

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	解析ブローブ					
	GM63-Taq ブローブ			NGMr-Taq ブローブ		
	ブランク	試料 C		ブランク	試料 C	
		× 1 ^{a)}	× 2 ^{a)}		× 1 ^{a)}	× 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、

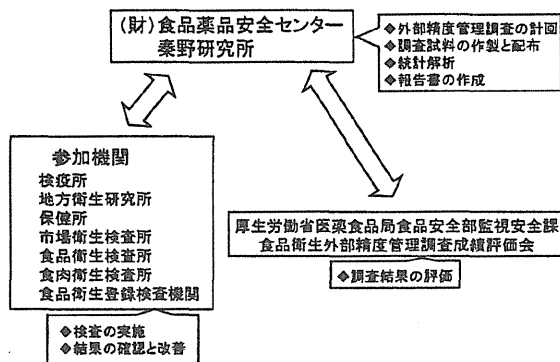


図1 食品衛生外部精度管理調査の流れ

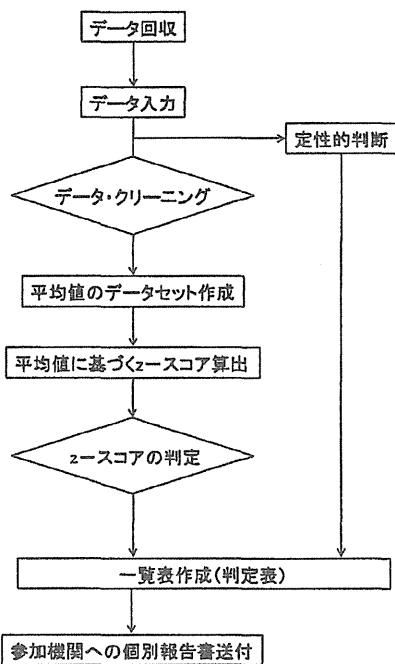


図2-1 外部精度管理調査の解析フロー（従来方式）

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

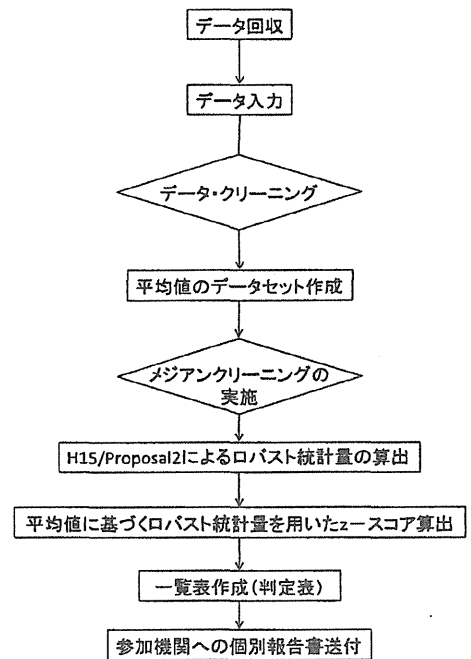


図2-2 外部精度管理調査の解析フロー（ロバスト方式）

最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關する検査機関の技能試験に關連して、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²¹⁾²²⁾。統計手法の導入に關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」と呼ば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±メジアン×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

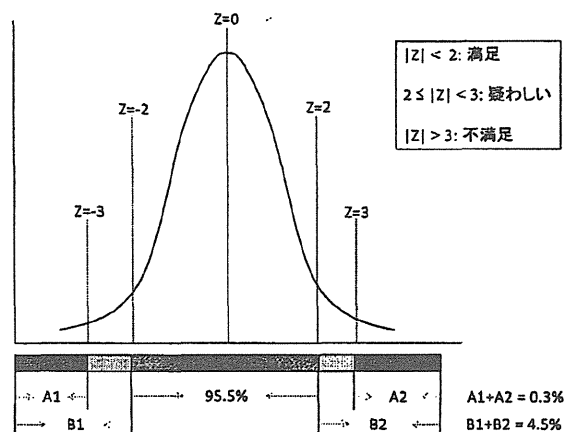
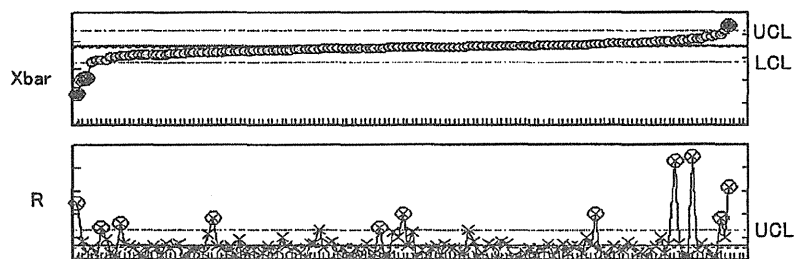


