

2) コメ加工品粉砕物試料の調製および試験期間中の品質の確認

DNA 抽出操作の確認を目的とした調査試料は、あらかじめ通知法¹⁾により中国産安全性未審査 GM コメの混入がないことを確認したタイ産ピーファンを、孔径 1.0 mm のスクリーンを装着した超遠心粉砕機 ZM200 (㈱レッチェ) で粉砕後、十分混合して作製した。これを 25 mL 容の遠沈管 49 本に 2 g ずつ分注し、コメ加工品粉砕物試料 (陰性試料) とした。分注試料は使用まで -20℃ で保存した。

分注試料から試料配布前および外部精度管理の試験期間終了後にそれぞれ 6 本を無作為に取り出し、DNA を抽出して定性 PCR 試験を実施し、検出結果を確認した。

3) 定性 PCR 用 DNA 溶液試料の調製および試験期間中の品質の確認

定性 PCR 用陽性試料は、検出下限の検討結果^{*5}に基づいて、定性 PCR 用コントロールプラスミド (16800 copy/5 μL) を非 GM コメ DNA 溶液で希釈し、定性 PCR 用コントロールプラスミドを容量比で 1% および 0.05% 含む試料を調製した。このうち 1% 試料は陽性対照用、Cry1Ac 検出用、Bt コメ検出用、Bt コメ確認用の全試験の検出を予定し、試料 3 (高濃度陽性試料) とした。また 0.05% 試料は陽性対照用、Cry1Ac 検出用、Bt コメ確認用の 3 試験の検出を予定し、試料 1 (低濃度陽性試料) とした。さらに遺伝子汚染の確認用として、非 GM コメ DNA 溶液を試料 2 (陰性試料) として使用した。各試料はそれぞれ 0.5 mL 容のマイクロチューブ 100 本に 40 μL ずつ分注し、使用まで -20℃ で凍結保存した。

試料 1、試料 2、試料 3 の分注試料は、試料配布前および外部精度管理調査の試験期間終了後にそれぞれ 8 本を無作為に取り出して定性 PCR 試験を実施し、調製した各試料が予定どおり検出できるか確認した。

4) リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料の調製および試験期間中の品質の確認

リアルタイム PCR 用陽性試料は、検出下限の検討結果^{*5}に基づいて、リアルタイム PCR 用コントロールプラスミド (250000 copy/5 μL) を非 GM コメ DNA 溶液で希釈し、リアルタイム PCR 用コントロールプラスミドを容量比で 0.6% および 0.12% 含む試料を調製した。このうち 0.6% 試料はコメ陽性対照用試験および、Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) の GM63-TaQ プローブおよび NGMr-TaQ プローブのマルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上の結果を予定し、試料 A (高濃度陽性試料) とした。また 0.12% 試料はコメ陽性対照用および、Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) の NGMr-TaQ プローブの解析の値が 1.5 以上の結果を予定し、試料 B (低濃度陽性試料) とした。さらに遺伝子汚染の確認用として、非 GM コメ DNA 溶液を試料 C (陰性試料) と

して使用した。各試料はそれぞれ 0.5 mL 容のマイクロチューブ 62 本に 40 μL ずつ分注し、使用まで -20℃ で凍結保存した。

試料 A、試料 B、試料 C の分注試料は、試料配布前および外部精度管理調査の試験期間終了後にそれぞれ 8 本を無作為に取り出して 2 試行でリアルタイム PCR 試験を実施し、調製した各試料が予定どおり検出できるか確認した。

3. 外部精度管理調査試料の送付および参加機関における試験の実施

GM 食品の検査を行っている検査機関のうち、事前に実施した調査で遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査への参加を希望した機関数は 33 機関であった。これらの参加機関には、コメ加工品粉砕物試料 1 試料 (1 本)、定性 PCR 用 DNA 溶液試料 3 試料 (試料 1、試料 2、試料 3、各 2 本)、リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料 3 試料 (試料 A、試料 B、試料 C、各 1 本) を実施要領および報告書書式とともに冷凍便で送付し、試料については到着後 -20℃ で保存するよう指示した。なお、実施要領には検査法として 2007 年 2 月 20 日付け通知¹⁾ および 2006 年 6 月 29 日付けの通知⁶⁾ の方法を使用すること、および定性 PCR 用 DNA 溶液試料、リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料測定の実行数および判定法の変更点を記載した。すなわち、定性 PCR 用 DNA 溶液試料においては、1 試料につき 2 試行実施し、この結果を通知¹⁾ における DNA 抽出液 2 本それぞれ 1 試行の結果と読み換えて判定すること、およびリアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料は、コメ陽性対照用試験、Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) とも通知¹⁾ の半分の試行数とし、1 試料につき、コメ陽性対照用試験 2 ウェル (2 試行)、Bt コメ検出用試験 4 ウェル (1 倍試料 2 試行 + 2 倍希釈試料 2 試行) を実施し、この結果から判定を行うよう指示した。

表 1 に通知¹⁾ の実施手順と本外部精度管理調査における各試料の測定対象試験および試行数をまとめて示した。

III 結果

1. 外部精度管理調査試料の調製

1) コメ加工品粉砕物試料の調製および分注済み試料の試験期間中の品質の確認

コメ加工品粉砕物試料 (陰性試料) の分注試料を外部精度管理試験期間の前後に測定し、試験期間中の品質を確認した。その結果、試料配布前および試験期間終了後共に陽性対照用試験では全測定で予定長の増幅物が検出された。一方、Cry1Ac 検出用試験、Bt コメ検出用試験、Bt コメ確認用試験では予定長の増幅物は検出されず、コメ加工品粉砕物試料は試験期間を通じて陰性の品質を保持していたことが明らかになった (表 2)。

*5 井上ら、中国産安全性未審査遺伝子組換え米を対象とした外部精度管理調査における試料作製の検討、日本食品衛生学会第 96 回学術講演会講演要旨集、113 (2008)。

表 1. 通知の実施手順および外部精度管理試料の測定対象試験

通知の実施手順の概略 (上から順に実施)		外部精度管理試料の測定対象試験 および試行数				判定
		試験名	試行数	定性 PCR 用 DNA 溶液試料		
コメ 加工品 粉砕物 試料	陰性試料			陽性試料		
DNA 抽出		2	2			(260 nm/280 nm の吸光度比の目安は 1.7~2.0)
定性 PCR1	陽性対照用 試験	2†	2†	2‡	2‡	陽性対照用試験の少なくとも 1 試行で 81 bp の増幅物を検出し、さらに Cry1Ac 検出用試験の少なくとも 1 試行で 90 bp の増幅物を検出した場合、定性 PCR2 に進む
	Cry1Ac 検出用 試験	2†	2†	2‡	2‡	
定性 PCR2	Bt コメ検出用 試験	2†			2‡	Bt コメ検出用試験で 147 bp、Bt コメ確認用試験で 120 bp のいずれかの増幅物を 1 試行でも検出した場合、リアルタイム PCR 試験に進む
	Bt コメ確認用 試験	2†			2‡	
リアル タイム PCR	コメ陽性対照用 試験	4††			2‡	コメ陽性対照用試験でマルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上となる解析値が 1 つ以上あり、さらに Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) の GM63-Taq プロープおよび NGMr-Taq プロープに対するマルチコンポーネント解析のいずれかで 1.5 以上となる解析値が 1 つ以上ある場合は陽性と判断する
	Bt コメ検出用 試験 (Duplex PCR)	8†††			4‡‡	

表の数字は各試験の試行数

†: 2 抽出液×1 試行

‡: 2 抽出液×2 試行

††: 2 抽出液×(1 倍抽出液 2 試行+2 倍希釈抽出液 2 試行)

‡‡: 1 試料につき 2 試行

‡‡‡: 1 倍試料 2 試行+2 倍希釈試料 2 試行

表 2. 外部精度管理調査試料 (コメ加工品粉砕物試料および定性 PCR 用 DNA 溶液試料) の定性 PCR による検出の確認結果

試験名	コメ加工品粉砕物試料 ^{a)}		定性 PCR 用 DNA 溶液試料 ^{b)}					
			試料 1		試料 2		試料 3	
	配布前	試験期間 終了後	配布前	試験期間 終了後	配布前	試験期間 終了後	配布前	試験期間 終了後
陽性対照用	6/6 ^{c)}	6/6	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
Cry1Ac 検出用	0/6	0/6	8/8	8/8	0/8	0/8	8/8	8/8
Bt コメ検出用	0/6	0/6	1/8	3/8	0/8	0/8	8/8	8/8
Bt コメ確認用	0/6	0/6	8/8	8/8	0/8	0/8	8/8	8/8
試料タイプ	陰性試料		陽性試料 (低濃度)		陰性試料		陽性試料 (高濃度)	

a) 6 容器の分注試料からそれぞれ 1 試行で抽出した DNA 溶液についてそれぞれの試験を 1 試行で実施

b) 8 容器の分注試料についてそれぞれの試験を 1 試行で実施

c) 予定長増幅物の検出数 / 測定数

2) 分注済み定性 PCR 用 DNA 溶液試料の試験期間中の品質の確認

定性 PCR 用 DNA 溶液試料の試料 1、試料 2、試料 3 の分注試料を試験期間の前後に測定し、試験期間中の品質を確認した。その結果、試料 1 (低濃度陽性試料) では予定通り、陽性対照用試験、Cry1Ac 検出用試験、Bt コメ確認用試験の全測定で予定長の増幅物が検出された。試料 2 (陰性試料) は、陽性対照用試験では全測定で予定長の増幅物が検出されたが、Cry1Ac 検出用試験、Bt コメ検出用試験、Bt コメ確認用試験では予定長の増幅物は全く検出されなかった。試料 3 (高濃度陽性試料) では陽性対照用試験、Cry1Ac 検

