

食品中の特定 DNA 配列及び特定タンパク
質の検出、同定、定量のための
分析法の性能規準及びバリデーション
に関するガイドライン

CAC/GL 74-2010



Food and Agriculture Organization of the
United Nations



World Health
Organization

Published by arrangement with the
Food and Agriculture Organization of United Nations
by the
Ministry of Health, Labour and Welfare

本文書は、当初、国際連合食糧農業機関（FAO）及び世界保健機関（WHO）により、「食品中の特定 DNA 配列及び特定タンパク質の検出、同定、定量のための分析法の性能規準及びバリデーションに関するガイドライン（CAC/GL 74-2010）」として出版されたものである。日本語への翻訳は、日本政府の厚生労働省によってなされた。

本文書において使用する呼称及び資料の表示は、いかなる国、領土、都市あるいは地域、若しくはその当局の法律上の地位に関する、又はその国境あるいは境界の設定に関する、FAOあるいはWHOのいかなる見解の表明を意味するものではない。また、個別の企業あるいは製品への言及は、それらが特許を受けているか否かにかかわらず、言及されていない同様の性質を持つ他者に優先して、FAOあるいはWHOが承認あるいは推薦していることを意味するものではない。本文書において表明された見解は、筆者の見解であり、必ずしもFAOあるいはWHOの見解を示すものではない。

食品中の特定 DNA 配列及び特定タンパク質の検出、同定、定量のための分析法の性能規準及びバリデーションに関するガイドライン原案*

(手続きのステップ 5/8)

セクション 1—はじめに

1. 分子分析法及び免疫分析法は現在、食品中の DNA 及びタンパク質分析対象成分の測定手段として認められている。しかし、こうした分析法によって異なる試験所から得られた結果が信頼に足るものとして広く受け入れられるためには、その方法が一定の品質基準を満たすことが必要である。
2. 本ガイドラインは、食品中の特定 DNA 配列又は特定タンパク質の検出を目的に開発された分析法の性能をバリデーションするための適切な基準を提供する。
3. 本ガイドラインの最初のパートでは、特定 DNA 配列及び特定タンパク質の分析法のバリデーションについて全般的な考察を提示する。また付属文書ではそれぞれ、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法のバリデーション、定性的 PCR 法のバリデーション、及びタンパク質ベースの分析法のバリデーションに関する情報を取り上げる。

セクション 1.1. 目的

4. 本書の目的は、食品中の特定 DNA 配列及び特定タンパク質の検出、同定、定量のために行われ、異なる試験所で実施された場合に同等の再現性で結果が得られる分子法及び免疫法の確立を支援することである。
5. 本ガイドラインでは、バリデーションの適切な基準を定め、特定の分析法がこれらの基準を満たすかをその性能特性に基づき明らかにすることにより、食品中の特定の DNA 配列及びタンパク質を検出及び同定する分析法を確立するための指針の提供を目指している。

本ガイドラインは以下により適切な基準を定め、これらの基準の考え方を説明する。

- 最も関連する基準の論拠を提示すること
- 特定の分析法が所定の基準要件を満たすかを見極める方法を明示すること

* 例えばモダンバイオテクノロジー応用食品、食品認証、食品特定、その他の目的に適用

セクション 1.2 範囲

6. 本ガイドラインは、モダンバイオテクノロジー応用物質を含有する食品を含めて、食品中に存在する可能性のある特定の DNA 配列及びタンパク質の検出、同定、定量を伴う食品分析法のバリデーション基準に関する情報を提供する。これらの分子法と免疫法は、モダンバイオテクノロジー応用食品を含む食品中のバイオマーカーの検査や食品認証などの幅広い用途に適用でき、食品分析に責任を負う試験所によって利用される可能性がある。

セクション 2—分析法のバリデーション

7. コーデックス委員会は、ISO 5725:1994 又は AOAC/IUPAC 統一プロトコルに基づく国際的に認められたプロトコルに準拠した共同試験によりバリデーションされた分析法の受け入れを重視している。この分野では、共同試験データが存在しない場合は暫定措置として形式的な単一試験所バリデーションを採用する必要があると考えられる。

しかし、DNA 配列及びタンパク質の分析法は、多くの試験所で行うことができなければならない。

セクション 2.1—基準アプローチ

8. 本ガイドラインでは「基準アプローチ」を適用する。

セクション 2.2—分析法の一般基準

9. コーデックス手続きマニュアルでは、分析法の選択に関する一般基準を採用している。本ガイドラインでもこれらの基準を適用し、適切な付属文書に追加基準を記載する。

セクション 2.3—バリデーションプロセス

10. 分析法のバリデーションは、特定の分析法の性能特性と限界を確認するプロセスである。バリデーションプロセスの結果には、どの干渉が存在する場合にどの種の基質においてどの分析対象成分を確認することができるかが記載される。バリデーションを行うことにより、検査した条件下での特定の分析法の精度と真度が得られる。

