

## 1. 妥当性確認とは

FBI の DNA 分析方法に関する技術作業部会(SWGDAM : Scientific Working Group on DNA Analysis Methods)

「妥当性確認とは科学界によって以下の必要な情報を得るプロセスである」

- (a)信頼できる結果を得るための手順の能力を評価する。
- (b)信頼できる結果を得ることができる状況を決定する。
- (c)手順の限界を定義する。



- (a) 品種の遺伝子型を正確に検出するためのマニュアルの能力を評価する。
- (b) 品種の遺伝子型を正確に検出することができる状況を決定する。
- (c) マニュアルに従った検査で品種の遺伝子型を正確に検出できる範囲を定義する。

## 2. 妥当性確認のガイドライン(要約)

妥当性確認ガイドラインの構成を「事前確認事項」「試験室間共同試験」「予備試験」の3つに分けた。

### 事前確認事項（試験室間共同試験をおこなう前に確認する事項）

#### A. 分析する植物の情報

- a. 品種内多型・・品種内多型の有無を確認
- b. 品種の由来・・供試するサンプルは品種の代表
- c. 基準品種の選定・・SSR 分析におけるアリルの基準となる品種の選定

#### B. SSR マーカーの情報

- a. マーカーの性能・・増幅効率、高い品種間の多型性、識別が容易
- b. マーカーの独立性・・品種識別率に影響
- c. Null 対立遺伝子がほぼ無いことの確認・・マーカーの試験室間共同試験の方法に影響

#### C. DNA 抽出

- a. DNA 抽出法・・再現性良く、PCR に供試するのに十分な DNA を抽出
- b. サンプル部位・・流通部位からの抽出とサンプル部位による差を確認
- c. サンプルの状態・・抽出可能なサンプルの状態を把握
- d. サンプルの保存・・試験の品質・精度の担保のため

#### D. PCR 条件

（サンプル部位ごとに）適した反応コンディション（十分な PCR 産物、非特異反応の有無）

#### E. SSR 分析

- a. PCR 産物の希釈倍率・・目安として提示

- b. 精度の確認・・・同じデータと見なせる範囲の決定基準
- F. 加工品における確認事項
  - a. 抽出される DNA の質と量・・・抽出・PCR の阻害要因への対応
  - b. 混合物・・・混合物からの確認条件
- G. 査読と論文発表の必要性
  - 査読を経て論文発表されていることや技術を発表した論文が複数引用されていることによって、専門家から技術的な信頼性が高いことを認められていることになる。

### 試験室間共同試験（再現性の確認）

- A. 再現性を確認する項目・・・DNA 抽出とマーカー性能
- B. DNA 抽出法の再現性確認・・・PCR に供試するのに十分な DNA の質と量
- C. マーカー性能の再現性確認・・・試験方法 1（アリル）と試験方法 2（ローカス）

### 予備試験（各試験室の技術の習熟やマニュアルの平易化のため）

#### 予備試験における確認事項

- A. 試験室間共同試験の作業行程の確認
- B. 反復分析
- C. 結果判定能力の確認

#### 技術を導入する試験室の確認事項

- A. 基準品種と不明の品種を用いた再現性と精度の試験
- B. 内部、外部または共同で実施される技術の検定試験

## 3. ガイドライン作成段階における検討事項

### 試験室数の考え方

試験室間共同試験に参加する試験室数は、統計学的には 10 試験室以上であることが望ましい（ガイドライン資料 8 参照）が、植物における DNA 品種識別技術は、対象となる植物種が多いことや主産地に地域的な偏りがあることから、共同試験に参加する試験室を確保することが容易ではないと考えられる。このことから以下のような問題が生じると考えられるため、柔軟に設定できるものとする。

- ・ 妥当性確認を経る DNA 品種識別技術の数を抑制する可能性。
- ・ 経験や実績が十分でない試験室や試験者が参加することで、妥当性確認の結果に影響を与える危険性。
- ・ 妥当性確認を促進するためのコスト抑制の必要性。

