

2008J7048A

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

食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究

(課題番号) H20-食品-一般-011

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡 英明

平成21 (2009)年 4月

## 目次

I. 総括研究報告	
食品の企画基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究	1
松岡英明	
II. 分担研究報告	
1. 「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワークの構築	3
松岡英明	
2. 理化学的試験法の不確かさの推定	9
松田りえ子	
3. 生化学的試験法の不確かさの推定	27
渡邊敬浩	
【別紙資料1】 Real-time PCR 法に含まれる不確かさの推定を目的とした 共同試験プロトコル	57
4. 微生物学的試験法の不確かさの推定	105
工藤由起子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	122

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）  
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究  
総括研究報告書

研究代表者 松岡英明 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻 教授

研究要旨

食品分析において、その不確かさを推定し分析値と共に示すことが国際的に必要となっている。しかし、分析値の不確かさ推定に関する研究の多くは物理的計測の分野において進められており、理化学、生化学的及び微生物学的試験に関連した具体性のある研究はほとんど行われていない。本研究では、理化学的方法の一例として残留農薬等の分析法、生化学的試験の一例として遺伝子組換え食品の定量分析法、微生物学的試験の一例として生菌数測定法（集落計数法及び最確数法）を対象として、不確かさの推定方法を検討する。このような食品の試験に係わる分析値の不確かさを推定するための標準的手順を確立することにより、国内の試験機関が不確かさを推定し分析値に付与することが可能となると共に、食品検査の国際的な信頼性が向上し、分析値を巡る係争となった際にも正当性を主張することが可能となる。また、現在、食品分析の関係者の間でも、不確かさへの理解が十分であるとは言えない状況を鑑みて、学術・産業・行政各分野を横断的に結ぶ、「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワークの構築を目指す。

研究分担者

松田りえ子（国立医薬品食品衛生研究所  
食品部 部長）  
渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所食  
品部 第三室長）  
工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部 室長）

A. 研究目的

Codex 委員会において、分析値の不確かさについてのガイドライン(CAC/GL54 2004)が作成され、食品を対象とした分析においては不確かさを推定し分析値と共に示すことが必要となっている。分析値への不確かさの付与は、残留農薬等に係わる理化学的試験結果のみならず、遺伝子組換え食品分析に用いられる PCR 法のような生化学的試験や、培養によって行う微生物学的試験にも求められている。

本研究は、このような食品分析値の不確かさの具体的データに基づく検証と、不確かさの概念の普及を目的としている。具体的データとしては、上に例示した、残留農薬等の分析法(理化学的試験の例)、

遺伝子組換え食品の定量分析法（生化学的試験の例）、生菌数測定法（微生物学的試験の例）を実施、あるいは既に蓄積されている試験成績データの解析を行う。

一方、不確かさの概念に関しては、食品分析の専門家の中でも、十分共通認識をされているとはいえない状況である。また、上述のように Codex のガイドラインが作成されているとはいえ、分析法の種類が多様さ、試験操作の複雑さなどを考えれば、ガイドラインの改訂や更新は、随時、必要になると予想される。そこで、こうした内外の状況を鑑み、不確かさに関する研究動向を分析、評価、さらには提言するシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

食品分析値の不確かさの具体的データに基づく検証は、残留農薬等の分析法(理化学的試験の例)、遺伝子組換え食品の定量分析法(生化学的試験の例)、生菌数測定法〔集落計数法(寒天培地法)及び最確数法(液体培地法)〕(微生物学的試験の例)を、それぞれ分担研究課題として、

松田、渡邊、工藤が担当する。また、研究動向の分析・評価・提言システムについては、「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワークの構築を分担研究課題として、松岡が担当する。

理化学的、生化学的、あるいは微生物学的試験の何れについても検討すべき課題は多いが、特に、微生物学的試験は他に比べて困難な課題が多い。そこで、研究動向調査に際しては、当初は微生物試験に重点をおき、また試験の実施やデータ解析に際しても、試験成績の変動要因の分析を詳細に行う。

### C. 研究結果の総括

理化学的試験では、分析法毎に不確かさの差が認められる場合があったが、HorRat 値は 1 以下であり、分析法は妥当性確認された方法と判定された。生化学的試験では、人的要因とは別に、リアルタイム PCR 機器の性能や、検量線のデザインが測定値の偏りやばらつきに影響を与える主要因の一つとなっていることが明らかになった。微生物学的試験では、拡張不確かさは  $0.24 \sim 0.26(\log 10)$  とほぼ

一定の値であった。情報ネットワーク構築では、文献情報の分析に際して、統計解析の専門家の協力を得ることが出来るようになった。

### D. 結論

室間再現標準偏差、あるいは室間再現相対標準偏差に関連させた値として不確かさを推定する考え方は理化学的試験、生化学的試験、微生物学的試験のいずれの場合も同様である。不確かさを推定する前提はその試験法が妥当性確認されていることであるが、そのためには、試験法の変動の要因分析が重要である。そのことは微生物学的試験において特に顕著である。

### E. 健康危険情報

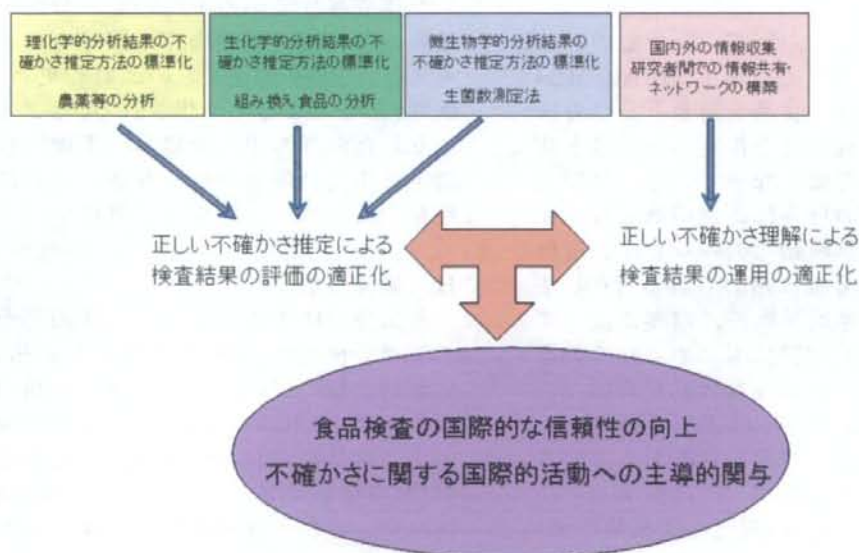
なし。

### F. 研究発表

各分担研究課題の項参照。

### G. 知的財産権の出願・登録状況

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）  
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究  
分担研究報告書

