

標準偏差および拡張不確かさを算出した結果を表5に示した。

各グループの平均値 (log/g) は、2005 年度が 3.68～3.72, 2006 年度が 4.79～4.80, 2007 年度が 4.93～5.06 の範囲にあった。真数 (/g) に変換した場合、2005 年度が $4.8 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^3$, 2006 年度が $6.2 \times 10^4 \sim 6.4 \times 10^4$, 2007 年度が $8.4 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ の範囲にあり、いずれの年度においても、グループ間に顕著な差異は認められなかった。

一方、各グループの拡張不確かさ (log/g) は、2005 年度が 0.11～0.27, 2006 年度が 0.25～0.37, 2007 年度が 0.23～0.46 の範囲にあったが、拡張不確かさと集落計数法との間に顕著な相関は認められなかった。

以上の結果から、集落計数法は不確かさに関与する主要な要因ではないと推測された。

5) 技能試験データに基づき不確かさを推定する場合の課題

食品衛生外部精度管理調査の細菌数測定データに基づき推定した拡張不確かさ (log/g) は、0.24～0.26 であったが、APLAC (Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation; アジア太平洋試験所認定協力機構) が作成した不確かさに関する解説書¹⁾では、以下の観点から技能試験データが常に適切な測定の不確かさを提供するとは限らないことを指摘している。

- ①技能試験サンプルと試験所での日常的試験のサンプルで、マトリックスが異なる場合がある。
- ②母集団レベルが、試験所の日常的試験レベルと異なる場合や日常的試験レベルの全範囲をカバーしない場合がある。
- ③技能試験参加試験所は、結果を提出するためにさま

ざまな経験的手法 (異なる測定量) を用いる場合がある。

また、技能試験では、主催者により試料調製 (均一化) が行われるため、参加試験所の試料調製に起因する不確かさが反映されない場合が考えられる。

以上のことより、技能試験データに基づき推定した拡張不確かさを適用する場合は、試験所ごとにマトリックスや試料調製などに起因する不確かさを検討・評価することが前提になると考えられた。

謝 辞

本研究は平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金「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 (課題番号 H20—食品—一般—011)」(研究代表者 松岡英明) の分担研究として行われた。

文 献

- 1) APLAC TC 005: Interpretation and guidance on the estimation of uncertainty of measurement in testing (2006).
- 2) ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (2005).
- 3) JIS Z 8404-1: 測定の不確かさ—第 1 部: 測定の不確かさの評価における併行精度、再現精度及び真度の推定値の利用の指針. 日本規格協会 (2006).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: 登録検査機関における製品検査の業務管理について. 平成 16 年 3 月 23 日, 食安監発第 0323003 号 (2004).
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: 食品衛生検査施設における検査等の業務管理について. 平成 16 年 3 月 23 日, 食安監発第 0323007 号 (2004).

【報文】

Percoll 密度勾配遠心分離法による難濾過性食品
からの生菌分離における定量性荒木恵美子^{1, 2}, 重富 知也², 斉藤美佳子², 松岡 英明^{2*}Quantitative Separation of Viable Microbial Cells from
Non-Filterable Food by Percoll Density Gradient CentrifugationEmiko ARAKI^{1, 2}, Tomoya SHIGETOMI², Mikako SAITO² and Hideaki MATSUOKA^{2*}¹Department of Fisheries, School of Marine Science and Technology, Tokai University,
3-20-1, Orido, Shimizu-ku, Shizuoka 424-8610, Japan²Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and
Technology, 2-24-16, Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

Percoll five-stepwise density gradient centrifugation (DGC) was applied to separating viable microbial cells from several kinds of food including non-filterable types (yellowtail, salted sea urchin, shiokara, peanut butter, bee honey, and oyster). *Escherichia coli* cells were added to a food extract prepared by stomaching 25 g of food and a 10-fold or 100-fold dilution. The total recovery rates of viable cells were higher than 80 %, which indicated that Percoll DGC could be used satisfactorily for the quantitative collection of viable cells. By the fluorescent microscopic measurement of several samples of Percoll density layers after DGC, novel insights about the causes of false signals were obtained. The present study provided us with valuable information toward the higher performance of culture methods as well as rapid non-culture methods.

(Accepted 22 October 2009)

Key words : Percoll (パーコール)/Density gradient centrifugation (密度勾配遠心分離)/Quantitative viable cell separation (定量的生菌分離)/BioBall (バイオボール)/False signal (擬シグナル).

緒 言

微生物試験法は培養法が基本であり、また、迅速測定法として非培養法も種々提案されている¹⁻³⁾。しかし、食品中微生物の測定に際しては、培養法、非培養法を問わず、共存する食品成分の影響を考慮する必要がある。非培養法においては、例えば蛍光染色法を利用した迅速測定法の場合、擬シグナルの除去が極めて難しい。その他の原理の非培養法においても微生物細胞と非生物微粒子の識別は難しい。そのため、適当な培地を使用した培養法により、増殖可能な細胞と不可能な非生

物微粒子が識別されている。このことが培養法の信頼性が高い所以である。ところが、その培養法の結果は、培地成分に大きく依存する。したがって、特異的な食品成分、例えば香辛料、特殊なアミノ酸や有機酸などが培地に混入した場合は、コロニー形成に予想外の影響を及ぼす可能性がある。このような背景から、今日では、食品中の微生物細胞を生菌のまま分離することの重要性が強く指摘されるようになっている。

しかし、生菌分離に利用できる方法の種類は多くはない¹⁻³⁾。最も簡便な方法として濾過法があるが、食品中には濾過できないものが少なくな

東海大学海洋学部水産学科 〒424-8610 静岡県静岡市清水区折戸3-20-1 ☎054-334-0411
東京農工大学大学院工学府生命工学専攻 〒184-8588 東京都小金井市中町2-24-16 ☎042-388-7029

い⁷⁾。この対処法として、適切な前処理と密度勾配遠心分離法の組み合わせが考えられる。密度勾配遠心分離法 (Density Gradient Centrifugation; DGC) による細胞やオルガネラなどの分離はすでに数多く報告されている^{8, 12, 15)}。しかし、食品のルーチン検査法として適用するために、サンプル量やサンプル中の汚染菌の添加回収率について議論がされることはなかった。

この様な理由から、前報では Ficoll を用いる密度勾配遠心分離法について検討し、魚肉 (ブリ) からの定量的生菌分離に応用できることを示した¹⁶⁾。しかし Ficoll は粘性が高く実用的とは言えなかった。そこで Ficoll に代わるものとして、新たに Percoll を用いる方法を検討することとした。試験対象食品としては魚肉を含む数種類の食品を選んだ。また、添加菌については自ら菌数を調整した生菌試料のほか、生菌標準品としての利用が期待されているバイオボール (30 ± 2 細胞) も用いた。

実 験 方 法

1. 試験菌液の調製

1) 段階希釈菌液の調製

スラントで保管されている *Escherichia coli* K12 を乳糖ブイヨン培地 (LB) に接種し、37℃、18時間、130rpm で前培養した。前培養液から 100 μl を標準寒天培地に塗抹し、37℃、18時間培養後、1白金耳を滅菌リン酸緩衝液 (PB) (pH7.0, 0.1M) 1 ml にとり懸濁させたのち、段階的に PB で希釈して段階希釈菌液とした。

2) バイオボール

微生物試験の精度管理用に開発された BioBall (SYSMEX bioMérieux, SingleShot30, *E. coli* NCTC12923) を用いて添加菌数レベルが少ない場合の DGC を行った。30 ± 2 個の生細胞となるようにコントロールされた BioBall 1 個をブリ筋肉の 10 倍希釈溶液 600 μl に 30 秒間浸漬、溶解し、その 200 μl × 2 回を DGC に供した (後述の Table 2 における a-1, a-2)。残りの 200 μl を標準寒天平板培養に供し、出現コロニー数を添加菌

数とみなした。以上の試験を 3 回行った。

2. 食品試料の調製

食品マトリクスとして、ブリ筋肉 (宮崎県産、養殖、生食用)、カキむき身 (三重県産、加熱加工用)、粒ウニ (輸入原料、瓶詰め、冷蔵)、塩辛 (国産原料、瓶詰め、常温)、ハチミツ (輸入原料、合成樹脂容器入り、常温)、ピーナツバター (輸入原料、合成樹脂容器入り、常温)、を選定した。

1) ブリ

食品として宮崎県内で養殖されたブリを用いた。水揚げ後直ちにフィレに加工、真空包装 (生食用、約 1.5kg) され、氷蔵で輸送された。到着後、直ちに背側の筋肉部を 50g ずつ小分けし、冷凍保管 (−20℃) した。到着時に細菌数 (生菌数) を標準寒天平板培養法 (35℃, 48時間) により測定した。ブリ筋肉の 25g を採取し、ストマッカー用袋 (フィルタ付) に入れ、10 倍量、あるいは 100 倍量の PB を加えて 60 秒間ストマッキングし、それぞれブリ 10 倍希釈試料液、ブリ 100 倍希釈試料液とした。

2) カキ

カキは三重県の大湊で養殖され、漁獲後直ちに殻を剥かれ、冷凍されたものを用いた。細切したカキ 25g をストマッカー用袋に採取し、10 倍量のアルカリペプトン水を加えストマッキングし、カキ 10 倍希釈試料液とした。

3) 粒ウニ、塩辛、ハチミツおよびピーナツバター

いずれも市販品を購入した。開封後、内容物を混合し 5g を採取し、ストマッカー用袋 (フィルタ付) に入れ、10 倍量の PB を加えて 60 秒間ストマッキングし、各 10 倍希釈試料液とした。

3. DGC

1) 密度勾配遠心分離管の作製

Percoll (1.130 ± 0.005g/ml) (GE Healthcare, #170891-01) を滅菌した PB で、75, 50 および 25v/v % になるようにマイクロピペットを用いて希釈した。DGC 用の密度勾配は、最初に Percoll 原液をマイクロピペットで 200 μl 採取し、11 × 34mm の遠心分離管 (Beckman, Polyallomer) の底部に注入し、続いて各密度溶