11. 分析法の形式的バリデーションは、以下の主要な段階を含む長いプロセスの結論である。

- ・ **分析法のプレバリデーション** プレバリデーションは、必要に応じて個別に行うべきである。プレバリデーションでは、バリデーション試験の結果がうまく得られるような形で分析法が機能するよう保証すべきである。つまり、プレバリデーションは、その分析法が意図された目的

に対して適切であるという証拠を提示しなければならない。プレバリデーションは、2~4つの試験所を参加させて行うことが望ましい。統計分析（例えば「反復性」や「再現性」の）は、その後使用されるバリデーション手順に照らして行うべきである。

- ・ **分析法のバリデーション** 共同試験によるバリデーションは実施費用が高く、通常は単一試験所試験とプレバリデーション試験の両方において、分析法が許容可能な性能を持つと認められた場合に限り行われる。

セクション3—DNA配列及びタンパク質の検出、同定、定量のための分析法のバリデーションに関する具体的考察

セクション3.1—形式的バリデーション法の開発

12. DNAベースの分析の一般的な方法は、特定の（標的）DNA配列の検出に使用できるPCRに基づく方法である。タンパク質に対する一般的なアプローチでは、酵素免疫吸着測定法（ELISA）と側方流動装置を利用する。DNAベースの分析では、同じ目的を達成する他のDNAベースの分析法も適切にバリデーションされれば利用できるが、PCRアプローチが現在最も広く適用されている。ここでは、DNAベースとタンパク質ベースの両アプローチについて検討する。

セクション3.1.1—分析法の許容基準（バリデーションの必要条件）

13. 付属文書Iで詳述するように、バリデーションの前に分析法を評価するため、分析法とその試験の両方に関する情報が必要とされる。

14. 分析法の評価においては、その分析法をコーデックス目的で使用するための原則的な前提条件が満たされていることを確認すべきである。このセクションでは、プレバリデーションと完全な共同試験を実施するために、分析法が満たすべき許容基準を記載する。

セクション3.1.2—分析法の適用性

15. 分析法の適用性は、その分析法を必要な性能で対象食品に使用できるかを確認することにより判定でき、それは明確に示されるべきである。特にDNA配列及びタンパク質の分析においては、DNAとタンパク質が変性している場合もあることから、単一の生の基質に適用できる何らかの分析法が必ずしも複雑な基質及び／又は加工食品に適用できるとは限らない。

16. 分析法は原則として、対象の基質に適用できなければならない。さまざまな食品基質中のDNA配列とタンパク質を同定及び定量する「汎用」の分析法の場合には、一般的な食品基質に適用できる少なくとも一つの抽出法が利用できるべきである。

セクション 3.1.3—原則条件

17. DNA ベースの分析法では、特定 DNA 配列のレベルを検出及び同定すべきであり、また定量することができる。タンパク質ベースの分析法では、製品における特定タンパク質のレベルを検出及び同定すべきであり、また定量することができる。

18. 現在、DNA ベースの検出法は一般に PCR 法で構成され、以下が含まれる。

- ・ 関連基質に適用できる抽出法を説明したプロトコル
- ・ 使用する装置を含めて、標的 DNA 配列の検出に PCR を使用できる条件を説明したプロトコル
- ・ 標的 DNA 配列を一意的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマー配列に関する説明
- ・ 適用できる場合には、標的 DNA 配列を一意的に同定する蛍光オリゴヌクレオチドプローブ配列に関する説明
- ・ 抽出／増幅プロセスの失敗による陰性結果を識別するため、また分類群特異的 DNA に対する標的 DNA の量を定量するため、特定の分析対象成分の有無に関わらず、従来の食品基質に存在するはずの分類群特異的 DNA 配列を増幅するオリゴヌクレオチドプライマー配列に関する説明
- ・ 適用できる場合には、分類群特異的 DNA 配列を一意的に同定する蛍光オリゴヌクレオチドプローブ配列に関する説明
- ・ DNA の検出に使用する方法に関する説明
- ・ 適切な対照試料及び基準
- ・ 結果の導出に使用する計算に関する説明

19. タンパク質ベースの分析法は、一般に定量法又は定性法で構成される。通常これらは免疫吸着分析システムであり、以下によって構成される。

- ・ 関連基質に適用できる抽出法を説明したプロトコル
- ・ 使用する装置を含めて、標的タンパク質の検出に免疫吸着分析を使用できる条件を説明したプロトコル
- ・ 抗体被覆サポート
- ・ 酵素結合二次抗体
- ・ 発色酵素基質
- ・ 洗浄緩衝液及び試料抽出緩衝液
- ・ タンパク質の検出に使用する方法に関する説明
- ・ 適切な対照試料及び基準
- ・ 結果の導出に使用する計算に関する説明

