

方で2.0を大きく超えるPCR効率が算出されたwellでは、PCRにより増幅されたDNA断片の量を正確に反映していない強度の蛍光が生じているか、蛍光の検出異常が推測される。また、特定のwellから理論値との差異が大きなPCR効率が繰り返し得られる場合には、特にリアルタイムPCR機器に含まれるサーマルサイクラーや蛍光検出部の異常が疑われる。組換えDNA技術応用食品の分析における最終的な分析結果は、Ct値を検量線に内挿し、変換することで得られるコピー数に基づく定量値である。本研究では、機器ごとに検量線を作成し、該当するCt値を内挿することでコピー数に変換した。それでもなお、機器間でコピー数に差が生じた結果は、検量線の傾きやばらつきが各機器により異なることを意味しており、定量値に対する影響については、検量線の信頼区間の推定といった今後の検討により、明らかにすべき課題である。反応系と定量PCR機器の組み合わせによっては、PCR効率が理論値を明らかに下回る場合があることおよび、特定のwellにおいて理論値との大きな差異が観察された場合には、PCRあるいは蛍光検出の異常が疑われることについて言及したが、得られた測定値の大きさやそのばらつきが、機器の仕様に起因する変動の幅に含まれているのか、含まれず異常な値であるのかを判断するための基準がない。また、定量PCR法に使用される反応系の改良についても同様である。今後、最終的な分析結果である定量値に許容される不確かさの検討とあわせ、明確な基準を設定することにより、定量PCR機器の管理手法の一つとして、内部精度管理等に役立てられることが期待される。

②ベースライン補正方法の検討— Ct値を得るまでの解析手順には、reporter色素由来の蛍光値をreference色素の蛍光値によって除した値(Rn値)をベースライン補正することが含まれている。また、定量PCR法では、どのようなRn値が得られた場合にも、一定の条件で作成されたベースラインによって全てのwellから得

られた値を一様に補正することが指示されている。これは機器付属のソフトウェア上の制限によるものであると考えられ、本来的には、反応や測定が進行するに従って、ベースラインが変動する可能性も考えられることから、得られたRn値の大きさを指標として補正に使用するベースラインを変更すべきと考える。GiMletには、各wellから得られたRn値の大きさに応じてベースライン作成に使用するデータの採取内容を変更し、独立して補正するためのアルゴリズムを組み入れた。この結果は、繰り返し測定間でベースラインが変動しており、新たなベースライン補正方法によりその変動の影響が解消あるいは軽減されていることを示唆している。このように、ベースライン補正の方法を変更することによって、得られる測定値の精度が向上する可能性が示された。

③検量点およびTh. line解析条件が測定値の精度に与える影響— 食安発第0629002号により通知されている組換えDNA技術応用食品を対象とした定量PCR法では、0、20、125、1,500、20,000、250,000コピーの濃度に調製された6点の検量点から検量線を作成し、これに被検査試料から得られたCt値を内挿してコピー数に変換する。また、Ct値を得るためには、横軸をサイクル数として ΔRn 値をプロットしたamplification plot curveに対して「 ΔRn 値が指数関数的に増加している領域にTh. lineを引く」事が規定されている。これは、Ct値がamplification plot curveとTh. lineとの交点として得られ、「 ΔRn 値が指数関数的に増幅している領域」つまりは、PCR効率(実際には検出される蛍光強度の増加率)が安定し、増幅対象となったDNA配列の初期量が正確に反映されているサイクル数をCt値としているためである。従って、Th. lineの設定に当たっては、DNA配列の初期量を真度よく推定するために、「 ΔRn 値が指数関数的に増幅している領域」をどのように決定するかが重要である。また、Th. line設定の方法を規定した上で、各検量点から得られる測定値のばらつきを明らかにす

ることが、検量線の信頼区間の推定、ひいては検量線に内挿することで得られる被検査試料のコピー数の不確かさを推定する上で必要である。低コピー数のプラスミドは、連続量ではなく離散量として考えられるべき測定量であり、試薬溶液中での分布は、ポアソン分布あるいは二項分布に従うため、そこから分取され、定量 PCR の反応系に加えられたプラスミドの数は、当該分布に従ってばらつき、結果として、得られる測定値のばらつきは大きくなり、頻度の分布は一様になるのではないかと考えられる。本研究により、Th. line 値が、測定値のばらつきに影響を与える要因の一つであることが明確に示されが、どのような値に設定すべきかについては、一般化して示すことができない。これは、使用する定量系(プライマーならびにプローブ)、試薬、定量 PCR 機器により、その最適値が変動すると考えられるためである。最適な Th. line 値に関しては、各試験者が検量線作成時に本研究で行われたような解析を実施し、規定コピー数を目安にするなどして、用時設定すべきと考える。また、低コピー数のプラスミドを含む検量点を検量線の作成に使用することで、当該検量点に含まれる原理的なばらつきにより、検量線が不正確となり、結果、測定値の真度を下げる結果につながりかねない。今後、検量線の信頼区間等の検討を通じて定量値への影響を明確にすることにより、検量点として規定すべき最小コピー数について明らかにすべきと考える。

5-2. フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究— 本分析法に規定された実験条件およびデータ解析条件に従うことにより、1) 100%の相同性を有する DNA 配列が一魚種についてのみ検索された場合には、被検査試料を当該魚種として同定することが可能であること、2) 複数の魚種から 100%の相同性を有する DNA 配列が検索された場合には、そのいずれかの魚種であっても特定魚種の同定には至らないこと、3) 100%の相同性を有する DNA 配列が検索されない場合には、最終シーケンスデータ

に実験的なエラーが含まれていると考えられ、なお同定が必要な場合にはさらにシーケンスデータを精査することが必要なこと、4) 100%の相同性を有する DNA 配列が検索されずかつ、検索された DNA 配列の相同性が一定以下である結果に基づき、特定魚種ではないと判定可能な場合があることが示された。1~3) に関しては、被検査試料由来の当該 DNA 配列が GenBank に登録されているあるいは採取されており、それらには誤りが含まれていないことを前提としている。また、4) については、本研究で検討したカワハギ、アンコウ、およびウマヅラハギと各フグ種との比較および、各フグ種間の比較結果に基づいて考えれば、90%以下の相同性を判断基準とすることによって、先に挙げた3魚種を少なくともフグ種と誤判定することはないと考える。

6. 町井分担研究: 下痢性貝毒の陽性サンプルについて、公定法の安元バイオアッセイ法を用いて検討した。試作試料の安定性・均一性を検討し協力7機関にサンプルを配布して検査を行なった結果では、マウスの死に方に違いはあるものの全て適合という結果であった。この結果は、バイオアッセイの持つ難しさと考える。また、アンケート調査では、試料の劣化を防ぐ目的で、各機関に到着後-70℃程度での保管を希望したが、-30℃冷凍庫しか所持していない機関もあった。しかし、その機関での試験は、試料到着後8日目で実施されたが、結果に問題を認めなかった。近年、高い毒値を示す例が少なく、十分量の適切な毒値を持つ試料の作製が出来ていない。従ってこの点についても考慮する必要があるものと思われる。

7. 大島分担研究: 1) 理化学検査のための適正試料の作製—①有機リン系残留農薬調査試料の検討では、精度管理調査試料としてかぼちゃペースト、えだまめペーストを用い、回収率、均一性、安定性についてクロルピリホス、フェニトロチオンについて検討した。えだまめペーストは調査試料として不適切であった

が、かぼちゃペーストにクロルピリホス、フェントロチオンを添加した調査試料は、今回回収率が低かったものの十分な期間の安定性が確認された。しかし、えだまめペーストについては、不十分な原因について詳細な検討が必要であると考えられた。

②残留動物用医薬品のための調査試料基材の基礎的検討については、精度管理試料として固形試料による配布が期待されている。我々は、鶏ササミ肉を用い試料作製を試みているが、なかなかうまく行かないのが現状である。しかしながら、水を添加することで均一な基材の作製が可能となり、いずれのサルファ剤も約80%以上の回収率を示した。そのうち国内基準のあるSDDで良好な結果が得られていることから、今後は10%水添加鶏ササミ肉ペーストを基材とするSDDを調査試料として用いることで詳細な検討を加えたい。

