

わかった。しかし、実試料の検量線には、脂質以外の夾雑成分の関与が考えられ、従来の固相抽出法である Oasis MCX による精製法と、更にアフィニティーカラムで処理した場合のいずれにおいても十分な精製効果は得られなかった。今後、試料精製に関しては更なる検討が必要であった。

#### E. 結論

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。

#### 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

- (1) 北村 渉, 斉藤貢一, 椛沢圭介, 岡山明子, 堀江正一, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 中澤裕之, 食肉中ゲンタマイシン測定におけるアフィニティーカラムの有用性の検討, 第 51 回 日本薬学会関東支部大会(2007 年 10 月, 東京)
- (2) 北村 渉, 斉藤貢一, 椛沢圭介, 岡山明子, 加藤美穂子, 小平 司, 堀江正一, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 中澤裕之, アフィニティークロマトグラフィーを用いた食品中残留抗菌性物質の試料精製, 日本薬学会第 128 年会(2008 年 3 月, 横浜)

#### 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

R.S.D. 14.1%

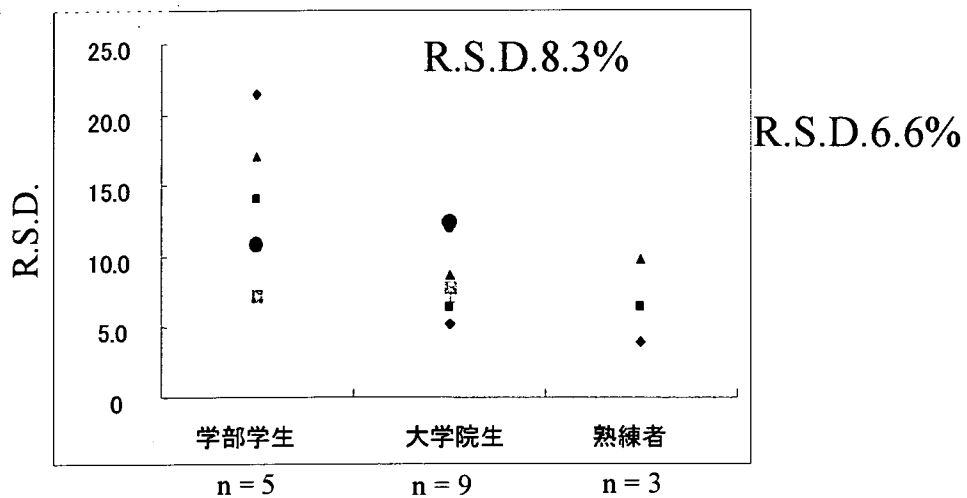


Fig.1 操作の習熟度による測定値の影響

(抗体非固定マイクロプレート使用)

(ニューキノロン測定用マイクロプレート使用)

