

推定した。分散分析は全ての生鮮野菜について実施し、全データセットにおいて分析の併行精度が十分に小さく分析法の性能評価結果に一致していることを確認した。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測定値の平均値の差に有意な差が認められるかの検定を行った。その際にはまず、1回目と2回目のそれぞれのサンプリングにより得られた $n=8$ 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、全データセットについて等分散が確認されたため、Student's t 検定により平均の差の検定を行った。

サンプリングの不確かさ推定の際には、実験計画に従い得られた 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硝酸塩濃度の

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。

食肉加工食品に添加される化学物質並びに汚染穀物中に含まれるマイコトキシン濃度のサンプリングに起因する不確かさ

・試料

・生産管理された加工食品

ソーセージ並びにハムを食肉加工品として選択した。いずれも食肉加工工場において通常市販される製品として製造された。

・汚染小麦及び大麦

(独)農研機構・九州沖縄農研の実験圃場にて収穫され、25kg を容量として袋詰めされた汚染小麦 3 袋及び汚染大麦 1 袋を入手し、使用した。汚染圃場から採取した小麦あるいは大麦は、一切の混合操作をせずに袋詰めし、袋内に汚染圃場中でのデオキシニバレノール濃度の分布が再現されるよう意図した。各袋に詰められた小麦あるいは大麦は、それぞれ異なる汚染圃場から採取した。なお小麦に関しては、トワイズミ、ミナミノカオリ、農林 61 号の 3 つの品種

を各汚染圃場で栽培し、それぞれを採取し袋詰めしたものを試料とした。

・サンプリング計画及び手順

・食肉加工食品のサンプリング計画及び手順

規定量の原材料を使用し、製造手順に決められた1製造単位を母集団(ロット)とした。ロットの全体を通じ、ベルトコンベアーにより運ばれる動的状態を利用し一定の間隔をもって、製品となる20包装単位を抜き取った。1包装単位ごとに混合・均質化し、試験室試料とした。試験室試料から分析に必要な重量をはかり取り、分析用試料(分析ポーション)とした。分析ポーションは、分析に供するまでの間-20℃で保存した。1つの試験室試料あたり2併行分析を実施した。従って、1つの製品と対象化学物質ごとの分析点数は40点となる。

・汚染小麦並びに大麦のサンプリング計画及び手順

入手した25kgの汚染小麦あるいは大麦で満たされた袋をロットとした。螺旋状に50カ所の印を袋につけ、印づけられた各箇所から平型穀刺棒(米麦用 25 x 400 mm、不二金属工業(株))を用いて、100 g ずつインク

リメントを採取し、これを1次試料とした。1次試料を70℃の温度条件下で一昼夜乾燥させ、真菌を死滅させた後、約1 mmの粒径になるようにミキサーミルを用いて粉碎し、混合・均質化した試料を試験室試料とした。試験室試料は、分析に供するまでの間-20℃で保存した。各試験室試料は2併行で分析した。本研究では、品種の異なる3種の小麦と1種の大麦で満たされた4つの袋をそれぞれ独立したロットとして取り扱い検討した。そのため、総分析点数は400点となる。

・分析法

・亜硝酸ナトリウムの分析

試料約10 gを正確に量り取り、80℃にあらかじめ加温しておいた水80 mL及び0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mLを加え、ホモジナイズした後、200 mL容のフラスコに移した。ホモジナイズに使用した容器は温水10 mLにより5回洗浄し、洗液は先のフラスコに加えた。これに硫酸亜鉛溶液(3→25, 417 mM) 20 mLを加えてよく振り混ぜ、80℃の水浴中で20分間加温した。この間、ときどき振り混ぜた。次いで、冷水中で室温まで冷却した後、0.5 mol/L水酸

化ナトリウム溶液により pH9.5 に調整し、水を加えて 200 mL に定容した。混和後、4°C にて 30 分間静置した。静置後の溶液を乾燥ろ紙を用いてろ過した。ろ過直後に得られるろ液 20 mL は捨て、以後得られた澄明なろ液を抽出液とした。測定用溶液の調製及び測定の方法は以下の通り。抽出液 20 mL を 25 mL 容メスフラスコに正確に量り取り、スルファニルアミド液 1 mL、塩酸(1→2, 6 mol/L) 2 mL 及びナフチルエチレンジアミン溶液 1 mL を加えた後、水により定容した。