液を200 μ l ずつ密度の高い順に、界面を乱さないように遠心分離管の内壁に沿って積層した。密度勾配は使用の都度、調製した。

2) DGC の実施

各食品希釈試料液4.5ml に試験菌液0.5ml を添加し試験溶液とし、その200 μ l をあらかじめ調製した密度勾配の最上層に、密度勾配の液面が乱れないようマイクロピペットの先端をチューブ内壁に付けて積層した。遠心分離（4℃, 5,000 rpm, 30分間）後、最上層から200 μ l ずつマイクロピペットで吸引し、各画分の100 μ l を標準寒天平板培地に塗抹し、37℃で18時間培養し、コロニー数を測定した。

4. DGC による食品成分除去効果の検証

種々の食品について、DGC のみによって、完全にその成分を除去することは難しい。したがって、DGC 後の各画分について、その除去効果を検証することが重要となる。そこで、生菌を選択的に染色できる蛍光色素の一つ、カルボキシ・フルオレッセイン・ジアセテート（Carboxy fluorescein diacetate; CFDA）を用いて顕微蛍光計測を行った。専用装置として、バイオプロローラー®(BP)（パナソニック・エコシステムズ）を用いた。BP は、試料を濾過してメンブレンフィルター上に生菌を固定して観測する装置である。そのため、DGC 後の各画分が、濾過できる場合は直接測定し、濾過できない場合は、一旦、遠心分離・洗浄操作等（例えば Triton X-100 0.5%,

EDTA 5mM で洗浄後、12,000rpm \times 5 min で遠心分離）によって濾過できるようにした後、測定した。

実験結果および考察

1. ブリに添加した段階希釈菌液の回収試験結果

試験に用いたブリ筋肉の細菌数（生菌数）を測定した結果、1 g 当たり300以下（実測値0）であり、コントロールとして用いることは適当であると判断された。

ブリ10倍希釈試料液に対しては、添加菌数100以下の場合と、1000以下の場合を調べた。また、100倍希釈試料液の場合は添加菌数1000以下の場合について調べた。その結果、Table 1 に示すように、それぞれ添加した生菌数の94, 81, 107%の生菌が回収された。すなわち、Percoll DGC 操作によっては細菌の増殖機能が損なわれないことが確認された。各密度層の分布状態に関しては Fig. 1 に示すように Percoll 50 v/v % 層に最大数（約60%）、ついで75v/v % 層に約20%の生菌が回収され、この2画分を合わせて、全回収生菌の80–87%に達した。一次近似としては、この2画分の合計で十分と考えられる。しかし、より100%に近い生菌回収率を得るためには、25v/v % 層や100v/v % 層の生菌も別途回収する必要がある。その場合は、各々の層について、適当な界面活性剤の添加やイオン強度の調節などによっ

Table 1. Separation of viable *E. coli* cells by Percoll DGC from foods.

| Foods | n | Total number of cells collected (CFU/200 μ l) | | | | | | Number of cells added to initial sample (g) | Total recovery (%) (h) |
|--------------------------|---|---|-----------|-----------|-----------|------------|--------------|---|---------------------------|
| | | Percoll density (v/v %) | | | | | | | |
| | | 0 (a) | 25 (b) | 50 (c) | 75 (d) | 100 (e) | Total (f) | | |
| Yellowtail ¹⁾ | 4 | 13 | 75 | 444 | 182 | 65 | 778 | 825 | 94.3 |
| Yellowtail ¹⁾ | 4 | 1 | 1 | 21 | 8 | 2 | 33 | 40 | 80.6 |
| Yellowtail ²⁾ | 3 | 21 | 21 | 277 | 81 | 29 | 429 | 401 | 107 |
| Salted sea urchin | 4 | 22 | 166 | 167 | 91 | 27 | 472 | 551 | 82.2 |
| Shiokara | 3 | 9 | 100 | 191 | 79 | 18 | 397 | 340 | 117 |
| Peanut butter | 2 | 8 | 49 | 308 | 30 | 8 | 403 | 292 | 138 |
| Bee honey | 4 | 21 | 17 | 348 | 205 | 50 | 641 | 650 | 98.7 |
| Oyster | 4 | 12 | 57 | 108 | 27 | 5 | 209 | 226 | 92.5 |

Sample preparation: 1) 10-fold dilution; 2) 100-fold dilution

n: Number of samples tested in respective cases

(f)=(a)+(b)+(c)+(d)+(e), (g): Average of numbers of cells added to respective n samples, (h)=(f)/(g) \times 100

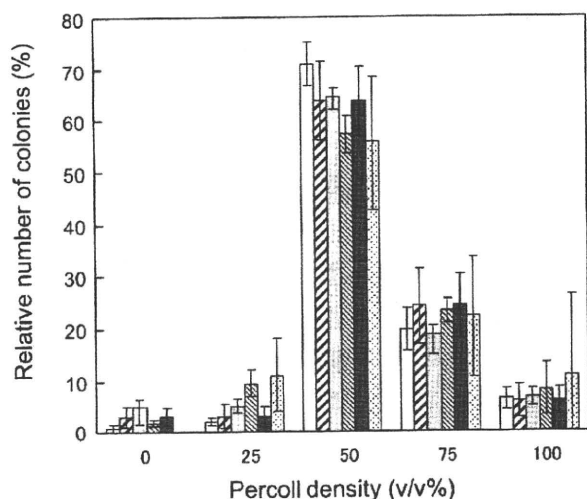


Fig.1. Distribution of viable *E. coli* cells in respective Percoll density layers after separation by DGC from yellowtail.

- ca. 500 cells added to PB
- ▨ ca. 70 cells added to PB
- ▤ ca. 800 cells added to 100-fold dilution of yellowtail extract
- ▧ ca. 1600 cells added to 10-fold dilution of yellowtail extract
- ca. 80 cells added to 10-fold dilution of yellowtail extract
- 1 BioBall added to 10-fold dilution of yellowtail extract

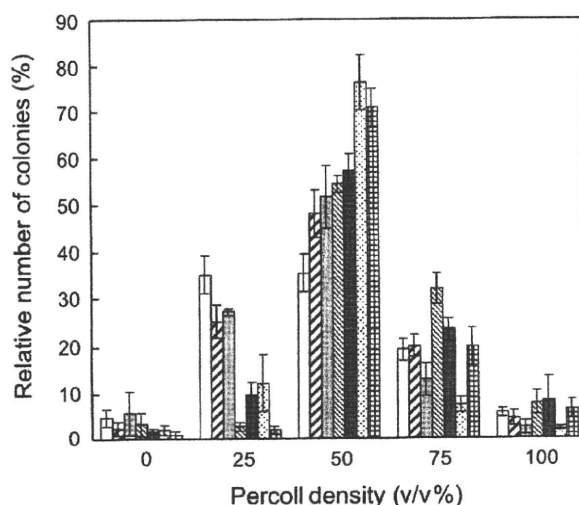


Fig.2. Distribution of viable *E. coli* cells in respective Percoll density layers after separation by DGC from several foods.

- Salted sea urchin
- ▨ Oyster
- ▤ Yellowtail
- ▧ PB
- ▦ Shiokara
- ▩ Bee honey
- Peanut butter

Table 2. Separation of small numbers of viable *E. coli* cells by Percoll DGC from yellowtail.

| Trial | Total number of cells (CFU/200 μ l) | | | | | | Total recovery (%) |
|---------------|---|----|----|----|-----|-----------------------|--------------------|
| | Percoll density (v/v%) | | | | | Number of cells added | |
| | 0 | 25 | 50 | 75 | 100 | Total | |
| a-1 | 0 | 0 | 5 | 3 | 0 | 8 | 89.0 |
| a-2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 1 | 7 | 77.8 |
| b-1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 3 | 8 | 89.0 |
| b-2 | 0 | 1 | 4 | 2 | 0 | 7 | 77.8 |
| c-1 | 0 | 1 | 8 | 1 | 0 | 10 | 90.9 |
| c-2 | 0 | 0 | 6 | 1 | 0 | 7 | 63.6 |
| Mean \pm SD | | | | | | | 81.4 \pm 10.5 |

て処理するか、あるいは溶液条件を変えた後、再度、DGCを行うことが必要となる。煩雑なDGCを繰り返すことは実用的見地からは大きな問題ではあるが、現在、別途開発中の簡便型DGC後回収システムが利用できるようになれば、この問題も解決するであろう。

2. ブリに添加したバイオボールの回収試験結果

BioBallを用いて低レベルの菌数の添加回収試験を行った。3回の試行(a, b, c)で、実際添加された生菌数は、予測値どおり 10 ± 1 であった。これに対してDGC後に回収された生菌数を

調べたところ、81.4%の生菌が回収された(Table 2)。

各密度層の分布状態に関しては、上記の段階希釈菌液を添加した場合と同様に、50v/v%層で最大、次いで75v/v%層となり、両画分を合わせて全回収生菌の69%となった。

以上より、200 μ lあたりの菌数が10~1000の範囲では、ブリ筋肉の場合、特に菌濃度依存性は認められず、生菌回収率81~107%、50 v/v%層+75 v/v%層合計の回収率は69~89%であった。

3. 他の食品に添加した段階希釈菌液の回収試験結果

試験に用いた、粒ウニ、塩辛、ピーナツバター、ハチミツ、カキについて、細菌数(生菌数)を測定した結果、それぞれ20/g, 26/g, 50/g, 150/g, 910/gであった。これらの食品5gをストマッカーで10倍(45ml)または100倍(495ml)希釈試料液とし、その200 μ lを試料として用いるので、試料中の菌数はそれぞれ、0.4, 0.5, 1, 3, 18(100倍希釈試料液の場合は0.04, 0.05, 0.1, 0.3, 1.8)となる。添加菌数を200/200 μ l以上とすれば、最も自然混入菌の多かったカキの場合でも細菌数は添加菌数の1%以下となるので、各食品共、試験には支障ないと判断された。