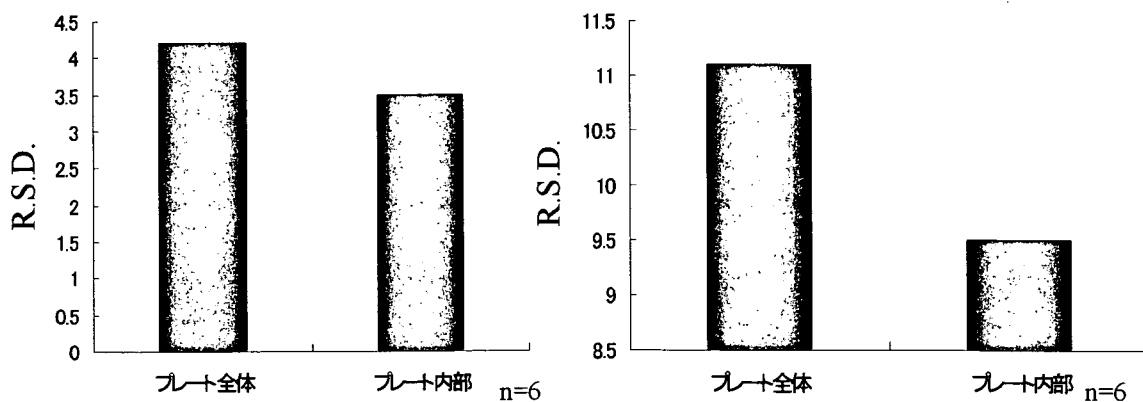


Fig.2 ELISA 測定におけるエッジ効果の検討

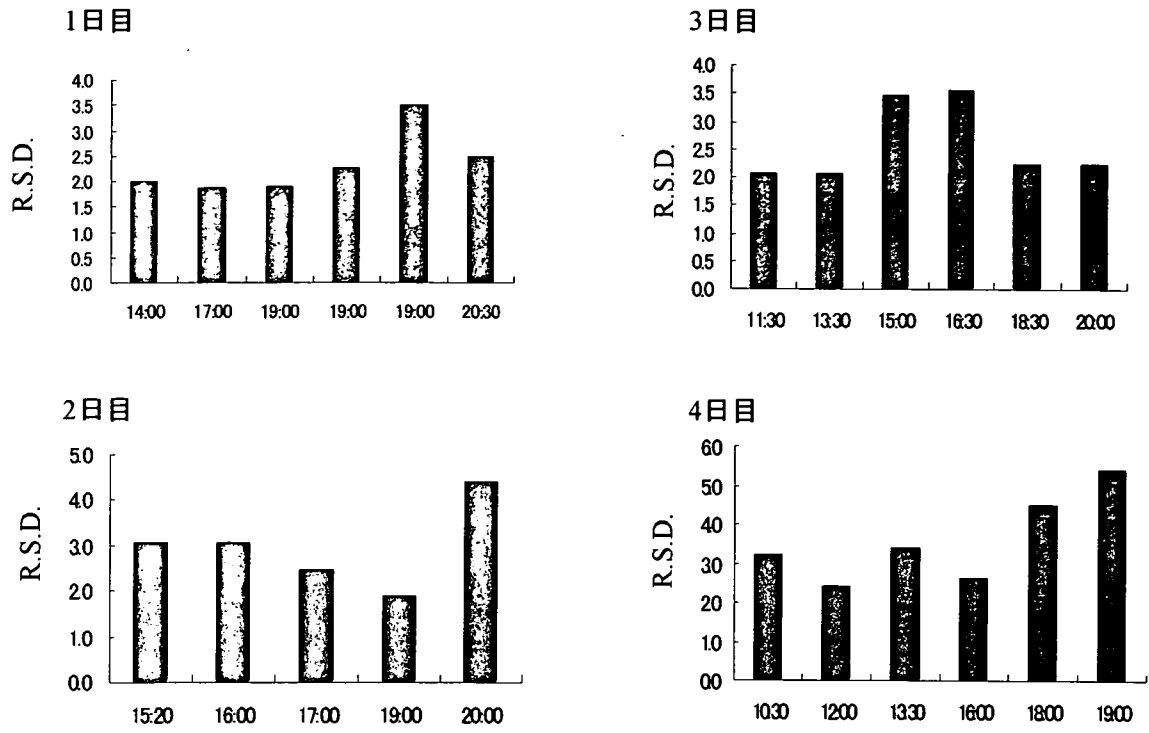


Fig.3 日内変動の検討

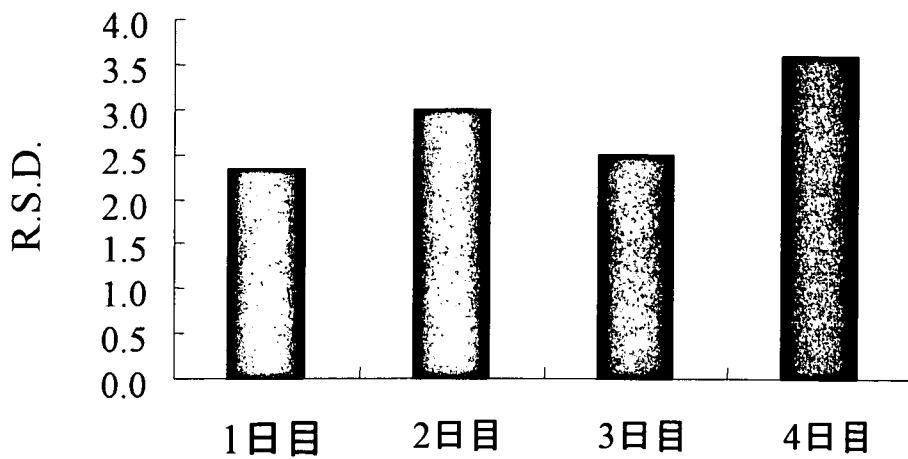


Fig.4 日差変動の検討

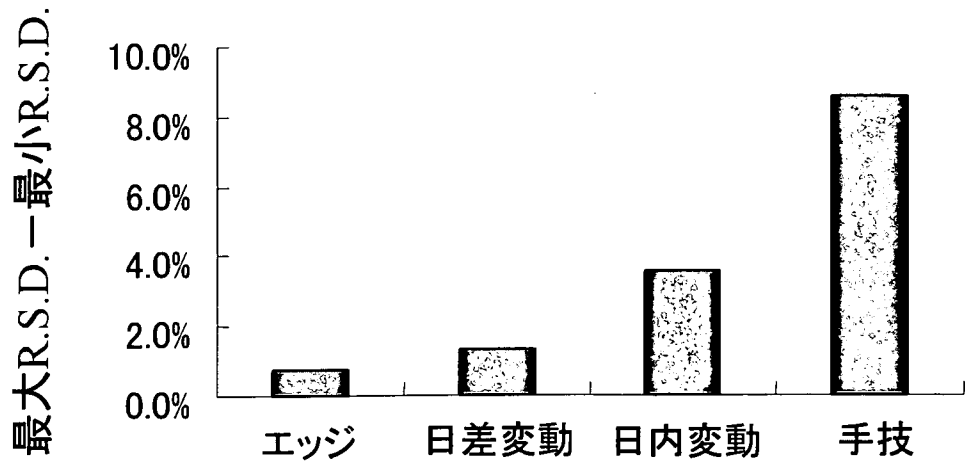


Fig. 5 ELISA 測定値の変動要因の比較

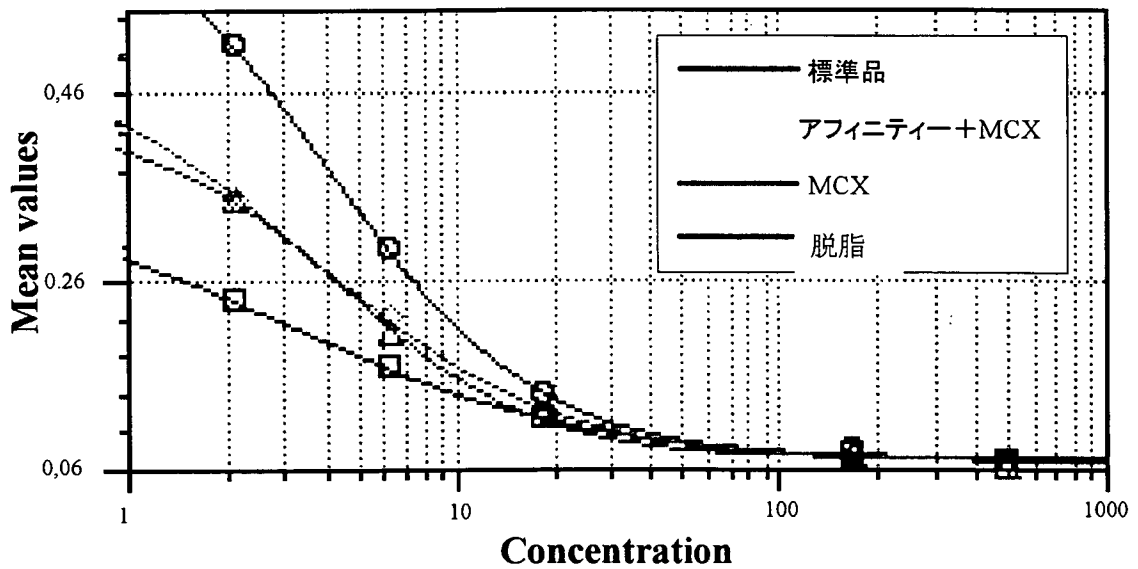


Fig. 6 試料クリーンアップによるELISA 測定値への影響比較

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

市販農薬標準品の純度比較に関する研究

分担研究者 松木 容彦

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

市販農薬標準品の純度比較に関する研究

主任研究者	遠藤 明	(財)食品薬品安全センター
分担研究者	松木 容彦	(社)日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	藤巻 照久	神奈川県衛生研究所
協力研究者	高橋 淳子	(財)食品薬品安全センター
協力研究者	藤代 良彦	(財)千葉県薬剤師会検査センター
協力研究者	小林 文亮	(社)日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	伊藤 禎啓	(社)日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	小林 保美	(社)日本食品衛生協会食品衛生研究所

研究要旨

わが国では、農薬分析法のために用いられる農薬標準物質の提供においては、平成9年の通知、「残留農薬分析用標準品の情報提供に関する指針について」によって、供給メーカーが扱う標準品の品質情報に関わる資料を使用者に提供することが義務付けられ、市販されている標準品には、その標準品の純度が添付されている。また、我が国では、一般的に、公的試験に標準品を用いるとき、定められた純度以上のものを用いるという規格が設けられている。しかし、わが国の「純度」の表示や純度算出法に関する指針等は示されていないため、純度算出する方法はメーカーごとに異なり、標準品の純度表示値が必ずしも正確であるとは言い難いものが認められる。したがって、実際の検査において、異なるメーカーから購入した標準品を用いて同一試料について検査した場合に異なる検査結果が得られる事態が生じたり、標準品の精製度の不十分さ、あるいは不適切に表示された純度が要因で、検査結果の信頼性が確保できない事態が生じる可能性に加え、表示に対する不信感を使用者に抱かせることに繋がりがかねない。

本研究においては、標準品販売における国内の代表的なメーカー3社から市販されている残留農薬検査用標準品を入手し、ガスクロマトグラフィー(GC)及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて純度確認試験を行い、各メーカー表示の純度値との比較を試みた。また、特に輸入食品けんさに用いる公定試験法における標準品の基準の観点から、各メーカーの残留農薬検査用標準品の純度について調べた。