出用試験、Bt コメ検出用試験、Bt コメ確認用試験の全測定で予定長の増幅物が検出された (表 2)。この結果、定性 PCR 用 DNA 溶液試料はいずれも予定通り調製され、試験期間を通じて品質を維持していたことが確認された。

3) 分注済みリアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料の試験期間中の品質の確認

リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料の試料 A、試料 B、試料 C の分注試料を試験期間の前後に測定し、試験期間中の品質を確認した。その結果、試料 A (高濃度陽性試料) では、コメ陽性対照用試験および Bt コメ検出用試験

(Duplex PCR) の GM63-Taq プローブおよび NGMr-Taq プローブのマルチコンポーネント解析の値は予定通り全て 1.5 以上だった。試料 B (低濃度陽性試料) では、コメ陽性対照用試験および Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) の NGMr-Taq プローブのマルチコンポーネント解析の値は予定通り全て 1.5 以上であった。試料 C (陰性試料) はコメ陽性対照用試験の全ウェルでマルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上であったが、Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) では 1.5 以上となる解析はなかった (表 3)。この結果、リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料はいずれも予定通り調製され、試験期間を通じて品質を維持していたことが確認された。

2. 外部精度管理調査結果

1) コメ加工品粉砕物試料についての外部精度管理調査結果

コメ加工品粉砕物試料からの DNA 抽出では 260 nm/280

nm の吸光度比が精製度の目安である 1.7 ~ 2.0 の範囲外となった機関が 7 機関あった。しかし定性 PCR の陽性対照用試験の結果 (表 4) では全 33 機関が 2 試行共に予定長の増幅物を検出した。一方 Cry1Ac 検出用試験では 33 機関中 31 機関は予定長の増幅物を検出せず予定通り陰性と判定したが、2 機関では 2 試行とも予定長の増幅物を検出した。これら 2 機関はさらに Bt コメ検出用試験および Bt コメ確認用試験を行った。その結果、2 機関のうち 1 機関は両試験共に予定長の増幅物を検出せず、ここで陰性と判定した。残る 1 機関は両試験で 2 試行共に予定長の増幅物を検出し、定性 PCR の最終結果は陽性の判定となった。この結果、コメ加工品粉砕物試料は 33 機関中 32 機関が GM 陰性と判定し、正答率は 97% だった。なおデータは示していないが、定性 PCR 試験でコメ加工品粉砕物試料を陽性と判定した当該 1 機関は通知¹⁾の手順に従ってリアルタイム PCR による最終確認試験を実施し、最終的に GM 陰性と判定した。

表 3. リアルタイム PCR 試験用外部精度管理試料のリアルタイム PCR による検出の確認結果

試験名	解析プローブ	試料 A		試料 B		試料 C	
		配布前	試験期間終了後	配布前	試験期間終了後	配布前	試験期間終了後
コメ陽性対照用試験		16/16 ^{a)}	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR)	GM63-Taq プローブ	16/16	16/16	13/16	16/16	0/16	0/16
	NGMr-Taq プローブ	16/16	16/16	16/16	16/16	0/16	0/16
試料タイプ		陽性試料 (高濃度)		陽性試料 (低濃度)		陰性試料	

各試料とも 8 容器の分注試料についてそれぞれの試験を 2 試行で実施

a) マルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上となった解析数 / 測定数

表 4. 外部精度管理調査参加機関におけるコメ加工品試料および定性 PCR 用 DNA 溶液試料の定性 PCR 測定結果

試験名	コメ加工品粉砕物試料		定性 PCR 用 DNA 溶液試料					
			試料 1		試料 2		試料 3	
	陽性測定数	陽性機関数	陽性測定数	陽性機関数	陽性測定数	陽性機関数	陽性測定数	陽性機関数
陽性対照用	66/66	33/33	66/66	33/33	66/66	33/33	66/66	33/33
Cry1Ac 検出用	4/66	2/33	66/66	33/33	3/66	2/33	65/66	33/33
中間判定結果	2/33		33/33		2/33		33/33	
Bt コメ検出用	2/4	1/2	18/66	13/33	0/4	0/2	66/66	33/33
Bt コメ確認用	2/4	1/2	62/66	31/33	0/4	0/2	65/66	33/33
最終判定結果	1/33		33/33		0/33		33/33	
試料タイプ	陰性		陽性		陰性		陽性	
正答率 (%)	97		100		100		100	

陽性測定数: 予定長増幅物の検出数 / 総測定数

陽性機関数: 1 試行以上検出した機関数 / 総機関数

中間判定結果: 陽性対照用試験および Cry1Ac 検出用試験とともに 1 試行以上増幅物を検出した機関数 / 総機関数

最終判定結果: Bt コメ検出用試験および Bt コメ確認用試験を実施した機関のうちいずれかの試験で 1 試行以上増幅物を検出した機関数 / 総機関数

2) 定性 PCR 用 DNA 溶液試料についての外部精度管理調査結果

参加機関における定性 PCR 用 DNA 溶液試料の試験結果をまとめて表 4 に示した。陽性対照用試験では試料 1、試料 2、試料 3 共に全 33 機関が 2 試行とも予定長の増幅物を検出した。

試料 1 ではさらに Cry1Ac 検出用試験でも全 33 機関が 2 試行とも予定長の増幅物を検出した。試料 3 の Cry1Ac 検出用試験では 33 機関中 32 機関が 2 試行とも予定長の増幅物を検出したが、残る 1 機関は 2 試行のうち 1 試行のみの検出であった。しかし、この場合も判定は陽性となるため、試料 1、試料 3 については全 33 機関が予定通り Bt コメ検出用試験および Bt コメ確認用試験の実施に進んだ。試料 2 の Cry1Ac 検出用試験では 31 機関は 2 試行とも予定長の増幅物を検出せず GM 陰性と判定し、予定通りここで試験を終了した。しかし 2 機関は少なくとも 2 試行のいずれかで予定長の増幅物を検出し、陽性と判定したため、Bt コメ検出用試験および Bt コメ確認用試験の実施に進んだ。

Bt コメ検出用試験の結果、試料 1 で 1 試行でも予定長の増幅物を検出したのは 33 機関中 13 機関のみであった。一方、試料 3 では全 33 機関が 2 試行とも予定長の増幅物を検出し、全機関が陽性と判定した。また、試料 2 の測定を実施した 2 機関はいずれも予定長の増幅物を検出しなかった。

Bt コメ確認用試験の結果、試料 1 では 33 機関中 31 機関は 2 試行とも予定長の増幅物を検出したが、2 機関は 2 試行とも予定長の増幅物を検出しなかった。しかし、この 2 機関はいずれも Bt コメ検出用試験で予定長の増幅物を検出しているため、Bt コメ検出用試験の結果と合わせて試料 1 は予定通り全 33 機関が GM 陽性の最終判定となった。試料 3 の Bt コメ確認用試験においては 33 機関中 32 機関が 2 試行とも予定長の増幅物を検出した。残る 1 機関は 2 試行のうち 1 試行のみの検出であったが、試料 3 も予定通り全 33 機関が GM 陽性の最終判定となった。また、試料 2 の測定を実施した 2

機関は Bt コメ確認用試験でも予定長の増幅物を検出せず、最終的に陰性と判定し、試料 2 についても全機関が GM 陰性と最終判定した。以上の結果、定性 PCR 用 DNA 溶液試料の最終判定結果は正答率がいずれの試料も 100% であった。

また、参加機関における定性 PCR のブランク反応液の測定結果は全て陰性だったほか、定性 PCR 用陽性対照プラスミドの測定でも全機関が全試験で予定長の増幅物を検出し、これらの測定に問題は認められなかった。

3) リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料についての外部精度管理調査結果

参加機関におけるリアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料の測定結果をまとめて表 5 に示した。コメ陽性対照用試験 (1 倍液 2 試行) のマルチコンポーネント解析の値は試料 A、試料 B は全機関の全解析結果で、試料 C は 1 機関の 1 解析結果を除き全て 1.5 以上となり、全 33 機関で増幅が検出された。

Bt コメ検出用試験 4 ウェル (1 倍試料 2 試行 + 2 倍希釈試料 2 試行) の GM63-Ta q プローブ、NGMr-Ta q プローブそれぞれのマルチコンポーネント解析結果は、試料 A (高濃度陽性試料) では全 33 機関で両プローブについて全て 1.5 以上となり、全機関が GM 陽性と判定した。試料 B (低濃度陽性試料) のマルチコンポーネント解析では、GM63-Ta q プローブにおいて 27 機関では 4 ウェルとも 1.5 以上であったが、6 機関、1 倍試料で 3 解析、2 倍希釈試料で 4 解析の値が 1.5 未満であった。しかし NGMr-Ta q プローブでは 33 機関の全解析で 1.5 以上となり、全機関が GM 陽性と判定した。

試料 C (陰性試料) のマルチコンポーネント解析では 33 機関中 28 機関が GM63-Ta q プローブ、NGMr-Ta q プローブ共に全て 1.5 を下回り、この時点で予定通り陰性と判定した。しかし 33 機関中 5 機関は、GM63-Ta q プローブおよび NGMr-Ta q プローブについての解析のうち少なくとも 1 つ以上 1.5 を上回る解析があった。これらの機関については報告書

表 5. 外部精度管理調査参加機関におけるリアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料のリアルタイム PCR 測定結果

