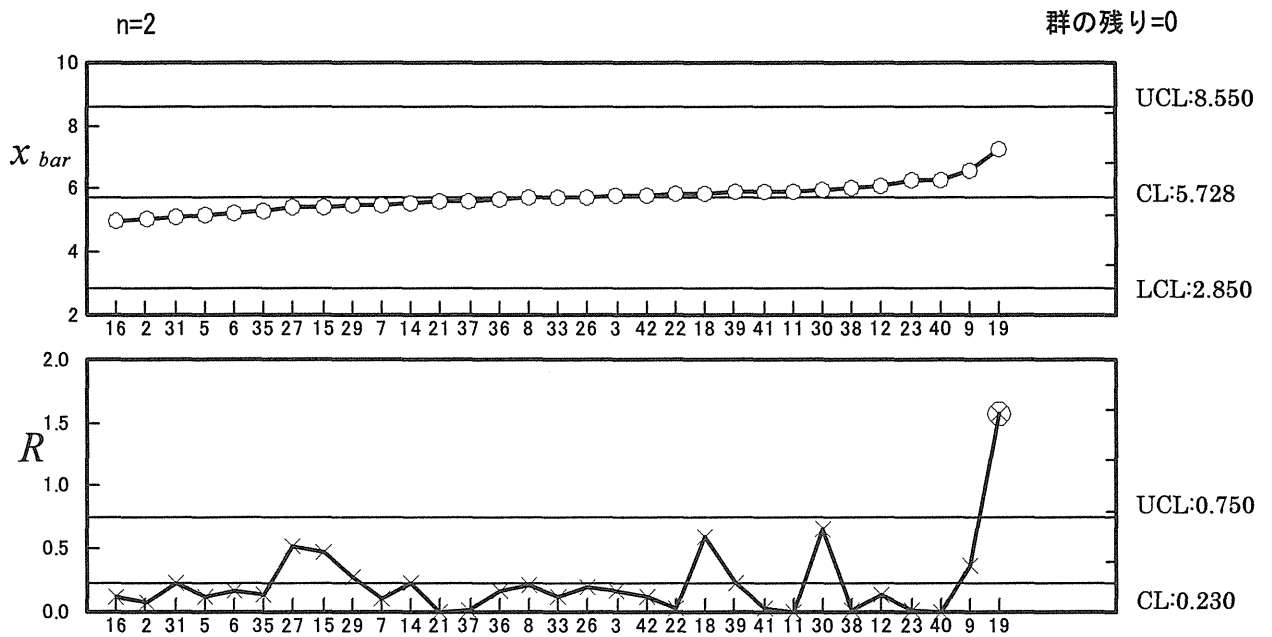


図 19 試料 3 の日本ハムキットによる測定におけるヒストグラムおよび正規確率プロット



(機関数 31)

図 20 試料 3 の日本ハムキットによる測定における Xbar-R 管理図

Xbar 管理図において上部管理限界線 (UCL) はメジアン (5.700) の 150%、下部管理限界線 (LCL) はメジアンの 50% に設定した。また、中心線 (CL) は平均値線である。R 管理図における上部管理限界線 (UCL) は R の平均値と JIS ハンドブックの係数 D_4 から算出される値である。

