

監査できる。

- c) 評価の範囲、すなわち評価が制度全体を対象とするのか、あるいはその下位構成要素、措置、技術要件、又は製品を対象とするのかを明示すべきである。
- d) 輸出国の公的検査認証制度の評価要件を含め、利用する予定の評価手段を指定すべきである。

32. いかなる場合においても、輸入国の管轄当局は、輸出国の管轄当局が手配や情報収集などの必要な準備を行えるよう、予定している評価について十分な通知を行うべきである。評価の理由が重大な公衆衛生問題にある場合には、事前通知には公衆衛生リスクの緊急性を反映させるべきである。

33. 評価の要請が輸出国からなされた場合には、輸入国は遅滞なく対応し、評価の実施を明言すべきである<sup>5</sup>。

### 評価の準備

34. 評価手段、期間、及び必要な情報の交換を含めて、評価を行うための計画は、然るべき期間を残して作成し輸出国の管轄当局に伝達すべきである。計画には以下を含める必要がある。

- a) 単独の評価であるか、他の評価（例えば以前の評価のフォローアップ）又は一連の評価に伴うものであるかを含めて、評価の目的と範囲
- b) 記録及び評価チェックリストを含む、点検／実施すべき項目/要素
- c) 評価を実施及び報告する予想期間
- d) 輸出国の公的検査認証制度の評価を行う際の基準
- e) 評価計画の詳細を協議できる評価チームの連絡担当者、及び必要な場合には外国の監査官／検査官、主任監査官／検査官、技術者、通訳を含む評価チームのメンバー
- f) 翻訳、公平で見識の高い通訳及び人材の可用性を含めて、評価期間に使われる言語
- g) 視察する場所のタイプ又は可能／適切な場合にはその特定（例えば事務所、研究所、又はその他の施設）、及び必要な場合にはその場所に通知を行う時期と責任の指定（この作業は監査の初回／入口会議（entry meeting）でも行える）
- h) 評価の実施日、開始及び最終会議日、ならびに評価結果の報告予定日
- i) 評価視察の必要性に応じて、出張の日程及びその他の手配
- j) 秘密情報を保護するための規程

35. 評価計画の遵守に向けて努力は払われるべきであるが、監査前又は監査期間中に収集された情報に基づき重点を変更できるよう、計画は柔軟に立てるべきである。評価計画の重大な修正は酌量すべき事情がある場合に限り提案されるものとし、これを行う管轄当局は可能な限り速やかに他方の管轄当局に伝達すべきである。

36. 評価計画の一環として、両国の管轄当局は、所見、不遵守、勧告などの評価結果を輸出国に伝達する方法について合意すべきである。

37. 翻訳、公平で見識の高い通訳及び人材の可用性を含めて、評価期間に使われる言語について事前

<sup>5</sup> CAC/GL 20-1995 パラグラフ 18。

に合意がなされるべきである。

38. 評価に先立ち、可能な場合には常に電子的手段を用いて、評価の計画、実施、完了に必要とされる最大限の記録情報を請求及び提供すべきである。

- a) 評価の準備を要請する際には、所定の範囲と目的を明確化し、またそれらに関連付けるべきである。
- b) フォローアップ評価の場合には、輸出国が提供を求められる情報は以前の評価から変化した情報、又は以前の評価では請求されなかった情報のみとすべきである。
- c) 情報請求の目的が輸出国にとって不明確であり、請求された情報に関して何らかの問題がある場合には、輸出国は輸入国にその情報の目的と用途の明確化を求めることができる。
- d) 提案された評価手段が現地視察である場合には、評価視察の開始に先立ち、法的支援を含めて制度を説明した文書を検討すべきである。これにより、現地で費やされる時間を最も効率的かつ効果的に利用すること、つまり評価に伴う両国の管轄当局の負担を軽減することが可能となる。

39. 輸出国の管轄当局が提供する情報の性質によって現地視察の前に評価が中止又は完了する場合もあり、その際には輸入国の管轄当局は輸出国の管轄当局にその理由を明確に伝達すべきである。輸出国の管轄当局が必要と認めた場合には、輸出国の管轄当局は当該情報を明確化する機会を得るべきである。

40. 評価による情報の共有の利用と情報を共有できる当事者について、事前に合意がなされるべきである。

## 評価の手配

41. 評価に現地視察が含まれる場合には、輸出国の管轄当局は国内旅行や宿泊先の手配に関する助言を含めて、評価の手配面に関する主な責任を負うべきである。評価を受ける場所の責任者との連絡は、輸出国の管轄当局の責任である。

## 評価の初回／入口会議

42. 評価に視察が含まれる場合には、初回又は入口会議を開くべきである。

- a) この会議は、輸出国の管轄当局が指定した場所で開かれるべきである。
- b) この会議では、最終調整を含めて評価計画のあらゆる側面を検討すべきであり、輸出国の公的検査認証制度の概要を説明すること、及び評価のパラメータと手配を確認することを目的とする。
- c) 評価期間における両者間の継続的な連絡と情報交換を確保する方法について、合意がなされるべきである。

