

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

5. 定量的 PCR 分析法は、意図する使用又は適用に関してバリデーションを受けるべきである。ISO

5725:1996 又は AOAC/IUPAC 統一プロトコルは化学分析法を対象に開発されたものであり、分析法のバリデーションに必要な手順を定めている。統一プロトコルのあらゆる原則及び規則は定量的 PCR 法に適用できることを重視することが重要である。

6. 定量的 PCR 分析法の性能のバリデーションに含まれるいくつかのパラメータを、以下に詳細に検討する。すなわち、範囲、LOD と LOQ、真度、精度、感度、及び堅牢性である。その他の重要な要素として、許容基準と結果の解釈、及び結果を示す単位の問題についても取り上げる。

7. パーセンテージ値の解釈については一般的な科学的議論が存在する。成分の重量と DNA 分子数の相関に不確かさが存在することから、今のところ重量対コピー数の信頼できる関係は存在しないと認識されている。重量対重量比とコピー数対コピー数比の計算は、それが結果の報告に際して明示されれば、両方ともに許容できる。

8. 選択性と感度を含む下記のすべてのパラメータは、標準・標的特異的 PCR 分析を含めて、アッセイごと個別に評価されなければならない。これらは、重要度ではなくアルファベット順に記載する。

適用性

9. 分析法が適用される可能性のある分析対象成分、基質、及び濃度を提示すべきである。

10. 抽出法からは、それが適用される基質とは関わりなく、分析法の後続の段階の性能（例えば PCR 段階における DNA の十分な増幅）を適切に評価できるよう、十分な量の DNA、構造上の完全性と純度が得られなければならない。

11. リアルタイム PCR 分析では、PCR の効率を推定するために Ct 値を利用できる。効率は、例えばテンプレート DNA の希釈シリーズを調製し、各希釈の Ct 値（測定される蛍光シグナルがユーザーの定めた閾値に達した時のサイクル数の閾値）を判定することにより試験できる。増幅効率が 100% の理想的な状況では、PCR に添加されるテンプレート DNA 量が 2 倍減少すると Ct 値が 1 上昇することになる。したがって、DNA が 10 倍希釈されると、希釈された DNA と希釈されない DNA の Ct 値の理論的な差は約 3.32 となるはずである。現実の状況では、理論的な数値は得られない可能性がある。この関係からの大きな乖離は、抽出された DNA に PCR 阻害物質が含まれていること、DNA 溶液が均一でないこと、又は DNA 量があまりにも少ないために、反応における DNA 量の確率的変動が信頼できない定量的推定をもたらしていることを示唆する可能性がある。このことは、蛍光プローブを用いて行われるエンドポイント PCR 反応にも当てはまる。

ダイナミックレンジ-定量範囲

12. 分析法の範囲は、分析対象成分が確実に測定される濃度域を定義する。DNA 抽出物中の総 DNA に対

する分類群特異的 DNA の相対量は、その DNA が単一成分から抽出されたか、又は複合食品基質から抽出されたかによって異なることになる。この望ましい濃度域により標準曲線が決まるが、十分な数の標準曲線を、適用できる場合には例えば較正曲線とともに用いて、濃度と反応の関係を適切に定義すべきである。反応と濃度の関係は、継続的で再現可能であることを立証されるべきであり、適切な変換の後では直線状になるべきである。

13. 標的的特異的定量法の範囲は、分類群特異的 DNA に対して 0 近くから 100 パーセント (w/w) になるよう設計できる。しかし、分析法のバリデーションは適用範囲に適合した濃度域に関して行うことが一般的である。分析法のバリデーションが所定の値域に関して行われている場合には、さらなるバリデーションを行うことなくその値域を拡大してはならない。特定の適用（例えば食品や穀物の分析）については、標準曲線の作成にゲノム DNA を使用すること（プラスミド DNA の使用に関する下記の考察を参照）を検討できる。名目 100% の標準を設定することは容易であるが、0.1% 未満の標準溶液を確実に作成することは難しい。また、標的部位（増幅されるべき DNA 配列）の数があまりにも少なくなるため、確率的誤差が増大し始め、分析の信頼性が低下する可能性がある。

