

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## Ⅱ. 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 各小麦タンパク質溶液の総タンパク質濃度測定結果

試料名	抽出液	標準品規格に記載の タンパク質濃度範囲 (mg/mL) a)	タンパク質濃度 (mg/mL) b)
小麦全粒粉	old-2ME	4.0~6.0	4.3
	new		4.4

old-2ME: 0.5%SDSを含有する0.1M Tris-HCl (pH8.6) (通知法改正前の抽出液から2-メルカプトエタノールを除いたもの)

new: 0.6%SDS及び0.1M亜硫酸ナトリウムを含有する0.1M Tris-HCl (pH8.6) (通知法改正後の抽出液)

a) 消費者庁通知「アレルギー物質を含む食品の検査法について」(平成26年3月26日消食表第36号)より引用

b) 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)により測定したタンパク質濃度

表2 各小麦タンパク質溶液の新ELISAキットにおける測定値および回収率

試料名	抽出液	タンパク質 濃度 (µg/mL) a)	小麦 ELISAキット					
			Nキット		Mキット		Pキット	
			測定値 (µg/mL)	回収率 b) (%)	測定値 (µg/mL)	回収率 b) (%)	測定値 (µg/mL)	回収率 b) (%)
小麦全粒粉	old-2ME	8.61	9.59	111.4	11.25	130.7	8.63	100.2
	new	8.90	9.59	107.8	10.87	122.2	8.81	99.0

Nキット : FASTKIT™ エライザ Ver. III 小麦キット (日本ハム)

Mキット : FASPEK エライザ II 小麦キット (森永生科学研究所)

Pキット : アレルゲンアイ® ELISA II 小麦キット (プリマハム)

old-2ME : 0.5%SDSを含有する0.1M Tris-HCl (pH8.6) (通知法改正前の抽出液から2-メルカプトエタノールを除いたもの)

new : 0.6%SDS及び0.1M亜硫酸ナトリウムを含有する0.1M Tris-HCl (pH8.6) (通知法改正後の抽出液)

a) 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値より算出したELISA測定時の総タンパク質濃度

b) [測定値] / [タンパク質濃度] × 100

表3 ラージスケールで作製した小麦タンパク質添加試料（ベビーフード）の小麦ELISAキットによる均一性試験結果

No.	Nキット			Mキット			Pキット		
	測定値(μg/g)		平均値(μg/g)	測定値(μg/g)		平均値(μg/g)	測定値(μg/g)		平均値(μg/g)
	1	2		1	2		1	2	
1	11.72	10.43	11.07	16.44	16.43	16.44	11.16	8.67	9.91
2	11.86	9.61	10.74	16.32	16.96	16.64	10.08	9.54	9.81
3	10.16	10.80	10.48	16.14	16.61	16.38	9.56	9.82	9.69
4	10.70	11.22	10.96	16.54	16.78	16.66	9.72	10.08	9.90
5	11.43	10.79	11.11	16.44	16.71	16.57	9.71	10.42	10.07
6	12.33	10.95	11.64	16.28	17.17	16.73	9.99	11.73	10.86
7	11.08	10.73	10.90	16.57	16.91	16.74	10.41	11.86	11.13
8	12.62	9.96	11.29	16.79	16.41	16.60	11.46	9.67	10.57
9	11.03	10.30	10.67	16.61	15.79	16.20	11.52	9.17	10.34
10	11.20	9.94	10.57	16.73	16.48	16.60	10.02	10.36	10.19
	平均値(μg/g)		10.94	平均値(μg/g)		16.56	平均値(μg/g)		10.25
	SD(μg/g)		0.35	SD(μg/g)		0.17	SD(μg/g)		0.48
	RSD(%)		3.2	RSD(%)		1.0	RSD(%)		4.6
	回収率(%)		109.6	回収率(%)		165.9	回収率(%)		102.7
	F値		0.264	F値		0.446	F値		0.428

添加量 : 9.98 μg/g

有意水準5%点 : 3.020

Nキット: FASTKIT<sup>TM</sup>エライザVer.Ⅲ小麦キット (日本ハム)

Mキット: FASPEKエライザⅡ小麦キット (森永生科学研究所)

Pキット: アレルゲンアイ<sup>®</sup>ELISAⅡ小麦キット (プリマハム)

表4 ラージスケールで作製した小麦タンパク質添加試料（かぼちゃペースト）の小麦ELISAキットによる均一性試験結果

No.	Nキット			Mキット			Pキット		
	測定値(μg/g)		平均値(μg/g)	測定値(μg/g)		平均値(μg/g)	測定値(μg/g)		平均値(μg/g)
	1	2		1	2		1	2	
1	10.45	9.62	10.04	16.95	15.76	16.36	10.55	10.67	10.61
2	10.58	9.66	10.12	16.65	15.72	16.18	9.87	10.72	10.29
3	9.95	9.98	9.97	16.58	18.20	17.39	9.81	10.42	10.12
4	10.80	9.90	10.35	16.02	15.55	15.78	9.59	10.70	10.14
5	10.66	9.90	10.28	16.02	16.23	16.12	9.98	10.64	10.31
6	11.54	9.72	10.63	16.00	15.20	15.60	10.38	10.35	10.37
7	11.04	9.71	10.38	16.28	14.86	15.57	10.31	10.78	10.54
8	10.88	10.61	10.75	15.52	15.04	15.28	10.52	10.02	10.27
9	9.58	10.32	9.95	16.28	14.85	15.56	11.46	9.88	10.67
10	9.78	10.67	10.23	15.54	15.29	15.42	9.84	10.46	10.15
	平均値(μg/g)		10.27	平均値(μg/g)		15.93	平均値(μg/g)		10.35
	SD(μg/g)		0.27	SD(μg/g)		0.62	SD(μg/g)		0.20
	RSD(%)		2.6	RSD(%)		3.9	RSD(%)		1.9
	回収率(%)		104.8	回収率(%)		162.5	回収率(%)		105.6
	F値		0.308	F値		1.525	F値		0.259