「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワークの構築  
研究分担者 松岡英明 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻教授

研究要旨

食品分析法における不確かさの推定に関する国際動向を継続的に調査するとともに、その成果を反映するガイドライン策定が要請されている。この要請に応えるために、学術・産業・行政各分野を横断的に結ぶ、「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワーク構築を目指し、11名の委員及び若干名のオブザーバーからなる専門調査委員会を設置した。初年度は、特に、理化学試験や生化学試験に比較して、不確かさの要因分析や推定理論などに関して遅れている、微生物学的試験法に焦点を絞って、最新の文献情報に基づく動向調査を行い、専門調査委員会で討論を行った。

A. 研究目的

現在、食品分析の関係者の間でも、不確かさへの理解が十分であるとは言えない。このため、不確かさに影響を与える要因についての研究、並びにその成果を反映するガイドライン策定などについて、国際動向を継続的に調査し、国際学会や標準化委員会等で議論することが要請されている。その活動を通じて、不確かさの概念の普及に務めると共に、実際の推定も推進する必要がある。そこで、学術・産業・行政各分野を横断的に結ぶ、「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワークの構築を目指す。

理化学試験に関しては、残留農薬の分析法に即して、平成17～19年度の先行研究により、不確かさの推定に関する調査研究、及び推定法ガイドラインの提示を行った。その実績に基づき、研究対象をさらに生化学試験、微生物学的試験まで広げることが期待された。そこで、各試験法についての国際的動向に詳しい識者からなる専門委員会を設置することとした。そして、初年度は、比較的研究が遅れている微生物学的試験法に頂点を絞っ

て、文献情報の調査を行い、専門委員会で議論する。

このような活動により、国際的ガイドラインの改定に際しても、主導的に関わっていくことができるシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

1. 専門調査委員会の設置

平成20年6月7日東京農工大学小金井キャンパスで行われた AOAC インターナショナル日本セクションの総会・シンポジウムで、本研究の趣旨について解説した。その趣旨にしたがい、理化学試験法、生化学試験法、および微生物学的試験法のバリデーション等に関する国際機関の活動に詳しい識者からなる、表1の専門委員会を設置した。平成21年1月28日（水）に東京農工大学で委員会を開催し、それまでに行った文献情報に関する討論を行った。さらに、メールでの意見交換を行った。

2. 微生物学的試験法における不確かさの研究に関する動向調査

専門委員の意見を参考にしつつ、食品分析法における不確かさに関する文献を検索・収集した。その中から、特に、微生物学的試験法に関するものを抽出した。また国際機関の活動に関しては、第122回 AOAC International 年会（米国、ダラス、平成20年9月21日～24日）に出席し、その統計委員会で意見交換を行った。

### C. 微生物学的試験法における不確かさの研究に関する動向調査の結果及び考察

#### 1. 緒言

微生物学的試験法の不確かさに関する論文を検索に基づき、主要論文として表2の①～⑤を選定した。また、微生物学的試験法に関するものではないが、不確かさの推定に関する最近の動向の例として、本年度 AOAC International 統計委員会の F.D. McClure らの紹介された最新論文2件（⑥、⑦）もリストに加えた。この中で、文献①は、微生物学的試験法の不確かさを考える上で、試験プロトコルの個々の操作や機器などに起因する変動について具体的に記述している。最終的に得られた試験結果に対して不確かさを推定することが最終的に課題ではあるが、その不確かさを合理的に小さくするための注意しなければならないことは、微生物学的試験の場合は、理化学試験に比べ、はるかに多く複雑である。そこで、それらの具体例を以下にまとめた。

#### 2. 微生物学的試験法における不確かさの要因の分析

- (1) 検査すべき食品原体 (Original material of bulk food) の収集方法の違い
- (2) 食品原体を試験室まで輸送する方法の違い

基本的には冷蔵であるが、水産食品など冷凍の場合もある。また冷蔵の場合は温度指定をするかしないか、例えば

4℃以下、あるいは10℃以下で。

- (3) 食品原体から「代表的 (Representative)」な部位を採取して、一次検体 (Initial suspension) を調製する方法の違い

- ・菌叢は通常、食品中、あるいは食品表面に局在しているため、食材のどの部位を採取するかは慎重を要する。
- ・第1次検体は25gであるが、元の食材の異なる部位から採ったものを合わせて25gとする。
- ・果実、野菜、生肉では、重量あたりではなく、表面積あたりの菌叢の数で結果を示す場合がある。その場合は、綿棒でふき取る表面の部位が偏らないようにする。
- ・切り取りの方が綿棒でのふき取りより菌回収率が高いため、生肉の場合は例えば深さ1-2mmを切り取る。
- ・サンドウィッチやパイに載せる材料などのように複数の成分が不均一に混ざっている食品では、一次検体の採取法が難しい。

- (4) 一次検体の均一化とサブサンプルの調整法の違い

- ・希釈液、あるいは液体培地で効果的に混合、均一化ができていないか？
- ・ストマッカーは最も頻繁に使用されており、均一化に有効であるが、理想的ではない。理想的には菌は食材断片には菌は付着残存していないこと。
- ・定量試験では、綿棒や肉片に付着している菌は検出されない場合でも、定性試験で綿棒や肉片を増菌培地に入れて培養すると、わずかに付着残存していた菌は検出され、「陽性」の判定になることがある。
- ・希釈操作に際して起こりうる誤差の要因として、(イ) オートクレープ時の培地の水の蒸発 ( $\pm 2\%$ 、ISO 6887-1 (1999))、(ロ) ピペットが押し出す液量の誤差 ( $\pm 5\%$ 、ISO 6887-1 (1999))、などが指摘されている。

