

## II. 研究分担報告

### 2. サンプルングに起因する不確かさの推定方法の検討

渡邊 敬浩

研究分担報告書

サンプリングに起因する不確かさの推定方法の検討

研究代表者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部第三室長  
研究分担者 渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部第三室長

研究要旨

食品衛生法に関連した検査の目的は、法により規定される様々な食品規格への適合を判定することである。この検査の多くは破壊分析を伴うため、対象となるロット等の母集団を代表するようにサンプルを採取すること(サンプリングすること)が必要となる。サンプリングは、母集団からの抜き取りサンプル数を規定するサンプリング計画と、サンプルの抜き取り手法や調製法を規定するサンプリング手順に従い実行される。またサンプリング計画及び手順を通じて肝要なことは、「検査の目的に応じ、母集団を代表するサンプルをその代表性を損なわないように得る」事である。これは、分析により得られる測定値には、母集団における対象化学物質濃度の平均の最良推定値であることが求められるためである。

母集団を代表するサンプルが採取されたことを証明するためには、母集団の分布を明らかにしなければならない。言い換えれば、サンプリング計画は母集団の分布を考慮して策定されなければならない。しかし、食品分析の分野において母集団の分布に関する報告例はまれである。本研究では、規定したサンプリング計画及び手順に従い、圃場から種々の生鮮野菜を採取しそこに残留する農薬濃度の測定値を得た。さらに、得られた測定値のばらつきを詳細に解析することで、分析による測定値のばらつき(併行精度)、個別サンプルに含まれる農薬濃度のばらつき(サンプル間のばらつき)の大きさ及び、測定値に含まれる全てのばらつきの大きさ(総標準偏差)について推定した。その結果、サンプル間での農薬濃度のばらつきは、併行精度の1.5~8.0倍の大きさとして推定され、総標準偏差への寄与が非常に高い事が明らかとなった。繰り返し実行したサンプリング間で得られた測定値の平均の差に有意な差は認められなかった。これらの結果は、母集団(圃場)中での農薬濃度の分布が分析の併行精度が無視できるほどに広いことを示唆している。さらに、サンプル間での農薬濃度のばらつきを母集団である圃場中での農薬濃度の分布とし、採取するサンプルの数の変更も検討項目に加え、サンプリングに由来する不確かさの推定を試みた。その結果得られた不確かさは非常に大きく、これを考慮して母集団の規格基準への適合を判定しようとするれば、分析の実効性が損なわれると考えられた。肝要なことは、母集団の分布について可能な情報を収集しあるいは想定をたて、それらと測定対象化学物質のリスク、分析コストまた、許容可能な母平均の存在範囲等を総合的に判断した上で、高い実効性と科学的根拠を兼ね備えたサンプリング計画及び手順を策定することと、そのハーモナイゼーションを実行することである。

### A. 研究目的

検査は所定の目的を達成するために実施される。食品衛生法に関連した検査においては、法により規定される様々な食品規格への適合を判定することが目的となる。この検査においては、規格に定められた値(基準値)と、検査対象となる一群の食品(ロットあるいはコンサイメント;統計上の母集団)に含まれる規格対象化学物質の濃度の平均値とを比較することで判定が下される。従って、検査において得られる測定値は、ロット中の化学物質濃度の平均の正しい推定値でなければならない。正しい推定値を得るためには、ロットを代表する試料を採取すること、及び採取された試料を正しく分析することが不可欠となる。分析に関しては、得られる測定値の確からしさを保証する事を目的に、通知等により使用する分析法の妥当性を評価する事並びに分析法の運用を正しく管理することが要求されている。具体例を挙げれば、分析法の性能として真度、精度、選択性、定量限界等が使用の目的に合致することを確認することや、日常得られる測定値の変動が正常な範囲を逸脱しないように管理することが求められている。

ロットを代表する試料を採取する行為がサンプリングであり、その採取により得られた試料がサンプルである。ここで、ロットを構成する全食品を経済的な損失なく分析することが可能であるならば全数を分析すればよく、サンプリングの必要はない。しかし現実に実施される多くの分析は破壊分析であり、分析に供された食品は失われる。また、分析には労力やコストもかかるため、ロットの一部をサンプルとして採取し、採取されたサンプルから測定値を得ることになる。分析法の妥当性評価が求められていることからわかるように、分析によっても測定

値は変動しうる。しかし、分析対象となるサンプルが、ロットの一部から偏って採取されたり、ロット中での化学物質濃度の分布を考慮せずそれを反映しない数として採取されていたのでは、分析以前の問題としてロット中の化学物質濃度の平均を推定することができない。この問題を解決するために、ロットを代表するサンプルを採取すること、つまりロット中での化学物質濃度の分布を考慮して決められた数を、ロットの全体から偏りなく無作為に採取することがサンプリングには求められる。採取されたサンプルが母集団を代表し、その分析により得られた測定値の平均(母平均推定値)の分布の幅が設定した大きさとなることを保証する目的から、サンプリング計画並びに手順が規定されている。サンプリング手順には、母集団の性質に応じた様々なサンプルの抜き取り方法並びにサンプル調製方法が規定されている。これは、母集団の性質によって無作為にサンプリングするための具体的な手段が変わるためである。一方、サンプリング計画には、母平均推定値の分布の幅が設定された広さとなるために必要なサンプル数(サンプルサイズ)が規定されている。