図3 Zスコアの分布図

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な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」と命名された統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} やばらつきの測定としての範囲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、微生物学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い、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初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)

ダイズおよびトウモロコシ抽出 DNA の精製度の検討

(2013 年 7 月 4 日受付)
(2013 年 9 月 25 日受理)笠間 菊子^{a)}、小熊 恭代^{a)}、穂山 浩^{b)}、鈴木 達也^{a)}、渡辺 卓穂^{a)}、小島 幸一^{a)}

a) 一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

b) 国立医薬品食品衛生研究所

Qualitative study of DNA extracted from soybean and maize

(Received July 4, 2013)

(Accepted September 25, 2013)

Kikuko Kasama^{a)}, Yasuyo Oguma^{a)}, Hiroshi Akiyama^{b)}, Tatsuya Suzuki^{a)}, Takaho Watanabe^{a)}, Koichi Kojima^{a)}

a) Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

b) National Institute of Health Sciences

Abstract

The quality and yield of DNA extracted from soybean and maize samples were compared using two commercial DNA extraction kits, the DNeasy Plant Mini kit (Mini kit) and the GM quicker kit. Subsequent quantification of the extracted DNA samples by UV spectrophotometry and fluorometry revealed that the yields of soybean DNA extracted using the Mini kit were approximately three times higher when determined by UV spectrophotometry than when they were determined by fluorometry. Conversely, the yields of soybean DNA extracted using the GM quicker kit were only slightly higher when determined by UV spectrophotometry than when they were determined by fluorometry. However, the relative DNA yields of maize DNA samples estimated by UV spectrophotometry and fluorometry were 1.77 with the Mini kit and 1.52 with the GM quicker kit. To validate the soybean DNA yields obtained using both extraction kits, DNA samples were analyzed by agarose gel electrophoresis and real-time PCR of a reference gene. These analyses indicated that the Mini kit yields estimated by UV spectrometry were over-estimated, due to more low-intensity bands and fewer gene copies being observed, compared to DNA extracted with the GM quicker kit. Conversely, the maize DNA yields obtained using the Mini and GM quicker kits showed only slight differences between the real-time PCR and agarose gel electrophoresis analyses. The extracted DNA samples were then analyzed by size-exclusion chromatography. The results showed that the soybean DNA extracted using the Mini kit contained more low-molecular weight impurities than the DNA extracted using the GM quicker kit and maize extracts obtained with both extraction kits. Therefore, it appears that the presence of low molecular weight impurities in soybean DNA extracted with the Mini kit interferes with the UV quantification of DNA.

Keywords: DNA 抽出法、ダイズ、トウモロコシ、不純物、サイズ排除クロマトグラフィー

DNA extraction method, soybean, maize, impurity, size exclusion chromatography

I 緒言

安全性審査を受けていない遺伝子組換え (GM) 食品の流通防止および安全性審査済みの GM 食品の適正な表示とその検証のため、厚生労働省および消費者庁から組換え DNA 技術応用食品の検査方法^{1,2)}が通知されている。GM 食品検査は各都道府県の衛生研究所および登録検査機関等で広く実施されているが、我々はこれらの検査機関における分析の

信頼性の確認および向上を目的として GM 食品検査に関する外部精度管理調査を実施してきた³⁻⁷⁾。

2006 年度および 2009 年度に実施したラウンドアップ・レディ・ダイズを対象とした遺伝子組換え食品検査外部精度管理調査において、定量 PCR 法により測定されたダイズ内在性遺伝子レクチンのコピー数は参加機関が採用した DNA 抽出法によって大きく異なり、GM quicker 法を使用した機関のレクチンのコピー数が、他の抽出法を採用した機関に比べ多