- どのような希釈液を作るべきか、については規定されているが、その実施法については標準化されていない場合が多い。例えば、各希釈段階（10倍希釈、10倍希釈、・・・）で、そのたびにピペットやチップを新しいものにしなれば、最大1  $\text{Log}_{10}[\text{cfu/g}]$  の誤差が生じたり（Nordic Committee for Microbiological Standardisation; NMKL 1994）、希釈ごとに良く攪拌がされていなければ大きな誤差になるが、その確認方法の規定はない。
  - 多くの場合、希釈はプラスチックチップを使った自動ピペット機で行われる。プラスチックチップでは（汚染を防ぐための綿栓などの）詰め物をしないで使う場合がほとんどなので、自動ピペット機が汚染しやすい。その結果、今度は、ピペッティングによって検体を汚染する可能性が高くなる。
  - 希釈液をボルテックスで攪拌するか、ピペットで吐出・吸引を繰り返すかでも結果が異なる。後者の方が、ピペットに付着して残ってしまう菌数は少なくなる。
  - ピペットから菌液を吐出する際、チップ先端を容器の内壁に付けるか、あるいはチップ先端を希釈液に直接接触させるか、によっても結果が影響を受ける。
- (5) 培地の調製
- 培地の調製、及びその希釈操作はしばしば初心者が行うことが多いが、最終結果に大きな影響があることを考えると、十分訓練された者が行うべきである。
  - 一度に大量の寒天培地を処理しようとしてオートクレーブで加熱しすぎると増殖しにくい場合が起こる。NMKL (1994)は寒天培地では 200ml、液体培地では 1000ml を上限とすることを推奨している。
  - Violet red bile agar 培地では、使用直前にしか沸点以上に昇温してはいけない、と指示があるように培地ごとの注意事

項をよく理解しなければならない。

(6) 菌の状態の違い

- 前培養増菌では、傷害菌が回復して増殖してくる場合がある。一方、傷害菌は選択培地で増殖してこない場合がある。したがって、傷害菌が多いと予想される場合は、直接選択培地で培養するのではなく、前培養増菌が必要になる。例えば、サルモネラ菌の場合、緩衝ペプトン水で前培養増菌することの効果認められている。
  - メンブレンフィルター上に大腸菌検体を播き、それを一旦、非選択寒天培地上に置き、培養後、このメンブレンフィルターを選択培地へ移す方法が ISO 16649-2 (2001) に採択されている。
  - 熱傷害を受けたサルモネラの純粋培養では 36 時間以上の長い回復時間が必要。
  - 標的菌が極端に少なく、競合菌が多い場合は、選択増菌培地でも、競合菌が数において標的菌を凌ぐ場合がある。
- (7) 寒天プレート培養
- 直径 9cm の寒天プレートでは、通常 0.1ml/plate の菌液を塗抹する。0.2ml/plate より多くの菌液を塗抹すると均一に展開することが難しい。
  - 塗抹したとの展開の仕方が結果に大きな影響を与える。
  - プラスチックプレートでは 12 個以上積み重ねてインキュベーターに入れることがあるが、積層されたプレートの真ん中あたりのプレートでは、庫内はエア－攪拌無しでは 37℃ になるのに 13.5 時間もかかったというデータがある。これに対して、一番底と上のプレートでは 2.7 時間でその温度に達した。
  - 2 時間以内に各プレート内が規定温度にするためには、プレートの重ねは 3 個以下、開口したプラスチックバッグに入れる（プレートの乾燥を防ぐ効果があるという）、庫内はエア－攪拌、が推奨される（Peterz(1991)）

(8) コロニー計数

- ・誤差は非常に大きい。同じプレートを5人が数えたら±18%、同じ人が同じプレートを繰り返し計数したら±7.7%、同じ人が繰り返し計数して±5%以内となったのは全体の73%のプレートのみだった(以上は1982までのデータ)。
- ・自動計数装置の使用によって、コロニーの大きさや合体などによる不正確さが改善されたが、十分とは言えない。
- ・コロニーの形状のみならず色も含めて、識別計数は試験者の「眼」に頼らざるを得ない。

(9) 確認試験

- ・定性試験では、感度 (Sensitivity, ISO 16140 (2003)5.1.1.3 では相対感度 Relative sensitivity; SE)、および特異性 (Specificity, ISO 16140 (2003)では相対特異性 Relative specificity; SP)は次表で与えられる。

検体	陽性(既知)	陰性(既知)	合計
判定結果	陽性	PD	$N_p$
	陰性	NA	$N_n$
合計			$N$
PA:陽性正解数	PO:陽陽性数		
NA:陰性正解数	ND:陽陰性数		
N:検体総数=PA+PD+ND+NA			
N <sub>p</sub> :陽性と判定した総数		N <sub>n</sub> :陰性と判定した総数	
相対精度(Relative accuracy) AC=(PA+NA)/N×100%			
相対特異性(Relative specificity) SP=NA/N <sub>n</sub> ×100%			
相対感度(Relative sensitivity) SE=PA/N <sub>p</sub> ×100%			

- ・しかし、この場合、適当な標準法の結果が「真値」ということになっているので、代替法が標準法より高感度の場合は、代替法の結果を何らかの方法で証明 (Verify) する必要がある。代替法が培養法であれば、得られたコロニーを調べて確かに標的菌であることを示すことができるが、PCR法やELISA法ではそれができない。検体が、自然汚染食品の場合で、特に菌濃度が検出限界 (Limit of detection) に近い場合は、特にそのような問題が生じやすい。食品分析では、自然汚染食品の試験することは第一に要請されている (ISO

16140 (2003) Annex C) ため、この問題は重要である。

(10) 不確かさの推定方法

(イ) 分散分析 (Analysis of variance; ANOVA) による推定: 外れ値 (Outlier) 検定によって、外れ値を除外した後、室間分散と室内分散を分析し、次の精度指標を求める。

- ・併行標準偏差 (Repeatability standard deviation;  $S_r$ )
- ・併行相対標準偏差 (Relative repeatability standard deviation;  $RSD_r$ )
- ・室間再現標準偏差 (Reproducibility standard deviation;  $S_R$ )
- ・室間再現相対標準偏差 (Relative reproducibility standard deviation;  $RSD_R$ )