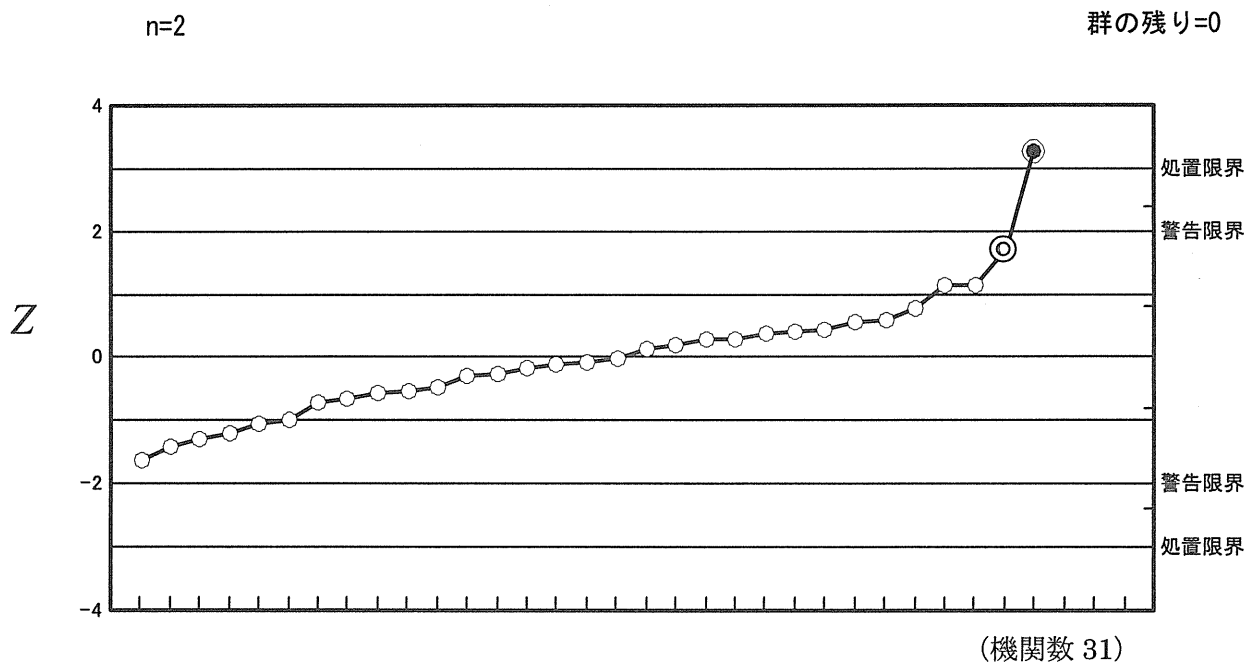


図 21 試料 3 の日本ハムキットによる測定における z スコアの順位

y 軸の値は従来方式統計、 2σ 処理前の z スコア

◎ いずれの統計方式でも z スコアの絶対値が 2 以上となった測定

結果

◎ 従来方式 (2σ 処理後)、ロバスト方式による統計で z スコアの絶対値が 2 以上となった測定結果

絶対値が 2 以上の z スコアと順位

統計方法		従来方式		ロバスト方式
z スコア	順位		2σ 処理	
2 以上	1	3.28	4.20	3.80
	2	-	2.28	2.04

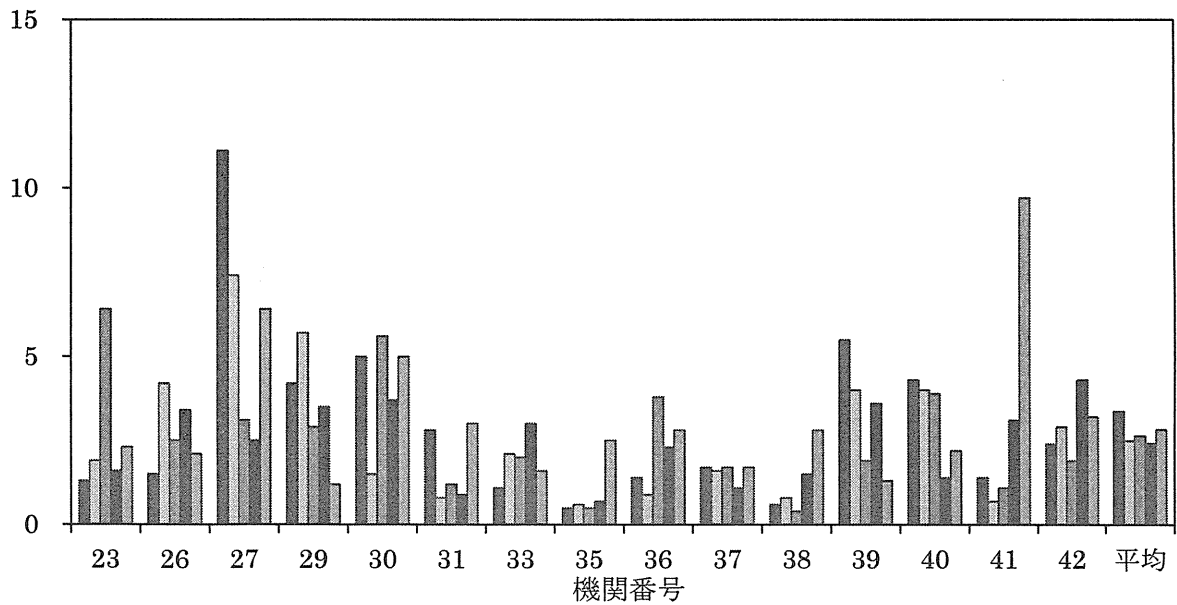
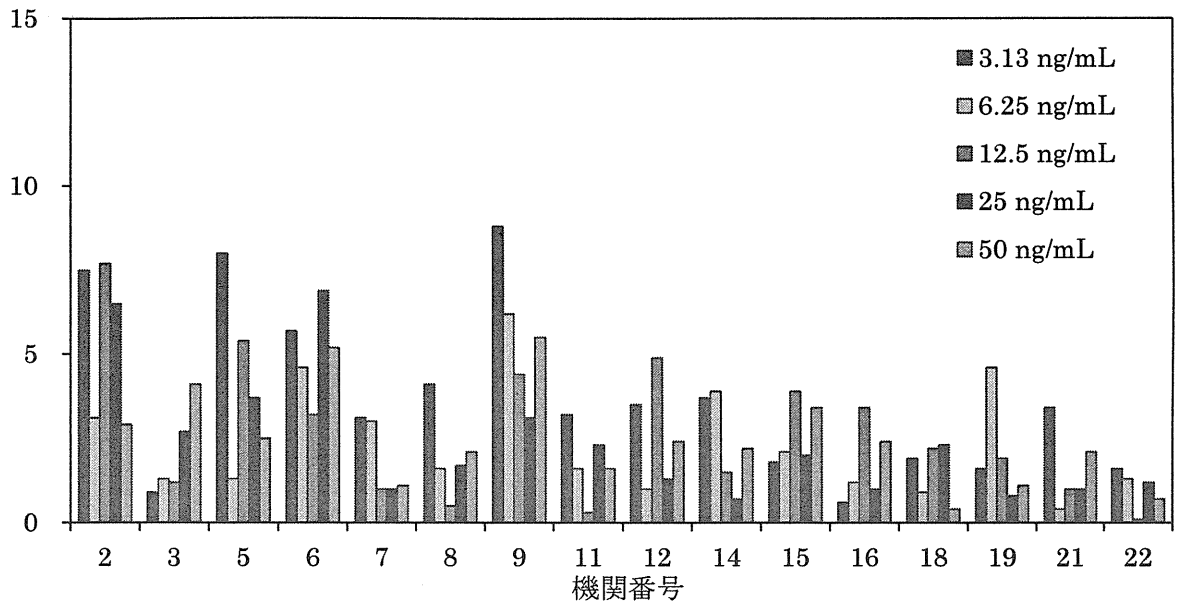


図 22 日本ハムキットの標準溶液測定における吸光度の相対標準偏差

縦軸は 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差 (%)