連絡先: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 穂山浩

Corresponding author: Hiroshi Akiyama, Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences,
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

くなる傾向が認められた。通知法²⁾の定量 PCR 測定は、あらかじめ規定の濃度に調製した DNA 溶液の一定量を鋳型とし、標準プラスミドによる検量線から目的とする遺伝子のコピー数を求める。このためマトリックスがほぼ同じ試料であれば、抽出法に関わらず得られるコピー数は一定となると考えられる。しかし、ダイズにおいて GM quicker 法による抽出 DNA のレクチンのコピー数が他の抽出法によるコピー数より多くなる傾向は北村ら⁹⁾ および佐藤ら⁹⁾ によっても報告されている。一方、渡邊ら¹⁰⁾ は 4 種の抽出法で抽出したダイズ DNA の収量が 260 nm の吸収から求めた場合 (UV 法) と、2 本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光試薬の蛍光光度から求めた場合 (蛍光法) とでは異なることを報告した。また、渡邊ら¹¹⁾ はトウモロコシにおいても DNA 抽出法により定量 PCR で得られる DNA 当たりの目的遺伝子のコピー数が異なることを報告した。

これらの報告および外部精度管理調査結果は、DNA 抽出法により、得られる DNA の精製度や断片化の程度が異なる可能性を示唆している。そのため本研究では通知法²⁾ の DNA 抽出法のうち外部精度管理調査において多くの機関で使用された、DNeasy Plant Mini kit (Mini キット) および GM quicker (GM quicker キット) により抽出されるダイズおよびトウモロコシ DNA の品質について検討を行ったので報告する。

II 実験方法

1. 試料

市販のダイズ (カナダ産、品種不明) および国立医薬品食品衛生研究所より供与された非遺伝子組換えトウモロコシ (アメリカ産、品種不明) を試料として使用した。

2. 試薬

DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) および GM quicker (關ニッポンジーン) を使用した。DNA 定量の蛍光試薬には Quant-iT dsDNA High Sensitivity Assay Kit HS (ライフテクノロジーズジャパン) を使用した。ダイズおよびトウモロコシ内在性遺伝子のコピー数の測定にはダイズ内在性 DNA Lei オリゴヌクレオチドセット、GM ダイズ (RRS) プラスミドセット -ColEI/TE、トウモロコシ内在性 SS II b-3 オリゴヌクレオチドセット、GM トウモロコシプラスミドセット -ColEI/TE (以上關ニッポンジーン) および TaqMan Universal PCR Master Mix (ライフテクノロジーズジャパン) を使用した。サイズ排除クロマトグラフィーは分析カラムに TSKgel G5000PW_{XL} (關東ソー) を使用して実施した。また、DNA の分解には DNase I recombinant, RNase-free (ロシユ・ダイアグノスティック) を使用した。

3. 装置

ダイズおよびトウモロコシの粉碎には高速遠心式粉砕機 ZM200 (關レッツェ) を、DNA 抽出には多用途小形遠心

機 CF16RX (日立工機) および DryThermoUnit DTU-2B (タイテック) を使用した。260 nm の吸光度測定には GeneQuant pro (GEヘルスケアバイオサイエンス) 、UV 吸収スペクトルの測定には UV-1700 (關島津製作所) 、蛍光法の蛍光測定には Varioskan Flash マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を使用した。内在性遺伝子のコピー数の測定には ABI PRISM7900HT リアルタイム PCR システム (ライフテクノロジーズジャパン) を、サイズ排除クロマトグラフィーには關島津製作所製、高速液体クロマトグラフ装置 Prominence (LC-20AD、SPD-20A、SIL-20AC、CBM-20A、DGU-20A₃、CTO20AC) を使用した。

4. DNA 濃度の測定

DNA の濃度は UV 法と、蛍光法を用いて測定した。UV 法では 260 nm における 1 O.D. を 50 ng/μL DNA として DNA 濃度を算出した。蛍光法は Quant-iT dsDNA High Sensitivity Assay Kit のプロトコールに従って操作し、キット付属の標準品を測定して得た検量線から DNA 濃度を求めた。