これから不確かさとしては  $S_R$ 、あるいは拡張不確かさ  $k \times S_R$  の値を用いる。理化学試験では  $k=2$  の場合を拡張不確かさとしている。微生物学的試験の場合、室間再現性限界値 (Reproducibility limit; R) は2つの試験結果が95%の確率でその範囲内にあるような値の範囲であり、 $R=2.8 S_R$  である。

(ロ) 帰納的メジアン (Recursive median;  $S_n$ ) による推定: 外れ値を除外せずに分析し、ISO 16140 (2003) Annex Q に例示されている方法で  $S_n$  を算出する。得られた  $S_n$  に計数  $k$  をかけて得られる値、 $k_1 \times S_n$ 、ただし  $k_1=1.1926$  が、上記の  $S_R$  に対応する値となる。例示されている16個のデータから求めた値は、 $S_n=0.91$ 、 $k_1 \times S_n=1.085$ 、下のデータから直接計算した  $S_R=1.163$  であった。

D. 結論

微生物学的試験における不確かさに関



して関連文献情報、および、AOAC、ISOなどの動向を調査した結果、次のように結論された。

1. 室間再現標準偏差、あるいは室間再現相対標準偏差を不確かさ基準とする考え方は、理化学試験の場合と変わらない。
2. 微生物学的試験では  $\text{Log}_{10}(\text{cfu/ml})$  正規分布を仮定しているが、その妥当性を実験的に再確認する必要があるのではないか？特に少数の微生物（100cells以下）を計数する場合は正規分布の仮定は再検討を要する。
3. 理化学試験では妥当性確認の指標として HorRat 値を用いているが、微生物学的試験でも適用できるのか、検討が必要である。
4. 微生物学的試験では、不確かさをできるだけ小さくするために考慮しなければならないことが極めて多く、また、多様である。試験成績の評価はトップダウン方式にせざるを得なくても、その前に、ボトムアップの考え方で、個々の操作や条件、それに伴うバラツキの程度を調査する必要がある。
5. 微生物学的試験では自動機械の導入によって不確かさを減少させることができる余地が大きい。
6. 試験法プロトコルの詳細を規定することと、試験成績の統計的解析法の規定を分けて考える必要がある。
7. 培養法と非培養法では考え方が基本的に異なる。両方法に対して併行して不確かさに関する調査を行う必要がある。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

○投稿論文

なし

○著書・総説等

なし

○学会発表

- ・松岡英明、“食品の企画基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究”、AOAC インターナショナル日本セクション総会・シンポジウム、東京（2008年6月7日）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 専門調査委員会委員

研究班	松岡英明	東京農工大学	AOAC・微生物試験法
	松田りえ子	国立医薬品食品衛生研究所	理化学分析
	渡邊敬浩	国立医薬品食品衛生研究所	遺伝子組換え食品分析
	工藤由起子	国立医薬品食品衛生研究所	微生物分析
専門調査委員	小高秀正	日水製菓	AOAC・微生物試験
	後藤哲久	信州大学	AOAC・理化学分析
	杉本敏明	日本食品分析センター	Codex
	田中廣行	日本食品分析センター	ISO SC9・微生物試験
	藤田利治	統計数理研究所	統計理論
	布藤 聡	ファスマック	AOAC・遺伝子組換え食品分析
	逸見昌之	統計数理研究所	統計理論

表2 微生物試験法の不確かさに関する文献

- ① E.L. Corry, et al.: A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. Food Microb. 24, 230-253 (2007).
- ② C. Lahellec: Development of standard methods with special reference to Europe. Intern. J. Food Microb. 45, 13-16 (1998).
- ③ B. Lombard: Estimation of measurement of uncertainty on food microbiology: The ISO approach. Accred. Qual. Assur. 17, 94-100 (2006).
- ④ L.I. Forster: Measurement uncertainty in microbiology. J. AOAC INTERN. 86, 1089-1094 (2003).
- ⑤ Executive summary, Statistics Working Group: AOAC INTERNATIONAL presidential task force on best practices for microbiological methodology. Appendix G-STWG ES 7-16-06, pp1-5.
- ⑥ F. D. MCCLURE, J. K. LEE: Exact One-Tailed 100p% Upper Limits for Future Sample Repeatability Relative Standard Deviations Obtained in Single and Multilaboratory Repeatability Studies. J. AOAC INTERN. 90, 1701-1705 (2007).
- ⑦ F. D. MCCLURE, J. K. LEE: Uncertainties of Method Performance Statistics Based on a Balanced Completely Randomized Model Interlaboratory Study. J. AOAC INTERN. 91, 660-670 (2008).

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）  
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究  
分担研究報告書

理化学的試験法の不確かさの推定

分担研究者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

平成 15-19 年の 5 年間に実施された、食品中の食品添加物、重金属、農薬、動物用医薬品を対象とした技能試験結果を解析し、平均、併行精度、室間精度を求めた。また、これらのパラメータから分析方法間で、分析結果あるいは不確かさに差があるかについて検討した。分析法毎に差がみられる場合もあったが、それぞれの方法について得られた室間精度の HorRat 値は、ほとんどが 1 以下であり妥当な精度と考えられた。アナライト毎に、代表的な分析法別に解析を行い、それぞれの室間精度から不確かさを推定した。この値から推定した拡張不確かさは、分析法を特定し、また技能試験で満足できる成績を得た機関の分析に適用可能である。

研究協力者 大島赴夫、鈴木達也 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所

A. 研究目的

食品に関わる分析分野においても、その結果に不確かさを付与することが求められており、Codex 委員会分析サンプリング部会(CCMAS)においては、分析法の不確かさに関するドラフトガイドラインが審議され、2004 年には「測定の不確かさに関するガイドライン(CAC/GL 54-2004)」が作成されて、食品規格に関わる全ての分析結果について不確かさを推定し、分析値の使用者の求めに応じて、不確かさを提供できるようにすることが、勧告された。また、ヨーロッパでは不確かさを考慮した基準値への適合判定が議論されている。

このような背景から、平成 17-19 年度の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「食品中に残留する農薬等の規格基準に係る分析法における不確か要素に関する調査研究」の分担研究課題「農薬等の分析値の不確かさ推定法に係わる手法の調査研究」において、食品中の残留農薬等の不確かさ推