2) 微生物学検査のための適正試料の作製—マッシュポテトに代わる実食材を用いて黄色ブドウ球菌検査を行うための調査試料を試作し、高圧蒸気滅菌処理後の物性変化、冷蔵保存時の接種菌の安定性および公定法による添加菌の検出について検討を行った。

黄色ブドウ球菌検査用調査試料として加熱食肉製品を採用し、蒸し鶏、とりそばろ、ミートボールについて検討を行ったが、とろそばろを除く2種については滅菌方法を考慮することにより高圧蒸気滅菌処理後の変形ならびに変色を最小限に抑えることができることが明らかとなった。また、これまでの結果から、試験菌液に安定化剤を添加することにより低温保存においても接種菌の死滅を少なくすることができることが明らかとなっていたため、本研究においても安定化剤を添加したが、初発菌数に比べて最大で、3~4オーダーの菌数減少が認められた。大腸菌検査等においてハンバーグを採用した場合には、比較的菌数は安定しており、反対に増加傾向も認められていたことを考慮すると、黄色ブドウ球菌の場合には菌液調製における溶液組成や菌液の接種方法につい

ても変更する必要があるものと考えられた。本来であれば試験菌の接種後に大幅な菌数変動がないものが望ましいと考えられるが、外部精度管理調査において最も懸念すべき事項は検査期間中に対象微生物が検出できなくなることである。この点から判断した場合、本研究において試作した調査試料は作製後35日目においても対象微生物を公定法により検出することができ、かつその生菌数は 10^4 cfu/g程度であったことから、長期間の保存においても定性検査を行ううえでは大きな問題はないものと考えられた。しかしながら、検査法として黄色ブドウ球菌数検査も存在することから、今後接種菌の変動が小さい基材あるいは接種方法について検討する必要があるものと考えられた。また、今回蒸し鶏を基材として用いて検討を加えてきたが、他の基材と比較すると、接種菌数の減少傾向が最も強いものであった。これまで、冷蔵保存することにより基材中の水分量が低下することにより、菌数減少が著しくなることが認められていることを考慮すると、菌数と水分活性との関係から蒸し鶏はもともと水分保持能力が高くなかったために、冷蔵保存後の安定性が他の基材と比較すると劣っていた可能性も考えられた。

3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製—小麦、そば、落花生について検討を試みた。小麦試料では、標準品規格に従った小麦粒の入手が困難であったことから代替品を用いて検討をしたが、規格品13種の内6種でタンパク質規格が適合せず、モリナガFASPEK小麦キットによる測定値も高い値として示された。家庭用小麦粉は主に小麦粒の中心部を使用し、外皮およびそれに近い部分は使用しないため、小麦粒全体を粉砕した小麦一次標準粉末とはグリアジン含量が大きく違っている可能性が考えられた。しかし、モリナガFASPEK小麦測定キットは小麦一次標準粉末抽出液においても2-D Quant Kitのタンパク質濃度に対して家庭用小麦粉と同様に高い回収率を示していることから、これ以外の可能性

も含めさらに検討が必要と考えられた。

そば試料作製においては、全ての試料で標準品規格に適合していたが、添加食材の回収率は特に FASTKIT エライザ Ver. II そばで比較的高い値を示しており、精度管理試料として配布する際には工夫が必要と思われる。

落花生については、標準品規格に適合しているが、添加回収率が添加量を上回った結果となった。これは、落花生粉のタンパク質の含量の予測が正しくなかったことにより、落花生粉添加あんで回収率が大きくなった可能性が考えられた。しかし、安定性も含め使用可能なものと判断した。

E. 結論

1. 田中分担研究： ポジティブリスト制度における一律基準値(0.01 ppm)付近の低濃度の農薬検査の信頼性を確保するために、地方衛生研究所の9参加協力機関(新潟県、愛知県、神戸市、奈良県、和歌山市、広島市、徳島県、北九州市、大阪府)による外部精度管理を実施した。

均質性、安定性を確認したほうれんそう(GC/MS)及びとうもろこし(LC/MS/MS)の精度管理試料に、0.01 ppm付近の10種類の添加農薬のGC/MS及びLC/MS/MSによる分析結果は、全機関が添加農薬をすべて正しく検出した。各農薬の全体の平均値は0.01 ppm付近でも良好な結果が得られた。X_{bar}-R管理図、z-スコアによる評価で適正域に入っていない機関も認められたが、総合成績では前年度と比較してかなり良好な結果が得られた。適正域に入っていない機関も安定同位体(サロゲート物質)を内標準として補正した結果、再現性において良好な結果が得られた。

いずれの機関も信頼性のあるデータが得られる要因「正確な(一定の)標準品」を用いて「適正な分析法」を実施し「良好な状態の装置」で分析が行われており、ほとんどの添加農薬の測定データで信頼性に関する問題点は無かった。

ポジティブリスト制導入に呼応した農産物中の

一斉分析法による参加機関の測定感度、添加回収率等の技術情報を相互に交換し、GC/MS 対象農薬では 244 農薬(異性体等含む 274 種類)及び LC/MS/MS 対象農薬 180 農薬(異性体等含む 189 種類)が、機器の測定感度から一律基準値(0.01 ppm)を満足していた。添加回収率では農産物 28 種類(延べ 47 種類)について延べ 352 農薬の回収率の良否の確認ができた。本研究は地方衛生研究所の相互協力体制、情報の共有、精度管理を含む技術能力の向上等に極めて有効であった。

2. 中澤分担研究： ELISA 法によって得られる測定値の信頼性評価に関する研究として、マイクロプレートにおける酵素・基質発色反応や、ニューキノロン測定用マイクロプレートを用いて、主に測定値の変動に影響を及ぼす要因について検討した。その結果、ELISA 法の精度を上げるために、ピペット操作に習熟し、エッジ部分の値を除外すること、また抽出液作製の段階で、精製を行い、脱脂回数を増やすことが重要であった。

3. 松木分担研究： 本研究においては、国内メーカー3社より市販されている農薬標準品のメーカー表示純度と我々が設定した条件で純度を比較した結果、今回用いた15物質の標準品45種のうち、HPLCで測定した純度においては98%が、GCでは89%がほぼ同等な純度を示しており、比較的良好な結果が示された。しかし、我々がひとつの標準品に対して複数の分析機器種(HPLC、GC)を用いて純度を測定した結果においては、分析する機器種によって違いが認められ、異なる分析手法を用いた場合、異なる不純物が検出されるか、あるいは不純物の割合が異なってくる可能性が示され、標準品の純度表示にあたっては、測定原理の異なるような複数の分析機器を用いて多方面から検証することの重要性が確認された。一方、通知法の個別試験法において純度が規定されている7物質のうち、規定を満たしていない純度表示を有する標準品が21種中、4種認められた。これについては、平成9年に実施した

調査時の結果とほぼ同等の結果であった。また、購入時に標準品の純度に関する情報が、カタログ等から得ることができない場合(特に並行輸入販売品)も多いことから、提供後に初めて通知法に規定されている純度を満たしていないことが判明することも、少なからず起こりうると思われる。メーカーには、全ての食品の輸入規制緩和策にともない、途上国からの輸入品目が急増している昨今、検査対象農薬種が急増し、それに対応するため標準品の品質には細心の注意を払っているものと思われるが、メーカーとしては、検査頻度が少ない農薬や分解しやすい農薬、あるいは本体と類似した物理化学的性状を有する不純物があるような農薬における精製のためのコストの問題が大きいと思われる。しかしながら、行政上の対処を行うことから、通知法の中で標準品の純度について規定されている以上、それを満たした標準品が必要であり、今後とも引き続きメーカー側の一層の努力を期待したい。

4. 米谷分担研究: 3 回の技能試験の結果から、TEQ が 1.7~26 pg/g 程度の魚試料において、TEQ の試験室間の変動は 4.8%~7.7%であることが示され、我が国における食品中のダイオキシン類分析値の信頼性が保証された。全国的に食品中のダイオキシンを分析する機関数が減少しており、技術水準の高い機関が残ったとも考えられる。