Table 1に示すように、添加菌数200~700/200 μ lの範囲で、これら5種類の食品についても、生菌回収率は82~138%となった。一方、Percoll密度層分布に関しては、粒ウニ、塩辛、ピーナツバター、カキの場合、25%層の分布率が75%層よりも高くなった。したがって、これらの食品の場合は、25, 50, 75 v/v %の3層からそれぞれ回収する必要があるが、それらを合計すると、回収率は77, 109, 96, 85%であった。一方、ハチミツの場合はブリの場合と同様で、25v/v %層への分布は少なかった。この場合は、50v/v %と75v/v %合わせて85%であった。

以上により、試験した食品全てについて、生菌回収率は80%以上となった。実用的見地からは100%回収が目標であるが、そのためには、上述のように、DGC前後の化学的処理(界面活性剤等)、あるいはさらに異なる溶液条件でDGCを繰り返す必要と考えられる。一方、DGCによって、生菌単体、大きさの違う生菌、生菌と食品成分との複合体、などが各々分画できることが示された。その結果は、これに続く微生物試験における擬シグナルの解析等に際して大きな手がかりとなると考えられる。

4. 食品成分除去効果の検証結果

個々の生菌は、単一細胞としての形状も同じとは限らず、食品成分との複合体を形成する場合もある。また、死菌断片が付着する場合も考えられ

る。そのため、同一の菌株であっても、食品中にある場合は、DGCによって複数の密度の異なる層に分かれて分布したものと推察される。その状態を解析することは、さらに高精度の分離法を考える際の手がかりになる。そこで、典型的な画分について、BPによる顕微蛍光測定を行った。

1) ブリの100倍希釈試料液より得た Percoll 50 v/v % 画分

魚肉成分は、部位や前処理条件によって大きく性質が異なる。本研究における処理条件では、DGC後の50v/v %画分は濾過できなかった。しかし、遠心分離・洗浄操作により粗大粒子を除去することによって、BP測定が可能になった。そうして得られた画分はFig. 3A-aに示すように、擬シグナルがほとんど観察されない状態になった。これをCFDA染色したところ、生菌と考えられる光点が観測された(Fig. 3A-b)。これらの光点が、確かに生菌であることを確認するため、そのまま、培養を続けてマイクロコロニーを形成させた。その結果、多くの光点がマイクロコロニーになり、それらが生菌であることが確かめられた(Fig. 3A-c)。

2) ハチミツの10倍希釈試料液より得た Percoll 50 v/v % 画分

この場合は直接濾過が可能であった。CFDA染色前に観察された擬シグナルは少なく、染色後のマイクロコロニーも観察された(Fig. 3B)。

3) ピーナツバターの100倍希釈試料液より得た Percoll 50 v/v % 画分

この場合はCFDA染色以前から擬シグナルと考えられる多くの光点が認められた(Fig. 3C-a)。次にCFDAで染色すると、光点の数は減少した(Fig. 3C-b)。この原因は、メンブレンフィルター上に固定された微粒子が乾燥状態になったために生じたシグナルであると推察された。そのため、染色操作によって水分が供給されると、それらのシグナルが消え、新たにCFDAで染色された生菌に相当する光点が現れた。それらが生菌であることは、培養を続けてマイクロコロニーを形成させることによって、確認することができた(Fig. 3C-c)。

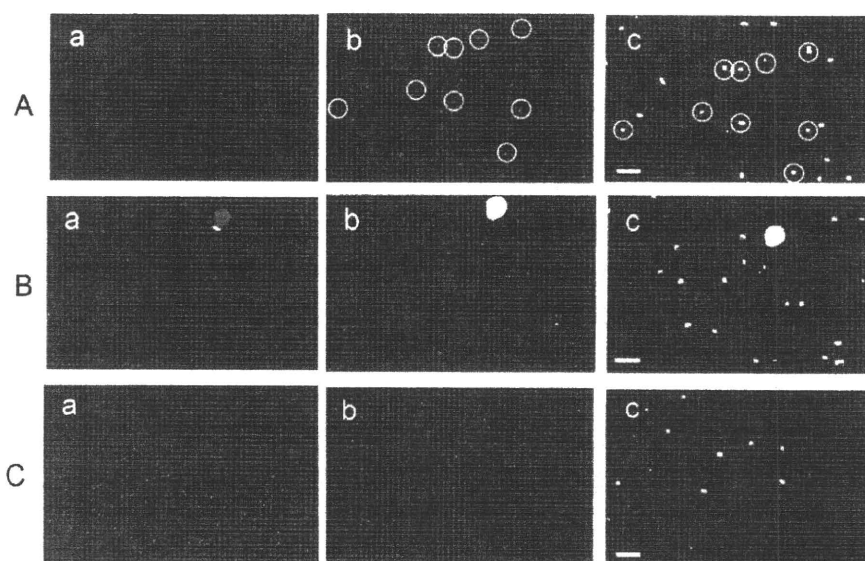


Fig.3. Fluorescent microscopic images of CFDA-stained *E. coli* cells and other particles after Percoll DGC. (A) A sample of a 100-fold dilution of yellowtail extract sample, (B) 10-fold dilution of bee honey extract, (C) 100-fold dilution of peanut butter extract. a) Before CFDA staining, b) just after staining with CFDA, c) after culture at 37°C for 4 hr. Bar indicates 100 μ m. Circles in Fig.3A-b and 3A-c indicate the presence of viable cells that were recognized at the same positions.

結 論

マイクロピペットを用いた Percoll ステップワイズ密度勾配遠心分離管の調製は、操作性がよく、また遠心分離条件も温和であることから、日常的なルーチン検査にも利用できるものと考えられる。

Percoll DGC による *E. coli* の生菌分離効果は、今回実施した菌数範囲 (10-1000/200 μ l) では、生菌全回収率は80%以上となり従来の報告と比べても良好と考えられた¹⁵⁾。本研究における Percoll DGC 操作条件によって、生菌の増殖機能が損なわれる程度は極めて低いと結論された。

また、各密度層への生菌分布パターンを比較した結果、同一の菌種、菌株であっても、食品の違いによって異なることがわかった。しかし、そのような場合でも、予め分布パターンのデータベースを作っておけば、それに従って回収することによって、難濾過性食品からの効率的な生菌分離ができることが示された。

さらに、各画分を顕微蛍光計測した結果、擬シグナルの原因とその除去法について多くの示唆を得ることができた。メンブレンフィルター表面の乾燥に起因する擬シグナルはその一例である。

以上の結果に基づき、今後は、各画分中に観察された擬シグナルの原因究明と共に、それらをさらに高精度に除去する方法の開発が望まれる。それによって、培養法、非培養法を問わず、微生物試験法の性能向上が図られるものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に際しては、次の研究費の支援を受けました。ここに謝意を表します。厚労科研：食品の安心・安全確保推進研究事業「不確かさの推定」(H20-Food-General-011)、「精度管理」(H20-Food-General-012)、および「迅速法」(H18-Food-General-011)。科学技術振興機構、戦略的国際科学技術推進事業「微生物の音波分離」。

文 献

- 1) Shimakita, T., Yamamoto, H., Naramura, T., Fujimori, A., Ide, T., Tashiro, Y., Saito, M., and Matsuoka, H. (2007) Rapid count of microbial cells in dialysate. *Ther. Apher. Dial.*, 11, 363–369.
- 2) Motoyama, Y., Yamaguchi, N., Matsumoto, M., Kagami, N., Tani, Y., Satake, M., and

- Nasu, M. (2008) Rapid detection and identification of beer-spoilage lactic acid bacteria by microcolony method. *Transfusion*, **48**, 2364–2369.
- 3) Mariscal, A., Lopez-Gigosos, R.M., Carnero-Varo, M., Fernandez-Crehuet, J. (2009) Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 773–783. doi: 10.1007/s00253-009-1879-x.
 - 4) Brigati, J.R., Ripp, S.A., Johnson, C.M., Iakova, P.A., Jegier, P., and Sayler, G.S. (2007) Bacteriophage-based bioluminescent bioreporter for the detection of *Escherichia coli* 0157:H7. *J. Food Prot.*, **70**, 1386–1392.
 - 5) Escamilla-Gómez, V., Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J.M. (2009) Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive *Escherichia coli* quantisation. *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 3365–3371.
 - 6) Davey, H. M. (2002) Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods Cell Sci.*, **24**, 91–97.
 - 7) Shimakita, T., Tashiro, Y., Katsuya, A., Saito, M., and Matsuoka, H. (2006) Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with Bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit. *J. Food Prot.*, **69**, 170–176.
 - 8) Inoue, K., Nishimura, M., Nayak, B.B., and Kogure, K. (2007) Separation of marine bacteria according to buoyant density by use of the density-dependent cell sorting method. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1049–1053.
 - 9) Allman, R., and Coakley, W.T. (1994) Ultrasound enhanced phase partition of microorganisms. *Bioseparation*, **4**, 29–38.
 - 10) Markx, G.H., Dyda, P.A., and Pethig, R. (1996) Dielectrophoretic separation of bacteria using a conductivity gradient. *J. Biotechnol.*, **51**, 175–180.
 - 11) Harkins, K.R. (2001) Sorting of bacteria. In *Current Protocols in Cytometry*. (Robinson, J.P. ed.), Unit 11.4. John Wiley & Sons, Inc., doi: 10.1002/0471142956.cy1104s07.
 - 12) Pertoft, H. (2000) Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **44**, 1–30.
 - 13) Makinoshima, H., Nishimura, A., and Ishihama, A. (2002) Fraction of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. *Mol. Microbiol.*, **43**, 269–279.
 - 14) Nayak, B.B., Kamiya, E., Nishino, T., Wada, M., Nishimura, M., and Kogure K. (2005) Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **51**, 179–186.
 - 15) Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R., and Fujiwara, S. (2007) Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 92–100.
 - 16) Araki, E., Takayama, K., Saito, M., and Matsuoka, M. (2009) Viable separation of histamine-producing bacteria free from meat components of yellowtail by density gradient centrifugation. *Biocontrol Sci.*, **14**, 31–34.