20. 分析法は以下の要件を満たすべきである。

- ・タンパク質ベースの分析法では、特定の抗原又はエピトープの明確な検出、同定、及び／又は定量が可能であるべきである。
- ・DNA ベースのスクリーニング法は、複数の生物に存在する標的 DNA の検出に使用する。例えば、複数の形質転換事象の検出に使用されるスクリーニング法では、いくつかの形質転換事象に共通する標的 DNA 配列の検出が可能であるべきである。
- ・類似した生物と混在している可能性のある特定の生物の明確な検出、同定、及び／又は定量に使用される DNA ベースの特異的方法では、その生物に特有又は特異的な DNA 配列の明確な検出、同定、及び／又は定量が可能であるべきである。例えば、単一の形質転換事象の検出に使用される標的的特異的分析法では、その形質転換事象に特有又は特異的な DNA 配列の明確な検出、同定、及び／又は定量が可能であるべきである。食品認証に関しては、必要に応じて特異的標的配列が分類群を一意的に定義すべきである。
- ・標的 DNA の検出又は相対的定量に使用される DNA ベースの分類群特異的分析法では、その分類群に特有又は特異的な DNA 配列の明確な検出、同定、及び定量が可能であるべきである。
- ・相対的定量に使用される標的及び分類群特異的分析法については、例えばプローブのハイブリダイゼーション又はこれと同等の適切な方法による増幅断片の同定が推奨される。

セクション 3.1.4—測定単位及び結果の報告

21. 各分析法についてはその使用の前に、適切な測定単位（例えば標的コピー数やモル当量）、性能及びデータの報告基準を特定すべきである。定性分析については、結果を「検出」又は「不検出」として提示できるため、測定単位は存在しない。
22. 測定結果は重量／重量又は相対的割合として明示できるが、現在の方法（DNA 又はタンパク質ベース）ではそれらを直接測定することは不可能である。

セクション 3.1.5—測定の不確かさ

23. コーデックス「測定の不確かさに関するガイドライン（CAC/GL 54-2004）」に記載の通り、試験所ではその定量的測定の不確かさを推定する必要がある。試料調製と分析法は、分析測定の評価に際して検討すべき二つの重要なエラーの原因である。本ガイドラインに従いバリデーションされた分析法を使用する分析者は、その結果の不確かさを推定できるよう十分な情報を持つべきである。
24. 詳細はコーデックス手続きマニュアルの「測定の不確かさに関するガイドライン（CAC/GL 54-2004）」、「分析結果の活用：サンプリング計画及び分析結果・測定の不確かさ・回収率とコーデックス規格の条項の関係」のセクションを参照。

セクション 3.1.6—分析法のバリデーションへのモジュール式アプローチ

25. 「分析法」とは、特定の基質における測定量を推定するために必要なあらゆる実験手順を意味している。特定の物質については、方法には PCR 又は免疫吸着分析システムにおける DNA 若しくはタンパク質の抽出及び最終的な定量、又は定性法による分析対象成分の有無の判定のためのプロセスが含まれることもある。このような場合には、抽出から分析段階までのつながり全体が一つの分析法を構成する。しかし、バリデーションされた分析法のプロセスが同じである限り、その後行われるいくつかの異なった分析に同じ試料調製（例えば粉砕）法を同じ DNA 又はタンパク質単離プロセスと併用して経済効率を達成することも可能である。

26. バリデーションされた分析法に異なった DNA 又はタンパク質の単離プロセスなどの代替プロセスを代用することは、その代用が分析法の性能に影響しないことを示す追加試験を行わない限り不適切と考えられる。

セクション 3.2—共同試験の要件

セクション 3.2.1—一般的情報

27. 共同試験の目的は、プレバリデーション又は単一試験所におけるそれまでの試験によって得られたデータの妥当性を確認し、反復性と再現性に関して方法の精度を判定することである。

28. バリデーション試験によって報告されるあらゆる性能パラメータの値は、慎重に解釈及び比較すべきである。厳密値とその解釈は、分析法の性能に加えて、分析法の範囲によっても左右される可能性がある。

29. ISO 5725:1994 又は AOAC/IUPAC 統一プロトコルに従い共同試験が行われた場合には、その情報を分析法の許容性の評価に利用できる。

セクション 3.2.2—性能最低要件

30. 共同試験においては、分析法の性能は分析法の許容基準の関連部分に適合しているべきであり、また共同試験に関して以下に具体的に定める分析法の性能要件を満たしていなければならない。特に、感度及び反復性／再現性の標準偏差と真度に関する基準との適合性を評価すべきである。

31. 共同試験の実験データからは、分析法の許容基準に加えて、少なくとも付属文書 I に記載の分析法の性能要件を評価すべきである。

32. 分析法及びそれに関連したバリデーションデータは、バリデーション及び共同試験によって得られる科学的知識と経験の進歩に伴い定期的に修正されることになる。本ガイドラインは、バリデーションプロセスの作業手順に関する実用的な情報によって補完される。

セクション 3.2.3—共同試験の試験物質

33. 原則として、分析法は対象の基質（つまり何らかの特定が行われているもの）に対して適用及び試験されるべきである。

34. プロトコルの抽出段階に対する物質／基質の影響は、あらゆる分析にとって重要である。バリデーション試験の結果を報告する際には、どの基質が分析されたか、分析の対象として精製タンパク質又は DNA が使われたかを詳細に報告することが重要である。