濃い方から 5 濃度のデータのみ解析

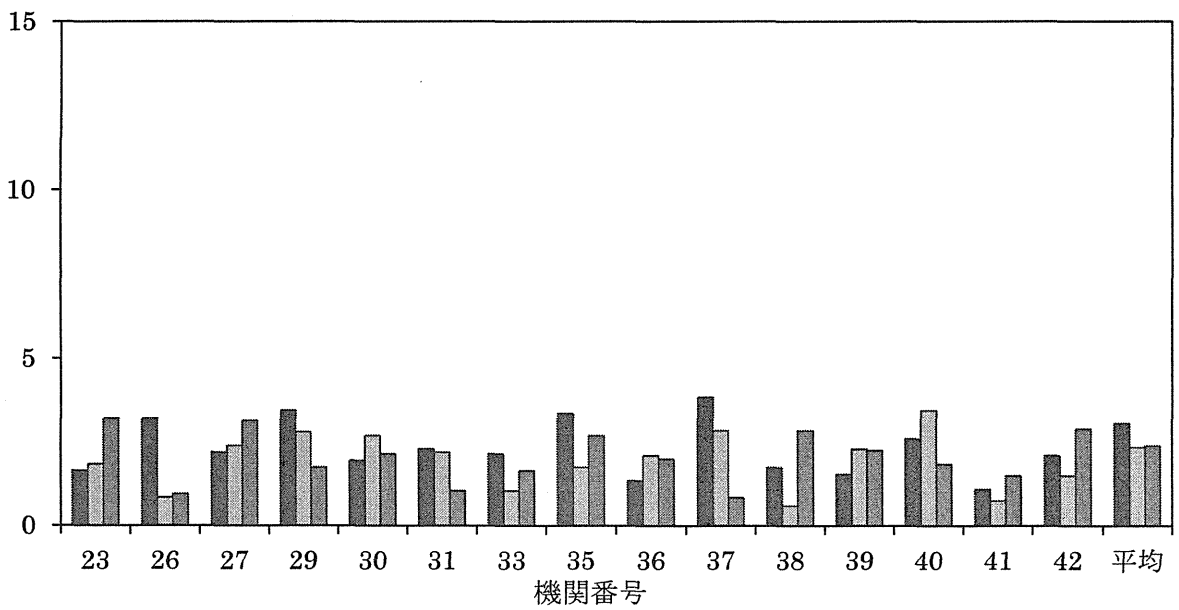
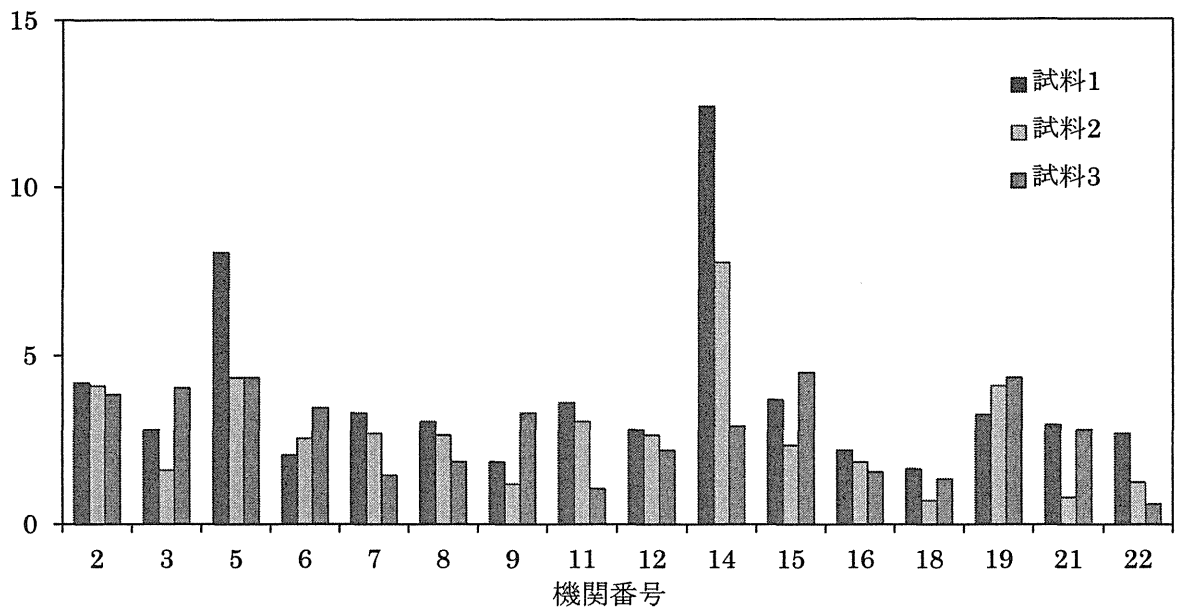


図 23 日本ハムキットの試料測定における吸光度の相対標準偏差

縦軸は各抽出液について 3 ウェルの吸光度の相対標準偏差を算出後、試料ごとに平均した値 (%)

表6 プリマハムキットによる測定結果の統計量一覧

試料名		試料1	試料2	試料3
解析対象	統計量の種類	従来方式	従来方式	従来方式
2測定の平均値	データ数 (有効機関数)	4	4	4
	平均値	9.840	7.974	5.031
	標準偏差	1.377	1.251	0.521
	相対標準偏差	13.99	15.69	10.36
	最少値	7.990	6.215	4.290
	最大値	11.280	8.920	5.420
	範囲	3.290	2.705	1.130
2測定の間	データ数	4	4	4
	Rの平均	0.200	0.118	0.103

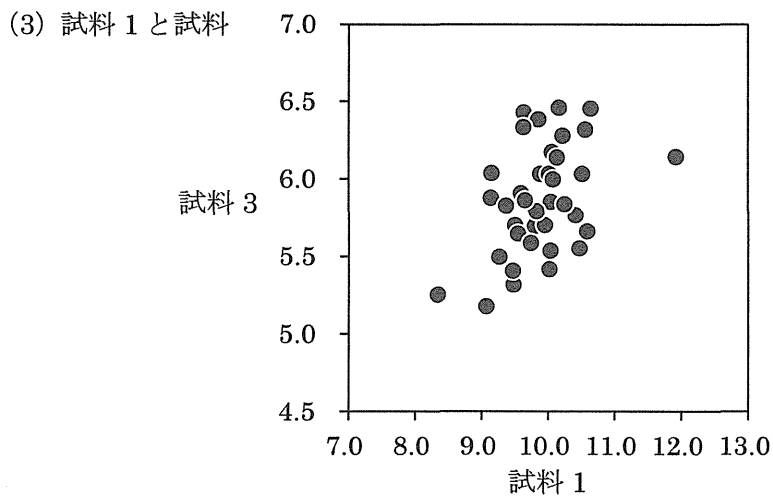
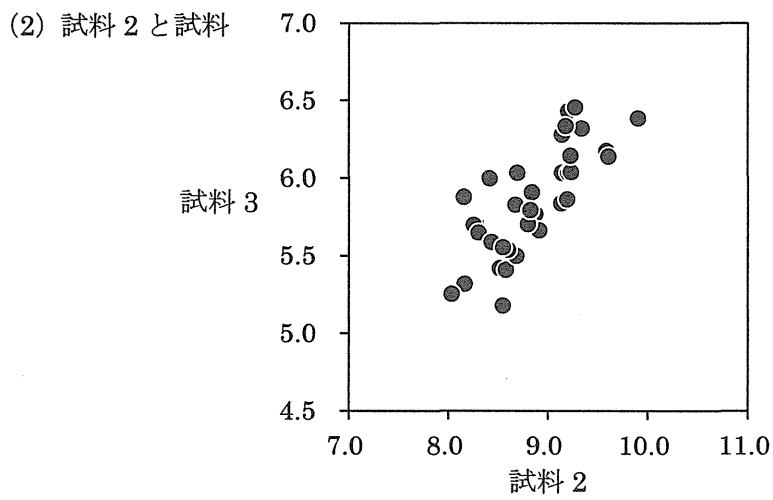
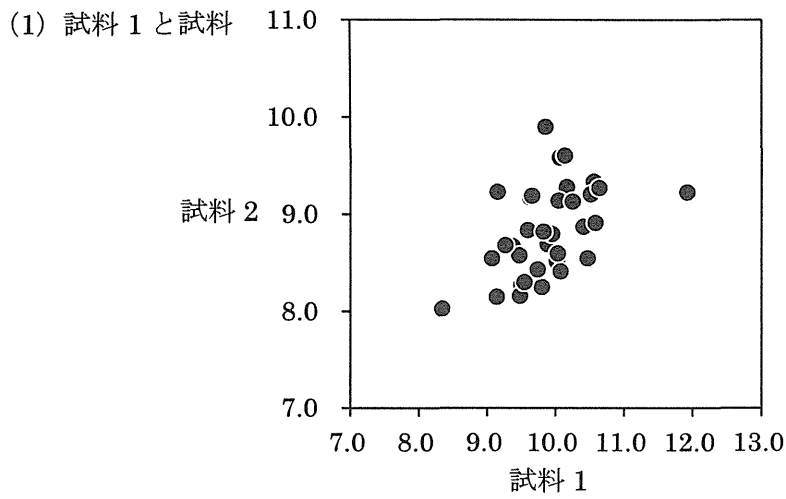
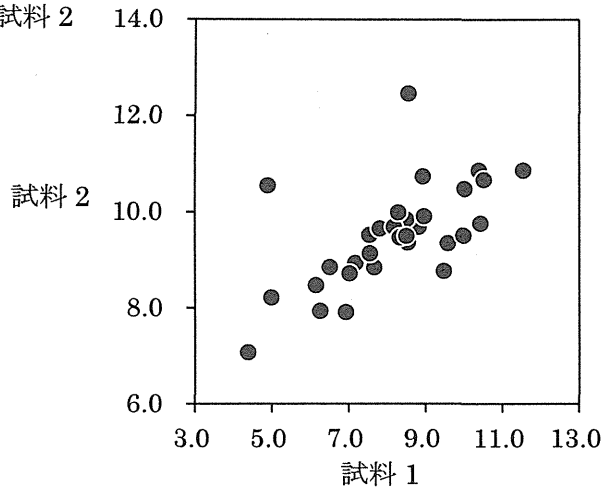