## A. 研究目的

平成9年から平成11年度の3年間に亘り、3社のメーカー(林純薬工業、関東化学、和光純薬工業)が市販している農薬標準品29種について品質評価試験を実施した。その結果、各メーカーが添付資料に提示している表示純度に対する含量比が HPLC 及び GC 法ともに2%以上かけ離れた値を示した標準品が数種確認された。また、GC 法により良好な結果を与えた標準品の中にも HPLC 測定において、測定波長を変化させた時、標準品の含量比が著しく低下した標準品も数種確認され、通常の検査条件では確認できない、標準品と吸収スペクトルが異なる不純物質の存在が認められた。

一方、標準品の純度については、公定試験法に標準品の純度が規定されているものの、一部、それを満たしていない標準品が現在も市販されているのが実情である。また、各メーカーで選択する純度測定法は必ずしも同一ではなく、各社で使用機器、算出法、表示の仕方などが異なっており、純度の比較及び評価は容易ではないことから、ある標準品について同じ純度が表示されていたとしても、実際に同じ純度とは限らない。そこで、本研究においては、国内の代表的な試薬メーカー3社の農薬標準品について、統一した分析条件下で HPLC と GC の両測定法により純度測定を行い、各メーカーの表示している純度との比較を試み、各メーカーの表示純度の確認を行った。

## B. 研究方法

### 1 標準品

メーカー3社から市販されている標準品を入手し用いた。(イソキサチオン、イソキサチオンオキソン、イプロベンホス、キントゼン、ジクロラン、ジフェナミド、シマジン、ジメタメトリン、ダイムロン、ピリダフェンチオン、フサライド、フルミオキサジン、プロフェノホス、ベンフルラリン、ホスメットの15物質、45種)

### 2 使用機器及び測定条件

#### (1) 使用機器

検出器の特性を考慮し、HPLC—紫外分光高度型検出器(UV)及び、GC—水素炎イオン化検出器(FID)を純度測定に用いることとした。また、HPLC においては、多波長検出器(PDA)を用いて、測定波長、波長以外の波長で検出される不純物質の確認を行った。

#### (2) 測定条件

##### GC—FID

注入モード:スプリットレス

注入口温度:300°C

カラム:キャピラリカラム 内径0.32 mm、長さ30 m、膜厚1.5 µm

カラムオープン温度:180°C(1分)→10°C/分→300°C(17分)

キャリアガス:ヘリウム

流量:1.0 mL/分

注入量:1 µL

なお、昇温プログラム中に標準品のピークが溶出しないう場合は、必要に応じてキャリアガス流量を上げて対応した。また、溶出時間が早すぎる被験物質については、初期温度を下げて溶出時間の調節を行った。

##### HPLC—UV

カラム:WakoPak Navi C-18 内径4.6 mm、長さ250 mm

カラム温度:40°C

移動相:10%アセトニトリル→90%アセトニトリルにリニアで20分かけてグラジエント後10分溶出。

流速:1.0 mL/分

測定波長:各標準品の極大波長及び200 nm

注入量:20 µL

多波長検出器:200-600 nm

なお、このプログラム中に標準品のピークが溶出しないう場合は、90%アセトニトリルで溶出するまで流しその溶出時間から10分モニタリングした。溶出時間が早すぎる場合には、グラジエント条件を変更し、溶出時間を調節した。

### 3 標準溶液の調製

#### (1) 標準品の秤取

0.1 mg 以下まで測定できる精密天秤を使用し、マイクロ秤量ロート(ホウ珪酸ガラス製)に約 100 mg を精密に量り取る。但し、粘性が高い等の理由で、必要量が採取できない場合においては、10 mg を下回らない範囲で、秤取量を減らした。