セクション 3.2.4—分析法のバリデーションに関する具体的情報

35. 定量及び定性的 PCR 法のバリデーションに関する具体的な情報は、それぞれ付属文書 II 及び III に記載されている。

36. タンパク質ベースの定量及び定性法のバリデーションに関する具体的情報は、付属文書 IV に記載されている。

セクション 4—品質管理要件

セクション 4.1—試験所の品質

37. CAC/GL 27 では、輸入及び輸出食品を扱う試験所についての指針を提供している。この指針は、ISO/IEC 規格 17025 の遵守、検定試験及び内部品質管理、並びにコーデックスの要件に従いバリデーションされた分析法の使用に基づくものである。

セクション 4.2—標準物質

38. 分析法のバリデーションには、一般に適切な標準物質が必要とされる。DNA 配列及びタンパク質の検出法のための標準物質又は作業基準の開発にはいくつかの基質が利用でき、それぞれが特定の目的に対して固有の利点と欠点を持っている。特定の分析法に対する標準物質の適切性は、その物理的性状によって決まる。粉末材料に関しては、標準物質とルーチン試料の粒度分布の違いが、サンプリング誤差による標的タンパク質又は DNA の抽出効率と分析法の再現性に影響を及ぼす可能性がある。

39. DNA ベースの分析法の標準物質としては、分析対象成分を含む基質、分析対象成分を含む基質から抽出された DNA、特定 DNA を含むプラスミド、又は認定された標準物質が利用できない場合には、例えば検定試験制度からの対照試料物質が利用できる。プラスミド又はアンプリコン DNA を

使用する場合には、プラスミド又はアンプリコン DNA が必要な目的に確実に適うものとなるよう、これらに組み込む選択肢を慎重に検討する必要がある。

40. タンパク質ベースの分析法の標準物質としては、例えばそれ自体が組換え微生物（大腸菌など）から精製されたタンパク質、粉碎した植物基質（一般に葉や穀粒）、又は加工食品の断片などが利用できる。

セクション 5—技術的及び方法論的情報

DNA 及びタンパク質ベースの分析法の技術的及び方法論的側面については以下を参照：

Allmann M、Candrian U、Hoefelein C、及び Luethy J（1993 年）。「ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）：食品の安全性と品質を保証する免疫化学法の代替可能性」。Lebensm. Unters. Forsch 196:248-251。

Anklam E、Gadani F、Heinze P、Pijnenburg H、及び Van den Eede G（2002 年）。「農作物及び植物由来食品中の遺伝子組換え生物（GMO）を検出及び測定するための分析法」。European Food Research and Technology 214:3-26。

Asensio L（2007 年）。「レビュー：魚類・水産製品の認証のための PCR ベースの分析法」。Trends in Food Science & Technology 18(11): 558-566。

Asensio L、Gonzalez I、Garcia T、及び Martin R（2008 年）。「酵素免疫吸着測定法（ELISA）による食品の真正性の判定」。Food Control 19:1-8。

Carnegie、PR（1994）。「食品産業における DNA 技術を用いた品質管理」。Australas. Biotechnol. 4(3):146-9。

Chapela MJ、Sotelo CG、Pérez -Martin RI、Pardo MA、Pérez -Villareal B、Gilardi P、及び Riese J（2007 年）。「種の同定のために缶詰のマグロの筋肉から DNA を抽出する方法の比較」。Food Control. 18(10):1211-1215。

コーデックス委員会手続きマニュアル。「分析結果の活用：サンプリング計画及び分析結果・測定の不確かさ・回収率とコーデックス規格の条項の関係」

CAC/GL 54-2004。「測定の不確かさに関するコーデックスガイドライン」

Colgan S、O'Brien LO、Maher M、Shilton N、McDonnell K、及び Ward S（2001 年）。「肉及び骨粉における種の同定のための DNA ベースの分析法の開発」。Food Research International 34(5):409-414。

Dahinden I, von Büren M, Lüthy J (2001 年)。「セリアック病患者用の無グルテン食品における小麦、大麦、ライ麦の汚染を検出するための定量的競合 PCR システム」。European Food Research and Technology 212(2):228-233。

Dieffenbach CW 及び Dveksler GS (1993 年)。「PCR 試験所の設置」。PCR Methods Appl. 3(2):S2-7。

ISO 5725:1996。「測定の方法と結果の正確性 (真度と精度)」。ジュネーブ：国際標準化機構。

ISO 21569:2005。「食品－遺伝子組換え生物及び由来製品の検出のための分析法－核酸ベースの定性法」。ジュネーブ：国際標準化機構。

ISO 21570:2005。「食品－遺伝子組換え生物及び由来製品の検出のための分析法－核酸ベースの定量法」。ジュネーブ：国際標準化機構。

ISO/DIS 24276:2006。「食品－遺伝子組換え生物及び由来製品の検出のための核酸ベースの分析法－一般要求事項と定義」。ジュネーブ：国際標準化機構。

ISO/IEC Standard 17025:2005。「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」。ジュネーブ：国際標準化機構。

