

いる。そのため、DNA 抽出操作を含む外部精度管理調査試料においても DNA 溶液の濃度は各機関で 10 ng/μL に調製されているはずであるが、これには抽出、濃度測定および濃度調整による機関間差が含まれてくるため、Ct 値が DNA 溶液試料に比べてばらつくことが予想される。一方、DNA 濃度の誤差は、同じ DNA 溶液を試料とする陽性対照用試験と検出用試験の 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と考えられる。

実際に、平成 24 年度の報告では安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ (DAS59132 系統) を含む粉末試料において、トウモロコシ陽性対照用試験と DAS59132 検出用試験の Ct 値の差を用いた解析により、DNA 濃度の誤差を補正できる可能性が示唆された。

本年度は平成 24 年度とは異なり、遺伝子組換えでない米加工品粉砕物に陽性プラスミドを添加したコメ粉砕物試料を用いているが、参加機関で抽出した DNA 溶液中のコメ加工品粉砕物由来の DNA と陽性プラスミドの割合が一定であれば、Ct 値の差を用いた解析により、DNA 濃度の誤差を補正できる可能性が考えられた。そこで、コメ粉砕物試料について平成 24 年度と同様に Ct 値の差を用いた解析を行い、DNA 濃度の誤差を補正できるか検討した。

### 2.2.1. コメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験の Ct 値を用いた解析

試料 1 および試料 4 についてコメ陽性対照用試験および CpTI 検出用試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施した (図 7、

図 8、図 12、図 13)。その結果、コメ陽性対照用試験では、両試料で平均値から大きく離れたデータは認められなかったため、2 シグマ処理は実施しなかった。一方、CpTI 検出用試験では両試料で平均値から大きく離れたデータが認められたことから、2 シグマ処理を実施したところ、試料 1 では 1 機関 (機関番号 13)、試料 4 では 2 機関 (機関番号 13、機関番号 30) が除外された (図 9、図 14)。

コメ陽性対照用試験および 2 シグマ処理後の CpTI 検出用試験の正規確率プロットを確認したところ、試料 1 では両試験でひずみ、とがりが試料 4 に比べて大きかった。特に、コメ陽性対照用試験では正規確率プロットの間隔が広い箇所があり、データに偏りがみられた (図 7、図 9)。一方、試料 4 では両試験でひずみ、とがりが非常に小さかった (図 12、図 14)。

また、コメ陽性対照用試験および 2 シグマ処理後の CpTI 検出用試験の z-スコア管理図を確認したところ、試料 1 において、機関番号 30 は両試験で z-スコアが 2 以上であった (図 7、図 9)。この機関の DNA 抽出液の測定値を確認したところ、260 nm の吸光度値が 0.1 以下と低く、260 nm および 280 nm の吸光度比も他機関に比べて低かったことから、DNA 濃度を正確に測定できていなかった可能性が考えられた。よって、試験番号 30 はリアルタイム PCR に用いた DNA 溶液の濃度が薄かったために、両試験の Ct 値が大きくなった可能性が考えられた。

一方、試料 4 において、コメ陽性対照用試験では z-スコアが 2 以上の機関は無かつ

たが、2シグマ処理後のCpTI検出用試験では機関番号11が $z$ -スコアが2以上であった(図12、図14)。機関番号11のDNA抽出結果について確認を行ったところ、特に問題は認められなかったことから、この機関の $z$ -スコアが2以上であった原因は、DNA濃度ではなく、2.1.と同様にCpTI検出用試験におけるベースラインの継続的増加であると考えられた。

以上のことから、コメ陽性対照用試験およびCpTI検出用試験のCt値をそのまま用いて統計解析を実施した場合、試料1ではDNAの濃度差によるCt値のばらつきが解析結果に影響している可能性が考えられた。一方、試料4ではDNAの濃度差によるCt値のばらつきが小さく、解析結果への影響は比較的少ないと考えられた。

#### 2.2.2. コメ陽性対照用試験およびCpTI検出用試験のCt値の差を用いた解析

試料1および試料4についてコメ陽性対照用試験とCpTI検出用試験のCt値の差を求め、この差について統計解析を実施した(図10、図15)。その結果、両試料で平均値から大きく離れたデータが認められたため、2シグマ処理を実施したところ、試料1では1機関(機関番号13)、試料4では2機関(機関番号13、機関番号30)が除外された(図11、16)。これは2.2.1.のCpTI検出用試験の結果と同様であった。

2シグマ処理後の正規確率プロットを確認したところ、試料1ではCt値をそのまま用いた場合に比べて、ひずみ、とがりが非常に小さくなり、より正規分布に近い形状となった(図11)。一方、試料4ではCt値をそのまま用いた場合に比べて、ひず

み、とがりが若干大きくなった(図16)。

また、2シグマ処理後の $z$ -スコア管理図を確認したところ、試料1では $z$ -スコアが2以上の機関はなかったが、試料4では機関番号11、機関番号29で $z$ -スコアが2以上、機関番号19で $z$ -スコアが-2以下であった(図11、図16)。

試料1において、機関番号30はCt値をそのまま解析した場合、コメ陽性対照用試験および2シグマ処理後のCpTI検出用試験の両試験で $z$ -スコアが2以上であったが、Ct値の差を用いて解析した場合、 $z$ -スコアが2未満となった(図11)。つまり、機関番号30はDNA濃度が薄いため両試験のCt値が他機関よりも大きくなっていましたが、両試験のCt値の差は他機関とほぼ同等であり、リアルタイムPCR測定には問題がないことが示された。このことから、試料1はCt値の差を用いた解析によりDNA濃度の誤差を補正できた可能性が示唆された。

試料4はCt値をそのまま解析した場合、DNA濃度に問題のある機関は認められず、DNA濃度の差が解析結果に与える影響は比較的少ないと考えられたが、Ct値の差を用いて解析すると、機関番号11だけでなく機関番号29においても $z$ -スコアが2以上となり(図16)、2.1.のDNA溶液試料の結果と一致した。このことは、各機関のDNA濃度のわずかな誤差がCt値の差を用いることで補正され、PCR測定に問題がある機関のみを検出することができたことを示している。よって、試料4においてもCt値の差を用いた解析によりDNA濃度の誤差を補正できた可能性が示唆された。

また、試料4のCt値の差を用いて解析し

た場合の  $z$ -スコアが $-2$  以下であった機関番号 19 は、試料 4 の CpTI 検出用試験でのみ Ct 値が平均値よりも低かった (図 13)。この機関の DNA 抽出結果について確認を行ったところ、Genomic-tip 100/G 抽出用試料の全抽出で DNA 収量が極端に低かったことから、DNA 抽出の際、他機関とは異なる操作により米加工品粉碎物由来 DNA の回収量が少なくなり、陽性プラスミド量が多くなった可能性が考えられた。

陽性プラスミドを添加した試料では、DNA 抽出操作が異なると DNA 溶液に含まれる陽性プラスミドの割合も異なる可能性があることから、Ct 値をそのまま用いた解析と Ct 値の差を用いた解析の両者から検査精度を評価する必要があると思われる。また、抽出キットあるいは抽出操作の違いが陽性プラスミドの抽出量にどの程度影響するかについては不明であり、今後の課題としたい。

#### E. 結論

外部精度管理調査の際、リアルタイム PCR 測定で得られる参加機関の Ct 値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、DNA 溶液試料については CpTI 検出用試験の Ct 値の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 以上となった機関について 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。