添加量 : 9.80 μg/g

有意水準5%点 : 3.020

Nキット: FASTKIT<sup>TM</sup>エライザVer.Ⅲ小麦キット (日本ハム)

Mキット: FASPEKエライザⅡ小麦キット (森永生科学研究所)

Pキット: アレルゲンアイ<sup>®</sup>ELISAⅡ小麦キット (プリマハム)

表5 ラージスケールで作製した小麦タンパク質添加試料の安定性試験結果

小麦 ELISA キット	試料名	タンパク質 <sup>a)</sup> 添加量 ( $\mu\text{g/g}$ )	保存後 0ヶ月 (均一性)*			保存後 1ヶ月				保存後 2ヶ月			
			測定値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>b)</sup> (%)	RSD (%)	測定値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>b)</sup> (%)	RSD (%)	安定性 <sup>c)</sup> (%)	測定値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>b)</sup> (%)	RSD (%)	安定性 <sup>c)</sup> (%)
Nキット	ベビーフード	9.98	10.94	109.6	3.2	10.81	108.3	5.9	<b>98.8</b>	10.80	108.2	8.2	<b>98.7</b>
	かぼちゃ ペースト	9.80	10.27	104.8	2.6	10.61	108.3	10.0	<b>103.3</b>	11.28	115.1	5.8	<b>109.8</b>
Mキット	ベビーフード	9.98	16.56	165.9	1.0	15.17	152.0	2.2	<b>91.6</b>	14.26	142.9	2.6	<b>86.1</b>
	かぼちゃ ペースト	9.80	15.93	162.5	3.9	14.28	145.7	3.3	<b>89.7</b>	14.87	151.8	1.7	<b>93.4</b>
Pキット	ベビーフード	9.98	10.25	102.7	4.6	9.84	98.6	2.9	<b>96.0</b>	10.09	101.1	5.0	<b>98.5</b>
	かぼちゃ ペースト	9.80	10.35	105.6	1.9	9.55	97.5	7.9	<b>92.3</b>	10.47	106.9	2.3	<b>101.2</b>

Nキット: FASTKIT<sup>TM</sup>エライザVer.Ⅲ小麦キット (日本ハム)

Mキット: FASPEKエライザⅡ小麦キット (森永生科学研究所)

Pキット: アレルゲンアイ<sup>®</sup>ELISAⅡ小麦キット (プリマハム)

a) 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス) の測定値から算出したタンパク質添加量

b)  $[\text{測定値}]/[\text{タンパク質添加量}] \times 100$

c)  $[\text{保存後1ヶ月または2ヶ月の測定値}]/[\text{保存後0ヶ月 (均一性)の測定値}] \times 100$

\*: 表3および表4より値を引用した。

表6 各そばタンパク質溶液の総タンパク質濃度測定結果

試料名	抽出液	標準品規格に記載の タンパク質濃度範囲 (mg/mL) a)	タンパク質濃度 (mg/mL) b)
中国北方産そば粉	old-2ME	2.7~4.0	3.0
	new		5.7

old-2ME: 0.5%SDS、0.5M NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) (通知法改正前の抽出液から2-メルカプトエタノールを除いたもの)

new: 0.6%SDS及び0.1M亜硫酸ナトリウムを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) (通知法改正後の抽出液)

a) 消費者庁通知「アレルギー物質を含む食品の検査法について」(平成26年3月26日消食表第36号)より引用

b) 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)により測定したタンパク質濃度

表7 各そばタンパク質溶液の新ELISAキットにおける測定値および回収率

試料名	抽出液	タンパク質 濃度 (µg/mL) a)	そば ELISAキット					
			Nキット		Mキット		Pキット	
			測定値 (µg/mL)	回収率 b) (%)	測定値 (µg/mL)	回収率 b) (%)	測定値 (µg/mL)	回収率 b) (%)
中国北方産 そば粉	old-2ME	10.00	13.37	133.7	13.20	132.0	19.85	198.5
	new	10.00	11.12	111.2	13.79	137.9	10.61	106.1

Nキット : FASTKIT™エライザVer.Ⅲそばキット (日本ハム)

Mキット : FASPEKエライザⅡそばキット (森永生科学研究所)

Pキット : アレルゲンアイ®ELISAⅡそばキット (プリマハム)

old-2ME : 0.5%SDS、0.5M NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) (通知法改正前の抽出液から2-メルカプトエタノールを除いたもの)

new : 0.6%SDS及び0.1M亜硫酸ナトリウムを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) (通知法改正後の抽出液)

a) 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)の測定値より算出したELISA測定時の総タンパク質濃度

b)  $[\text{測定値}] / [\text{タンパク質濃度}] \times 100$

表8 ラージスケールで作製したそばタンパク質添加試料（こしあん）のそばELISAキットによる均一性試験結果

No.	Nキット			Mキット			Pキット		
	測定値 (µg/g)		平均値 (µg/g)	測定値 (µg/g)		平均値 (µg/g)	測定値 (µg/g)		平均値 (µg/g)
	1	2		1	2		1	2	
1	16.26	15.67	15.97	14.03	13.72	13.87	9.84	9.89	9.87
2	15.62	15.59	15.60	13.54	14.01	13.78	9.64	9.42	9.53
3	14.54	14.79	14.66	12.69	14.16	13.43	9.78	9.83	9.80
4	16.07	14.81	15.44	14.15	13.82	13.99	9.75	9.80	9.78
5	14.45	14.62	14.53	12.75	12.97	12.86	9.73	9.64	9.69
6	16.25	14.90	15.57	14.48	12.94	13.71	9.68	9.64	9.66
7	15.22	15.09	15.16	13.65	14.01	13.83	9.25	9.77	9.51
8	16.08	14.27	15.18	14.37	12.78	13.58	9.80	9.37	9.59
9	15.51	13.62	14.56	13.60	12.67	13.14	9.39	9.73	9.56
10	15.22	15.64	15.43	13.55	13.30	13.42	9.50	9.37	9.44
	平均値 (µg/g)		15.21	平均値 (µg/g)		13.56	平均値 (µg/g)		9.64
	SD (µg/g)		0.49	SD (µg/g)		0.35	SD (µg/g)		0.14
	RSD (%)		3.2	RSD (%)		2.6	RSD (%)		1.5
	回収率 (%)		152.6	回収率 (%)		136.0	回収率 (%)		96.7
	F値		0.873	F値		0.584	F値		1.206