## 評価の終了／出口会議 (Exit Meeting)

43. 評価に視察が含まれる場合には、終了又は出口会議を開くべきである。
- a) この会議は、輸出国の管轄当局が指定した場所で開かれるべきである。
  - b) 評価チームは主な所見と暫定的結論をまとめるべきである。不適合を特定し、結論を裏付ける客観的証拠を概説する必要がある。不適合の是正は輸出国の管轄当局に委ね、必要であればフォローアップ評価を含めて輸入国の管轄当局が検証すべきである。
  - c) この会議は、会議で提示された所見と結果について質問し、又は明確化を求める機会を輸出国の管轄当局に提供する。

## セクション 6- 評価報告

原則 F 及び G では、評価報告について取り上げる。

### 原則 F

合意された是正措置、期限、及びフォローアップ検証の手順を明確に定め、文書化すべきである。

### 原則 G

最終評価報告書は正確かつ透明であるべきであり、必要に応じて情報の秘密性を尊重しつつ公表することができる。

44. 報告書作成への協力的なアプローチ及び配布・提示プロセスについて、事前に合意がなされるべきである。
45. 評価を行った当事者は、合意された期間内に報告書案に目を通し、その完成の前に意見を提供し、事実誤認を是正する機会を得るべきである。最終報告書には輸出国の管轄当局が提供した意見が盛り込まれ、又は添えられるべきである。
46. 評価報告では所見の公平な全体像を提示し、これらの所見を正確に反映させた結論と勧告を含めるべきである。その要件は以下の通りである。
- a) 目的、範囲、及び結果を説明する。
  - b) 基準及び評価プロセスを説明する。
  - c) 終了会議で検討された重要事項の詳細とともに、各結論を裏付ける証拠を添えた評価所見を含める。
  - d) 報告の正確性を高めるために輸出国の管轄当局の意見を含め、またこれに対応しつつ、輸入国と輸出国の管轄当局間の合意に基づき利用できるようにする。
  - e) 輸入国と輸出国の管轄当局間で合意された報告書の完成期限と対応手順を考慮する。
  - f) フォローアップ検証をどのように完了するかを含めて、是正措置を伝達しこれに合意する方法を含める。
  - g) 所見を裏付けるために必要な場合には、評価された要素のチェックリストを含める。
  - h) 評価結果の概要を含める。
  - i) 結論及び対応する是正措置について合意が得られていない場合には、評価中に生じた未解

決の事項や問題を報告に含める。

- j) 評価結論の信頼性に影響を与えそうな不確定要素及び／又は生じた障害を含める。
- k) 範囲に含まれながら評価プロセスで取り上げられなかった分野と、合意された範囲からそのような逸脱が生じた理由を指摘する。

47. フォローアップ検証を行う場合には、その期間と手順を明示すべきである。是正措置の検証には以下を含めることができる。

- a) 輸出国の管轄当局が提供する保証の再検討
- b) 輸出国の管轄当局が提供する文書の再検討
- c) 後続の評価に示された是正措置の再検討

48. 評価報告書の作成とその後の配布においては、秘密情報を尊重しなければならない。

49. 評価報告書が完成した時点で、輸入国と輸出国の管轄当局は、必要に応じて情報の秘密性を尊重しつつ、報告書の一部又は全体を公表することの是非及びその方法について協議し、可能であれば合意すべきである。

## 食品中の特定 DNA 配列及び特定タンパク質の検出、同定、定量のための分析法の性能規準及びバリデーションに関するガイドライン原案\*

(手続きのステップ 5/8)

### セクション 1—はじめに

1. 分子分析法及び免疫分析法は現在、食品中の DNA 及びタンパク質分析対象成分の測定手段として認められている。しかし、こうした分析法によって異なる試験所から得られた結果が信頼に足るものとして広く受け入れられるためには、その方法が一定の品質基準を満たすことが必要である。
2. 本ガイドラインは、食品中の特定 DNA 配列又は特定タンパク質の検出を目的に開発された分析法の性能をバリデーションするための適切な基準を提供する。
3. 本ガイドラインの最初のパートでは、特定 DNA 配列及び特定タンパク質の分析法のバリデーションについて全般的な考察を提示する。また付属文書ではそれぞれ、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法のバリデーション、定性的 PCR 法のバリデーション、及びタンパク質ベースの分析法のバリデーションに関する情報を取り上げる。

### セクション 1.1. 目的

4. 本書の目的は、食品中の特定 DNA 配列及び特定タンパク質の検出、同定、定量のために行われ、異なる試験所で実施された場合に同等の再現性で結果が得られる分子法及び免疫法の確立を支援することである。
5. 本ガイドラインでは、バリデーションの適切な基準を定め、特定の分析法がこれらの基準を満たすかをその性能特性に基づき明らかにすることにより、食品中の特定の DNA 配列及びタンパク質を検出及び同定する分析法を確立するための指針の提供を目指している。

本ガイドラインは以下により適切な基準を定め、これらの基準の考え方を説明する。

- 最も関連する基準の論拠を提示すること
- 特定の分析法が所定の基準要件を満たすかを見極める方法を明示すること

---

\* 例えばモダンバイオテクノロジー応用食品、食品認証、食品特定、その他の目的に適用

## セクション 1.2 範囲

6. 本ガイドラインは、モダンバイオテクノロジー応用物質を含有する食品を含めて、食品中に存在する可能性のある特定の DNA 配列及びタンパク質の検出、同定、定量を伴う食品分析法のバリデーション基準に関する情報を提供する。これらの分子法と免疫法は、モダンバイオテクノロジー応用食品を含む食品中のバイオマーカーの検査や食品認証などの幅広い用途に適用でき、食品分析に責任を負う試験所によって利用される可能性がある。