図 24 試料間の測定値の相関性 (モリナガキット)
(2σ 処理で 3 試料とも除外された 2 機関のデータを除く)

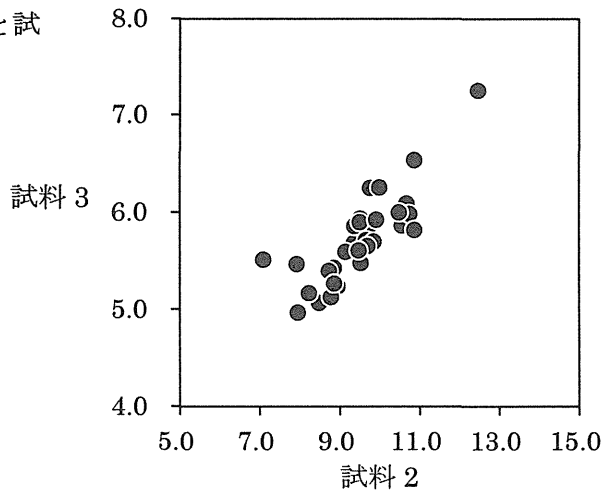
(1) 試料 1 と試料 2



相関係数 : 0.614

データ数 : 31

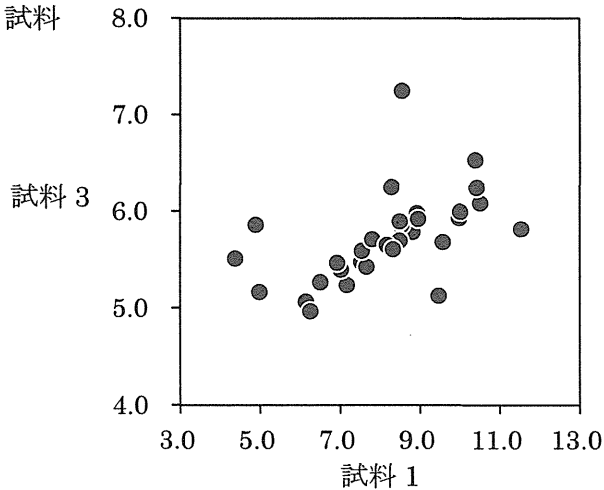
(2) 試料 2 と試



相関係数 : 0.829

データ数 : 31

(3) 試料 1 と試料

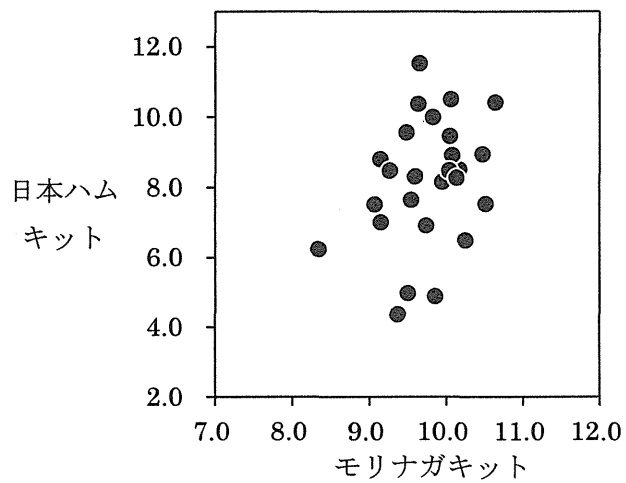


相関係数 : 0.518

データ数 : 31

図 25 試料間の測定値の相関性 (日本ハムキット)

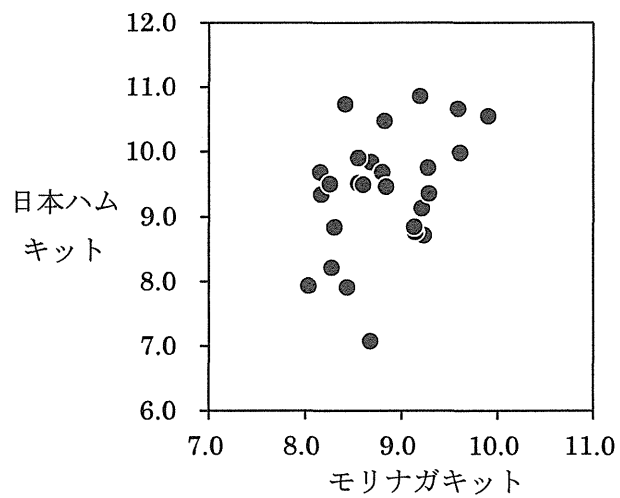
(1) 試料



相関係数 : 0.313

データ数 : 27

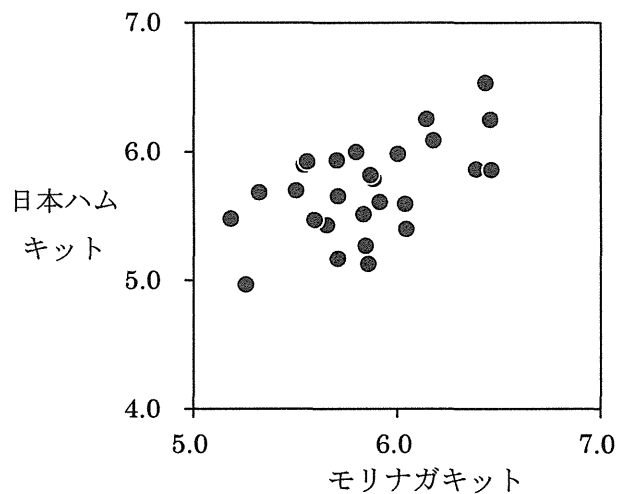
(2) 試料



相関係数 : 0.412

データ数 : 27

(3) 試料 3



相関係数 : 0.559

データ数 : 27

図 26 キット間の測定値の相関性
(モリナガキットの2 σ 処理で3試料とも除外された1機関のデータを除く)