定容後よく振り混ぜ、室温下で 20 分間静置し、測定用溶液とした。抽出溶液の代わりに水を用いて同様の操作を行い、得られた溶液を空試験溶液とした。測定波長を 540 nm とし、測定溶液及び空試験溶液の吸光度を測定した。測定溶液の吸光度から空試験溶液の吸光度を差し引いた後の値を、下記のとおり設計した検量線により検量し、濃度を求めた。

・アセスルファム K の分析

細切した試料 10 g を精密に量り、透析内液用溶液 20 mL を用いてセロハンチューブに移した後、セロハンチューブの上端を密封し、200 mL の

メスシリンダーに入れた。次いでメスシリンダー内に透析外液用溶液を加えて全量を 200 mL とした。ときどき揺り動かしながら室温で 48 時間透析した。

透析後の容液 20 mL を 25 mL 容メスフラスコに移し、これに 0.1 mol/L 臭化テトラ-n-プロピルアンモニウム溶液 2 mL を加えた後、水により正確に 25 mL とした。この溶液の 5 mL をオクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジカラムに負荷し、続いて水 10 mL を通して洗浄した。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジカラムの溶出口に強陰イオン交換型カートリッジカラムを接続し、メタノール・水混液(4:6, v:v) 10 mL を負荷後、オクタデシルシリル化シリカゲルカートリッジカラムを取り外した。強陰イオン交換型カートリッジカラムに 0.3 w/v %リン酸溶液 5 mL を負荷し、続いて水 5 mL を通して洗浄した後、0.3 mol/L 塩酸で溶出した。溶出液の全量が正確に 5 mL となるまで溶出し、これを測定用溶液として HPLC による測定に供した。

・デオキシニバレノールの分析

デオキシニバレノール濃度の分析

には、DON 5/5 Quantitative Test Kit (Neogen 社製 ELISA kit)を用いた。乾燥した各試料 10 g を量り取り、キット製造者が作成したプロトコールに基づいて分析した。

C.D. 研究結果及び考察

生鮮野菜中に残留する各種農薬等のサンプリングに起因する不確かさ

・サンプルの測定結果の概要

生鮮野菜と分析対象農薬の組み合わせごとの分析ポーションの測定結果をサンプリングの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)も合わせて求めた。まずデータを俯瞰すれば、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から得られた測定値はよく一致していた。2つのポーションでの測定値の平均値を個別サンプル代表値とし、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

むね大きく、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。

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た。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。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た。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の差が認められた。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られた。

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。

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。

ハクサイ中のエトフェンプ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。

・測定結果の統計解析

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 回目にサンプリングしたナス中のクロルフェナピル濃度の測定結果を除き、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ピル濃度の測定値については外れ値を含む可能性が考えられたため、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。その結果、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。

・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。

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ことが示された。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。しかし、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られる。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。

・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

対象とした生鮮野菜のようなそのまま食される一次性の食品(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の食品(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ないことになり、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

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。

各種生鮮野菜中に含まれる亜硝酸塩濃度のサンプリングに起因する不確かさ

・分析法の性能評価

実際の試料を分析する前提として、分析法の性能が評価されていることが重要である。そこで分析法の性能を評価することを目的とした試験を、別途計画し、事前に実施した。

実施した性能評価試験では、硝酸塩の濃度が低いことを明らかにしたうえで、トマトとアスパラガスをコントロール試料として選定し、そこに規定量の硝酸塩を添加し、性能評価用試料として用いることとした。添加濃度としては、試料重量あたりの濃度として200及び1000 ppmを設定し、本濃度域での精度と真度の妥当性を判断した。

1日あたり、コントロール試料並びに各濃度の添加試料を2検体ずつ、計6検体を併行して分析し、この分析を5日間実施した。得られた測定値を解析し、回収率並びに精度を推定した。各濃度のトマト及びアスパ

ラガス試料を通じて、回収率は97.6-102.4%、併行精度及び室内精度はそれぞれ相対標準偏差として0.4-1.3%及び0.8-1.5%であった。使用した生鮮野菜の種類によることなく、回収率、併行精度並びに室内精度ともに、一般的な理化学分析に要求される性能評価基準を満たしており、信頼性の高い測定値を得るための分析が可能であると判断した。