試験	解析プローブ	試料溶液の希釈倍	試料 A		試料 B		試料 C	
			陽性測定数	陽性機関数	陽性測定数	陽性機関数	陽性測定数	陽性機関数
コメ陽性対照用試験		× 1	66/66	33/33	66/66	33/33	65/66	33/33
Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR)	GM63-Ta q プローブ	× 1	66/66	33/33	63/66	33/33	0/66	0/33
		× 2	66/66		62/66		0/66	
	NGMr-Ta q プローブ	× 1	66/66	33/33	66/66	33/33	1/66	1/33
		× 2	66/66		66/66		0/66	
最終判定結果			33/33		33/33		1/33	
試料タイプ			陽性		陽性		陰性	
正答率 (%)			100		100		97	

陽性測定数: マルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上となった解析数 / 総測定数

陽性機関数: マルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上となった解析がある機関数 / 総機関数

最終判定結果: コメ陽性対照用試験においてマルチコンポーネント解析に 1.5 以上の解析値があり、かつ Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) のいずれかのプローブについての解析で 1.5 以上となる解析値があった機関数 / 総機関数

とともに提出をうけた GM63-Taq プローブおよび NGMr-Taq プローブの Amplification plot の出力図を確認した。その結果、5 機関のうち 1 機関では NGMr-Taq プローブの 1 解析で指数関数的な増幅が確認でき、報告通り陽性の結果であることが確認された。残る 4 機関はいずれかのプローブで 1.5 以上となる解析結果があるにもかかわらず陰性と報告しているが、Amplification plot の出力図で増幅が認められた測定はなく、陰性の判定で間違いのないことが確認された。なお、これら 4 機関はいずれもリアルタイム PCR 装置に ABI7700 を使用していることが判明した。

以上の結果、陽性試料の試料 A、試料 B は予定通り全 33 機関が GM 陽性と判定し、正答率はいずれも 100% だった。しかし陰性試料の試料 C は 1 機関が誤って GM 陽性と判定したため正答率は 97% となった。なお、リアルタイム PCR 試験におけるコメ陽性対照用試験、Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) の試行数はいずれも通知¹⁾の半分の設定であったが、陽性試料を陰性試料と判定した機関はなく、今回の外部精度管理調査の結果に影響はないと考えられた。

リアルタイム PCR 測定における陽性対照プラスミドの測定結果には特に問題は認められなかったが、ブランク反応液の測定では、コメ陽性対照用試験においてマルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上となり、Amplification plot においても増幅が確認された機関が 4 機関あった。

IV 考察

外部精度管理調査におけるコメ粉砕物試料からの DNA 抽出では 260 nm/280 nm の吸光度比が 1.7 ~ 2.0 の範囲外となった機関もあったが、抽出 DNA を鋳型とした定性 PCR の陽性対照用試験では全抽出で増幅物が検出されたことから、DNA の精製度は妥当であったと考えられた。なお陰性試料にもかかわらず Cry1Ac 検出用試験では、33 機関のうち 2 機関から予定長の増幅物が検出されたとの報告があったが、Cry1Ac 検出の原因は後述する定性 PCR 操作または電気泳動操作にあると考えられた。

定性 PCR 用 DNA 溶液試料のうち陽性試料の分析では、試料 1 (低濃度陽性試料)、試料 3 (高濃度陽性試料) とともにすべての参加機関が GM 陽性と判定し、定性 PCR の検出感度の問題のある機関はないものと考えられた。一方、試料 2 (陰性試料) の分析では、Cry1Ac 検出用試験で予定長の増幅物を検出した機関が 2 機関あった。このうち 1 機関はコメ加工品粉砕物試料の Cry1Ac 検出用試験で増幅物を検出した機関と同一であり、DNA 抽出、PCR 操作、電気泳動の操作区域、および DNA 抽出、PCR 操作のピペットが共通との報告があることから、PCR 操作の際に遺伝子混入を起こした可能性が高いと考えられた。また、Cry1Ac 検出用試験で増幅物を検出したもう 1 機関では、他機関と比べて Cry1Ac 検出用試験および Bt コメ検出用試験で非特異的増幅物が多く検出されていることから、PCR の際に遺伝子混入があったものと考えられた。このほか、定性 PCR ではコメ加

工品粉砕物試料の Cry1Ac 検出用試験で増幅物を検出した機関も含め、電気泳動操作に改善の余地がある機関が複数見受けられた。今回の定性 PCR では、予定長の増幅物が陽性対照用試験では 81 bp、Cry1Ac 検出用試験では 90 bp、Bt コメ検出用試験では 147 bp、Bt コメ確認用試験では 120 bp であるにもかかわらず 100 bp Ladder のサイズマーカーを使用した機関が多く、またアガロース濃度が 2% のゲルを使用した機関の泳動像は増幅物の分離が不十分な結果が多かった。このため、非特異的増幅物が認められた場合、増幅物のサイズの確認が難しく、予定長の増幅物の有無を判定することが困難な場合があった。なお、通知^{1,6)}にはアガロースゲル濃度は増幅産物のバンド長に合わせて決めること、および増幅物をサイズマーカーと比較して判定することは記載されているが、いずれについても選択の目安や具体的指示は記述されていない。本外部精度管理調査の結果、サイズマーカー、ゲル濃度の適正な選択が、定性 PCR 操作の信頼性の向上に欠かせないことが明らかになったことから、定性 PCR を使用する検知法には、サイズマーカーおよびゲル濃度についての具体例を示すことが重要であると考えられた。

リアルタイム PCR 用 DNA 溶液試料のうち陽性試料の試料 A (高濃度陽性試料) および試料 B (低濃度陽性試料) の Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) における NGMr-Taq プローブ、GM63-Taq プローブを対象としたマルチコンポーネント解析ではともに全機関が GM 陽性と判定し、参加機関のリアルタイム PCR の測定感度には問題がないものと考えられた。一方、試料 C (陰性試料) では Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) の NGMr-Taq プローブによる解析で 1 機関の 1 解析が 1.5 以上となった。この機関は定性 PCR 用 DNA 溶液試料の試料 2、およびコメ加工品粉砕物試料の Cry1Ac 検出用試験で増幅物を検出した機関とは別機関であるが、ピペットまたは操作区域の共用により、陽性プラスミドあるいは PCR 増幅産物の混入があったものと考えられた。

一方、試料 C の Bt コメ検出用試験 (Duplex PCR) でマルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上となる解析があったものの Amplification plot で増幅が確認されなかった 4 機関は、いずれもリアルタイム PCR 装置に ABI7700 を使用していた。これらの機関では、ブランク溶液のマルチコンポーネント解析結果も NGMr-Taq プローブ、GM63-Taq プローブのいずれかまたは両方で 1.5 以上となっていた (表 6)。またその Amplification plot では、蛍光強度のベースラインがサイクル数に比例して徐々に上昇しているのが観察された。したがってこれらの機関では使用装置に依存したベースラインの上昇により、マルチコンポーネント解析の値が 1.5 以上となったものと考えられた。なお、ABI7700 を使用した機関でも、ブランク溶液の測定で、マルチコンポーネント解析の結果が全て 1.5 未満の機関では、試料 C で 1.5 を超えた機関はなかった。以上の結果から、一般に ABI7700 は他の測定機に比べて蛍光強度のベースラインがサイクル数に比例して上昇しやすいため、マルチコンポーネント解析の値が大きく計算される場合があることが示唆され、リアルタイム PCR を用いた定性試験での Amplification plot 確認の重要性が示された。

表 6. ABI7700 使用機関におけるマルチコンポーネント解析結果

ABI7700 使用機関	解析プローブ					
	GM63-Taq プローブ			NGMr-Taq プローブ		
	ブランク	試料 C		ブランク	試料 C	
	$\times 1^{a)}$	$\times 2^{a)}$		$\times 1^{a)}$	$\times 2^{a)}$	
1	1.3	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7
	1.3	1.3	1.4	1.6	1.6	1.7
2	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2
	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2
3	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6
	1.6	1.5	1.5	1.7	1.6	1.6
4	1.5	1.3	1.4	1.6	1.4	1.5
	1.5	1.4	1.4	1.6	1.4	1.5
5	1.2	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1
	1.1	1.1	1.1	0.9	1.1	1.1
6	0.8	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
7	1.2	1.1	1.1	1.3	1.2	1.2
	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2
8	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5
	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5

a) DNA 溶液の希釈倍
太字: 1.5 以上となった解析結果

今回の外部精度管理調査ではコメ加工品粉砕物試料の分析において、途中経過も含め予定と異なる結果を報告したのは2機関のみであった。しかし、陽性のコメ試料測定の設定がなかったため、汚染はいずれも PCR 測定で発生した可能性が高いと考えられ、DNA 抽出段階で陽性試料による汚染がどの程度発生し、PCR 結果にどの程度影響するかは調査できなかった。これらの点を明らかにし検査機関における検査精度のさらなる向上を図るためにも、今後中国産 GM コメまたは加工品を使用した外部精度管理調査実施が望まれる。

また、定性 PCR 用コントロールプラスミドとリアルタイム PCR 用コントロールプラスミドを原料として調製した DNA 溶液試料の陽性試料では、全機関が全試料を予定通り検出した。この結果、プラスミド DNA を含む DNA 溶液試料は、定性 PCR においては PCR 操作および電気泳動操作、リアルタイム PCR においては PCR 操作の信頼性確認用試料として使用可能であり、中国産安全性未審査 GM コメ検査の信頼性を検討する有効な調査試料であると考えられた。

さらに、本外部精度管理調査の結果から、プラスミド DNA 溶液を用いた調査試料は他の GM 食品検査の外部精度管理調査にも広く応用可能であることが示唆された。

V まとめ

中国産安全性未審査 GM コメ検査を対象とした外部精度管理調査を実施した。通知法による検知を目的として、定性 PCR 用およびリアルタイム PCR 用陽性コントロールプラスミド DNA 溶液と非 GM コメ DNA 溶液から DNA 溶液試料