添加量 : 9.97 µg/g

有意水準5%点 : 3.020

Nキット: FASTKIT™ エライザVer. III そばキット (日本ハム)

Mキット: FASPEK エライザ II そばキット (森永生科学研究所)

Pキット: アレルゲンアイ® ELISA II そばキット (プリマハム)

表9 ラージスケールで作製したそばタンパク質添加試料の安定性試験結果

そば ELISA キット	試料名	タンパク質 <sup>a)</sup> 添加量 ( $\mu\text{g/g}$ )	保存後 0ヶ月 (均一性)			保存後 1ヶ月				保存後 2ヶ月			
			測定値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>b)</sup> (%)	RSD (%)	測定値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>b)</sup> (%)	RSD (%)	安定性 <sup>c)</sup> (%)	測定値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率 <sup>b)</sup> (%)	RSD (%)	安定性 <sup>c)</sup> (%)
Nキット	こしあん	9.97	15.21	152.6	3.2	15.23	152.7	4.7	<b>100.1</b>	13.97	140.1	4.9	<b>91.8</b>
Mキット	こしあん	9.97	13.56	136.0	2.6	12.44	124.8	1.8	<b>91.8</b>	12.38	124.1	5.1	<b>91.3</b>
Pキット	こしあん	9.97	9.64	96.7	1.5	10.02	100.5	1.6	<b>104.0</b>	10.37	104.0	2.8	<b>107.6</b>

Nキット: FASTKIT<sup>TM</sup> エライザVer. III そばキット (日本ハム)

Mキット: FASPEK エライザ II そばキット (森永生科学研究所)

Pキット: アレルゲンアイ<sup>®</sup> ELISA II そばキット (プリマハム)

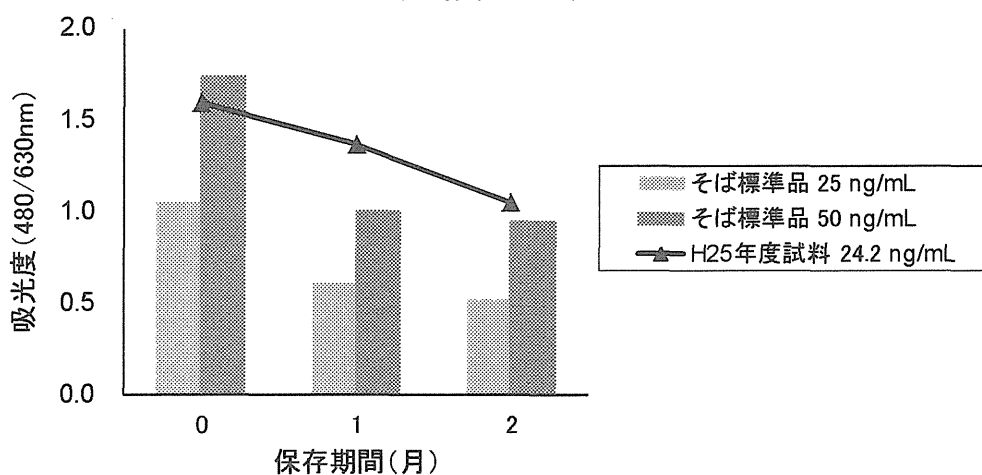
a) 2-D Quant Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス) の測定値から算出したタンパク質添加量

b)  $[\text{測定値}] / [\text{タンパク質添加量}] \times 100$

c)  $[\text{保存後1ヶ月または2ヶ月の測定値}] / [\text{保存後0ヶ月 (均一性) の測定値}] \times 100$

\* : 表8より値を引用した。

**通知法改正前の日本ハム社製ELISAキット(そば)**  
(平成25年度に報告済み)



**通知法改正後の日本ハム社製ELISAキット(そば)**

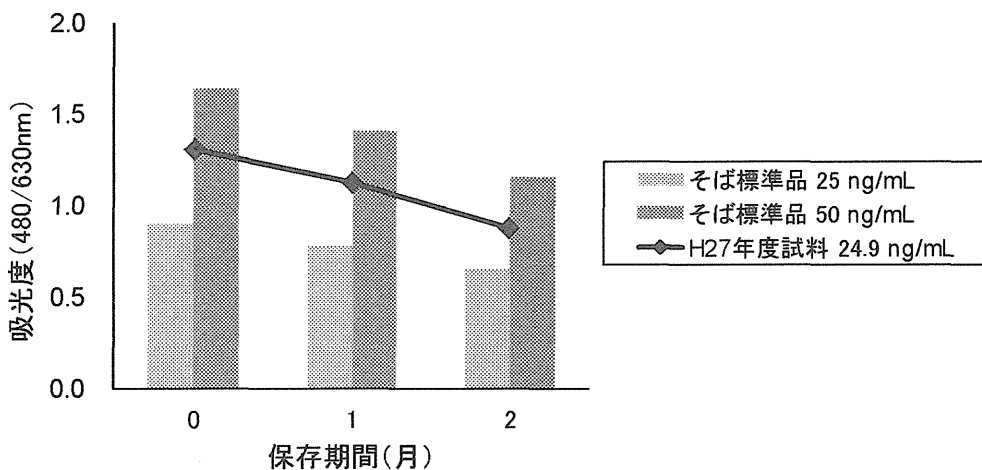


図1 試料の測定に用いた日本ハム社製ELISAキット(そば)の検量線及び試料の実測値の経時変化

上:平成25年度こしあん試料(そばタンパク質添加量:9.68  $\mu\text{g/g}$ )のELISA測定時の吸光度データ  
(平成25年度報告済み)