Note

Development of a Density Slicer for the Simple Collection of Respective Density Layers after Stepwise Density Gradient Centrifugation

EMIKO ARAKI^{1, 2, §}, TAKUHIRO MATSUZAKI², TEPPEI SEKITA²,
MIKAKO SAITO², AND HIDEAKI MATSUOKA^{2*}

¹Japan Food Research Laboratories, 52-1, Motoyoyogi-cho,
Shibuya-ku, Tokyo 151-0062, Japan

²Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and
Technology, 2-24-16, Naka-cho, Koganei, Tokyo 184-8588, Japan

[§]Present address: Department of Fisheries, School of Marine Science and Technology,
Tokai University, 3-20-1, Orido, Shimizu-ku, Shizuoka 424-8610, Japan

Received 27 July, 2009/Accepted 6 November, 2009

Density gradient centrifugation (DGC) is useful for the separation of living microbial cells from food samples that are not filterable. After DGC, however, careful operation is necessary to collect each density layer. For a simple and reproducible collection after DGC, we have developed a seamless operation system composed of a 5-needle unit, a microchannel plate, and a microflow controller, and named this a density slicer system. Two types of 5-needle units were devised and both showed nearly the same performance. Reproducible results with the automatic operation system could be demonstrated using an *Escherichia coli* cell suspension.

Key words : Percoll density gradient/Density slicer/Cell separation/*Escherichia coli*/
Non-culture method.

In rapid methods for the determination of microbial cells in foods, dealing with non-specific signals caused by various food components is a critical issue. To overcome this problem, it is important to separate only the cells from the food matrix without killing them. There are several methods for separating living cells. They include membrane filtration, centrifugation, electrophoresis, dielectrophoresis (Markx and Pethig, 1995), acoustic separation (Petersson et al., 2007), and flowcytometry (Steen, 2000; Kitaguchi et al., 2005; Papadimitriou et al., 2006). Among these methods, the simplest and most useful method is membrane filtration. In fact, 26 out of 33 tested food matrices could successfully be dealt with by the filtration method (Shimakita et al., 2006).

However, such matrices as raw milk and oysters are not filterable without proper pretreatment using EDTA, detergents, and enzymes. In those cases, the next method of choice is density gradient centrifugation (DGC). DGC has long been used in molecular and cell biology for the separation of viruses (Guo et al., 2009), subcellular organelles (Hartwig et al., 2009), and living bacteria (Nayak et al., 2005; Fukushima et al., 2007).

Previously we studied the feasibility of using DGC with Ficoll in a particular case of fish meat contaminated with *Morganella morganii*. A promising performance was seen (Araki et al., 2009). From the viewpoint of routine test operation, however, Ficoll was not suitable because of its high viscosity. It was therefore replaced by Percoll (density: 1.130 ± 0.005 g/ml) (GE Healthcare Bio-Sciences) with much lower viscosity. In fact, DGC using Percoll was found

*Corresponding author. Tel: +81-42-388-7029, Fax: +81-42-387-1503, E-mail: mhide@cc.tuat.ac.jp

useful even from a practical viewpoint except that a careful operation of fractionation was necessary after DGC. Thus we have developed a useful system that may facilitate this operation step.

Our goal was to construct a seamless operation system including DGC, post-DGC collection, fluorescent staining, and microscopic measurement. Among them, the last two steps can be performed by using a commercially available apparatus. For post-DGC collection, there are also commercially available systems but none of them fits such a seamless system. Thus we devised a novel system for the post-DGC collection: a density slicer composed of a multi-needle unit, a microchannel plate, and a microflow controller. Its concept is that respective density layers in a centrifugation tube can be separated just as if they are sliced off with a sharp knife. Considering a sample volume fit for a microscopic measurement apparatus, we decided that the volume of one sample to be applied to DGC should be $200\ \mu\text{l}$. The composition of density layers was then decided to be $5 \times 200\ \mu\text{l}$.

The multi-needle unit was an assembly of needles that could be inserted into a centrifugation tube ($11\phi \times 34\ \text{mm}$, Thinwall Polyallomer, Beckman Coulter,

Inc., Fullerton, CA). This tube was used exclusively for the present study. The number of density layers was 5 and therefore 5 needles (TERUMO, 27G \times $3/4''$; $0.20\ \text{mm ID} \times 0.40\ \text{mm OD}$) were arranged in a circle along the inside wall of the centrifugation tube (Type-I, FIG. 1 A, B) or bundled up ($1.2\ \text{mm OD}$) at the center of the tube (Type-II, FIG. 1 C, D, E).

The 5-needle unit was inserted in the tube either before or after centrifugation. When inserted before centrifugation, the 5-needle unit and tube assembly was held upright after centrifugation, and a coupler with 5 syringes (TERUMO, SS-01T, 27G; $1\ \text{ml}$) was connected to the 5-needle unit (FIG. 1A). When inserted after centrifugation, the 5-needle unit connected to the adapter was inserted in the tube gently and carefully (FIG. 1 B). In the case of Type-II, the experimental manner was same as the case of Type-I. Density layers (each layer $200\ \mu\text{l}$) were collected by suction at $400\ \mu\text{l}/\text{min}$ from the bottom in the order of 100, 75, 50, 25, and 0 (sample layer) v/v % layers with respective syringes (FIG. 1A, B, D), or with a microflow control system (FIG. 1E).

A microchannel plate (FIG. 2A) was devised so that 5 layers could be collected seamlessly via separate microchannels. The microflow was regulated at $400\ \mu\text{l}/\text{min}$ by a microflow control system composed of valves (FIG. 2B, C, D), a syringe pump (PHD2000-P, Harvard Apparatus, Holliston, MA) (FIG. 2E), and their controller (FIG. 2F).

In order to verify the performance of the density slicer, *Escherichia coli* was applied as a test bacterium. *E. coli*, maintained on a tryptic soy agar (TSA) plate at 4°C , was inoculated into LB broth and cultured for 18 h at 37°C with shaking at 130 rpm. Then $100\ \mu\text{l}$ of the culture was transferred to 10 ml LB broth and cultured for another 18 h at 37°C with shaking at 130 rpm. After that, the cells were collected, washed with a phosphate buffer (PB) solution, and suspended in PB solution to prepare a cell suspension containing approximately 1000-2000 cells per $200\ \mu\text{l}$.

A Percoll density gradient tube was prepared beforehand according to the following protocol. Percoll was dissolved in a 50 mM PB solution (pH 7.0) to prepare 75, 50, and 25 v/v % solutions. Two hundred μl of each Percoll/PB solution, beginning with 100 v/v %, were put into a centrifugation tube by careful manipulation of a micropipette by hand. Two hundred μl of the cell suspension prepared above was laid onto the top layer in this density gradient tube.

The tube was centrifuged using a centrifugation system (Optima™ TLM, and TLS-55 swing bucket rotor, Beckman Coulter, Inc.) at 5000 rpm for 30 min at 4°C . After the centrifugation, each layer was collected

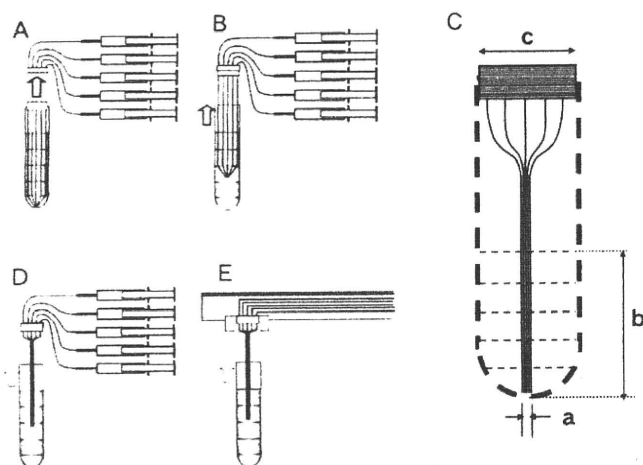


FIG. 1. Five-needle units and density layer collection modes.

(A) Type-I 5-needle unit was connected to the coupler of a 5-syringe unit after centrifugation. (B) Type-I 5-needle unit, that was connected to the coupler of 5-syringe unit beforehand, was inserted into a centrifugation tube after DGC. (C) Type-II 5-needle unit. $a=1.2\ \text{mm}$, $b=\text{ca. } 17\ \text{mm}$, $c=11\ \text{mm}$. (D) Same as B except that a Type-II 5-needle unit was used instead. (E) Same as D except that a 5-needle unit was connected to the coupler of a microchannel plate for the automatic collection of the respective density layers.

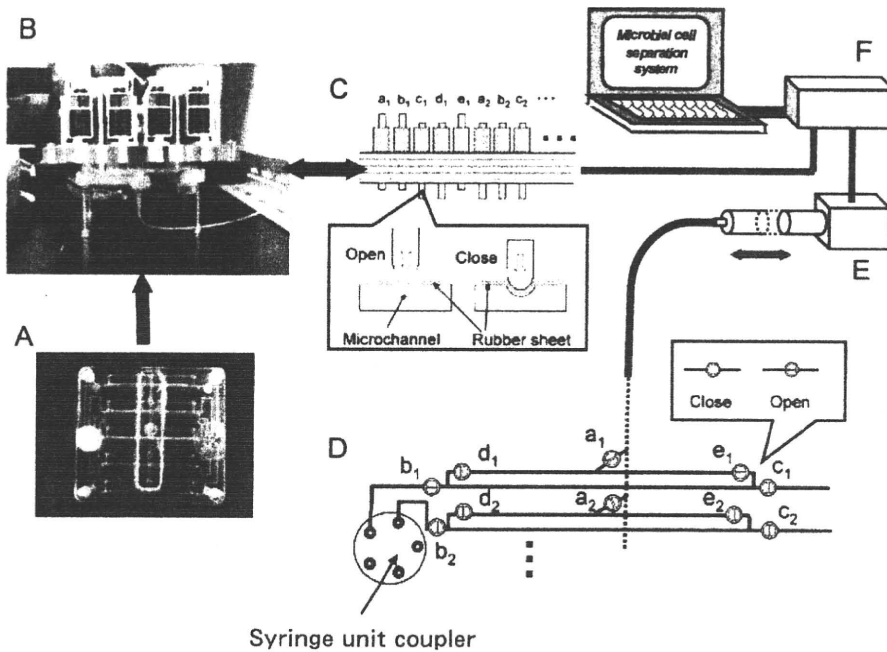


FIG. 2. Schematic diagram of a density slicer system.