定方法に関する調査研究が実施された。この研究では、Codex 及び諸外国の取り組み状況を調査した結果、食品中の農薬等に関わる分析値の不確かさ推定には、いわゆるトップダウンアプローチが適切であることが明かとなった。トップダウンアプローチで正しく不確かさを推定するためには、バリデーションにより適切な精度を求める必要があるため、平成 18 年度には残留農薬分析を単一試験室でバリデートする際の標準的手法を示したガイドラインを作成し、このガイドラインは平成 19 年 11 月 15 日に通知された(平成 19 年 11 月 15 日食安発第 1115001 号 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ついて)。ついで、平成 19 年度に、通知されたガイドラインに従って、有機リン系農薬分析法の妥当性を評価し、5 種類の食品中のバリデーション結果から不確かさを推定した。

本研究では、バリデーションと並んで不確かさ推定方法として推奨されている、

技能試験結果から不確かさを推定する方法を検討した。また、分析の対象を農薬以外の有害金属、食品添加物に拡張した。

## B. 実験

### データ

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所において実施されている、食品衛生外部精度管理調査結果を解析し、不確かさを推定を試みた。

平成 15-19 年の 5 年間に実施された、食品添加物、重金属、農薬、動物用医薬品の定量試験結果を解析した。各年度の調査内容を Table 1 に示す。

### 解析

分析年度及び対象物毎に分類し解析を行った。分析法が複数ある場合は、実施した機関数が多いものを選択し、分析法毎に解析した。

5 回併行分析結果について、JIS 8402-5 に示されているロバストなデータ解析方法のアルゴリズム A 及び S により、頑健な平均、併行精度、室間精度を求めた。また、これらのパラメータから分析方法間で、分析結果あるいは不確かさに差があるかについて検討した。

## C. 結果及び考察

### 食品添加物

平成 15~17 年度は、食品添加物の分析対象としてサッカリンナトリウムが使用されている。マトリクスとしてしょう油、シロップ、ジャムと異なる食品が使用され、またマトリクス中のサッカリンナトリウム濃度もおよそ 0.5 mg/g, 0.15 mg/g, 0.05 mg/g と 10 倍の変化がある。

サッカリンナトリウム分析の既定法では、HPLC による測定が設定されており、抽出方法として、透析法と溶媒抽出法が示されている。技能試験参加者が実施した前処理方法は、ほとんどが透析法であるが、溶媒抽出法を採用した参加機関も

20~30 カ所、既定法には記載されていない直接法で分析した機関も 20 カ所程度あった。これらの結果より、サッカリンナトリウム分析の前処理法により分析結果及び結果の不確かさに差があるかどうかの解析を行った。

Fig.1 には 3 回の技能試験結果を、前処理法で分類して示した。年度により、サッカリンナトリウムの濃度、食品が異なっているが、全ての年度で溶媒抽出法の結果が他の 2 方法の結果よりもやや低い傾向が見られた。また、透析法による結果の分布がやや広い傾向も見られた。これらの傾向を確認するためには、統計量を比較することが基本的な方法であるが、外れ値の可能性のある値が含まれているため、ロバストな統計量を求めて比較した。Table 2 に、それぞれの前処理毎に求めた統計量を示す。

前処理間での平均値の大小の傾向は 3 年間同じであり、直接法と透析法がほぼ等しく、溶媒抽出法が 4-5% 小さい値となった。また、併行精度、室間精度においても溶媒抽出法が他の 2 法の結果よりも大きな値を示した。

溶媒抽出法は、水に分散した試料からサッカリンをエチルエーテルに抽出し、塩基性条件の水に転溶し、さらに酸性下でエチルエーテルに転溶するという、複雑な手順で行われる。この過程で食品中の夾雑物が除かれ、クロマトグラムの妨害ピークが少なくなる。一方、試料を希釈する操作のみの直接法、あるいは透析膜中に放置するのみの透析法と比較して、各転溶段階での分析対象のロスが考えられ、分析者の技量が影響しやすい可能性がある。このような理由から、溶媒抽出法では低い分析結果を与える機関があり、そのデータの影響で平均値が低下すると共に、室間の RSD が上昇したと考えられる。平成 17 年のデータはこの傾向が顕著に現れており、溶媒抽出法を実施した 30 機関中、0.058~0.06 mg/g の範囲に 14 機

関が集中しているが、この範囲より上は4機関、下は13機関であり、低濃度側に裾を引いた分布となっている。

平成19年の分析対象とされた清涼飲料水中の、安息香酸及びパラオキシ安息香酸ブチルは、既定された前処理は水蒸気蒸留法であるが、サッカリンと同じく直接法、溶媒抽出法、透析法も行われた。結果をTable 3に示す。

パラオキシ安息香酸ブチルの濃度は安息香酸の1/10であるため、室間精度は全体的にパラオキシ安息香酸ブチルの方がやや大きくなった。これらのアナライトの平均値、室間精度にも、前処理による僅かな差が見られたが、サッカリンのように一定した傾向は認められなかった。

#### 重金属 カドミウムと鉛

データを収集した5年間連続して、清涼飲料水中のカドミウムと鉛が試料として使用されている。測定器としてフレーム原子吸光を使用した機関が大部分であったので、この結果について解析を行った。前処理として溶媒抽出を行った機関と、行わない機関を分類して計算した統計量をTable 4及びTable 5に示した。

鉛の濃度はカドミウムの10倍であるが、室間精度はやや大きい傾向がみられた。カドミウム、鉛共に、室間の平均値は前処理法間でほとんど差がなかった。一方、カドミウムの室間精度は平成15年の結果を除き、溶媒抽出法が大きくなった。鉛の結果では、平成18年と19年に同様の傾向が認められた。また、時系列的には、室間精度の大きな変化は見られない。

Fig.2及び3に、前処理法別に各機関の結果のプロットを示した。カドミウム鉛共に、溶媒抽出法を採用した機関(図左)には他機関とかけ離れた結果を報告する機関が見られ、溶媒抽出法を行わなかった機関の結果は良くまとまっている。カドミウムと鉛の報告値をプロットした