表7 検査手法の度数表

項目	合計	1	2	3
全般	ろ過	実施	一部実施	実施せず
		32	1	9
	ELISA 試薬添加	マルチチャンネルピペット	連続分注ピペット	シングルチャンネルピペット
		38	3	1
	洗浄法	ウォッシュャー	その他	
21		21		
検量線の回帰法	4PL	5PL	多項式(4次)	
	30	9	3	
モリナガ キット 測定操作	抽出液の保存期間	0日	1日	2日以上
		32	4	3
	試料溶液分注時間	≤ 5分	5分 < x ≤ 10分	10分 <
		14	19	6
	操作中の室温	常時25℃以下	25℃を超える時間帯有り	
16		23		
日本ハム キット 測定操作	抽出液の保存期間	0日	1日	2日以上
		16	11	4
	試料溶液分注時間	≤ 5分	5分 < x ≤ 10分	10分 <
		14	12	5
	操作中の室温	常時25℃以下	25℃を超える時間帯有り	
15		16		

表 8 参加機関における平成 23 年度の試験実績および使用キット

		特定原材料						
		卵	乳	小麦	そば	落花生	甲殻類	
ELISA	試験数	1109	1130	1108	588	301	581	
	実施機関数	32	29	31	25	14	24	
	使用キット	日本ハム	32	29	31	23	13	—
		モリナガ	33	29	31	24	15	—
		プリマハム	3	2	3	3	4	—
		ニッスイ	—	—	—	—	—	24
		マルハ	—	—	—	—	—	24
確認試験	試験数	36	12	92	8	3	83	
	実施機関数	8	8	10	4	2	8	

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査用適正試料の作製検討と

信頼性確保に関する研究 (その 4)

— 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究 —

主任研究者	小島 幸一 (財) 食品薬品安全センター	秦野研究所 所長
分担研究者	渡辺 卓穂 (財) 食品薬品安全センター	秦野研究所 部長
協力研究者	近藤 一成 国立医薬品食品衛生研究所	代謝生化学部第二室長
協力研究者	笠間 菊子 (財) 食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
協力研究者	小熊 恭代 (財) 食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員

研究要旨

組換え DNA 技術応用食品の定性試験による外部精度管理調査の結果をより詳細に検討することを目的として、組換えトウモロコシ DAS59132 の検知のためのリアルタイム PCR で得られる Ct 値の統計解析を試みた。昨年度に引き続き、外部精度管理調査の際、Th. line を指定して収集した参加機関における Ct 値のデータについてヒストグラム、正規確率プロット、 \bar{X} -R 管理図および z-スコア管理図を作成し、データを検討した。その結果、DNA 溶液試料である試料 A および試料 C の DAS59132 検出用試験の Ct 値のヒストグラム、正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示しており、Ct 値の解析により、外部精度管理参加機関における測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。

一方、粉末試料では、Ct 値をそのまま用いてヒストグラム、正規確率プロットを作成した場合は形状が正規分布とは多少異なっていた。このため、トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値の差を用いることにより DNA 濃度の機関間差の補正を試みた結果、ヒストグラム、正規確率プロットの形状はより正規分布に近くなった。また、Ct 値をそのまま解析した時、z-スコアが 2 以上であった機関は、いずれも 2 未満となり、限界外の値となった原因が、DNA 濃度にあったことおよび Ct 値の差を用いることにより、DNA 濃度の誤差を補正できる可能性が示唆された。

A. 研究の目的
の衛生研究所および登録検査機関等で広く
遺伝子組換え食品の検査は、各都道府県 実施されている。我々はこれらの検査機関

における遺伝子組換え食品検査の信頼性の確認および向上を目的として、外部精度管理調査を実施してきた。平成 23 年度は安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ DAS59132 の検知を対象として外部精度管理調査を行った。

DAS59132 トウモロコシの検査法は定性試験法ではあるがリアルタイム PCR 法を利用しており、増幅が認められた測定においては Th. line を設定することにより Ct 値（増幅曲線が Th. line と交わるサイクル数）を求めることができる。Th. line 上の Ct 値は初期鋳型量に比例するが、外部精度管理は共通試料を用いるため、Th. line を同じ値に設定すれば、Ct 値は一定になると考えられた。このため、外部精度管理の際あらかじめ Th. line を指定し、参加機関における Ct 値のデータを収集した。

本研究では昨年度に引き続き、遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査において収集した Ct 値に対して、定量試験の外部精度管理で用いる統計手法を適用し、定性試験による外部精度管理結果をより詳細に解析できないか検討した。なお本年度は解析の対象を DNA 溶液試料のみから、粉末試料にも拡大し、DNA 抽出による誤差が Ct 値に与える影響およびその対処法についても検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 試料の調製

外部精度管理調査試料の調製には、いずれも国立医薬品食品衛生研究所から提供を受けた安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ DAS59132 系統（DAS59132 トウモロ

コシ）および非遺伝子組換えトウモロコシ（nonGM トウモロコシ）を使用した。DAS59132 トウモロコシは受領した粉砕物をそのまま、穀粒として提供された nonGM トウモロコシは 500 μ m のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200（レッチェ）にて粉砕後、粉末試料の調製および DNA 溶液試料の調製に使用した。

粉末試料は、DAS59132 トウモロコシ粉末と nonGM トウモロコシ粉末を 1 対 1000 の重量比で混合し、0.1% 試料（試料 2）を調製した。また、nonGM トウモロコシ粉末を試料 1 とした。DNA 溶液試料は、DAS59132 トウモロコシ粉末から通知に従って 10 ng/ μ L の DNA 溶液を抽出し、これを同様にして抽出した nonGM DNA 溶液で希釈し、試料 C（0.5% DNA 溶液試料）、試料 A（0.05% DNA 溶液試料）を作製した。また、nonGM DNA 溶液を試料 B とした。

また、DAS59132 検出用で試験用の陽性コントロールプラスミドが市販されていないため、DNA 溶液試料の調製に使用した DAS59132 トウモロコシ 10 ng/ μ L DNA 溶液を No Template Control -ColE1/TE（ニッポンジーン）を用いて希釈し、0.5% と 5% の陽性コントロールを調製した。