ELISAキット:FASTKIT™エライザVer.Ⅱそばキット(日本ハム)

下:平成27年度こしあん試料(そばタンパク質添加量:9.97  $\mu\text{g/g}$ )のELISA測定時の吸光度データ

ELISAキット:FASTKIT™エライザVer.Ⅲそばキット(日本ハム)

棒グラフは検量線作成に用いたそば標準品2濃度の吸光度、折れ線グラフは平成25年度または平成27年度こしあん試料の吸光度を示す。

凡例に記載の濃度は、ELISA測定時に抗体固相化プレートに添加した溶液の濃度( $\text{ng/mL}$ )を示す。



平成 27 年度 厚生労働省科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

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 —

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	部長
研究協力者	近藤 一成	国立医薬品食品衛生研究所	生化学部第二室長	
	鈴木 達也	(一財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	室長
	梅津 麻実	(一財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員
	佐藤 夏岐	(一財) 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、リアルタイム PCR で得られる Ct 値を用いて統計解析を試みた。昨年度は安全性未審査の遺伝子組換えコメ CpTI 系統について実施したが、本年度は、安全性未審査の遺伝子組換えコムギ MON71800 系統について実施した。解析は DNA 溶液試料に加え、非遺伝子組換えコムギ穀粒の粉碎物に遺伝子組換えコムギ MON71800 系統の陽性コントロールプラスミドを添加して調製したコムギ粉碎物試料についても解析した。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た結果、DNA 溶液試料では MON71800 検知試験の 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た。このとき  $z$ -スコアが 2 以上となった 2 機関について Ct 値がはずれた原因を検討した結果、1 機関では PCR 反応液の調製操作が、他の 1 機関ではリアルタイム PCR 解析時の設定ミスが Ct 値に影響したと考えられた。よって、DNA 溶液試料では Ct 値の解析により外部精度管理参加機関の測定精度をより詳しく推定できる可能性が示された。コムギ粉碎物試料では、Ct 値をそのまま用いて解析した場合、2 シグマ処理後のコメ陽性対照試験および MON71800 検知試験における Ct 値の正規確率プロットはいずれも、ひずみ、とがり共に小さく、正規分布に近い分布を示した。このとき  $z$ -スコアの絶対値が 2 以上となった 2 機関について Ct 値がはずれた原因を検討した結果、いずれも DNA の濃度測定に問題があったことから、コムギ粉碎物試料では、Ct 値をそのまま用いて解析した場合、DNA の濃度の誤差が解析結果に影響すると考えられた。そこで、コムギ陽性対照用試験と MON71800 検知試験の 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。その結果、 $z$ -スコアの絶対値が 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 濃度の誤差が補正できたと考えられた。

## A. 研究の目的

組換え DNA 技術応用食品の検査は、各都道府県の衛生研究所および登録検査機関等で広く実施されている。我々はこれらの検査機関における組換え DNA 技術応用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 26 年度は、安全性未審査の遺伝子組換えコムギの検査法が新たに追加（食安発 0703 第 3 号、平成 25 年 7 月 3 日、以下、通知法とする）されたことを受け、安全性未審査の遺伝子組換えコムギ MON71800 系統（以下、MON71800 コムギとする）を対象にした外部精度管理調査を行った。また、平成 26 年度は外部精度管理調査試料を作製するにあたり、原料となる MON71800 コムギを入手することができなかつたため、非遺伝子組換えコムギ粉砕物に遺伝子組換えコムギ（MON71800）陽性コントロールプラスミドを添加し、これを DNA 抽出操作確認用のコムギ粉砕物試料として配布した。

MON71800 コムギの検査法は定性試験ではあるが測定にリアルタイム PCR を使用しており、増幅が認められた測定においては Threshold line（以下、Th. line とする）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。Ct 値は PCR 反応液中の初期鋳型量に比例するが、外部精度管理で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る。

本研究では、平成 26 年度の組換え DNA 技術応用食品検査に関する外部精度管理調査において収集した参加機関の 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。本年度も昨年と同様に、粉砕物試料についても検討した。また、参加機関の Ct 値の相関についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

外部精度管理調査試料の調製には、非遺伝子組換えコムギ（以下 nonGM コムギとする）穀粒、遺伝子組換えコムギ（MON71800）陽性コントロールプラスミド（以下、陽性プラスミドとする）および ColE1/TE（いずれも国立医薬品食品衛生研究所より供与）を使用した。なお、nonGM コムギ穀粒は厚生労働省通知に従って洗浄および乾燥した後、孔径 1.5 mm のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200（レッチェ）で粉砕したもの（以下 nonGM コムギ粉砕物とする）を使用した。

### 2. nonGM コムギ DNA 溶液の調製

nonGM コムギ粉砕物から DNeasy Plant Maxi Kit（QIAGEN）を使用し、厚生労働省通知に従って DNA 溶液を抽出し、水で 10 ng/ $\mu$ L に調整したものを nonGM コムギ DNA 溶液とした。なお、遠心分離には多用途小形遠心機 himac CF16RX（日立工機）、恒温槽には DryThermoUnit DTU-2B（TAITEC）、吸光度測定には Gene Quant pro（GE ヘルスケアバイオサイエンス）を使用した。

### 3. 外部精度管理調査試料の調製

DNA 溶液試料は、陽性プラスミドを nonGM コムギ DNA 溶液で希釈し、試料 C（高濃度陽性試料；100 コピー/ウェル）、試料

B (中濃度陽性試料 ; 50 コピー/ウェル) および試料 D (低濃度陽性試料 ; 20 コピー/ウェル) を調製した。また、nonGM コムギ DNA 溶液を試料 A (陰性試料) とした。