を調製した。さらにコメ加工品粉砕物試料を調製し、これらを調査試料として33の参加機関に送付した。外部精度管理調査の結果、参加33機関のうち31機関は調査試料をすべて予定通り判定した。しかし、2機関は陰性試料を陽性と判定し、プラスミド DNA を含めたその他の遺伝子の測定溶液への混入の可能性が疑われた。またリアルタイム PCR のマルチコンポーネント解析では、特定のリアルタイム PCR 装置でベースライン上昇が観察され、Amplification plot 確認の重要性が示された。

本精度管理調査の結果、プラスミド DNA 溶液から調製した調査試料は中国産安全性未審査 GM コメ検査の信頼性を確認する有効な手段となり得ることが示唆された。

VI 謝辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金により行った。

VII 文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 “安全性未審査の中国産米加工品の検知法について” 平成19年2月20日、食安監発第00220001号および食安監発第00220002号(2007).
- 2) Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Shibuya, M., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 44, 281-288 (2003).
- 3) Kasama, K., Watanabe, T., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Laboratory performance study of the quantitative detection method for genetically modified soybeans (roundup ready soybeans 40-3-2). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 46, 270-276 (2005).
- 4) Kikuchi, H., Watanabe, T., Kasama, K., Wakui, C., Matsuki, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified papaya (55-1). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 46, 21-27 (2005).
- 5) Watanabe, T., Kasama, K., Kikuchi, H., Suzuki, T., Tokishita, S., Sakata, K., Matsuki, A., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Laboratory-performance study of quantitative PCR methods to analyze an approved genetically modified maize (Mon810 Line). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 47, 15-27 (2006).
- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “組換え DNA 技術応用食品の検査方法について (一部改正)” 平成18年6月29日、食安発第0629002号(2006).

特集「塩及び海水の分析法及び信頼性向上の最近の展開」
(解説)

食の安全を確保するための外部精度管理

渡辺 卓穂*

External Quality Control to Insure Food Safety

Takaho WATANABE*

1. はじめに

近年、海水を原料として塩やにがり、化粧品等の製品が
つくられている。これらの製品中には海水由来のミネラル
成分や微量金属が含有しており、その含有量の違いから
個々の製品の特徴を示している。海水中に含まれるミネラ
ル成分は既存添加物として、海水湖水低塩化ナトリウム液、
粗製海水塩化カリウムや粗製海水塩化マグネシウム、指定
添加物として塩化マグネシウムがあり、いずれも食品添加
物として取り扱われている。このように、塩及び海水は食
品加工に用いられており、われわれの食生活には必須のも
のである。これらの成分分析は品質を確保するために重要
であり、安全性を担保するためにも必要と考えられる。現
在、食品分野において、食の安全が国民の関心事であり、
信頼できる分析値が求められる。

食品分析を行う機関にとっての分析値は食品の安全性を
考える上で信頼性を確保して提示することが重要である。
その信頼性を確保するための一般的な手法は、内部精度管
理と外部精度管理であると考えられる。たとえば、理化学
検査において、同じ検体を複数の機関で分析したとき、試
験検査機関の分析能力の違いから、各機関で異なる分析結
果を出していたのでは、行政処分等の対策もとれない。食
品分野においては、平成8年にGLP (Good Laboratory
Practice) が導入され、厚生省 (現厚生労働省) は「食品
衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施につ
いて」(平成9年4月1日) を通知し、内部精度管理と外部
精度管理を規定して、食品の分析データの信頼性を確保し
ている。このGLPはデータの信頼性確保のためのきわめ
て有用なシステムであり、検査結果の信頼性を保証するた
めには不可欠である。このような背景から、国内において、
平成9年度より財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
が厚生省の適合性の確認を受けて、検査所、衛生研究所、
保健所、食品衛生登録検査機関や自治体等のその他の公的
検査機関を対象とした食品衛生外部精度管理調査(理化学、
微生物学)を開始している。これに加え、平成12年度か

らは民間の分析機関を対象とした食品衛生精度管理比較調
査も行っている。また、食品衛生法の改正により、平成
18年5月ポジティブリスト制度が導入され、約800種類
の農薬、動物用医薬品に対して、一律に残留基準値が設定
された。これに伴い、分析対象物質が大幅に増え、一段と
分析値に対する信頼性が要求されることになった。

他方、水質検査においては、検査に係る技術水準の掌握
及び向上を目的として、厚生労働省では平成12年度から
水道水質検査の精度管理に関する調査(外部精度管理調査)
を登録検査機関を対象に実施している。平成22年度外部
精度管理調査からGrubbs検定を取り入れ、精度不良機関
の判定方法の変更を行い、また、水質検査の信頼性を確保
するために登録検査機関に対する実地調査と階層評価の見
直しを行っている。その他、日本国内においては、外部精
度管理調査が実施されている化学検査項目として、臨床検
査、環境関連物質検査等が挙げられる。

このように、試験検査機関の分析値の信頼性を確保する
ために外部精度管理調査は非常に重要と考えられる。一方
で、WTO (世界貿易機関) の貿易の技術的障害に関する
一般協定 (TBT協定) においては、一つの分析試験所で
得られた分析値が世界で受け入れられるようなシステムの
構築が施行されており、分析値の同等性が求められている。
そのため、分析試験所に対して、分析値の信頼性を確保す
るためのシステムと一定の能力が求められることになる。
そして、各国の認定制度を同じ基準で運用することが不可
欠になる。試験所認定は、試験所においての測定されたデ
ータの信頼性を確保するため、試験所が一定の基準を満た
し、特定の分野の試験を行う能力があることを第三者の認
定機関が認定する制度であり、認定を行う機関がそれぞれ
相互認証協定を結ぶことで試験データの共有を実現しよう
としている。そのための規格として、ISO/IEC17025 (試
験所認定) が現在種々の分野において用いられている。こ
の要求事項は15項目の管理上の要求事項、10項目の技術
的要求事項があり、使用する分析法は妥当性が確認されて
いなければならない。その確認方法の一つに試験所間比較

* 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 (〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5)

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

(技能試験)があり、試験所認定を受けるために必須となっている。食品の輸出入に係る試験所は(1) ISO/IEC17025 に適合している。(2) 適切な技能試験に参加している。(3) 妥当性確認された方法を用いる。(4) 内部精度管理を実施している。これら4要件がガイドライン(CAC/GL27-1997)に示され満たすように求められている。

これらの背景より、食品関連の検査施設には分析値の信頼性を確保するために技能試験、言い換えれば外部精度管理調査への参加が非常に重要であると考えられる。本稿では食品衛生法に基づいて公的機関等を対象として実施されている食品衛生外部精度管理調査について解説する。

2. 食品衛生外部精度管理調査の基本概念

外部精度管理調査の解析については、すでにCodexより提示された「Proficiency Testing of Laboratories」¹⁾に示されている。これはIUPAC、ISO、AOACにより取りまとめられたもので、「International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories (1993)」²⁾として示されており、特に食品衛生外部精度管理調査の理化学調査についてはこのプロトコルを参考として解析を行っている。定量的な微生物学調査の結果解析法については基本的には理化学調査と同様であるが、統計学的処理方法については、理化学調査を一部変更した別の方法を採用している。なお、食品衛生調査会食品規格部会精度管理分科会において討議検討されたものである。さらに、食品衛生外部精度管理調査では、調査試料分析機関に到着してから最終的な結果報告を行うまでの全ての過程を各分析機関の操作手順書(SOP)に従って実施することとしている。これは、技能試験としてあつかった場合には、検査方法及びその結果にのみ特化した解析となり、しかも、真値と近似した値をどのように検出するのかを問題とすることになる。これに対して、ここで言う外部精度管理調査では公定法又は公定法と同等であると妥当性確認された方法を用いたときに得られる結果がどの程度ばらついているのか、また分析機関の組織体制、検査体制を含め資料の受入からその結果をどのような過程で得ているのかという「GLPシステムにおける試験」という概念に基づいている。

3. 外部精度管理調査における調査試料

食品衛生外部精度管理調査では理化学及び微生物学を対象として実施しているほか、動物を用いる検査も平成23年度より実施している。このうち理化学では、重金属、食品添加物、残留農薬及び残留動物用医薬品を、微生物学では生菌数測定、大腸菌群、E. coli、黄色ブドウ球菌及びサルモネラ属菌を、動物を用いる検査では麻痺性貝毒をそれぞれ調査項目として設定している。このうち、これまで食品衛生外部精度管理理化学調査において採用した調査項目及び基材を表1に示す。重金属については清涼飲料水中のカドミウム及び鉛の検査精度の経年的な解析を行っていた

が、残留農薬検査の一斉分析が加わったことから、現在では行われていない。また、米を用いたカドミウムの調査は平成14年度より現在まで引き続き調査を行っている。食品添加物においては定量試験のほか定性試験として食用色素を調査項目として採用している。また、残留農薬は平成20年度より個別分析のほか一斉分析が加わった。これは、ポジティブリスト制度の導入により分析対象物質が大幅に多くなったため、多くの検査機関で一斉分析法が導入されたためである。以前は基材に米油又はコーン油を用いていたが、現在は野菜ペースト(にんじん、かぼちゃ、とうもろこし、ほうれんそう)を用いている。残留動物用医薬品については鶏肉ペーストを基材として、サルファ剤を調査対象としている。表2に平成23年度の食品衛生外部精度管理理化学調査項目と添加量を示す。理化学についてはこのような内容で一年間の調査が行われ、添加量はおおむね基準値に近いレベルに設定している。いずれの調査対象も調査試料での基準があるものを選択している。