#### (2) 標準溶液(被験溶液)の調製

採取した標準品を各溶媒で 100 mL 容褐色メスフラスコに移し入れ、100 mL に定容し、1000 µg/mL 溶液を調製し、被験溶液とする。(1)で秤取量を減らしている場合には、それに応じて、定容量を変え、1000 µg/mL 溶液を調製した)

通常、用いる溶解液は、GC 測定用標準溶液では、アセトン、HPLC 測定用標準溶液では、アセトニトリルとした。ただし、溶解できない場合には、その他の溶媒を用いて溶解性について検討した。

#### (3) 低濃度溶液の調製

3 社のうち任意に選択した 1 社の被験溶液 1 mL をホールピペットで 100 mL 容褐色メスフラスコに取り、各溶媒で定容する。さらに、そこから 1 mL をホールピペットで 100 mL 容褐色メスフラスコに取り、各溶媒で定容し、被験溶液の 1 万分の 1 の低濃度溶液(0.1 µg/mL)を調整した。原則として、低濃度溶液は SN10 程度を満たすこととし、それより小さい場合には、0.5、1、2 µg/mL と順次濃度を上げていき、SN10 程度を満たす濃度の溶液を低濃度溶液と定めた。

### C. 試験操作

#### 1 測定濃度の決定

##### (1) 直線性の確認

3 社のうち任意に選択した 1 社の被験溶液を適宜希釈し、10~1000 µg/mL の溶液を調製して検量線を作成し、直線性を確認した。

##### (2) 直線性が取れない場合の標準溶液の再調製

10~1000 µg/mL で直線性が得られない場合には、直線性の得られる範囲を確認し、直線性の得られる最も高い濃度の溶液を被験溶

液とした。その場合、低濃度溶液は原則として被験溶液の 1 万分の 1 とし、SN10 程度を満たすことが出来ないものについては、順次濃度を上げて SN10 が得られる濃度を低濃度溶液とした。

#### 2 測定方法

##### (1) GC による測定

低濃度溶液、3 社の被験溶液の順で、それぞれ 5 回、GC-FID による測定を行った。被験溶液によるキャリーオーバーを事前に確認したがクロマトグラム上では見られなかったため、溶媒のみによるブランクランは行わなかった。

##### (2) HPLC による測定

低濃度溶液、3 社の被験溶液の順で、それぞれ 5 回、HPLC-UV-PDA による測定を行った。被験溶液によるキャリーオーバーを事前に確認したがクロマトグラム上では見られなかったため、溶媒のみによるブランクランは行わなかった。

#### 3 試験結果の処理

##### (1) SN 比の算出法

被験物質ピークの前後 30 秒に現れるノイズの最大値(E1)と最小値(E2)との幅の 2/5 をノイズ幅(N)とする。一方、ノイズの中央値(C)をベースラインとし、ベースラインのノイズを元にピークトップ(D)を決めて、この幅をピーク高さ(S)とする。

##### (2) 不純物質ピークの採否

各被験物質の低濃度溶液を 5 回繰り返し測定して得られたピーク面積の平均値を基準とし、それ以上の面積を有するピークを不純物として採用した。

##### (3) 含量の計算

各被験溶液(1000 µg/mL 溶液)又は直線性を示すまで希釈した溶液について得られた、HPLC 及び GC のクロマトグラム上の被験物質及び不純物質ピークの総面積に対する被験物質面積比を求め、5 回の平均値を被験物質の含量(%)とした(表 1)。

##### (4) 含量比較

各標準品の HPLC 及び GC による測定より



求められた純度と、各メーカーの純度表示値又は添付情報より得た標準品の純度表示値とを比較し、それらの表示値に対する含量比(%)を求めた(表 2)。

#### D. 結果及び考察

1) 厚生労働省より通知された「食品に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品の成分である物質の試験法」(以下、「通知法」とする)において規定されている各標準品の純度と各メーカーより提供された標準品の添付文書等に表示された純度の比較を表 1 に示した。

通知法の一斉分析法では、標準品の純度については、「純度が明らかなもの」としており、明確に規定されていないため、個別試験法が定められている標準品 7 種について比較を行ったところ、3 社の標準品 21 種中、4 種のメーカーの表示した純度が通知法の個別試験法で規定された純度を満たしていなかった。

2) 各メーカーから提供された標準品について、我々が設定した条件で純度を測定した結果と、提供された標準品に表示された純度の比較を表 2 に示した。

各標準品に表示された純度と、我々が GC 又は HPLC で測定した純度との割合を含量比として表し、測定値の室間誤差として $\pm 2\%$ までのばらつきを許容範囲の基準として評価したところ、HPLC における純度測定結果においては、15 物質の標準品 45 種中、44 種(98%)、GC における純度測定結果においては、35 種中、31 種(89%)については、表示された純度と同等の測定結果が得られた。なお、我々が設定した GC の条件下での純度測定において熱分解等が生じ、著しく低い結果が得られた標準品については、今回の比較から除外した。

3) 通知法に規定された純度及び定量に用いる分析機器、我々が測定した標準品の純度を表 3 に示した。

各メーカーから提供された標準品について HPLC 及び GC を用いて測定した時、両機器の純度結果が 2.0%以上の違いが見られた標

準品は、35 種中 6 種あり、純度測定に用いる分析機器の違いによって得られる純度に大きな違いが生じることが示された。また、我々が測定した純度結果に基づき、通知法に規定された純度との比較をおこなったところ、HPLC における純度測定結果においては、標準品 21 種中、3 種が通知法で規定された純度を満たしていなかったが、GC における純度測定結果では、比較した標準品 15 種全てが、通知法に規定された純度を満たしていた。したがって、純度測定においては、使用する分析機器の種類により純度結果が異なり、いずれの結果を用いるかにより規定された純度を満たす場合と満たさない場合が生じることが示唆された。

#### E. まとめ

検査機関においては、検査に用いる標準品の純度はメーカー表示値の信頼を前提にしており、また定量分析における標準品は、定量値算出の基になっており、その表示純度は定量値の信頼性の根幹を成している。さらに、行政検査等においては測定の結果が違反の有無の判定に用いられることから、表示される純度の正確性が重要である。