14. 較正物質として使用される DNA は、最高の計量秩序の基準、例えば認定標準物質まで遡る（計量的な意味において）べきである。その範囲は、PCR 法の指定範囲内又は上・下限の量で分析対象成分を含む試料に適用された場合に、許容できる程度の直線性と真度を PCR 法が提供することを確認することにより決定される。

15. 定量的 PCR 特有の特徴は、定量的 PCR のダイナミックレンジの下限に特別な制約を与える。これは、この範囲における値の非正規分布によって、LOD 及び LOQ 値の測定が難しいためである。

検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ)

16. 定量的 PCR 分析法のバリデーションによって、その分析法では許容できる真度と精度で 0.1% (例えば) の DNA を測定できると分かれば、その分析法は LOD と LOQ が関係する範囲を超えてのみ適用されるため、これらの測定は必要とされない場合が多い。しかし、その分析法が LOD 及び LOQ に近い濃度（通常は 0.01~0.05%）で使用される場合には、バリデーション手順には LOD 及び LOQ の評価が組み込まれることになる。

17. 定量的 PCR においては、ブランクの測定値の分布はガウス分布ではなく、通常はポアソン分布に従う。LOD が必要であれば、それは実験的に測定されるべきである。定量法については、分析法が 95% 以上の確率で分析対象成分の存在を検出する (<5% 偽陰性結果 5%) 分析対象成分の量が LOD となる。

18. 定量法については、特定の基質に関する LOQ が測定される値に近いかを認識することが重要である。定量的 PCR の分布測定は正規分布しないことから、LOQ は実験的に測定する必要がある。

19. 実際には、LOQ の測定には二つの手順が使用される。第一のアプローチは、既知量の分析対象成分で補充した（スパイクした）いくつかの従来型試料を測定することである。LOQ はこの場合、結果の変動性が何らかの既定基準（校正データの下限から ± 2 SD など）を満たすレベルである。しかし、例えばデンブンやケチャップなど、DNA の抽出が困難な基質もあり、抽出効率がさらに低くても許容しなければならないこともある。抽出効率が低い場合には、そのことをバリデーションデータと分析報告書に記載すべきである。より完全性の高いアプローチは、既知量の分析対象成分を含むいくつかの試料を用いて分析法を試験することである。目的の DNA 配列を既知の濃度範囲で含む標準物質を相当量入手する必要があることから、このアプローチはより複雑なものとなる。

実行可能性

20. 分析法の実行可能性は、例えば一定の時間内で処理できる試料の量、分析法を実施するための固定費用と試料ごとの概算費用の見積り、日常の使用又は特定の条件下における現実的な問題、及びオペレーターにとって重要性を持ち得るその他の要素などのパラメータを検討して評価すべきである。

反復性標準偏差 (RSDr)

21. PCR 段階の反復性の相対標準偏差は、その分析法のダイナミックレンジ全体に対して $\leq 25\%$ であるべきである。

再現性標準偏差 (RSDR)

22. PCR 段階の再現性の相対標準偏差は、RSDR が増加する可能性のある定量限界を除き、ダイナミックレンジの大半に対して 35%未満であるべきである。

堅牢性

23. 堅牢性は、分析法のパラメータの小さいが意図的な変動による影響を免れる分析手順の能力の尺度であり、通常の使用における信頼性の目安を提供する。このような変動の例としては、反応体積（例えば 29対30 μ l）、アニーリング温度（例えば $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ）、及び／又はその他の関連の変動が挙げられる。実験は少なくとも3重で行う必要がある。こうした小さな変動に対する分析法の反応は、再現性実験においては元の条件下で得られた反応から $\pm 35\%$ を超えて乖離してはならない。

24. 堅牢性試験の妥当性は分析法ごとに立証される必要がある。例えば、リアルタイム PCR 法については、理想的には以下の要素とその起源／出所を考慮すべきである。すなわち、さまざまな熱循環器モデル、DNA ポリメラーゼ、ウラシル N グリコシラーゼ、塩化マグネシウム濃度、フォワード及びリバース側プライマー濃度、プローブ濃度、温度プロファイル、時間プロファイル、dNTP（適用できる場合には dUTP を含む）濃度である。