(A) Microchannel plate. (B) Assembly of a microchannel plate and a valve unit. (C) Valve operation mechanism. (D) Arrangement of microvalves along microchannels and a syringe unit coupler. At first, a Type-I or Type-II 5-needle unit (FIG. 1) is connected to the syringe unit coupler. Then valves b_1 , e_1 , and a_1 are opened and a 200 μ l aliquot is transferred to the microchannel between e_1 and the tip of one needle of the 5-needle unit. Then b_1 , e_1 , and a_1 are closed. Next, b_2 , e_2 , and a_2 are opened and the second 200 μ l aliquot is transferred to the micro channel between e_2 and the tip of the 2nd needle of the 5-needle unit. The same operation is repeated 5 times to collect 5 density layers seamlessly. (E) Syringe pump. (F) Valve unit and syringe pump controller.

separately. At first, the collection was performed by a careful manipulation of a micropipette by hand. The volume dial of the micropipette was adjusted to 200 μ l and 5 layers were collected from the top layer by a one push-suction operation of the micropipette per layer. The second collection mode was the collection from the bottom by manual operation of a 5-syringe unit (FIG. 1A, B, D). Finally, each density layer was collected by means of an automatic operation system depicted in FIG. 1E and FIG. 2. After collection, the number of living cells in 100 μ l aliquot of each layer was determined by the colony count method using standard agar medium (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo) after the incubation at 37 °C for 24 h.

In the first collection mode, the highest and the second highest numbers of cells were collected in the 75 and 50 v/v % layers, respectively (FIG. 3a). Approximately 97% of the cells in the test sample were collected in these 2 layers. This method was thought to be best to minimize layer-to-layer mixing during collection but the operation took more than 5

min per tube.

In the second collection mode (FIG. 1A, B, D), the highest and the second highest numbers of cells were collected in the 75 and 50 v/v % layers, respectively (FIG. 3b, c, d), in the same manner as the first collection mode. Though the relative distribution of cells in both layers was slightly different, the sum of both layers was 95, 96, and 96% for the modes of FIG. 1A, B, and D, respectively.

In the automatic collection mode (FIG. 1E), the cells were much more concentrated in the 75 v/v % layer (FIG. 3e) than other cases. However, the sum of cells collected in the 75 and 50 v/v % layers reached 95 %, which was at a level similar to above described cases.

In the present study, the total cell recovery from the original pre-DGC sample was not exactly compared, because our primary concern was how to minimize the layer-to-layer mixing. However, the loss of living cells during the collection process seemed to increase as the collection flow line became longer; i.e.

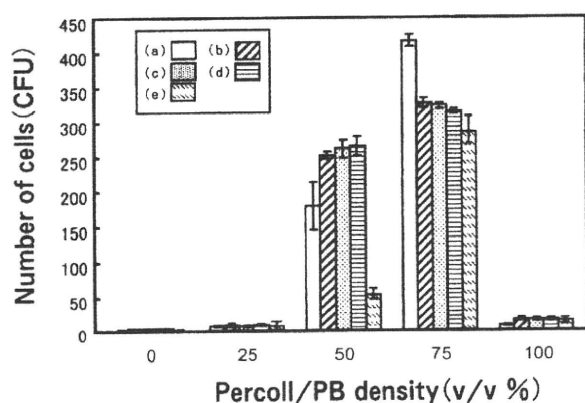


FIG. 3. Cell distribution in each density layer after DGC.

(a) Collected by manual pipette operation from the top layer of a density gradient tube. (b) Collected by manual operation mode FIG. 1A. (c) Collected by manual operation mode FIG. 1B. (d) Collected by manual operation mode FIG. 1D. (e) Collected by the automatic operation mode FIG. 1E. Each bar indicates mean \pm SD for $n=3$.

from the pipette chip alone, the needle and tubing, and to the needle and a microchannel. This suggests the adsorption of cells on the inside walls of the flow line. Therefore it would be necessary to find a more effective rinsing process, if a much higher recovery rate is required.

Among the data of the 75 and 50 v/v % layers in FIG. 3, the case (a) at 50 v/v % showed the greatest value of standard deviation for 3 repeated tests. In this case, the relative repeatability standard deviation (RSD) was 19 % ($100 \times 34.2/179.7=19.0$). This is not a bad level considering that the cell number is not expressed by the \log_{10} scale but by the linear scale. In the case (e) at 75 v/v %, RSD was 7.0 %. These results indicated that sufficient repeatability was ascertained both in manual and automatic collection modes.

Recently, researchers have reported on various types of microdevices for cell transport (Inatomi et al., 2006; Manneberg et al., 2009) and their ideas and suggestions for the design for a specific purpose are practical. Among them, the idea of a valve system described by Futai et al. (2006) was especially attractive. Then we devised a similar system to fit our experimental conditions. As described above, our system showed a promising performance.

The plastic plate of the microchannel (FIG. 2A) was also devised by CAD in our laboratory and used repeatedly by rinsing it each time. Practically, however, it would be better to use a disposable plate. Thus, we are in the process of developing a smaller

and thinner disposable one.

In conclusion, the density slicer is a useful system for the post-DGC collection of living cells and potentially applicable to any type of cells and particles as long as they can be separated by DGC. Therefore, we expect that the seamless operation using a density slicer system will lead to the realization of an official grade validation of a non-culture rapid method.

ACKNOWLEDGMENTS

Author Matsuoka would like to acknowledge the support received from the Grant-in-aid for Scientific Research for the Promotion of Safety and Security of Foods, on the Subjects: "measurement uncertainty" (H20-Food-General-011), "measurement accuracy and precision assurance" (H20-Food-General-012), "rapid microbiological methods" (H18-Food-General-011), The Ministry of Health, Labor, and Welfare. This study was partly supported also by the Strategic International Cooperative Program, Strategic Japanese-Swedish Cooperative Program on Multidisciplinary BIO (2007-2008): Acoustic Separation of Microbial Cells Alive from Food Samples. JST/VINNOVA-SSF.

REFERENCES

- Araki, E., Takayama, K., Saito, M., and Matsuoka, H. (2009) Viable separation of histamine-producing bacteria free from meat components of yellowtail by density gradient centrifugation. *Biocontrol Sci.*, **14**, 31-34.
- Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R., and Fujiwara, S. (2007) Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 92-100.
- Futai, N., Gu, W., Song, J.W., and Takayama, S. (2006) Handheld recirculation system and customized media for microfluidic cell culture. *Lab. Chip*, **6**, 149-154.
- Guo, Y., Cheng, A., Wang, M., and Zhou, Y. (2009) Purification of anadid herpesvirus 1 particles by tangential-flow ultrafiltration and sucrose gradient ultracentrifugation. *J. Virol. Methods*, **161**, 1-6.
- Hartwig, S., Feckler, C., Lehr, S., Wallbrecht, K., Wolgast, H., Müller-Wieland, D., and Kotzka, J. (2009) A critical comparison between two classical and a kit-based method for mitochondria isolation. *Proteomics*, **9**, 3209-3214.
- Inatomi, K.I., Izuo, S.I., and Lee, S.S. (2006) Application of a microfluidic device for counting of bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **43**, 296-300.
- Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., and Nasu, M. (2005) Enumeration of respiring *Pseudomonas* spp. in milk within 6 hours by fluorescence in situ hybridization following formazan reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**,

- 2748-2752.
- Manneberg, O., Vanherberghen, B., Önfelt, B. and Wiklund, M. (2009) Flow-free transport of cells in microchannels by frequency-modulated ultrasound. *Lab. Chip*, **9**, 833-837.
- Markx, G.H., and Pethig, R. (1995) Dielectrophoretic separation of cells: Continuous separation. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 337-343.
- Nayak, B.B., Kamiya, E., Nishino, T., Wada, M., Nishimura, M., and Kogure, K. (2005) Separation of active and inactive fractions from starved culture of *Vibrio parahaemolyticus* by density dependent cell sorting. *FEMS Microbiol Ecol.*, **51**, 179-186.
- Papadimitriou, K., Partsinis, H., Nebe-Von-Caron, G., Kletsas, D., and Tsakalidou, E. (2006) Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *Int. J. Food Microbiol.*, **111**, 197-205.
- Petersson, F., Aberg, L., Swärd-Nilsson, A.M., and Laurell, T. (2007) Free flow acoustophoresis: microfluidic-based mode of particle and cell separation. *Anal. Chem.*, **79**, 5117-5123.
- Shimakita, T., Tashiro, Y., Katsuya, A., Saito, M., and Matsuoka, H. (2006) Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with Bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit. *J Food Prot.*, **69**, 170-176.
- Steen, H.S. (2000) Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *J Microbiol. Methods*, **42**, 65-74.

報 文

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

(平成 20 年 6 月 30 日受理)

渡 邊 敬 浩^{1,*} 米 谷 民 雄² 松 田 り え 子¹Factors Affecting the Variance of Copy Numbers in Real-time PCR as
Estimated from Calibration CurvesTakahiro WATANABE^{1,*}, Tamio MAITANI² and Rieko MATSUDA¹¹ National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;² University of Shizuoka: 52-1 Yata, Suruga-ku, Shizuoka 422-8536, Japan;

* Corresponding author

The distribution interval of calibration curves in real-time PCR was successfully predicted from the variance of the Ct values, and the predicted distribution interval was consistent with the interval of the actual calibration curves. Although the width of the 95% confidence interval at the lower end was about 1%, the copy number estimated from individual calibration curves was distributed over a wider range, and the 95% confidence interval of the estimates of 20 copies was $\pm 40\%$. The variances of the Ct values at 20 copies were significantly larger than those at higher copy numbers, and this large variation increased the distribution interval of the calibration curves. The variation, however, can be attributed to the probabilistic distribution of copy numbers in the measurement system, and is impossible to reduce by improvement of the analytical methodology. The 95% confidence interval of the calibration curves obtained after omitting 20 copies was decreased and the measurement precision was improved.