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たり、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。また並行して、標準品の純度に関する情報が、カタログ等から明確になるような整備を求めたい。

#### 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

表1 通知法中の個別試験法に規定された各標準品の規格と各メーカーの表示純度

標準品名	通知法に規定された純度	A社	B社	C社
イプロベンホス	98%以上	99.9	96.0	100.0
イソキサチオンオキソン	純度が明らかなもの	98.5	94.6	97.8
イソキサチオン	純度が明らかなもの	99.2	99.9	99.8
ジクロラン	純度が明らかなもの	97.2	99.3	99.8
キントゼン	98%以上	99.9	95.9	99.3
シマジン	純度が明らかなもの	99.9	99.9	99.6
ダイムロン	96%以上	99.9	99.9	100.0
ジメタメリン	純度が明らかなもの	96.9	96.1	99.9
ジフェナミド	純度が明らかなもの	99.9	99.9	100.0
ピリダフェンチオン	98%以上	98.3	99.9	100.0
フサライド	純度が明らかなもの	99.9	99.7	99.9
フルミオキサジン	99%以上	99.5	99.9	99.5
プロフェノホス	99%以上	95.0	98.4	98.7
ベンフルラリン	98%以上	99.9	99.8	100.0
ホスメット	純度が明らかなもの	97.6	99.5	98.5

単位：%

※通知法に規定された純度は、当該物質に対する個別試験法がある場合には、その中で規定された純度を用いた。

表2 各標準品に表示された純度と GC 及び HPLC で測定した純度の割合(含量比%)

		表示 %	分析機器	LC 含量比 %	GC 含量比 %
イプロベンホス	A 社	99.9	GC	100.1	99.5
	B 社	96.0	LC	97.8	103.3
	C 社	100.0	GC	99.9	99.2
イソキサチオンオキソン	A 社	98.5	GC	99.6	101.5
	B 社	94.6	不明	101.2	-
	C 社	97.8	GC	98.4	102.2
イソキサチオン	A 社	99.2	GC	100.6	100.8
	B 社	99.9	不明	99.6	95.0
	C 社	99.8	GC	99.7	100.2
ジクロラン	A 社	97.2	GC	101.2	102.9
	B 社	99.3	GC	100.2	95.0
	C 社	99.8	GC	100.0	99.7
キントゼン	A 社	99.9	GC	100.1	100.1
	B 社	95.9	GC	98.4	102.5
	C 社	99.3	GC	100.0	100.7
シマジン	A 社	99.9	LC	99.8	100.1
	B 社	99.9	LC	99.8	100.1
	C 社	99.6	GC	100.1	100.0
ダイムロン	A 社	99.9	LC	100.1	
	B 社	99.9	LC	100.1	
	C 社	100.0	LC	100.0	
ジメタメリン	A 社	96.9	GC	100.3	100.2
	B 社	96.1	LC	101.0	100.8
	C 社	99.9	GC	99.9	99.9
ジフェナミド	A 社	99.9	GC	100.0	99.9
	B 社	99.9	LC	100.0	99.9
	C 社	100.0	GC	99.9	99.8
ピリダフェンチオン	A 社	98.3	GC	101.7	100.1
	B 社	99.9	GC	100.1	98.2
	C 社	100.0	GC	100.0	97.8
フサライド	A 社	99.9	GC	100.0	100.0
	B 社	99.7	不明	100.3	100.3
	C 社	99.9	GC	100.0	100.1
フルミオキサジン	A 社	99.5	LC	99.9	99.7
	B 社	99.9	不明	99.3	99.4
	C 社	99.5	GC	99.7	99.7
プロフェノホス	A 社	95.0	GC	103.2	
	B 社	98.4	LC	100.2	
	C 社	98.7	GC	100.6	
ベンフルラリン	A 社	99.9	GC	100.0	100.1
	B 社	99.8	LC	100.0	100.2
	C 社	100.0	LC	99.9	100.0
ホスメット	A 社	97.6	GC	102.0	
	B 社	99.5	LC	100.0	
	C 社	98.5	GC	100.5	

表3 HPLC 又は GC による純度測定結果

標準品名	通知法に規定された純度	測定機器	A 社	B 社	C 社
	通知法で使用する定量機器				
イプロベンホス	98%以上	HPLC	100.0	93.9	99.9
	GC-FPD	GC	99.4	99.2	99.2
イソキサチオンオキソン	純度が明らかなもの	HPLC	98.1	95.7	96.2
	GC/MS(一斉分析)	GC	100.0	—	100.0
イソキサチオン	純度が明らかなもの	HPLC	99.8	99.5	99.5
	GC/MS(一斉分析)	GC	100.0	95.0	100.0
ジクロラン	純度が明らかなもの	HPLC	98.4	99.5	99.8
	GC/MS(一斉分析)	GC	100.0	94.4	99.6
キントゼン	98%以上	HPLC	100.0	94.4	99.3
	GC-ECD	GC	100.0	98.3	100.0
シマジン	純度が明らかなもの	HPLC	99.7	99.7	99.7
	GC/MS(一斉分析)	GC	100.0	99.7	100.0
ダイムロン	96%以上	HPLC	100.0	100.0	100.0
	HPLC-UV	GC			
ジメタメトリン	純度が明らかなもの	HPLC	97.2	97.1	99.8
	GC/MS(一斉分析)	GC	97.1	96.9	99.8
ジフェナミド	純度が明らかなもの	HPLC	99.9	99.9	99.9
	GC/MS(一斉分析)	GC	99.8	99.8	99.8
ピリダフェンチオン	98%以上	HPLC	100.0	100.0	100.0
	GC-FPD	GC	98.4	98.1	97.8
フサライド	純度が明らかなもの	HPLC	99.9	100.0	99.9
	GC/MS(一斉分析)	GC	99.9	100.0	100.0
フルミオキサジン	99%以上	HPLC	99.4	99.2	99.2
	GC-FTD 又は NPD	GC	99.2	99.3	99.2
プロフェノホス	99%以上	HPLC	98.0	98.6	99.3
	GC-FPD	GC			
ベンフルラリン	98%以上	HPLC	99.9	99.8	99.9
	GC-ECD	GC	100.0	100.0	100.0
ホスメット	純度が明らかなもの	HPLC	99.6	99.5	99.0
	GC/MS(一斉分析)	GC			