母平均推定値は、サンプルサイズ及び母集団中の化学物質濃度のばらつき(母分散)の影響を受ける。例えば、母集団中の化学物質濃度が正規分布している場合には、サンプルサイズによらず、母平均推定値は正規分布する。また、その分散はサンプルサイズの増加に応じて小さくなる。つまり、サンプルサイズが大きくなるにつれて、母平均推定値の分布の幅は狭くなる。一方、母集団の分布が正規分布でない場合でも、サンプルサイズが大きくなるにつれて母平均推定値の分布は正規型に近づき、真の母平均を中心とした正負に等しい範囲に母平均推定値が



分布するようになる。ただし、そのためのサンプルサイズは母集団中の化学物質濃度が正規分布している場合に比べて著しく大きくなることは予想されるが、具体的にどのくらいの数になるのかは個別に検討が必要となる。このように、母集団の分布やそこから採取されるサンプルの数によって変わりうる母平均推定値の分布の幅に基づき、真の母平均が存在する範囲を表現する概念がサンプリングの不確かさであると考えられる。

サンプリング計画の策定並びにサンプリングの不確かさ推定においては、母集団の分布が正規分布であることが一般的な前提として設定されている。例えば、サンプリングの不確かさ推定においては、推定された不確かさに95%の信頼水準を加味して表現した拡張不確かさについて議論が進められているが、ここで用いられる包含係数は通常2であり、この数値は母平均推定値の分布が正規分布でなければ適用できない。しかし実際には、食品で構成されるロット中での化学物質濃度の分布、特に生鮮食品により構成されるロット中での化学物質濃度の分布についてはあまり知られておらず、これを知ることが、採用するサンプリング計画の妥当性を評価する上でも、またより適切なサンプリング計画を策定する上でも重要となる。また、実際の測定値から母集団の分布を推定し、それに基づきサンプリングの不確かさを推定した例は少ない。

そこで本研究では、市販を目的に農薬散布を含む通常の方法にて栽培された生鮮野菜を収穫前に圃場から直接採取し、これらを分析することで得られた残留農薬濃度の測定値に基づき生鮮野菜中の残留農薬濃度の分布を仮定し、サンプリングの不確かさの推定を試みた。

## B. 研究方法

### B-1. 試料

ナス、キャベツ、ハクサイを対象生鮮野菜として選択した。いずれの野菜も、

茨城県桜川市の農家において、市販を目的に農薬散布を含む通常の方法にて栽培された。また、分析対象農薬の回収率を確認する目的で分析したスパイクサンプルの調製には、世田谷区内のスーパーから市販のナス、キャベツ及びハクサイを購入し用いた。

### B-2. 分析対象農薬

各野菜の栽培履歴から、試料採取より一ヶ月以内に散布された農薬を、残留が期待される農薬として分析対象とした。具体的には、ナスではクロロフェナビル及びピリダリル、キャベツではインドキサカルブ、ハクサイではエトフェンブロックスを分析対象農薬とした。

### B-3. サンプリング計画及び手順

圃場全体を50の区画に区分し左端より1~50の数値を割り付け、発生させた1~50の一樣乱数と一致した圃場の1区分から1サンプル(一次サンプル)を採取した。アイテムは、野菜1個を基本とし、分析に必要な重量を確保する目的から、ナスのみ同一区画の隣接する2個を1つの一次サンプルとした。この計画に従い1回のサンプリングあたり8個の一次サンプルを採取しこれを1セットとした。また、サンプリングは2回繰り返し実施した。よって、1種の野菜あたり採取した一次サンプルの総数は、8つの一次サンプルの2セット分となる16である。

### B-4. 分析法

厚生労働省により通知された「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成17年1月24日付け食安発第0124001号、以下通知)に記載の「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農作物)」に準拠した。試験溶液調製法のうち、抽出・精製は「果実、野菜、ハーブ、茶及びホップの場合」に従って行った。

### B-5. 試薬

アセトニトリル、トルエン、n-ヘキサン、アセトン、無水硫酸ナトリウム、及

び塩化ナトリウムは和光純薬(株)社製、あるいは関東化学(株)社製の残留農薬試験用を用いた。ピリダリル(99.1%)、クロルフェナピル(99.7%)及びインドキサカルブ(99.8%)は和光純薬(株)社製、エトフェンブロックス(99.9%)は林純薬(株)社製を用い、アセトンに溶解して標準原液(1 mg/mL)を調製し、これをアセトン-n-ヘキサン(1:1)溶液で適宜希釈することで0.01、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、20 µg/mL濃度の各検量点溶液を調製した。スパイクサンプルの調製に用いた添加溶液は、標準原液をアセトンで2 µg/mLになるよう希釈することで調製した。精製に用いるグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(500 mg/500 mg)にはSUPELCO社製 Envi-Carb/LC-NH<sub>2</sub>を用いた。

#### B-6. 機器

分析試料の混合均一化にはRetsch社製グラインドミックス GM200を1 L容ステンレス容器と組み合わせて用いた。

試料濃縮装置: Büchi Labortechnik社製の多検体エバポレーター-Syncore Analyst(200 mL容濃縮管並びに200 mL容貯留槽(0.5 mL)付き濃縮管、12検体ラック、還流モジュール、ポンプ V-500、バキュームコントローラーV-855付属)を使用した。

ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC/MS): Agilent Technologies社製7890A(GC)-5970C(MS)にオートサンプラー(Agilent 7683)を組み合わせて使用した。

#### B-7. 測定条件

本研究において測定対象とした各農薬の測定条件は、通知を基本に決定した。概要は以下の通り。

キャピラリーカラムには Agilent technologies社製 DB-5ms(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm、5 m ガードカラム付き)を用いた。カラム温度は 50°C で 1 分間保持した後 25°C/min で 125°C ま