結果をFig.4に示す。他の結果と外れた結果を報告する機関は、2つのアナライトどちらも外れている場合が多く、プロットは右上がりの楕円に近い形となった。測定は個別に実施されるが、前処理は同時に行われていると考えられるので、この結果は前処理段階における手順等の差が、結果の変動につながっていると考えられる。

カドミウムについては玄米の技能試験も実施されている。代表的な分析法である、湿式分解-溶媒抽出-フレーム原子吸光で実施した機関の結果の統計量を、Table 5に、プロットをFig.5に示した。清涼飲料の結果と比較すると、外れた値を報告した機関が少ないが、室間精度はやや大きい結果となった。

#### 有機リン系農薬

データを収集した5年間に、種類の野菜ペースト中の有機リン系農薬が分析対象となっている。毎年、有機リン系農薬は2種類添加されており、その1つはクロルピリホスに固定されている。

技能試験参加機関が採用した主な前処理法は、液液分配、液液分配とカラム精製の併用、GPCであった。また、大部分の機関がFPD検出器で定量しているが、MSを用いた機関数が少しずつ増加しており、H19年にはH15年の3倍となった。採用した分析法毎に計算した統計量をTable 7に示す。

FPDを用いた機関の室間精度は6~14%RSDの範囲にあり、H17年からは、液液分配のみの前処理を行った機関における室間精度が他の処理よりも大きく、GPCを用いた機関の室間精度が小さい傾向が見られた。検出器としてMSを用いた機関の大部分は前処理として液液分配とカラム精製を併用していた。MSを検出器として用いた機関の室間精度は、同じ前処理で検出器としてFPDを用いた機関に比較して大きく、H16年及び

H17 年は 2 倍の差が見られたが、H18～19 年にはこの差は小さくなった。H18～19 年には MS を使用する機関数が増加し、使用経験の蓄積により精度が向上したと考えられる。

Fig.6 には、各年度の 2 農薬の分析結果を分析法毎にプロットして示した。プロットは右上がりの楕円を示すことが多く、2 つの農薬の間には相関が認められた。相関の大きさを定量的に評価するために相関係数を計算し、Table 8 に示した。ほとんどの組み合わせが 0.5 以上の相関係数を与え、個々の試験室の操作条件、手順が 2 農薬に類似した影響を及ぼしていると考えられる。相関係数は、経年的に低下する傾向が認められ、特に MS を検出器とした結果では大きく低下している。全体として手技の差による影響が低下し、併行精度と比較した室間精度が低下していると考えられる。

#### 動物薬

残留動物薬分析の技能試験は、卵（液卵）中のフルベンダゾールを試料として実施された。ほとんど全ての試験室がカラムによる精製及び HPLC を用いた分析を実施していた。Table 9 にこれらの結果から得た統計量を示す。農薬、重金属と比較すると、室間精度の変化は少なく、11%RSD 付近で一定していた。参加機関もほぼ固定されており、この分析の手技に習熟していると考えられる。

#### 不確かさの推定

技能試験に参加した試験室中、分析法を特定して計算した室間精度は、その分析法により得た分析値の不確かさ推定の根拠となると考えられる。しかし、技能試験にはその分析に習熟しない機関が参加する可能性もあり、その結果含まれる外れ値により不当に大きな室間精度が推定されがちである。そこで、技能試験データをロバストな方法により解析して室

間精度を求めた。このようにして求めた室間精度に包含係数 2 を乗ずることにより拡張不確かさが得られる。

Table 10 には、ロバスト法により推定した室間平均値及び室間精度の値及び拡張不確かさを示した。得られた値の妥当性を評価するため、Thompson の推定式により求めた推定室間精度及び HorRat 値も併せて示した。

サッカリンナトリウムを直接 HPLC で分析した値の拡張不確かさは、 $\pm 6.6\%$ ～ $\pm 11.1\%$ の範囲であった。ジャム中のサッカリンナトリウム濃度  $60 \mu\text{g/g}$  では推定室間精度は RSD 8.6%である。得られた室間精度 RSD4.2%は推定精度の 1/2 であり、妥当な値と考えられる。

Table 10 に示した HorRat 値は大部分が 1 以下であったが、溶媒抽出法によるサッカリンナトリウム分析値、GC-MS 法による有機リン系農薬分析値で 1 を越えるものがあつた。一般に室間バリデーションで得られた室間精度の HorRat 値は 1/2～2 の範囲にあると言われているが、今回取り扱ったアナライト及び分析法は、広く実施され習熟した試験室が多いこと、参加機関数が室間バリデーションの 8-10 よりもかなり多く精度推定の信頼性が高いことから、小さい HorRat 値が得られたと考えられる。

このようにして求めた不確かさの値は、実施した試験機関の技能の情報が無く、分析法のみが特定された場合に適用可能である。技能試験で z-スコアの絶対値 2 以下の試験室で得た分析値にこの不確かさを用いることが可能であるが、室内バリデーションでより小さな不確かさを推定できる可能性もある。

一方、室内でのバリデーションから推定した不確かさは、その試験室の技能と分析法から得られる値の不確かさであり、多くの試験室の技能を含めた不確かさである技能試験からの値とは、当然異なる。

一試験室内で FPD を用いた通知法で

分析されたクロルピリホスの分析値の不確かさは、0.02 ppm レベルで 5%以下であり、技能試験結果から推定した値 9-10%の半分程度である。分析値の不確かさは、その分析値がどのようにして得られたかにより異なると考えられ、不確かさを論じる際にこの点にも留意する必要がある。

#### D. 結論

平成 15～19 年に実施された、食品中の食品添加物、重金属、農薬、動物用医薬品分析技能試験結果を解析し、不確かさを推定した。アナライト毎に、代表的な分析法別に解析を行い、それぞれの室間精度から不確かさを推定した。得られた室間精度の HorRat 値は、ほとんどが 1 以下であり妥当な値と考えられた。この値から推定した拡張不確かさは、分析法を特定し、また技能試験で満足できる成績を得た機関の分析に適用可能である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

松田りえ子、米谷民雄、下山 晃、青島陽子、単一試験室における農薬分析法の妥当性評価、第 95 回 日本食品衛生学会学術講演会（平成 20 年 5 月 15-16 日）