Grothaus GD、Bandla M、Currier T、Giroux R、Jenkins R、Lipp M、Shan G、Stave J、及び V. Pantella (2007 年)。「農業バイオテクノロジーにおける分析ツールとしての免疫測定法」。Journal of AOAC International. 85: 3, pp 780-786。

Holst-Jensen A 及び Berdal KG (2004 年)。「食品及び飼料中の遺伝子組換え物質のモジュール式分析手順、バリデーション方法、及び測定単位。」Journal of AOAC International 87(4):927-36。

Horwitz E。「分析法の性能試験の設計、実施、及び解釈に関する ISO/AOAC/IUPAC 統一プロトコル (1995 年)」。Pure and Applied Chemistry 67:331-343。

Kwok S 及び Higuchi R (1989 年)。「PCR による偽陽性の回避」。Nature 339(6221):237-238。

Lipp M、Shillito R、Giroux R、Spiegelhalter F、Charlton S、Pinero D、及び Song P (2005 年)。「農業バイオテクノロジーにおける分析ツールとしてのポリメラーゼ連鎖反応技術」。Journal of AOAC International 88 (1):36-155。

Meyer R、Candrian U (1996 年)。「食品成分の同定と特性解析のための PCR ベースの DNA 分析」。Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 29(1-2):1-9。

Mifflin TE (2007 年)。「PCR 試験所の設置」。Cold Spring Harbor Protocols 14 (doi:10.1101/pdb.top14)。

Miraglia M、Berdal KG、Brera C、Corbisier P、Holst-Jensen A、Kok EJ、Marvin HJP、Schimmel H、Rentsch J、van Rie JPPF、及び Zagon J (2004 年)。「食品生産チェーンにおける遺伝子組換え生物の検出とトレーサビリティ」。Food and Chemical Toxicology 42:1157-1180。

Newton CR、Herbitter A、及び Gubler U (1995 年)。「PCR: 必須データ」。Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons。

Olexova L、Dovičovičová L、Švec M、Siekel P、Kuchta T (2006 年)。「ポリメラーゼ連鎖反応による小麦粉及び『無グルテン』ベーカリー製品中のグルテン含有穀物の検出」。Food Control 17(3):234-237。

Poms、RE; Klein CL、Anklam E (2004 年)。「食品中のアレルゲン分析法: レビュー」。Food Addit. Contam. 21(1):1-31。

Trapmann S、Burns M、Broll H、Macarthur R、Wood RKS、Žel Jana (2009 年)。「GMO 試験所のための測定の不確かさに関する指針書」。EUR - Scientific and technical research series。Luxembourg: Office for official publications of the European communities。

Turci M、Sardaro MLS、Visioli G、Maestri E、Marmiroli M、及び Marmiroli N (2010 年)。「各種トマト製品のトレーサビリティのための DNA 抽出法の評価」。Food Control. 21(2):143-149。

Williams R (2005 年)。「優良食品と偽造食品の識別に役立つ遺伝子検査」。Nature 434:262。

Woolfe M 及び Primrose S (2004 年)。「食品の鑑識: 誤記及び偽装に対抗するための DNA 技術の活用」。Trends in Biotechnology 22(5):222-6。

付属文書 I : 分析法のバリデーションを検討する際に必要な情報

分析法の説明

1. 分析法のあらゆる構成要素について、完全かつ詳細な説明を提供すべきである。例えば、PCR 法及びタンパク質法のためのマルチプレートの使用について明確に取り上げるべきである。説明には分析法の範囲に関する情報も含めるべきであり、また以下とともに測定単位を明示すべきである。

分析法の目的及び妥当性

2. 分析法においてはその目的を示すべきである。分析法は意図された用途に適うものでなければならない。

科学的根拠

3. 分析法が基づいている科学的原理（例えばリアルタイム PCR 法の使用の基礎となる分子生物学）の概要を提示すべきである。

分析法に必要な予測モデ／数理モデルの詳細

4. DNA 配列及びタンパク質の検出と定量に使用される DNA 及びタンパク質ベースの技術は、さまざまな原理に基づいている。PCR においては、標的 DNA は指数関数的に増幅される。さらに、リアルタイム PCR による定量は、しばしば二つの独立した PCR 分析法、すなわち標的 DNA に対するものと分類群特異的 DNA 配列に対するものに基づいている。免疫吸着測定法では PCR と対照的に、当初の各標的分子に対する一層又は複数の抗体層の結合が含まれ、シグナルの増幅はレポーター分子の数と、適用できる場合には酵素反応時間に比例する。