で昇温し、その後 10°C/min で 300°C まで昇温して 10 分間保持した。注入口温度は 300°C、イオン源温度は 230°C とした。キャリアーガスにはヘリウムを用いた。イオン化法は電子イオン化法(EI)とし、電圧は 70 eV とした。試験溶液 2 µL をスプリットレス注入し、測定は SIM モードで行った。各農薬の測定イオン(m/z)は以下の通り。

ピリダリル: 定量用 204、定性用 164。

クロルフェナピル: 定量用 408、定性用 247。

インドキサカルブ: 定量用 150、定性用 218。

エトフェンブロックス: 定量用 163、定性用 183。

#### B-9. 分析計画

##### 1) 分析試料(試験室サンプル並びに分析ポーション)の調製

圃場より採取した一次サンプルから試験室サンプル(個別サンプル並びにコンポジットサンプル)を調製する際に用いた方法及びそれらからの分析ポーションの採取は以下の通り行った。

ナス 2 個を垂直方向に 4 分割し、そのうちの 4 分の 3 ずつを採取し(合計 1.5 個分)、合わせて細切、混合しこれを個別サンプルとした。キャベツは垂直方向に 8 分割し、向かい合う 2 切片(4 分の 1 個)を採取し、合わせて細切、混合しこれを個別サンプルとした。ハクサイはまず垂直方向に 8 分割した上で向かい合う 2 切片を 2 組抜き取り、これをさらに水平方向に 4 分割して互い違いになるよう採取し(4 分の 1 個) 合わせて細切、混合しこれを個別サンプルとした。個別サンプルは、サンプリング時に規定した一次サンプルごとに調製した。また、個別サンプルとは別に、1 回のサンプリングで採取された 8 個の一次サンプルを縮分の上混合均一化することでコンポジットサンプルを調製した。コンポジットサンプル調製時、ナスについては個別



サンプルの調製に使用しなかった 1 つの一次サンプルあたり 0.5 個分、キャベツとハクサイについては個別サンプル調製時と同様の方法で採取した 1 つの一次サンプルあたり 4 分の 1 個分を操作に供した。混合均一化しペースト状になった個別並びにコンポジットサンプルのそれぞれから 20 g の分析ポーションを 2 つ採取し、これらを分析に供した。

スパイクサンプルは、購入した各野菜を混合均一化し、20 g の分析ポーションを 2 つ採取し、これに分析対象農薬を 2 $\mu$ g (100 ppb) 添加することで調製した。抽出は添加 30 分後に行った。回収率が本研究の検討対象ではないため詳述しないが、分析の結果、ピリダリルを除き各農薬の回収率は 70~110% の範囲に含まれた。また全農薬を通じて 2 つの分析ポーション間での回収率の一致の程度が高いことが確認された。

以上の分析試料の調製法に従い 1 種の生鮮野菜あたり 2 セット分を調製したため、分析ポーションの総数は 40 となる。

## 2) 分析手順

圃場より採取した後の農薬の分解を避けるため、採取した 1 セット分の分析試料(個別サンプル 8x2 ポーション、コンポジットサンプル 1x2 ポーション、スパイクサンプル 1x2 ポーションの計 20 ポーション)の抽出、精製操作を 2 日で実行する事を 1 サイクルとし、これを連続して 2 サイクル実行する事で全分析ポーション(40 ポーション)分の試験溶液を得た。試験溶液の GC/MS による測定順は、一様乱数を発生させそれに従うことで無作為となるように決め、測定順による系統誤差が測定値に含まれることを避けた。また、ポーションとポーションを測定する間には必ず検量点溶液を測定することとした。各ポーションから得られたシグナルは、この測定計画により

作成される複数の検量線のうち、最も近接して測定された検量点溶液由来のシグナルから作成された検量線に内挿することで定量した。

## B-10. 統計解析

最初に、1 回目と 2 回目のサンプリングごとに得られた  $n=16$  の測定値(個別サンプル 8x 分析ポーション 2)を一組のデータセットとして一元配置の分散分析を実施し、分析の併行精度、サンプル間のばらつき、測定値に含まれる全てのばらつきの大きさ(総標準偏差)を推定した。分散分析はすべての生鮮野菜と農薬の組み合わせについて実施し、全てのデータセットにおいて分析の併行精度が十分に小さいことを確認した。次いで、個別サンプルのそれぞれについて、採取した 2 つの分析ポーションから得られた測定値の平均値を当該個別サンプルの代表値(個別サンプル代表値)とし、2 回のサンプリング間で得られる分析値の平均値の差に有意差が認められるかの検定を行った。まず、1 回目と 2 回目のサンプリングごとに得られた  $n=8$  の個別サンプル代表値の分散に差があるかを検定(F 検定)し、検定結果を危険率 5%で判断した。その結果等分散が確認された場合には Student's t 検定により、また確認できなかった場合にはウェルチの t 検定により平均値の差の検定を行った。

## B-11. サンプリングの不確かさの推定

本研究のサンプリング計画として、一組の生鮮野菜と農薬の組み合わせにつき、8 つの一次サンプルを 2 回繰り返してサンプリングする事で計 16 の一次サンプルを得た。さらに 16 の一次サンプルから個別サンプルを調製した上で 2 つの分析ポーションを分取し分析することで計 32 の測定値を得た。サンプリングの不確かさ推定の際には、これら 32 の測定値をデータセットとして用いた。まず、一元配置の分散分析を行い、その