しかし、異性体によっては他機関と大きく外れた報告値があり、5~7 か所という少数の機関から統計量を求めると、外れ値が影響し大きな SD を与える場合があった。その結果として、外れ値と思われる値を報告した機関の z-スコアも 3 以下となり、問題点が見いだされない結果となった。頑健な統計量を用いることにより、外れた値には 3 を超える z-スコアが計算された。外部精度管理の目的は、他機関と比較して分析上の問題点を見だし、是正していくことである。この目的から、参加数機関数が少なく、外れ値の発生が予想されるような分析の外部精度管理においては、頑健な統計量による評

価の方が望ましいと考えられる。

5. 渡邊分担研究: 5-1. 組換え DNA 技術応用食品検査の信頼性確保に関する研究—リアルタイム PCR により得られる一義的な測定量である蛍光データを、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション (*GiMlet*) を開発した。組換え DNA 技術応用食品を対象とした定量 PCR 法により得られる蛍光データを *GiMlet* により解析した結果、使用する定量 PCR 機器の性能あるいは仕様が原因となり、well 間で測定値が変動する可能性が示された。今後、機器の上を判定するための基準を明確にする事によって、定量 PCR 機器の管理手法の一つとして、内部精度管理等に役立てられることが期待される。また、Ct 値を取得する際に設定される Th. line 値が測定値にばらつきを生じる一要因であり、適切な値を設定すべきであることが示された。さらに、検量線を構成する検量点として、低コピー数のプラスミドを規定した場合、そこに含まれる原理的なばらつきにより、検量線の正確性が損なわれる可能性が示唆された。

5-2. フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究—食安輸発第 1017004 号により示されたフグ鑑別試験法の適用拡大を目的に、より頑健性の高い改良 DNA 抽出法を開発し、評価した。また、相同性検索に供される最終シーケンスデータを得るためのラベリング反応条件およびデータトリミング方法を確認し、3 種の陰性試料ならびに 6 種のフグ種への適用可能性について検討した。その結果、改良 DNA 抽出法を用いることにより、多種の魚凍結乾燥試料から安定した収量で DNA を抽出可能であることが示された。また、確立されたラベリング反応条件を用いることにより、アライメントに支障を来すことのない一次シーケンスデータが得られることが示された。さらに、最終シーケンスデータを相同性検索に供して得られた結果から、一次シーケンスデータのトリミング方法の妥当性が示された。本研究に用いた、3 種の陰性試料および 6 種のフグ種試料から得られた結

果に基づき、フグ種鑑別に係る判定基準が以下のとおり提案された。

1) 100%の相同性を有するDNA配列が一魚種についてのみ検索された場合には、被検試料を当該魚種として同定する。

2) 複数の魚種から100%の相同性を有するDNA配列が検索された場合には、そのいずれかの魚種であっても特定魚種であると同定することはできない。

3) 100%の相同性を有するDNA配列が検索されない場合には、最終シーケンスデータに実験的なエラーが含まれていると考えられ、なお同定が必要な場合にはさらにシーケンスデータを精査する。

4) 100%の相同性を有するDNA配列が検索されずかつ、検索されたDNA配列の相同性が一定以下である結果に基づき、特定魚種ではないとする。

なお、本判定基準は、被検試料由来の当該DNA配列がGenBankに登録されているあるいは採取されており、それらには誤りが含まれていないことを前提としているため、未登録のDNA配列については分析者による採取、ひいては登録をすることにより、判定精度を高めるための努力が必要である。

現在、より多数のフグ種、および他機種シーケンサーへの適用可能性について検討を進めている。さらに、それらの結果に基づき策定した共同試験プロトコルに従い、2 機関による分析法の妥当性評価試験を計画している。

6. 町井分担研究：①遮光バイアルにアセトン溶液で密栓及び遮光バイアルに吸着した OA は冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも 6 か月間安定であることが明らかとなり、1 年 3 か月経過後のサンプルは HPLC レベルで微減傾向を示したが、MBA では力価の残存が観察された。現在更に長期に亘り観察中である。②昨年末までの知見で濾紙に吸着した OA はどの条件でも回収率は経時的に緩徐に減少することが明らかであったが、冷蔵及び冷凍条件下では 3 週間比較的安定であった。③以上より実際に

使用を予定している冷凍条件はどの条件でも外部精度管理用サンプルとして使用可能である事が示唆された。④OA の熱に対する耐性を検討するため、50℃について経時的に回収率を求めたところ、48 時間安定であり、通常分析及び輸送等に影響の無い事が示唆された。⑤OA は 120℃を境に急激に分解が始まる可能性が示唆された。そこで、OA の加熱時間を 1 時間に固定して、温度を 100℃～150℃に可変させ、回収率を求めると、回収率はシグモイド状に減少し、半減期は 120℃～130℃と推定され、150℃では完全に分解する事が明らかとなった。⑥今回加熱時間と加熱温度の相関に関する基礎的データが得られたので、加熱時間と分解の予測の可能性が示唆され、今後のリファレンスマテリアル作製に大きく寄与すると考えられる。⑦小型挽肉器を導入し、貝の身の細切を試みた。従来用いていたフードプロセッサに比し、細切されきれずに残る、残渣となるようなものが比較的少なく、効率良く、良好な細切物が得られた。また、この細切物は、この後の抽出作業においても扱いやすく、特に問題が発生せず、実用上推奨されるものと判断された。⑧下痢性貝毒検査の経験豊富な試験所の試験室による同一ロット試料の性能調査で、その結果、協力 7 検査機関全てにおいて陰性、陽性の判断は正しく出された。陰性試料に関しては、全ての機関で 3 匹中全て生存し、陽性試料においては、5 機関では 3 匹中 3 匹死亡、2 機関では 3 匹中 2 匹死亡であった。死亡までの時間については、夜間に死亡した個体では死後硬直の具合などから推定した時間での回答を求めたため、詳細な考察は出来ないが、試料送付前の確認試験においては、2～5 時間であったが、協力各機関からの回答では、1 時間から 22 時間の範囲でばらつきが見られ、同一機関でも大きくばらつく例が見られた。このことから、濾紙への毒素の含浸法の更なる検討、或いは新たな添加法の検討、また、別の観点からは、マウスへの毒素の注射法の実際についての聞き取り調査、或いは指

導についても検討する必要性も考えられた。

今後は安定して OA 含有試料を供給できる条件について更に検討を加える予定である。更に、毒性の評価をより正確に行うために、LC-MS 等による活性成分の多成分同時分析法を導入することも不可欠である。

7. 大島分担研究:1) 理化学検査のための適正試料の作製— 精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料を作製することを目的とし、実分析に即した調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

①収穫後に水蒸気処理を行ったかぼちゃ及びえだまめペースト(マイクロペースト状食材)を使用し、有機リン系農薬2種(クロルピリホス、フェニトロチオン)を添加混合し、かぼちゃペーストで均一な濃度の試料を作製できることが分かったが、えだまめペーストでは、これら有機リン系農薬の基材として不相当であることがわかった。また、かぼちゃペーストに添加した農薬の安定性も確認され、精度管理調査における適正な試料であることがわかった。

②鶏ササミ肉をミンチし、マルチグラインダーを使用し、サルファ剤8種(SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SMXZ、SDMX、SQ)を添加混合し、試料作製し、基材に10%水添加することで良好な均一性が得られた。また、SDDを調査試料とすることが可能である事を示唆した。

2) 微生物学検査のための適正試料の作製— 食品衛生外部精度管理調査の黄色ブドウ球菌検査用調査試料として、これまでにマッシュポテトを基材として採用し、均一かつ安定な調査試料を提供してきたが、新たに加熱食肉製品を対象とした調査試料を作製すべく、市販製品を対象菌を添加することにより、その安定性ならびに基本性状について検討を実施してきた。

黄色ブドウ球菌検査用調査試料として蒸し鶏、とりそばろおよびミートボールを採用し、高圧蒸

気滅菌処理後の物性変化について確認したところ、とりそばろでは著しい炭化が認められたため、基材として採用することは難しいと判断されたが、これ以外の2種の基材については若干の褐変が認められるものの大きな物性の変化は認められなかった。そこで、これらの2種の基材に他の試験においても実績のあるハンバーグならびにマッシュポテトを用い、これらを試験菌液(*S.aureus* あるいは *S.epidermidis*)に漬け込み、これを冷蔵保存することにより接種菌の安定性について検討した。その結果、全ての基材において菌液接種後35日目まで初発菌数に比べて菌数は減少傾向にあるものの、公定法によっても接種菌を検出することは十分に可能であった。さらに新規で採用したミートボールおよび蒸し鶏では菌数と水分活性との関係からマッシュポテトと比較した場合に安定性は低かったが、菌液の接種方法等を検討することにより、より安定した菌数を確保できるものと考えられた。