参考 通知法で定量に用いる機器と各メーカーが純度測定に用いた機器

標準品名	通知法で定量に用いられる機器	A社	B社	C社
イプロベンホス	GC-FPD	GC	LC	GC
イソキサチオンオキソン	GC/MS(一斉分析)	GC	不明	GC
イソキサチオン	GC/MS(一斉分析)	GC	不明	GC
ジクロラン	GC/MS(一斉分析)	GC	GC	GC
キントゼン	GC-ECD	GC	GC	GC
シマジン	GC/MS(一斉分析)	LC	LC	GC
ダイムロン	HPLC-UV	LC	LC	LC
ジメタメトリン	GC/MS(一斉分析)	GC	LC	GC
ジフェナミド	GC/MS(一斉分析)	GC	LC	GC
ピリダフェンチオン	GC-FPD	GC	GC	GC
フサライド	GC/MS(一斉分析)	GC	不明	GC
フルミオキサジン	GC-FTD 又は NPD	LC	不明	GC
プロフェノホス	GC-FPD	GC	LC	GC
ベンフルラリン	GC-ECD	GC	LC	LC
ホスメット	GC/MS(一斉分析)	GC	LC	GC

参考 LCにおける純度測定の際に本研究で用いた波長と各メーカーが用いた波長

標準品名	本研究で純度測定に用いた波長	A社	B社	C社
イプロベンホス	200nm		215nm	
イソキサチオンオキソン	260nm			
イソキサチオン	260nm			
ジクロラン	358nm			
キントゼン	212nm			
シマジン	220nm	220nm	226nm	
ダイムロン	244nm	254nm	254nm	262nm
ジメタメトリン	220nm		218nm	
ジフェナミド	210nm		200nm	
ピリダフェンチオン	318nm			
フサライド	307nm			
フルミオキサジン	290nm	309nm		
プロフェノホス	277nm		216nm	
ベンフルラリン	276nm		270nm	274nm
ホスメット	294nm		220nm	

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

食品中ダイオキシン類検査の外部精度管理用適正調査試料  
の作成および評価法の検討

分担研究者 米谷 民雄

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品中ダイオキシン類検査の外部精度管理用適正調査試料の作成および評価法の検討

分担研究者 米谷 民雄 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長  
協力研究者 松田 りえ子 国立医薬品食品衛生研究所 食品部室長

研究要旨

6 カ所のダイオキシン類分析機関に試料を配布し、報告された分析結果を比較した。試料として、魚(タチウオ)を凍結乾燥し均一に混合した粉末を用いた。今回使用した試料の TEQ は 26 pg/g 程度であり、食品関連の試料としては比較的高濃度であった。試験室間の RSD% は 6.2% であり、これまでの技能試験と比較して同等の精度であった。異性体によっては、試験室間の RSD% がかなり大きいものがあり、外れ値の存在が考えられた。参加機関数が減少しているため、平均値及び標準偏差のような統計量は外れ値の影響を受けて、変動しやすくなっていると考えられるが、検定で除外するとデータ数が減少し、評価結果の信頼性が低下する。そこで、外れ値の影響の少ない頑健な解析法を適用し、通常の計算法で得られた結果との比較を行った。

A. 研究目的

ヒトへのダイオキシン類曝露の主要な経路は食品であると考えられており、ダイオキシン類による健康への影響を精密に評価するためには、多数の食品の分析値や、トータルダイエツト試料を分析した結果から、食品に含まれるダイオキシン類の量の分布を知り、食品からのダイオキシン類摂取量に基づいて健康リスクを評価しなければならない。このため、多数の個別食品あるいはトータルダイエツト試料の分析が実施されている。

このような食品の分析結果からリスクを正しく評価するためには、食品中のダイオキシン類の正確な分析値を得ることが重要である。しかし、前述のように食品からのダイオキシン類摂取量の総摂取量に対する割合は高いとはいえ、個々の食品におけるダイオキシン類の濃度は、たとえば飛灰のような環境試料と比較すると非常に低い。また、食品には多くの成分が含まれており、このような複雑なマトリクスから極微量のダイオキシン類を抽出し、

マトリクスの影響を受けずに分析できる状態まで精製するには、長時間にわたる煩雑な前処理が必要となる。このため、ダイオキシン類の分析値は、食品のマトリクスによる妨害に加えて、試験室の空気や試薬の汚染といった、分析環境からのコンタミネーションの影響を受けたり、操作中にダイオキシン類が失われたりする可能性が高い。従って、食品中のダイオキシン類の分析結果には大きな誤差が伴う可能性があり、このような分析値に基づいたリスク評価は、誤った結論に陥る危険もある。

従って、食品からのダイオキシン類摂取量を求め、さらにその生体への影響を評価するためには、単に多数の食品中のダイオキシン類分析値を収集するだけでは、その結果の信頼性は低いものとなる。正しい評価のためには品質の保証された分析値に基づいた推定が不可欠である。

分析値の品質あるいは正当性を保証するために、分析値の品質管理を実施しなければならない。



品質の保証された分析値を得るために、厚生省、環境庁等が作成したダイオキシン類分析に関連したガイドライン・マニュアル中には、分析法だけではなく、測定データの品質管理に関する項目が設定されている。品質管理項目としては、分析法のバリデーション、分析時の信頼性の確認、データの管理・評価、内部精度管理の実施に加えて、外部精度管理に参加することが規定されている。外部精度管理は技能試験ともいわれ、多数の試験機関が共通試料を分析した結果を相互比較する事によって、個々の分析機関の能力を客観的に評価する手法である。

本研究では、ダイオキシン類分析の技能試験方法を検討する目的で、6 機関を対象として外部精度管理を実施した。試料として、ダイオキシン類の主要な摂取源である魚類(タチウオ)の凍結乾燥粉末を使用した。