5. 内在性遺伝子のコピー数の測定

内在性遺伝子 (レクチン、スタチンシンターゼ II b (SS II b)) のコピー数は通知法²⁾ の定量 PCR の項に従って測定した。なお、鋳型 DNA には各抽出 DNA を UV 法の定量値および蛍光法の定量値に基づいて、ダイズにおいては UV 法 20 ng/μL、蛍光法 7 ng/μL、トウモロコシにおいては UV 法 10 ng/μL、蛍光法 6 ng/μL に調製したものを使用した。

6. アガロースゲル電気泳動

電気泳動は ultraPURE™ Agarose-1000 (ライフテクノロジーズジャパン) 、50 × TAE (遺伝子工学研究用、關ニッポンジーン) により作製した 0.7% アガロースゲルを用い、泳動槽に Mupid (關 ADVANCE) を使用して実施した。また、エチジウムブロミド染色は前染色により行い、画像解析にはプリントグラフ (アトー) を使用した。

7. サイズ排除クロマトグラフィー

DNA 溶液のサイズ排除クロマトグラフィーは分析カラムに TSKgel G5000PW_{XL} (排除限界分子量 2.5 × 10⁶) 、高速液体クロマトグラフ装置 Prominence を使用して実施した。溶離液には 0.4 mol/L 塩化ナトリウムを含む 0.2 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 7.0) を使用し、流速 0.6 mL/min、カラム温度 23℃ の条件下、10 μL の試料を注入し、260 nm における UV 吸収を測定した。なお、試料には蛍光法による定量値に基づいて 7 ng/μL に調製したダイズ DNA および 6 ng/μL に調製したトウモロコシ DNA、さらに DNase I recombinant, RNase-free を用い、付属のプロトコールに従って分解したダイズおよびトウモロコシ DNA を使用した。さらに DNA のサイズ推定のため、電気泳動用 DNA サイズマーカーの λ-Hind III digest (タカラバイオ) もあわせて分析した。

III 結果

1. DNA 収量

ダイズおよびトウモロコシから Mini キットおよび GM quicker キットにより通知法²⁾に従って抽出した DNA (以下 Mini-DNA および Quicker-DNA とする) を、UV 法および蛍光法により定量した。ダイズの Mini-DNA は、定量法間で収量に大きな差が認められ、UV 法収量は蛍光法収量の約 3 倍であった。一方、ダイズの Quicker-DNA では、UV 法収量は蛍光法収量の 1.24 倍で、Mini-DNA に比べ差が小さかった (Table 1)。

トウモロコシでは Mini-DNA の定量法間の収量の差はダイズほど大きくなかったが、ダイズと同様 Mini-DNA および Quicker-DNA のいずれでも UV 法による収量が蛍光法より高かった。なお UV 法収量は蛍光法収量に比して Mini-DNA で 1.77 倍、Quicker-DNA で 1.52 倍であった (Table 2)。

2. 内在性遺伝子のコピー数

ダイズの Mini-DNA および Quicker-DNA を、UV 法および蛍光法による定量値それぞれに基づいて濃度調製し、通知²⁾に従って内在性遺伝子レクチンのコピー数を測定した。その結果、UV 法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数は、Mini-DNA に比べて 2.72 倍多く測定された。一方、蛍光法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数は Mini-DNA のコピー数と同程度

であった (Table 1)。この結果、ダイズにおいては蛍光法の定量値が PCR の鑄型 DNA の量を反映していること、および Mini-DNA には PCR の鑄型と異なる 260 nm に吸収を持つ成分が多く含まれることが示唆された。