## セクション 2—分析法のバリデーション

7. コーデックス委員会は、ISO 5725:1994 又は AOAC/IUPAC 統一プロトコルに基づく国際的に認められたプロトコルに準拠した共同試験によりバリデーションされた分析法の受け入れを重視している。この分野では、共同試験データが存在しない場合は暫定措置として形式的な単一試験所バリデーションを採用する必要があると考えられる。

しかし、DNA 配列及びタンパク質の分析法は、多くの試験所で行うことができなければならない。

### セクション 2.1—基準アプローチ

8. 本ガイドラインでは「基準アプローチ」を適用する。

### セクション 2.2—分析法の一般基準

9. コーデックス手続きマニュアルでは、分析法の選択に関する一般基準を採用している。本ガイドラインでもこれらの基準を適用し、適切な付属文書に追加基準を記載する。

### セクション 2.3—バリデーションプロセス

10. 分析法のバリデーションは、特定の分析法の性能特性と限界を確認するプロセスである。バリデーションプロセスの結果には、どの干渉が存在する場合にどの種の基質においてどの分析対象成分を確認することができるかが記載される。バリデーションを行うことにより、検査した条件下での特定の分析法の精度と真度が得られる。

11. 分析法の形式的バリデーションは、以下の主要な段階を含む長いプロセスの結論である。

- ・ **分析法のプレバリデーション** プレバリデーションは、必要に応じて個別に行うべきである。プレバリデーションでは、バリデーション試験の結果がうまく得られるような形で分析法が機能するよう保証すべきである。つまり、プレバリデーションは、その分析法が意図された目的

に対して適切であるという証拠を提示しなければならない。プレバリデーションは、2~4つの試験所を参加させて行うことが望ましい。統計分析（例えば「反復性」や「再現性」の）は、その後使用されるバリデーション手順に照らして行うべきである。

- ・分析法のバリデーション 共同試験によるバリデーションは実施費用が高く、通常は単一試験所試験とプレバリデーション試験の両方において、分析法が許容可能な性能を持つと認められた場合に限り行われる。

## セクション3-DNA配列及びタンパク質の検出、同定、定量のための分析法のバリデーションに関する具体的考察

### セクション3.1-形式的バリデーション法の開発

12. DNAベースの分析の一般的な方法は、特定の（標的）DNA配列の検出に使用できるPCRに基づく方法である。タンパク質に対する一般的なアプローチでは、酵素免疫吸着測定法（ELISA）と側方流動装置を利用する。DNAベースの分析では、同じ目的を達成する他のDNAベースの分析法も適切にバリデーションされれば利用できるが、PCRアプローチが現在最も広く適用されている。ここでは、DNAベースとタンパク質ベースの両アプローチについて検討する。

#### セクション3.1.1-分析法の許容基準（バリデーションの必要条件）

13. 付属文書Iで詳述するように、バリデーションの前に分析法を評価するため、分析法とその試験の両方に関する情報が必要とされる。

14. 分析法の評価においては、その分析法をコーデックス目的で使用するための原則的な前提条件が満たされていることを確認すべきである。このセクションでは、プレバリデーションと完全な共同試験を実施するために、分析法が満たすべき許容基準を記載する。

#### セクション3.1.2-分析法の適用性

15. 分析法の適用性は、その分析法を必要な性能で対象食品に使用できるかを確認することにより判定でき、それは明確に示されるべきである。特にDNA配列及びタンパク質の分析においては、DNAとタンパク質が変性している場合もあることから、単一の生の基質に適用できる何らかの分析法が必ずしも複雑な基質及び／又は加工食品に適用できるとは限らない。

16. 分析法は原則として、対象の基質に適用できなければならない。さまざまな食品基質中のDNA配列とタンパク質を同定及び定量する「汎用」の分析法の場合には、一般的な食品基質に適用できる少なくとも一つの抽出法が利用できるべきである。

### セクション 3.1.3—原則条件

17. DNA ベースの分析法では、特定 DNA 配列のレベルを検出及び同定すべきであり、また定量することができる。タンパク質ベースの分析法では、製品における特定タンパク質のレベルを検出及び同定すべきであり、また定量することができる。

18. 現在、DNA ベースの検出法は一般に PCR 法で構成され、以下が含まれる。

- ・ 関連基質に適用できる抽出法を説明したプロトコル
- ・ 使用する装置を含めて、標的 DNA 配列の検出に PCR を使用できる条件を説明したプロトコル
- ・ 標的 DNA 配列を一意的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマー配列に関する説明
- ・ 適用できる場合には、標的 DNA 配列を一意的に同定する蛍光オリゴヌクレオチドプローブ配列に関する説明
- ・ 抽出／増幅プロセスの失敗による陰性結果を識別するため、また分類群特異的 DNA に対する標的 DNA の量を定量するため、特定の分析対象成分の有無に関わらず、従来の食品基質に存在するはずの分類群特異的 DNA 配列を増幅するオリゴヌクレオチドプライマー配列に関する説明
- ・ 適用できる場合には、分類群特異的 DNA 配列を一意的に同定する蛍光オリゴヌクレオチドプローブ配列に関する説明
- ・ DNA の検出に使用する方法に関する説明
- ・ 適切な対照試料及び基準
- ・ 結果の導出に使用する計算に関する説明