5. 結果の導出が数学的関係に依存する場合には、これを概説し記録すべきである（例えば $\Delta\Delta C_t$ 法、又はその他の方法によって得られる回帰線や較正曲線）。また、モデルの正しい適用に関する指示を提供すべきである。そこには分析法に応じて、分析するレベルの推奨数と範囲、ルーチン分析に含めるべき複製及び／若しくは希釈の最小回数、又は適合度を評価するための方法及び信頼区間を含めることができる。

DNA ベースの分析法に必要な具体的情報

6. DNA ベースの分析法については、特に以下の追加情報を提供すべきである。

プライマー対

7. 一般的分析法では、所定のプライマー対及びそれが標的とする配列を提示する必要がある。そのプライマーがスクリーニング及び／又は定量に適しているかを含めて、プライマーセットの効率／使用に関する推奨事項を明示しなければならない。

・アンプリコンの長さ

8. 食品の加工は一般に標的 DNA の分解を招く。増幅産物の長さは PCR 成績に影響を及ぼす可能性がある。したがって、(妥当な範囲内で) 短いアンプリコンを選択すれば、高度に加工された食品の分析において陽性シグナルが得られる可能性が高まることになる。一般に、分類群特異的 DNA 配列と標的配列の増幅断片の長さは同様の範囲内にすべきである。

・分析法は機器特異的か、化学特異的か

9. 現在、いくつかの異なった種類のリアルタイム機器と化学が利用できる。これらの機器や化学は、試薬の安定性や加熱・冷却特性など、ランプ速度や PCR の全工程の所要時間に影響を及ぼすさまざまな性能を持つ可能性がある。

10. 加熱・冷却システムの相違に加えて、蛍光の誘導とその後の記録に使用される技術とソフトウェアの相違も存在する。また蛍光の検出と定量も、使用される記録装置やソフトウェアに応じて変化する可能性がある。定性法は一般に、定量法に比べて機器特異性が低い傾向を持つ。

11. 分析法は一般に機器及び化学に依存し、評価及び／又は変更を行わずに他の機器や化学に転換することは不可能である。

・単一又は多重 PCR 増幅が行われているか

12. 単一反応に複数のプライマーセットを使用することを多重 PCR と言う。

13. 提供する情報においては、試験所間での移転可能性に関する分析法の堅牢性を立証すべきである。つまり、分析法はそれを開発した試験所に加えて、他の一つ以上の試験所によって試験される必要があるということである。それは、分析法のバリデーションを成功させるための重要な前提条件である。

タンパク質ベースの分析法に必要な具体的情報

14. タンパク質ベースの分析法については、以下の追加情報を提供すべきである。

アッセイの適用性

15. 食品の加工は一般に標的タンパク質の分解又は変性を招き、それが免疫反応を実質的に変化させる可能性がある。免疫測定法は、加工製品中の標的への適用性について評価を受けるべきである。加工食品中の標的に対する分析法の適用性を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

フック効果

16. 抗体ベースの側方流動装置やプレート形式のアッセイでは、フック（飽和）効果が偽陰性結果をもたらすことがある。作用濃度範囲が標的分析試料の現実的な必要を十分に満たすことを、徹底的に立証する必要がある。したがって、標的基質におけるフック効果を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

確認法

17. 免疫測定法については、抗体が基質中に存在する他のタンパク質と交差反応する可能性があるため、測定法の選択性を立証する必要がある。確認法として別の方法も利用できる。既知濃度の同じ分析試料のアリコートを用いて両方の分析法を試験することで得られる経験的結果を提示できる。

分析法の性能に関する情報

選択性試験

18. 動物及び植物由来物質、異種系統、又は標的 DNA 配列など、使用すべき適切な陰性対照が定義されている場合には、分析法はその使用について明確にしなければならない。

19. 非標的種／変種からの DNA 及び標準種／変種材料からの DNA で分析法を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。この試験には、感度の限界が正確に試験されるよう、密接に関係する材料及び事例を含めるべきである。さらに、特に分類群特異的 DNA 配列に関しては、偽陽性が出る可能性を低下させるため、類似した食品のその他のソースを試験することが適切と考えられる。

20. 同様に、タンパク質法については、非標的及び密接に関係する種／変種／形質、精製標的タンパク質、及び／又は標準陽性対照物質からのタンパク質を用いて分析法を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

安定性試験

21. 必要に応じて異種、亜種、変種、栽培品種、動物系統、又は微生物菌株を用いて、(標準及び標的 DNA 配列の両方、又はタンパク質を検出するための) 分析法を試験することで得られる経験的結果を、例えば分類群特異的遺伝子 DNA のコピー数や配列保存の安定性、又はタンパク質発現の安定性を立証するために提示できる。

22. タンパク質法については、必要に応じて標的物質及びその派生/加工製品を用いて分析法を試験することで得られる経験的結果を、タンパク質の免疫反応型の安定性を立証するために提示すべきである。