トウモロコシについてもダイズと同様に Mini-DNA と、Quicker-DNA の濃度を UV 法および蛍光法による定量値に基づいて濃度調製し、通知²⁾に従って内在性遺伝子 SS II b のコピー数を測定した。その結果、UV 法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数が、Mini-DNA に比べ 1.21 倍高く測定されたが、その差はダイズに比べて低かった。また、蛍光法から濃度調製した DNA 溶液では、Quicker-DNA のコピー数と Mini-DNA のコピー数はほぼ同等であった (Table 2)。以上の結果、トウモロコシでは DNA 溶液を UV 法、蛍光法のいずれに基づいて調製しても、得られる SS II b のコピー数に抽出キット間でそれほど差がないことから、Mini-DNA と Quicker-DNA に含まれる不純物の割合には差が少ないことが示唆された。

3. 抽出 DNA の UV 吸収スペクトル

内在性遺伝子の測定結果から、試料 (ダイズおよびトウモロコシ) および使用する抽出キット (Mini キット、GM quicker キット) により、得られる DNA 溶液の精製度に差がある可能性が示唆されたため、ダイズおよびトウモロコシの Mini-DNA と Quicker-DNA の UV 吸収スペクトルを検討した。その結果、ダイズ、トウモロコシともに Mini-DNA と Quicker-DNA

Table 1. Yield and lectin copies in soybean DNAs extracted using Mini kit and GM quicker kit

Extraction method	Quantification of DNA			Lectin copy number	
	Method	Yield (μg)	Yield ratio (UV / Fluorometry)	copy/100 ng ¹⁾ of DNA	copy/35 ng ²⁾ of DNA
Mini kit	UV	9.45 \pm 0.62	2.96	30353 \pm 3069	—
	Fluorometry	3.19 \pm 0.34		—	30434 \pm 3386
GM quicker kit	UV	5.19 \pm 0.10	1.24	82616 \pm 7244	—
	Fluorometry	4.19 \pm 0.63		—	34259 \pm 3160
Ratio of lectin copy (GM quicker kit/Mini kit)				2.72	1.13

Yield and lectin copy number represents the mean \pm S.D. of 3 extractions.

1) DNA contents were adjusted according to the UV spectrophotometry

2) DNA contents were adjusted according to the fluorometry

Table 2. Yield and SSIIB copies in maize DNA extracted using Mini kit and GM quicker kit

Extraction method	Quantification of DNA			SSIIB copy number	
	Method	Yield (μg)	Yield ratio (UV / Fluorometry)	copy/50 ng ¹⁾ of DNA	copy/30 ng ²⁾ of DNA
Mini kit	UV	12.32 \pm 0.74	1.77	11373 \pm 825	—
	Fluorometry	6.95 \pm 0.62		—	12810 \pm 1212
GM quicker kit	UV	3.03 \pm 0.09	1.52	13753 \pm 1062	—
	Fluorometry	2.00 \pm 0.13		—	12191 \pm 660
Ratio of SSIIB copy (GM quicker kit/Mini kit)				1.21	0.95

Yield and SSIIB copy number represents the mean \pm S.D. of 3 extractions.

1) DNA contents were adjusted according to the UV spectrophotometry

2) DNA contents were adjusted according to the fluorometry

の UV 吸収スペクトルの形状には明確な差は認められなかった (Fig. 1)。また、精製度の指標となる 260 nm/280 nm の吸光度比は、Mini-DNA と Quicker-DNA のそれぞれで、ダイズでは 1.77 および 1.75、トウモロコシでは 1.74 および 1.65 といずれも良好であった。以上の結果、UV 吸収スペクトルからは抽出 DNA の質的な差は確認できなかった。

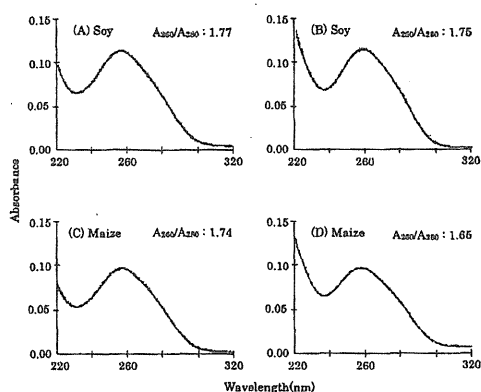


Fig. 1. UV spectra of soybean and maize DNAs extracted using Mini kit (A, C) and GM quicker kit (B, D)

