

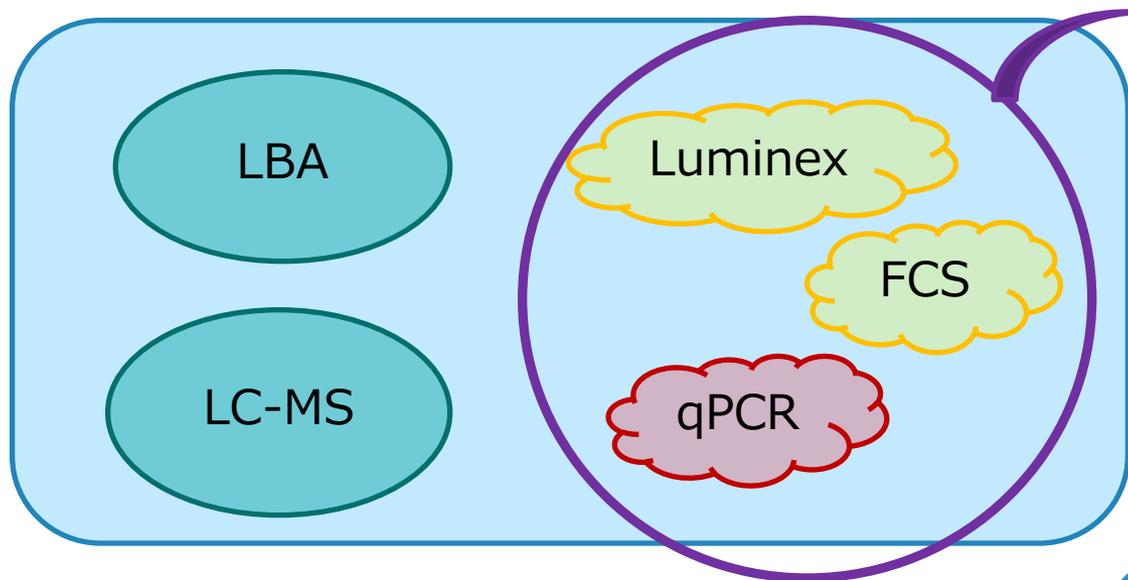
qPCRを用いた定量における バリデーションの考え方

第9回JBFシンポジウム

株式会社新日本科学
内山朝子

小原栄¹、成富洋一²、橋本義孝³、花田雄志⁴、増本真理²、渡辺恭子⁵

¹株式会社新日本科学, ²アステラス製薬株式会社, ³小野薬品工業株式会社,
⁴アスビオファーマ株式会社, ⁵第一三共株式会社



Bioanalysisのツールとしての使用が増えたが、バリデーションに関するガイドライン等が存在しない

目標

バリデーションに関する Discussion Paperの作成

欧米と親和性の高いものを

現実

バリデーションの中身を検討するには、実験方法、数値の取り扱い等に関する「共通認識」が不足している

まずは、ツールとしてのqPCRの特徴、Bioanalysisに用いる際の留意点をまとめる

構成メンバー

氏名	所属
内山 朝子	株式会社新日本科学
小原 栄	株式会社新日本科学
成富 洋一	アステラス製薬株式会社
橋本 義孝	小野薬品工業株式会社
花田 雄志	アスピオファーマ株式会社
増本 真理	アステラス製薬株式会社
渡辺 恭子	第一三共株式会社
中村 隆広 (アドバイザー)	株式会社新日本科学

(50音順)

用語の使用について

qPCR : quantitative polymerase chain reaction
= 定量PCR
= real-time PCR = リアルタイムPCR

Real-time PCR をrtPCR と記載しない
RT-PCR (Reverse Transcription)-PCRと混同する場合がある。

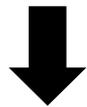
DNAを検出するアッセイ→qPCR
RNAを検出するアッセイ→RT-qPCR } 統一する



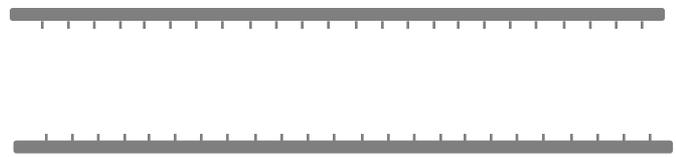
PCRの基本メカニズム



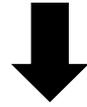
増幅前の標的DNA



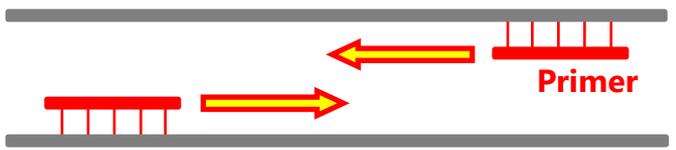
Denature
95 °C



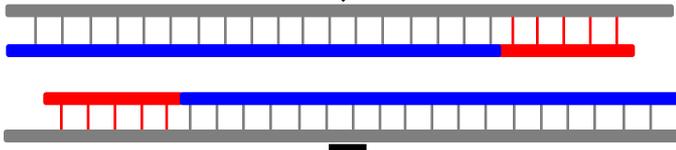
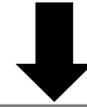
95 °C前後の高い温度で
DNAの二本鎖を解離