・各生鮮野菜中の硝酸塩濃度の測定結果(概要)

生鮮野菜の種類を問わず、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から得られた測定値はよく一致した。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。

ダイコン葉中の硝酸塩濃度の測定結果は、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4214 ppm、2回目のサンプリングで5011 ppmであり、分析に供した全生鮮野菜を通じ最も高いことが明らかとな

った。また、サンプリング回ごとの個別サンプル代表値の変動(相対標準偏差;RSD)は17.4及び15.5%であった。一方、2つの分析ポーションの測定値はよく一致しており、分析手順による測定値への影響は分析法の性能評価結果から予測される大きさと同程度であると予測された。また、ダイコン葉中の硝酸塩濃度は、EUにおいてハウレンソウに定められている基準値(3000 mg/kg; 10月～3月期)と仮に比較すると、その値を超過していた。

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4449 ppm、分析ポーション B について4414 ppm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5093 ppm、分析ポーション B について4924 ppmであった。2回のサンプリングを通じ、個別サンプル代表値の平均値と、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。これ

らの結果は、分析に供したダイコン葉中での硝酸塩濃度の均一性が高い事を示唆しており、二つの分析ポジションの測定値に比べ個別サンプル代表値の変動が大きい結果によっても支持される。つまり、少なくともダイコン葉中の硝酸塩濃度を測定する場合には、同一試料からの分析を繰り返すよりはむしろ、多数の個別サンプルの分析を行った方が、より対象母集団中での硝酸塩濃度の平均を正確に推定できるものと考えられる。

ダイコン根中の硝酸塩濃度の測定結果は、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 2228 ppm、2回目のサンプリングで 2755 ppm であり、それぞれの RSD は 15.3 及び 11.1%であった。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、分析ポジション A について 2096 ppm、分析ポジション B について 2128 ppm 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、分析ポジション A について 2724 ppm、分析ポジション B について 2614 ppm であった。個別サンプル間での硝酸塩濃度の測定値はダ

イコン葉中と同程度の変動を示した。また、2回のサンプリングを通じ、個別サンプル代表値の平均値と、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つの分析ポジションから得られた測定値もよく一致した。

いずれも食することが可能な部位として、ダイコンの葉と根を区別し、部位ごとの硝酸塩濃度を測定した。その結果からは、根に比べ葉中での硝酸塩濃度が2倍程度高い事が明らかとなった。これは同重量の葉と根を摂食すると仮定すれば摂取される硝酸塩の量は、2倍異なることを意味している。サンプリング手順の観点から言えば、ダイコンの全体のうちに明らかに硝酸塩濃度の異なる部位が存在することから、これらを十分に混合均一化しない限り、分析試料中での濃度が不均一となり、硝酸塩濃度の正確な推定値を得ることが難しくなると予測される。いずれにせよ、部位別に分析する限り、サンプリングの不確かさを推定するために必要となる個別サンプル間での濃度の分布並びに分析の併行精度に対する分析試料の均一性の寄与は低い。

ハウレンソウ中の硝酸塩濃度の測

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 1271 ppm、2 回目のサンプリングで 1172 ppm であり、それぞれの RSD は 27.4 及び 24.0%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 1339 ppm、分析ポーション B について 1337 ppm 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 1186 ppm、分析ポーション B について 1198 ppm であった。上記のとおり、個別サンプル間での硝酸塩濃度の測定値は、ダイコンの場合に比べ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は、2 回のサンプリングを通じてよく一致した。

キャベツ中の硝酸塩濃度の測定結果は、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 1264 ppm、2 回目のサンプリングで 1263 ppm であり、それぞれの RSD は 23.7 及び 16.3%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 1271 ppm、分析ポーション B について 1267 ppm 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 1374 ppm、分析ポーション B について 1382 ppm であった。上記のとおり、個別サンプル代表値の平均値及び個別サンプル間での測定値のばらつきの程度は、ハウレンソウの場合と非常によく似ていた。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は、2 回のサンプリングを通じてよく一致した。