結果から分析の併行精度、サンプル間のばらつきを推定した。推定されたサンプル間のばらつきを母集団中での対応する農薬濃度の標準偏差と仮定した。サンプリングの不確かさの推定の際には分析精度は一定とし、サンプルサイズによる推定値への影響についても検討した。

#### C.D. 研究結果および考察

##### C.D.-1. 圃場からのサンプリング

図1に、生鮮野菜をサンプリングした圃場の一例を示す。図示したとおり、圃場全体を50の区画に区分し左端より1~50の数値を割り付けた。これらの区画の内から、一次サンプルを採取する区画を選ぶためには、1-50の一樣乱数を8個発生させ用いた。発生させた乱数に対応する区画から一次サンプルを採取することにより、圃場全体をサンプリング対象としてとらえた上でそこからサンプルを無作為に抽出すること意図した。圃場中での測定対象農薬濃度の分布が均一かつ正規分布であると仮定するならば、2回のサンプリングにより得られたそれぞれ8つの一次サンプル中での測定対象農薬濃度は正規分布し、2セット間の平均及び分散には有意の差がないと期待される。

##### C.D.-2. サンプルの測定結果

###### C.D.-2-1. 概要

表1~3に、分析ポーションの測定結果を生鮮野菜と測定対象農薬の組み合わせごとに示す。各表では、サンプリングの1回目と2回目、また2つの分析ポーションに区別してデータをまとめ、さらに対になる2つのポーションから得られた測定値の平均値と、それらの個別サンプル間での変動(標準偏差; SD 及び相対標準偏差; RSD)も合わせて示した。

まずデータを俯瞰すれば、散布から1ヶ月が経過した後でも数10 ppb程度の農薬が残留していることがわかる。農薬間で残留濃度に違いが見られるが、農薬としての純度や散布濃度、またサンプル

への付着効率や付着後の分解特性などが正確にわからず、それを知ることは本研究の目的ではないためこれ以上考察しない。同一の個別サンプルから採取した2つの分析ポーション(表中AとB)から得られた測定値を比較すると、よく一致している。これら2つのポーション間での測定値の差から推定される分析の併行精度については後述するが、その値が個別サンプル間での測定値の変動に比べ明らかに小さいことを確認したうえで、2つのポーションでの測定値の平均値(個別サンプル代表値)及びばらつきを算出した。8つの個別サンプル代表値の平均値についてサンプリング間での差を求めると、対応する2つのポーションでの測定値の差に比べておおむね大きい。個別サンプル代表値の平均値と対応するコンポジットサンプルの測定値にも差が認められた。

###### C.D.-2-2. ナス中のピリダリル濃度の測定結果

次に、生鮮野菜と農薬の組み合わせごとに測定値の変動について詳述する。まず、ナス中のピリダリル濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1回目のサンプリングで49.29 ppb、2回目のサンプリングで40.61 ppbであり、それぞれの変動(相対標準偏差; RSD)は79.8及び85.2%であった。2つの分析ポーションから得られた測定値の一致の程度から、分析手順による測定値の変動への影響は小さいと考えられる。また、8つの個別サンプル間で農薬濃度は広い範囲に分布しているが、平均値は近い値であることから、同一のサンプリング手順を繰り返して実行する事で得られる結果の一致の程度は高いと考えられた。個別サンプル間に認められた測定値の変動とそれに基づく圃場での農薬濃度の分布の推定、分析手順による測定値の変動への影響、繰り返しサンプリングにより生じる圃場での農薬濃度推定値の差についてのより



詳細な解析結果については後述する。

一方で、1回目のサンプリングで採取した一次サンプル(n=8)から調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 47.57 ppb、分析ポーション B について 42.44 ppb であった。また、2回目のサンプリングにより得られたコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 28.01 ppb、分析ポーション B について 33.13 ppb であった。1回目のサンプリングで採取されたサンプルに関しては、個別サンプル代表値の平均値(42.29 ppb)と、対応する一次サンプルの一部を採取して調製したコンポジットサンプルの2つの分析ポーションから得られた測定値がよく一致している。一方で、2回目のサンプリングに関しては、個別サンプル代表値の平均値(40.61 ppb)とコンポジットサンプルから得られた測定値とに差が認められた。これは、ナスの個体全体への農薬の付着が不均一であることを反映した結果と考える。つまり、一次サンプルから無作為に採取した箇所に偶然に多い(あるいは少ない)量の農薬が付着していた場合には、コンポジットサンプル中の農薬濃度と複数の個別サンプル中の農薬濃度の平均値との間に乖離が生じる可能性を否定できない。興味深い課題ではあるが、より多くの検証が必要であり、本研究により得られたデータからはこれ以上に正確な考察は困難である。

#### C.D.-2-3.ナス中のクロルフェナピル濃度の測定結果

ナス中のクロルフェナピル濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1回目のサンプリングで 12.16 ppb、2回目のサンプリングで 12.00 ppb であり、それぞれの RSD は 23.7 及び 41.8% であった。一方で、1回目のサンプリングで調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 31.90 ppb、分析ポーション B について 27.18

ppb であった。また、2回目のサンプリングにより得られたコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 25.32 ppb、分析ポーション B について 24.88 ppb であった。個別サンプル間でのクロルフェナピル濃度の測定値はピリダリル同様、大きな変動を示した。また、個別サンプル代表値の平均値と対応するコンポジットサンプルから得られた測定値との乖離の程度は、サンプリング間での測定値の差に比較しても大きく、ナス個体全体でのクロルフェナピル濃度がより不均一であったことが推測される。