(Received June 30, 2008)

Key words: リアルタイム PCR real-time PCR; 検量線 calibration curve; 精度 precision

緒 言

定量を目的とした多くの分析では、標準品を測定し、測定対象物質の濃度と得られる信号との関係を示す検量線を作成する。未知濃度の測定対象物質を含む試料から得られた信号は、検量線に内挿（もしくは外挿）されることにより濃度に変換され、これが目的とする測定量（定量値）となる。検量線は測定原理に応じて回帰分析などの手法により作成されるが、いずれの場合も測定された信号に基づいている。また、測定には必ず誤差を伴うため、その大きさに応じて検量線は変動し、その幅（変動範囲）が検量線の信頼区間となる。林ら^{1)~3)}は、検量点となる異なる濃度の測定対象物質から得られた測定量の分散から、検量線の信頼区間を求める式を誘導し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) の検量線の信頼区間が推定できることを示した。

HPLC あるいはガスクロマトグラフ (GC) をはじめとする大部分の機器分析においては、検量線は原点を通る直線

となり、これは信号と濃度の関係を直接表している。これらの機器分析に対し、安全性審査を終了した遺伝子組換え (GM) 食品の定量分析を目的とし、組換え DNA 技術応用食品の検査方法^{*1}として示されているリアルタイム PCR 法（定量 PCR 法）においては、まず、得られた信号（蛍光）は Ct 値に変換される⁴⁾。次いで、原理的に測定量として規定される DNA 中の特定塩基配列の数（コピー数）の対数と Ct 値との間の直線関係を利用した検量線が作成される。一次的に得られる信号を変換した値があたかも信号のように扱われ、さらには、作成される検量線の傾きが負であり原点を通らない点は、一般的な機器分析の検量線とは異なるリアルタイム PCR 法の特徴である。

現在、食品にかかわる分析法については、その性能を評価し、分析値の品質を保証することが求められている⁵⁾。一方、リアルタイム PCR 法をはじめとする生化学的分析法は、理化学分析法に比較して分析法の性能評価についての研究が進んではいない。本研究では、リアルタイム

* 連絡先

¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野 1-18-1² 静岡県立大学食品栄養科学部: 〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1*¹ 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“組換え DNA 技術応用食品の検査方法について（一部改正）”平成 18 年 6 月 29 日、食発第 0629002 号 (2006)。

PCR法の性能評価の一部として、検量線に起因する推定コピー数の変動を、林らの検量線信頼区間推定方法を応用して推定することを試みた。さらに、変動を減少させることを目的に、検量線のデザインについて検討した。

方 法

1. 試 薬

TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ: ABI 社製), ダイズ内在性 DNA Le1 オリゴヌクレオチドセット, GM ダイズ (RRS) プラスミドセット—ColEI/TE— (以上ニッポンジーン社製) を用いた。他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

2. 機 器

リアルタイムPCR機器: ABI PRISM[™] 7900 HT (ABI 社製)。

3. 検量線の作成

食安発第 0629002 号 3.1.2 項に記載された GM ダイズ (Roundup Ready Soy; RRS) を対象としたリアルタイムPCR法のうち、内在性遺伝子であるレクチン遺伝子を増幅し検出するためのプライマーとプローブの組み合わせ (Le1 オリゴヌクレオチドセット) を用い、1 反応当たり 20, 125, 1,500, 20,000, 250,000 のコピー数が計測されるよう濃度調製された GM ダイズプラスミドセット—ColEI/TE—を測定した。反応液組成ならびに PCR 条件は上記通知に従い、リアルタイムPCR機器には ABI PRISM 7900HT を用いた。PCR 機器に供する 96 ウェルプレート上に規定の配置で調製済み反応液を分注した。1 本の検量線作成のための検量点は上記の 5 点とし、計測数は各検量点につき 3 ウェルとした。プレート 1 枚当たりでは 5 本の検量線を作成するための測定を行い、これを 3 回繰り返した。この実験計画により、合計 15 本の検量線を作成した。なお、PCR により得られた測定量の解析法上、Ct 値を得る目的から、指数関数的に増加している領域に Threshold line として設定することが規定されている補正蛍光強度 (ΔRn) は、全検量線の解析を通じて 0.256 とした。

4. 検量線の信頼区間の計算

X_i : コピー数の常用対数, Y_i : Ct 値, e_i : Ct 値の標準偏差 (SD) とすると、検量線の傾きは

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X}) Y_i}{S_{XX}} \quad (1)$$

切片は

$$b = \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Y_i \right) - a\bar{X} \quad (2)$$

で表される。このとき、傾きおよび切片の SD, \bar{a} および \bar{b} は

$$\bar{a}^2 = \frac{1}{S_{XX}^2} \left\{ \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 e_i^2 \right\} \quad (3)$$

および

$$\bar{b}^2 = \sum_{i=1}^N \left\{ \left[\frac{1}{N} - \frac{\bar{X}}{S_{XX}} (X_i - \bar{X}) \right]^2 e_i^2 \right\} \quad (4)$$

共分散は

$$\text{Cov}(a, b) = \sum_{i=1}^N \left[\left\{ \frac{(X_i - \bar{X})}{NS_{XX}} - \frac{\bar{X}}{S_{XX}^2} (X_i - \bar{X}) \right\} e_i^2 \right] \quad (5)$$

である。検量線の信頼区間は、

$$\hat{Y} = A_X^2 (X - B_X)^2 + C_X^2 \quad (6)$$

で表され、係数 A_X, B_X, C_X はそれぞれ、

$$A_X = \bar{a} \quad (7)$$

$$B_X = - \frac{\text{Cov}(a, b)}{\bar{a}^2} \quad (8)$$

$$C_X = \bar{b} \left[1 - \frac{\text{Cov}(a, b)^2}{\bar{a}^2 \bar{b}^2} \right]^{1/2} \quad (9)$$

で表される。

結果および考察

1. 検量線の信頼区間の推定

Table 1 に、作成した 15 本の検量線に関する基本的なパラメーター (傾き、切片および相関係数)、各濃度 (コピー数) の検量点から得られた Ct 値およびその SD を示す。すべての検量線が食安発第 0629002 号 3.1.2 項に規定された基準 (相関係数が 0.990 を上回る) を満たしていた。コピー数の増加に応じて Ct 値の SD は減少しているが、他の検量点に比べ、20 コピーでの Ct 値の SD は際だって大きい。

Fig. 1a には、SD の算出に使用したコピー数ごとの Ct 値 (○) を、これらの Ct 値をコピー数の対数に対して一次回帰分析することで作成した検量線 15 本の分布とともに示した。検量線の分布範囲は 10,000 コピー付近で最も小さくなり、最大 (250,000) および最小 (20) コピーでは広がっている。一般に回帰直線の信頼区間は、説明変数の重心付近で最も小さくなる。本実験における説明変数の重心は 1,800 コピーであり、実測した信頼区間が最小となるコピー数はこれよりも大きい。Table 1 に示したとおり、20 コピーにおける Ct 値の SD が極めて大きいため、低コピー数側で検量線の分布が広くなり、これに伴って、信頼区間の極小が高コピー数側に移動したことが原因であると考えられる。

Table 1 に示した各コピー数における Ct 値の SD を、式 (3)~(5) の e_i に代入し、検量線の 95% 信頼区間を計算した結果を Fig. 1b に示す。15 本すべての検量線が、点線で示した 95% 信頼区間に含まれた。また、信頼区間の形は実際の検量線の分布とほぼ一致し、式 (1)~(9) によって、リアルタイムPCRの検量線の信頼区間が推定できることが示された。

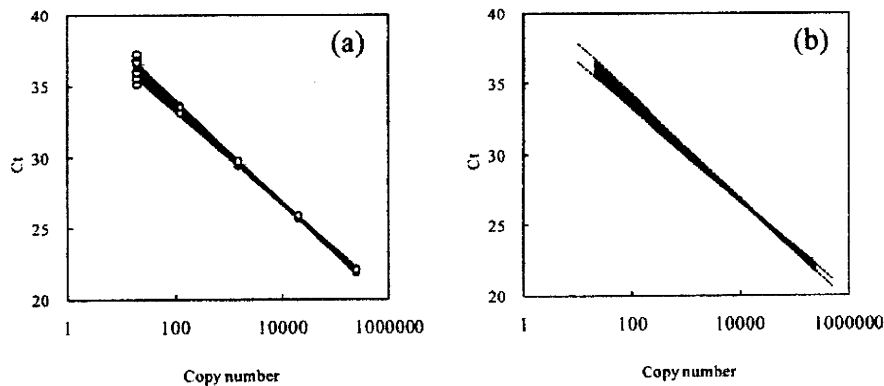
2. 検量線により推定したコピー数の信頼区間

検量線の信頼区間は最も広い 20 コピー付近でも $\pm 1\%$ 程度であり、一般的な理化学分析と比較しても大きいとは言えない。しかし、リアルタイムPCR法の検量線のように分析対象の測定量が対数となっている場合には、検量線