なお、DNA 抽出には多用途小形遠心機 CF16RX（日立工機）、DryThermoUnit DTU-2B（TAITEC）、Gene Quant pro（GE ヘルスケアバイオサイエンス）の各装置を使用した。

2. 外部精度管理調査の実施

外部精度管理調査参加機関にはトウモロコシ粉末試料 2 試料（試料 1 および試料 2、各 1 本）、DNA 溶液試料 3 試料（試料 A、試料 B および試料 C、各 1 本）、陽性コントロ

ール（0.5%、5%各1本）を、実施要領および報告書書式とともに送付し、厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知（食安発第0618001号、平成20年6月18日）に従って試験を実施するよう依頼した。

すなわち参加機関は、通知に従って粉末試料から抽出したDNAと、DNA溶液試料のそれぞれについてトウモロコシ陽性対照用試験およびDAS59132検出用試験のリアルタイムPCR測定を実施する。次にそれぞれのPCR測定についてAmplification plotを確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Ct値が38未満か否かにより、陰性試料または陽性試料の別を判定した。

また通知法とは別に、リアルタイムPCR結果をTh. lineを0.2に設定して解析し、Ct値が得られた場合はその値について報告するよう依頼した。

3. 外部精度管理調査結果の統計処理

各参加機関の測定結果は試料ごとにまとめ、正答率を算出した。

また、各測定のCt値データは、試料A、試料CについてはDAS59132検出用試験、試料2についてはDAS59132検出用試験およびトウモロコシ陽性対照用試験について、統計解析システムJUSE-QCAS（㈱日本科学技術研修所）を用いて統計処理した。すなわちXbar-R管理図を代用した解析を実施し、ヒストグラム、正規確率プロット、Xbar-R管理図およびzスコア管理図を作成した。さらに試料2についてはトウモロコシ陽性対照用試験とDAS59132検出用試験のCt値の差についても同様に統計処理を実施した。

また、陽性コントロールのCt値についてもまとめ、0.5%の陽性コントロールについ

てはDAS59132の調製濃度が同じである試料CのCt値との相関についても検討した。

C. D. 結果および考察

1. 外部精度管理調査結果

外部精度管理の判定結果をまとめて表1に示した。DAS59132トウモロコシの検出に関しては全機関が陽性試料および陰性試料を正しく判定し、正答率は100%だった。

定性試験では検出下限付近のコピー数を含む試料の測定結果において、検出の有無は確率の問題となるため、正しく判定するためには繰り返しの数を多く設定する必要がある。しかし、通知法では繰り返しの数が指定されており、外部精度管理調査では試料の濃度を検出下限付近に設定すると陰性だった場合、結果の解釈が難しくなると考えられた。このため、平成23年度の外部精度管理調査試料は検出下限付近の濃度設定を避け、低濃度試料でも検出下限の10倍以上の濃度とした。このため、陽性試料に関しては難易度が低くなり、結果として正答率は全試料とも100%となった。従って、判定結果のみから参加機関の検出感度を確認することは困難であった。

2. 外部精度管理調査結果の解析

2. 1. 解析対象のCt値

通知法のDAS59132検知法は定性試験ではあるもののリアルタイムPCRによる試験であるため、増幅が認められた測定においては増幅曲線にTh. lineを設定することによりCt値を求めることができる。外部精度管理調査の際に収集したTh. line 0.2のCt値をまとめて表2～表5に示した。

2. 2. DNA溶液試料の解析

DNA 溶液試料は DNA 抽出および濃度調整の操作が含まれないため PCR 反応液に含まれる鋳型の量には機関間差が少なく、Ct 値はほぼ一定になると予想される。このため、試料 A、試料 C については Ct 値をそのまま解析した。

試料 A および試料 C の統計解析結果のうち、ヒストグラムおよび正規確率プロットを検討した結果、いずれの試料においてもひずみ、とがりは共に小さく、一部のデータを除いて正規分布に近い形状を示した（図 1、4）。

試料 A の Xbar 管理図、z-スコア管理図では、機関番号 23、機関番号 30、機関番号 32 が、R-管理図では機関番号 8 が管理限界外の値となった（図 2、図 3）。試料 C の Xbar 管理図、z-スコア管理図では、機関番号 23、機関番号 30 が、R-管理図では機関番号 8 が管理限界外の値となった（図 5、図 6）。

機関番号 30 は試料 A と試料 C のいずれでも z-スコアが -2 以下であったが、昨年度報告した組換えコメの測定でも Ct 値が小さい傾向が認められている。機関番号 30 はリアルタイム PCR 装置に ABI7000 を使用しており、コメの時と同様、測定装置の特性により管理限界外の値となった可能性が高いと考えられた。機関番号 23 も試料 A と試料 C の両方で z-スコアが 2 を超えたが、蛍光強度、蛍光コンポーネントには問題がなく、管理限界外となった原因は不明であった。

試料 A で z-スコアの絶対値が 2 を超えた機関番号 32 は反応がプラトーに達した時の蛍光強度が他の機関に比べて小さく、さらに蛍光コンポーネントでは、プローブに

由来する TAMURA と TaqMan Universal PCR Master Mix に由来する ROX の比が他機関と異なることが判明し、PCR 反応液の調製が Ct 値に影響した可能性が考えられた。

R-管理図では機関番号 8 が試料 A、試料 C のいずれも管理限界外の値となり、Ct 値の再現性が悪いことから、PCR 反応液の混合が不十分だった可能性が考えられた。

2. 3. 粉末試料の解析

粉末試料でも、PCR 測定に供する DNA 溶液の濃度は同じであるが、これには抽出および濃度調整による機関間差が含まれてくるため、PCR 反応の Ct 値が DNA 溶液試料に比べてばらつくことが予想された。しかし、DNA 濃度の誤差は、同じ DNA 溶液を試料とする トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値に同程度の誤差として現れると考えられるため、両者の差を解析することにより、DNA 濃度の誤差を補正できる可能性が考えられた。

まず、試料 2 の トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施し、ヒストグラムおよび正規確率プロットを検討した。その結果、いずれの試験においてもひずみ、とがりは小さかったが、データの分布は右側に裾を引いた形となった（図 7、図 10）。DNA 抽出のばらつきの指標となると考えられる R-管理図では機関番号 11 が両試験で、機関番号 1 および機関番号 23 がいずれか一方の試験で管理限界外の値となり、これらの機関では DNA の 2 抽出間の再現性が悪かったことが明らかになった（図 8、図 11）。