以上の調査試料を現在使用しているが、新しい調査試料の開発は引き続き検討している。理化学の調査試料は使用頻度が高く、違反事例が多く試料の均一性・安定性が良いものを選択することを念頭に置いているが、その開発には予想以上の時間がかかる。調査試料は均一でなければならない。そこで、調査試料の均一性確認はThompsonらの方法³⁾に準じ分散分析(一元配置分散分析)により実施している。作製した配布用調査試料の容器群から、無作為に10個の容器を指定する。この各容器から無作為に2部位を採取してそれぞれについて測定を行う。すなわち、試料群を一つの要因とし、それぞれについて反復数が2の測定値からなるデータについて一元配置分散分析を適用する。ここでの仮説は、試料間(容器間)の測定には差異がない(つまり均一である)ことを、統計的に検定することにある。一元配置分散分析を行い求めた分散値(F値)の値に対する有意確率を求め、この時の有意水準5%に対する(片側検定による)F値は3.02となる。求めた分散値(F値)がこの値より小さければ試料間(容器間)の濃度が均一であり、外部精度管理調査試料として適切であると判断する。

4. 基本的な統計処理について

食品衛生外部精度管理調査は図1に示すような流れで行われている。まず食品薬品安全センターにおいて外部精度管理調査の計画を策定し年度の事業として参加機関に対して参加申込書を送付する。計画に従って調査試料の作製と配布を行い、参加機関は検査を実施し、結果を報告する。一方、食品薬品安全センターで報告された結果の統計解析を行い、報告書の作成を行う。調査結果は厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課及び食品衛生外部精度管理調査成績評価会において評価する。参加機関は結果を確認し、必要ならば改善を行う。

表 1 平成 13 年度から食品衛生外部精度管理理化学調査に採用した調査項目と使用基材

調査項目	調査対象	使用基材
重金属	カドミウム+鉛 カドミウム	清涼飲料水 精米, 玄米
食品添加物	安息香酸+ソルビン酸 ソルビン酸 サッカリンナトリウム パラオキシ安息香酸ブチル+パラオキシ安息香酸イソプロピル 安息香酸+パラオキシ安息香酸ブチル 安息香酸+ソルビン酸 安息香酸	つゆ ジャム, シロップ シロップ, しょう油, ジャム, 飲料 清涼飲料水 清涼飲料水 シロップ しょう油
食用色素	赤色 102 号 赤色 102 号+黄色 4 号+青色 1 号 黄色 4 号+黄色 5 号 赤色 102 号+黄色 4 号+黄色 5 号+青色 1 号 赤色 40 号+赤色 105 号+赤色 106 号 赤色 102 号+赤色 106 号 赤色 40 号+赤色 102 号+黄色 5 号 黄色 4 号+黄色 5 号+赤色 102 号 黄色 4 号+赤色 2 号+赤色 40 号+赤色 106 号	ジャム 清涼飲料水 ジャム ゼリー 清涼飲料水 漬物 漬物 漬物 漬物
残留農薬	赤色 2 号+赤色 102 号+黄色 4 号+緑色 3 号 EPN + PAP クロルピリホス+マラチオン クロルピリホス+フェニトロチオン クロルピリホス+ダイアジノン クロルピリホス+EPN クロルピリホス+フェントエート クロルピリホス+マラチオン+チオベンカルブ クロルピリホス+マラチオン+フルトラニル	漬物 米油 コーン油, とうもろこしペースト, にんじんペースト にんじんペースト, かぼちゃペースト, とうもろこしペースト, ほうれんそうペースト ほうれんそうペースト かぼちゃペースト かぼちゃペースト ほうれんそうペースト, にんじんペースト, とうもろこしペースト かぼちゃペースト
残留動物用医薬品	フルベンダゾール スルファジミジン	鶏肉, 液卵 鶏肉ペースト (ささみ, むね)

表 2 平成 23 年度食品衛生外部精度管理理化学調査の調査項目と添加量

調査項目	調査対象	添加量
重金属 II (玄米)	カドミウム	0.42µg/g (理論値)
食品添加物 I (漬物)	着色料の定性	食用赤色 2 号, 赤色 102 号, 黄色 4 号, 緑色 3 号
食品添加物 II (シロップ)	ソルビン酸	0.95g/kg
残留農薬 I (ほうれんそうペースト)	クロルピリホス フェニトロチオン	0.02µg/g 0.05µg/g
残留農薬 II (かぼちゃペースト)	クロルピリホス マラチオン フルトラニル	0.05µg/g 0.36µg/g 0.05µg/g
残留動物用医薬品 (鶏肉ムネペースト)	スルファジミジン	0.16µg/g

従来方式 (これまでの評価法) における外部精度管理調査の解析フローを図 2-1 に示す。各参加検査機関よりデータを回収後、範囲を大きく外れた機関、すなわち、理化学

検査では添加量の 1/10 以下及び 10 倍以上の報告値を含む機関を除外し、添加量が明確でないときには外部精度管理調査機関の測定値を暫定値として同様の処理を行う。一方、

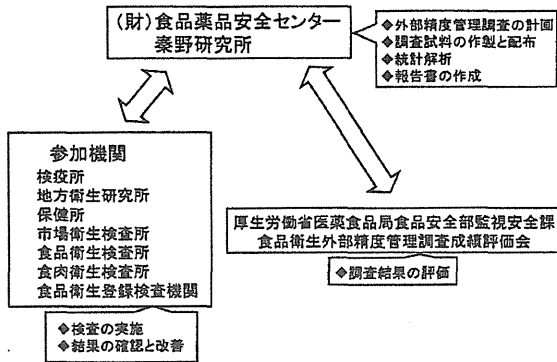


図1 食品衛生外部精度管理調査の流れ

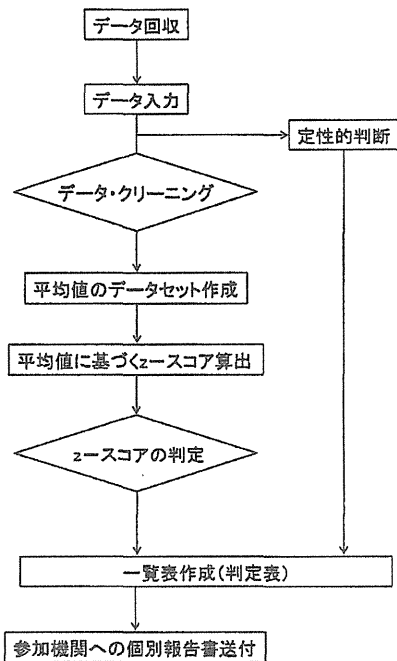


図2-1 外部精度管理調査の解析フロー（従来方式）

一般細菌数測定検査では外部精度管理調査機関の測定値（暫定値）の1/100以下及び100倍以上の報告値を含む機関を除外する。また、報告値が理化学調査では5個未満、微生物学調査では3個未満の報告値を回答した機関については、その機関の報告値全てを以後の解析対象から除外する。次いで各検査機関間、検査機関内の変動を $\bar{X}-R$ 管理図を代用する方法で観察した後、各検査機関からの報告値の平均値について、基本統計量、順序統計量、ヒストグラムおよび正規確率プロットを作成することによりデータ全体の様相を掌握する。分布に極端なひずみやとがりが観察された場合には2シグマ（平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差）以上の値を報告した検査機関を除外した後、同様の処理を行い、最

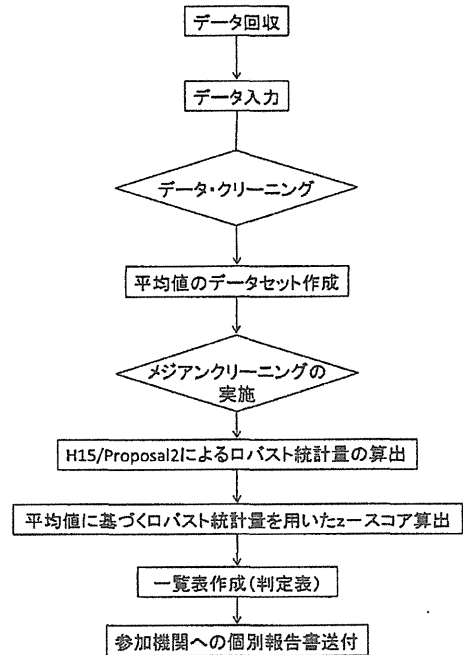


図2-2 外部精度管理調査の解析フロー（ロバスト方式）

終的に各検査機関のZスコアと $\bar{X}-R$ 管理図に基づいて各検査機関の解析を行う。ただし一般細菌数測定検査については基本的には $\bar{X}-R$ 管理図のみで各検査機関の解析を行い、Zスコアは参考に留める。また、理化学調査ならびに微生物学調査における定性検査については、報告結果を入力した後、判定結果について表示する。

図2-2にロバスト方式における外部精度管理調査の解析フローを示す。平成21年度より、新たにロバスト統計量による解析法の導入を行い、これまでの解析法による従来方式とロバスト方式による評価法を併記している。ロバスト方式は、食品衛生や分析化学に関与する検査機関の技能試験に関連して、測定データの分析評価に用いるさまざまな統計手法が、IUPAC, FAPAS, AOAC, ISOまたはJISなどから提案されている^{30,31}。統計手法の導入に関心を示す理由の一つには、こうした手法が測定値の分布の観測ツールとして有効であるだけでなく、測定法や測定値の構造が次第に複雑になり、より科学的、客観的な評価法が求められているからである。たとえば、現実の測定値の分布には、はずれ値やゴミの混入を伴うことがあり、これへの解析上の対応策が必要とされている。こうしたはずれ値の影響を受けにくい統計量の一つとしてロバスト統計量（頑健統計量）があり、近年、これの利用を薦める提案が多くなってきている。食品衛生外部精度管理調査でもこうした解析手法の導入をはかるため、種々の方法のある中Huberの提唱したProposal2「H15」と呼称される方式を用いて解析を行っている。すなわち、データ・クリーニング済み