コメ粉碎物試料において、試料 1 では Ct 値をそのまま用いて解析した場合よりも、

コメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差を用いて解析した場合のほうが正規確率プロットの形状がより正規分布に近くなったことから、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。一方、試料 4 では、Ct 値をそのまま用いた場合のほうが Ct 値の差を用いた場合よりも正規確率プロットの形状はより正規分布に近かったが、Ct 値の差を用いた場合の  $z$ -スコアが 2 以上となった機関が、DNA 溶液試料の場合と一致したことから、試料 4 においても DNA 濃度の誤差が補正された可能性が考えられた。このことから、コメ粉碎物試料についても Ct 値を用いた解析により、測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 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

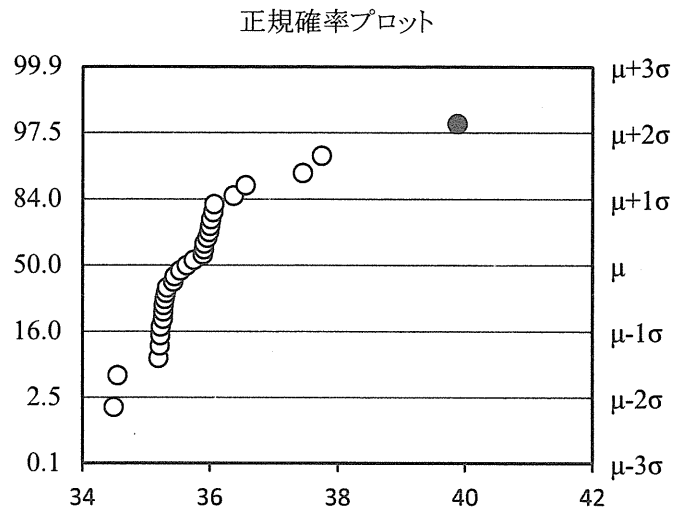
表 1 外部精度管理調査結果の概要

試料形態	試料名	試料内容 <sup>c</sup>	検出機関数		正答率(%)
			コマ陽性 対照試験	CpTI 検出試験	
DNA溶液試料	試料A	陽性(40コピー/ウェル)	31	31	100
	試料B	陽性(20コピー/ウェル)	31	31	100
	試料C	陽性(100コピー/ウェル)	31	31	100
	試料D	陰性	31	0	100
コマ粉砕物試料 <sup>a</sup> (米粉②)	試料1	陽性( $3 \times 10^4$ コピー/本)	30	30	100
	試料2	陰性	30	0	100
コマ粉砕物試料 <sup>b</sup> (ライスヌードル)	試料3	陰性	30	0	100
	試料4	陽性( $6 \times 10^4$ コピー/本)	30	30	100

a GMquicker2抽出用試料

b Genomic-tip 100/G抽出用試料

c 括弧内は陽性コントロールプラスミドの添加量を、DNA溶液試料では1ウェル当たりのコピー数(コピー/ウェル)、粉末試料では送付試料1本当たりのコピー数(コピー/本)で示した



基本統計量	
データ数	31
最小値	34.50
最大値	39.88
平均値	35.849
標準偏差	1.013
ひずみ	2.397
とがり	7.904

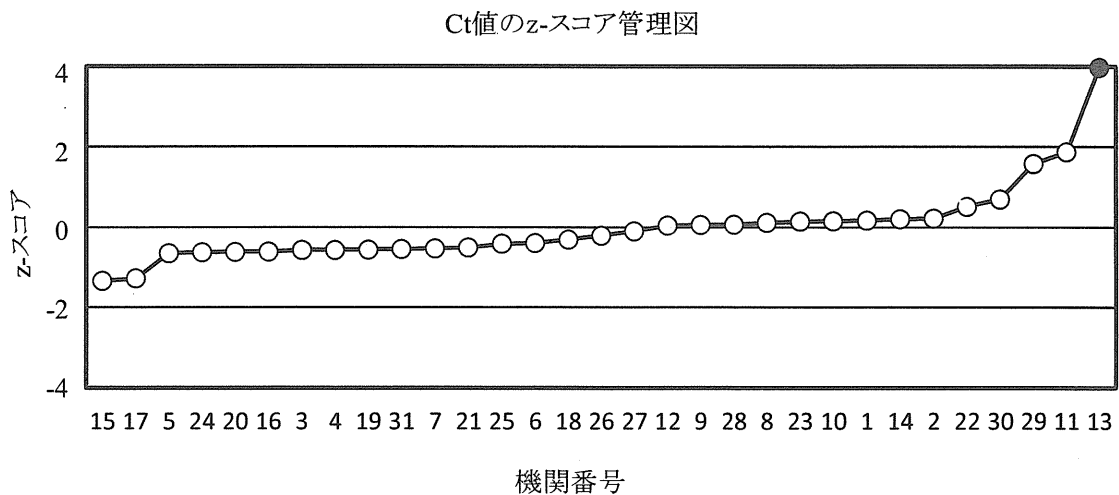
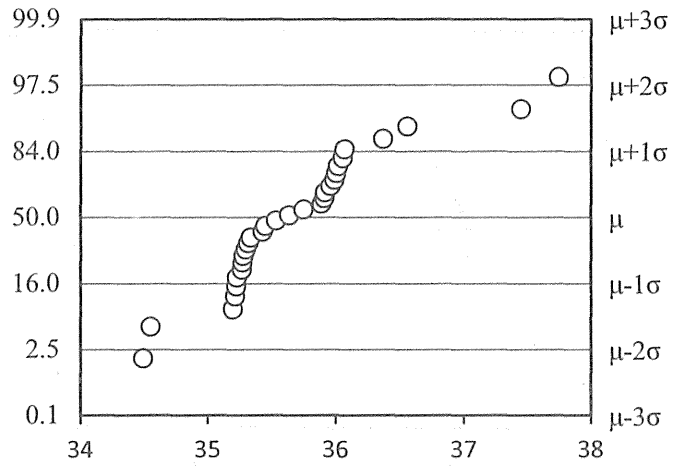


図1 試料AのCpTI検出用試験のCt値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。  
 正規確率プロットにおいてz-スコアの絶対値が2以上の機関(2シグマ処理の対象機関)を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	30
最小値	34.50
最大値	37.75
平均値	35.714
標準偏差	0.695
ひずみ	1.135
とがり	2.344

