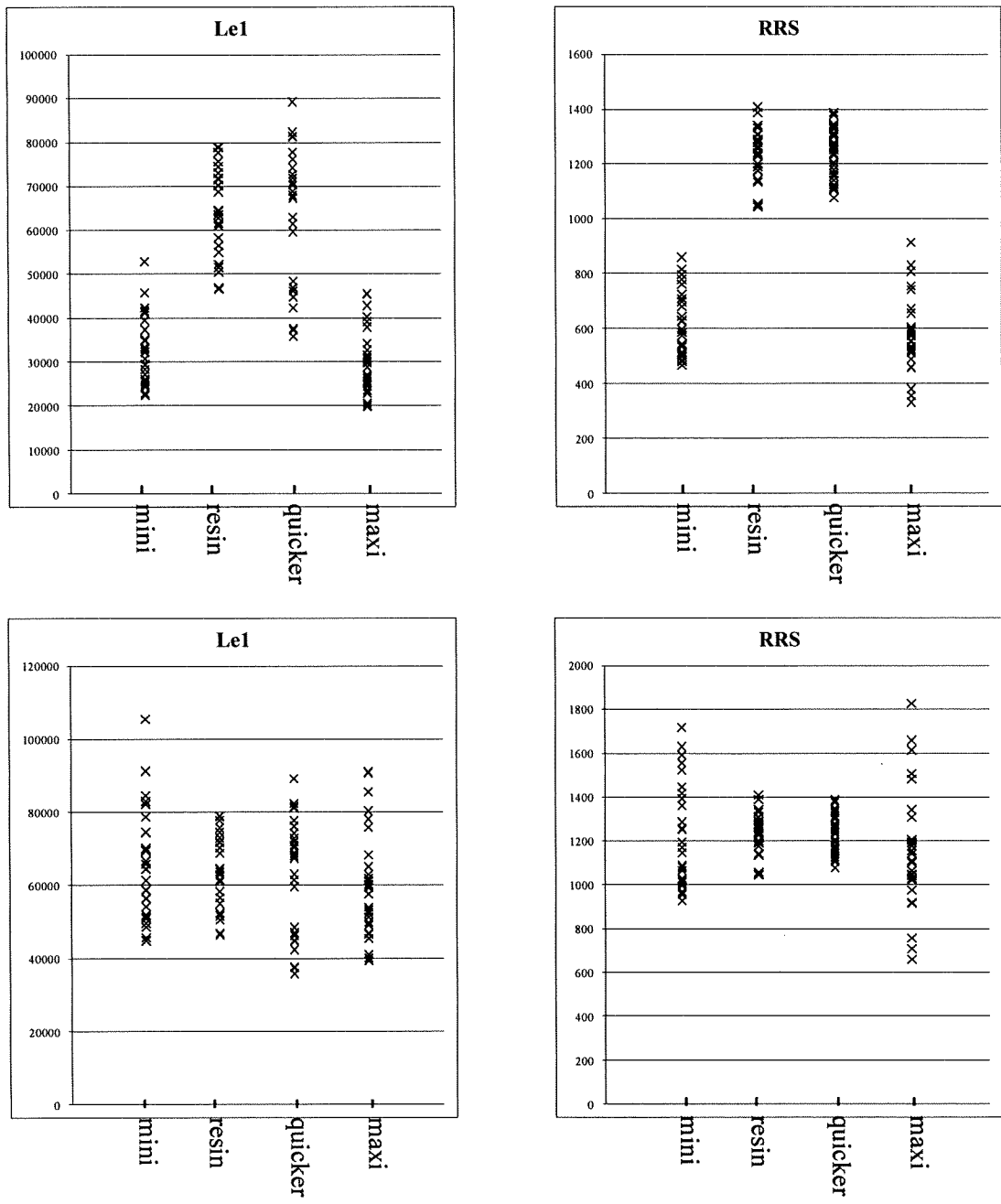


図4 プレート間繰り返し測定試験により得られたコピー数の散布図
 (上段:コピー数の散布図、下段:計測に供したDNA量を補正するためmini法とmaxi法については便宜的に係数2を乗じた結果)

表7 プレート内多量測定試験により得られた測定値の分散分析結果から推定されるコピー数の変動

Methods	Data set 1						Data set 2				
	Targeted DNA seq.	well 間	SD (コピー数)		RSD %		SD (コピー数)		RSD %		
			併行抽出 (同日内2併行)	抽出日及び測定間	併行抽出 (同日内2併行)	抽出日及び測定間	併行抽出 (5日間)	抽出日及び測定間	併行抽出 (5日間)	抽出日及び測定間	
mini	Lel	1952	1792	4853	6	5	14	1767	7580	5	22
	RRS	50	0	169	6	0	22	41	266	5	34
resin	Lel	6546	9782	8953	9	14	13	8298	12938	12	19
	RRS	71	0	51	6	0	4	30	78	3	7
quicker	Lel	5223	0	4008	12	0	9	2357	6188	5	14
	RRS	94	40	106	8	4	9	70	162	6	14
maxi	Lel	2541	2720	4518	9	10	16	4255	6495	15	23
	RRS	8	4	9	8	8	18	68	139	13	27

Data set 1について、well間、併行抽出、抽出日及び測定間としたデータの自由度はそれぞれ、140、1、4となる。

Data set 2について、併行抽出、抽出日及び測定間としたデータの自由度はそれぞれ、5、4となる。

測定値の分散が併行抽出間に比べwell間で大きい場合、併行抽出間のSDは0とした。

表8 プレート間繰り返し測定試験により得られた測定値の分散分析結果から推定されるコピー数の変動

Method	Plate	Le1						RRS		
		SD (コピー数)		RSD %		SD (コピー数)		RSD %		
		併行抽出 (5日間)	抽出日	併行抽出 (5日間)	抽出日	併行抽出 (5日間)	抽出日	併行抽出 (5日間)	抽出日	
mini	1	2427	5644.1	8	19.4	31	108.0	6	19.1	
	2	3539	7081.6	10	19.1	30	121.1	5	20.1	
	3	3638	5489.2	12	17.8	36	91.9	5	13.6	
resin	1	2881	3155.1	6	6.1	57	61.7	5	5.3	
	2	2838	5620.5	4	8.3	69	0	5	0	
	3	4139	3311.0	6	4.6	64	52.2	5	4.1	
quicker	1	3366	3336.4	8	7.8	36	102.4	3	8.4	
	2	5407	0	7	0	64	80.2	5	6.3	
	3	4553	8779.8	7	12.7	66	50.7	5	4.1	
maxi	1	4011	6840.9	13	22.2	100	113.7	16	18.8	
	2	3515	6549.9	12	22.7	83	110.9	14	19.1	
	3	3922	7248.5	13	24.8	89	94.0	16	17.4	

測定値の分散が抽出日間に比べ併行抽出間で大きい場合、抽出日間のSDは0とした。

表9 プレート内多重測定試験結果に基づき算出される混入率

Method	Sample	Day				
		1st	2nd	3rd	4th	5th
mini	1	3.43	2.00	2.50	1.87	1.76
	2	3.10	2.08	2.29	1.86	1.73
resin	1	1.93	1.61	2.35	1.79	1.45
	2	1.69	1.40	2.41	1.75	1.14
quicker	1	2.93	2.35	3.08	2.33	2.48
	2	2.71	2.30	2.92	2.31	2.47
maxi	1	1.41	2.02	1.93	2.07	1.80
	2	1.46	1.77	1.93	2.01	1.90

%