のデータのメジアン \pm メジアン $\times 50\%$ の範囲を超える報告値を除外した後、ロバスト統計量に基づくZスコアによる各検査機関の解析を行う。

ここでZスコアを算出するには指示値が必要であり、指示値は、食品マトリックス中の分析対象物の真値の代用値として「The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (2006)」⁹⁾においてはいくつかの方法によって求められるとされている。ここで推奨している一つの方法として専門試験室グループによる平均値の利用が提案されているが、この方法による評価は当面実施困難である。そこで、まず、従来方式では、暫定的に検査機関の報告値についてデータ・クリーニングを行った後、各検査機関の報告値の機関別平均値の平均値（つまり総平均値 \bar{x} ）を求めて、それを指示値としてみなすこととしている。また、ヒストグラムの分布に外れ値が観測されたときは、さらに2シグマ以上（総平均値 $\bar{x} \pm 2 \times$ 標準偏差 s の範囲を超える）の値を報告した検査機関の全ての測定値を除外して、同様に指示値を再度算出することとしている。こうして得た平均値と標準偏差を用いて、Zスコアを算出する。その式を次に示す。

$$z = \frac{(x - \bar{x})}{s}$$

- x : 各分析機関からの報告値の平均値
- \bar{x} : 参加分析機関全体の平均値（指示値）
- s : 標準偏差

なお、ロバスト方式の場合は、上のデータ・クリーニングの他に、更に必要に応じてメジアンを用いたクリーニングを行う。その後、各検査機関の報告値の機関別平均値を用いて、ロバスト平均値とロバスト標準偏差を推定し、これを用いてZスコアを算出する。Zスコアとは標準化の操作をいい、標準化とは上の式に見られるように、Zスコアの平均値は「0」となる。図3にZスコアの分布図を示す。典型的な化学分析の結果は正規分布になるので、結果の大部分は平均値付近に集まるが、当然いくつかの結果は分布の外れに来てしまう。Zスコアの絶対値が2以上のデータ数は全体の約4.5%、3以上のデータ数は全体の約0.3%となる。よって、評価基準は、測定値にこうした仮定が満たされたときに成り立つ関係であることに注意すべきである。たとえば、Codex, IUPAC, AOAC, ISOでは、このZスコアは同一検査機関内で時系列的に観測することとしており、その評価基準は図3に示すとおりである。食品衛生外部精度管理調査もほぼこの解釈に従っている。すなわち、Zスコアの絶対値が2未満であれば「良好」、2以上3未満であれば「改善措置が必要か否かの検討が必要」、3以上であれば「改善措置の必要あり」とする。このZスコアは当該検査機関の報告値が全検査機関に対してどのような成績にあるのかに関する位置づけを測定値の標準化を行

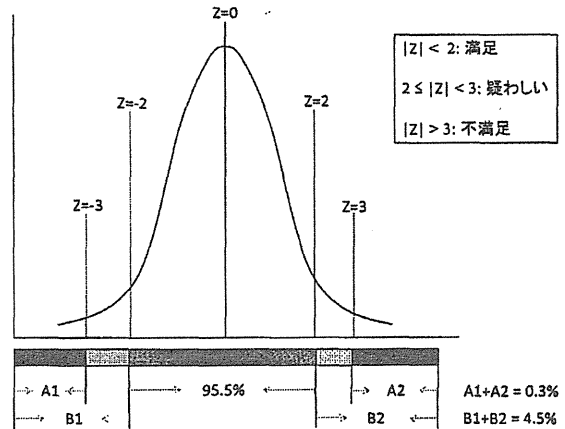


図3 Zスコアの分布図

うことで相対的に示したものである。従って、Zスコアの絶対値が3以上の場合には、“調査に参加した検査機関全体の分布の傾向と比較”して大きくずれが生じているため、測定法の再点検と何らかの対策をとることが必要である。このことからZスコアの絶対値が4や5といった値となる場合には、確率から考えて、その外れた値は、全体の傾向から明らかにならずれを生じていると判断しよう、と考えるのである。しかし、現実的には調査項目によっては機関別平均値が総平均値付近に集中する傾向がある（すなわち「尖度」が大きくなる傾向にある）。つまり、大半の検査機関の報告値の機関内変動が少なくなる傾向になる。一方、この集中化現象から外れる測定値を報告する検査機関も存在する。結果として、機関別平均値の分布の変動（分散、標準偏差）が過小に評価される傾向にあり、調査項目によっては、この影響が変動係数の大小に関係する。なお、ロバスト方式を用いた場合も、上述したロバスト統計量（ロバスト平均値、ロバスト標準偏差）を用いる算出式で得たZスコアについて、この同じ評価基準を適用している。

Zスコアの他に解析する評価法として \bar{X} -R管理図（図4）がある。 \bar{X} -R管理図は米国のシューハートにより提唱された方法で、“quality control chart”と命名された総計的手法を導入した製品の工程管理の方法である。この管理図の特色はデータに変動（ばらつき）があることを認め、管理図の中に管理限界線を置いて工程の稼働状況を客観的に評価しようとするところにある。 \bar{X} -R管理図では、工程から数個の試料を逐次的に抽出し、その平均値 \bar{X} やばらつきの測度としての範囲 R を計算しプロットしたものである。管理図には管理限界を示す一対の管理限界線を引き、これに測定値を表す点を打つ。その点が管理限界線の内側にあるか、外側にあるかによって製造工手が良い状態にあるかどうかを知ることができる。管理図に記入した多くの点が管理限界線の内側に収まって入れば、その製造工程は安定した状態にあるとみなせるが、点がこの外側にあるときは、

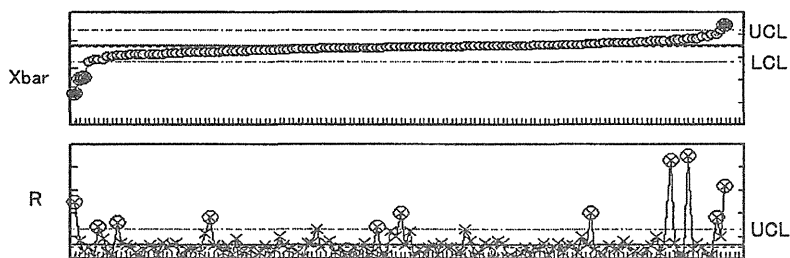


図4 \bar{X} -R管理図の例

製造工程に見逃せないばらつきを生み出す原因があるので、原因を究明し改善処置を取らなければならないことを示す。通常の \bar{X} -R管理図は、前述の通り各工程から抽出されたある大きさの試料（群）が時間軸に沿って時系列的に観測される測定値で、ある母集団から順次サンプリングされた試料であるとの前提で考えている。しかし、外部精度管理調査では、各検査機関を単に一つの群と見なして、この群内（検査機関内）変動（測定値のばらつき）と検査機関間における群間変動（平均値のばらつき）とを総合的に比較し観察するために同管理図を代用している。 \bar{X} とRは検査機関ごとの結果報告（理化学調査では $n = 5$ 、微生物学調査では $n = 3$ ）から求め、縦軸に配列しプロットする。Rはある検査機関の n 個の測定値内の（最大値－最小値）を示す。外部精度管理調査において \bar{X} の管理限界線はJISの方法ではなく基本的には添加量を用いて計算している。すなわち理化学調査での上部管理限界線（UCL）は添加量の120%、下部管理限界線（LCL）は70%、微生物学検査での上部管理限界線は各検査機関の報告値の機関別平均値の総平均値に対して300%、下部管理限界線は30%と設定している。なお、理化学調査における管理限界線設定値は添加回収試験における回収率の目安である添加量の70%～120%を、微生物調査における管理限界線設定値である30%及び300%は、バイオロジカルインジケータの品質管理基準である“表示値の50%から300%を有効とする”の規格を参考として設定している。一方、Rの上部管理線（UCL）は \bar{R} に係数を乗じて求める。すなわち理化学調査では $n = 5$ 測定であるため係数表より係数は2.115となり、一般細菌数検査では $n = 3$ であるため係数表より係数は2.574となる。

5. 解析結果の基本的な考え方

ここでは理化学調査における解析結果の基本的な考え方を示す。まず、データ・クリーニング又は2シグマ処理によって除外された場合は、報告値が参加機関全体の平均値から大きく離れていることを意味する。すなわち、信頼性確保システムの基本的な管理及び運営に問題がある可能性があるため、試験品の管理、試験法、機器の管理、試薬等の管理、報告書の作成、内部点検、信頼性保証体制につい