19. タンパク質ベースの分析法は、一般に定量法又は定性法で構成される。通常これらは免疫吸着分析システムであり、以下によって構成される。

- ・ 関連基質に適用できる抽出法を説明したプロトコル
- ・ 使用する装置を含めて、標的タンパク質の検出に免疫吸着分析を使用できる条件を説明したプロトコル
- ・ 抗体被覆サポート
- ・ 酵素結合二次抗体
- ・ 発色酵素基質
- ・ 洗浄緩衝液及び試料抽出緩衝液
- ・ タンパク質の検出に使用する方法に関する説明
- ・ 適切な対照試料及び基準
- ・ 結果の導出に使用する計算に関する説明

20. 分析法は以下の要件を満たすべきである。



- ・タンパク質ベースの分析法では、特定の抗原又はエピトープの明確な検出、同定、及び／又は定量が可能であるべきである。
- ・DNA ベースのスクリーニング法は、複数の生物に存在する標的 DNA の検出に使用する。例えば、複数の形質転換事象の検出に使用されるスクリーニング法では、いくつかの形質転換事象に共通する標的 DNA 配列の検出が可能であるべきである。
- ・類似した生物と混在している可能性のある特定の生物の明確な検出、同定、及び／又は定量に使用される DNA ベースの特異的方法では、その生物に特有又は特異的な DNA 配列の明確な検出、同定、及び／又は定量が可能であるべきである。例えば、単一の形質転換事象の検出に使用される標的的特異的分析法では、その形質転換事象に特有又は特異的な DNA 配列の明確な検出、同定、及び／又は定量が可能であるべきである。食品認証に関しては、必要に応じて特異的標的配列が分類群を一意的に定義すべきである。
- ・標的 DNA の検出又は相対的定量に使用される DNA ベースの分類群特異的分析法では、その分類群に特有又は特異的な DNA 配列の明確な検出、同定、及び定量が可能であるべきである。
- ・相対的定量に使用される標的及び分類群特異的分析法については、例えばプローブのハイブリダイゼーション又はこれと同等の適切な方法による増幅断片の同定が推奨される。

#### セクション 3.1.4—測定単位及び結果の報告

21. 各分析法についてはその使用の前に、適切な測定単位（例えば標的コピー数やモル当量）、性能及びデータの報告基準を特定すべきである。定性分析については、結果を「検出」又は「不検出」として提示できるため、測定単位は存在しない。
22. 測定結果は重量／重量又は相対的割合として明示できるが、現在の方法（DNA 又はタンパク質ベース）ではそれらを直接測定することは不可能である。

#### セクション 3.1.5—測定の不確かさ

23. コーデックス「測定の不確かさに関するガイドライン（CAC/GL 54-2004）」に記載の通り、試験所ではその定量的測定の不確かさを推定する必要がある。試料調製と分析法は、分析測定の評価に際して検討すべき二つの重要なエラーの原因である。本ガイドラインに従いバリデーションされた分析法を使用する分析者は、その結果の不確かさを推定できるよう十分な情報を持つべきである。
24. 詳細はコーデックス手続きマニュアルの「測定の不確かさに関するガイドライン（CAC/GL 54-2004）」、「分析結果の活用：サンプリング計画及び分析結果・測定の不確かさ・回収率とコーデックス規格の条項の関係」のセクションを参照。

#### セクション 3.1.6—分析法のバリデーションへのモジュール式アプローチ

25. 「分析法」とは、特定の基質における測定量を推定するために必要なあらゆる実験手順を意味している。特定の物質については、方法には PCR 又は免疫吸着分析システムにおける DNA 若しくはタンパク質の抽出及び最終的な定量、又は定性法による分析対象成分の有無の判定のためのプロセスが含まれることもある。このような場合には、抽出から分析段階までのつながり全体が一つの分析法を構成する。しかし、バリデーションされた分析法のプロセスが同じである限り、その後行われるいくつかの異なった分析に同じ試料調製（例えば粉碎）法を同じ DNA 又はタンパク質単離プロセスと併用して経済効率を達成することも可能である。

26. バリデーションされた分析法に異なった DNA 又はタンパク質の単離プロセスなどの代替プロセスを代用することは、その代用が分析法の性能に影響しないことを示す追加試験を行わない限り不適切と考えられる。

## セクション 3.2—共同試験の要件

### セクション 3.2.1—一般的情報

27. 共同試験の目的は、プレバリデーション又は単一試験所におけるそれまでの試験によって得られたデータの妥当性を確認し、反復性と再現性に関して方法の精度を判定することである。

28. バリデーション試験によって報告されるあらゆる性能パラメータの値は、慎重に解釈及び比較すべきである。厳密値とその解釈は、分析法の性能に加えて、分析法の範囲によっても左右される可能性がある。