Ct値のz-スコア管理図

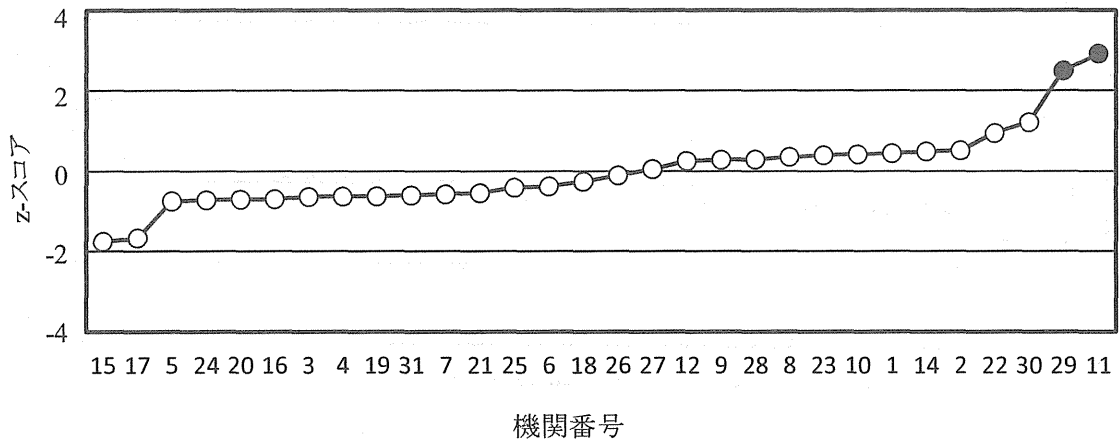
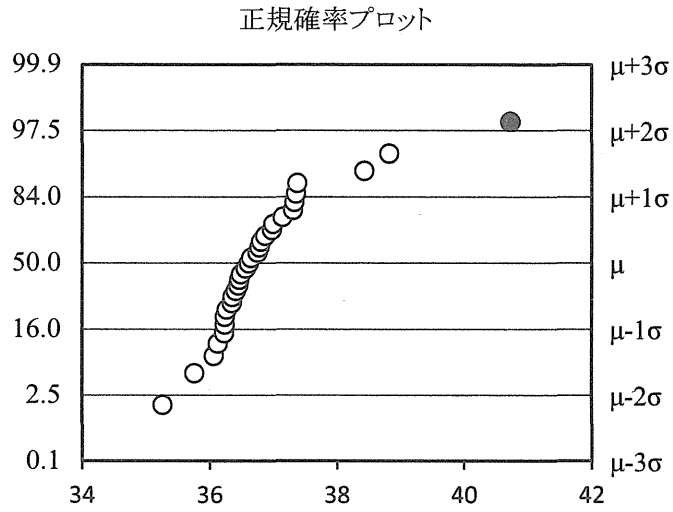


図2 試料AのCpTI検出用試験のCt値の解析(2シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。



基本統計量	
データ数	31
最小値	35.27
最大値	40.73
平均値	36.844
標準偏差	1.002
ひずみ	2.244
とがり	7.121

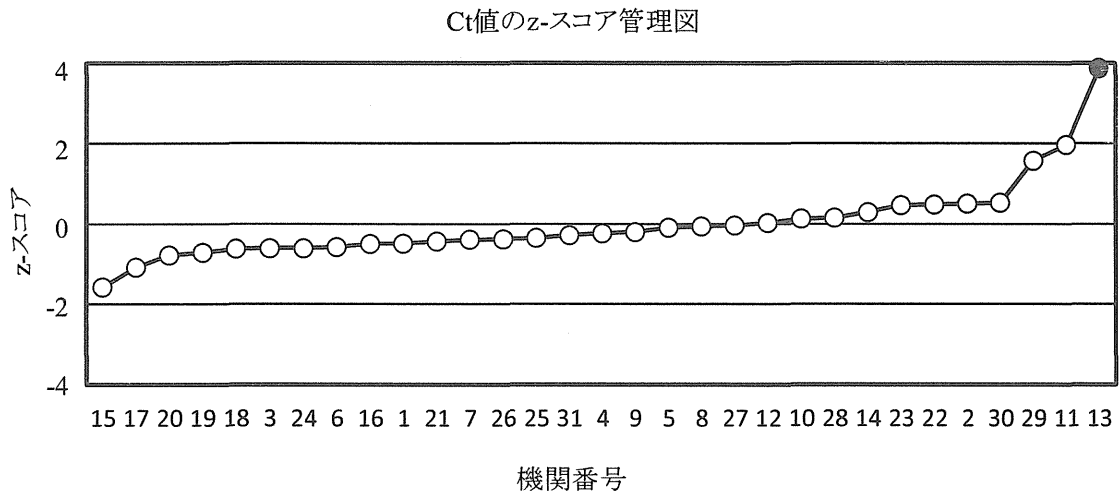
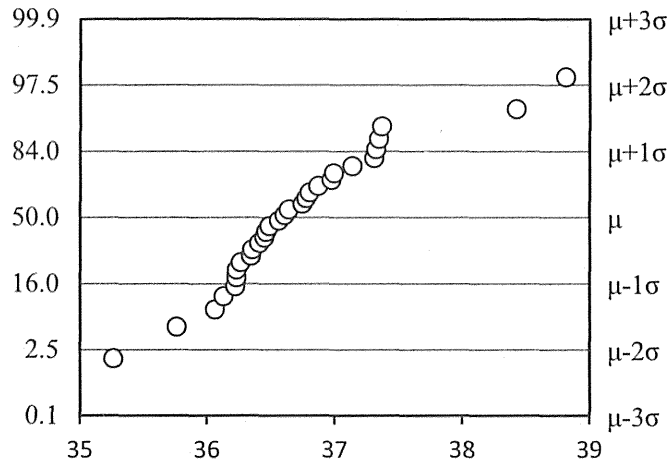


図3 試料BのCpTI検出用試験のCt値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。  
 正規確率プロットにおいてz-スコアの絶対値が2以上の機関(2シグマ処理の対象機関)を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	30
最小値	35.27
最大値	38.82
平均値	36.714
標準偏差	0.708
ひずみ	1.084
とがり	2.499

Ct値のz-スコア管理図

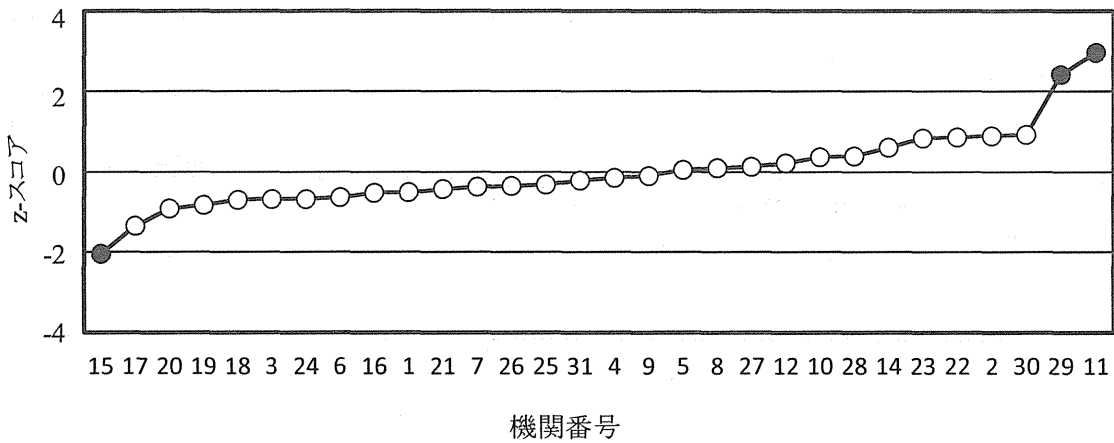
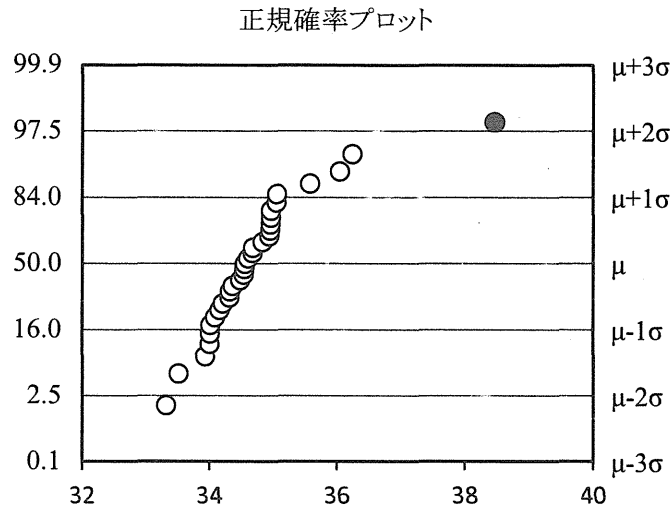