以上のことから今回試作した加熱食肉製品は、黄色ブドウ球菌検査用調査試料として接種菌の安定性について考慮する必要はあるものの、外部精度管理調査試料として使用しうるものと考えられた。しかしながら、今後の食品衛生外部精度管理調査の実施にあたり、食品の規格基準に示されている食品カテゴリーを参考とした調査試料作製のための実食材の選択とそれらを基材とした均一かつ安定な調査試料の作製を継続して検討する必要があり、これまでに問題とされてきている「指定された特定微生物に対する検査方法の適正とその検査方法の検証」、「標準菌株の選択と採用検査方法による特定微生物の検出の検証」、「調査試料の輸送条件における試験菌数の変動」など様々な局面を考慮して、外部精度管理調査の目的に応じて適切な標準菌株を選択し、日常の検査試料に近似した調査試料を提供することにより、さらに向上した精度管理の実施が遂行されるものと考えられる。

3) アレルギー関連物質検査のための適正試

料の作製、①小麦試料作製の検討— 厚生労働省の通知法、標準品規格に従った小麦粒が入手できなかったため、小麦一次標準粉末の代替品を検索することとし、入手可能な小麦粉について標準品規格による抽出液の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、2-D Quant Kit、モリナガ FASPEK 小麦 測定キットおよび FASTKIT エライザ Ver. II 小麦によるタンパク質濃度の測定、ケルダール法による小麦粉のタンパク質含量の測定を実施し、標準品規格と比較した。その結果、試験した小麦粉は抽出液のタンパク質濃度が規格に適合しないものが約半数あったほか、いずれもモリナガ FASPEK 小麦 測定キットの測定値が小麦粉のタンパク質含量よりも高く測定されるなど、小麦一次標準粉末の代替品として適当なものは見つからなかった。その中で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像が小麦一次標準粉末の電気泳動像と類似していた石臼挽きハルユタカ全粒粉を用いて以下の検討を行なった。ハルユタカ高濃度標準液または石臼挽きハルユタカ全粒粉を食材に添加したものを-20℃で保存し、回収率および保存安定性を検討した。その結果、添加試料は回収率では ELISA キット間で2倍の差が認められたが、同時再現性、アッセイ間再現性とも良好で、-20℃、12週間の安定性が確認できた。

②そば試料作製の検討— 標準品規格に従って自家製一次標準粉末および自家製高濃度標準液を調製し、標準品規格に適合していることを確認した。自家製高濃度標準液を添加した試料を作製し-20℃で保存したものについてそばタンパク質を測定した結果、モリナガ FASPEK そば 測定キットでは添加回収率が良好で保存安定性も12週まで確認でき、使用可能な高濃度標準液添加試料が調製できたと考えられた。一方、自家製一次標準粉末を添加した食材においては回収率が添加量を大幅に上回った。そば粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した結果、標準品規格の抽出液から予測したそば粉のタンパク質含量が

実際と異なっていることが分かった。

③落花生試料作製の検討— 標準品規格に従って自家製一次標準粉末および自家製高濃度標準液を調製し、標準品規格に適合していることを確認した。自家製高濃度標準液を添加した食材を作製し-20℃で保存したものについて落花生タンパク質を測定した結果、モリナガ FASPEK 落花生 測定キットでは添加回収率は良好で保存安定性も12週まで確認でき、使用可能な高濃度標準液添加試料が調製できたと考えられた。一方、自家製一次標準粉末を添加した食材においては回収率が添加量を上回った。落花生粉のタンパク質含量をケルダール法により測定した結果、標準品規格の抽出液から予測した落花生粉のタンパク質含量が実際と異なっていることが分かった。

F. 健康危険情報

特になし

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

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・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」

平成 19 年度 分担研究報告書

農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究

分担研究者 田中 之雄

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究

主任研究者	遠藤 明	財団法人食品薬品安全センター 理事長
分担研究者	田中 之雄	大阪府立公衆衛生研究所 食品化学課長
研究協力者	土田由里子	新潟県保健環境科学研究所
	上野 英二	愛知県衛生研究所
	田中 敏嗣	神戸市環境保健研究所
	宇野 正清	奈良県保健環境研究センター
	木野 善夫	和歌山市衛生研究所
	佐々木珠生	広島市衛生研究所
	堤 泰造	徳島県保健環境センター
	花田 喜文	北九州市環境科学研究所

研究要旨

平成 18 年 5 月に施行された「食品に残留する農薬等のポジティブリスト制度」により約 800 種類の農薬等に暫定基準または一律基準が設定された。この規制に対応するため検査機関では検査体制を再構築し農薬検査の拡大を図ってきた。そこで、検査機関のポジティブリスト制度における一律基準値(0.01 ppm)付近の農薬検査の信頼性を確保するために、地方衛生研究所の 9 参画機関(新潟県、愛知県、神戸市、奈良県、和歌山市、広島市、徳島県、北九州市、大阪府)の協力を得て外部精度管理を実施した。

均質性、安定性を確認したほうれんそう(GC/MS用)、とうもろこし(LC/MS/MS用)の外部精度管理試料に、一律基準値(0.01 ppm)付近の低濃度の農薬10種類を添加した結果は、全機関が添加農薬をすべて正しく検出した。各農薬の全体の平均値は0.01 ppm付近でも良好な結果が得られた。品質管理などに用いられている \bar{X} -R管理図による方法及び検査精度の相対的な判定に有効なzスコアによる評価では、適正域に入っていない機関も認められたが、総合成績では前年度と比較して良好な結果が得られた機関が多かった。R管理図で適正域に入っていない機関(RSDが10%を超える)も安定同位体(サロゲート物質)を内標準として補正した結果、再現性においてRSDが5%以下となり良好な結果が得られた。

現行の主流であるGC/MS-SIM測定及びLC/MS/MS-MRM測定の他に農薬データベースを搭

載した GC/MS-SCAN 測定及び LC/TOF/MS 測定による検討を行った結果、データベースから添加農薬及びその濃度を的確に検出し、その有用性が認められた。

9 参画機関は、いずれも信頼性のあるデータを得るための要素である「正確な標準品」を用いて「適正な分析法」を実施し「良好な状態の装置」で分析が行われており、測定データの信頼性について問題点の無いことが示唆された。

ポジティブリスト制導入に対応した農産物中の一斉分析法による参画機関の測定感度、添加回収率等の技術情報を相互に交換したところ、GC/MS対象農薬では244農薬(異性体等含む274種類)及びLC/MS/MS対象農薬180農薬(異性体等含む189種類)が、機器の測定感度から一律基準(0.01 ppm)を満足していた。添加回収率では、農産物28種類(延べ47種類)について延べ352農薬の回収率の良否の情報が得られた。本研究は地方衛生研究所の相互協力体制、情報の共有、精度管理を含む技術能力の向上等に極めて有効であった。

A. 研究目的

厚生労働省は平成 15 年 5 月に食品中の農薬等残留基準を改正し、平成 18 年 5 月 29 日からポジティブリスト制が施行された。これに伴いすべての食品は、すべての農薬等(約 800 種類、農薬は 516 種類)が測定の対象となった。そこで、ポジティブリスト制における検査機関の農薬検査の信頼性を確保するために、検査の精度管理について検証することが必要となった。精度管理には、内部精度評価(既知の農薬の添加回収試験)と外部精度評価(第三者によるブラインドスパイク試験)があるが、従来から外部精度評価の重要性が指摘されている。

地方衛生研究所をはじめとする検査機関では農薬検査にあたり、厚生労働省の示す一斉分析法や個別試験法、或いはこれらの通知試験法以外の方法によって試験する場合は、同等又はそれ以上の性能を有する独自の検査標準作業書(SOP)を作成し、その手順に従い検査を実施し信頼性を確保(分析法のバリデーション)しているのが現状である。さらに「食品中に残留する農薬等に関する妥当性評価ガイドライン」(平成 19 年 11 月 15 日食安発第 1115001 号)による標準的方法による評価を行うことになった。