ハクサイ中の硝酸塩濃度の測定結果は、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 1678 ppm、2 回目のサンプリングで 1829 ppm であり、それぞれの RSD は 17.1 及び 10.9%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 1534 ppm、分析ポーション B について 1513 ppm 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 1598 ppm、分析ポ

ション B について 1589 ppm であった。上記のとおり、個別サンプル代表値の平均値は、ダイコン程ではないが、ホウレンソウやキャベツに比べると若干高めである一方で、個別サンプル間の測定値のばらつきは小さかった。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は、2 回のサンプリングを通じてよく一致した。

ナス中の硝酸塩濃度の測定結果は、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 371 ppm、2 回目のサンプリングで 404 ppm であり、本研究で対象とした生鮮野菜中最低であった。またそれぞれの RSD は 11.6 及び 11.1% でありハクサイで得られた結果に近かった。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 369 ppm、分析ポーション B について 368 ppm 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 410 ppm、分析ポーション B について 407 ppm であり、それぞれ対応する個別サンプル測定値の平均値と非常に近い結果となっ

た。

・測定結果の統計解析

全ての生鮮野菜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、それに比較すると個別サンプル間で硝酸塩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硝酸塩濃度の変動(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(RSD)は約 0.8~2.3%の範囲にあるのに対し、サンプル間の変動(RSD)は 10.9~27.4%のより大きな値となった。また総標準偏差に占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。併行精度の大きさについては、トマト及びアスパラガスに規定量の硝酸塩を添加した試料を用いて実施した、性能評価試験の結果から推定される併行及び室内精度によく一致している。性能評価試験の際に添加した硝酸塩濃度と個別サンプルに含まれていた硝酸塩濃度との差や、同一試料を複数繰り返し分析した結果から推定された精度であるか、複数の個別試料を分析した結果から推定された精度であるかの違いを考慮すると、本研究で採用した分析法は生鮮野菜の種を問わず広く適用可能な、ばらつきの小さい方法であると言える。

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。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、全ての代表

値について等分散が確認された。この結果から、2回のサンプリング間で得られた個別サンプル代表値の分散は等しいと仮定し、Student's t 検定により平均値の差を検定した。その結果、ダイコンの葉から得られた個別サンプル代表値の検定結果についてのみ P 値が 0.05 を下回り(0.006)、2回のサンプリングで得られた平均値の差に有意の差があると考えられた。この結果は、サンプリングを繰り返し実行することにより得られる測定値が有意に異なる可能性が高いことを示唆するものであるが、ダイコンの葉についてのみ、そのような結果となった原因は特定できない。サンプリングの観点から考察すれば、ダイコンから得られた結果は、葉に関する2回の繰り返しサンプリング並びに葉と根という異なる部位のサンプリングの両方が、特定の母集団中での濃度の分布が均一ではなく、異なる平均値を持つ分布が混在した状態を想像させる。そのような場合にはランダムサンプリングを実行したにせよ、抜き取られるサンプル数が十分に大きくなければサンプリングごとに推定される平均値の差が均一な分布からのサンプリ

ングに比べ大きくなり、サンプリング計画の策定上、留意しなければならないケースだと考えられる。

ダイコンを除くその他の生鮮野菜については、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な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差が生じる可能性が非常に低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硝酸塩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。

・不確かさの推定

生鮮野菜ごとに硝酸塩濃度の測定における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の一次サンプルに対応する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硝酸塩濃度の変動を推定した。推定されたサンプル間で

の硝酸塩濃度の変動を、母集団(圃場)中の硝酸塩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。まず、全ての生鮮野菜を通じて、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ことがわかる。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。また、サンプルサイズが3の場合でも、サンプリングの不確かさ(RSD)はハウレンソウについて推定された14.7%が最大であり、これは昨年度報告したサンプルサイズを16と仮定して推定される残留レベルの農薬測定におけるサンプリングの不確かさの最も小さな幅(16.5%)とほぼ同等の結果である。この結果は、分析対象とする物質の濃度とその存在様式の違いを反映したものと考える。昨年度報告した個別サンプル測定値の平均とコンポジットサンプル測定値が乖離するという結果からは、農薬類は個別の生鮮野菜の個体中に一様の濃度で残留しているわ