29. ISO 5725:1994 又は AOAC/IUPAC 統一プロトコルに従い共同試験が行われた場合には、その情報を分析法の許容性の評価に利用できる。

### セクション 3.2.2—性能最低要件

30. 共同試験においては、分析法の性能は分析法の許容基準の関連部分に適合しているべきであり、また共同試験に関して以下に具体的に定める分析法の性能要件を満たしていなければならない。特に、感度及び反復性／再現性の標準偏差と真度に関する基準との適合性を評価すべきである。

31. 共同試験の実験データからは、分析法の許容基準に加えて、少なくとも付属文書 I に記載の分析法の性能要件を評価すべきである。

32. 分析法及びそれに関連したバリデーションデータは、バリデーション及び共同試験によって得られる科学的知識と経験の進歩に伴い定期的に修正されることになる。本ガイドラインは、バリデーションプロセスの作業手順に関する実用的な情報によって補完される。

### セクション 3.2.3—共同試験の試験物質

33. 原則として、分析法は対象の基質（つまり何らかの特定が行われているもの）に対して適用及び試験されるべきである。

34. プロトコルの抽出段階に対する物質／基質の影響は、あらゆる分析にとって重要である。バリデーション試験の結果を報告する際には、どの基質が分析されたか、分析の対象として精製タンパク質又は DNA が使われたかを詳細に報告することが重要である。

### セクション 3.2.4—分析法のバリデーションに関する具体的情報

35. 定量及び定性的 PCR 法のバリデーションに関する具体的な情報は、それぞれ付属文書 II 及び III に記載されている。

36. タンパク質ベースの定量及び定性法のバリデーションに関する具体的情報は、付属文書 IV に記載されている。

## セクション 4—品質管理要件

### セクション 4.1—試験所の品質

37. CAC/GL 27 では、輸入及び輸出食品を扱う試験所についての指針を提供している。この指針は、ISO/IEC 規格 17025 の遵守、検定試験及び内部品質管理、並びにコーデックスの要件に従いバリデーションされた分析法の使用に基づくものである。

### セクション 4.2—標準物質

38. 分析法のバリデーションには、一般に適切な標準物質が必要とされる。DNA 配列及びタンパク質の検出法のための標準物質又は作業基準の開発にはいくつかの基質が利用でき、それぞれが特定の目的に対して固有の利点と欠点を持っている。特定の分析法に対する標準物質の適切性は、その物理的形狀によって決まる。粉末材料に関しては、標準物質とルーチン試料の粒度分布の違いが、サンプリング誤差による標的タンパク質又は DNA の抽出効率と分析法の再現性に影響を及ぼす可能性がある。

39. DNA ベースの分析法の標準物質としては、分析対象成分を含む基質、分析対象成分を含む基質から抽出された DNA、特定 DNA を含むプラスミド、又は認定された標準物質が利用できない場合には、例えば検定試験制度からの対照試料物質が利用できる。プラスミド又はアンプリコン DNA を

使用する場合には、プラスミド又はアンプリコン DNA が必要な目的に確実に適うものとなるよう、これらに組み込む選択肢を慎重に検討する必要がある。

40. タンパク質ベースの分析法の標準物質としては、例えばそれ自体が組換え微生物（大腸菌など）から精製されたタンパク質、粉碎した植物基質（一般に葉や穀粒）、又は加工食品の断片などが利用できる。

## セクション 5—技術的及び方法論的情報

**DNA 及びタンパク質ベースの分析法の技術的及び方法論的側面については以下を参照：**

Allmann M, Candrian U, Hoefelein C, 及び Luethy J (1993 年)。「ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)：食品の安全性と品質を保証する免疫化学法の代替可能性」。Lebensm. Unters. Forsch 196:248-251。

Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H, 及び Van den Eede G (2002 年)。「農作物及び植物由来食品中の遺伝子組換え生物 (GMO) を検出及び測定するための分析法」。European Food Research and Technology 214:3-26。

Asensio L (2007 年)。「レビュー：魚類・水産製品の認証のための PCR ベースの分析法」。Trends in Food Science & Technology 18(11): 558-566。

Asensio L, Gonzalez I, Garcia T, 及び Martin R (2008 年)。「酵素免疫吸着測定法 (ELISA) による食品の真正性の判定」。Food Control 19:1-8。

Carnegie, PR (1994)。「食品産業における DNA 技術を用いた品質管理」。Australas. Biotechnol. 4(3):146-9。

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez -Martin RI, Pardo MA, Pérez -Villareal B, Gilardi P, 及び Riese J (2007 年)。「種の同定のために缶詰のマグロの筋肉から DNA を抽出する方法の比較」。Food Control. 18(10):1211-1215。

コーデックス委員会手続きマニュアル。「分析結果の活用：サンプリング計画及び分析結果・測定の不確かさ・回収率とコーデックス規格の条項の関係」

CAC/GL 54-2004。「測定の不確かさに関するコーデックスガイドライン」

Colgan S, O'Brien LO, Maher M, Shilton N, McDonnell K, 及び Ward S (2001 年)。「肉及び骨粉における種の同定のための DNA ベースの分析法の開発」。Food Research International 34(5):409-414。