そこで食品衛生検査に係わる地方衛生研究所の検査水準の把握、検査精度の維持・向上を図ることを目的に検査精度や信頼性確保に大きく貢献する外部精度管理調査を実施した。

B. 研究方法

B-1. 実施機関

大阪府立公衆衛生研究所が、精度管理調査の実施機関を担当した。調査試料の調製・送付、均質性・安定性試験および結果の取りまとめを担当したが、同研究所の別の班が外部精度管理調査の測定に参加協力機関として

も加わった。同研究所内で測定に参加した班が、添加農薬の種類および濃度を知ることがないように十分に留意して行った。

B-2. 参加協力機関

精度管理調査に参画した研究協力機関は、新潟県保健環境科学研究所、愛知県衛生研究所、神戸市環境保健研究所、奈良県保健環境研究センター、和歌山市衛生研究所、広島市衛生研究所、徳島県保健環境センター、北九州市環境科学研究所、大阪府立公衆衛生研究所の計 9 機関の地方衛生研究所である。

B-3. 実施概要及び日程

本研究における 3 年目の実施概要を図 1 に示した。ほうれんそうに添加農薬 7 種類(サロゲートを含む 10 種類)を GC/MS 用に、とうもろこしに添加農薬 3 種類を LC/MS/MS 用による外部精度管理調査を実施した。

表 1 に示した実施日程で精度管理調査を実施した。平成 19 年 8 月 27 日に冷凍宅配便で外部精度管理試料、GC/MS 用農薬標準混合液:関東化学製農薬標準混合液 31(85 種類)、LC/MS/MS 用農薬混合液:和光純薬製農薬標準混合液 PL-7-1(30 種類)、林純薬工業製 GC/MS システム評価用試料(以下、クライテリアサンプル)を送付した。分析結果等の報告期限は同年 12 月 7 日とした。

B-4. 添加農薬(表 2)

添加農薬の種類は基準値、GC/MS 及び LC/MS/MS の測定感度、回収率判定を考慮して厚生労働省から示された情報を参考に実際の検査で比較的良好に検出された農薬を添加した。添加農薬の濃度は一律基準値(0.01 ppm)付近の低濃度に設定した。

GC/MS 用管理試料では農薬標準混合液 85 種類から 30 種類の添加農薬指定リストを設定し、7 種類の農薬を添加した。7 種類のうち 4 種類の農薬はブラインドにして配布した市販混合標準液による測定を求めた。残りの 3 種類は農薬名を明らかにして添加濃度を各機関の標

準液による測定を求めた。LC/MS/MS 用管理試料は農薬標準混合液 30 種類から 10 種類の添加農薬指定リストに設定した。3 種類の農薬をブラインドにして配布した市販混合標準液による測定を求めた。

B-5. 試料の調製及び送付方法

1. 試料食材および試薬

試料食材は、ほうれんそう、とうもろこしの冷凍磨砕マイクロペースト状食材(株式会社 新進)を使用した。精度管理用試料はロット差のない均質な必要量を確保するために業務用の食材を用いた。

クロルピリホスメチル、プロモホス、ジクロホップメチル、フェンブコナゾール、 γ -BHC、クロルピリホス、ダイアジノン、シフルフェナミド、シメコナゾール、メキシフェノシド:和光純薬製残留農薬試験用試薬、農薬混合液31:関東化学、クライテリアサンプルmix:林純薬工業、安定同位体 δ -BHC ($^{13}\text{C}6$, 99%) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液、安定同位体クロルピリホス (Diethyl-D10, 99%) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液、安定同位体ダイアジノン (Diethyl-D10、98%) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液: Cambridge Isotope Laboratories, Inc. アセトン:和光純薬製残留農薬・PCB試験用アセトン 5000を使用した。

2. 試料調製

ほうれんそうにはクロルピリホスメチル 0.030 ppm、プロモホス 0.008 ppm、ジクロホップメチル 0.017 ppm、フェンブコナゾール 0.010 ppm、 γ -BHC 0.015 ppm、クロルピリホス 0.007 ppm、ダイアジノン 0.010 ppmになるように添加した。サロゲートは δ -BHC、クロルピリホス、ダイアジノンを0.020 ppmになるように添加した。これらのサロゲートは内部標準物質として添加農薬の補正の目的で添加した。とうもろこしにはシフルフェナミド 0.020 ppm、シメコナゾール 0.015 ppm、メキシフェノシド 0.010 ppmを添加した。

ほうれんそう添加用混合溶液及びとうもろこし添加用混合溶液を調製し、精度管理試料1 kgあたり1 mLを添加した。はじめにクロルピリホ

スメチル、プロモホス、ジクロホップメチル、フェンブコナゾール、 γ -BHC、クロルピリホス、シフルフェナミド、シメコナゾール、メキシフェノシドダイアジノンの1 mg/mL のアセトン溶液を調製した。その後、各々食品毎の添加濃度になるように調製した。

ほうれんそう用では調製した各農薬類をアセトンで希釈しクロルピリホスメチル 30 ppm、プロモホス 8 ppm、ジクロホップメチル 17 ppm、フェンブコナゾール 10 ppm、 γ -BHC 15 ppm、クロルピリホス 7 ppm、ダイアジノン 10 ppm、サロゲートとして添加する安定同位体の農薬類は20 ppmになるように調製した。とうもろこし用ではシフルフェナミド 20 ppm、シメコナゾール 15 ppm、メキシフェノシド 10 ppmになるようなアセトン溶液を調製した。

精度管理用の試料は食品2 kgをケンミックス・アイコーKM-800付属のステンレス容器(容量7 L)に入れ攪拌しながら、ホールピペットで正確に量りとった農薬混合アセトン溶液2 mLを徐々に滴下させ加えた。以上と同一の操作を4回行いそれらの全量を10 L容量半寸胴型鍋に入れ、攪拌後ポリプロピレン製の容器に小分けした。

研究協力機関への送付分として、250 mL容器に入れたもの(約200 g)2個ずつ配付することとし、配付分18個と均質性と安定性を調べるために15個分を小分けした。小分けした精度管理用の試料は -20°C で冷凍庫に保管した。

保管後、均質性と安定性を調べるため無作為に5個の容器を選び、均質性試験では試料を解凍後、それぞれ繰り返し2回ずつ採取し、各々の農薬を大阪府立公衆衛生研究所の農薬標準作業書に準じて測定した。残りの容器は -20°C で冷凍庫に保管して2ヶ月後に、各々の添加農薬の安定性試験を同様の方法で確認した。

3. 送付方法

無添加のほうれんそう、とうもろこし各々250 mL 容器に小分けしたものを各2個ずつを、ビニールに入れて真空パックにして固定した後、発

泡スチロール製の送付箱に入れて翌日の午前中必着になるように冷凍宅急便で試料を送付した。

B-6. 検査方法

分析は各参加機関が規定している検査標準作業書(SOP)で行い、ほうれんそうはGC/MS測定、とうもろこしはLC/MS/MS測定で行うこととした。測定は5回の併行測定とした。外部精度管理で得られた分析値、SOP、機器の測定条件等を所定の様式により郵送、E-mail等で報告することとした。

B-7. 結果集計と評価方法

各機関から報告された定量値について統計処理(基本統計量、ヒストグラム、正規確率プロット、X bar-R管理図の作成およびzスコアの算出)を行った。

各々の検査項目毎に、品質管理などに用いられているX bar-R管理図を代用する方法で管理線を定め、機関内変動と機関間の変動を比較した。このX bar-R管理図および各機関における検査精度の相対的な判定に有効なzスコアによる評価をJUSE-Stat Works V4.0の外部精度管理を用いて行った。

X bar 管理図

中心線(CL):各参加機関の報告値の平均値(x)の平均値

上部管理限界 UCL:

各参加機関の平均値(x)の平均値×1.2

下部管理限界 LCL:

各参加機関の平均値(x)の平均値×0.7

R 管理図

中心線:rの合計/参加機関数

上部管理限界 UCL:2.114×R

r:範囲(各参加機関の報告値の最大値と最小値の差)

2.114:管理限界のための係数(n=5回)