その一方で、以下のような場合は可能な限り多くの試験室で再現性を確認することが望ましい。

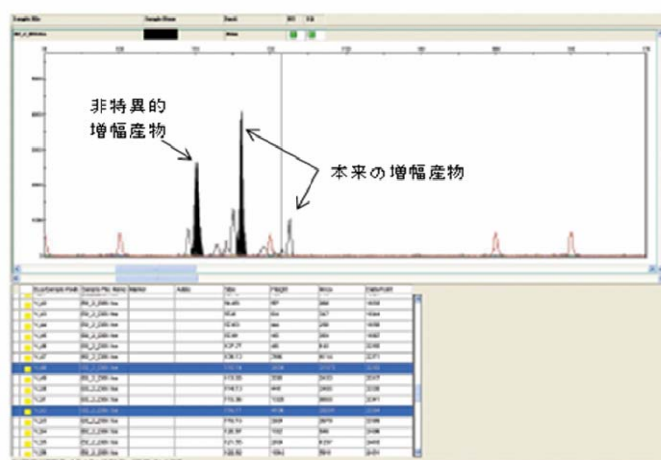
- ・初めて妥当性確認をおこなう技術  
(技術が潜在的にエラーを生じやすい工程等を明らかにするため)
- ・新規のマーカー（複数の論文に発表されている等、信頼性の高いマーカーは除く）

## 潜在的なエラーについて

今回実施したおうとうの SSR による品種識別技術において、以下のような潜在的なエラーと思われる事例が確認された。これらについてはその対応方法とともにガイドラインに記載した。

- ①試験室やシーケンサーの機種および試薬・設定が異なる場合、データ値に差が生じる。  
→対応として、ガイドラインの資料3および4にデータの表示形式等を記載した。
- ②同一サンプルを異なる日に PCR・フラグメント解析をおこなうと、データにズレが生じることがある(ガイドライン資料5)。  
→対応として、比較するサンプルは同じ日に同じランでおこなうことが望ましい旨を記載した。
- ③フラグメント解析のためにセットされたサンプルの内、最初に解析されるサンプルは機械的なズレが生じることがある。  
→対応として、供試サンプルは反復をとることが望ましい旨を記載した。
- ④PCR 産物を凍結保存後にフラグメント解析に供試すると、非特異的なフラグメントが検出されることがある（図：1 参照）。  
→対応として、PCR 後は速やかにフラグメント解析をおこなうことが望ましい旨を記載した。

②～④のエラーは当初予想していなかったエラーであったことから、このような潜在的なエラーの可能性を洗い出すためにも、初めて妥当性確認をおこなう技術については、可能な限り多くの試験室で再現性を確認することが望ましい。



図：1 非特異的な増幅

## 本ガイドラインの適用範囲

SWGDM のガイドラインでは、妥当性確認を DNA 分析法の開発時にいくつかの試験室でおこなうもの（Developmental Validation）と、開発した DNA 分析法を利用したい試験室に導入する際に行う妥当性確認（Internal Validation）とに分けて記載されている。これは、DNA 鑑定の技術は Developmental Validation を経たものであっても、実施する試験室や試験者がその技術に対する経験や専門知識が十分でなければ正しい結果が得られない可能性が他の技術に比べて高いことを示唆していると考えられる。

一方、AOAC のガイドライン等の食品分析における化学分析法の妥当性確認では、Internal Validation に相当する作業は検証（method verification）といい、妥当性確認とは区別している。

本ガイドラインにおける妥当性確認の適用範囲は、Developmental Validation に相当するものである。Internal Validation については予備試験において若干触れたものの、詳細な項目については設定しないこととした。

これは DNA 品種識別技術においても Internal Validation に相当するものが必要であるが、本来 DNA 分析をおこなう試験室のレベルを担保するには、それだけでは不十分であり、試験室の認定が必要だからである。そして、試験室の認定をおこなう認定機関が Internal Validation に相当するものを設定することが望ましいと考えられるため、本ガイドラインでは詳細な項目の設定はおこなわなかった。