感度

25. 定量的 PCR 法については分析法の範囲全体にわたって、テンプレート濃度の対数関数として Ct の直線関係が得られるべきである。回帰直線の相関係数、y 切片、及び傾きを報告すべきである。各較正物質の残余の%は 30%であることが望ましい。

26. 曲線パラメータの報告に加えて、反応効率を計算する上でやはり重要であることから、定量を行うためにどの範囲の傾き値を許容できるかを定義することが推奨される。(例えば、DNA 検出に関して-2.9~-3.3、又はこれに対応する 100%近くの増幅効率を示す最適値)

27. 試験所が校正ベースの定量法の代わりに Δ Ct 法を採用する場合には、分析者は分析法がバリデーションされる範囲内に DNA の総量が十分に収まるよう保証する責任を負う。

選択性

28. 分析法の選択性は、実験的証拠の提供により立証されるべきである。この立証には、検出限界（ダイナミックレンジに対して適切な場合）が正確に試験されるよう、標的 DNA 及び非標的 DNA の混合物を含む試料の分析を含めるべきである。分析法は標的 DNA に対して選択性を持つべきであることから、標的 DNA を含む食品基質での結果はすべて陽性となるべきである。

29. プライマーとプローブについては使用目的に応じて、予期される基質に潜在する他の配列との相同性の可能性を、適切な配列データベースに照らして確認すべきである。このような評価を行った上で、選択性を実験的に立証すべきである。

30. 標的 DNA に対して選択性を持つ分析法について 標的 DNA に対する選択性の実験的証拠には、以下が含まれるべきである。

- ・ 試料には分類群特異的 DNA が含まれるべきであるが、標的 DNA 配列の含まれていない食品又は成分のさまざまなロット又はバッチからの 10 以上の試料の分析。これらの分析結果はすべて陰性となるべきである。例えば、標的 DNA が特定の組換え DNA 植物の形質転換事象に対応する場合には、試料は他の（非標的）形質転換事象や、同じ植物種に属する非組換え DNA 植物から得ることができる。
- ・ 各ソースからの適切な数の DNA 試料を試験すべきである。
- ・ 各 DNA 試料について二つの複製を分析すべきであり、その結果は Ct 値 0.5 以内とならなければならない。

31. 試験結果には、有意な機器の指示値又は化学効果が観察されなかったことを明示すべきである。

32. 分類群特異的 DNA 配列に関する分析法について 分類群に対する選択性的実験的証拠には、以下が含まれるべきである。

- ・ 目的の分類群に属するものの、異なった下位分類群に分類される生物に由来する食品又は成分のさまざまなロット又はバッチからの 10 以上の試料の分析。これらの分析の結果はすべて陽性となるべきである。例えば、分類群特異性が例えばトウモロコシなどの植物種に対応すると思われる場合には、試料は異なった遺伝的起源を持つトウモロコシの変種に対応させることができる。
- ・ 関連の食品基質に存在する可能性があり、目的の分類群に属さない生物に由来する類似した食品又は成分のさまざまなロット又はバッチからの 10 以上の試料の分析。これらの分析結果はすべて陰性となるべきである。例えば（また前述の例に続き）、最初の 10 の分析を異なったトウモロコシ粉に適用した場合には、二番目の分析群では小麦／大豆／米粉を分析することが適切と考えられる。
- ・ 各ソースからの適切な数の DNA 試料を試験すべきである。
- ・ 各 DNA 試料について二つの複製を分析すべきであり、その結果は Ct 値 0.5 以内とならなければならない。

33. 試験結果には、重大な測定器の指示値又は化学効果が観察されなかったことを明示しなければならない。

真度

34. いかなる分析法についても、その真度は、標準物質の分析から得られる結果をその標準物質に関する既知又は指定された値と比較することで判定すべきである。特に試料の基質が標準物質の基質と異なる場合には、試料のマトリクス効果の影響を考慮すべきである。