Annealing/
Extension
60 °C



温度を下げることでプライ
マーが結合し、60 °C前後で
酵素反応により相補鎖が伸長



標的DNAが2倍となる

1サイクル

qPCRでは、これらのDNAが
蛍光として検出される

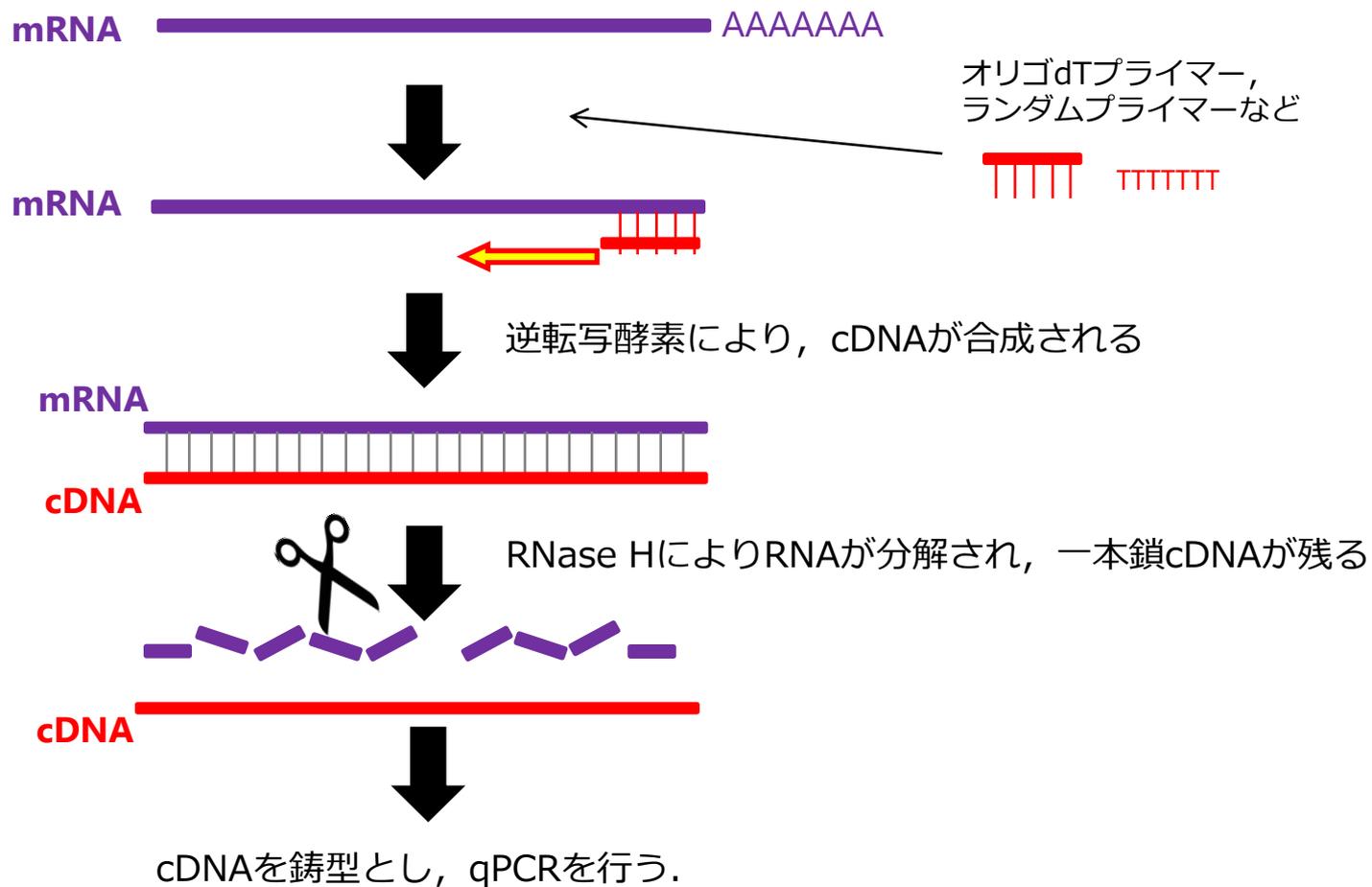
Nサイクル繰り返すことで、
標的DNAを2^N倍で増幅することができる

<http://bioanalysisforum.jp/>

RT-qPCRの基本メカニズム

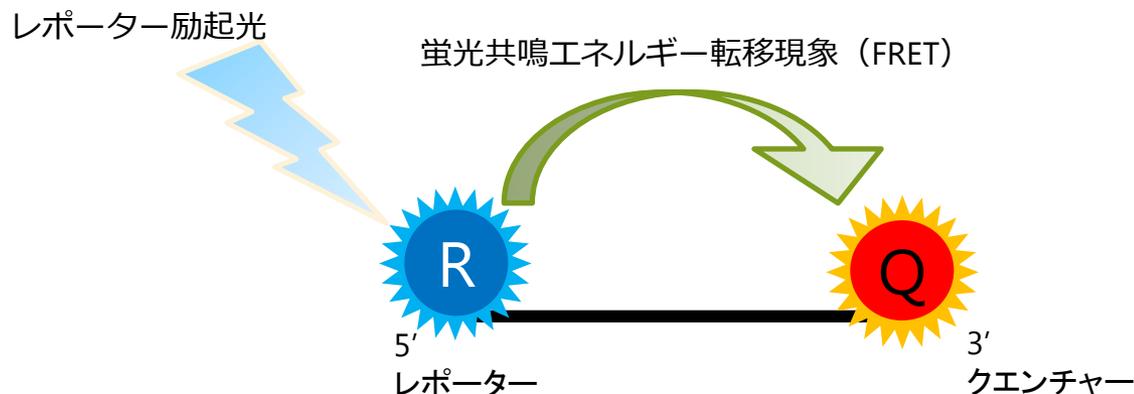
発現定量、RNAウイルス定量を行う場合は、
標的がRNAとなる

➡ 逆転写のStepが必要

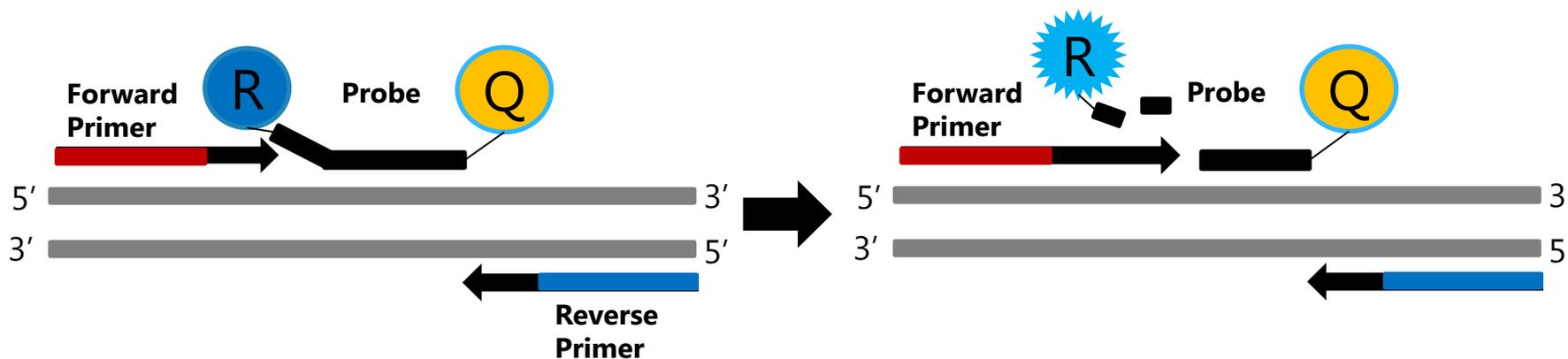


蛍光検出—加水分解Probe

①通常は、FRETによってレポーターの蛍光は吸収されている。



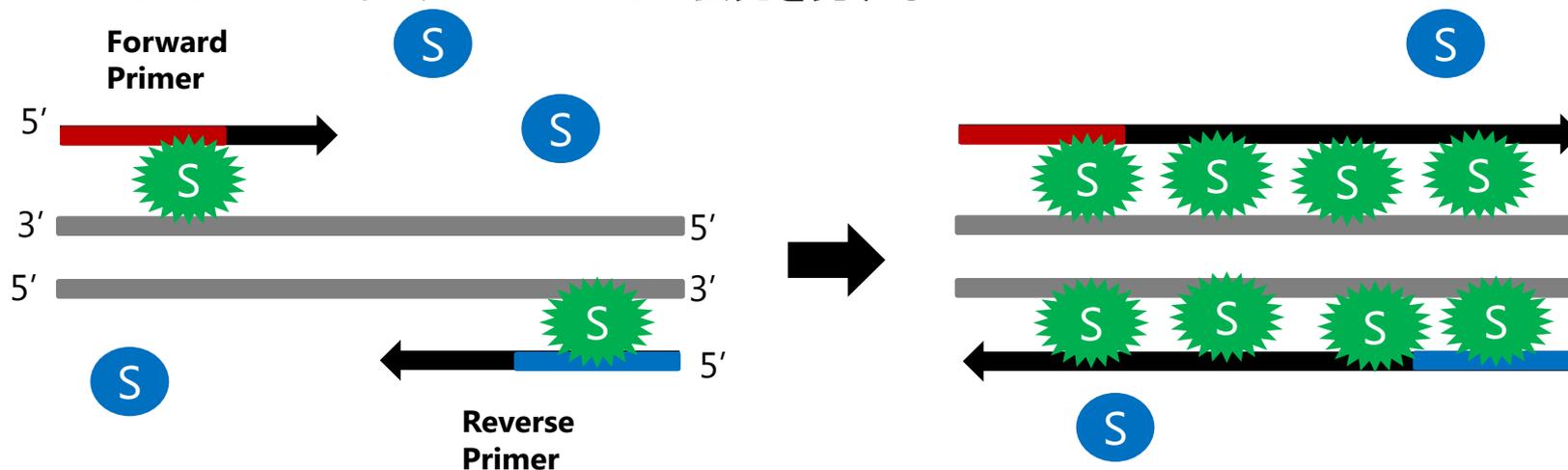
②伸長反応によりプローブが加水分解されることで蛍光を発する。



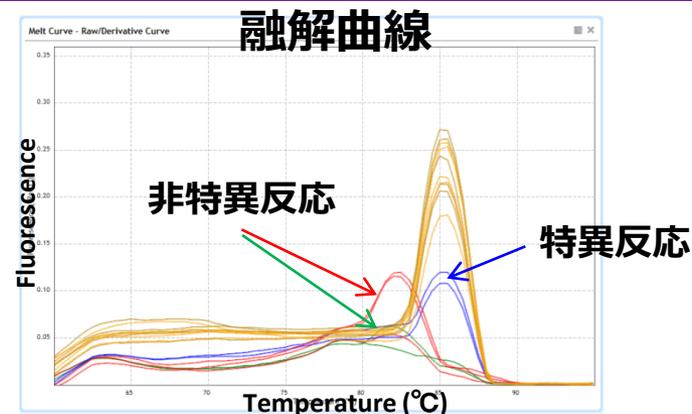
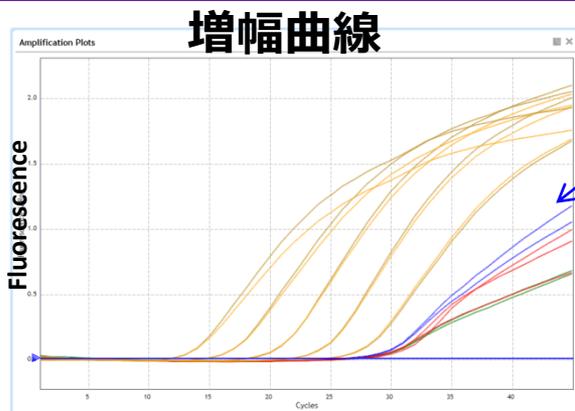
プローブには特異的塩基配列を用いるので、標的に対する特異性が高い