けではなく、散布されたときに付着しやすい箇所あるいは、雨風等の環境による影響を受けにくい箇所等に高い濃度で存在することが強く示唆される。これに対し、硝酸塩は植物性食品に幅広く含まれ、植物種あるいは葉と根といった生理学上区別される器官によって濃度の平均が異なる可能性は否定できないものの、分布の幅は狭く、個体差も生じにくいものと考えられる。このように分析対象とする物質の濃度やアイテム中での局在、また母集団中での分布に関する情報を得て、分析の目的と合わせて総合的に評価する事が適切なサンプリング計画の策定には必要となる。

また測定値には、サンプリングの不確かさと同時に、対象物質の抽出、分離、計測といった分析行為に起因する不確かさ(測定の不確かさ)が含まれている。この測定の不確かさに比べ、サンプリングの不確かさを小さくすること(サンプリングサイズを大きくすること)は、労力やコストの点から現実的ではない。そのため、測定の不確かさを推定し、これを指標にサンプリングの不確かさを評価する事でサンプリング計画の適正を

諮る事が有効な手段になりうると考える。測定の不確かさを推定するために一般的に用いられる Thompson 修正式により、本研究で得られた測定値に対応する濃度レベルである 1000 ppm での拡張不確かさ(包含係数 2)を推定すると 8%となる。この測定値の拡張不確かさと同等の不確かさを与えるサンプルサイズは約 5~10 であり、ナスのように生鮮野菜の種類によっては 3 でも十分な場合もある。さらに言えば、本研究で推定しているサンプリングの不確かさには寄与は小さいものの一定の分析精度を含めているため、より小さなサンプルサイズにしても不確かさの幅が同程度に保たれることが期待される。

食肉加工食品に添加される化学物質並びに汚染穀物中に含まれるマイコトキシン濃度のサンプリングに起因する不確かさ

・食肉加工食品中のアセスルファミン K 及び亜硝酸ナトリウム濃度

ソーセージ及びハム中のアセスルファミン K 並びに亜硝酸ナトリウム濃度の測定結果を俯瞰すると、ハム、ソーセージの種類を問わず、同一の

試験室試料から分取した2つの分析ポーション(表中 A と B)から得られた測定値は、試験室試料間での測定値に比べよく一致した。つまり、同一試料に由来する2つの分析ポーション間での測定値の変動は、試験室試料(1 包装単位の製品)間での測定値の変動に比べ小さい。そこで、1つの試験室試料に由来する2つの分析ポーションの測定値の平均値(試験室試料代表値)を算出し、試験室試料代表値の平均値で除することによって標準化した後、散布図にプロットし解析した。その結果、2つの化学物質濃度の試験室試料間での変動はともに、ソーセージに比べハムにおいてより大きかった。また、アセスルファム K に比べ、亜硝酸ナトリウムでより大きかった。これらの結果は、食品とそれに含まれる化学物質の組み合わせによって、それら食品により構成される集団(母集団)における意図する化学物質の濃度の変動が大きく異なることを強く示唆している。ソーセージは原材料にアセスルファム K と亜硝酸ナトリウムをともに添加し、その後十分に攪拌・混合した後に成形することを製法とする。これに対し、ハムの製造工程

中、2種の化学物質は、原材料となる生肉に注入器を用いて添加される。このような化学物質の添加の方法の異なりが、2種の食品における試験室試料間での食品添加物濃度の変動に影響しているものと推測される。また、原材料に含まれる脂肪といった食品成分が、ソーセージではより均質であるのに対し、ハムでは原材料である生肉と同様に局在していることも、食品添加物の化学物質としての極性を介して、それら濃度の変動に寄与するものと考えられる。

・大麦あるいは小麦中のデオキシニバレノール濃度

ロットとした「袋詰め」の異なる大麦及び3種の小麦ごとに、1つの試験室試料から分取した2つの分析ポーションを併行分析した。分析により得られたデータを俯瞰すると、ロットの別によらず、同一の試験室試料から分取した2つの分析ポーションから得られた測定値は、同一ロットから採取された試験室試料間での測定値に比べよく一致した。2つの分析ポーション間での測定値は、試験室試料の均質性と分析法の精度の影響を受け変動する。しかし、その変動が試験室試料間での測定値の