35. PCR 段階に関しては、ダイナミックレンジ全体に対して $\pm 25\%$ の真度値を許容範囲とすべきである。

付属文書 II の参考文献

AOAC (2002 年)。「国際分析法委員会：定性的及び定量的食品微生物公定分析法のバリデーションに関するガイドライン」

Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J, Gruden K (2006年)。「リアルタイムPCRによるDNA定量の要点—遺伝子組換え生物の定量に対するDNA抽出法と試料基質の影響」。 *BMC Biotechnol.* 6(37)。

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín 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。

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。

Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K, 及びBrodmann P (2001年)。「食品中の遺伝子組換え植物の定量のためのPCR法のバリデーション」。 *Journal of AOAC International* 84(6):1855-1864。

Kay S及びVan den Eede G (2001年)。「GMO検出の限界」。 *Nature Biotechnology* 19(5):504。

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmioli M, 及びMarmioli 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。

付属文書 III：定性的 PCR 法のバリデーション

はじめに

1. 定性 PCR のバリデーションは可能な限り、ルーチン分析での使用を意図したのと同じ方法で行われるべきである。つまり、その分析法の感度は陽性試料を確実に検出でき、有意な数の偽陽性が生じないようなかたちで示されるべきということである。
2. 定性試験の結果はまさにその本質から、検出限界の上／下の同定を意味している。定性法の検出限界は定量法の検出限界と同様、陽性試料結果が少なくとも 95% の確率で陽性となる濃度として定義でき、結果的に偽陰性結果の割合は 5% 以下となる。これは、比又はパーセンテージとして表すこともできる。

偽陽性率

3. これは、既知の陰性試験試料が分析法によって陽性に分類された確率である。便宜上、この比率はパーセンテージとして次のように表すことができる。

$$\text{偽陽性結果 (\%)} = 100 \times \frac{\text{誤分類された既知の陰性試料の数}}{\text{既知の陰性試料の総数}}$$

偽陰性率

4. これは、既知の陽性試験試料が分析法によって陰性に分類された確率である。便宜上、この比率はパーセンテージとして次のように表すことができる。

$$\text{偽陰性結果 (\%)} = 100 \times \frac{\text{誤分類された既知の陽性試料の数}}{\text{既知の陽性試料の総数}}$$

注：偽陽性率と偽陰性率についてはさまざまな定義が使われているため、バリデーション報告ではどの定義が使われているかを明確にすべきである。

5. 定性分析の偽陰性率を立証するため、陰性物質のプールに一定の既知濃度の陽性物質が含まれる一連の試料を分析し、その結果を評価しなければならない。また、信頼区間と統計的不確かさの概念を偽陽性及び偽陰性結果のリスクにも適用する必要がある点に留意することが重要である。試験を要するプールの規模と数は、望ましい信頼性のレベルによって決まる。

堅牢性

6. バリデーションされたあらゆる方法と同様、分析の堅牢性を立証するために相応の努力が払われるべきである。これには、定量的 PCR に関する付属文書に記載の通り、技術的理由から分析法に加えられた小さな変更の影響を慎重に最適化し、調査することが含まれる。

付属文書 IV : タンパク質ベースの分析法のバリデーション

定量試験

1. 手順に関する以下の説明は、目的のタンパク質について免疫学的検出測定を行うためのいくつかの可能性の一つに過ぎない。

2. 例えば、タンパク質に関する一般的な ELISA では、酵素反応からのレポーター物質の量が測定される。標準曲線は、標準濃度を x 軸に、光学密度 (OD) を y 軸に表示し、二次方程式又は分析法のモデルに適合するその他の必要な曲線を用いて用量反応曲線を得ることで作成される。正確な定量値を得るためには、試料溶液の OD は較正曲線の直線部に適合していなければならない。OD が高すぎる場合には、OD がアッセイの定量範囲内に低下するまで試料溶液を希釈しなければならない。元の試料のタンパク質分析対象成分の濃度は、マイクロプレートに適用するために試料調製に導入されたあらゆる希釈係数を補正することにより計算される。試料の初期重量と、抽出液及びその後のあらゆる希釈液の体積は、希釈係数を計算するために使用される。