蛍光検出—SYBR Green

SYBR GreenがDNAにインターカレートして蛍光を発する



dsDNAを非特異的に検出するため、標的であることを確認するために融解曲線解析も必要

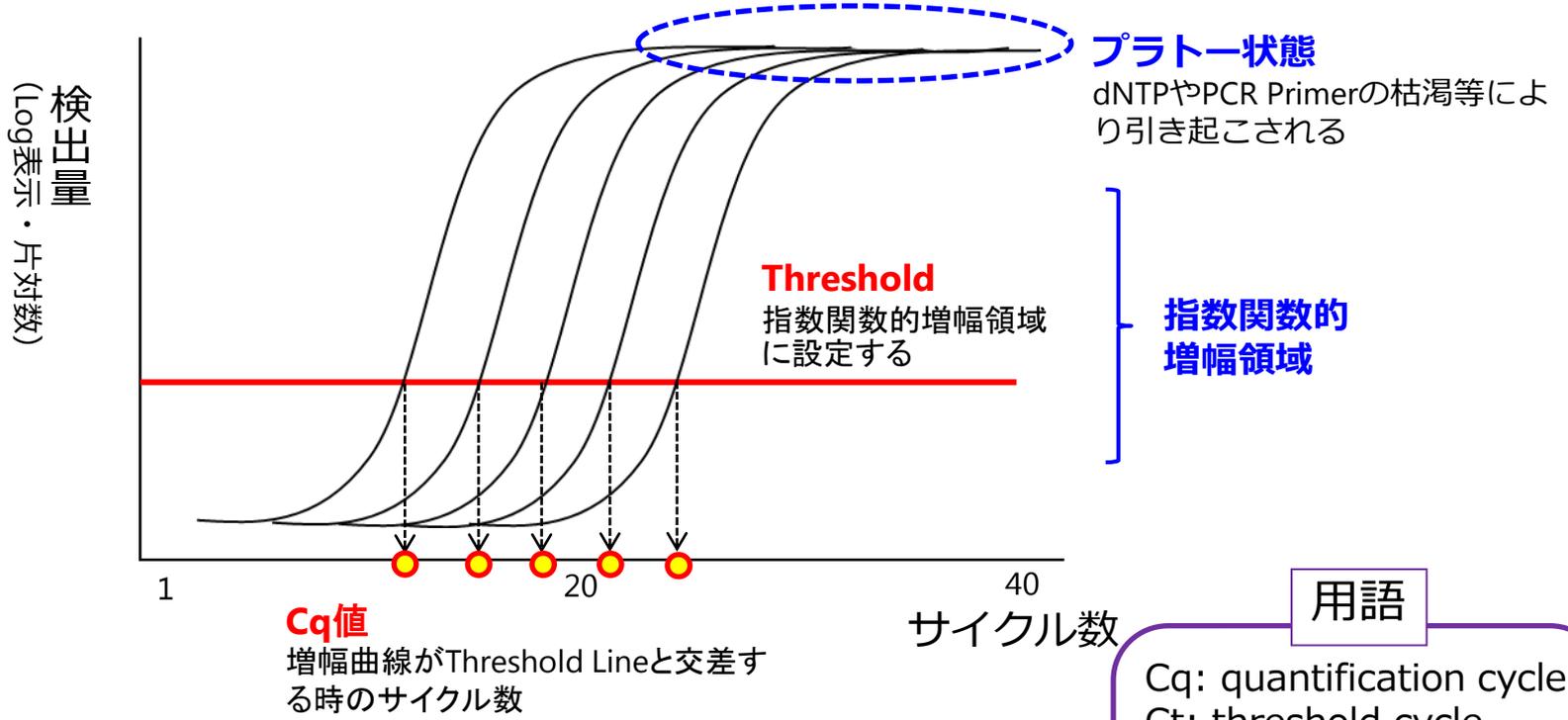




データ解析方法

増幅曲線 (Amplification Plot)

サイクルごとの蛍光シグナルをプロットしたもの



理論的には元のサンプル量に2倍の差がある場合、1サイクル違いで増幅曲線が得られる。

用語

Cq: quantification cycle
 Ct: threshold cycle
 機器メーカーによって異なる呼称

ここではCqに統一

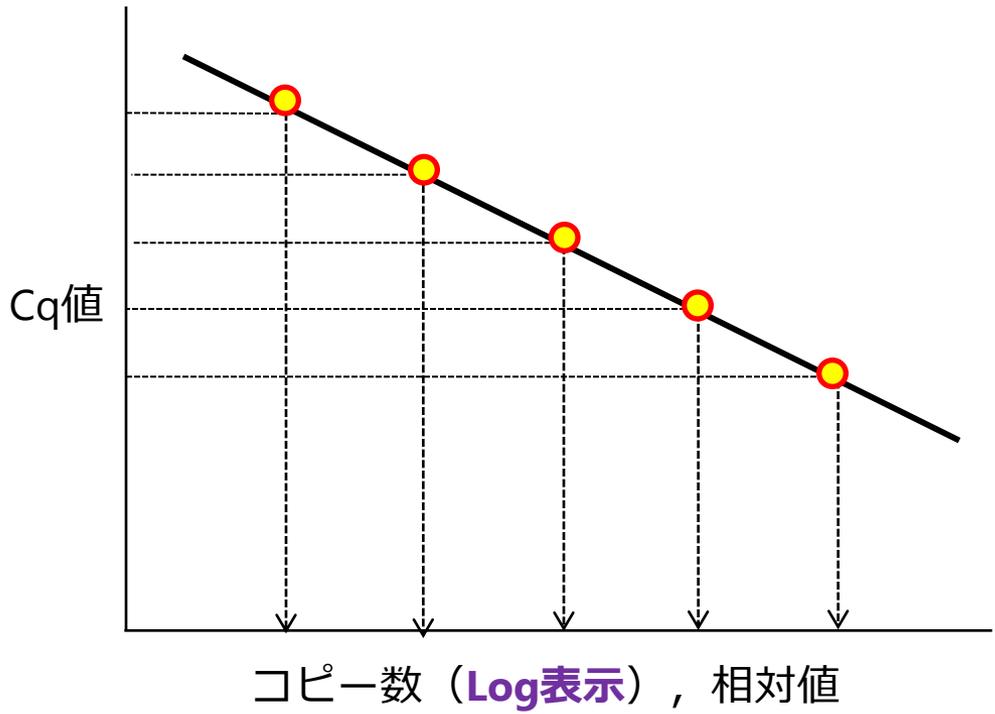
http://bioanalysisforum.jp/



データ解析方法

検量線 (Standard Curve)

検量線試料のコピー数や相対値に対するCq値をプロットして作成



理論的には元のサンプル量に2倍の差がある場合, 1サイクル違いで増幅曲線が得られる.



検量線の傾きから, PCR効率を算出できる.

PCR効率 (PCR Efficiency)

$$E \text{ (PCR Efficiency)} = 10^{(-1/\text{slop})} - 1$$

※理論通りに増幅している場合,
 PCR効率=100 %
 検量線の傾き (Slop) \div -3.32

<http://bioanalysisforum.jp/>

Application of qPCR

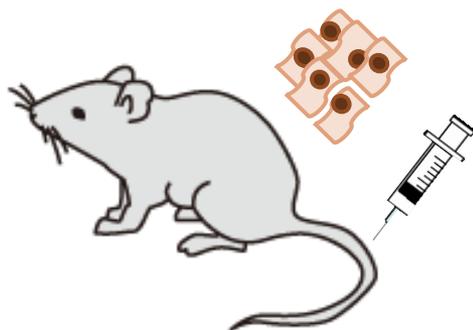
 DGで取り扱うもの

製剤の種類	試験の種類	検出するもの	PCR or RT-PCR	マトリックス
遺伝子治療製剤 (ウイルスベクター、 プラスミド等)	特性試験 (濃度測定)			なし
	体内分布	vDNA or vRNA or DNA ベクターそのもの	PCR or RT-PCR ベクター次第	宿主組織
	排出試験 (排出確認)			尿、糞、血液等
	排出試験 (感染性確認)	vmRNA (ウイルス由来RNA)	RT-PCR	細胞
	遺伝子 発現測定	mRNA (宿主由来)	RT-PCR	宿主組織
核酸製剤	遺伝子 発現測定	mRNA (宿主由来)	RT-PCR	宿主組織
細胞製剤	特性試験 (未分化iPS検出)	mRNA (未分化iPS由来)	RT-PCR	細胞製剤
	体内分布	DNA (細胞製剤由来)	PCR	宿主組織
ワクチン評価	感染実験 (感染防御試験の ウイルスカ価測定)	vDNA or vRNA (ウイルスそのもの)	PCR or RT-PCR (ウイルス次第)	宿主組織

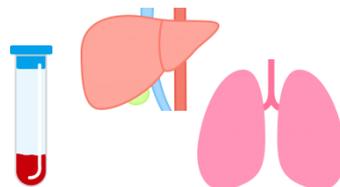
1. qPCR, RT-qPCR共通の留意点
2. RT-qPCRの留意点
3. 試験実施方法
4. 細胞の定量について
5. 実験施設
6. その他注意事項消耗品
7. バリデーションに関するディスカッション

一般的な実験の流れ

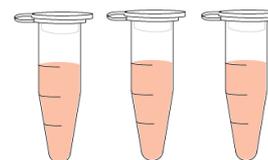
①対象動物に被験物質
投与



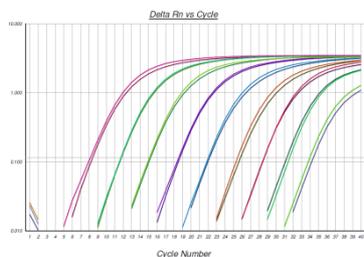
②組織採取



③細かく破碎後、
溶解、核酸抽出



1反応中に同等量の
核酸を添加



⑤qPCR測定
copies/rxnを算出

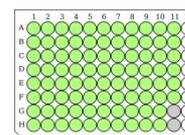
qPCR step

qPCR
DNA測定

RT-qPCR
RNA測定

④濃度測定

cDNA合成
(RT step)



注：qPCRの一番の留意点はコンタミネーションを防ぐこと



1. qPCR, RT-qPCR共通の留意点

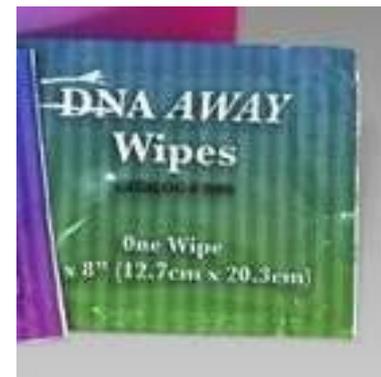
JBFB 組織採取 (Step ②)