## B. 研究方法

6カ所のダイオキシン類分析機関に試料を配布し、報告された分析結果の比較及び統計解析を実施した。

試料 タチウオの筋肉部を凍結乾燥し均一に混合し粉末としたものを試料とした。

分析対象 WHO で TEF の定められた、PCDD、PCDF 及び dioxin like PCB 類を分析対象とした。

### 技能試験結果の評価

6 参加機関からの報告値について、全ての異性体ごとに、平均値、標準偏差(SD)、相対標準偏差(RSD)を求めた。参加機関数が少なく、外れ値が含まれていても一般的な検定方法を適用して除くことが困難であるため、頑健な平均、標準偏差、相対標準偏差も求めた。頑健な統計量の算出には、ISO 5725 Part-5 の algorithm A を用いた。検出下限以下の分析値は除き、分析値が報告されたもののみについて、統計量を計算した。

さらに、通常統計量と頑健な統計量を用いた、2 種類の z-スコアを計算し、比較を行った。

## C. 研究結果

6 参加機関全てから分析結果が報告された。

Table 1 に各機関の分析値及び全ての分析結果の平均値、SD、RSD(%で表示)、頑健な平均値、頑健なSD、頑健な統計量から計算したRSD%を示す。報告値から計算したTEQの統計量も示した。

Table 2 には通常統計量から計算した z-スコア、Table 3 には頑健な統計量に基づいて計算した z-スコアを示した。

## D. 考察

PCDD、PCDF では、機関間のRSD%が10%程度から90%程度まで広い範囲の値を示し、異性体間で室間精度が異なっていた。また、PCB については、ほとんどの異性体の室間精度は20%RSD程度であったが、2',3,4,4',5-PeCB は150%のRSDとなった。TEQのRSD%は7%であった。

大きなばらつきを示す異性体の濃度が必ずしも低い傾向は認められなかった。この原因として、参加試験室が少ないため得られる標準偏差が変動しやすいことも考えられるが、その他の原因として外れ値の存在が疑われた。技能試験において、参加者の値から平均・標準偏差を求める際には、検定を行って外れ値を除くことが行われるが、今回の試験では参加機関数が少なく、検定により外れ値を除くことは適切ではない。そこで、外れ値の存在が予想されるときに用いられる頑健な統計を用いて頑健な統計量の計算を行った。頑健な統計によれば、外れ値を除外することなく、その影響を除いた平均値と標準偏差が求められる。Table 1 に示すように、通常統計計算では147%という大きな室間精度を示した2',3,4,4',5-PeCBの分析結果について、頑健な統計量からRSD%を計算すると、19%となった。6箇所の参加機関中1機関が、他の機関の10倍程度の値を報告しているため、通常計算では大きな平均及び標準偏差が得られるが、頑健な平均は通常平均の1/2以下、標準偏差も1/10以下となり、外れ値の影響が除かれている。2',3,4,4',5-PeCB は、例年の調査で室間精度が大きく、妨害ピークとの分離が困難等の

分析上問題のある異性体の可能性がある。しかし、この異性体の毒性等価係数は小さいことから、外れ値を報告した機関の TEQ は、異性体濃度の差から予想されるような大きな差は見られていない。その他の異性体では、3,4,4',5-TCB において、頑健な RSD が通常の RSD の 1/3 程度の値となった。他の異性体では、通常の統計量と頑健な統計量はほぼ一致した。

Figure 1 と 2 に、通常の統計量を用いて計算した z-スコアと、頑健な統計量を用いて計算した z-スコアを示す。通常の統計量を用いて計算した各異性体の z-スコアには 3 を超える値は現れず、外部精度管理の評価では、全ての機関が問題ないと評価される。しかし、頑健な統計量により計算した z-スコアでは、機関 3 の 2',3,4,4',5-PeCB が 45 という極端に大きな値となった。この機関の 3,4,4',5-TCB の z-スコアは -7.9 であり、2 つの異性体で不満足な結果を報告している。機関 3 の TEQ の z-スコアは -2 となり、明らかに問題があるとは言えないものの、良好とは言えない結果となった。

平成 16-18 年の 3 年間に行った技能試験に、延べ 9 カ所の試験機関が参加した。3 回の技能試験で用いた試料は、全て魚筋肉部の凍結乾燥粉末であり、TEQ はそれぞれ 5.5 pg/g, 1.7 pg/g, 25.9 pg/g であった。それぞれの TEQ の室間精度は、RSD 表示で 7.7%、4.8%、6.2% であり、濃度によらず同程度であった。全ての年で 10% 以下の室間精度であり、参加機関においては良好な精度が保持されている。

参加機関の 3 年間の異性体毎の z-スコアを Fig.3~Fig.5 に示す。図中の機関の番号は共通である。1~4 の試験機関は全ての年度で参加しており、6~9 は 1 年のみの参加である。3 年間連続して参加した 4 機関の中で、1 と 4 は全ての異性体で満足な z-スコアとなった。2 は最初の年度には大きな z-スコアとなった異性体が見られたが、2 年目以降は良好な結果となった。これに対し、機関 3 は毎年 1-2 種の異性体で大きな z-スコアとなった。1 年のみの参加機関は、大きな z-スコアを

示す異性体が多く見られる傾向があった。

Fig.6 は 3 年間の TEQ の z-スコアを示す。個々の異性体の結果と同じく、単年度の参加機関は大きな z-スコアとなる傾向が見られた。参加頻度の少ない機関は、分析経験が少ない可能性が高く、それが結果に反映していると考えられる。

## E. 結論

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 箇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。

## 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

Table 1. タチウオ試料を用いたダイオキシン技能試験結果 (pg/g)