3. 測定のパフォーマンスを立証するためにはさまざまな測定対照を使用できる。空のウェルや緩衝液などのブランク試料は、必要に応じて試料や較正反応から差し引くべきあらゆるバックグラウンド反応を検出するため、並行して測定にかけることができる。測定中に生じるあらゆる非特異的反応又はマトリクス干渉効果を立証するためには、陰性対照試料（すなわち分析対象成分が含まないことが分かっている基質抽出液）を使用しなければならない。陽性対照又は既知量の分析対象成分でスパイクした基質抽出物を測定にかけて試験の正確性を立証することができる。試験の精度を正しく評価するには、標準と試料を適切な複製数で測定にかけることができる。プレートごとの変動を調整するには、ブランク、陰性対照、陽性対照、標準物質、及び複製をそれぞれのマイクロプレート上で測定にかけることができる。

標準物質

4. 適用できる場合には、標準物質は試験される標的試料と同じ基質で構成されるべきである。これには一般に、陰性対照物質と陽性標準物質が含まれる。例えば、試験される基質が大豆粉であれば、標準的な陽性標準物質は、目的のタンパク質を既知の比率で含む大豆粉となる。或いは、目的のタンパク質の標準物質の使用が問題の基質に対してバリデーションされている場合には、そのタンパク質の純粋な試料又は抽出物を使用することができる。場合によっては、標準基質を入手できないこともある。食品基質中のタンパク質を分析するための免疫測定法を開発、バリデーション、及び使用している間は、標準物質を入手できることが重要である。法規及び試験要件を遵守するため、入手可能な最良の標準物質を使用すべきである。

5. 食品又は食品成分で分析対象成分を含むものと含まないものを入手できる場合には、既知の比率の標

的物質による対照試料はかなり容易に調製できる。その他の場合には、特定の基質や分析対象成分の対照試料の作成には困難が伴うこともある。安定性と均一性は考慮すべき重要な問題である。例えば、試験される基質が物質の混合物で構成されている場合には、オペレーターは既知量のタンパク質を含む均一の対照試料が得られるような方法で物質を混合する必要がある。これらの物質の安定性は、保存及び試験条件下で評価する必要があるだろう。

タンパク質ベースの定量法のバリデーション

6. タンパク質法には、統一された ISO/IUPAC/AOAC 規格に定められた分析法のバリデーションの原則が適用される。

7. 定量法バリデーションのパラメータには、正確性／真度、選択性、抽出効率、感度、定量範囲、精度、堅牢性、適用性、及び実行可能性が含まれる。

8. 正確性は、スパイクされた試料からの分析対象成分の回収率を測定することによって立証され、定量範囲全体のいくつかのレベルにおける平均回収率として報告される。

9. 目的のタンパク質の回収率は、標準物質の分析から得られる結果をその標準物質に関する既知又は指定された値と比較することで判定すべきである。特に試料の基質が標準物質の基質と異なる場合には、試料のマトリクス効果の影響を考慮すべきである。回収率は 70～120% であるべきである。

10. 抽出効率は、基質からタンパク質分析対象成分を分離する際に、特定の抽出法がどれほど効率的であるかを示す尺度である。それは、試料から回収される分析対象成分のパーセントとして表示される。抽出法の効率を真に立証することが困難な場合もあり、また免疫測定法の結果を比較できる代替検出法が存在しない場合もある。抽出効率に対する一つのアプローチは、総量分析 (exhaustive extraction)、すなわちタンパク質がそれ以上検出されなくなるまで繰り返し試料を抽出することにより、各種の食品片からの標的タンパク質分析対象成分の回収率を立証することである。

11. アッセイ内の精度は一つのアッセイ内でどれほどの変動が生じるかを示し、標準曲線上のさまざまな濃度で測定された複製間の変動 (変動係数%) と、別の日に行われた独立したアッセイによる標準の吸光度値から導かれた統合変動 (RSDr) を確認することで評価できる。アッセイ間の精度は個々の測定の間でどれほどの変動が生じるかを示し、各マイクロプレート上の品質管理試料を分析することで測定できる。必要な品質管理試料は抽出物の二つのプール、一方は標的 analysis 対象成分を含む試料からの抽出物と、他方は対照試料からの抽出物で構成されと考えられる。抽出物中でタンパク質が安定していれば冷凍して保存することができ、タンパク質は各マイクロプレート上で解凍されてアッセイされることになる。アッセイ間の精度は経時的に評価し、変動係数 (%) として表示できる。