変動に比べ小さかった。そこで、試験室試料間での変動の大きさを知るために、2つの分析ポーションの測定値の平均値(試験室試料代表値)を算出し、試験室試料代表値の平均値で除することによって標準化した後、散布図にプロットし解析した。解析結果から、本研究で検討した4つのロット中では、大麦のロットから採取した試験室試料間でのデオキシニバレノール濃度の変動が最も大きいことが明らかとなった。デオキシニバレノールは、フザリウム属のカビが産生するトリコテセン系のカビ毒であり、その試料中濃度は、菌の繁殖の程度やデオキシニバレノール産生能に依存するものと考えられる。そのため、4つのロット間で、デオキシニバレノール産生菌の繁殖の程度あるいはデオキシニバレノール産生能が異なっていた可能性が示唆される。しかし、当該菌の繁殖や当該菌によるデオキシニバレノール産生能は、天候等の気象条件や、作物の生育の程度にも依ると考察されることから、異なる大麦あるいは小麦品種、さらには異なる圃場で育成されたそれら作物についても、同様の結果が得られることを意味するもので

はない。一方で、4つのロットを通じて、試験室試料間のデオキシニバレノール濃度の変動は、ソーセージ中のアセスルファムK並びに亜硝酸ナトリウム及び、ハム中のアセスルファムk濃度の変動に比べ、明らかに大きい。このことから、管理生産される加工食品中に意図して添加される化学物質濃度のロット内変動にくらべ、圃場等で生産される全ての穀物といったロット中でのデオキシニバレノール濃度は、より大きく変動することが示唆される。

・測定結果の統計解析

・アセスルファムK及び亜硝酸ナトリウム濃度の統計解析

分析により得られたアセスルファムKあるいは亜硝酸ナトリウムの全測定結果を対象に統計解析を実施することにより、測定値に含まれている分析に起因するばらつきと、そもそも試料に含まれている化学物質濃度の変動を分離し、明らかにすることを試みた。

まず、分析により生じたばらつきの大きさ(併行精度)、個々の試験室試料に含まれるアセスルファムK並びに亜硝酸ナトリウム濃度の変動(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)を推定するため、一元配置の分散分析を行った。20の試験室試料を2併行分析することで得られた n=40 の測定値を一組のデータセットとして分散分析を行った。分散分析により算出された分散に基づき推定した併行精度、サンプル間の変動、総標準偏差を SD 並びに RSD として推定した。その結果、ソーセージ中のアセスルファム K の分析精度(RSD)は 6.3%であり、サンプル間での濃度のばらつき(6.6%)とほぼ変わらない推定値であったが、この結果を除き、残る3つの食品と食品添加物との組み合わせを通じて、併行精度はサンプル間でのばらつきに比べて十分に小さかった。具体的には、残る3つの組み合わせを通じての併行精度は 2.7~4.6%の範囲にあるのに対し、サンプル間でのばらつきは 10.5~45.7%であると推定された。また、総標準偏差は、併行精度とサンプル間でのばらつきを分散として合成し推定しているため明らかであるが、サンプル間でのばらつきの寄与が大きい。特にハム試料間濃度の変動は極めて大きく、総標準偏差への寄与は極めて高い。測定値

を散布図としてプロットし解析した結果についても考察したが、上記の分散分析の結果からも、本研究で得られたアセスルファム K と亜硝酸ナトリウム測定値のばらつきの主たる要因は、試料間での濃度の変動であることが明らかとなった。

・デオキシニバレノール濃度の統計解析

分析により得たデオキシニバレノールの全測定結果を対象に分散分析を実施し併行精度、サンプル間のばらつき、及び総標準偏差の推定を試みた。分散分析では、50の試験室試料を2併行分析することで得られた n=100 の測定値を一組のデータセットとして取り扱った。4つのロットを通じ、デオキシニバレノールの分析精度(RSD)は 5.3~10.5%と推定された。また、サンプル間のばらつきは 17.7~33.4%、総標準偏差は 18.7~33.8%と推定された。最も大きな併行精度は、小麦の一品種であるトワイズミから得られた測定値に基づき推定された。トワイズミ中のデオキシニバレノール濃度は、試験室試料代表値の平均値として 0.93 $\mu\text{g/g}$ と推定され、分析法として用いた ELISA 法の定量限界付近の濃度であ