- Dahinden I, von Büren M, Lüthy J (2001 年)。「セリアック病患者用の無グルテン食品における小麦、大麦、ライ麦の汚染を検出するための定量的競合 PCR システム」。European Food Research and Technology 212(2):228-233。
- Dieffenbach CW 及び Dveksler GS (1993 年)。「PCR 試験所の設置」。PCR Methods Appl. 3(2):S2-7。
- ISO 5725:1996。「測定の方法と結果の正確性 (真度と精度)」。ジュネーブ：国際標準化機構。
- ISO 21569:2005。「食品－遺伝子組換え生物及び由来製品の検出のための分析法－核酸ベースの定性法」。ジュネーブ：国際標準化機構。
- ISO 21570:2005。「食品－遺伝子組換え生物及び由来製品の検出のための分析法－核酸ベースの定量法」。ジュネーブ：国際標準化機構。
- ISO/DIS 24276:2006。「食品－遺伝子組換え生物及び由来製品の検出のための核酸ベースの分析法－一般要求事項と定義」。ジュネーブ：国際標準化機構。
- ISO/IEC Standard 17025:2005。「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」。ジュネーブ：国際標準化機構。
- Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins R, Lipp M, Shan G, Stave J, 及び V. Pantella (2007 年)。「農業バイオテクノロジーにおける分析ツールとしての免疫測定法」。Journal of AOAC International. 85: 3, pp 780-786。
- Holst-Jensen A 及び Berdal KG (2004 年)。「食品及び飼料中の遺伝子組換え物質のモジュール式分析手順、バリデーション方法、及び測定単位。」Journal of AOAC International 87(4):927-36。
- Horwitz E。「分析法の性能試験の設計、実施、及び解釈に関する ISO/AOAC/IUPAC 統一プロトコル (1995 年)」。Pure and Applied Chemistry 67:331-343。
- Kwok S 及び Higuchi R (1989 年)。「PCR による偽陽性の回避」。Nature 339(6221):237-238。
- Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D, 及び Song P (2005 年)。「農業バイオテクノロジーにおける分析ツールとしてのポリメラーゼ連鎖反応技術」。Journal of AOAC International 88 (1):36-155。
- Meyer R, Candrian U (1996 年)。「食品成分の同定と特性解析のための PCR ベースの DNA 分析」。Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 29(1-2):1-9。

Mifflin TE (2007 年)。「PCR 試験所の設置」。Cold Spring Harbor Protocols 14 (doi:10.1101/pdb.top14)。

Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJP, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JPPF, 及び Zagon J (2004 年)。「食品生産チェーンにおける遺伝子組換え生物の検出とトレーサビリティ」。Food and Chemical Toxicology 42:1157-1180。

Newton CR, Herbitter A, 及び Gubler U (1995 年)。「PCR: 必須データ」。Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons。

Olexova L, Dovičovičová L, Švec M, Siekel P, Kuchta T (2006 年)。「ポリメラーゼ連鎖反応による小麦粉及び『無グルテン』ベーカリー製品中のグルテン含有穀物の検出」。Food Control 17(3):234-237。

Poms, RE; Klein CL, Anklam E (2004 年)。「食品中のアレルギー分析法: レビュー」。Food Addit. Contam. 21(1):1-31。

Trapmann S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood RKS, Žel Jana (2009 年)。「GMO 試験所のための測定の不確かさに関する指針書」。EUR - Scientific and technical research series. Luxembourg: Office for official publications of the European communities。

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli M, 及び Marmiroli N (2010 年)。「各種トマト製品のトレーサビリティのための DNA 抽出法の評価」。Food Control. 21(2):143-149。

Williams R (2005 年)。「優良食品と偽造食品の識別に役立つ遺伝子検査」。Nature 434:262。

Woolfe M 及び Primrose S (2004 年)。「食品の鑑識: 誤記及び偽装に対抗するための DNA 技術の活用」。Trends in Biotechnology 22(5):222-6。

## 付属文書 I：分析法のバリデーションを検討する際に必要な情報

### 分析法の説明

1. 分析法のあらゆる構成要素について、完全かつ詳細な説明を提供すべきである。例えば、PCR 法及びタンパク質法のためのマルチプレートの使用について明確に取り上げるべきである。説明には分析法の範囲に関する情報も含めるべきであり、また以下とともに測定単位を明示すべきである。

### 分析法の目的及び妥当性

2. 分析法においてはその目的を示すべきである。分析法は意図された用途に適うものでなければならない。

### 科学的根拠

3. 分析法が基づいている科学的原理（例えばリアルタイム PCR 法の使用の基礎となる分子生物学）の概要を提示すべきである。

### 分析法に必要な予測モデ／数理モデルの詳細

4. DNA 配列及びタンパク質の検出と定量に使用される DNA 及びタンパク質ベースの技術は、さまざまな原理に基づいている。PCR においては、標的 DNA は指数関数的に増幅される。さらに、リアルタイム PCR による定量は、しばしば二つの独立した PCR 分析法、すなわち標的 DNA に対するものと分類群特異的 DNA 配列に対するものに基づいている。免疫吸着測定法では PCR と対照的に、当初の各標的分子に対する一層又は複数の抗体層の結合が含まれ、シグナルの増幅はレポーター分子の数と、適用できる場合には酵素反応時間に比例する。