12. 反復性の相対標準偏差 (RSDr) は、その分析法のダイナミックレンジ全体に対して $\leq 25\%$ であるべき

である。

13. 再現性の相対標準偏差は (RSDR) は、それが増加する可能性のある定量限界を除き、標的濃度で、またダイナミックレンジの大半に対して 35%未満であるべきである。

14. 試料の OD が標準曲線の定量範囲のどこに挿入されるかとは関わりなく、アッセイが均等な結果を出す能力があるかを評価するため、希釈の一致性又は直線性が使用される。これらの実験を行うために、標的タンパク質に対して陽性の試料を、少なくとも 3 つの希釈液について曲線の定量範囲内の値が得られるよう希釈することが理想的である。単一の試料抽出物のいくつかの希釈液から得られた補正結果の変動係数は、理想的には $\leq 20\%$ であるべきである。

検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ)

15. LOD 又は LOQ が分析法の意図された使用範囲をはるかに下回って設定されていれば、正確な測定は必要とされないことには注目に値する。例えば、分析法のバリデーションの範囲が $\mu\text{g}/\text{kg}$ の濃度範囲のみにわたっている一方で、LOD が $1 \text{ ng}/\text{kg}$ の範囲にある場合などである。

16. LOD の推定に際しては、LOD は、ブランクの標準偏差を 3 倍に増加させたブランクの信号強度であると想定することが一般的である。この方法では最善の場合でも推定が得られるに過ぎず、ゼロに近いブランク測定値の正規ガウス分布に依存している。これは一般に ELISA のような分析法に関して想定できるが、LOD は実験的に最も正確に測定される。もう一つの一般的な方法は、アッセイにおいて使用される最低標準で常に陽性値が得られる場合には、LOD をその標準に等しい濃度として定義することである。

17. 定量法については、特定の基質に対する LOQ が測定される値に近いかを認識することが重要である。

交差反応性

18. 交差反応性は、類似体又はその他の分子が検出抗体と結合できる程度であり、したがって分析法において明示され、説明されるべきである。交差反応性が存在しないことは、非標的及び近縁分類群、精製標的タンパク質、又は標準陽性対照物質からのタンパク質又は分子で分析法を試験し、得られた実験的結果を用いて評価すべきである。試薬及び実験器具による干渉の可能性は、分析対象成分を含まない材料からの抽出物をアッセイすることで評価できる。

マトリクス効果

19. 分析法の反応が最終抽出物中の特定のタンパク質分析対象成分以外の物質によって影響を受ける場合、その非特異的反応をマトリクス効果と呼ぶ。マトリクス効果を管理する方法の一つは、抽出物中に

試料基質が存在するか否かに関わらず、分析法が同様の結果を生むと立証することである。このアプローチでは、アッセイが使用されるあらゆる基質においてマトリクス効果を受けないことを立証する必要があるだろう。マトリクス効果を管理するもう一つのアプローチ（比較的望ましくないが）は、分析対象成分を含まない基質からの抽出物で標準溶液を作成することであると考えられる。これにより、標準と試料の間のマトリクス効果の一貫性が保証されることになる。

堅牢性

20. 堅牢性は、分析法のパラメータの小さいが意図的な変動による影響を免れる分析手順の能力の尺度であり、通常の使用における信頼性の目安を提供する。このような変動の例としては、反応体積、培養温度（例えばオープンによる培養では $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、「室温」での培養では $\pm 4^{\circ}\text{C}$ など）、及び／又はその他の関連の変動が挙げられる。実験は少なくとも 3 重で行い、回収率を計算する必要がある。こうした小さな変動に対するアッセイの反応は、元の条件下で得られた反応から $\pm 30\%$ を超えて乖離してはならない。

定性試験

21. 定性試験には従来の ELISA 法など、その他の免疫吸着測定法も利用できるが、側方流動装置は現場試験又はフィールド試験の有効な手段である。信頼できる結果を確保するためにアッセイのバリデーションを行うべきであり、性能特性の説明には感度、選択性、適用性、検出限界、堅牢性、マトリクス効果、及び適用できる場合にはフック効果を含めるべきである。