4. 抽出 DNA のアガロースゲル電気泳動

ダイズでは UV 法で濃度調製した DNA 溶液のレクチンのコピー数には Mini-DNA と Quicker-DNA の間で約 3 倍の開きが認められたが、両者の UV 吸収スペクトルには差が認められなかったため、Mini-DNA は、ゲノミック DNA と類似した吸収スペクトルを持つ DNA 断片を含む可能性が考えられた。このため、各抽出 DNA の断片化を 0.7% アガロースゲルを用いた電気泳動により検討し、結果を Fig. 2 に示した。ダイズの Mini-DNA と Quicker-DNA を、UV 法から濃度調製して電気泳動した結果、ゲノミック DNA のバンドの濃さは Quicker-DNA が Mini-DNA に比べて目視で判断できるほど高かった。一方、蛍光法から濃度調製して電気泳動した結果では、ゲノミック DNA のバンドの濃さは Mini-DNA と Quicker-DNA で目視上ほぼ等しく、DNA の低分子化を示す幅広く検出されるバンドについても差は認められなかった。トウモロコシについても同様に Mini-DNA と Quicker-DNA を UV 法および蛍光法から濃度調製して電気泳動した結果、ゲノミック DNA のバンドの濃さは濃度調製の方法に関わらず Mini-DNA と Quicker-DNA で目視上ほぼ等しく、低分子化を示すバンドについても差は認められなかった。また、ダイズ、トウモロコシとも低分子化した DNA の有無を確認するために 3% ゲルを用いて電気泳動を実施したが、いずれも低分子化した DNA と考えられるバンドは検出されなかった (データは示さず)。

以上の結果、ダイズ、トウモロコシともにアガロースゲル電気泳動からは DNA の断片化は確認できなかった。しかし、

ダイズでは UV 法により濃度調製した Mini-DNA のゲノミック DNA のバンドの濃さが同濃度の Quicker-DNA のそれに比べて薄かったことから、ダイズ Mini-DNA は 2 本鎖 DNA に結合する蛍光試薬 (ゲル染色に用いたエチジウムブロミドは蛍光試薬の一つ) では検出できない成分を含むことが示唆された。

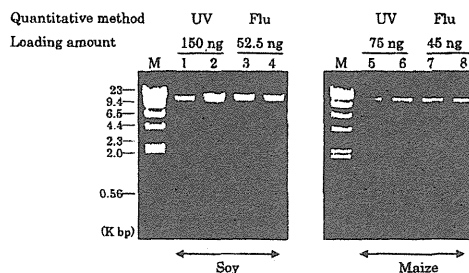


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of soybean and maize DNAs

Loading amount of the each DNA was adjusted using UV spectrophotometry (UV) and fluorometry (Flu). Lane M, molecular marker λ -HindIII; lanes 1, 3, 5 and 7, Mini kit extract; lanes 2, 4, 6 and 8, GM quicker kit extract.

5. サイズ排除クロマトグラフィー

以上ダイズの Mini-DNA には 260 nm に吸収を持ち、蛍光法では検出されない不純物が含まれることが強く示唆された。このため、ダイズおよびトウモロコシの抽出 DNA について 260 nm の吸収を指標としてサイズ排除クロマトグラフィーにより 260 nm に吸収を持つ成分の分析を行い、ダイズの結果を Fig. 3 に、トウモロコシの結果を Fig. 4 に示した。

ダイズでは、排除限界がそれより大きい成分が分離される 8.5 分付近のピークの高さは Mini-DNA と Quicker-DNA でほぼ等しく、その後 15 分までの溶離パターンには大きな差は認められなかった。しかし、Mini-DNA では 16 分付近および 18 分付近に大きなピークが観察されたのに対し、Quicker-DNA では 18 分付近に小さなピークが観察されたのみであった。また、Mini-DNA および Quicker-DNA を DNase により分解後、同様に測定した結果、いずれのクロマトグラムでも 15 分以前の溶離物は消失した。

トウモロコシでは 8.5 分付近のピークは Quicker-DNA が Mini-DNA に比べて高かった。しかしダイズとは異なり Mini-DNA でも 16 分以降の溶離物は少なく、Mini-DNA と Quicker-DNA の溶離パターンの差も小さかった。また、Mini-DNA および Quicker-DNA を DNase により分解後、同様に測定した結果、いずれのクロマトグラムでも 15 分以前の溶離物は消失した。