Table 1. The basic parameters of the calibration curves obtained with real-time PCR and variance of Ct value at various copy numbers

| Plate No. | Standard curve No. | Copy number | | | | | Slope | Intercept | Correlation |
|-----------|--------------------|-------------|---------|---------|---------|---------|--------|-----------|-------------|
| | | 20 | 125 | 1,500 | 20,000 | 250,000 | | | |
| 1 | 1 | 35.5114 | 33.3063 | 29.6252 | 25.8654 | 21.9383 | -3.333 | 40.097 | -0.999 |
| | 2 | 36.0965 | 33.6082 | 29.6630 | 25.7669 | 21.9663 | -3.475 | 40.730 | -1.000 |
| | 3 | 36.6785 | 33.3446 | 29.6758 | 25.8390 | 22.0029 | -3.538 | 41.021 | -0.999 |
| | 4 | 36.0715 | 33.4870 | 29.5154 | 25.7561 | 21.9861 | -3.454 | 40.603 | -1.000 |
| | 5 | 36.5170 | 33.3506 | 29.4307 | 25.8820 | 21.9645 | -3.511 | 40.855 | -0.999 |
| 2 | 6 | 35.9994 | 33.4758 | 29.6634 | 25.7670 | 21.9503 | -3.446 | 40.588 | -1.000 |
| | 7 | 36.0264 | 33.2345 | 29.5266 | 25.7460 | 21.9781 | -3.421 | 40.437 | -1.000 |
| | 8 | 36.5040 | 33.6081 | 29.5876 | 25.8240 | 21.9278 | -3.550 | 41.044 | -1.000 |
| | 9 | 36.5403 | 33.1374 | 29.6619 | 25.7380 | 22.0591 | -3.489 | 40.483 | -0.999 |
| | 10 | 37.1858 | 33.1183 | 29.4528 | 25.6880 | 21.8238 | -3.653 | 41.343 | -0.997 |
| 3 | 11 | 36.7997 | 33.0853 | 29.5720 | 25.6914 | 22.0261 | -3.541 | 40.958 | -0.998 |
| | 12 | 35.4790 | 33.1503 | 29.4927 | 25.7904 | 21.9047 | -3.324 | 39.980 | -1.000 |
| | 13 | 35.1107 | 33.2738 | 29.7044 | 25.7111 | 21.9428 | -3.272 | 39.798 | -0.998 |
| | 14 | 36.8094 | 33.1410 | 29.6882 | 25.8001 | 22.0404 | -3.500 | 40.846 | -0.999 |
| | 15 | 35.8870 | 33.5792 | 29.7522 | 25.9031 | 22.0082 | -3.413 | 40.535 | -1.000 |
| Mean | | 36.201 | 33.327 | 29.601 | 25.785 | 21.968 | | | |
| SD | | 0.561 | 0.186 | 0.098 | 0.067 | 0.059 | | | |

The value of threshold line was kept at 0.256 for all data analysis.

**Fig. 1.** Calibration curves (a) and their 95% confidence intervals estimated from SD of Ct value (b)

Circles: Ct values obtained with the real-time PCR

Solid lines: calibration lines calculated from Ct values and logarithm of copy numbers

Dotted lines: 95% intervals of calibration lines estimated from SD of Ct values and Eqs. (1)–(9).

の相対的信頼区間と、検量線に基づき推定された分析対象の測定量の相対的信頼区間は一致しない。したがって、リアルタイム PCR 法により作成される検量線の変動が測定量に与える影響を評価するためには、検量線の信頼区間を推定するだけでは不十分であり、検量線に基づき推定されるコピー数の分布を知らなくてはならない。

検量線に基づき推定されるコピー数の分布を知るために、まず、15本の検量線を作成するための計測により得られた全 Ct 値を検量点別に集計した上で平均値を算出することにより、各コピー数について計測される Ct 値の代表値（代表 Ct 値）とした。次いで、得られた5つの代表 Ct 値を15本の検量線により変換することにより、検量点当たり15のコピー数推定値を得た。Fig. 2 には、個々のコピー数推定値の全推定コピー数の平均値からのバイアス

(%)を●で示した。上下の曲線は、検量線の95%信頼区間の上限と下限から推定したコピー数のバイアスである。

Fig. 2 に示すように、推定コピー数の95%信頼区間の幅は、20コピー付近では±40%程度、最も信頼区間の幅小さい10,000コピー付近では±10%程度となった。一定以上に高いコピー数の検量点から得られる Ct 値の SD は小さいが (Table 1), 推定コピー数の信頼区間の幅は再度増加し250,000コピー付近では±20%となった。これらの結果は、リアルタイム PCR 法において検量線により推定されるコピー数の相対標準偏差 (RSD) が、コピー数が一定数以下に低い場合には一般的な理化学分析と比較して非常に大きく、さらには一定数以上に高い場合にも明らかに大きくなることを示している。

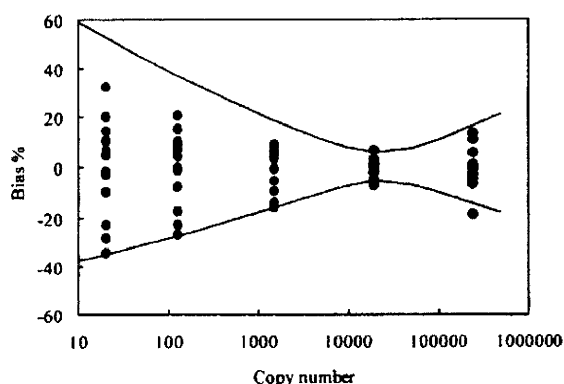


Fig. 2. Distribution of copy numbers estimated from calibration curves at 5 levels

Circles: copy number estimates shown as bias (%) from means

Lines: 95% intervals of copy number estimates

3. Ct 値変動の原因

Table 1 に示したように、20 コピーから得られる Ct 値の SD は、それよりも高いコピー数に比較して数倍以上大きい。一般的な機器分析においても、測定対象物質の濃度が小さい範囲では、得られる信号の RSD は増大する。これは低濃度の測定対象物質から得られる信号そのものが小さくなるために、機器のノイズなどの影響を大きく受けるためである。リアルタイム PCR 機器により検出された信号（蛍光）を補正して得られる値（ ΔRn 値）を、縦軸を ΔRn 値、横軸を PCR のサイクル数として示した Amplification plot curve の解析により、目的の ΔRn 値に達したサイクル数が Ct 値として規定される。また、測定対象となるコピー数が低いほど必要な信号が生じるまでに多くの PCR サイクル数を要する。これらを理由に、リアルタイム PCR における Ct 値は、理化学分析とは逆に低濃度つまり、低いコピー数になるにつれて増大する。上述のとおり、Ct 値は Amplification plot curve 上で ΔRn 値が一定の値に達するまでの PCR サイクル数であり、言い換えれば、その時点での ΔRn 値つまり補正蛍光強度は、コピー数によらず一定である。したがって、蛍光検出系におけるノイズの影響もコピー数によらず一定とであると考えられる。以上の考察から、20 コピーにおいて観察される Ct 値の SD の増加は、理化学分析とは異なる要因によると考えられる。

リアルタイム PCR 法では、96 ウェル（もしくは 384 ウェル）で構成されたプレートを実験用 PCR 機器に供し、PCR を行いながら生じる信号を計測する。低コピー数に関しては、一括して調製された多量の反応溶液を複数のウェルに分配した場合、各ウェルに含まれる実際のコピー数は一定ではなくある範囲に分布する。検量点として規定されている 20 コピーについては、各ウェルに平均して 20 コピーが入るように調製した反応溶液を複数のウェルに分配した場合、実際に分配されるコピー数は一定して 20 コピーにはならず、Poisson 分布に従う。また、

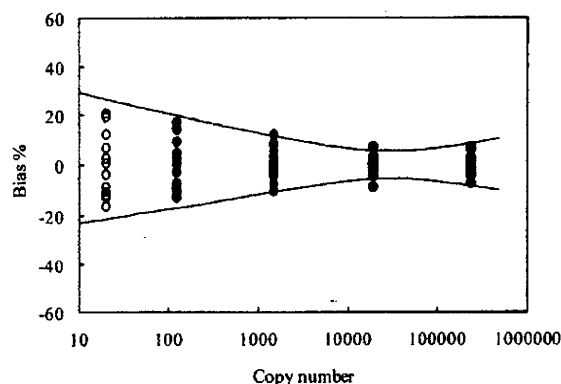


Fig. 3. Distribution of copy numbers estimated from calibration curves at 4 levels, excluding 20 copies

Closed circles: copy number estimates shown as bias (%) from means; value for 20 copies were estimated by extrapolation and are shown as open circles.

Lines: 95% intervals of copy number estimates

平均が 20 である Poisson 分布の 95% 信頼区間は 11 コピーから 29 コピーである。平均的な検量線を用いて、このコピー数に対応する Ct 値を算出すると 35.6 から 37.0 程度となり、実測で得られた Ct 値の範囲とおおむね一致した (Fig. 1a)。これらの結果および考察により、20 コピーでの Ct 値の変動は測定系に入るコピー数が分布していることが主な原因であり、測定系を改良しても小さくすることは困難であると考えられた。

どのような分析法においても、測定系に入る対象分子の数は Poisson 分布に従う。しかし、一般的な理化学分析においては、低濃度範囲であっても測定系には 10,000 分子以上が入ると考えられ、Poisson 分布によって起こる分子の個数の RSD は 1% 以下である。Poisson 分布が測定量の変動の大きな要因となるのは、原理的には 1 コピーでも増幅することで検出可能となるリアルタイム PCR の大きな特徴と考えられる。

4. 検量線の信頼区間の低減方法

式 (3) から (5) により明らかであるが、検量線の信頼区間は個々のコピー数における Ct 値の SD に依存している。したがって、Ct 値の SD を小さくすることができれば、検量線の信頼区間の幅は小さくなる。本研究において示した例では、20 コピーを計測して得られる Ct 値の SD が極めて大きいため、これを小さくできれば検量線の信頼区間の幅が全体に狭くなると期待できる。しかし前述のように、分析法を改良することにより 20 コピーにおける Ct 値の SD を低下させることは困難である。20 コピーを除いて検量線を作成した場合には、式 (3) から (5) において大きな SD (σ_i) の寄与がなくなると同時に、検量点の数 (N) が減少するため、信頼区間の形状が変化すると予想される。

Fig. 3 には、20 コピーを除いた 4 つの検量点に基づき

作成した検量線および、Fig. 2 と同様に推定したコピー数の分布を示した。20 コピーの Ct 値は検量線の作成には含まれていないが、コピー数の推定は行った。Fig. 2 と比較すると、分布範囲が最も狭くなるコピー数が高いコピー数の側に移動し、両端の信頼区間は狭くなっている。20 コピーの Ct 値を検量線作成データに含めなかったにもかかわらず、対応する推定コピー数の分布は、検量線作成データに 20 コピーの Ct 値を含めた場合に比べ小さくなり、推定の精度が向上した。