次に、DAS59132 検出用試験と、トウモロコシ陽性対照用試験の Ct 値の差を求め、こ

の差について統計解析を実施した(表 6)。ヒストグラムおよび正規確率プロットを検討した結果、Ct 値をそのまま用いた場合に比べて、ひずみ、とがりが小さくなり、グラフの形状が正規分布に近づいた(図 13)。また、R-管理図で管理限界外の値となったのは機関番号 1 のみで、機関番号 11 および機関番号 23 では DNA 抽出のばらつきを相殺できたと考えられた。機関番号 1 の Ct 値のばらつきが大きいのは DAS59132 検出用試験のみであり、ばらつきの原因が DNA 抽出以外にあることが明らかになった。

試料 2 の Ct 値をそのまま統計処理した z-スコア管理図では、機関番号 14 および機関番号 23 が、トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験で共に z-スコアが 2 を超え、抽出 DNA 溶液の濃度が薄かった可能性が示された(図 9、図 12)。一方、Ct 値の差を用いた z-スコア管理図では、機関番号 14 および機関番号 23 のいずれも z-スコアは 2 以内となり、PCR 測定には問題がないことが示された。また、Ct 値の差を用いた z-スコア管理図で絶対値が 2 を超えた機関番号 13 および機関番号 20 は、Ct 値をそのまま統計処理した場合には z-スコアは 2 以内と問題はなく、トウモロコシ陽性対照用試験または DAS59132 検出用試験のいずれかの PCR 測定に問題があった可能性が考えられたが、原因は不明であった(図 15)。

2. 4. 陽性コントロールの測定結果

0.5%と 5%の陽性コントロールの Ct 値をまとめて表 7 に示した。両者の差は平均 3.54 で、Ct 値の差から求めた両者の濃度差は平均 11.63 となり、調製濃度の差より若干大きく測定された。試料 C と 0.5%陽性

コントロールの Ct 値の相関を検討し、図 16 に示した。両者の相関係数は 0.896 と良好で、リアルタイム PCR の Ct 値には、試料ごとの誤差よりも、測定機関固有の誤差(PCR 装置、試薬のロット、ピペットの誤差等)の影響が大きいことが明らかになった。

E. 結論

外部精度管理調査の際 Th. line を指定して収集した参加機関における Ct 値のデータについて正規確率プロットおよび z-スコア管理図を作成し、グラフの形状を検討した。その結果、試料 A および試料 C の DAS59132 検出用試験の Ct 値のヒストグラム、正規確率プロットはひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。この時、z-スコアが 2 以上となった機関のうちいくつかからは、Ct 値がはずれた原因が推定でき、Ct 値の解析により、外部精度管理参加機関における測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。

一方、粉末試料では、Ct 値をそのまま用いてヒストグラム、正規確率プロットを作成した結果、形状が正規分布とは多少異なっていた。トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値の差を用いることにより DNA 濃度の誤差の補正を試みた結果、ヒストグラム、正規確率プロットの形状はより正規分布に近くなった。また、Ct 値をそのまま解析した時、z-スコアが 2 以上であった機関は、いずれも 2 未満となり、限界外の値となった原因が、DNA 濃度にあったことが確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

笠間菊子, 井上雪乃, 穉山浩, 鈴木達也,
坂田こずえ, 中村公亮, 大島赴夫, 小島幸
一, 近藤一成, 手島玲子, プラスミドD
NAを用いた中国産安全性未承認遺伝子組
換えコメ検査に関する外部精度管理調査,
日本食品化学学会誌, 19, 215-222 (2012)

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

なし

3. その他

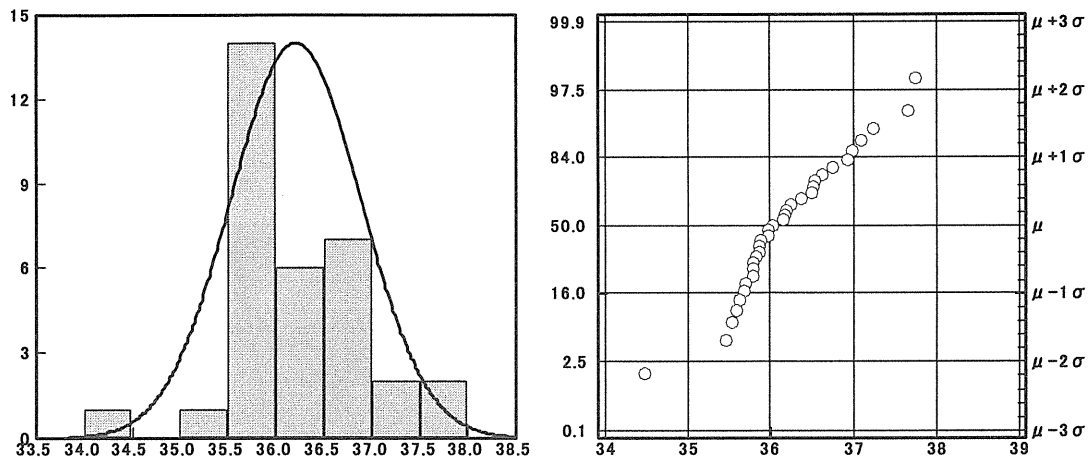
なし

表 1 外部精度管理調査結果のまとめ

試料形態	試料名	試料の種類	検出機関数		正答率(%)
			トウモロコシ 陽性対照用試験	DAS59132 検出用試験	
DNA 溶液試料	試料 A	陽性(0.05%)	33	33	100
	試料 B	陰性	33	0	100
	試料 C	陽性(0.5%)	33	33	100
粉末試料	試料 1	陰性	33	0	100
	試料 2	陽性(0.1%)	33	33	100

表2 外部精度管理における試料 A のDAS59132 検出用試験の Ct 値(Th.line 0.2)