コムギ粉砕物試料は nonGM コムギ粉砕物を 50 mL 容の遠沈管に 1.0 g ずつ分注し、このうち半分は ColeE1/TE で希釈した陽性プラスミド溶液 (75000 コピー/ $\mu$ L) を 10  $\mu$ L ずつ添加し、試料 1 (DNA 抽出確認用 陽性試料) とした。残り半分には陽性プラスミド溶液を添加せず、試料 2 (DNA 抽出確認用 陰性試料) とした。

#### 4. 陽性コントロールの調製

MON71800 コムギ検査に使用できる陽性コントロールは市販されていないため、陽性プラスミドを ColeE1/TE で希釈し、高濃度 (500 コピー/ウェル) と低濃度 (50 コピー/ウェル) の陽性コントロールを調製した。

#### 5. 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 DNA 溶液試料 4 試料 (試料 A、試料 B、試料 C および試料 D) 各 1 本、コムギ粉砕物試料 2 試料 (試料 1 および試料 2) 各 2 本を、実施要領および報告書書式とともに送付した。参加機関での検査は通知法に従うこととした。ただし、コムギ粉砕物試料から DNA を抽出する際、試料の秤量を行わずに試料の入った遠沈管に直接抽出緩衝液を添加し、以降の操作を実施するよう依頼した。

すなわち参加機関は、通知法に従ってコムギ粉砕物試料から抽出した DNA と、DNA 溶液試料のそれぞれについてコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験のリアルタイム PCR 測定を実施した。次に各測定について Amplification plot を確認し、指数関数的な増幅が確認された場合は、Th

Line を 0.2 に設定して得られた Ct 値が 43 未満か否かにより、試料ごとに陰性または陽性の判定を行った。

#### 6. 外部精度管理調査結果の統計解析

参加機関から回収した結果は試料ごとにまとめ、正答率を算出した。DNA 収量および Ct 値については試料ごとに平均値、標準偏差および変動係数 (%) を算出した。

また、参加機関の Ct 値は、試料 B、試料 C および試料 D については MON71800 検知試験、試料 1 についてはコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験について、統計解析システム JUSE-QCAS (株) 日本科学技術研修所) を用いて統計解析を行い、正規確率プロットおよび  $\bar{x}$ -スコア管理図を作成し、リアルタイム PCR 法による定性試験の結果の評価法について検討した。さらに、試料 1 についてはコムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の差についても同様に検討した。

また、参加機関の Ct 値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

外部精度管理調査結果の概要を表 1 に示した。平成 26 年度の参加機関は 24 機関であり、MON71800 コムギ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、正答率はすべて 100%であった。

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、外部精度管理調査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 26 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4倍の濃度とした。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。

コムギ粉砕物試料のDNA収量に関する基本統計量を表2に、すべての試料および陽性コントロールのCt値に関する基本統計量を表3に示した。DNA溶液試料および陽性コントロールのCt値の変動係数は両試験でいずれも約2%であり、非常に精度よく検査が実施されているものと考えられた(表3)。また、コムギ粉砕物試料ではDNA収量の変動係数は両試料で約60%と高く、各機関でばらついていたが、Ct値の変動係数は両試料で約4%と小さくなった(表2、表3)。このことから、DNA抽出液の濃度測定およびリアルタイムPCRに供するDNA溶液の濃度調整は各機関で適切に実施されたと考えられた。しかし、コムギ粉砕物試料のCt値の変動係数はDNA溶液試料の約2倍であることから、コムギ粉砕物試料のCt値にはDNA抽出液の濃度測定およびリアルタイムPCRに供するDNA溶液の濃度調整の操作による機関間差が含まれていると考えられた。

## 2. 外部精度管理調査結果の解析

### 2.1. DNA溶液試料の解析

参加機関から収集したCt値を用いて、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、DNA溶液試料はDNA抽出および濃

度調整等の操作が含まれないためPCR反応液中の鋳型量の機関間差は少なく、Ct値はほぼ一定になると予想される。このため、試料B、試料Cおよび試料DについてはCt値をそのまま解析した。試料B、試料Cおよび試料DのMON71800検知試験で得られたCt値の解析結果をそれぞれ図1、図2および図3に示した。正規確率プロットを確認したところ、すべての試料でひずみ、とがりが共に小さく、正規分布に近い形状であった(図1、図2、図3)。また、zスコア管理図を確認したところ、zスコアの絶対値が2以上となった機関は試料Bでは機関番号17、試料Cおよび試料Dでは機関番号18であった(図1、図2、図3)。これら機関について測定手法等の確認を行ったところ、機関番号17ではすべての試料でMON71800検知試験のCt値が高い傾向にあり、PCR反応がプラトーに達した時の蛍光強度が他機関に比べて低いことから、MON71800検知試験用のPCR反応液の調製がCt値に影響した可能性が考えられた。また、機関番号18はリアルタイムPCRの解析時にベースラインおよびTh. lineを設定せずに求めたCt値を報告していた。そこで、通知法に従いベースラインを3サイクルから15サイクル、Th. lineを0.2に設定してCt値を求めたところ、設定後のCt値は設定前のCt値に比べてコムギ陽性対照試験およびMON71800検知試験の両試験で1以上小さくなった(データは示さず)。このことから、機関番号18ではリアルタイムPCRの解析時の設定ミスがCt値に影響したと考えられた。

以上のことから、DNA溶液試料ではCt値を用いた解析を行うことで参加機関の測定

精度より詳しく推定できる可能性が示唆された。

## 2.2. コムギ粉砕物試料の解析

通知法において、リアルタイム PCR に供する DNA 溶液は、DNA 抽出液の濃度を測定後 10 ng/μL に調整したものをを用いることとしている。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 に調整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、昨年度の報告では安全性未審査の遺伝子組換えコメ (CpTI 系統) を含む粉砕物試料において、コメ陽性対照用試験と CpTI 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。