留意点

組織中に存在するターゲット遺伝子によるクロスコンタミネーションを防ぐため、組織採取の順番、解剖器具の洗浄に最新の注意を払う。

例：水やDNA awayによる器具の洗浄等

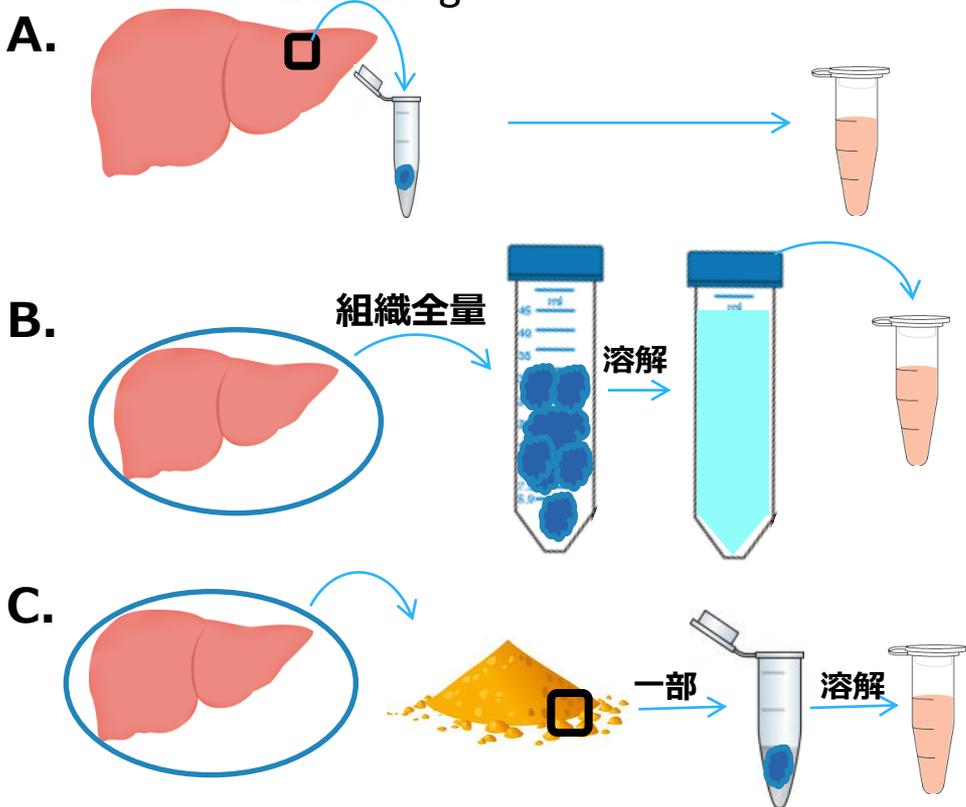
***DNA away の使用過多、サンプルへの混入は逆効果**



JBF 核酸抽出 (Step③)



例:



- 組織の一部を採取し抽出
分布に差がないことの確認が必要
- 全組織を溶解し、その一部から抽出
Pro: 組織内分布に偏りが有っても可
Con: 標的の濃度が薄くなる。経費高。
- 全組織を粉碎し、その一部から抽出
Pro: 組織内分布に偏りが有っても可
経費低。
Con: 標的の濃度が薄くなる。
コンタミリスク高。

組織を丸ごと粉碎

http://bioanalysisforum.jp/



核酸抽出 (Step③)



キット：シリカを用いたカラム法、マグネットビーズ法、フェノール/クロロホルム法等、多数存在。

組織からの核酸抽出の効率は5～100%
(サンプルによって異なり、一定しない)

⇒通常の方法では組織内のターゲット核酸濃度を正確に算出することはできない。

通常、PCRが定量として保証できるのは抽出後の核酸溶液に含まれる核酸の量のみ



http://bioanalysisforum.jp/

問題解決可能か？

例：Internal Standard (IS) の使用

DNA検出の時のみ



IS: ホスト、analyteの遺伝子配列をクロスしない核酸
(ヒト、使用動物以外の遺伝子核酸)

抽出効率算出の可能化により、組織内の標的濃度が算出可

注意点: 実績報告例が限られている。バックグラウンドデータが少ない

核酸濃度測定 (Step④) - 方法

注：通常は1反応に添加する核酸量を一定とすることで抽出効率のバラつきを補正するため、正確な濃度測定が必要。

吸光度法

- OD₂₆₀の吸光度値から算出

Pro: 簡便

Con: DNA vs. RNAの識別不可
タンパク質のコンタミが影響

例： Nanodrop
Nanovue
その他吸光度計

蛍光法

- DNAもしくはRNA特異的に
蛍光で検出

Pro: サンプル中に存在する
analyte以外の物質に影響
を受けない

Con: 使用がまだ一般化されていない

例： PicoGreen
RiboGreen
Qubit

核酸濃度測定 (Step④) - 核酸の質の保証

Q: どこまで求めるべき?

注: 質が悪いと、反応の阻害、核酸の断片化による反応可能な鋳型DNA配列の減少等の可能性が考えられる。

濃度以外に考えられる方法

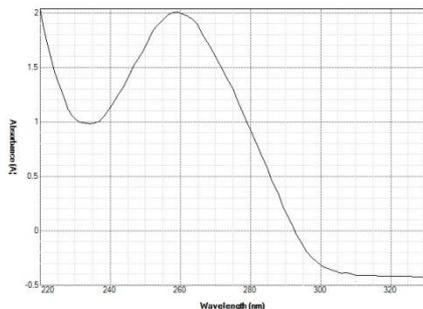
吸光度

OD260/280 : 1.8~2.0

OD230/260 : 2.0~2.2

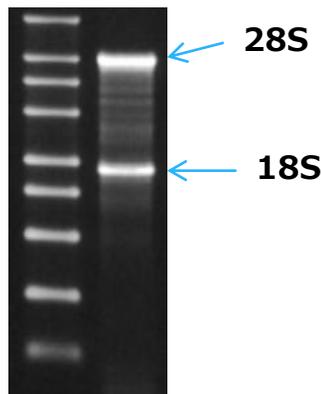
230,280nmで吸光する不純物の混入割合を示す

吸光度クロマトグラム



視覚的に不純物の混入を示す

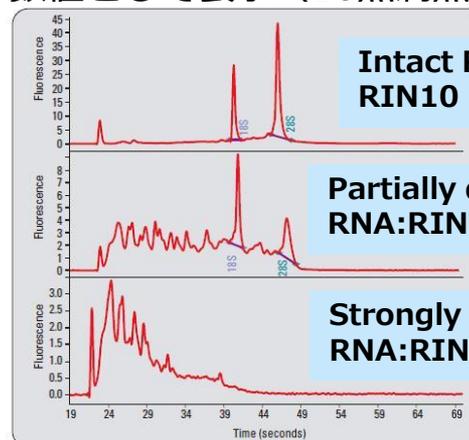
アガロースゲル電気泳動 (RNA)



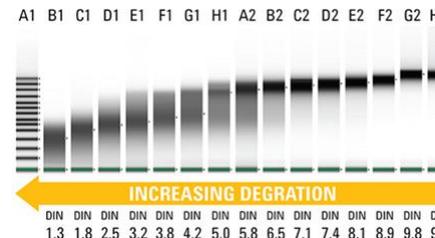
RIN (RNA Integrity Number) DIN (DNA Integrity Number)

電気泳動像から核酸の分解度を自動的に一つの数値として表示 (10点満点)

RIN



DIN



引用: アジレントテクノロジー株式会社データ

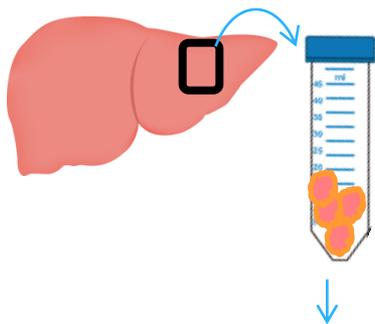
核酸安定性 (After Step④)

Q: 核酸の安定性はどこまで必要? どうやって実施?

1. 抽出されたDNAの安定性評価は可能

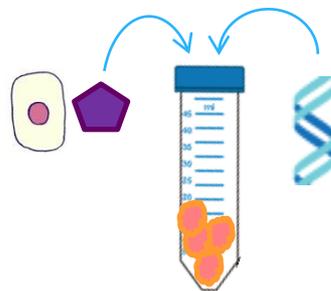
→経時的にqPCR測定することで、安定性保証が可能

2. 組織内核酸安定性?



難点①

この状態で保存することは考えることだが、組織内にターゲットが存在する状態を作るのは難しい?



難点②

抽出効率でもばらつくことを考慮しても難しい?