なお、参考のため測定したアガロースゲル電気泳動用サイズマーカー λ -Hind III digest のクロマトグラムでは、125 bp が約 12 分、564 bp が約 11 分に溶離され、2027 bp 以上の DNA は 8.5 分付近にまとめて溶離された。

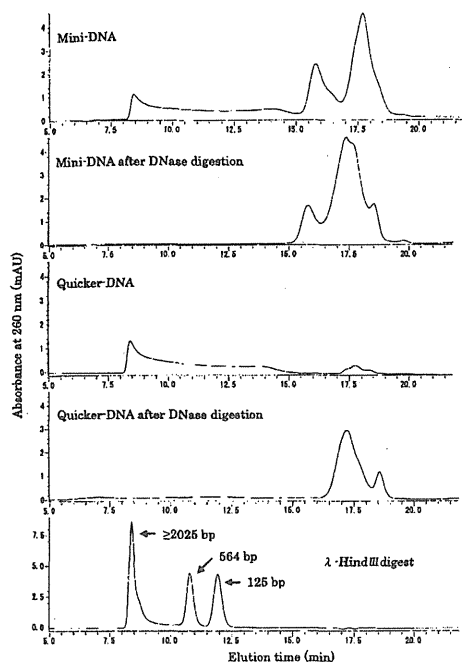


Fig. 3. Chromatograms of soybean DNAs in size exclusion chromatography

IV 考察

ダイズでは、レクチンのコピー数、アガロースゲル電気泳動の結果から、Mini-DNA および Quicker-DNA を UV 法の定量値から同濃度に調製した場合、実際の DNA 含量は、Mini-DNA が Quicker-DNA に比べ少なく調製されることが示唆された。また、蛍光法から濃度調製した場合、Mini-DNA と Quicker-DNA の濃度がほぼ等しく調製されることも示唆された。しかし、Mini-DNA および Quicker-DNA の間には UV 吸収スペクトルの形状、260 nm/280 nm の吸光度比においては、明確な差は認められなかった。このため、ダイズの Mini-DNA は 260 nm に吸収を持ち、UV 吸収スペクトルの形状が DNA に類似し、PCR の鋳型とならない不純物を含むことが強く示唆された。

これを確認するため、260 nm の吸収を指標としてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、DNA 抽出液に含まれる 260 nm に吸収を持つ成分の分析を行った。ダイズの Mini-DNA および Quicker-DNA のクロマトグラムを比較した結果、8.5 分から 15 分までの溶離パターンには大きな差は認められなかったが、Mini-DNA には 16 分付近および 18 分付近に溶離物の大きなピークが認められた。一方、DNase 処理を行った試料では、15 分までの溶離物は消失したため、DNA は 15 分以内に溶離されていると考えられ、16 分付近および 18 分