#### C.D.-2-4.キャベツ中のインドキサカルブ濃度の測定結果

キャベツ中のインドキサカルブ濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1回目のサンプリングで 37.75 ppb、2回目のサンプリングで 27.04 ppb であり、それぞれの RSD は 36.4 及び 68.6% であった。一方で、1回目のサンプリングで調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 51.55 ppb、分析ポーション B について 48.08 ppb であった。また、2回目のサンプリングにおいて調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 17.95 ppb、分析ポーション B について 18.10 ppb であった。上記のとおり、個別サンプル間でのインドキサカルブ濃度の測定値は、大きな変動を示した。また、個別サンプル代表値の平均値と対応するコンポジットサンプルでの測定値との乖離の程度は2回の繰り返しサンプリングに共通して大きく、ナスについて考察したのと同様に、キャベツ個体全体でのインドキサカルブ濃度の不均一性が示唆された。

#### C.D.-2-5.ハクサイ中のエトフェンブロックス濃度の測定結果

ハクサイ中のエトフェンブロックス濃度の測定結果は、個別サンプル代表値の平均値が、1回目のサンプリングで 18.43



ppb、2 回目のサンプリングで 35.21 ppb であり、それぞれの RSD は 51.7 及び 60.8%であった。一方で、1 回目のサンプリングで調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 27.13 ppb、分析ポーション B について 24.50 ppb であった。また、2 回目のサンプリングにおいて調製したコンポジットサンプルでの測定値は、分析ポーション A について 21.68 ppb、分析ポーション B について 23.96 ppb であった。上記のとおり、個別サンプル間でのインドキサカルブ濃度の測定値も他と同様に変動が大きかった。また、個別サンプル代表値の平均値と対応するコンポジットサンプルでの測定値との乖離の程度は、2 回の繰り返しサンプリングに共通して大きく、ハクサイ個体全体でのエトフェンプロックス濃度の不均一性が示唆された。ただし、コンポジットサンプル間で得られた測定値を比較すると、本研究で検討した生鮮野菜と農薬の組み合わせ中、一致の程度が最も高かった。十分なデータがなく、また文献等の情報もないため偶然かと考えられるが、このような結果が得られる場合もあるという一例として興味深い。

### C.D.-3. 測定結果の統計解析

表 1~3 に示した全測定結果から、生鮮野菜と農薬の全ての組み合わせを通じて、分析手順による測定値のばらつきへの影響は小さくまた、個別サンプル間で農薬濃度は広い範囲に分布しているが、同一のサンプリング手順を繰り返し実行する事で得られる測定結果の一致の程度は高いと考えられた。これらの結果についてより詳細を明らかにすることを目的に、統計解析を実施した。まず、分析により生じたばらつきの大きさ(併行精度)、個々の個別サンプルに含まれる農薬濃度の変動(サンプル間のばらつき)の大きさ及び、測定値に含まれる全ての変動の大きさ(総標準偏差)について推定するため、

一元配置の分散分析を行った。1 回目と 2 回目のサンプリングごとに得られた  $n=16$  の測定値(個別サンプル 8x 分析ポーション 2)を一組のデータセットとし分散分析を行い、得られた分散に基づき算出された併行精度、サンプル間の変動、総標準偏差を SD 並びに RSD として表 4 に示す。1 回目にサンプリングしたナス中のクロルフェナビル濃度の測定結果については後述するが、この結果を除き、生鮮野菜と農薬を組み合わせに関係なく全サンプリングを通じて、併行精度(RSD)は約 10~25%の範囲にあるのに対し、サンプル間の変動(RSD)は 35~84%のより大きな値となった。また総標準偏差にしめるサンプル間の変動の寄与が非常に大きいことも明らかとなった。1 回目にサンプリングしたナス中のクロルフェナビル濃度の測定値については、通常分散分析により分散を算出した場合には、サンプル間の変動を推定する事ができなかった。これは  $n$  数が少なく、そこに他の測定値との乖離の程度が大きな数値(外れ値)が含まれていた場合にも起こりうる。そのような場合に考慮すべき解析手法としてロバスト法がある。そこで本測定値については、ロバストな一元配置の分散分析を行った。その結果得られた併行精度、サンプル間の変動、総標準偏差は、それぞれ RSD として 13.4、25.1、28.5%であり、他のデータセットと同様に、併行精度に比べサンプル間の変動が明らかに大きく、また総標準偏差への寄与率が高いことが確認された。以上の結果に基づき、サンプル間の変動に比べ併行精度が十分に小さいと判断し、個別サンプルのそれぞれについて採取した、2 つの分析ポーションから得られた測定値の平均値を当該個別サンプルの代表値(個別サンプル代表値)とし、2 回のサンプリング間で得られる測定値の平均に有意差が認められるかに

ついて検定を行った。個別サンプル代表値については表1~3にもその数値を示したが、生鮮野菜と農薬との組み合わせごとに、1回目と2回目のサンプリングに分けて散布図を示す(図2)。

まず、1回目と2回目のサンプリングごとに得られた  $n=8$  の個別サンプル代表値の分散に差があるかを検定(F検定)した(表4)。検定結果は危険率5%で判断し、等分散が確認された場合には Student's t 検定により、また確認できなかった場合にはウェルチの t 検定により独立2群の平均値の差を検定した。結果は全てP値として示した。表4から明らかなどおり、いずれの生鮮野菜と農薬との組み合わせについても、繰り返しサンプリング間で得られた測定値の平均に有意差は認められなかった。つまり、本研究で採用したサンプリング計画に従って同一の集団(圃場)から複数回サンプリングを行って得られる測定値の平均には差がないことが確認された。言い換えれば、今回の計画は圃場での農薬の分布を反映した代表性のあるサンプルを偏ることなく繰り返し採取することの可能な適切な計画であったといえる。