図4 試料BのCpTI検出用試験のCt値の解析(2シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。





基本統計量	
データ数	31
最小値	33.32
最大値	38.46
平均値	34.723
標準偏差	0.939
ひずみ	2.231
とがり	7.745

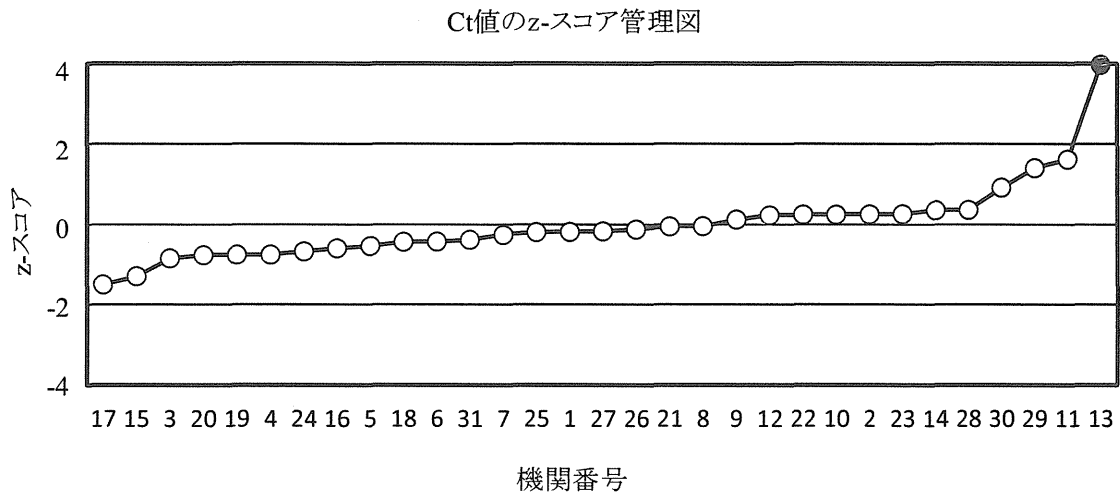
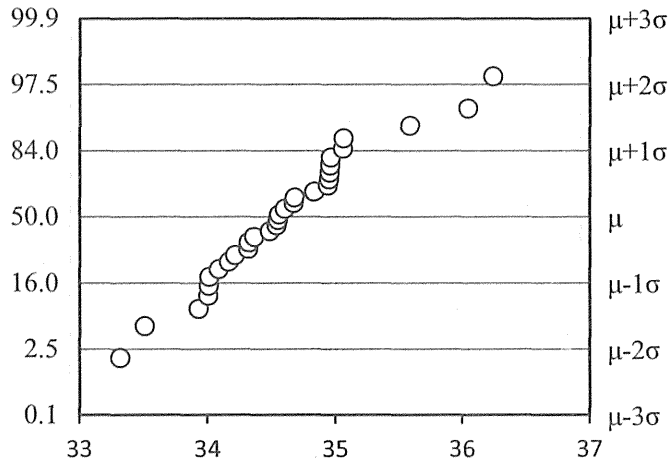


図5 試料CのCpTI検出用試験のCt値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。  
 正規確率プロットにおいてz-スコアの絶対値が2以上の機関(2シグマ処理の対象機関)を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	30
最小値	33.32
最大値	36.25
平均値	34.599
標準偏差	0.644
ひずみ	0.589
とがり	1.000

Ct値のz-スコア管理図

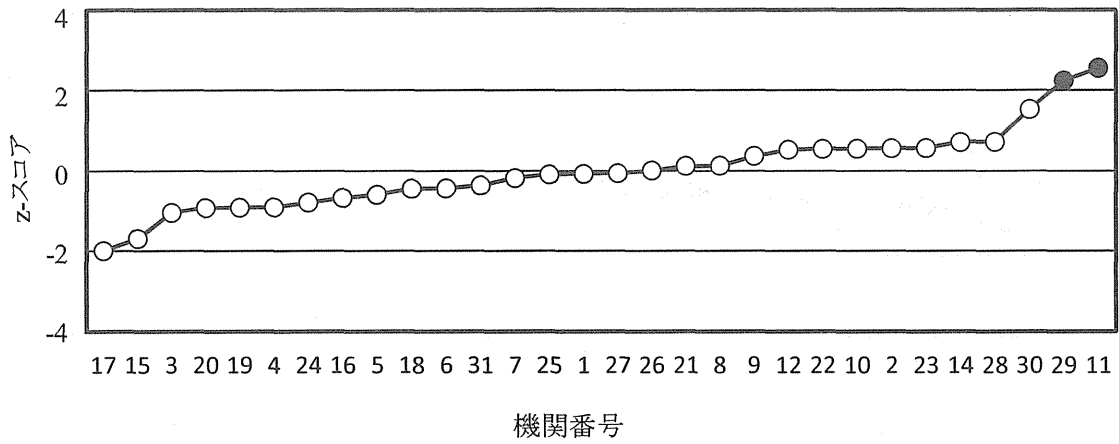
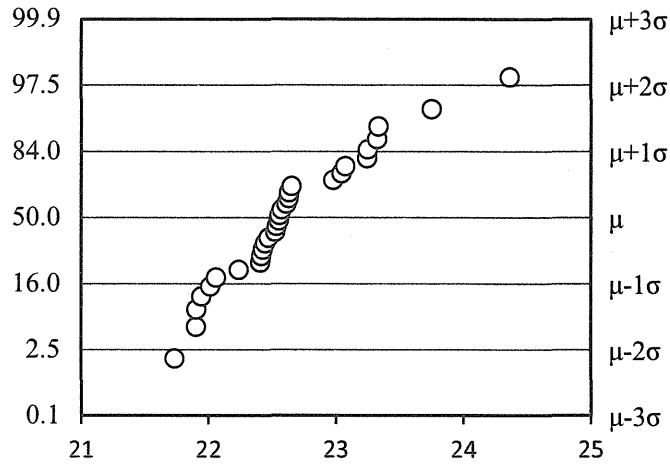


図6 試料CのCpTI検出用試験のCt値の解析(2シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	30
最小値	21.74
最大値	24.37
平均値	22.654
標準偏差	0.583
ひずみ	0.922
とがり	1.296