ま と め

本研究では通知された方法に規定されている検量線のデザインに基づき種々の検討を行ったが、このデザイン自体に結果をばらつかせる要因が含まれていることが明らかとなった。リアルタイム PCR 法の精度を低下させる要因についてはこれまでに十分に検討されておらず、測定各ステップで、精度を低下させる要因を特定し除去することによって、分析の信頼性が向上すると期待される。本研究で検討した検量線について端的に言えば、低濃度であるために測定系に入る対象分子数が原理的に分布する 20 コピーを検量点として規定することが検量線の信頼区間の幅を広げ、コピー数の推定精度を低下させる大きな要因となることが明らかになったため、必要に応じて濃度を増加させるもしくは、20 コピーについては外挿するなど、検量線デザインの再検討が必要と考えられた。

謝 辞

本研究は、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金により実施した。

文 献

- 1) Hayashi, Y., Matsuda, R., Poe, R. B. Probabilistic approach to confidence intervals of linear calibration. *Analyst*, **121**, 591-599 (1996).
- 2) Matsuda, R., Hayashi, Y., Sasaki, K., Saito, Y., Iwaki, K., Harakawa, H., Satoh, M., Ishizuki, Y., Kato, T. Deductive prediction of precision in measurement, calibration and standard addition method in atomic absorption spectrometry for cadmium. *Anal. Chem.*, **70**, 319-327 (1998).
- 3) Hayashi, Y., Matsuda, R. An expression of uncertainty in calibration using stepwise or separate dilution of a stock solution. *Anal. Sci.*, **22**, 889-894 (2006).
- 4) Watanabe, T., Shiramasa, Y., Furui, S., Kitta, K., Minegishi, Y., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of qualitative detection methods for unapproved genetically modified rice (LLRice). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, 170-178 (2007).
- 5) CAC/GL27-1997, Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food.

報 文

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

(平成 21 年 1 月 19 日受理)

渡 邊 敬 浩* 松 田 り え 子

Development of New Software (GiMlet) to Analyze Real-Time PCR Data Based on TaqMan Chemistry® and Examination of Factors Affecting Variance of the Ct Values

Takahiro WATANABE* and Rieko MATSUDA

National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

*Corresponding author

The primary data obtained from real-time PCR is the fluorescence intensity. We developed new software, *GiMlet*, to analyze the fluorescence data more effectively.

To examine factors affecting the variance of the Ct values calculated from the fluorescence data, we conducted measurements of the same test solutions containing defined numbers of copies of the targeted DNA sequence using three kinds of real-time PCR equipment, namely, ABI PRISM 7500, 7700 and 7900HT, under consistent conditions, and analyzed the obtained fluorescence data using *GiMlet*. We also introduced a new baseline correction algorithm in *GiMlet* and examined the effect of this correction on the measurement results. The results revealed that the variances of the measured values and the PCR efficiency differed among the three kinds of real-time PCR equipment used and also according to the well-position of the PCR plate. The fluorescence data could be analyzed more precisely using the new algorithm.

(Received January 19, 2009)

Key words: リアルタイム PCR real-time PCR; Ct 値 Ct value; 精度 precision; データ解析 data analysis

緒 言

リアルタイム PCR は、遺伝子の発現量解析、微生物や組換え DNA 技術応用食品の分析など、幅広い分野において近年活発に用いられるようになった技術である^{1)~3)}。食品を対象とした分析法については、その性能を評価し、分析値の質を保証することが求められているが^{4), 5)}、リアルタイム PCR を基礎とする分析法 (リアルタイム PCR 法) をはじめとする生化学的分析法は、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) のような理化学分析法に比較して、分析法の性能評価についての研究が進んでいない。

公的な分析にリアルタイム PCR 法が応用されている例としては、組換え DNA 技術応用食品を対象とした定量 PCR 法 (組換え食品定量 PCR 法) が挙げられる。本定量 PCR 法は、PCR に伴い蛍光を生じさせるための機構に

TaqMan Probe を使用しており、正確には TaqMan Chemistry® に基づくリアルタイム PCR (TaqMan PCR) を基礎としているといえる。著者らは、本定量 PCR 法を一例に、分析手順として規定される検量線作成に伴う測定値の変動要因について検討し、PCR において増幅の対象となる DNA 配列 (コピー) の数が一定数以下である検量点を含めた検量線デザイン自体に、測定値をばらつかせる要因が含まれていることを報告した⁶⁾。特に、検量点に含まれるコピーの数が 20 以下の場合には、実際に分析系に入るコピー数が Poisson 分布に従い変動し、これが測定値変動の主要因であると考えられた。この考察は、定性的な PCR を用いて得られる結果によっても裏づけられている^{7), 8)}。一方、Poisson 分布の影響が問題とならない大きなコピー数における Ct 値の標準偏差 (SD) は、0.1~0.2 程度であった。しかしながら、リアルタイム PCR においては、Ct 値が 1 異なれば推定されるコピー数は 2 倍異なる。そのため Ct 値としては 0.1 の差しかない 2 つの測定値であっても、これを組換え食品定量 PCR 法に従いコ

* 連絡先

国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上野賀 1-18-1

ピー数に変換して比較すれば約 7% の差となるため、最終的な分析値 (定量値) の変動としては大きいと考えられる。

TaqMan PCR では、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 (TaqMan Probe) 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。本リアルタイム PCR で計測される蛍光は、1) 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、2) その増加に伴って減少する quencher 色素由来の蛍光、3) ウェル間補正に使用される reference 色素由来の蛍光の計 3 種である。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 (Rn 値) をベースライン補正することで ΔRn 値が得られる。 ΔRn 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、分析対象である特定 DNA 配列の反応開始時の数 (初期コピー数) と Ct 値の間には、初期コピー数が大きければ Ct 値は小さくなり、逆に初期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。

このように、TaqMan PCR では、一義的な測定値である蛍光値に複数の補正や変換を施して得られる Ct 値が検量のための値として扱われる。さらに組換え食品定量 PCR 法では、TaqMan PCR により未知試料から得られた Ct 値を標準物質 (検量線用標準プラスミド) から得られた Ct 値に照らしてコピー数に変換した後、内在性遺伝子と組換え DNA 配列のコピー数の比を内標比と呼ばれる係数によって除することで初めて、規格基準への適合判定に使われる値である定量値 (混入率) が得られる。当然ながら、蛍光値から Ct 値への補正・変換過程での諸条件が定量値の真度ならびに精度に影響すると考えられる。しかし TaqMan PCR により得られたデータの補正および変換を含む解析は、機器に付属のソフトウェアによって自動的に行われるため、この過程で影響を与える要因の特定およびその大きさの推定が困難である。また、ソフトウェア上の制限により適切な解析条件の設定が不可能な場合もある。

本論文では、組換え食品定量 PCR 法が広く運用され情報も多いことからその事例に言及している。また本研究の実験計画においても、分析手順およびそれに使用する試薬などが規定されていることから一部を使用した。しかし、本定量 PCR 法に限定された検討を行うことが本研究の目的ではない。本研究では、TaqMan PCR により得られるデータを任意の条件で解析可能なアプリケーション (GiMlet)*1 の開発についてまず報告するものである。そのうえで、TaqMan PCR により併行条件下で測定される

Ct 値の変動を 1 つのモデルとし、得られた実測データを本アプリケーションにより解析することで、測定に用いるリアルタイム PCR 機種やデータ解析に起因する測定値の変動について検討したので報告する。

実 験

試薬および機器

食安発第 0629002 号 3.1.2 項に記載された定量 PCR 法に準拠し、検量線用標準プラスミドを試料としてダイズ内在性遺伝子 (*Lel1*) および遺伝子組換えダイズ (Roundup ready soy; RRS) 特異的 DNA 配列を測定した。具体的には、*Lel1* あるいは RRS オリゴヌクレオチドセットにより、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 5 点の検量点を含む)、および本検量点中 1,500 コピー濃度に相当するよう意図して別途大量調製した全ウェル測定用検液 (全ウェル検液) を測定した (以上ニッポンジーン (株) 製)。なお、本稿では上記測定の組み合わせを *Lel1* 測定系および RRS 測定系と呼ぶ。また結果は、機器に付属のソフトウェアおよび ABI 社製の 96 ウェルプレート上で割り振られている A1~H12 までの記号を 1~96 の数字に置き換えて報告した。詳しくは、A1~A12 までを 1~12、B1~B12 までの記号を 13~24 といった順に H12 までを置き換えた。

TaqMan PCR により得られた蛍光値の解析法上、Ct 値を得る目的から、 ΔRn 値が指数関数的に増加している領域に設定することが規定されている Th. line は、全解析を通じて 0.128 とした。

定量 PCR 機器としては、ABI PRISM 7500, 7700, 7900HT (いずれも ABI 社製) を使用した。各機種個体は、事前にメーカーによる点検を受けたうえで使用した。

TaqMan PCR により得られる蛍光値の解析を目的としたアプリケーション (GiMlet) の開発

TaqMan PCR により得られる蛍光値を解析するためのアプリケーション (GiMlet) は、汎用性を考慮し Microsoft Visual Basic で記述した Microsoft 社製 Excel 上で実行可能なマクロとした。ABI 社製リアルタイム PCR 機器各種 (ABI PRISM 7500, 7700, 7900HT) からエクスポートされる蛍光値を含む測定データ (multi component data) への適用が可能になるようにした。現在の仕様として解析可能な測定データは、FAM を reporter 色素、TAMRA を quencher 色素とする TaqMan Probe を用いて得られるデータに限定した。主な機能として、各種リアルタイム PCR 機器に付属のソフトウェアと同様に ΔRn 値を基本データとした増幅曲線 (amplification plot curve) の描画、Ct 値の算出、検量線作成、検量線に基づくコピー数の算出のほかに、① multi component data からの Rn 値の算出および描画、② 蛍光値に基づくウェル別ベースライン補正機能および当該条件下での ΔRn 値算出、③ 任意に設定した Th. line 条件下でのウェルごとの

*1 本アプリケーションの入手に関しては、著者らにお問い合わせください。