タンパク質ベースの定性法のバリデーション

22. タンパク質ベースの定性試験には定性的 PCR 試験と同じ原則が適用される。したがってこれらのアプローチは、偽陽性率と偽陰性率の計算を含めて、タンパク質ベースの分析法に適用できる。一般にタンパク質ベースの側方流動ストリップ法は、その信頼性から各試料に対して二重で行われることはない。しかし ELISA 試験においては、（その定量性から）通常は二重ウェルが使用される。

適用性

23. 分析法が使用される可能性のある分析対象成分、基質、及び濃度を提示すべきである。

24. タンパク質の抽出はタンパク質法の性能における重要な要素となることがあり、また使用される緩衝液も検出段階の性能に影響を及ぼす可能性がある。したがって、タンパク質検出法の信頼性を確保するためには慎重な最適化が必要である。分析法について LOD の測定基準を設定すべきである。定性分析の LOD を確認するには、LOD を超えるもののそれに近い基準を使用量の一つが満たしている限り、LOD に近い添加量を使用することができる。こうした手順は分析法の性能の目安となり得るが、よく知られた特性を持つ実試料（入手可能な場合）は、分析法の適用性を立証するのに最適な基質である。

実行可能性

25. 分析法の実行可能性は、例えば一定の時間内で処理できる試料の量、分析法を実施するための固定費用と試料ごとの概算費用の見積り、日常の使用又は特定の条件下における現実的な問題、オペレーターにとって重要性を持ち得るその他の要素などのパラメータを検討することにより評価すべきである。

付属文書 IV の参考文献

Grothaus GD、Bandla M、Currier T、Giroux R、Jenkins GR、Lipp M、Shan G、Stave JW、及び Pantella V. (2006 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」。AOAC International 89:913-928。

「バイオテクノロジー改良穀物及び由来食品成分に取り入れられたタンパク質判定のための免疫測定法のバリデーションと使用に関するガイドライン」。Lipton ら、Food and Agricultural Immunology, 2000, 12, 153-164。

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。

ISO 21572:2004。「食品—遺伝子組換え生物及び由来製品の検出法—タンパク質ベースの方法」。ジュネーブ：国際標準化機構

Mihaliak CA 及び Berberich SA (1995 年)。「農薬登録を支援するデータを生成するための免疫化学法のバリデーションと使用に関するガイドライン」。Nelson JO、Karu AE、及び Wong RB (eds)。「農薬の免疫分析：新たな技術」。ACS Symposium Series 586:288-300。

Stave JW (1999 年)。「GMO に由来する新たな食品中の新規又は組換えタンパク質の検出：今後のニーズ」。Food Control 10:367-374。

Rogan GJ、Dudin YA、Lee TC、Magin KM、Astwood JD、Bhakta NS、Leach JN、Sanders PR、及び Fuchs RL (1999 年)。「Roundup Ready (R) 大豆中の 5-エノルピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素を検出するための免疫診断法」。Food Control 10(6):407-414。

USDA (2004 年)。米国農務省/穀物検査局指令 9181.2。

[オンライン] <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/directives/9181-2.pdf>

付属文書 V 定量的 PCR 法の分析対照の許容基準及び結果の解釈

1. 少なくとも、以下の許容基準はあらゆる定量的 PCR 法に共通し、各 PCR 分析に適用できる。

- ・ 関連する濃度での陽性 DNA 標的対照の複製の平均は、指定値からの標準偏差を 3 未満とする。適用できる場合には、標的 DNA 対照は標準 DNA、或いは認定された標準物質又は試験対象の配列若しくは生物を代表する既知の陽性試料から抽出された DNA として定義される。対照の目的は、標的配列を含む試験試料の分析結果がどうあるべきかを明示することである。
- ・ 増幅試薬対照は、背景ノイズを超える増幅シグナルをもたらしてはならない。増幅試薬対照は、抽出された試験試料のテンプレート DNA を除き、あらゆる試薬を含む対照として定義される。テンプレート DNA の代わりに、対応する体積の核酸を含まない試薬（水又は緩衝液）が反応に添加される。