組織切片に核酸、もしくはウイルス/細胞を添加して凍結保存?

qPCR測定 (Step⑤) - 標準物質

qPCRの標準物質は、絶対定量の場合コピー数が既知でなくてはならないという概念がある。

標準物質の種類

	Pros	Cons
プラスミド	<ul style="list-style-type: none"> 安定性が高い。 大量製造が容易（初期クローニングは必要）。 	<ul style="list-style-type: none"> Analyteとの同等性
合成核酸	<ul style="list-style-type: none"> 配列決定が自由（変異配列に対応可） クローニングの必要無し。 	<ul style="list-style-type: none"> Analyteとの同等性
ゲノム核酸	<ul style="list-style-type: none"> Analyteとの同等性 	<ul style="list-style-type: none"> 安定性が低い 必要量が準備できない可能性大 製造に時間がかかる ロット間差大 コピー数計算の信頼性に問題

一般的にはプラスミドが使用されることが多い。

qPCR測定 (Step⑤) - 標準物質

プラスミドを用いた際の留意点

サイズの大きな環状プラスミドは検量線の直線性が上手く出ないと言われることもある。

制限酵素処理で**直鎖状**にして使用

その場合の留意点：

酵素処理後、DNA精製をし直すか⇒サンプルロスの可能性
精製無し⇒Buffer, 酵素がOD値やPCR効率に与える影響

標準物質の質の保証

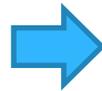
濃度、OD260/280、DIN、HPLC：どこまで必要か。

安定性：試験の前後で標準物質のCq値に変動が無いことを担保できれば良い？

qPCRにおけるマトリックス効果

1. 抽出されたDNAに含まれるPCR反応阻害物質の影響
2. 高濃度核酸がマトリックスに存在することによるprimer/probe, dNTP等の散乱等

1. によるデータへの影響が最も大きい



マトリックス効果はマトリックス濃度由来ではなく、**DNA抽出の質**とマトリックスの**希釈倍率**次第

Q: どうやってマトリックス効果のバリデーションをする?

- ・必要?
- ・もしくは試験時に各サンプルを確認することでバリデーションは必要なし?

検量線へのマトリックスの添加の必要性

マトリックスDNAの有無により検量線データに影響が無いことを示すことができれば、マトリックスDNAの添加の必要は無い？

マトリックスにすべき核酸

抽出された核酸は、由来組織次第で質が違ふことが考えられる

Ex. 皮膚－PCR阻害物質であるメラニンの混入が多い
糞便－PCR阻害物質が多い

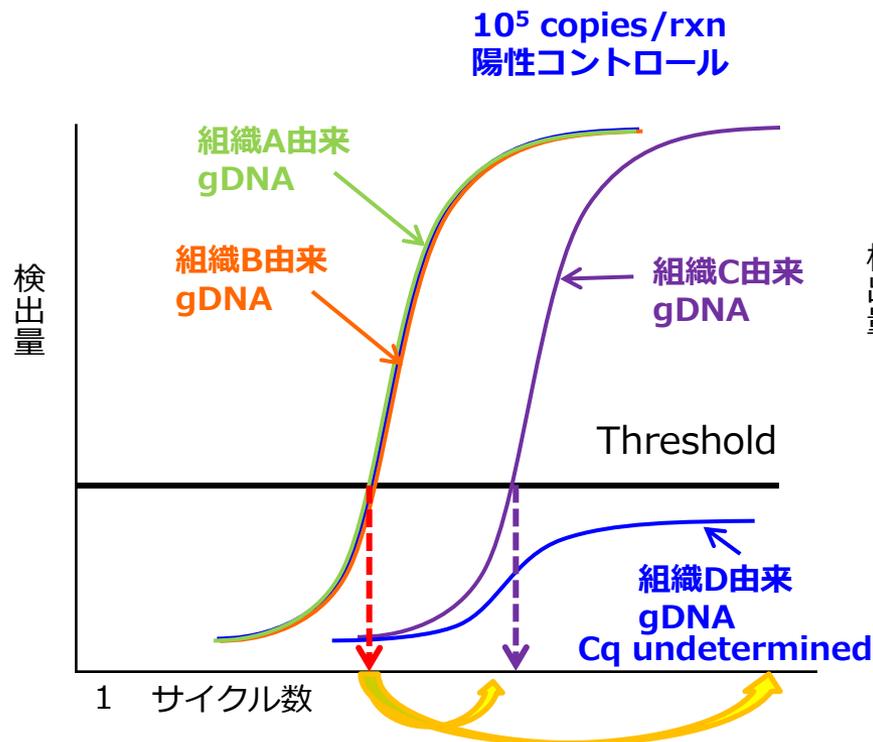
Q : 検量線のマトリックスにはどのDNAを使う？

多臓器を測定する場合、検量線のマトリックスにはどの組織由来DNAが最適か。

Mix vs. 代表組織、動物の系統は揃える？

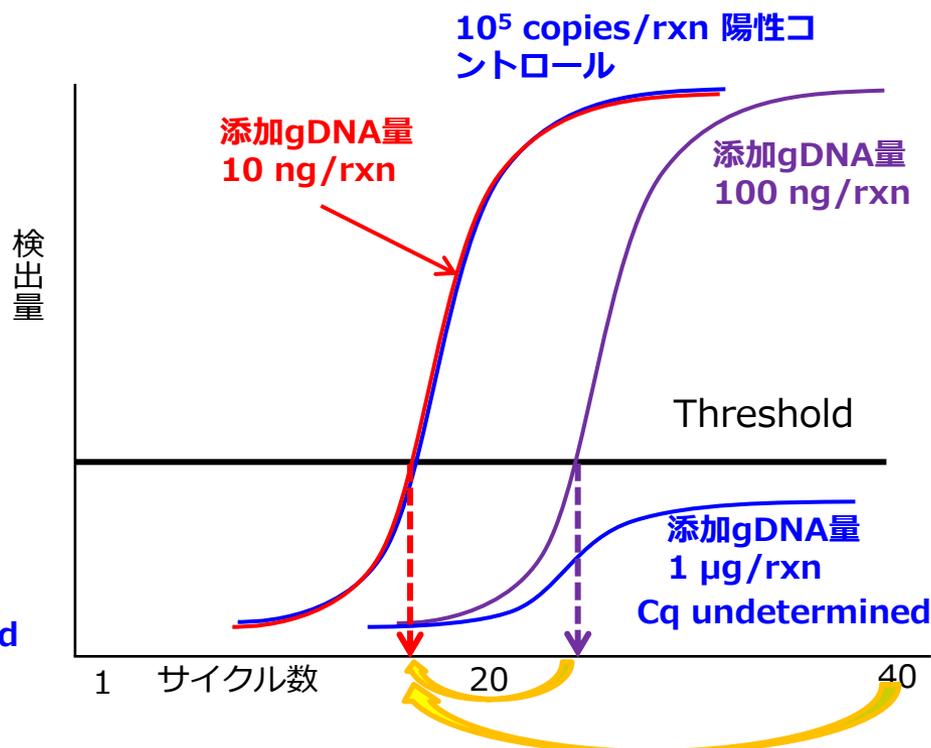
マトリックス効果 (阻害効果) の例 1

例1)各組織由来gDNAに 10^5 copies/reactionの陽性コントロールを加えた場合



通常は陽性コントロールと同じところでCq値が観測されるが、gDNA中に阻害物質がある場合は、Cq値が高くなる、もしくは観測されない。

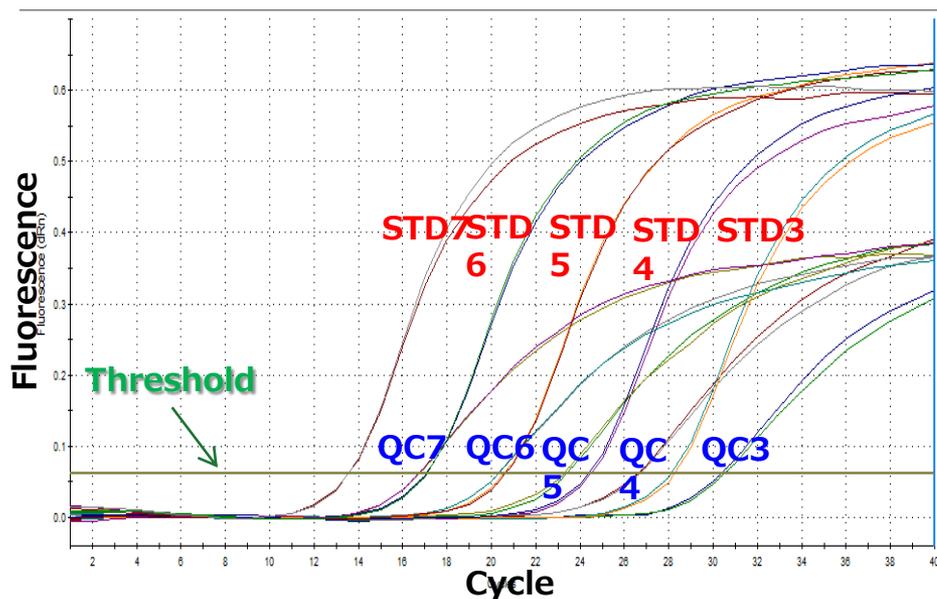
例2)gDNAを希釈することで阻害効果が改善される場合



添加gDNA量が1 µg/rxnの場合、Cq値がND。
100 ng/rxn, 10 ng/rxnになるように希釈すると用量依存的にCq値が回復。
10ng/rxnで理想値が得られる。