本年度のコムギ粉砕物試料はコメ粉砕物試料と同様に、遺伝子組換えでない粉砕物に陽性プラスミドを添加して作製しており、DNA 抽出方法はコメ粉砕物試料とは異なるが、各参加機関で抽出されるコムギ粉砕物由来の DNA 量と陽性プラスミド量の割合が一定であれば、コメ粉砕物試料と同様に 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ことが予想される。そこで、コムギ粉砕物試料について昨年度と同様に 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. コムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値を用いた解析

まず、試料 1 についてコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施した (図 4、図 6)。その結果、コムギ陽性対照試験では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、1 機関 (機関番号 22) が除外された (図 4、図 5)。MON71800 検知試験では、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 (図 6)。

2 シグマ処理後のコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の正規確率プロットを確認したところ、両試験でひずみ、とがりが共に小さく、正規分布に近い形状を示した (図 5、図 6)。また、z-スコア管理図を確認したところ、2 シグマ処理後のコムギ陽性対照試験では機関番号 18 で z-スコアが -2 以下、MON71800 検知試験では機関番号 22 で z-スコアが 2 以上であった (図 5、図 6)。機関番号 18 の DNA 抽出液の測定値について確認したところ、260 nm および 230 nm の吸光度比を負の値で報告しており、DNA 収量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 18 はリアルタイム PCR に用いた DNA 溶液の濃度が濃かったために、Ct 値が小さくなった可能性が考えられた。一方、MON71800 検知試験の z-スコアが 2 以上であった機関番号 22 はコムギ陽性対照試験でも z-スコアが 2 以上であり、2 シグマ処理で除外された (図 4)。この機関の DNA 抽出液の測定値について確認したところ、

260 nm の吸光度値が 0.1 以下と低く、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。よって機関番号 22 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。

以上のことから、コムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施した場合、DNA の濃度差が解析結果に影響すると考えられた。

### 2.2.2. コムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値の差を用いた解析

試料 1 についてコムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の差を求め、この差について統計解析を実施した (図 7)。なお、C. D. 2. 1. においてリアルタイム PCR の解析時の設定ミスが Ct 値に影響していると考察した機関番号 18 については、報告されたそのままの Ct 値の差と通知法に従って設定後に求めた Ct 値の差を比較したところ、大きな差は認められなかったことから、報告されたそのままの Ct 値を用いて解析した (データは示さず)。その結果、正規確率プロットおよび基本統計量は、コムギ陽性対照試験の Ct 値をそのまま用いて解析した場合と比較すると、ひずみ、とがりが共に小さく、より正規分布に近い形状となった (図 4、図 7)。しかし、2 シグマ処理後のコムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて解析した場合と比較すると、ひずみ、とがりは若干大きかった (図 5、図 6、図 7)。

また、z-スコア管理図を確認したところ、機関番号 18 および機関番号 22 は Ct 値をそのまま解析した場合では z-スコアの絶対値が 2 以上であったが、Ct 値の差を用いた場

合では z-スコアの絶対値がいずれも 2 未満であった (図 7)。機関番号 22 は、DNA 濃度が薄いため両試験の Ct 値が他機関よりも大きかったが、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。機関番号 18 は、DNA 濃度が他機関よりも濃いため、両試験の Ct 値が他機関よりも小さかったが、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、コムギ粉砕物試料における 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と考えられた。

また、z-スコア管理図において z-スコアが 2 以上であった機関は機関番号 3、機関番号 21 であった (図 7)。これら機関は試料 1 の MON71800 検知試験でのみ Ct 値がやや高かったが、Ct 値をそのまま解析した場合には両試験で z-スコアが 2 未満であり、報告された検査法や生データにも特に問題は認められなかった。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、機関番号 3 および機関番号 21 は DNA 抽出の際、他機関とは異なる操作により陽性プラスミドの回収量が低くなることで、MON71800 の Ct 値が高くなり、Ct 値の差が他の機関に比べて大きくなった可能性が考えられた。

以上のことから、コムギ粉砕物試料はコムギ粉砕物試料と同様に、Ct 値の差を用いた解析により DNA 濃度の誤差を補正することができたと考えられた。一方で、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。なお、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。

### 2.3. 陽性コントロールと試料 B の Ct 値の相関

陽性プラスミドの調製濃度が同じである低濃度陽性コントロールと試料 B について、参加機関の MON71800 検知試験における Ct 値の相関を検討した (図 8)。その結果、両者の相関係数は 0.852 と、強い正の相関があった。このことから、リアルタイム PCR の Ct 値は測定機関固有の誤差 (PCR 装置、試薬の種類、試薬のロット、ピペットなど) による影響が大きいと考えられた。さらに、低濃度陽性コントロールにおける、コムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の相関についても検討した (図 9)。その結果、両者の相関係数は 0.564 であり、MON71800 検知試験における試料 B との相関係数よりも低かった。同じ試料同士よりも同じ PCR 反応液同士で相関係数が高いことから、上述した測定機関固有の誤差の中でも特に PCR 反応液の誤差が Ct 値に影響していると考えられた。

### 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 MON71800 検知試験の Ct 値の正規確率プロットはひずみ、とがりが共に小さく、正規分布に近い分布を示していた。このとき、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。

コムギ粉砕物試料については、コムギ陽性対照試験および MON71800 検知試験の Ct 値をそのまま用いて統計解析を実施したところ、z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関はいずれも DNA の濃度測定に問題が認められたことから、DNA の濃度の誤差が解析結果に影響すると考えられた。