#### C.D.-4. 不確かさの推定

生鮮野菜と農薬の組み合わせごとに、サンプリングの不確かさを推定した。推定の前段階として、まず、16の一次サンプルから調製した個別サンプルから分析ポーションを2つずつ採取し得られた測定値( $n=32$ )をデータセットとして一元配置の分散分析を行った。次いで、分散分析の結果から、分析の併行精度並びにサンプル間での農薬濃度の変動を推定した。推定されたサンプル間での農薬濃度の変動を、母集団(圃場)中の農薬濃度分布の標準偏差と仮定した。サンプリングの不確かさ推定の際には、分析精度は一定として不確かさに含めるものとし、サンプルサイズを3、5、10、16と変更した場合の影響についても検討した。推定された

サンプリングの不確かさ(標準不確かさ)をSD及びRSDとして表5に示す。

まず、全ての生鮮野菜と農薬の組み合わせを通じて、サンプルサイズの増加に伴いサンプリングの不確かさが小さくなるのがわかる。これは中心極限定理に従い、母平均推定値の分散がサンプルサイズの増加に伴って小さくなるためである。中心極限定理では、「確率変数  $x$  が母平均  $\mu$ 、母分散  $\sigma^2$  をもつある分布に従う時、これから無作為に抽出した大きさ  $n$  の標本平均  $\bar{x}$  の分布は、 $n$  が大きくなるにつれて母平均  $\mu$ 、母分散  $\sigma^2/n$  の正規分布に近づく」としている。つまり、サンプルサイズを大きくすればする程、サンプリングの不確かさは原理的に小さくなる。しかし、表5からも明らかなどおり、サンプルサイズが16の場合でも、サンプリングの不確かさ(RSD)は16.5~32.7%であり、これに仮に2を包含係数として乗じた場合には、 $10^{-7}$ の濃度レベルでThompson修正式から推定される分析値の拡張不確かさである22%を明らかに超えてしまう。逆に言えば、サンプリングと分析の両方に起因する不確かさを測定値の不確かさとして付随させ、規格基準への適合判定の際に考慮するとするならば、現実的ではない多数のサンプルをサンプリングした上で分析しなければならないことになり、これは分析の実効性をそぐ無意味な行為であると考ええる。後述するが、母集団中の化学物質濃度の分布を考慮し、実行可能なサンプリング計画を策定することが重要となる。

また、推定されたサンプリングの不確かさを詳細に見ると、ナス中のクロルフェナピルについて推定されるサンプリングの不確かさは、サンプルサイズが増加しても効果的に小さくなっていない。これは、母集団中での農薬濃度の分散が他に比べて明らかに小さく、サンプリングの不確かさ推定に含めた分析の併行精度の影響が前面に現れたためである。すな



わち、分析に起因する測定値のばらつきを考えれば、それを超えて母平均推定値の分布の幅を狭くするためのサンプルサイズを設定することに母平均の存在範囲を狭める上での意味はない。

#### C.D.-5. 圃場(母集団)での農薬(測定対象化学物質)の分布とサンプリング計画及び手順に関する考察

本研究により得られた結果に基づき、圃場(母集団)での農薬(測定対象化学物質)の分布とサンプリング計画及び手順に関して考察する。今回対象とした生鮮野菜のようなそのまま食される一次性的食品(生鮮品)に人為的に加えられた測定対象化学物質は、圃場やそこから収穫され出荷された市場を母集団ととられれば、この母集団中でその濃度が広く分布する。これは、生鮮品が生育過程でおかれた場所的条件や天候影響の受けやすさの違い、また化学物質投与時の不均一性を反映した結果であると考えられる。このような考察は、与えられる化学物質の特性や食品により詳細は変わりうるが、全般的には生鮮野菜以外にも養殖魚や家畜についても当てはめることが可能であると考えられる。

このようないわば「生鮮品における化学物質濃度の分布の広さ」は、製造工程が規定及び管理され、母集団中の化学物質濃度の分布が比較的狭くまた管理可能な二次性的食品(加工食品)とは大きく異なる特性である。また、サンプリング計画の策定に当たっては十分に考慮すべき事項である。具体的には、サンプリング計画策定時により重要となる要因は、母集団を構成する個々のサンプルの数ではなく、集団における測定対象化学物質の分布であることを認識すべきである。母集団全体に一定の分布を仮定できるのであれば、それを構成するサンプルの数がどれほど多くても、そこから採取するサンプルの数が一定数を満たしていれば、それ以

上にサンプル数を増加させても母平均推定値の分布の幅は狭くならない。つまり、集団を構成するサンプル数が大きいからといって、それに依存して採取するサンプルの数を増やすことは、信頼性の高い測定値を得る上で労力に見合った効果を期待できない。一方で母集団中の化学物質濃度の分布の幅の影響は無視できないほどに大きい。極端な例を挙げれば、母集団中の濃度が均一であれば分布はない事になり、分析によるばらつきも無視できるほどに小さいのであれば、1つだけサンプルを採取し分析して得られた測定値を母集団中の化学物質濃度として問題がない。逆に言えば、分布の広さを考慮しこれを正しく反映可能な数として採取サンプル数を決めなければ、正しく母集団中の化学物質濃度の平均を推定することはできない。