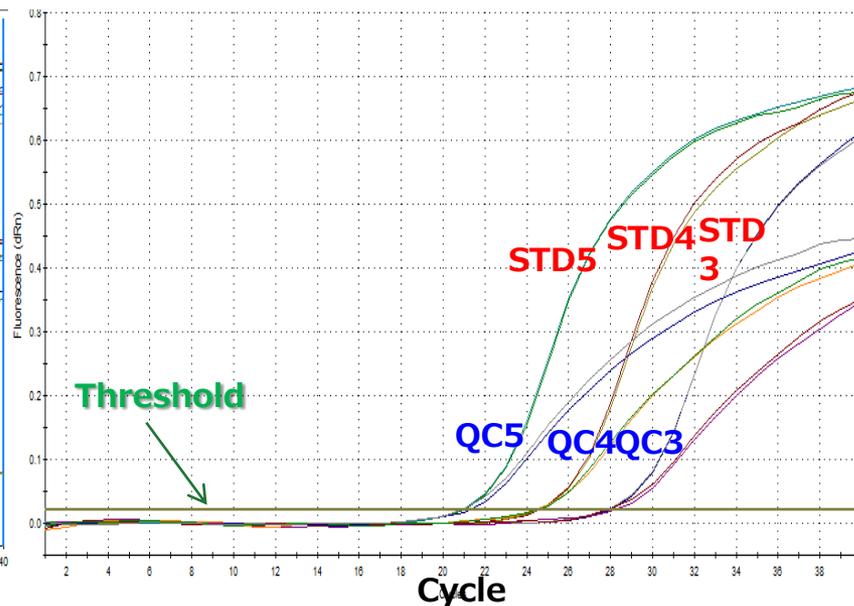
マトリックス効果（阻害効果）の例2

マトリックス効果有判定



Cq値3（約10倍）近い「ずれ」が生じている

マトリックス効果無判定



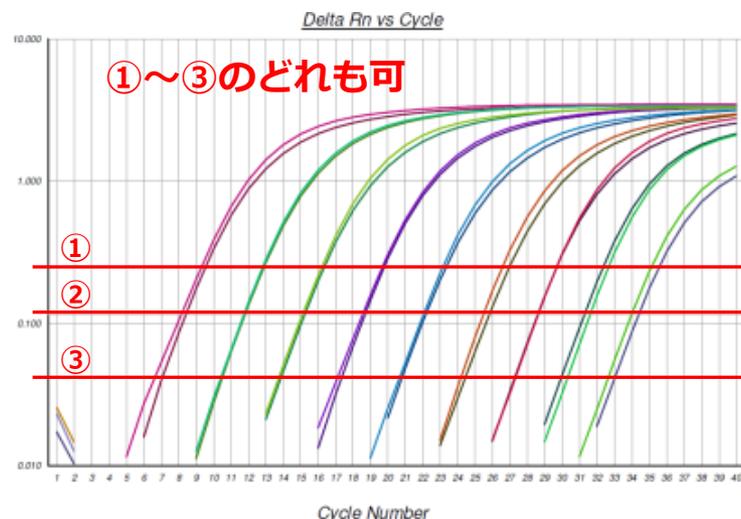
蛍光量に違いは見られるが、Cq値に差が無い

STD: マトリックス無
QC: マトリックス有

qPCR測定 (Step⑤) - Threshold

Q: Thresholdを設定するべきか？

- Thresholdを設定すべきかどうかは、どのガイドラインや手引書にも記載が無い（指数関数的に増幅し、直線でプロットされていればどこでもよい）。
- Auto解析を用い、設定しない場合が多いよう。
- Thresholdをマニュアルで動かせば、Cq値を変動させることができ、基準への適合不可を変えることができる。
- 同一プレート内サンプル間でのCq値の比較や、同一プレート内にある検量線を用いてコピー数換算をする場合には、Auto機能でも問題ない。



Q: バリデーションの適合基準はCq値か、コピー数換算値か？

- qPCRでは、ピペット操作等で発生する許容可能なCq値変動が1.5であることから、適合基準ではCq値を用いて、Cq値変動が1.5以内であれば重要な違いではないとされることが多い。
- Cq値でもコピー数換算値でも良いが、**Thresholdを固定しない場合は別プレート間でCq値の比較ができない。**

Thresholdを固定すれば、別プレート間でもCq値の比較はできる



2. RT-qPCRの留意点

分類	名称	検量線の必要性	特徴	Application
絶対定量		○	コピー数既知の標準物質で作成した検量線を用いて定量	微生物、遺伝子組換え食物の定量
相対定量	Pfaffl法	○	希釈率などの相対値で検量線を作成。そこから得られるPCR増幅効率を用いて比較定量	遺伝子の発現解析
	$\Delta\Delta Cq$ 法	X	基準とするサンプルとのサイクル数の比較で相対的な濃度差を算出	遺伝子の発現解析

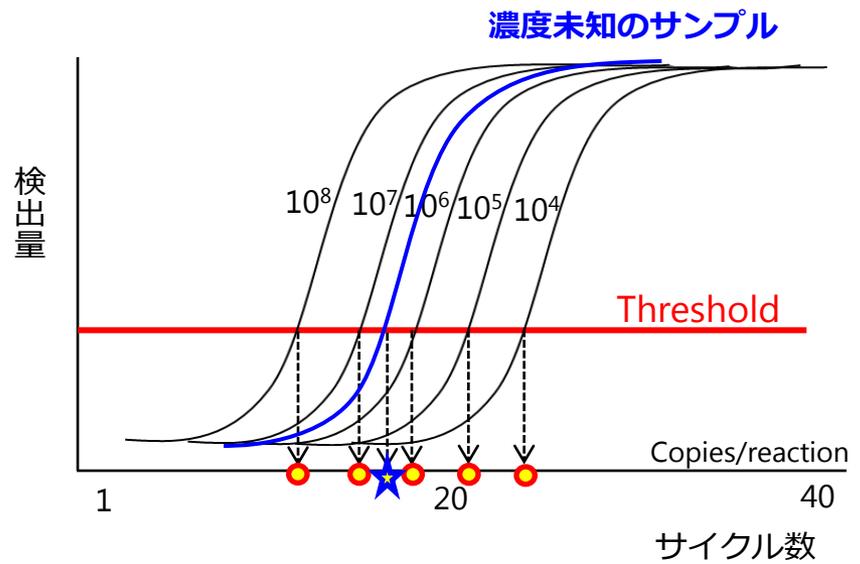


絶対定量

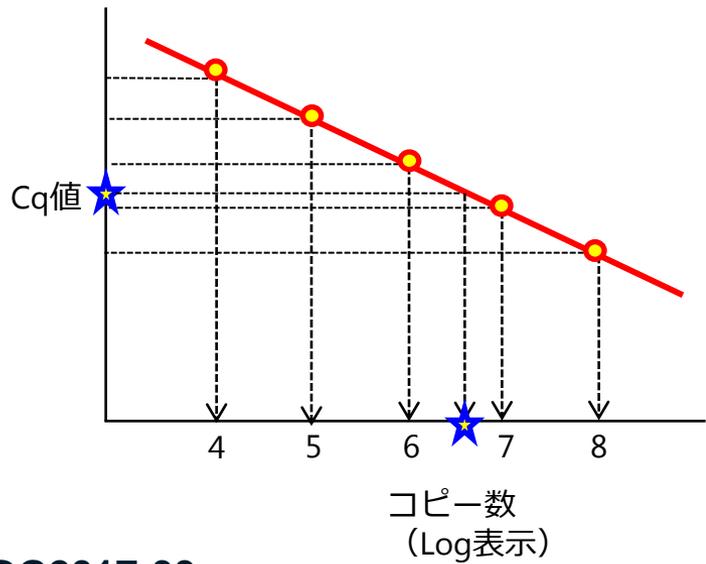
既知のコピー数が含まれるサンプルを使用して検量線を作成する。
検量線に測定サンプルのCq値を当てはめてサンプル中のコピー数を算出する。

主に、DNA定量に使われる。
RTを含まないqPCRの部分を絶対定量する

増幅曲線 (Amplification Plot)



検量線 (Standard Curve)



相対定量 ($\Delta\Delta Cq$ 法)

調べたい遺伝子（ターゲット遺伝子）の量をコントロール遺伝子の量で補正し、サンプルごとに比較することで相対的に定量する。

$\Delta\Delta Cq$ 法

理論的に1サイクルで2倍の差（ n サイクルで 2^n の差）ということを利用し、相対的に定量する。

$$2^{-\Delta\Delta Cq}$$

検量線は用いない

例) サンプルNo.1を基準に相対定量

サンプル	標的遺伝子のCq値 (A)	内在性コントロールのCq値 (B)	ΔCq 値 (A-B)	$\Delta\Delta Cq$ 値 (各サンプルの ΔCq 値) - (No.1の ΔCq 値)	$2^{-\Delta\Delta Cq}$ 乗数項に代入	No.1を基準とした標的遺伝子の発現比較 (内在性コントロールで補正)
No.1	20	16	20-16 =4	4-4 =0	2^{-0} =1	1
No.2	23	17	23-17 =6	4-6 =-2	$2^{-(-2)}$ =4	4

実際、PCR効率が100%ということはないため、 $\Delta\Delta Cq$ 法を用いると結果にずれが生じることが多い



相対定量の場合も、検量線を作成し増幅効率を加味して評価したほうがよい。

$\Delta\Delta Cq$ 法は旧式になりつつある

相対定量 (Pfaffl法)

増幅効率の考え方

増幅効率が100 %の時 = 増幅効率が1の時

$$N \text{ サイクル} \Rightarrow \text{標的DNA } \frac{2^n \text{ 倍に}}{(1 + 100 \%)} = 2$$

増幅効率は系に依存しており、標的によって効率は変わってくる

増幅効率が90 %の時

$$(1 + \text{増幅効率}) = (1 + 90 \%) = 1.9 \Rightarrow \text{標的DNA } 1.9^n \text{ 倍に}$$