機関番号	測定番号				平均	z-スコア	R
	1	2	3	4			
1	36.82	35.95	36.15	35.80	36.18	-0.03	1.02
2	35.29	35.72	36.18	36.30	35.87	-0.48	1.01
3	36.14	38.03	37.33	36.41	36.98	1.16	1.89
4	35.99	35.82	37.32	36.36	36.37	0.26	1.50
5	34.97	35.64	35.32	36.41	35.59	-0.91	1.44
6	37.62	36.50	36.74	35.17	36.51	0.46	2.45
7	37.25	36.47	36.55	36.19	36.62	0.62	1.06
8	38.62	38.65	36.43	34.01	36.93	1.08	4.64
9	36.69	36.08	36.28	35.95	36.25	0.08	0.74
10	37.21	35.61	35.20	35.80	35.96	-0.36	2.01
11	35.71	36.07	35.80	36.54	36.03	-0.25	0.83
12	36.02	36.04	35.51	35.97	35.89	-0.46	0.53
13	36.54	35.49	36.95	35.70	36.17	-0.04	1.46
14	36.15	35.89	35.23	35.89	35.79	-0.60	0.92
15	35.58	35.28	35.85	35.75	35.62	-0.86	0.57
16	37.49	36.69	37.34	37.44	37.24	1.55	0.80
17	36.30	35.60	35.38	35.52	35.70	-0.74	0.92
18	36.17	36.74	35.92	35.04	35.97	-0.34	1.70
19	36.91	36.45	34.99	34.95	35.83	-0.55	1.96
20	36.28	36.57	37.32	35.97	36.54	0.50	1.35
21	36.86	37.04	37.29	37.16	37.09	1.32	0.43
22	35.95	35.45	35.89	34.59	35.47	-1.08	1.36
23	38.02	38.09	36.81	37.70	37.66	2.16	1.28
24	37.34	37.29	36.48	35.88	36.75	0.82	1.46
25	36.93	36.82	35.98	36.25	36.50	0.44	0.95
26	35.87	35.84	35.99	35.48	35.80	-0.60	0.51
27	35.76	35.95	35.94	35.12	35.69	-0.75	0.83
28	35.40	35.63	36.19	34.89	35.53	-0.99	1.30
29	35.70	37.12	35.88	35.89	36.15	-0.07	1.42
30	34.55	34.64	34.36	34.42	34.49	-2.53	0.28
31	35.26	36.20	35.80	35.90	35.79	-0.60	0.94
32	37.45	38.69	37.56	37.28	37.75	2.30	1.41
33	35.27	34.87	35.99	37.29	35.86	-0.51	2.42



基本統計量	
データ数	33
最小値	34.49
最大値	37.75
平均値	36.197
標準偏差	0.674
ひずみ	0.343
とがり	0.770

図1 試料AのDAS59132検出用試験のCt値のヒストグラム、正規確率プロットおよび基本統計量

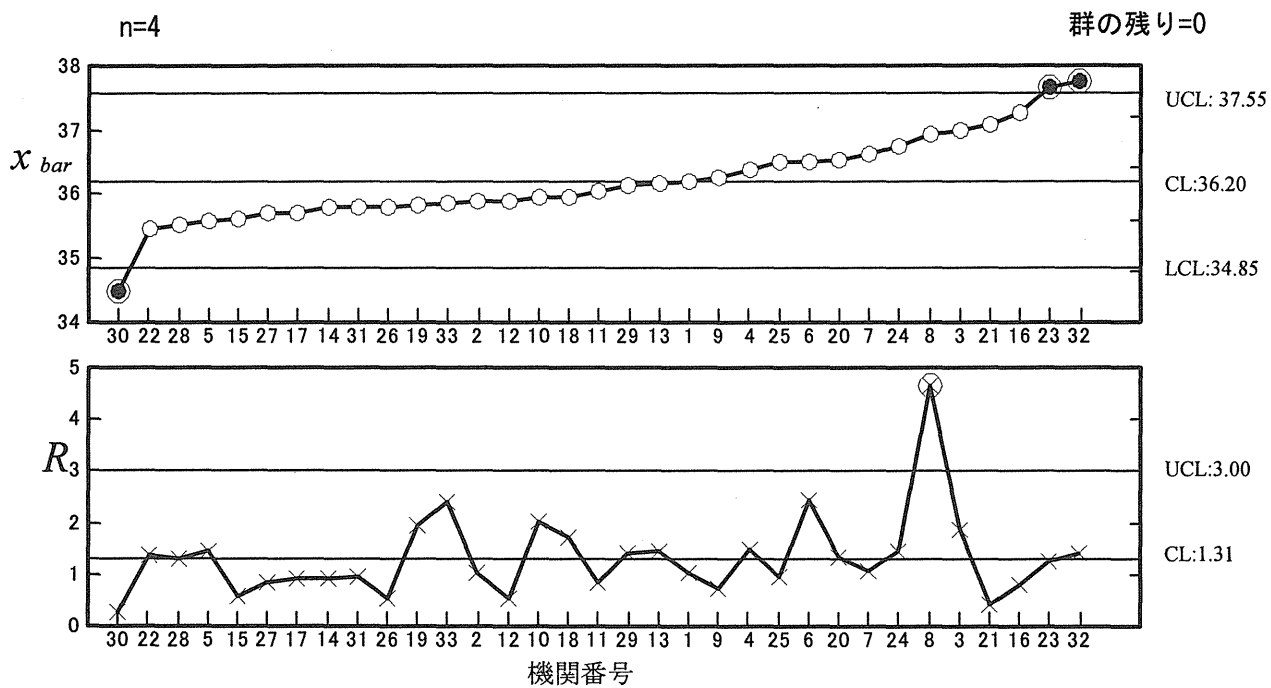


図2 試料 A の DAS59132 検出用試験の Ct 値の Xbar-R 管理図

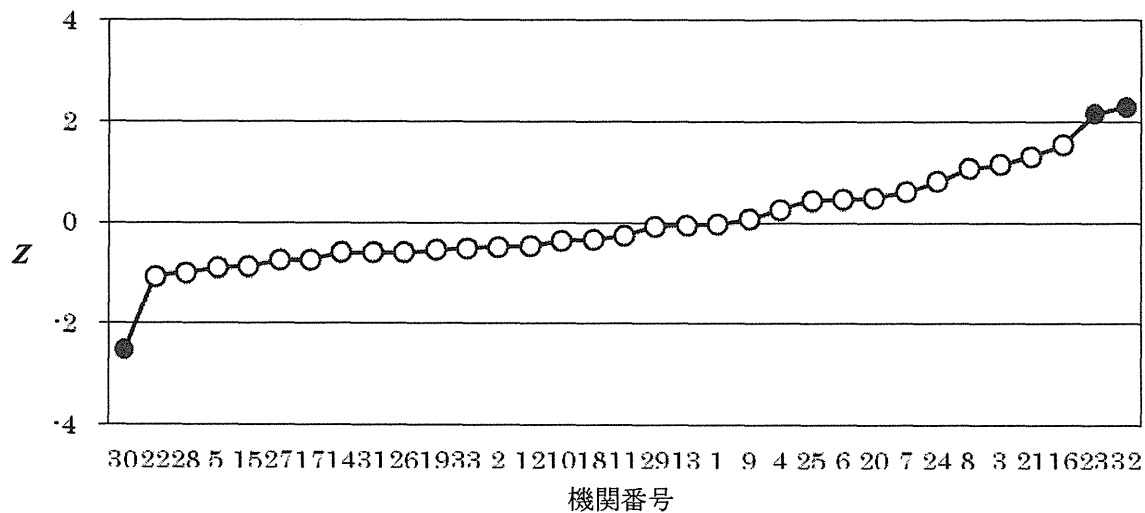


図3 試料 A の DAS59132 検出用試験の Ct 値の z-スコア管理図