R:rの合計/参加機関数

z-スコア

z-スコアの評価基準は、以下の通りである。

$|z| \leq 2$: 十分管理されている
(satisfactory)

$2 < |z| < 3$: 疑問点が示唆される
(questionable)

$|z| \geq 3$: 管理されていない
(unsatisfactory)

z-スコアは、以下の式により求めた。

$$z = (x - X) / s$$

x:各参加機関の報告値の平均値

X:各参加機関の報告値の平均値(x)の平均値

s:標準偏差(各参加機関の報告値の平均値(x)の標準偏差)

均質性試験の一元配置分散分析および安定性試験の平均値の比較等の統計処理はSPSS11.5J for Windowsを用いて行い、統計的な検定の有意水準はすべて5%とした。

C. D. 研究結果および考察

1. 試料調製方法の妥当性と試料の均質性

調製した精度管理試料の各農薬は、設定添加量に対して87.3~111.2%の平均回収率であった。変動係数は2.2~5.8%であり、いずれの農薬についても変動係数が10%以内と小さいことから、設定濃度に近似した試料を調製することができた(表3)。

試料の均質性試験のデータ及び解析を行った結果を表4、表5に示した。各々の農薬添加濃度の有意確率は、0.05(5%の有意水準)と比べて、農薬添加濃度に差が認められないので均一な濃度であることを確認した。

2. 試料の安定性

試料の安定性を各機関へ配布後、引き続き-20℃、2ヶ月間の保存試験のデータ及び解析結果を表6、表7に示した。γ-BHC、メキシフェノジドが5%の有意確率で2ヶ月保存後の定量値が小さいという結果となった。またプロモホスは定量値が大きいという結果となった。その違いは著しい影響を及ぼすものではなくγ-BHCの保存前0.0129 μg/gであったが保存後0.0122 μg/g、メキシフェノジド0.0100 μg/gが0.0086 μg/g、プロモホス0.0082 μg/gが0.0089 μg/gで

あり、「精度管理の一般ガイドライン」における回収率に関して少なくとも70%~120%の範囲内を確保しており精度管理試料として支障がないものと判断した。

3. 外部精度管理調査

3-1 分析法、使用機種及び測定条件

外部精度管理調査における参加機関の分析法フローシートを資料1-1~1-9に示した。分析法(SOP)は、厚生労働省一斉分析法に準じた方法が4機関、愛知県法、兵庫県法及びSFE法が各1機関、QuEChERS法変法が2機関で実施された。GC/MS、LC/MS/MSの使用機種及び測定条件を資料2、資料3に示した。

3-2 添加農薬の検出

ほうれんそうに添加した農薬(クロルピリホスメチル、ジクロホップメチル、フェンブコナゾール、プロモホス)は全機関がすべて適正に検出した。各農薬の全体の平均値は良好な結果が得られた。

添加農薬名を明らかにした γ -BHC、クロルピリホス、ダイアジノンの添加濃度は、設定濃度とほぼ一致した。とうもろこしに添加した農薬(シフルフェナミド、シメコナゾール、メキシフェノシド)を全機関がすべて適正に検出した。

3-3 X bar-R管理図及びzスコアによる評価

GC/MS、LC/MS/MS測定におけるX bar-R管理図及びzスコアによる食品毎の評価を以下に述べる。

3-3-1 ほうれんそう(GC/MS)

(1)クロルピリホスメチル(表8、図2)

添加量0.030 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる全機関の平均値は0.0300 $\mu\text{g/g}$ (回収率100.1%)であった。X bar管理図は全機関において「良好」であった。R管理図で適正域を外れたのは1機関、zスコアは絶対値が2以上の機関が1機関あった。

(2)ジクロホップメチル(表9、図3)

添加量0.017 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる測定値では全機関の平均値は0.0168 $\mu\text{g/g}$ (回収率99.1%)であった。X bar管理図は全機関において「良好」であった。R管理図で適正域を外

れたのは1機関あった。zスコアは「良好」であった。

(3)フェンブコナゾール(表10、図4)

添加量0.010 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる測定値では全機関の平均値は0.0126 $\mu\text{g/g}$ (回収率126.5%)と高めであった。X bar管理図とzスコアで適正域を外れたのは2機関、R管理図で適正域を外れたのは1機関あった。フェンブコナゾールの精度(正確度・精密度)が良くなかった原因の一つは、他の添加農薬に比べ保持時間が遅く、ほうれんそう由来の妨害ピークが近くに認められ、SIMでのイオンが、M/Z 129とM/Z 198の2本しかないために妨害ピークと重なったことがあげられた。また、標準のクロマトグラムとのピークがテーリング傾向によりマトリックスマッチングした標準による定量あるいは内部標準物質による補正を行わないと精度が良くないことが考えられた。

(4)プロモホス(表11、図5)

添加量0.008 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる測定値では全機関の平均値は0.0754 $\mu\text{g/g}$ (回収率94.3%)であった。X bar管理図及びzスコアは全機関において「良好」であった。R管理図で適正域を外れたのが1機関あった。

(5) γ -BHC(表12、図6)

添加量0.015 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる測定値では全機関の平均値は0.0130 $\mu\text{g/g}$ (回収率86.6%)であった。X bar管理図、R管理図、zスコアは全機関が「良好」であった。

(6)クロルピリホス(表13、図7)

添加量0.007 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる測定値では全機関の平均値は0.00687 $\mu\text{g/g}$ (回収率98.1%)であった。X bar管理図は、全機関において「良好」であった。R管理図で適正域を外れたのは1機関、zスコアは全機関において「良好」であった。

(7)ダイアジノン(表14、図8)

添加量0.010 $\mu\text{g/g}$ に対し、GC/MSによる測定値では全機関の平均値は0.00932 $\mu\text{g/g}$ (回収率93.2%)であった。X bar管理図は、全機関において「良好」であった。R管理図で適正域

を外れたのは1機関、zスコアは全機関において「良好」であった。

3-3-2 どうもろこし(LC/MS/MS)

(1) シフルフェナミド(表15、図9)

添加量0.020 µg/gに対し、LC/MS/MSによる測定値では全機関の平均値は0.0195 µg/g(回収率97.6%)であった。X bar管理図、R管理図、zスコアは全機関が「良好」であった。

(2) シメコナゾール(表16、図10)

添加量0.015 µg/gに対し、LC/MS/MSによる測定値では全機関の平均値は0.0146 µg/g(回収率97.4%)であった。X bar管理図、zスコアは「良好」であったがR管理図で適正域を外れたのは2機関であった。

(3) メキシフェナミド(表17、図11)

添加量0.010 µg/gに対し、LC/MS/MSによる測定値では全機関の平均値は0.00871 µg/g(回収率87.1%)であった。X bar管理図は全機関において「良好」であった。R管理図で適正域を外れたのは1機関、zスコアは全機関「良好」であった。

3-4 外部精度管理の総合評価

外部精度管理における総合評価を表18に示した。X bar-R管理図およびzスコアによる評価で各検査項目において適正域に入っていない機関が認められた一方で、X bar管理図、R管理図及びzスコアの評価ですべて「良好」が6機関と昨年度と比較しても全体で良好な結果が多かった。6機関の中で2機関は3年連続で「良好」であった。

LC/MS/MSでは適正域に入っていない機関がR管理図で認められたが、全体で良好な結果が多かった。この理由として全機関がGC/MSにおける最終液よりも2~20倍も希釈された最終液になっており、食品マトリックスが薄められたことやLC/MS/MS-MRM測定を選択性によりマトリックス由来のイオンが排除されたことで信頼性の高い結果が得られたものと考えられた。

なお、zスコア評価において、疑問点が示唆された機関($2 < |Z| < 3$)の検査結果及び検

査方法を精査した結果、GC/MS測定用検液の溶媒揮散の可能性等いくつかの検査作業上の課題が明らかになった。それらの課題については、機関毎にシリンジスパイクの添加や検液の重量確認などの是正措置を講じ、検査の信頼性確保を図っている。この様に、本研究における外部精度管理は、品質管理の基礎であるPDCAサイクルの面からも検査精度の維持・向上に効果の高いことが証明された。