5. 結果の導出が数学的関係に依存する場合には、これを概説し記録すべきである（例えば  $\Delta\Delta C_t$  法、又はその他の方法によって得られる回帰線や校正曲線）。また、モデルの正しい適用に関する指示を提供すべきである。そこには分析法に応じて、分析するレベルの推奨数と範囲、ルーチン分析に含めるべき複製及び／若しくは希釈の最小回数、又は適合度を評価するための方法及び信頼区間を含めることができる。

### DNA ベースの分析法に必要な具体的情報

6. DNA ベースの分析法については、特に以下の追加情報を提供すべきである。

## プライマー対

7. 一般的分析法では、所定のプライマー対及びそれが標的とする配列を提示する必要がある。そのプライマーがスクリーニング及び／又は定量に適しているかを含めて、プライマーセットの効率／使用に関する推奨事項を明示しなければならない。

### ・アンプリコンの長さ

8. 食品の加工は一般に標的 DNA の分解を招く。増幅産物の長さは PCR 成績に影響を及ぼす可能性がある。したがって、(妥当な範囲内で) 短いアンプリコンを選択すれば、高度に加工された食品の分析において陽性シグナルが得られる可能性が高まることになる。一般に、分類群特異的 DNA 配列と標的配列の増幅断片の長さは同様の範囲内にすべきである。

### ・分析法は機器特異的か、化学特異的か

9. 現在、いくつかの異なった種類のリアルタイム機器と化学が利用できる。これらの機器や化学は、試薬の安定性や加熱・冷却特性など、ランプ速度や PCR の全工程の所要時間に影響を及ぼすさまざまな性能を持つ可能性がある。

10. 加熱・冷却システムの相違に加えて、蛍光の誘導とその後の記録に使用される技術とソフトウェアの相違も存在する。また蛍光の検出と定量も、使用される記録装置やソフトウェアに応じて変化する可能性がある。定性法は一般に、定量法に比べて機器特異性が低い傾向を持つ。

11. 分析法は一般に機器及び化学に依存し、評価及び／又は変更を行わずに他の機器や化学に転換することは不可能である。

### ・単一又は多重 PCR 増幅が行われているか

12. 単一反応に複数のプライマーセットを使用することを多重 PCR と言う。

13. 提供する情報においては、試験所間での移転可能性に関する分析法の堅牢性を立証すべきである。つまり、分析法はそれを開発した試験所に加えて、他の一つ以上の試験所によって試験される必要があるということである。それは、分析法のバリデーションを成功させるための重要な前提条件である。

## タンパク質ベースの分析法に必要な具体的情報

14. タンパク質ベースの分析法については、以下の追加情報を提供すべきである。



## アッセイの適用性

15. 食品の加工は一般に標的タンパク質の分解又は変性を招き、それが免疫反応を実質的に変化させる可能性がある。免疫測定法は、加工製品中の標的への適用性について評価を受けるべきである。加工食品中の標的に対する分析法の適用性を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

## フック効果

16. 抗体ベースの側方流動装置やプレート形式のアッセイでは、フック（飽和）効果が偽陰性結果をもたらすことがある。作用濃度範囲が標的分析試料の現実的な必要を十分に満たすことを、徹底的に立証する必要がある。したがって、標的基質におけるフック効果を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

## 確認法

17. 免疫測定法については、抗体が基質中に存在する他のタンパク質と交差反応する可能性があるため、測定法の選択性を立証する必要がある。確認法として別の方法も利用できる。既知濃度の同じ分析試料のアリコートを用いて両方の分析法を試験することで得られる経験的結果を提示できる。

## 分析法の性能に関する情報

### 選択性試験

18. 動物及び植物由来物質、異種系統、又は標的 DNA 配列など、使用すべき適切な陰性対照が定義されている場合には、分析法はその使用について明確にしなければならない。

19. 非標的種／変種からの DNA 及び標準種／変種材料からの DNA で分析法を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。この試験には、感度の限界が正確に試験されるよう、密接に関係する材料及び事例を含めるべきである。さらに、特に分類群特異的 DNA 配列に関しては、偽陽性が出る可能性を低下させるため、類似した食品のその他のソースを試験することが適切と考えられる。

20. 同様に、タンパク質法については、非標的及び密接に関係する種／変種／形質、精製標的タンパク質、及び／又は標準陽性対照物質からのタンパク質を用いて分析法を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

## 安定性試験

21. 必要に応じて異種、亜種、変種、栽培品種、動物系統、又は微生物菌株を用いて、(標準及び標的 DNA 配列の両方、又はタンパク質を検出するための) 分析法を試験することで得られる経験的結果を、例えば分類群特異的遺伝子 DNA のコピー数や配列保存の安定性、又はタンパク質発現の安定性を立証するために提示できる。

22. タンパク質法については、必要に応じて標的物質及びその派生/加工製品を用いて分析法を試験することで得られる経験的結果を、タンパク質の免疫反応型の安定性を立証するために提示すべきである。

## 感度試験

23. 分析法の感度を試験するために異なった濃度で分析法を試験することにより得られる経験的結果を提示すべきである。検出限界 (LOD) は、単一成分のみで構成された試料を用いて明らかにできる。多成分で構成される食品については、抽出される DNA の総量が二つ以上の成分に由来するため、開始時の実際の測定量が減少することから、実際の感度は低下することになる。