Ct値のz-スコア管理図

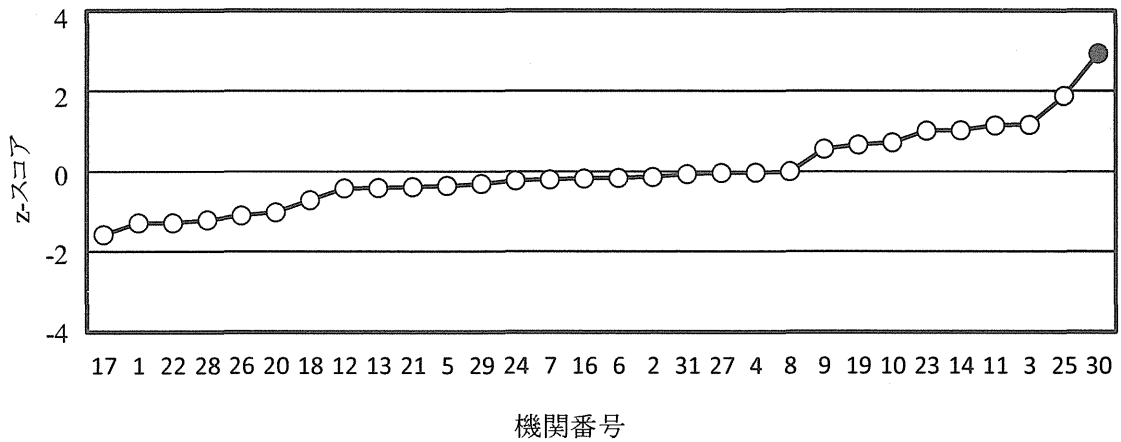
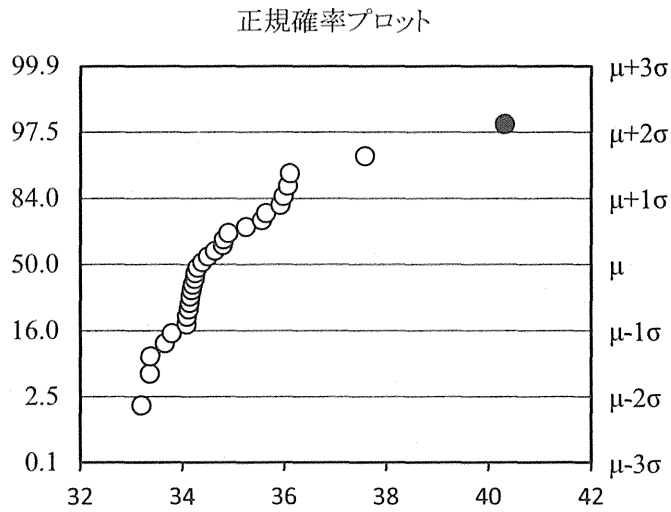


図7 試料1のコメ陽性対照用試験のCt値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。



基本統計量	
データ数	30
最小値	33.19
最大値	40.31
平均値	34.858
標準偏差	1.424
ひずみ	2.207
とがり	6.689

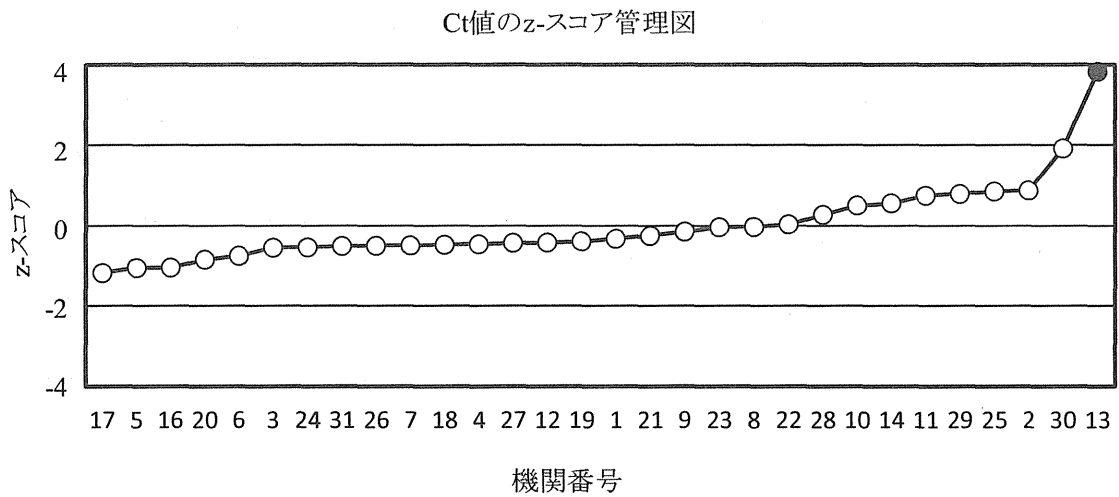
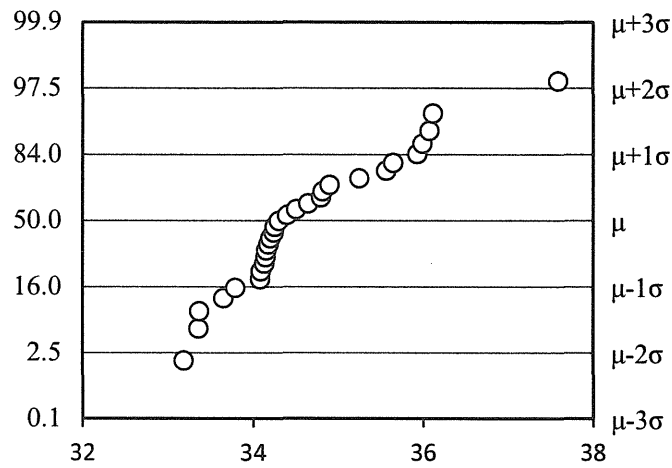


図8 試料1のCpTI検出用試験のCt値の解析

zスコア管理図において、zスコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。  
 正規確率プロットにおいてzスコアの絶対値が2以上の機関(2シグマ処理の対象機関)を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	29
最小値	33.19
最大値	37.59
平均値	34.670
標準偏差	1.001
ひずみ	1.008
とがり	1.116

Ct値のz-スコア管理図

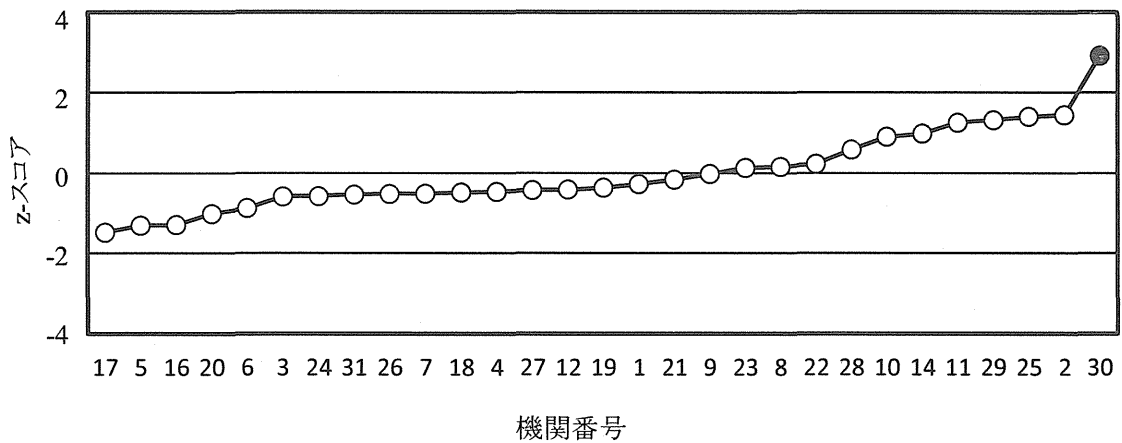
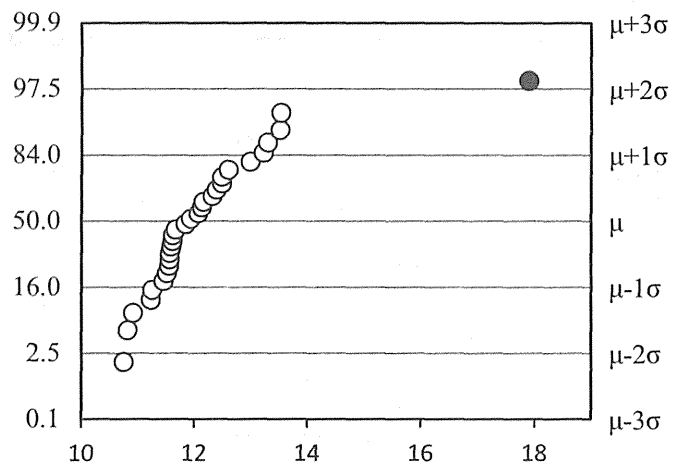