感度試験

23. 分析法の感度を試験するために異なった濃度で分析法を試験することにより得られる経験的結果を提示すべきである。検出限界 (LOD) は、単一成分のみで構成された試料を用いて明らかにできる。多成分で構成される食品については、抽出される DNA の総量が二つ以上の成分に由来するため、開始時の実際の測定量が減少することから、実際の感度は低下することになる。

24. 必要であれば、各分析法及び基質について LOD を測定すべきである。

堅牢性試験

25. 分析法のパラメータの小さいが意図的な変動に対して分析法を試験することで得られる経験的結果を提示すべきである。

抽出効率

26. 各基質における抽出効率について分析法を試験することで得られる経験的結果を、抽出が十分かつ再現可能であることを立証するために提示すべきである。定量的検出については、不完全抽出の較正方法を提示する必要があるだろう。

分析法の実用性

適用性

27. 分析法を適用できる基質 (例えば加工食品、原料等)、試料の種類、及び範囲を提示すべきである。また、分析法の関連する限界についても説明すべきである (例えば他の分析対象成分による干渉、又は特定の状況には適用できないことなど)。限界には可能な限り、費用、機器、オペレーター

及び／又は環境のいずれかにまつわる特異的及び非特異的リスクによって生じ得る制約も出来る限り含めることができる。

分析法の操作特性と実行可能性

28. 分析自体と試料調製に関して、分析法を適用するために必要な機器を明示すべきである。また、費用、現実的な困難、オペレーターにとって重要性を持ち得るその他のあらゆる要素に関する情報も提供すべきである。

実験デザイン

29. ラン、試料、複製、希釈等の数に関する詳細を含めて、実験デザインを提示すべきである。

オペレーターの技能要件

30. 提案された分析法を正確に適用するために必要な実用的技能について、説明を提供すべきである。

分析対照

31. 可能であれば、分析法の適用に際しての対照の適切な使用を示すべきである。対照は明確に指定し、その解釈を記録すべきである。これらには、陽性対照と陰性対照、その詳細な内容、それらが使用されるべき範囲、及び得られた値の解釈を含めることができる。

32. 以下を提示すべきである。

- 使用される分析対照の種類
 - i. 陽性及び陰性対照
 - ii. 適用できる場合には、使用される内部対照（競合的又は非競合的）
 - iii. 基質対照（PCR に試料が添加されたことを確認するため）又は抽出処理など、その他の種類の対照
- 対照試料
- 使用される標準物質

分析法の性能

33. 分析法がその意図された目的に適合することの全般的評価とともに、セクション 2.2、「分析法の一般基準」に記載された基準に関するデータを提供すべきである。

付属文書 II：定量的 PCR 法のバリデーション

はじめに

1. DNA ベースの分析は一般に PCR を用いて行われる。この技術は、特定の DNA 断片を機器によって（例えば蛍光分析による手段を用いて）測定可能な量まで増幅する。食品加工作業（例えば加熱、酵素、機械的せん断）は、DNA の分解又は総量の減少を招く可能性がある。分析法は、可能であれば相対的に短い標的特異的又は分類群特異的 DNA 配列を増幅すべく設計されるべきである。

2. 定量的決定は、分類群特異的 DNA 配列に対する標的特異的 DNA 配列の割合によって示されることが多い。このような相対的定量試験では実際に、PCR ベースの二つの測定が含まれることになる。すなわち、標的特異的 DNA 配列の測定と、内在性又は分類群特異的配列の測定である。これらの測定にはそれぞれ特有の不確かさがあり、この二つは異なった測定特性を持つことが多い。ほとんどの適用では、標的 DNA 配列は低濃度で現れ、分類群特異的 DNA 配列はその 10~1000 倍の濃度で現れることになる。したがって、両方の測定に適切なバリデーションが重要である。測定結果をパーセンテージとしてそのまま表示する場合には、分析法のバリデーションに際してこれらの要素を考慮すべきである。コピー数などのその他の測定単位でも結果を報告することができる。

3. 結論を言えば、DNA、特に加工食品中の DNA の分析は、多くはナノグラム/グラム範囲以下の極めて少量の標的特異的 DNA の検出を目的とする。定量 PCR 分析の結果は、特定の食品基質における比較分類群/種 DNA の総量に対する標的 DNA の相対量として%で示されることが多い。食品基質には、他の多くの種/分類群の DNA も相当量含まれている可能性がある。

4. 分析法のバリデーションは二つの段階で構成される。第一段階は、再現性を除く上記すべてのパラメータの試験所内バリデーションである。第二段階は共同試験で、その主な成果は反復性及び再現性の測定と、試験所間での分析法の移転可能性に関する詳細な情報である。大規模な試験を実施する費用が発生する前に、小規模な共同試験を通して特定の分析法の一般的な堅牢性を試験することが強く推奨される。分析法又はその説明に改善を要する場合、予備試験の実施によって生じる費用は限られているが、分析法の説明が曖昧であるために試験所間で行われる完全な分析法のバリデーションが失敗に終われば、極めて大きな損失が生じることになる。さらに、既にバリデーションされた分析法をある試験所で実施する場合には、実施される分析法がローカル条件下でも試験所間分析法バリデーションでの性能と同じ性能を発揮することを確認するための必要な実験を含めなければならない、との指摘もあるだろう。分析法が実行される条件を用いて分析法をバリデーションすべきことに留意することが重要である。