4. サロゲート物質による内標準法

R管理図で適正域を超えた機関の分析データ(n=5)の再現性について、サロゲート物質による内標準法の補正で再解析を行った。各機関のサロゲート物質の測定回数毎の提出された結果を表19に示した。機関Gのサロゲート物質の δ -BHC- $^{13}\text{C}6$ 、クロルピリホス-d10、ダイアジノン-d10と補正前の添加農薬毎の挙動を図12に示した。GC/MSにおける測定回数毎のこれらの傾向は、1回目の測定値が一番低く、測定2回目が一番高く、測定3回目~5回目がほぼ同程度である同一傾向を示した。そこで δ -BHC- $^{13}\text{C}6$ で補正した場合、クロルピリホスの相対標準偏差(RSD)は内標準による補正前では16.94であったが、補正後では3.28と精度の向上が見られた。同様にほうれんそうに添加したジクロホップメチル、フェンブコナゾール、ブromoホス、ダイアジノンも同程度の精度の向上が認められた。クロルピリホス-d10、ダイアジノン-d10で補正した場合も同様な結果が得られたことから、R管理図で適正域に入ることが確認できた(表20)。

サロゲート物質を用いた内標準法は分析操作中での挙動が分析対象農薬とほぼ同じであり、分析操作での損失の補正、信頼性を高める上で効果的な方法と考えられた。

5. 農薬データベース等を搭載したGC/MS解析法

ポジティブリスト制度により食品中に残留基準が設定された残留農薬の一斉分析法では、約300種類近くの農薬がGC/MSを用いた方法が採用されている。その主流である

GC/MS-SIM 測定が一律基準における感度をクリアできることから広く用いられている。また、検出感度を高めるために大量注入法を採用した GC/MS-SCAN 法により、定性定量を目的とした農薬データベース等(農薬成分等の保持時間、マススペクトル及び検量線情報のデータベース化)を搭載した GC/MS 解析法も実用化されている。

そこで本外部精度管理試料の農薬無添加及び添加ほうれんそう試験最終液(1 g/mL)を分析機器メーカー3社に送付し、スプリットレス及び大量注入による GC/MS 農薬データベース解析法を行い、定性能力・定量性について検証した。結果を表 21 に示した。添加農薬の種類を全て正しく検出しており定性(スクリーニング)能力が高かった。スプリットレスでは3社間にばらつきがあったが、大量注入による定量値は3社間で全般的によく一致した。設定値と比較すると、クロルピリホスメチル、フェンブコナゾール及びダイアジノンが高めの定量値が得られているが、マトリックスなしの標準液による定量を行っており、マトリックス効果の影響が避けられないためスクリーニングでは高めに検出されたものと推察した。一方、精密定量の際には、おおまかな濃度がわかっているため検量線の作成あるいはマトリックス添加法が軽減されることになる。

最近、中国製冷凍ぎょうざから農薬、化学物質(メタミドホス、ジクロロポス、ベンゼン、トルエンなど)による健康危機事例が発生したが、これらの農薬、化学物質は、データベースに既に登録されている(農薬約300成分、化学物質約700成分)。したがって、検量線の作成、標準溶液の調製・希釈・測定なしにスクリーニング・定量を行うことができる。検出されたもの(あるいは疑わしいもの)については、標準溶液を用いて精密定量を行えることから、データベース解析法はスクリーニング目的とした健康危機管理体制の構築に有用であることが示唆された。

6. LC/TOF/MS の有用性

ポジティブリスト制度により食品中に残留基準が設定された残留農薬は約800種類あり、このうち3分の1近くが HPLC や LC/MS を用いた方法が採用され、一斉分析法には LC/MS 法が有効である。これまで LC/MS 法としては選択性が高く、高感度分析が可能なトリプル四重極型 MS を用いた LC/MS/MS が最も汎用されている。

一方、飛行時間型 MS を用いた LC/TOF/MS は精密質量(ミリマススペクトル)測定が高感度で可能であることから、実試料においてはスクリーニングなど標準物質が無い状況下での正確な化合物の確認に有効である。また、近年ではデジタル技術の発展に伴い、TOF/MS の検出器のダイナミックレンジも拡大しており、定量にも対応可能な装置が出始めている。

そこで高分解能 MS による精密質量測定が可能であり、未知化合物の同定に有効である LC/TOF/MS を用いて、本外部精度管理試料の農薬無添加、添加とうもろこし最終試験液(2 g/mL)を添加農薬名及び添加量を伏せて分析機器メーカーにこの試験液と標準品(PL-7-1)を送付してスクリーニング・定量性について検証した。試料は、それぞれ標準品は PL-7-1、無添加抽出液は S1、農薬を添加した抽出液は S2、S3 とした。なお、オリザリンはネガティブ測定対象であったため除外した。また、ミルベメクチン A3 は (M-18+H)⁺、ブタフェナシル及びアバメクチンは (M+NH₄)⁺、それ以外は (M+H)⁺ を分子量関連イオンとした。

6-1. データベース検索結果

LC/TOF/MS ソフトウェアのデータベースサーチによる標準品、マトリックスブランク試料(S1)及びスパイク試料(S2、S3)のデータベース検索結果を表 22 に示した。標準品では 10 ng/mL 以上で、イソキサフルトールを除き、全農薬をヒットすることが可能であった。また、添加試料中から検出した農薬は、表より順にシフルフェナミド、メキシフェノジッド、シメコナゾールであった。これらのヒットした化合物の詳細(化

合物名、組成式、精密質量、保持時間、誤差など)の表示も可能であった。

6-2. 標準品と検出農薬のMSスペクトル

農薬標準品及びとうもろこし抽出物にスパイクした試料(S2)中から検出した農薬ピークのマススペクトルを図13に示した。S2から検出したピークのマススペクトルと、農薬標準品(シフルフェナミド、メキシフェノジッド、シメコナゾール)のマススペクトルは良く一致していることが確認できた。

6-3. LC/TOF/MSにおける定量限界

10 ng/mLの標準品から計算したピークのS/N及びS/N 3の検出下限値(DL)をまとめて示した(表23)。定量値の計算では、例えばチアベンダゾール $C_{10}H_{17}N_3S$ の場合、 $M+H^+$ の理論的精密質量は m/z 202.0433となる。実際に測定した値は m/z 202.0430であった。この m/z 202.0430を中心に、 ± 0.01 の範囲で抽出したマスキロマトグラムから定量値を計算している。添加試料中から検出した農薬は、シフルフェナミド 46.6 ng/mL、メキシフェノジッド 19.7 ng/mL、シメコナゾール 35.4 ng/mLとなり、試料が2倍濃縮であった事から、シフルフェナミド 23.3 ng/mL(回収率116.5%)、メキシフェノジッド 9.85 ng/mL(回収率98.5%)、シメコナゾール 17.7 ng/mL(回収率118%)と設定濃度とよく一致した。

7. 標準品の正確さ・適正な分析法・GC/MS 装置状態の良好さについて

7-1. 標準品

添加名を明らかにした γ -BHC、クロルピリホス、ダイアジノンの3種類は各機関の標準液により添加濃度を求めた。これは検査精度に影響を及ぼす要因の一つである標準品の正確さを確認するために行った。これらの添加濃度が設定濃度とほぼ一致していたことから各機関における標準溶液の正確さが確認できた。

7-2. 分析法

分析法(SOP)は、厚生労働省一斉分析法に準じた方法が4機関、愛知県法、兵庫県法及びSFPE法が各1機関、QuEChERS法変法が2

機関で実施された(資料1-1~1-9)。厚生労働省一斉分析法を用いた機関が半数あった。一方で「食品中に残留する農薬等に関する妥当性評価ガイドライン」によるガイドラインに沿った方法で、試料の状態にあわせた前処理と分析を行いかつ測定結果の信頼性を確保した独自法も半数の機関で実施された。

7-3. GC/MS システムの「良好さ」

GC/MS システム状態の良好であることの客観的かつ簡便な評価を目的としてGC/MSシステム評価用試料(クライテリアサンプル)を各機関に配布し、装置の立ち上げ後、精度管理試料測定前と測定後の3回のピーク形状(クロマトグラム)とピーク強度(定量値)を各機関から提出を求めた。その注入履歴を表 24、注入口ライナーの状態を表 25、全機関の定量値を表 26 に示した。