図9 試料1のCpTI検出用試験のCt値の解析(2シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が2以上の機関を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	30
最小値	10.75
最大値	17.90
平均値	12.204
標準偏差	1.320
ひずみ	2.897
とがり	11.671

Ct値のzスコア管理図

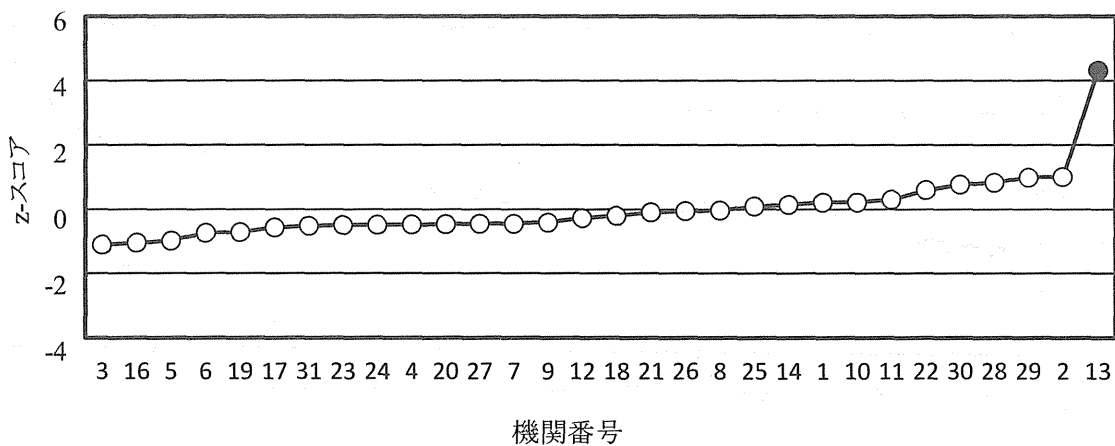
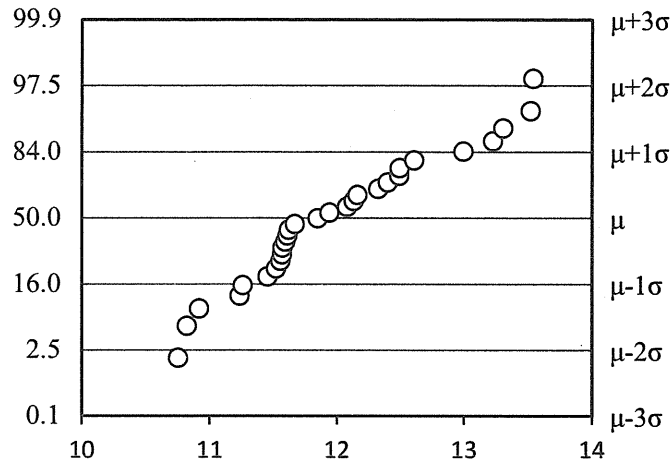


図 10 試料 1 のコメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差の解析

zスコア管理図において、zスコアの絶対値が 2 以上の機関を黒丸で示した。  
 正規確率プロットにおいて zスコアの絶対値が 2 以上の機関(2 シグマ処理の対象機関)を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	29
最小値	10.75
最大値	13.54
平均値	12.008
標準偏差	0.779
ひずみ	0.485
とがり	-0.478

Ct値のz-スコア管理図

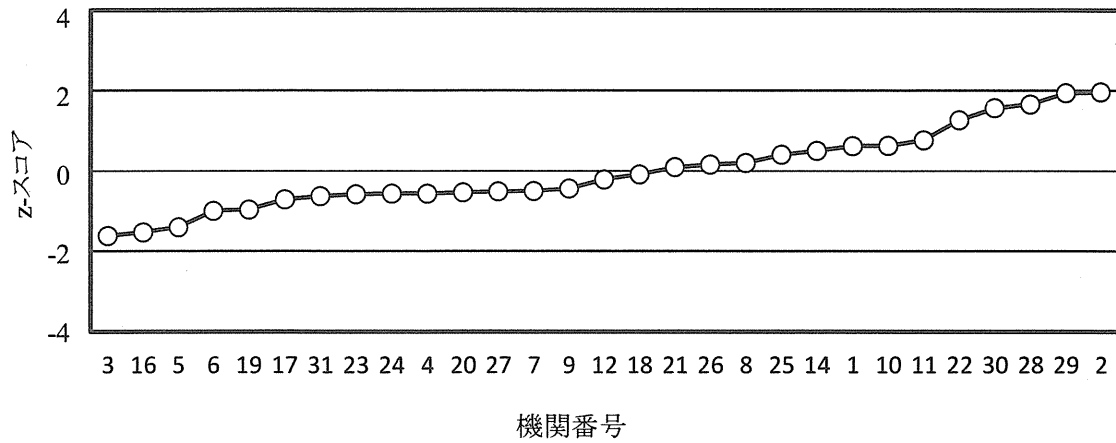
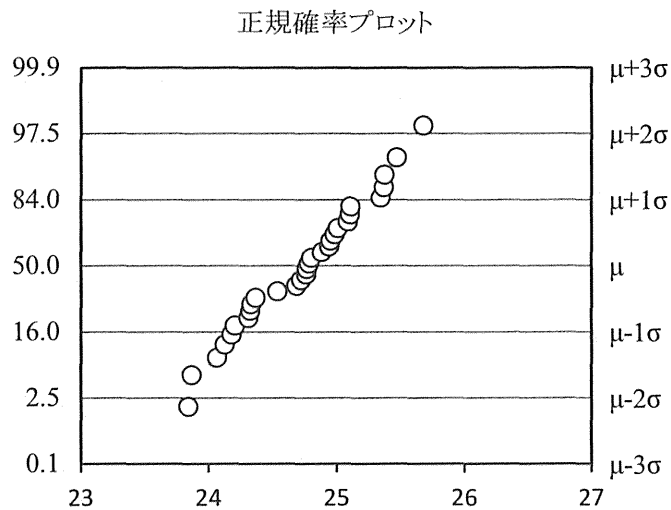


図 11 試料 1 のコメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差の解析 (2 シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関を黒丸で示した。