さらに、コムギ陽性対照試験と MON71800 検知試験の Ct 値の差を用いて解析したところ、Ct 値をそのまま用いた場合に z-スコアの絶対値が 2 以上となった機関はいずれも z-スコアの絶対値が 2 未満となったことから、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と考えられた。一方で、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。

さらに、参加機関の Ct 値の相関について検討した結果、同じ試料同士よりも同じ PCR 反応液同士で相関係数が高いことから、リアルタイム PCR の Ct 値は測定機関固有の誤差の中でも特に PCR 反応液の誤差が影響していると考えられた。

### 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 平成26年度遺伝子組換え食品検査における外部精度管理調査結果(正答率)

試料形態	試料名	試料の種類	添加量 <sup>a)</sup>	検出機関数		正答率(%)
				コムギ陽性 対照試験	MON71800 検知試験	
コムギ粉碎物試料	試料1	陽性	7.5×10 <sup>5</sup> コピー/本	24	24	100
	試料2	陰性	添加せず	24	0	100
DNA溶液試料	試料A	陰性	添加せず	24	0	100
	試料B	陽性	50 コピー/ウェル	24	24	100
	試料C	陽性	100 コピー/ウェル	24	24	100
	試料D	陽性	20 コピー/ウェル	24	24	100

a) 各試料の陽性コントロールプラスミド添加量を、DNA溶液試料は1ウェル当たりのコピー数(コピー/ウェル)で、コムギ粉碎物試料では送付試料1本当たりのコピー数(コピー/本)でそれぞれ示した。

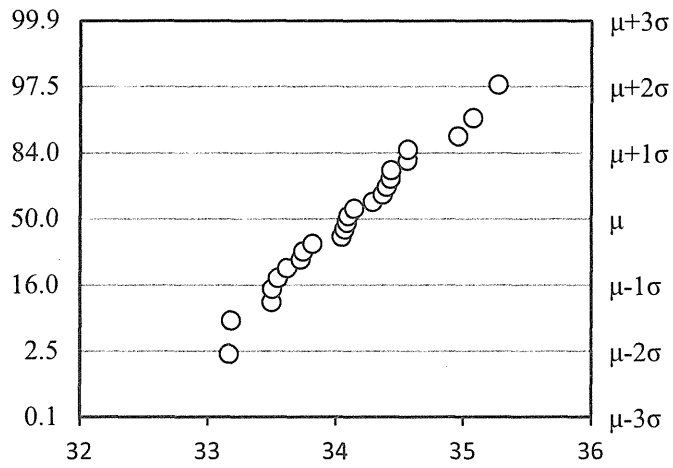
表2 平成26年度遺伝子組換え食品検査における外部精度管理調査結果(DNA収量)

	試料名	DNA収量 (ng)	
		平均 ± 標準偏差	変動係数 (%)
コムギ粉碎物試料	試料1	32299.69 ± 19398.16	59.41
	試料2	33194.79 ± 18659.94	56.02

表3 平成26年度遺伝子組換え食品検査における外部精度管理調査結果(Ct値)

	試料名	コムギ陽性対照試験		MON71800検知試験	
		平均 ± 標準偏差	変動係数 (%)	平均 ± 標準偏差	変動係数 (%)
コムギ粉碎物試料	試料1	28.289 ± 1.034	3.66	33.722 ± 1.183	3.51
	試料2	28.329 ± 1.319	4.66	-	-
DNA溶液試料	試料A	28.798 ± 0.512	1.78	-	-
	試料B	28.630 ± 0.543	1.90	34.110 ± 0.561	1.65
	試料C	28.596 ± 0.555	1.94	33.165 ± 0.520	1.57
	試料D	28.671 ± 0.514	1.79	35.597 ± 0.565	1.59
陽性コントロール	高濃度	32.272 ± 0.715	2.21	30.440 ± 0.542	1.78
	低濃度	35.632 ± 0.735	2.06	34.007 ± 0.656	1.93

正規確率プロット



基本統計量	
データ数	24
最小値	33.17
最大値	35.28
平均値	34.110
標準偏差	0.561
ひずみ	0.241
とがり	-0.371

Ct値のz-スコア管理図

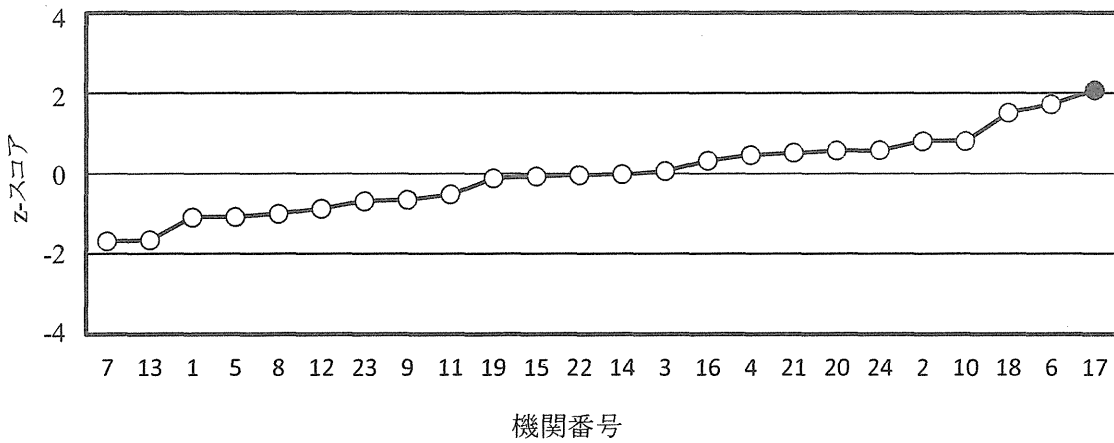
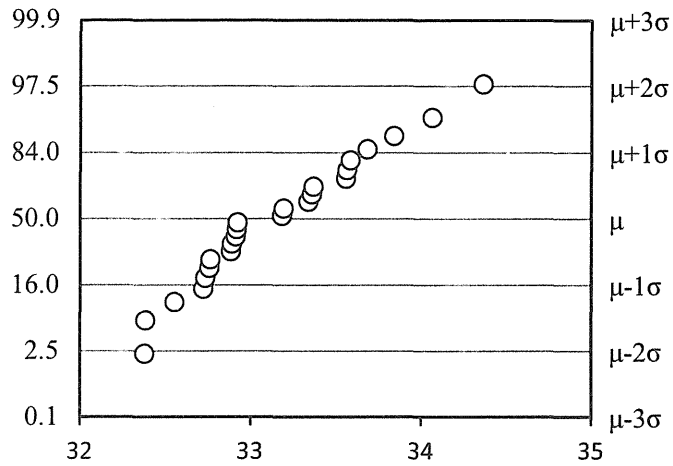