2. 未知の試料の結果を許容するには、試料複製の相対標準偏差は $\leq 35\%$ であるべきである。

加工助剤として使用される物質に関するガイドライン原案

(N14-2008)

(ステップ 5/8 における採択のため)

1. 目的及び範囲

本ガイドラインの目的は、加工助剤として使用される物質の安全な使用と、食品及び食品の原材料の調製におけるその残渣の安全性に関する情報を提供することである。

2. 定義

加工助剤とは、装置若しくは器具類を含まず、それ自体では食品の原材料として消費されることのない物質又は材料であって、処理若しくは加工過程において技術的な目的を達成すべく、原料、食品又はその原材料を加工する際に意図的に使用するものをいう。ただし、「加工助剤」を使用することで、意図的ではないが、その残渣又は派生物が最終製品中に存在することが回避できない場合がある。¹

3. 加工助剤として使用される物質の安全な使用のための原則

3.1 加工助剤としての物質の使用は、その使用が原料、食品又は原材料の処理若しくは加工過程において一つ以上の技術的機能を果たす場合に正当化される。加工後の食品に残る加工助剤の残渣は、最終製品中で技術的機能を果たしてはならない。

3.2 加工助剤として使用される物質は、以下を含む適正製造規範 (GMP) の条件に従い使用するものとする。

- ・ 使用される物質の量は、所望の技術的機能を達成するために必要な達成可能な最低限のレベルに限定するものとする。
- ・ 食品中に残る物質の残渣又は派生物は、合理的に達成可能な範囲まで減らすべきであり、健康上のリスクをもたらしてはならない。
- ・ 物質は食品の原材料と同様の方法で調製し、取り扱う。

¹ コーデックス委員会手続きマニュアル、「セクション I: コーデックス委員会の目的の定義」

3.3 加工助剤として使用される物質の安全性は、その物質の供給者又は使用者によって立証されるべきである。安全性の立証には、その物質を GMP の条件に従い加工助剤として使用することによる意図しない又は不可避の残渣についての適切な評価が含まれるべきである。

3.4 加工助剤として使用される物質は、食品用の品質であるべきである。このことは、コーデックス委員会が推奨する同一性及び純度に関する適用規格、又はそのような規格が存在しない場合には、責任ある国内期間又は国際機関若しくは供給者が策定した適切な規格に準拠することにより立証できる。

3.5 加工助剤として使用される物質は、「食品の微生物基準の設定と適用に関する原則(CAC/GL 21-1997)」に従い設定された微生物学的適用基準を遵守し、「食品衛生の一般原則に関する国際実施規範勧告(CAC/RCP 1-1969)」及びその他の関連のコーデックス文書に従い調製し、取り扱うべきである。

5.0 表示

5.1 加工助剤として使用される物質の表示は、コーデックスの「販売される食品添加物の表示に関する一般規格(CODEX STAN 107-1981)」及び「包装食品の表示に関する一般規格(CODEX STAN 1-1985)」の要求事項に従うべきである。

食品及び飼料中のメラミンの最大基準値原案

(手続きのステップ 5/8)

製品名	ML (mg/kg)	備考
乳児用粉末調製乳	1	
食品（乳児用調製乳を除く）及び動物用飼料	2.5	<p>注 1</p> <p>最大基準値は、飼料及び食品中に意図せず及び不可避に存在するメラミンの濃度に適用される。飼料及び食品中の 2.5 mg/kg を超えるメラミン濃度が以下の結果であると立証できる場合には、最大基準値は適用されない。</p> <ul style="list-style-type: none"> - 殺虫剤としてのシロマジンの認可された使用。メラミン濃度はシロマジン濃度を超えないものとする。 - 国内で認められた移行量制限を考慮し、食品接触材料からの移行。 <p>注 2</p> <p>最大基準値は、以下の飼料成分／添加物中に存在する可能性のあるメラミンに対しては適用されない：通常の生産過程の結果としてのグアニジノ酢酸（GAA）、尿素、及びピウレット</p>

食品中のメラミンの最大基準値原案

(手続きのステップ 3)

製品名	ML (mg/kg)
乳児用液体調製乳	0.5