基本統計量	
データ数	30
最小値	23.84
最大値	25.68
平均値	24.734
標準偏差	0.488
ひずみ	-0.081
とがり	-0.777

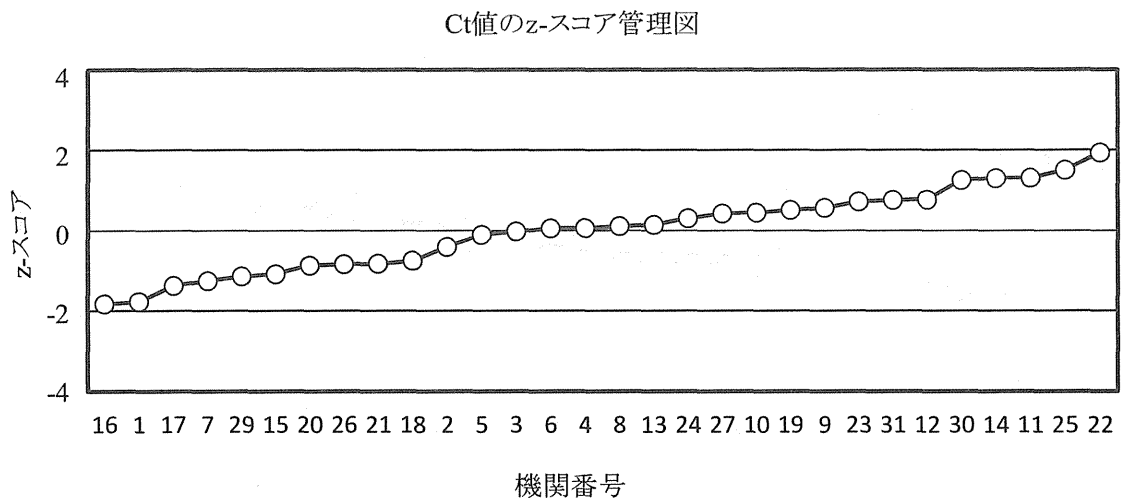
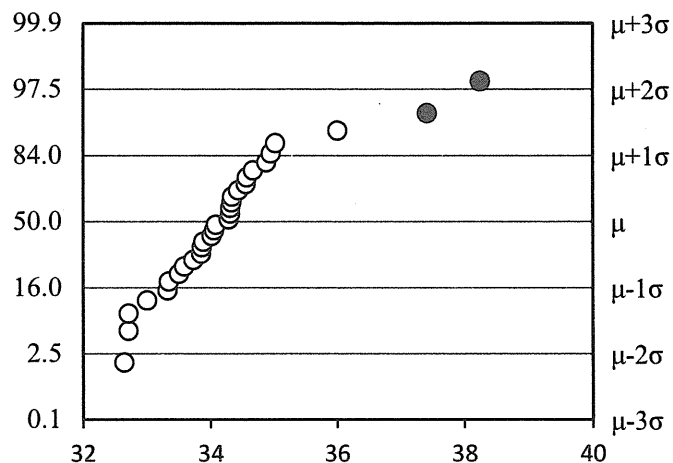


図 12 試料 4 のコメ陽性対照用試験の Ct 値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関を黒丸で示した。



正規確率プロット



基本統計量	
データ数	30
最小値	32.65
最大値	38.25
平均値	34.289
標準偏差	1.222
ひずみ	1.642
とがり	3.786

Ct値のz-スコア管理図

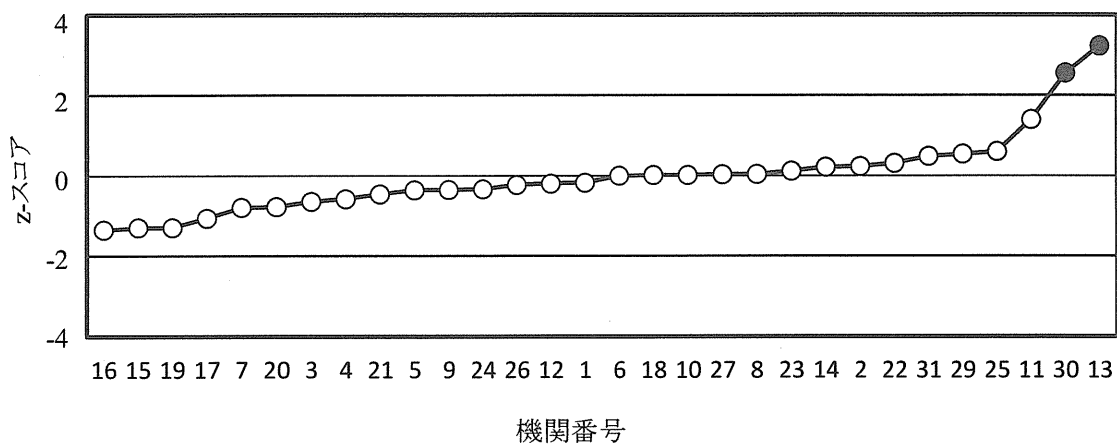
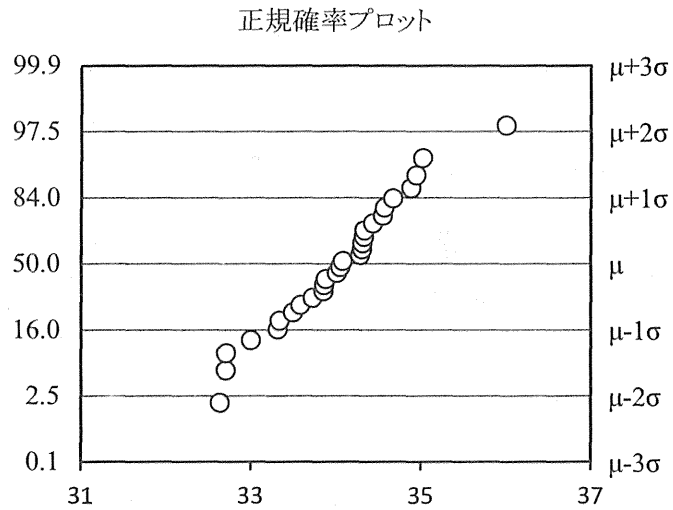


図 13 試料 4 の CpTI 検出用試験の Ct 値の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関を黒丸で示した。  
 正規確率プロットにおいて z-スコアの絶対値が 2 以上の機関 (2 シグマ処理の対象機関) を黒丸で示した。