て検証する必要がある。特に、データ・クリーニングで除外された場合には単位の付け間違え、転記ミス、希釈倍率など計算ミスも考えられる。次に、 \bar{X} 管理図で平均値、中央値から大きく外れた場合は、マトリックスの種類や採用する分析操作手順の違いにより添加量に対する期待回収率基準管理線から外れる機関数が増える場合もあるが、平均値から大きく離れた場合には、試験品の管理、試薬等の管理及び試験法について内部点検を行うことを推奨する。また、R管理図で管理限界線を越えた場合は、一連の検査操作のばらつき状態を示す目安となるため、管理限界線を越えた場合には再現性の悪い操作で検査しているため、操作の熟練度及び試験法について内部点検を行うことを推奨する。最後に、Zスコアの絶対値が限界外となった場合は、上述したように、仮に各検査機関の報告値の平均値が正規分布ないしはそれに近い場合にはZスコアの絶対値が2以上である確率は全体の分布の両端約4.5%に位置することとなるため、統計的な観点から、Zスコアがこの範囲に入ることもこの程度の確率で起こりうることであり、言い換えると各参加機関の適切な内部精度管理の遵守を薦めるものである。そのため、Zスコアによる評価を試験の点数と判断せず、それぞれの検査機関が信頼性確保システムを検証する目安として考えていただきたい。また、絶対値が3以上の場合にはこれに加えて試験法のバリデーションの実施も推奨する。微生物学検査については割愛させていただく。

6. おわりに

これまで述べてきたように、外部精度管理調査への参加は、自機関の分析精度を他機関と比較することにより相対的な位置づけを知ることができる。このことは内部精度管理が実施されていることが前提となる。すなわち、各検査機関内で分析精度や不確かさ等を検証し、掌握しておくことによってはじめて他機関との比較が行えること意味している。実際、水質、環境や臨床等において外部精度管理調査が行われているが、ここで評価された結果は、ある限定されたときの成績にすぎないということで、その分析機関の通年の成績ではなく、結果の判断は経年的に行うことが必要である。 \bar{X} -R管理図やZスコアで限界外となった場合

には、その原因を追及することや改善をどのように行ったかが最も重要な事項となる。上述したように、外部精度管理と技能試験は厳密には違いがあるが、現在は同様にとらえられており、試験所認定を受けるには技能試験の参加が必須であったり、ある分野では入札要件として使われるケースもあり、外部精度管理の結果がその試験機関の評価としてとらえられている。そのために、外部精度管理調査への参加は良い結果を出すための競争試験と考えられているのも事実である。しかし、本来の外部精度管理調査の目的は、分析結果の信頼性を確保するために自機関の現状を掌握し、全体の中での位置づけの確認をするための手段として利用していただきたい。

引用文献

- 1) Proficiency Testing of Laboratories (CX/MAS 94/6), Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, United Kingdom (1994)
- 2) M. Thompson and R. Wood, "International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories", *J. AOAC Int.*, **76** (4), pp.926-940 (1993)
- 3) AMC Technical Brief : Robust Statistics (2001) : A Method of Coping with Outliers, *Analytical Methods Committee* No. 6, Apr. 2001.
- 4) Analytical Methods Committee London and Cambridge (1998) : Robust Statistics-How Not to Reject Outliers, Part 1. Basic Concepts, *Analyst*, **114**, pp.1693-1697 (1989)
- 5) Analytical Methods Committee, London and Cambridge (1998) : Robust Statistics-How Not to Reject Outliers, Part 2. Inter-laboratory Trials, *Analyst*, **114**, pp.1699-1702 (1989)
- 6) FAPAS-Central Science Laboratory (2002) : Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), Protocol for the Organization and Analysis of Data, Sixth Edition, 2002
- 7) JIS ハンドブック 57, 品質管理, 日本規格協会, 東京 (2008)
- 8) Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Inter-laboratory Comparisons, ISO-13528, 2005-09-01
- 9) The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **78** (1), pp.145-196 (2006)

(平成 24 年 11 月 30 日受付)
(Received November 30, 2012)

厚生労働科学研究費補助金(食品の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 24 年度

研究成果の刊行物・別刷

学会発表

アルキルシクロブタノンを指標とした照射食品の簡易分析法の検討

○北川陽子¹、起橋雅浩¹、中山裕紀子¹、中辻直人¹、小阪田正和¹

柿本葉¹、福井直樹¹、高取聡¹、尾花裕孝¹、古田雅一²

¹大阪府立公衆衛生研究所、²大阪府立大学 地域連携研究機構 放射線研究センター

【目的】放射線照射の検知法の1つにアルキルシクロブタノン (ACB) 法がある。ACB法は、放射線照射により脂質から生成するドデシルシクロブタノン (DCB) とテトラデシルシクロブタノン (TCB) をGC/MSにより検出する方法である。現在、厚生労働省から通知されている方法は、ソックスレー抽出法で得られた脂肪を含水フロリジルカラムにより精製するものであるが、1) 抽出及び精製に時間を要する 2) 溶媒の使用量が多い 3) 多検体の同時処理が困難、等の問題がある。

今回、我々は特殊な抽出装置を使用せず、簡易かつ迅速なACBの分析法を開発した。また、 γ 線を用いて照射食品を作成し、分析法の検証を行ったので報告する。

【方法】1. 試料：市販の牛肉、豚肉、餃子、鶏唐揚げを用いた。
2. 試験溶液の調製：細切均一化した試料5gを乳鉢に採取し、珪藻土5gを加えよく混合した。これを50mLPP製遠心管に移し、ヘキサン30mL及び20mLで2回振とう抽出を行った。得られたヘキサンをナス型フラスコに合わせ、濃縮した。抽出した脂肪0.2gをガラス製スクリー試験管に採取し、アセトン2.5mL、次いでアセトニトリル0.5mLを加えて混合した。これを-20℃で30分間放置し、脂肪を析出させた。遠心分離後、有機層を試験管に採取し、窒素気流下で緩やかに濃縮した。残留物をヘキサン2mLで溶解し、あらかじめヘキサン10mLでコンディショニングしたシリカゲ

ルカラム (1g) に負荷した。カラムをヘキサン10mL、2%ジエチルエーテル/ヘキサン5mLで洗浄後、2%ジエチルエーテル/ヘキサン10mLで溶出した。これを窒素気流下で濃縮し、0.1ppmシクロヘキシルシクロヘキサノン溶液 (内部標準) 0.2mLで溶解し、GC/MSで測定した。

3. GC/MS分析：Restek社製Rtx-5MS (30m×0.25mm×0.25 μ m) を取り付けた島津製作所製GCMS-QP2010ultraを使用し、SIM測定 (定量イオン： m/z 98、確認イオン： m/z 112) によりDCB及びTCBを測定した。

4. 照射食品： γ 線を用いて、1kGy及び2.6kGyの線量を試料に照射した。

【結果及び考察】1. 添加回収試験：試料から抽出した脂肪にDCB及びTCBを各々0.05ppm添加し、添加回収試験 (試行数3) を行った。牛肉、豚肉、餃子、鶏唐揚げにおける平均回収率は68~105%、RSDは10%以下であった。
2. 照射食品中のACBの測定：照射した牛肉、豚肉、餃子、鶏唐揚げのいずれの試料からもDCB及びTCBが検出され、その濃度は照射線量依存的に増加した。また、非照射食品については、いずれの試料からもDCB及びTCBは検出されなかった。

本方法は、簡易で迅速な方法であり、ACBの検知法として有用な方法であると考えられた。また、特殊な抽出装置を用いないため、多くの機関で適応可能な方法であると考えられた。

高坂 典子¹、勝村 利恵子¹、福光 徹¹、鈴木 達也¹、渡辺 卓穂¹、小島 幸一¹
¹食品薬品安全センター秦野研究所

【目的】食品の安全性を確保する上で、検査機関における検査結果の信頼性確保は重要であり、そのための精度管理の実施が必要不可欠である。外部精度管理において適正な評価を行うためには、均一性・安定性がともに確保されたより実際の食材に近い調査試料の開発と提供が求められる。そこで当財団が実施する外部精度管理における調査項目の一つである残留動物用医薬品用調査試料の作製検討を行ったので報告する。

【方法】基材として鶏 3 部位及び豚 4 部位の生肉を用い、各部位にスルファジミジンを含むサルファ剤 10 種を添加し、均一性を検討した。いずれも、三度挽きしたミンチ肉を用いた。鶏ササミでは作製量全体の 10、20、30 及び 40%となるように水を加えた後、豚肉では水を加えずにサルファ剤を添加、混合した。均一性が得られた部位について、冷凍及び冷蔵による保存安定性、さらに繰り返し凍結融解安定性を検討した。添加薬剤の濃度測定は、食品衛生法に準拠し液体クロマトグラフィーを用いた。均一性の検討は、一元配置の分散分析により行った。

【結果及び考察】各基材が含有する水分及び脂質の量により、水添加の必要性あるいは水添加量と均一性の関係が異なり、水無添加でも鶏のムネ、モモは良好な均一性及び安定性が得られ、基材として使用できること明らかとなった。豚の各部位に添加した 10 種のサルファ剤は、バラを除くいずれの部位でもすべての薬剤の回収率が 70%以上であり、均一性も良好であった。冷凍及び冷蔵による保存安定性は、薬剤、基材部位により低下するもの及び腐敗による妨害ピークの出現により見かけ上高くなるものが認められた。調査試料には、基材及び添加薬剤の適切な選択が必要であることが示唆された。本研究は、厚生労働科学研究費補助金により実施した。

IAFP 2012
Providence, Rhode Island, July 22-25, 1012

Symposium S20
Tuesday, July 24, 1012

Title: Food Allergen Labeling: Challenges and Best Practices

Organizers: Tong-Jen Fu, Kathy Gombas, and Craig Henry

Conveners: Kathy Gombas (FDA); Lee Sanders (American Bakers Association)

Justification:

More than 11 million Americans suffer from food allergies and young children are disproportionately more affected. Strict avoidance of the offending food remains the only effective means to prevent the occurrence of allergic reactions. Allergic consumers rely on food labels to disclose the presence of allergenic ingredients. Many countries have enacted food allergen labeling regulations. But globalization in food production, manufacturing and trade has made compliance with different requirements an ever expanding challenge. Recent data have suggested that labeling errors are the leading cause of food allergen recalls. There is a critical, ongoing need for the food industry to develop and implement best practices to ensure accurate and proper allergen labeling. This symposium will provide IAFP attendees with an overview of the food allergen labeling requirements set up by various countries and how industry is working towards meeting these requirements. Issues or obstacles that contribute to errors in food allergen labeling will be discussed. Expert speakers will also showcase best practices to enhance compliance of food allergens regulations from a manufacturing, supply chain and a global trade perspective. This symposium differs from previous food allergen related symposia due to its focus on the allergen labeling issues and its broad scope in addressing these issues from a global supply chain perspective.