10サイクル実施した場合

増幅効率100 %の時 \Rightarrow 標的DNAは 1024 倍に

増幅効率90 %の時 \Rightarrow 標的DNAは 613 倍に

増幅効率の差が
評価に与える影響が大きい

Pfaffl法

標的遺伝子と内在性コントロールそれぞれのPCR効率を加味して相対比を算出する。

$$(1 + \text{PCR効率})^{[Cq(\text{基準サンプル}) - Cq(\text{各サンプル})]} \quad \text{標的遺伝子}$$

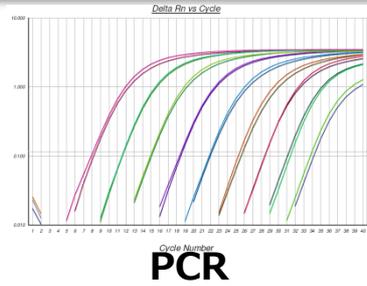
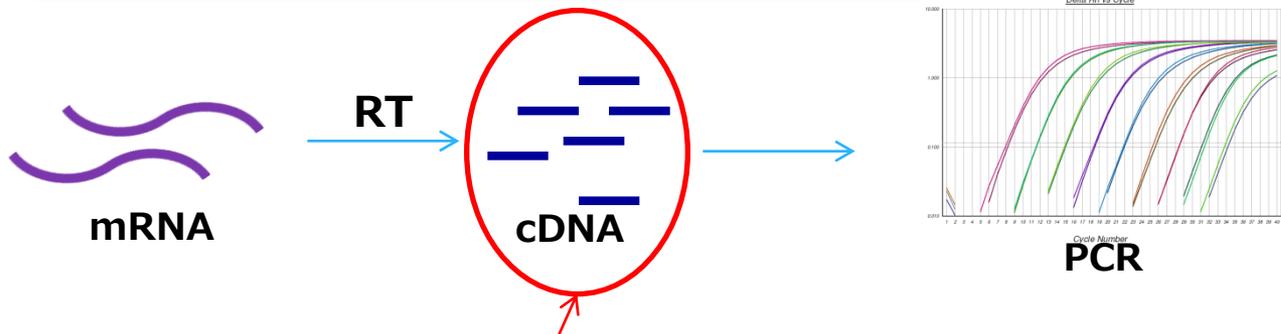
$$(1 + \text{PCR効率})^{[Cq(\text{基準サンプル}) - Cq(\text{各サンプル})]} \quad \text{内在性コントロール}$$

Q : 解析方法は統一すべき ?

Pfaffl M.W., Nucleic Acids Res. 2001 ; 29 (9) : e45



標準物質



RTの効率は一定でない。
標準物質はRNAでなく、DNA

	利点	欠点
プラスミド	<ul style="list-style-type: none"> 安定性が高い。 大量製造が容易 (初期クローニングは必要)。 コピー数既知 	<ul style="list-style-type: none"> Analyteとの同等性
合成核酸	<ul style="list-style-type: none"> 配列決定が自由 (変異配列に対応可) クローニングの必要無し。 コピー数既知 	<ul style="list-style-type: none"> Analyteとの同等性
cDNA	<ul style="list-style-type: none"> Analyteとの同等性 	<ul style="list-style-type: none"> コピー数未知

<http://bioanalysisforum.jp/>

内在性コントロール遺伝子

目的：ターゲット遺伝子の発現量を補正する

- 内在性コントロール遺伝子の発現量は、採取したRNAの品質や逆転写反応の効率を反映する。
- 従来はGAPDHや β -アクチンが用いられてきたが、これらの発現量は変動しているとの報告が多数。

内在性コントロール遺伝子の設定を誤れば、ターゲット遺伝子の発現量を過大/過小評価する可能性が考えられる。

- 注意点：**
1. 標的となる細胞や組織での発現量は適切か
 2. 刺激に対する発現の安定性を検討

論文レベルで
検索/検討

内在性コントロール遺伝子は2~3種類おき、その平均を用いて補正する。

参考資料： *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes:*
Vandesompele et al., 2002. 3(7) Genome Biology 2002.

Quantification of mRNA using real-time reverse transcription of PCR (RT-PCR): trends and problems: Bustin, 2002.29, 23-39. J Mol Endo

3. 試験実施方法

(FDA Gene Therapy Guidanceより)



前臨床におけるqPCRを用いた体内分布試験の実施方法について、FDAより発行された“Guidance for industry: Gene therapy clinical trials -Observing subjects for delayed adverse effect”には、以下3つの記載がある。

1. 定量下限

定量下限は50 vector/μg gDNAであり、この限界が95%の信頼性で検出できること。

Q: 1反応に実際に1μg gDNAを添加するのか

- 通常はPCR1反応中のtotal DNA量は~200ng
- 多量のDNAで反応が上手くいかない可能性
- 小さな臓器からは十分量のDNAが抽出できない可能性
- 多量のgDNA添加でPCR阻害物質の量も増える

➡ 1μg入れる必要は無い

しかし…

50 vector -----1μg gDNA
 5 vector -----100ng gDNA
 0.5 vector -----10ng gDNA

- 95%の確立で検出するのはほぼ不可能
- 95%で検出できる理論的限界値は3Copy* (ポワソン分布の原理)

できるだけ多くのgDNAを加え、導き出された検出限界を報告書に記載

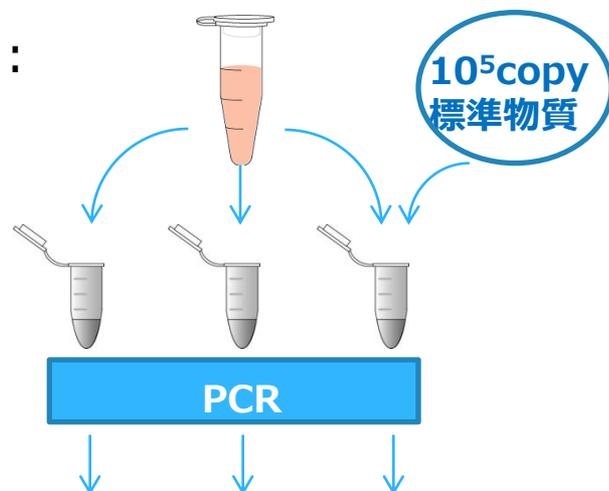
Q: 本当に換算値でOK?

*Ref: The MIQE Guidelines. Bustin et al., 2009. Clinical Chemistry 55:4, 611-622

2. スパイクサンプル (Internal Control, IC)の使用

1組織に対し、少なくとも**3重**で試料を用意し、
1試料に**既知量の標準物質をスパイク**する

例 :



	2.3×10^2 copy	2.3×10^2 copy	1.0×10^5 copy
OK →			
NG →	2.3×10^2 copy	2.3×10^2 copy	1.0×10^3 copy

NGの場合、サンプルを希釈して再測定

Q: なぜここまで必要?

- 結果が陰性、もしくは期待値よりも低かった際に、PCR阻害物質の影響ではないことを確認しなくてはならない。
- サンプルによってPCR阻害物質の混入量が違うことが予想されるため、サンプル毎に保証しなくてはならない。

***ICの使用は他のPCRバリデーションに関する文献にも記載されている**

Ref: Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. Raymaekers et al., 2009. J. Clin Lab anal. 23:145-151.