GC/MS システム中に不具合を生じると顕著に影響が現れる化合物の測定結果を用いて、各機関における装置状態の推定を試みた結果を図 14 に示した。ここでは GC/MS システムで試料が通過する箇所を注入口、カラム(入り口側)およびカラム(出口側)に大別した。不具合の箇所によって影響を受ける化合物は異なるが、ここで用いた化合物と不具合と相関性の高い箇所およびその際に見られる現象の組み合わせは以下の通りである。なお、カッコ内はベースイオンの質量数である。

カプタホール(79):注入口、感度低下
イソキサチオン(105):注入口(およびシステム全体)、感度低下
ペントクロロフェノール(以下 PCP)(266):カラム(注入口側)、テーリング
2,4-ジニトロアニリン(以下 2,4-DNA)(183):カラム(注入口側)、テーリング
シマジン(201):カラム(注入口側)、テーリング
フェニトロチオン(277):カラム(MS側)、感度低下
クロルピリホスメチル(286):保持時間、リファレンス

カプタホールとイソキサチオンでは、一般的

に前者の方が感受性が高い。また、PCP と 2,4-DNA は、カラム入り口側の活性点に影響されるが、その化学的性質上、前者は塩基性化、後者は酸性化に対して特に感受性が高い。また両化合物ともカラムだけでなく注入口ライナーの状態に影響されることもある。シマジンは両者に比べて影響の受け方が小さく、通常の農薬分析ではこのピークが対称であれば、大きな問題が生じることは少ない。

感度比較については、ピーク面積の絶対値によるのは機関間では困難な面があったので、相対強度で行った。上記化合物の中では、クロルピリホスメチルがもっとも装置状態の影響を受けにくいと判断し、これを対照化合物として使用した。相対強度として同化合物と対象となる化合物のそれぞれベースイオンによるマスプロファイルのピーク面積比を求めた。ただし、両者のベースイオン間で質量の差が大きい場合には使用した MS の特性(マススペクトルのバランス)の影響により、機関間での比較を難しくする可能性があったので、カプタホールにはイソキサチオンを 2,4-DNA にはシマジンをそれぞれ対照化合物とした。なお、イソキサチオンおよびシマジンともシステム状態の影響により感度が変動する可能性があるが、ここではクロルピリホスメチルとの相対強度が概ね安定していたので、対照化合物として使用できると判断した。なお、イソキサチオンについては、本実験ではクロルピリホスメチルよりも適当な対照化合物が無いと判断しそのまま同化合物を対照に用いた。

9 参画機関が検出した定量値・ピーク形状は概ね良かったことから、ほぼ良好な状態の GC/MS による測定が行われていたと推察した。また、9 機関とも信頼性のあるデータが得られる要因である「正確な標準品」を用いて「適正な分析法」を実施し「良好な状態の装置」で分析が行われており、ほとんどの化合物で問題点の無いことが示唆された。

8. 一律基準値の考察

一律基準値が 0.01 ppm と定められたポジテ

イブリスト制導入に呼応した農産物中の一斉分析法における農薬の測定感度、添加回収率等の検討結果を厚生労働省最終番号順、検出下限値、定量下限値および参照出典の順に参考資料 A~D に記載した。

GC/MS 対象農薬では 244 農薬(異性体等含む 274 種類)、LC/MS/MS 対象農薬 118 農薬(異性体等含む 127 種類)が、機器の測定感度から一律基準を満足していた。添加回収率では農産物 28 種類(延べ 47 種類)について延べ 352 農薬の回収率の良否が確認できた。本研究は地方衛生研究所の相互協力体制、情報の共有、精度管理を含む技術能力の向上等、極めて有効となりうることを示しており、今後の精度(正確度・精密度)を維持・向上し農薬検査の拡大の方向性を可能とすることが期待された。

9. 国際精度管理手法との整合性

本研究は、できる限り国際規格で定められた精度管理手法との整合性を考慮しながら実施した。国際規格との整合性について検討した結果を以下に述べる。

9-1. 国際規格との整合の必要性

近年のわが国の試験や検査方法は、様々な国際規格との整合性を要求される。厚生労働省が平成 19 年 11 月 15 日付で通知した「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」においても、国際規格 ISO/IEC 17025 (JISQ 17025: 試験所及び構成機関の能力に関する一般要求事項)等に準じた手法を採用している。検査に係る国際規格の中には、外部精度管理に用いる技能試験の実施やデータ評価に関する技術的事項を定めているものもあり、ここでは、それらに記載されている手法との整合性について検討した。

9-2 試験所間比較の国際的手法

9-2-1 スキームについて

国際規格 ISO/IEC Guide 43 (JISQ 0043-1 試験所間比較による技能試験)では、複数の検査機関で測定結果を比較する枠組み(スキーム)について提唱している。スキームには、同

程度の技術レベルの試験所間で実施するラウンドロビン型スキーム等と既に内部精度管理で検査精度を担保できている検査機関を1箇所定めて実施する共同実験型スキームがある。共同実験型スキームを実施する際には、一つの物質源から無作為に選り出した小分け試料(sub-sample)が用いられるが、sub-sampleは、提供される試験品目の有意の変動に帰因されないように十分に均質であることが必須条件となっている。

本研究では、3年間の研究成果として、均質性の保たれたsub-sampleの調製に成功しているため、国際規格と整合性のとれた共同実験型スキームによる試験所間比較を可能としている。また、試料を配布する実施機関は、表3から表7に示すように内部精度管理による精度保証が既に為されているため、Guide43に規定された基準を十分満足した試験所間比較となっている。

9-2-2 報告データの真度・精度の評価に関する統計的手法

Guide43の付属書には、データ評価のための統計的手法が記載され、Robust法、En数、zスコアが挙げられている。

Robust法は、データ系列が極端なはずれ値を含んでいる場合に、その値に影響されない頑健な統計手法(robust statistical technique)として定められている。ただし、今回のブラインド試験の様に、極端な値が認められない場合には、zスコアによる評価のみで十分な妥当性が得られていると考えられる。

En数は、参加試験所から報告された結果について、参照試験所及び参加試験所の精度(ばらつき)を加味した上で、その真度(正確さ)を評価する手法である。En数は、以下の計算式で求められる。

$$En = (x - X) / (U_{lab}^2 + U_{ref}^2)^{1/2}$$

x: 参加試験所から報告された平均値

X: 参照試験所の平均値

U_{lab} : 参加試験所の不確かさ

(拡張不確かさ $k=2, 2\sigma$)

U_{ref} : 参照試験所の不確かさ

(拡張不確かさ $k=2, 2\sigma$)

En数による測定結果の評価は、En数の絶対値が ≤ 1 の場合に満足、 > 1 の場合に不満足と評価する。

zスコアは、わが国でも一般化されている評価手法であり、今回のブラインド試験でも妥当な評価結果を与えた。zスコアは、以下の計算式で求められる。

$$z = (x - X) / S$$

x: 参加試験所の平均値

X: 付与された値(例えば平均値)

S: 全結果のばらつきの推定値
(例えば標準偏差)

共同実験スキームの評価では、zスコアの絶対値が、2以下で満足、2を超え3未満で疑義あり、3以上で不満足と評価される。ここで、付与された値(X)にメジアン、ばらつきの推定値(S)に正規四分位数範囲を使用すると、頑健な手法(robust法)となる。

なお、 \bar{X} 管理図は、平均値と標準偏差の信頼区間を推定し、 \bar{X} で真度(正確さ)をRで精度(ばらつき)を各々個別に評価することができるため、今回のブラインド試験においては、試験所あるいは物質による系統誤差を見出す上で非常に有用であった。

9-2-3 試験所間比較結果の視覚化

データの視覚化手法としては、zスコアの順に試験所を並べ替えバーグラフで表すバークヤートやユードン・プロットなどがGuide43の付属書で推奨されている。どちらも、検査結果の含んでいる誤差が、系統誤差(systematic error/bias error)なのか偶然誤差(random error)なのかを推測するために用いられるものであり、今回のブラインド試験のように、正規確立プロットやZスコア等で十分系統誤差が見出される場合は、不要と考えられた。

9-3 検査法の検出限界と定量限界

検査に用いる分析法の検出限界は、IUPACでは「合理的な確実性(reasonable certainty)を持って検出できる最小の測定値」、米国化学