分析値	1	2	3	4	5	6	mean	SD	RSD	Robust mean	Robust SD	Robust RSD
P	0.755	0.824	0.780	1.261	0.791	0.814	0.871	0.193	22.1	0.808	0.050	6.2
C	1.380	1.450	1.203	2.235	1.482	1.580	1.555	0.356	22.9	1.496	0.257	17.2
D	0.164	-	-	0.142	0.116	0.140	0.141	0.020	14.0	0.141	0.022	15.8
D	0.620	0.612	0.788	0.446	0.796	0.599	0.644	0.132	20.4	0.644	0.149	23.2
s	0.075	-	0.684	-	-	0.102	-	-	-	-	-	-
	0.131	0.150	-	-	0.158	0.184	0.156	0.022	14.1	0.156	0.025	16.0
	0.155	-	0.162	-	0.142	0.251	0.177	0.050	28.1	0.177	0.057	31.9
	5.590	6.915	4.724	7.414	6.660	6.250	6.259	0.973	15.5	6.259	1.103	17.6
P	1.000	1.105	0.941	1.701	0.921	1.630	1.216	0.354	29.1	1.216	0.402	33.0
C	3.490	3.830	3.021	5.214	2.950	3.510	3.669	0.825	22.5	3.562	0.674	18.9
C	0.185	0.238	0.921	0.516	0.145	0.160	0.361	0.307	85.0	0.333	0.281	84.3
D	0.206	0.836	1.214	0.253	0.210	0.207	0.488	0.434	88.9	0.488	0.492	100.8
F	0.012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
s	0.413	0.384	0.518	0.318	0.363	0.434	0.405	0.069	16.9	0.405	0.078	19.2
	0.148	-	-	-	0.136	0.078	-	-	-	-	-	-
	0.021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.062	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,3',4,4'-TCB	860.0	872.0	768.2	794.7	890.6	828.0	835.6	47.4	5.7	835.6	53.7	6.4
3,4,4',5'-TCB	31.9	32.0	18.7	31.2	30.6	30.1	29.1	5.2	17.7	30.7	1.5	5.0
3,3',4,4',5'-PeCB	135.0	127.5	111.5	125.3	144.0	128.0	128.6	10.8	8.4	128.6	12.2	9.5
3,3',4,4',5,5'-HxCB	18.90	17.40	14.84	16.42	21.23	20.19	18.2	2.4	13.2	18.16	2.72	15.0
2,3,3',4,4'-PeCB	9980	11050	8997	8280	9585	10250	9690.4	972.3	10.0	9690	1103	11.4
2,3,4,4',5'-PeCB	547.0	587.0	499.8	560.9	534.6	599.0	554.7	36.1	6.5	554.7	40.9	7.4
2,3',4,4',5'-PeCB	42600	41900	37876	51000	41050	41200	42604.4	4421.0	10.4	41920	3318	7.9
2',3,4,4',5'-PeCB	636.0	569.0	6031.3	684.3	510.0	608.8	1506.6	2217.5	147.2	637.9	121.2	19.0
2,3,3',4,4',5'-HxCB	3120.0	3360.0	1840.6	2630.0	2850.0	3180.0	2830.1	549.0	19.4	2870.0	527.3	18.4
2,3,3',4,4',5'-HxCB	771.0	810.0	419.4	757.8	509.0	802.1	678.2	169.3	25.0	678.2	192.0	28.3
2,3',4,4',5,5'-HxCB	2060.0	2165.0	1709.8	1760.0	1755.0	2063.0	1918.8	198.5	10.3	1918.8	225.1	11.7
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	280.0	280.5	291.0	272.7	269.0	293.0	281.0	9.6	3.4	281.0	10.86	3.9
TEQ	26.03	25.94	22.52	27.89	26.44	25.66	25.74	1.8	6.9	25.90	1.616	6.2

Table 2 通常の統計量による z スコア

	分析値	1	2	3	4	5	6
P C D D s	2,3,7,8-TCDD	-0.600	-0.245	-0.471	2.025	-0.414	-0.294
	1,2,3,7,8-PeCDD	-0.491	-0.295	-0.989	1.910	-0.206	0.070
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	1.192			0.090	-1.253	-0.030
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	-0.179	-0.240	1.098	-1.499	1.160	-0.339
	1,2,3,7,8,9-HxCDD						
P C D F s	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-1.120	-0.280			0.113	1.286
	OCDD	-0.447		-0.314		-0.717	1.479
	2,3,7,8-TCDF	-0.688	0.675	-1.578	1.188	0.413	-0.009
	1,2,3,7,8-PeCDF	-0.610	-0.314	-0.777	1.368	-0.833	1.167
	2,3,4,7,8-PeCDF	-0.217	0.195	-0.786	1.871	-0.871	-0.193
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	-0.573	-0.400	1.826	0.505	-0.704	-0.654
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	-0.650	0.803	1.676	-0.542	-0.640	-0.648
	1,2,3,7,8,9-HxCDF						
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.116	-0.307	1.653	-1.265	-0.618	0.422
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF						
ノ ン オ ル ト	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF						
	OCDF						
	3,3',4,4'-TCB	0.515	0.769	-1.423	-0.863	1.162	-0.160
	3,4,4',5'-TCB	0.547	0.567	-2.020	0.417	0.300	0.189
	3,3',4,4',5'-PeCB	0.598	-0.098	-1.578	-0.303	1.432	-0.051
	3,3',4,4',5,5'-HxCB	0.308	-0.318	-1.386	-0.729	1.279	0.846
	2,3,3',4,4'-PeCB	0.298	1.398	-0.713	-1.451	-0.108	0.576
	2,3,4,4',5'-PeCB	-0.214	0.894	-1.520	0.171	-0.557	1.226
	2,3',4,4',5'-PeCB	-0.001	-0.159	-1.069	1.899	-0.352	-0.318
	2,3,4,4',5'-PeCB	-0.393	-0.423	2.041	-0.371	-0.449	-0.405
モ ノ オ ル ト	2,3,3',4,4',5'-HxCB	0.528	0.965	-1.802	-0.365	0.036	0.637
	2,3,3',4,4',5'-HxCB	0.548	0.778	-1.529	0.470	-0.999	0.732
	2,3',4,4',5,5'-HxCB	0.711	1.240	-1.053	-0.800	-0.825	0.726
	2,3,3',4,4',5,5'-HxCB	-0.108	-0.055	1.042	-0.873	-1.256	1.249
	TEQ	0.160	0.110	-1.826	1.214	0.391	-0.050