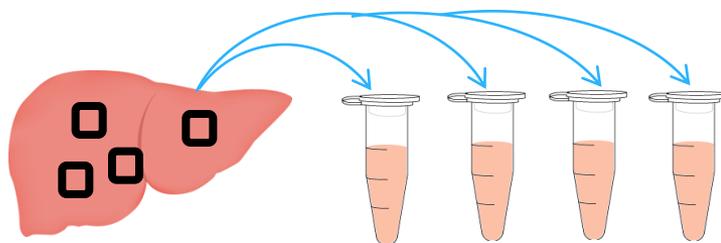
3. 各サンプルのn数

組織全体の大きさと実際に使用するサンプルの大きさを考慮して、各組織でのn数が適切な理由を述べる

安全性試験の一環である体内分布試験の場合、組織における被験物質の「無いことの証明」が必要である。

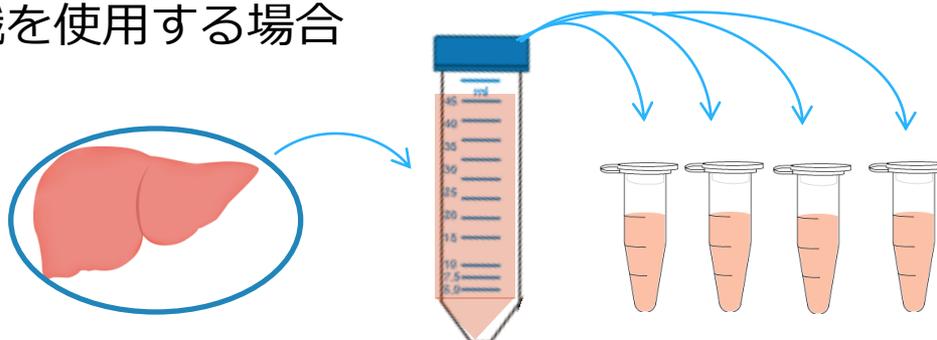
Q: 「無い」というために必要な n数は？

組織の一部を採材する場合



1反応中に標的核酸が含まれる確率をケースバイケースで考える？

全組織を使用する場合

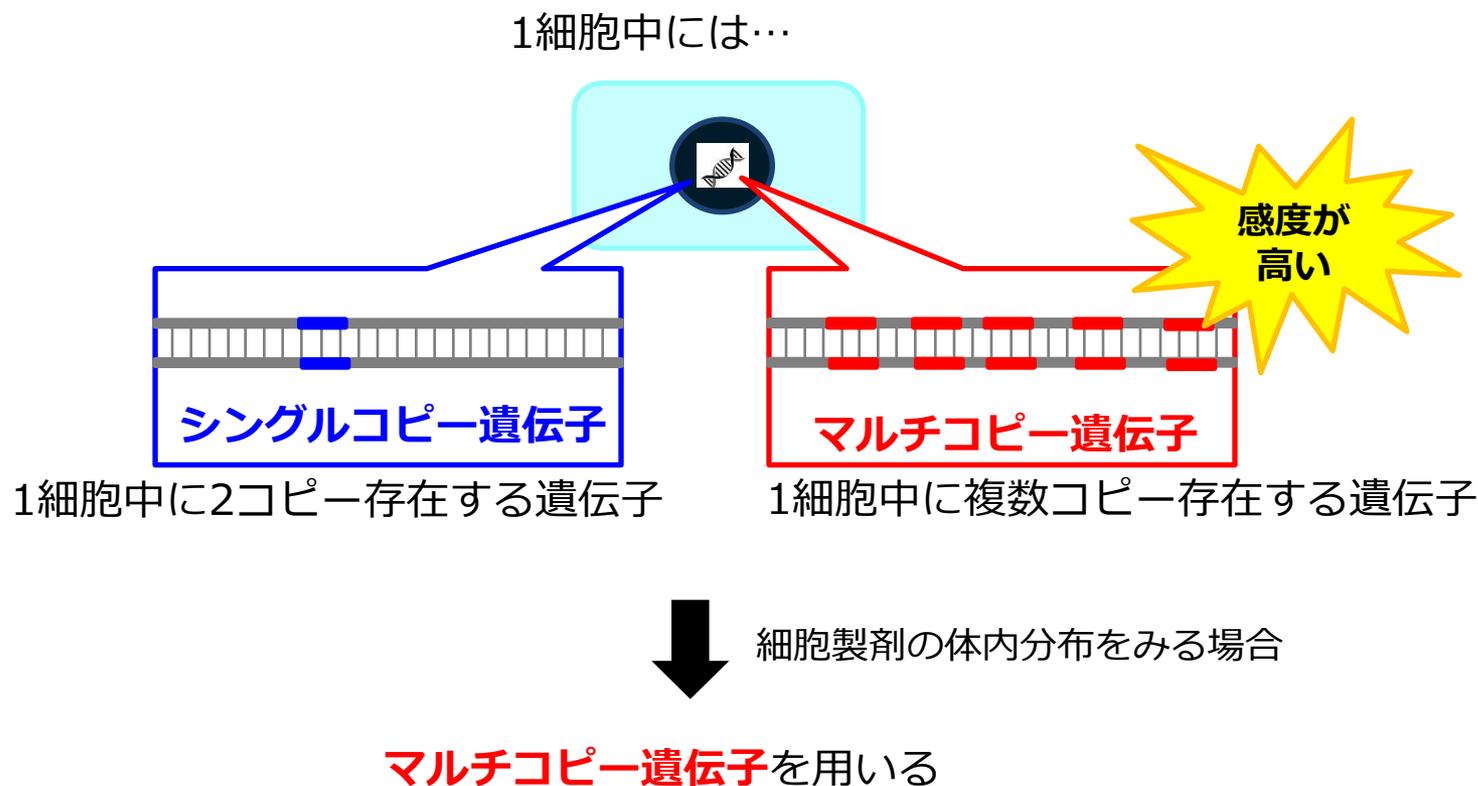




4. 細胞の定量について

細胞加工製品を検出する場合の標的遺伝子

細胞製剤で標的となる遺伝子



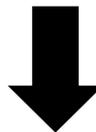
最も研究されている標的配列

Alu配列

細胞製剤をPCRで検出する場合の標的遺伝子として最も研究されている

- ✓ 霊長類に特異的な反復配列
- ✓ 長さ：約300塩基
- ✓ ヒト遺伝子に存在するSINE (short interspersed element) の中で、最もコピー数が多いといわれている (約 10^6 コピー)
- ✓ 遺伝子へのAlu配列挿入は、個人によって異なる

感度は高いが…



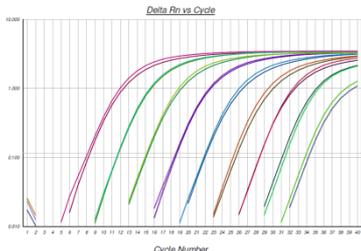
PCRの標的がヒト細胞に大量に存在する遺伝子であるため、
コンタミネーションの除去が難しい

試薬や消耗品由来のヒトDNAのコンタミネーションを完全に除去することはできない



マルチコピー遺伝子を標的とした場合の考慮点

PCRの結果から得られるのは…



合成核酸が標準物質の場合… コピー数/reaction

細胞由来のgDNAが標準物質の場合… DNA量/reaction

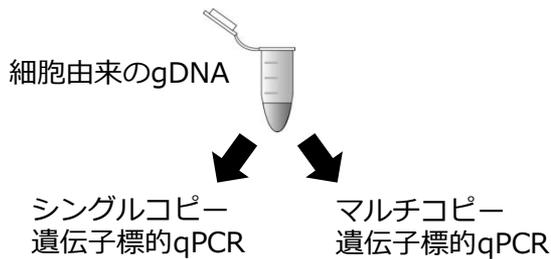
評価したいのは

細胞数

**細胞数への
換算が必要**

細胞数への換算方法

① シングルコピー遺伝子の測定結果より
細胞あたりのコピー数を算出



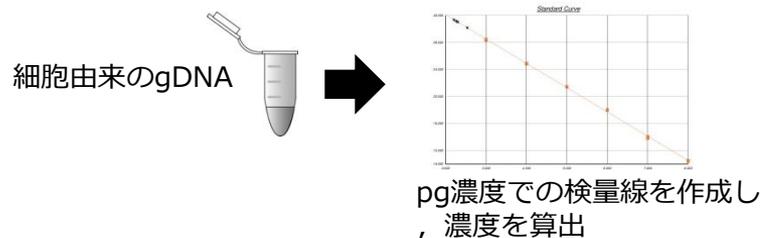
シングルコピー遺伝子
は1細胞中2コピー

細胞数を算出

細胞あたりのマルチコピー遺伝子のコピー数を算出

→ 実際の測定で得られたコピー数から細胞数を換算

② 細胞あたりの理論ゲノムDNA量から換算



核酸の平均分子量から、理論的な
1細胞あたりのゲノム量は6.6pg

濃度を6.6 pgで割ることにより細胞数へ換算

http://bioanalysisforum.jp



5. 実験施設

操作ごとにエリアを区分し，移動を一方向にする
PCRキャビネットの利用もコンタミネーション防止には効果的

Clean

master-mix area

核酸以外の試薬（プライマー，バッファー等）を取り扱う。

pre-PCR area

サンプルやコントロールなどを取り扱う。

PCR amplification

PCR装置を設置し，PCR増幅を行う。



PCRキャビネット

Post-PCR area

増幅したPCR産物を取り扱う電気泳動等を実施する。

Dirty

European Pharmacopoeia 2.6.21より引用

厚生労働省の「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン」にも同等の記載：http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/dl/140814_01a.pdf



6. その他留意点

消耗品

- チップは必ず**フィルター付き**。
- PCR grade = DNase-, RNase-free, 微生物DNA-free (特に大腸菌) の意味。その他のDNAは保証していない。
- 「Human DNA-free」グレードの消耗品も存在するが、これも100%-freeという意味ではない。
- チューブや核酸は核酸低吸着性のものを選ぶ。
- ボルテックスのかけすぎによる、核酸のプラスチックへの吸着に注意する。
- **DNAaway** の使用はDNA除去に有用だが、多用によるサンプルへのコンタミに注意

機器

- コンタミ防止のために**PCRチャンバー**を使用する。
- qPCR機器には、**ROX**補正が必要なものと、**ROX**が反応阻害を起こすものがあるため、機器とマスターミックスの相性に留意

7. バリデーションに関する ディスカッション

バリデーション項目と適合基準 (DG内の意見、要議論)

項目	適合基準
真度及び精度	現状を考慮すると50%程度
検量線	$r^2 \geq 0.98$, 増幅効率が85~110%
特異性	試薬コントロールと動物gDNAの両方で増幅が認められない、あるいは動物gDNAで増幅が認められてもCq値の差 <1.5 、または定量下限との乖離の差で妥当と判断することもありうる
マトリックス効果	動物gDNA原液 vs. H ₂ O or bufferにQCサンプルをスパイクし、その間でCq値差が <1.5 、検量線slopeが-3.6~-3.1。阻害が認められる場合、 ・ DNA抽出法の再検討、 ・ 希釈の適用・定性的な判断に用いる
定量下限	真度及び精度のクライテリアを満たす最低濃度
検出限界	95%信頼性で検出できる濃度
安定性	Cq値変動が <1.5

選択性、キャリーオーバー、希釈直線性は必要なし。

Q:実際に即しているのか？

来年度のDGでも引き続きバリデーシヨンの
Discussion Paper作成のための
ディスカッションをしていく予定です。