24. 必要であれば、各分析法及び基質について LOD を測定すべきである。

## 堅牢性試験

25. 分析法のパラメータの小さいが意図的な変動に対して分析法を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

## 抽出効率

26. 各基質における抽出効率について分析法を試験することで得られる経験的結果を、抽出が十分かつ再現可能であることを立証するために提示すべきである。定量的検出については、不完全抽出の較正方法を提示する必要があるだろう。

## 分析法の実用性

### 適用性

27. 分析法を適用できる基質 (例えば加工食品、原料等)、試料の種類、及び範囲を提示すべきである。また、分析法の関連する限界についても説明すべきである (例えば他の分析対象成分による干渉、又は特定の状況には適用できないことなど)。限界には可能な限り、費用、機器、オペレーター

及び／又は環境のいずれかにまつわる特異的及び非特異的リスクによって生じ得る制約も出来る限り含めることができる。

### 分析法の操作特性と実行可能性

28. 分析自体と試料調製に関して、分析法を適用するために必要な機器を明示すべきである。また、費用、現実的な困難、オペレーターにとって重要性を持ち得るその他のあらゆる要素に関する情報も提供すべきである。

### 実験デザイン

29. ラン、試料、複製、希釈等の数に関する詳細を含めて、実験デザインを提示すべきである。

### オペレーターの技能要件

30. 提案された分析法を正確に適用するために必要な実用的技能について、説明を提供すべきである。

### 分析対照

31. 可能であれば、分析法の適用に際しての対照の適切な使用を示すべきである。対照は明確に指定し、その解釈を記録すべきである。これらには、陽性対照と陰性対照、その詳細な内容、それらが使用されるべき範囲、及び得られた値の解釈を含めることができる。

32. 以下を提示すべきである。

- ・ 使用される分析対照の種類
  - i. 陽性及び陰性対照
  - ii. 適用できる場合には、使用される内部対照（競合的又は非競合的）
  - iii. 基質対照（PCR に試料が添加されたことを確認するため）又は抽出処理など、その他の種類の対照
- ・ 対照試料
- ・ 使用される標準物質

### 分析法の性能

33. 分析法がその意図された目的に適合することの全般的評価とともに、セクション 2.2、「分析法の一般基準」に記載された基準に関するデータを提供すべきである。

## 付属文書 II : 定量的 PCR 法のバリデーション

### はじめに

1. DNA ベースの分析は一般に PCR を用いて行われる。この技術は、特定の DNA 断片を機器によって（例えば蛍光分析による手段を用いて）測定可能な量まで増幅する。食品加工作業（例えば加熱、酵素、機械的せん断）は、DNA の分解又は総量の減少を招く可能性がある。分析法は、可能であれば相対的に短い標的特異的又は分類群特異的 DNA 配列を増幅すべく設計されるべきである。

2. 定量的決定は、分類群特異的 DNA 配列に対する標的特異的 DNA 配列の割合によって示されることが多い。このような相対的定量試験では実際に、PCR ベースの二つの測定が含まれることになる。すなわち、標的特異的 DNA 配列の測定と、内在性又は分類群特異的配列の測定である。これらの測定にはそれぞれ特有の不確かさがあり、この二つは異なった測定特性を持つことが多い。ほとんどの適用では、標的 DNA 配列は低濃度で現れ、分類群特異的 DNA 配列はその 10~1000 倍の濃度で現れることになる。したがって、両方の測定に適切なバリデーションが重要である。測定結果をパーセンテージとしてそのまま表示する場合には、分析法のバリデーションに際してこれらの要素を考慮すべきである。コピー数などのその他の測定単位でも結果を報告することができる。

3. 結論を言えば、DNA、特に加工食品中の DNA の分析は、多くはナノグラム/グラム範囲以下の極めて少量の標的特異的 DNA の検出を目的とする。定量 PCR 分析の結果は、特定の食品基質における比較分類群/種 DNA の総量に対する標的 DNA の相対量として%で示されることが多い。食品基質には、他の多くの種/分類群の DNA も相当量含まれている可能性がある。

4. 分析法のバリデーションは二つの段階で構成される。第一段階は、再現性を除く上記すべてのパラメータの試験所内バリデーションである。第二段階は共同試験で、その主な成果は反復性及び再現性の測定と、試験所間での分析法の移転可能性に関する詳細な情報である。大規模な試験を実施する費用が発生する前に、小規模な共同試験を通して特定の分析法の一般的な堅牢性を試験することが強く推奨される。分析法又はその説明に改善を要する場合、予備試験の実施によって生じる費用は限られているが、分析法の説明が曖昧であるために試験所間で行われる完全な分析法のバリデーションが失敗に終われば、極めて大きな損失が生じることになる。さらに、既にバリデーションされた分析法をある試験所で実施する場合には、実施される分析法がローカル条件下でも試験所間分析法バリデーションでの性能と同じ性能を発揮することを確認するための必要な実験を含めなければならない、との指摘もあるだろう。分析法が実行される条件を用いて分析法をバリデーションすべきことに留意することが重要である。

### バリデーション