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

Table 1 技能試験の分析対象物とマトリクス

年度	食品添加物		重金属		農薬		動物用医薬品	
	分析対象物	マトリクス	分析対象物	マトリクス	分析対象物	マトリクス	分析対象物	マトリクス
15	サッカリンNa	しょう油	Cd, Pb	清涼飲料水	クロルピリホス, フェニトロチオン	ニンジン ペースト	フルベンダ ゾール	凍結鶏卵
16	サッカリンNa	シロップ	Cd, Pb	清涼飲料水	クロルピリホス, 馬拉チオン	トウモロコシ ペースト	フルベンダ ゾール	鶏卵
17	サッカリンNa	ジャム	Cd, Pb	清涼飲料水	クロルピリホス, ダイアジノン	ハウレンソ ウペースト	フルベンダ ゾール	液卵
18	パラオキシ安息 香酸ブチル, パラオキシ安息 香酸プロピル	清涼飲料水	Cd, Pb	清涼飲料水	クロルピリホス, EPN	カボチャ ペースト	フルベンダ ゾール	液卵
19	安息香酸, パラオキシ安息 香酸ブチル	清涼飲料水	Cd, Pb	清涼飲料水	クロルピリホス, フェニトロチオン	カボチャ ペースト	フルベンダ ゾール	液卵

Table 2 サッカリンナトリウム技能試験結果のロバスト統計量

年度	前処理法	n	平均	併行精度		室間精度	
				SD	RSD	SD	RSD
H15	直接	25	0.469	0.00295	0.63	0.0259	5.5
	溶媒抽出	20	0.451	0.00431	0.96	0.0413	9.2
	透析	176	0.470	0.00397	0.84	0.0219	4.7
H16	直接	26	0.151	0.00135	0.89	0.0050	3.3
	溶媒抽出	24	0.142	0.00223	1.57	0.0089	6.2
	透析	181	0.149	0.00129	0.87	0.0057	3.9
H17	直接	14	0.060	0.00053	0.87	0.0026	4.2
	溶媒抽出	30	0.057	0.00074	1.29	0.0035	6.1
	透析	200	0.061	0.00065	1.07	0.0033	5.4

Table 3 パラオキシ安息香酸ブチル及び安息香酸技能試験結果のロバスト統計量  
パラオキシ安息香酸ブチル

年度	前処理法	n	平均	併行精度		室間精度	
				SD	RSD	SD	RSD
H19	水蒸気蒸留	135	0.0181	0.00035	1.91	0.0014	7.7
	直接	22	0.0195	0.00018	0.92	0.0009	4.7
	溶媒抽出	35	0.0198	0.00024	1.20	0.0011	5.4
	透析	36	0.0191	0.00025	1.29	0.0012	6.1

## 安息香酸

年度	前処理法	n	平均	併行精度		室間精度	
				SD	RSD	SD	RSD
H19	水蒸気蒸留	166	0.176	0.00149	0.85	0.0055	3.2
	直接	20	0.181	0.00106	0.58	0.0040	2.2
	溶媒抽出	39	0.174	0.00225	1.29	0.0101	5.8
	透析	39	0.180	0.00105	0.59	0.0057	3.1



Table 4 清涼飲料水中カドミウム技能試験結果のロバスト統計量

年度	前処理法 溶媒抽出	n	平均	併行精度		室間精度	
				SD	RSD	SD	RSD
H15	あり	86	0.179	0.00278	1.6	0.0086	4.8
	なし	25	0.171	0.00266	1.6	0.0096	5.6
H16	あり	73	0.140	0.00211	1.5	0.0092	6.6
	なし	24	0.137	0.00195	1.4	0.0073	5.3
H17	あり	81	0.147	0.00190	1.3	0.0074	5.0
	なし	25	0.144	0.00200	1.4	0.0064	4.4
H18	あり	72	0.157	0.00258	1.6	0.0096	6.1
	なし	23	0.154	0.00238	1.5	0.0067	4.3
H19	あり	66	0.131	0.00259	2.0	0.0085	6.5
	なし	19	0.126	0.00201	1.6	0.0072	5.7

Table 5 清涼飲料水中鉛技能試験結果のロバスト統計量

年度	前処理法 溶媒抽出	n	平均	併行精度		室間精度	
				SD	RSD	SD	RSD
H15	あり	84	1.706	0.02729	1.6	0.1059	6.2
	なし	24	1.642	0.03225	2.0	0.1564	9.5
H16	あり	73	1.579	0.02760	1.7	0.0956	6.1
	なし	24	1.593	0.02681	1.7	0.1075	6.7
H17	あり	79	1.398	0.02346	1.7	0.0883	6.3
	なし	25	1.392	0.02469	1.8	0.0868	6.2
H18	あり	71	1.719	0.03327	1.9	0.1248	7.3
	なし	23	1.701	0.02701	1.6	0.1132	6.7
H19	あり	66	1.471	0.03002	2.0	0.0951	6.5
	なし	19	1.483	0.02723	1.8	0.0570	3.8

Table 6 米中のカドミウム技能試験結果のロバスト統計量

年度	n	平均 μg/g	併行精度		室間精度	
			SD	RSD	SD	RSD
H15	47	0.388	0.00676	1.7	0.0292	7.5
H16	43	0.271	0.00544	2.0	0.0178	6.6
H17	38	0.313	0.00499	1.6	0.0225	7.2
H18	42	0.419	0.00624	1.5	0.0264	6.3
H19	44	0.352	0.00531	1.5	0.0227	6.5

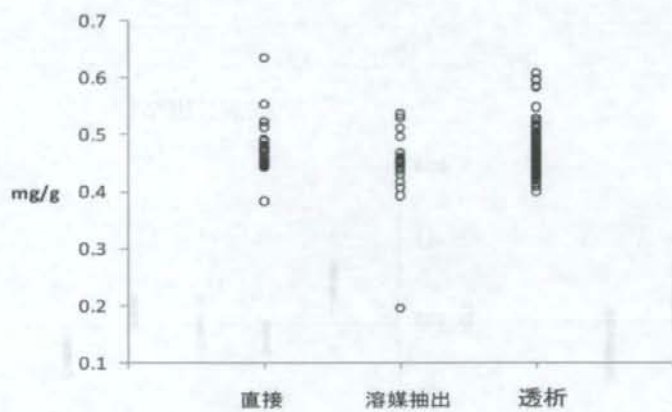
Table 8 2農薬分析結果の相関係数

		H15	H16	H17	H18	H19
液液分配	FPD	0.4569	0.1813	0.7780	0.5396	0.1020
液液-カラム精製併用	FPD	0.7600	0.6942	0.5980	0.5197	0.5975
GPC	FPD	0.9059	0.5356	0.7168	0.5321	0.7261
液液-カラム精製併用	MS	0.7903	0.7823	0.6725	0.5323	0.4147