Presentations:

1. Food Allergen Labeling Requirements: Impact on the Food Industry and Consumers – Dr. Steve Taylor, Univ. of Nebraska (20 min)
2. Food Allergen Labeling Regulation: a Japanese Perspective – Dr. Reiko Adachi, National Institute of Health Sciences, Japan (20 min)
3. Analysis of FDA Recall and RFR Databases: What Leads to Labeling Errors? – Dr. Steven Gendel, FDA (20 min)
4. Procurement Best Practices: Overview of Industry Supplier Approval Program – Kelly Duffin Maxwell, Dean Foods (20 min)
5. Q&A (10 min)

126th AOAC Annual Meeting & Exposition

Scientific Session

“Enforcement vs. Compliances: Is everybody playing by the same rules?”

(Tuesday, October 2, 2012)

Reiko Adachi, Shinobu Sakai, Hiroshi Akiyama, Reiko Teshima

National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Official Detection Methods for Monitoring the Food Allergy Labeling System in Japan

In Japan, labeling of eggs, milk, wheat, buckwheat and peanuts has been required by the ministerial ordinance since 2002, with shrimp/prawns and crabs labeling becoming mandatory in 2008. We refer to these seven ingredients as “specific allergenic ingredients.”

The Japanese official methods for detecting specific allergenic ingredients in processed foods consist of screening tests using two different ELISA kits for each allergenic ingredient and confirmation tests using western blotting (eggs, milk) or PCR (wheat, buckwheat, peanuts, shrimp/prawns, crabs). These methods are provided in a notification from the Consumer Affairs Agency, the Japanese governmental agency founded in 2009 for food labeling regulation. Three types of ELISA kits for eggs, milk, wheat, buckwheat, and peanuts and two for shrimp/prawns and crabs are commercially available as official screening methods. The reference materials and the preparation methods of the standard solutions have been standardized. For the confirmation tests, a type of western blotting kits and PCR primers are used. The methods have been validated through inter-laboratory testing according to the Japanese validation protocol.

Practical tests for monitoring food allergy labeling are performed at local government inspection centers. Food allergen labeling is investigated, and then a screening test using two different ELISA kits is performed. If the determined value of an allergen is over the threshold of 10 µg protein/g food (the corresponding allergen protein weight/food weight), the manufacturing records are examined. If an allergen’s presence cannot be elucidated, a confirmation test is performed. Based on the results, any necessary corrections to the labeling should be done with administrative guidance.

Reiko Adachi, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, akasaka@nihs.go.jp

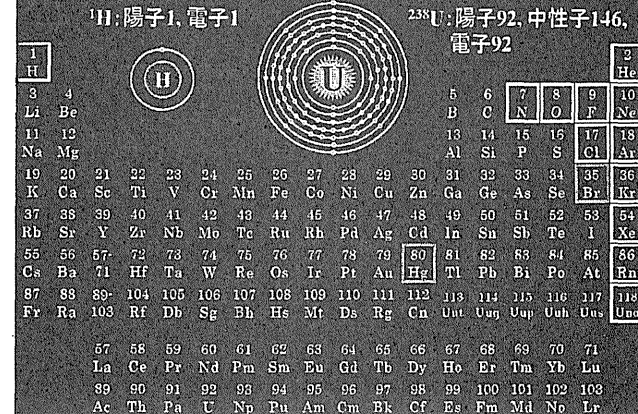
食品中の放射性物質の新基準と対応について

- ・ 放射線とは
- ・ 食品の放射能汚染に対する規制
- ・ 安全確保対策
- ・ 食品の放射能測定

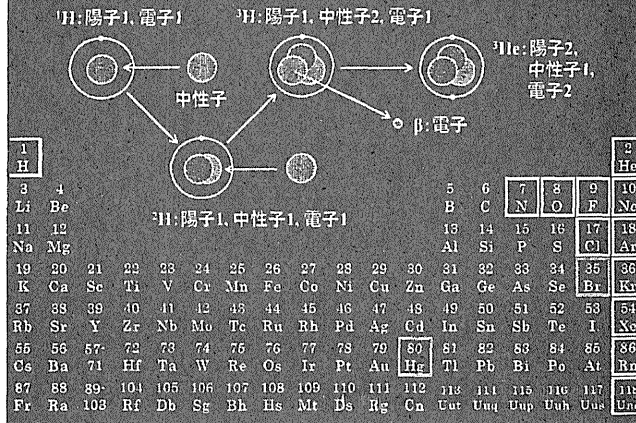


第7回 品質管理セミナー
平成24年5月15日 (社)日本食品衛生協会 村山三徳

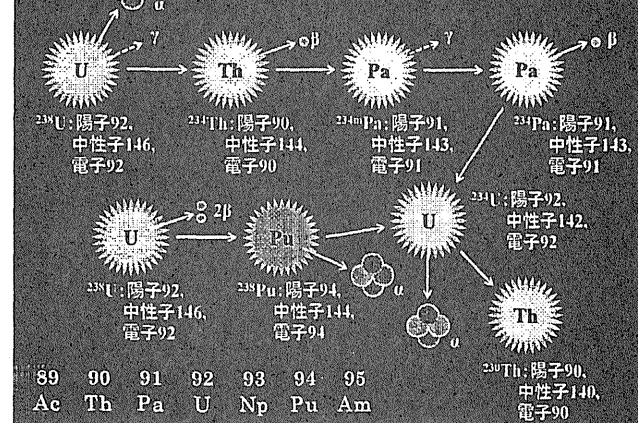
元素

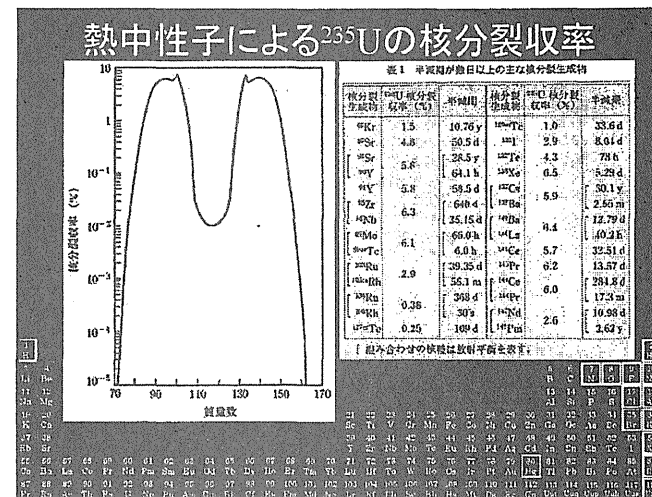
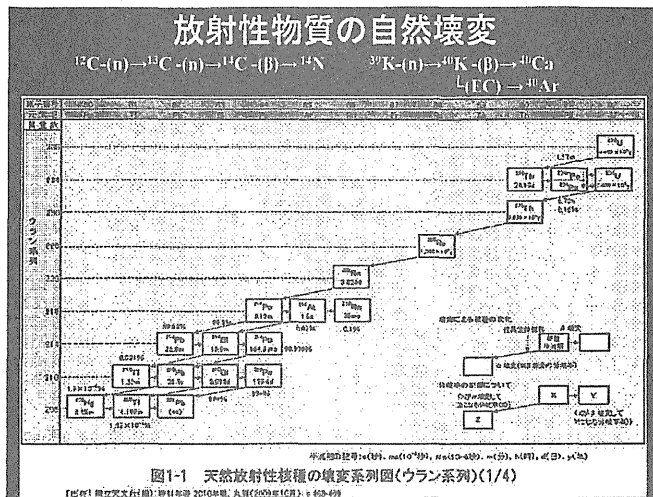


水素原子の遷移



ウラン原子の遷移





放射線

アルファ線 : α ($p2, n2; ^4\text{He}^{2+}$)
 ベータ線 : β^\pm ($e^-; e^+$)
 ガンマ線 : γ (電磁波)
 中性子線 : n

単位

放射能 : Bq ; 1秒間に崩壊した原子核数
 (ラジウム1 gの放射能 = 37 GBq = 1 Ci)
 吸収線量 : Gy (1 Gy = 1 J/kg = 100 rad)
 実効線量 : Sv ; 人体の吸収放射線の影響度
 (α : 1 Sv = 1 Gy \times 20; β, γ : 1 Sv = 1 Gy \times 1;
 n : 1 Sv = 1 Gy \times 5; 1 Sv = 100 rem)
 ^{137}Cs の実効線量係数 (mSv/Bq)
 吸入摂取 : 6.7×10^{-6} ; 経口摂取 : 1.3×10^{-5}

放射線による障害

電離作用 : $\alpha > \beta > \gamma$
 物理作用 : $\alpha > n > \beta$

早発性障害 :
 脱毛、皮膚障害
 悪心、嘔吐、全身倦怠

晩発性障害 :
 放射線性白内障、加齢現象
 白血病、悪性リンパ腫、癌