ここで問題となるのは、母集団中の化学物質濃度の分布を知るために必要な労力が甚大であり、その実行が難しいことである。また、正確を期すれば個々の集団について分布を知らなければならぬことになり、そこに現実性はない。この問題に対処するための実行可能な手段としては、いくつかの調査により代表的な分布を知ることや、本研究班の課題ともしているがシミュレーションにより分布の影響を考察すること、また、それらの結果と測定対象化学物質のリスク等を総合的に判断して、許容可能な母平均の存在範囲を設定しサンプリング計画を策定することが挙げられる。さらには、このようにして一定の科学的根拠と説明能力を与えたサンプリング計画を策定した上で、取り決めとしてハーモナイズすることも重要である。

サンプリング手順に関しては、特にサンプルの混合均一化について注意すべきである。その手順としてコンポジットサンプルの調製を含める場合には、母

集団中の化学物質濃度の平均を知る目的から最適とは言い難い場合があることに留意すべきである。本研究により得られた結果でも、複数の個別サンプルを分析して得られた測定値の平均とコンポジットサンプルから得られた測定値とに差がある場合が認められている。さらには、2回のサンプリング間でコンポジットサンプルから得られた測定値を比較すれば、個別サンプル測定値の平均値を比べた場合に比較して、より大きな差が高い頻度で観察された。コンポジットサンプルでの測定値がサンプリング間でどれほどの大きさをもってばらつくかについては、母平均推定への影響も含めて改めて詳細に検討する必要がある。しかし、少なくとも個別サンプルでの測定値の平均に2回のサンプリング間で差が認められなかった事実に基づけば、個別サンプルごとに測定値を得ることを手順とすることの信頼性は高いことが示唆される。先述した母集団中の化学物質濃度の分布と採取するサンプルの数、分析コスト、また許容可能な母平均の存在範囲も視野に入れた総合的な検討課題の一つとして、コンポジットサンプルを調製することを手順とする可否についても判断すべきである。

#### E. 結論

規定したサンプリング計画と手順に基づき、圃場から生鮮野菜を採取し、そこに含まれる各種農薬の濃度を測定した。その結果、個々のサンプル間での測定値の変動は、分析による測定値のばらつき(併行精度)に比べ約1.5~8.0倍と非常に大きく、総標準偏差への寄与割合を考えた場合には主たる要因になることが明らかとなった。また、サンプリングの不確かさを推定し、測定値による適合判定の際に考慮することは分析の実効性を損う、現実的ではない行為であると考えられた。また、本研究ではその推定の際に分析精度を含めたが、何を

サンプリングに起因する不確かさであるとするかは十分に議論した上で定義することが必要である。

本研究により得られた結果は、母集団中の化学物質濃度の分布を示した貴重なものである。今後の研究成果と合わせ、母集団の分布、測定対象化学物質のリスク、分析コストまた、許容可能な母平均の存在範囲等を総合的に判断した上で、高い実効性と科学的根拠を兼ね備えたサンプリング計画及び手順の策定とそのハーモナイゼーションの実行が期待される。

#### 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

渡邊敬浩、高附巧、小山陽子、松田りえ子；日本薬学会第129年会(2009年3月26~28日；京都府)