バリデーション

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

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

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

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

適用性

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

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

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

ダイナミックレンジー定量範囲

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

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

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

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

検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ)

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

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

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

ある。定量的 PCR の分布測定は正規分布しないことから、LOQ は実験的に測定する必要がある。

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

実行可能性

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

反復性標準偏差 (RSD_r)

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

再現性標準偏差 (RSD_R)

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

堅牢性

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

24. 堅牢性試験の妥当性は分析法ごとに立証される必要がある。例えば、リアルタイム PCR 法については、理想的には以下の要素とその起源/出所を考慮すべきである。すなわち、さまざまな熱循

環器モデル、DNA ポリメラーゼ、ウラシル N グリコシラーゼ、塩化マグネシウム濃度、フォワード及びリバース側プライマー濃度、プローブ濃度、温度プロファイル、時間プロファイル、dNTP（適用できる場合には dUTP を含む）濃度である。

感度

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

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

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

選択性

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

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

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

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

ばならない。

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

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

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

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

真度

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

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

付属文書 II の参考文献

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

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

Chapela MJ、Sotelo CG、Pérez-Martín RI、Pardo MA、Pérez-Villareal B、Gilardi P、及びRiese J (2007年)。「種の同定のために缶詰のマグロの筋肉からDNAを抽出する方法の比較」。 *Food Control.* 18(10):1211-1215。

Horwitz E、「分析法の性能試験の設計、実施、及び解釈に関するISO/AOAC/IUPAC統一プロトコル (1995年)」。 *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343。

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

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

Turci M、Sardaro MLS、Visioli G、Maestri E、Marmioli M、及びMarmioli N (2010年)。「各種トマト製品のトレーサビリティのためのDNA抽出法の評価」。 *Food Control.* 21(2):143-149。

付属文書 III : 定性的 PCR 法のバリデーション

はじめに

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

偽陽性率

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

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

偽陰性率

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

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

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

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

堅牢性

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

付属文書 IV : タンパク質ベースの分析法のバリデーション

定量試験

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

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

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

標準物質

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

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

タンパク質ベースの定量法のバリデーション

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

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

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

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

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

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

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

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

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

検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ)

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

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

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

交差反応性

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

マトリクス効果

19. 分析法の反応が最終抽出物中の特定のタンパク質分析対象成分以外の物質によって影響を受ける場合、その非特異的反応をマトリクス効果と呼ぶ。マトリクス効果を管理する方法の一つは、抽出物中に試料基質が存在するか否かに関わらず、分析法が同様の結果を生むと立証することである。このアプローチでは、アッセイが使用されるあらゆる基質においてマトリクス効果を受けないことを立証する必要があるだろう。マトリクス効果を管理するもう一つのアプローチ（比較的望ましくないが）は、分析対象成分を含まない基質からの抽出物で標準溶液を作成することであると考えられる。これにより、標準と試料の間のマトリクス効果の一貫性が保証されることになる。

堅牢性

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

定性試験

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

タンパク質ベースの定性法のバリデーション

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

適用性

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

24. タンパク質の抽出はタンパク質法の性能における重要な要素となることがあり、また使用される緩衝液も検出段階の性能に影響を及ぼす可能性がある。したがって、タンパク質検出法の信頼性を

確保するためには慎重な最適化が必要である。分析法について LOD の測定基準を設定すべきである。定性分析の LOD を確認するには、LOD を超えるもののそれに近い基準を使用量の一つが満たしている限り、LOD に近い添加量を使用することができる。こうした手順は分析法の性能の目安となり得るが、よく知られた特性を持つ実試料（入手可能な場合）は、分析法の適用性を立証するのに最適な基質である。

実行可能性

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

付属文書 IV の参考文献

Grothaus GD、Bandla M、Currier T、Giroux R、Jenkins GR、Lipp M、Shan G、Stave JW、及び Pantella V.(2006 年)。「農業バイオテクノロジーにおける分析ツールとしての免疫測定法」。AOAC International 89:913-928。

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

Horwitz E。「分析法の性能試験の設計、実施、及び解釈に関する ISO/AOAC/IUPAC 統一プロトコル (1995 年)」。 Pure and Applied Chemistry 67:331-343。

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

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

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

Rogan GJ、Dudin YA、Lee TC、Magin KM、Astwood JD、Bhakta NS、Leach JN、Sanders PR、及び Fuchs RL (1999 年)。「Roundup Ready (R) 大豆中の 5-エノルピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素を検出

するための免疫診断法」。Food Control 10(6):407-414。

USDA (2004 年)。米国農務省/穀物検査局指令 9181.2。

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

付属文書 V 定量的 PCR 法の分析対照の許容基準及び結果の解釈

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

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

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