図1 試料BのMON71800検知試験のCt値の解析

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	24
最小値	32.38
最大値	34.37
平均値	33.165
標準偏差	0.520
ひずみ	0.528
とがり	-0.238

Ct値のz-スコア管理図

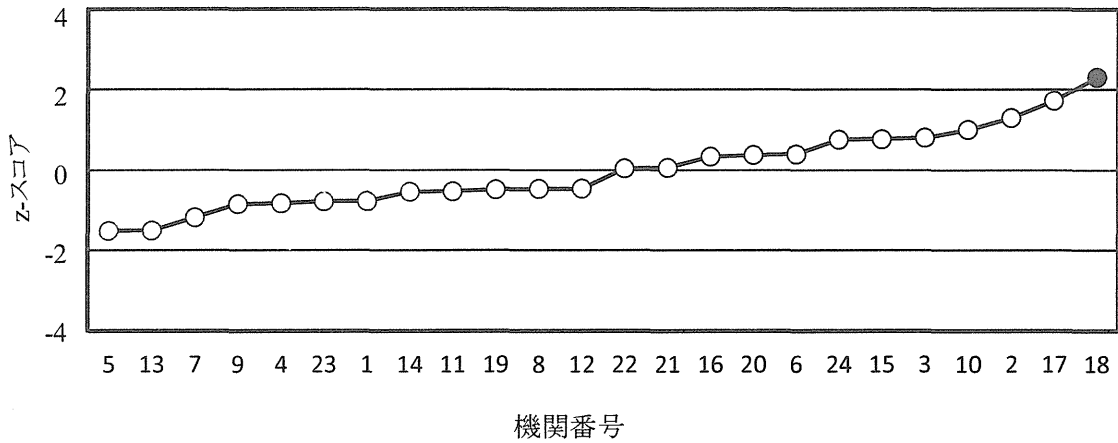
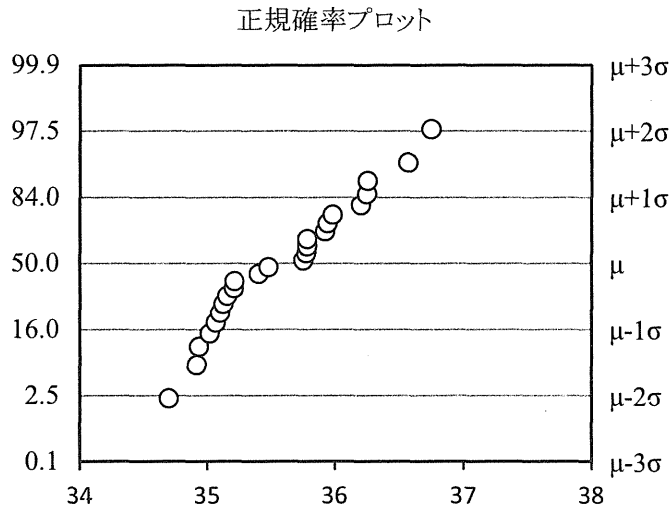


図2 試料CのMON71800 検知試験の Ct 値の解析

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	24
最小値	34.70
最大値	36.75
平均値	35.597
標準偏差	0.565
ひずみ	0.344
とがり	-0.850

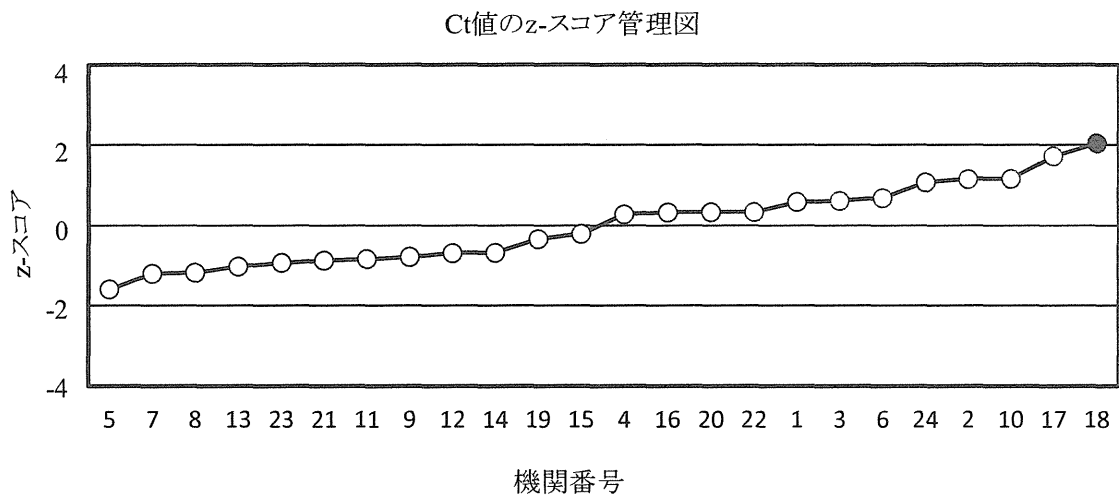


図3 試料DのMON71800 検知試験のCt値の解析

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。