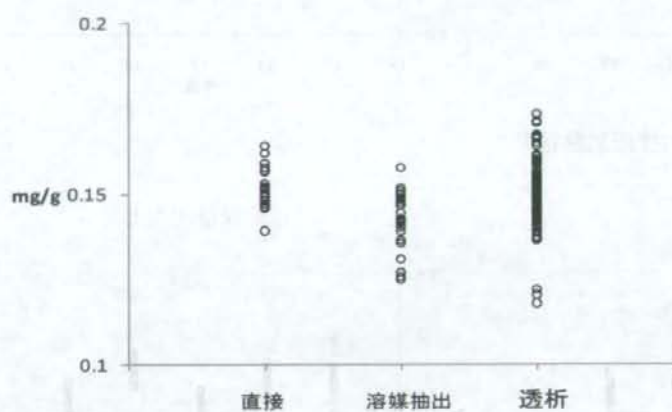
Table 9 卵中フルベンダゾール技能試験結果

年度	n	平均 μg/g	併行精度		室間精度	
			SD	RSD	SD	RSD
H15	169	0.335	0.01032	3.1	0.0355	10.6
H16	184	0.252	0.00800	3.2	0.0277	11.0
H17	181	0.210	0.00647	3.1	0.0242	11.6
H18	181	0.183	0.00567	3.1	0.0201	11.0
H19	185	0.283	0.00732	2.6	0.0323	11.4

H15



H16



H17

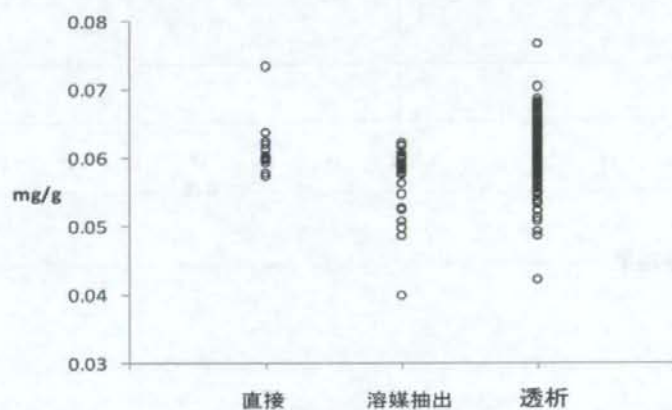


Fig.1 サッカリンナトリウムの技能試験結果

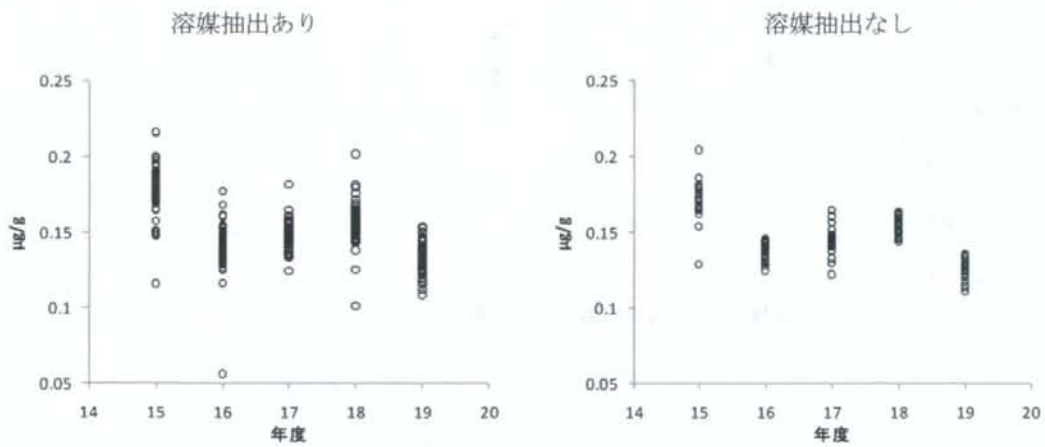


Fig.2 清涼飲料水中カドミウムの技能試験結果

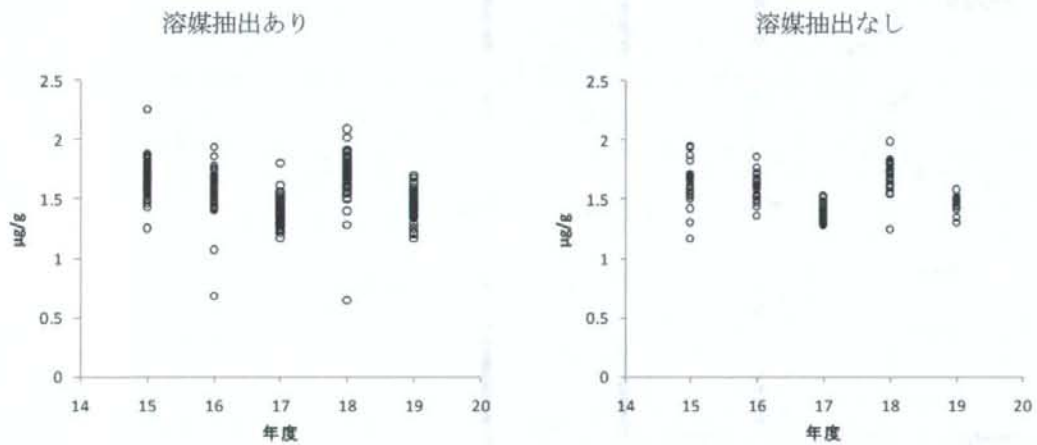


Fig.3 清涼飲料水中鉛の技能試験結果