#### 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



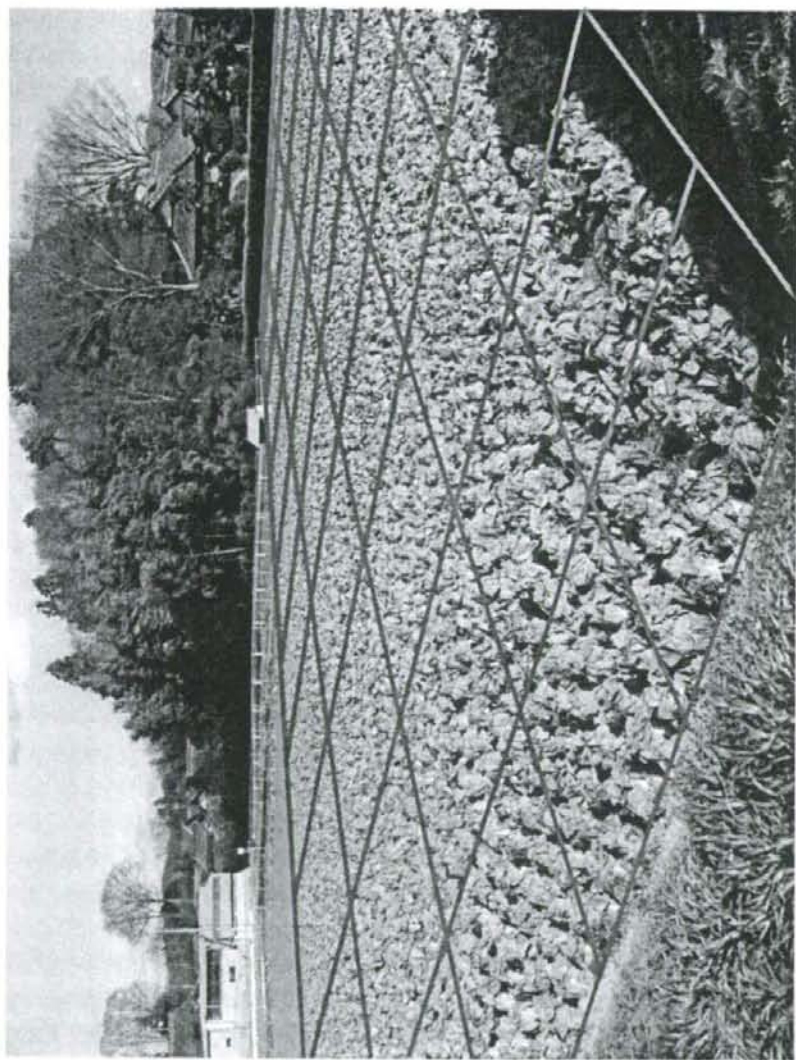


図1 サンプルリングを行った圃場の一例とサンプルリングのための区画区分

Pesticide sampling	Egg plant											
	Pyridaryl						Chlorfenapyr					
	1st		2nd		representative		1st		2nd		representative	
Test portion	A	B	representative	A	B	representative	A	B	representative	A	B	representative
Sample No. 1	14.51	12.14	13.33	21.78	21.95	21.86	9.84	7.45	8.65	20.32	20.25	20.28
2	106.86	117.23	112.05	12.41	13.36	12.88	12.22	12.18	12.20	7.51	8.21	7.86
3	14.83	12.31	13.57	12.14	14.51	13.33	9.89	7.41	8.65	7.11	9.92	8.52
4	88.69	72.32	80.51	21.32	21.58	21.45	10.81	9.38	10.09	20.18	20.20	20.19
5	50.23	58.24	54.23	86.62	91.15	88.89	11.10	21.18	16.14	12.65	12.80	12.72
6	21.35	14.51	17.93	12.34	13.21	12.77	20.35	10.06	15.21	7.47	8.14	7.80
7	21.09	13.21	17.15	78.78	104.03	91.41	20.22	8.15	14.19	11.09	23.10	17.09
8	80.22	90.93	85.58	66.24	58.32	62.28	11.48	12.80	12.14	9.68	9.46	9.57
Average			49.29			40.61			12.16			13.00
SD			39.4			34.6			2.9			5.4
RSD			79.8			85.2			23.7			41.8
composite	47.57	42.44		28.01	33.13		31.90	27.18		25.32	24.88	

表1 ナス中に含まれるピリダリル及びクロルフェナピル濃度の測定値



Pesticide sampling	Cabbage								
	Indoxacarb								
	1st				2nd				
Test portion	A	B	representative	A	B	representative	A	B	representative
Sample No. 1	21.05	20.96	21.01	10.42	10.97	10.70			
2	31.53	24.20	27.86	24.38	20.77	22.58			
3	31.76	40.42	36.09	57.47	66.52	62.00			
4	25.54	29.04	27.29	18.70	19.76	19.23			
5	36.02	37.51	36.77	2.36	2.23	2.29			
6	60.68	58.03	59.36	25.79	27.97	26.88			
7	37.06	36.73	36.89	31.99	30.50	31.24			
8	61.44	51.98	56.71	43.94	38.83	41.38			
Average			37.75			27.04			
SD			13.7			18.5			
RSD			36.4			68.6			
composite	51.55	48.08		17.95	18.10				

表2 キヤベツ中に含まれるインドキサカルブ濃度の測定値

Chinese cabbage									
Pesticide sampling	Ethofenprox								
	1st			2nd					
	A	B	representative	A	B	representative	A	B	representative
Sample No. 1	16.28	20.43	18.35	76.84	82.83	79.84			
2	40.14	37.45	38.79	9.03	11.74	10.38			
3	12.66	11.70	12.18	26.37	23.99	25.18			
4	17.03	14.99	16.01	47.85	42.47	45.16			
5	11.52	17.53	14.52	32.61	30.03	31.32			
6	16.42	10.70	13.56	30.88	33.62	32.25			
7	26.24	24.10	25.17	38.26	43.23	40.74			
8	10.41	7.27	8.84	16.99	16.56	16.78			
Average			18.43			35.21			
SD			9.5			21.4			
RSD			51.7			60.7			
composite	27.13	24.50		21.68	23.96				

表3 ハクサイ中に含まれるエトフェンプロックス濃度の測定値





Pesticide	Egg plant						Cabbage									
	Pyridaril			Chlorfenapyr			Indoxacarb			Ethofenprox						
	1st	2nd	RSD (%)	1st	2nd	RSD (%)	1st	2nd	RSD (%)	1st	2nd	RSD (%)				
	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)				
Between repeated analysis	6.50	13.18	6.74	16.61	4.80	39.49	3.10	23.81	3.87	10.26	2.84	10.52	2.65	14.40	2.70	7.68
Among samples	39.08	79.29	34.28	84.42	0.00	0.00	4.98	38.27	13.45	35.62	18.43	68.16	9.35	50.72	21.30	60.51
Total	39.62	80.38	34.94	86.04	4.80	39.49	5.86	45.07	13.99	37.07	18.65	68.97	9.71	52.72	21.47	60.99
The result of F-test		0.744				0.116				0.446				0.049		
The result of t-test		0.647				0.704				0.210				0.070		

表 4 各測定値の統計解析結果



Pesticide	Egg plant				Cabbage				Chinese cabbage																											
	Pyridaril		Chlorfenapyr		Indoxacarb		Ethofenprox		Indoxacarb		Ethofenprox																									
	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)	SD	RSD (%)																								
Sample size	3	21.69	48.26	4.42	35.15	10.13	31.27	10.78	40.21	5	17.32	38.52	4.27	33.96	8.13	25.11	8.52	31.78	10	13.11	29.16	4.16	33.05	6.23	19.24	6.32	23.56	16	11.13	24.76	4.11	32.70	5.35	16.51	5.26	19.60

表5 サンプルリングの不確かさの推定

## II. 研究分担報告

3. 不均一分布からのサンプリングのシミュレーション  
による最適化

松田 りえ子