基本統計量	
データ数	28
最小値	32.65
最大値	36.01
平均値	34.036
標準偏差	0.772
ひずみ	0.116
とがり	0.444

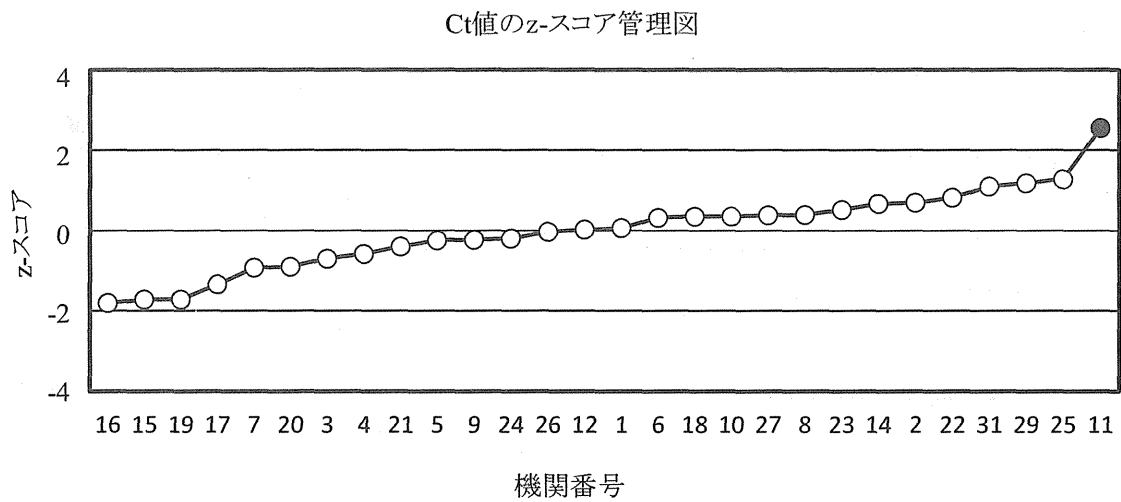
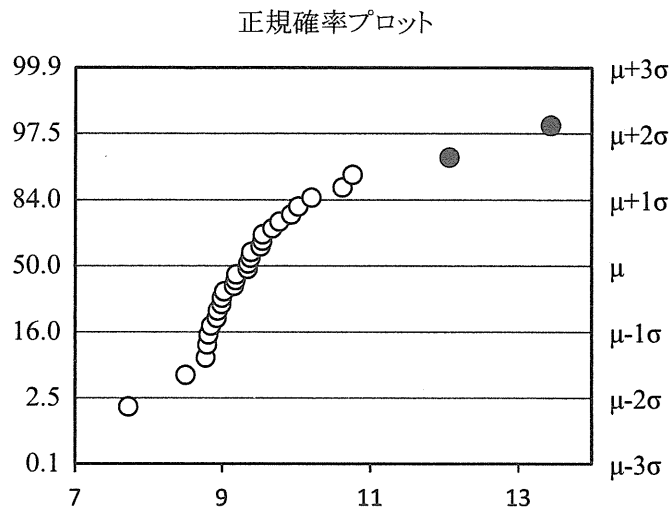


図 14 試料 4 の CpTI 検出用試験の Ct 値の解析 (2 シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関を黒丸で示した。



基本統計量	
データ数	30
最小値	7.73
最大値	13.44
平均値	9.555
標準偏差	1.079
ひずみ	2.000
とがり	5.601

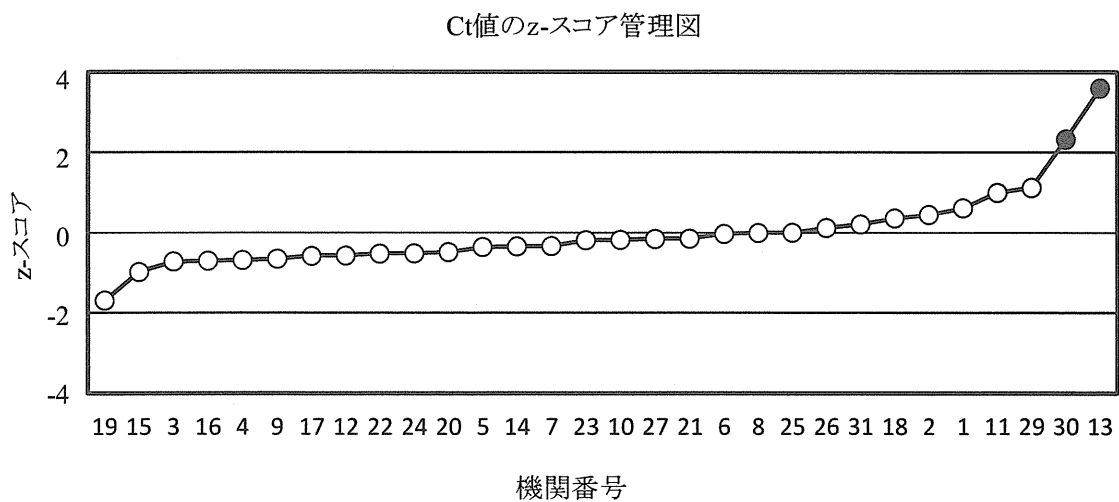
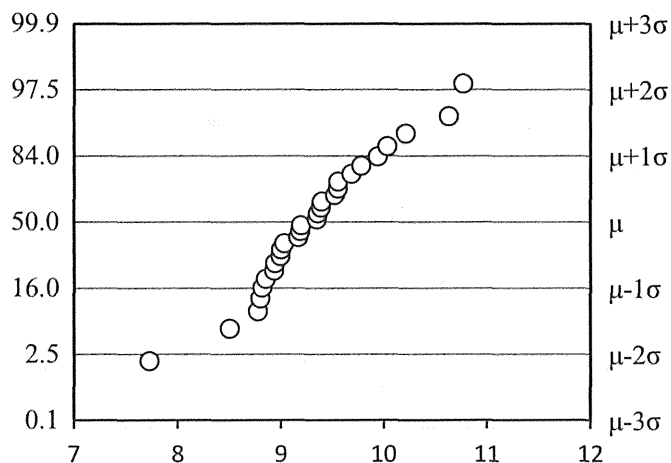


図 15 試料 4 のコメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差の解析

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関を黒丸で示した。  
 正規確率プロットにおいて z-スコアの絶対値が 2 以上の機関 (2 シグマ処理の対象機関) を黒丸で示した。

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	28
最小値	7.73
最大値	10.77
平均値	9.327
標準偏差	0.635
ひずみ	0.203
とがり	1.082

Ct値のz-スコア管理図

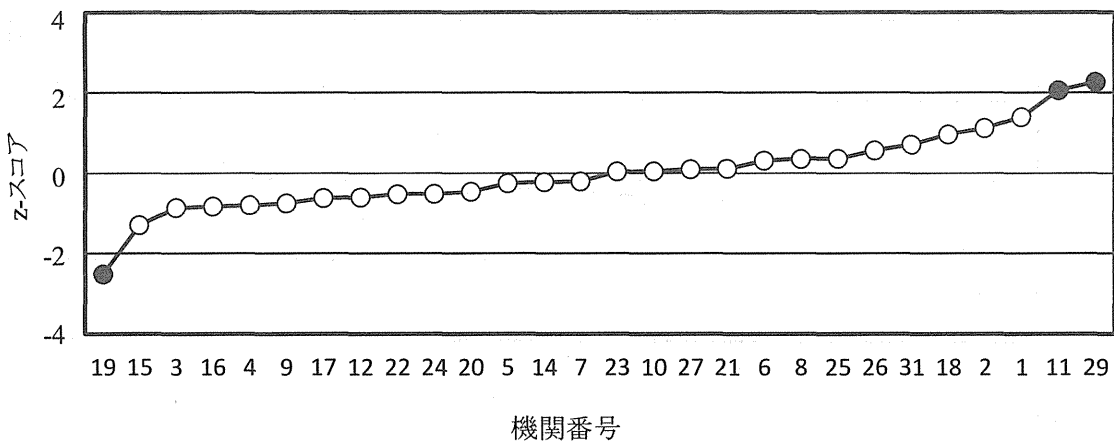


図 16 試料 4 のコメ陽性対照用試験と CpTI 検出用試験の Ct 値の差の解析 (2 シグマ処理後)

z-スコア管理図において、z-スコアの絶対値が 2 以上の機関を黒丸で示した。