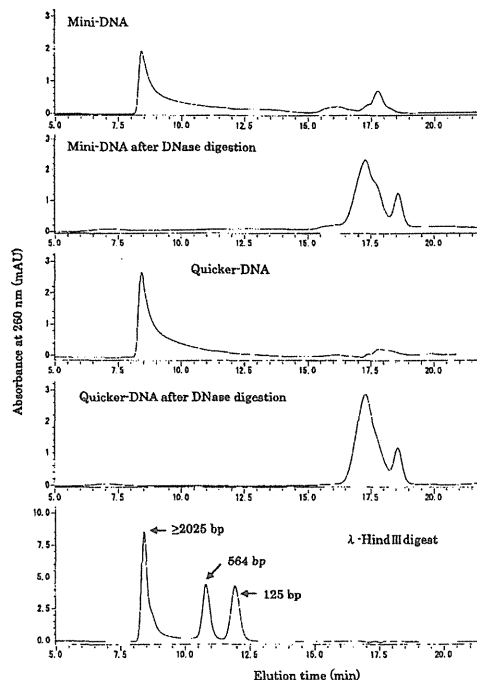


Fig. 4. Chromatograms of maize DNAs in size exclusion chromatography

付近に認められた溶離物が DNA である可能性は低いと考えられた。さらに 3% アガロースゲル電気泳動の結果からも、この溶離物は低分子化した DNA ではないことが支持された。以上の結果から、ダイズの Mini-DNA は 260 nm に吸収を持つ DNA 以外の成分を含んでいることが明らかになり、DNA 以外の成分による干渉により、Mini-DNA の UV 法による収量が蛍光法の収量の約 3 倍となったものと考えられた。これに比べ、Quicker-DNA は 15 分以降の溶離物が少なく、UV 法と蛍光法による収量の差も小さいことから、260 nm に吸収を持つ不純物の含量は少ないものと考えられた。

トウモロコシでは、Mini-DNA および Quicker-DNA の SS II b のコピー数は、DNA 濃度調製に UV 法、蛍光法のいずれの結果を用いても抽出キット間での差は小さかった。また、アガロースゲル電気泳動においても、抽出法による差は認められなかった。さらにサイズ排除クロマトグラフィーでは、15 分以降に溶離される不純物は Mini-DNA、Quicker-DNA のいずれにおいても微量であり、両者の質的差は小さいものと考えられた。しかし、Mini-DNA および Quicker-DNA の UV 法と蛍光法による収量にはともに 1.5 倍以上差があるため、サイズ排除クロマトグラフィーの結果からは説明できない不純物を含んでいる可能性もあると考えられた。

以上、ダイズにおいては UV 法による定量では、Mini-DNA の量を正確に測定できないことが明らかになった一方、

蛍光法による定量では、ゲノミック DNA の量を反映した定量値が得られることが示された。また、トウモロコシの Mini-DNA で、サイズ排除クロマトグラフィーで 15 分以降に溶離される不純物が微量であったことから、ダイズの Mini-DNA で認められた不純物はダイズ特有の成分である可能性が高いと考えられた。

GM 食品検査のうち PCR 法を用いた定量試験法は、抽出 DNA について GM 遺伝子と内在性遺伝子のコピー数をそれぞれ測定し、GM 遺伝子コピー数の内在性遺伝子コピー数に対する割合と内標比から GM 混入率 (%) を算出するものである。この時、GM 遺伝子と内在性遺伝子の測定には同じ DNA 溶液を使用するため、DNA 溶液の濃度が正確に調整されていなくても、混入率は理論上影響を受けない。しかし、ダイズの定性試験においては、鑄型 DNA のコピー数が検出感度として結果に直接影響するため、PCR 反応液に加える DNA 濃度を一定にすることが必須であると考えられる。本研究の結果、同じ試料でも抽出法によっては不純物の混入量が異なり、UV 法では DNA の量を正確に測定できない場合があることが明らかになった。今後、DNA 抽出法が複数種規定されている定性試験では、PCR 反応液に加える DNA 濃度を一定にするため、UV 法による定量結果と DNA 量の関係を個々の抽出法について確認する必要があると考えられた。

V 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金により行った。

VI 文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“安全性未審査の組換え DNA 技術応用食品の検査方法について”平成 24 年 11 月 16 日、食安発 1116 第 3 号 (2012)。
- 2) 消費者庁次長通知“安全性審査済みの組換え DNA 技術応用食品の検査方法について”平成 24 年 11 月 16 日、消費表第 201 号 (2012)。
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R.: Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem. Safety)*, 19, 215-222 (2012).
- 8) Kitamura, M., Tanabe, E., Yamabe, S., Koeduka, K., Imanaka, M.: Comparison of DNA extraction methods for genetically modified soybean. *Okayamaken Kankyo Hoken Senta Nempo (Annual Report of Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health)*, 31, 133-136 (2007).
- 9) Sato, N., Sugiura, Y., Kikuchi, H., Tanaka, T.: Application of DNA extraction kit 'GM quicker' for detection of genetically modified soybeans. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.)*, 53, 39-44 (2012).
- 10) Watanabe, T., Sekino, A., Shiramasa, Y., Matsuda, R., Maitani, H.: Effect of non-genetically modified(non-GM) soy varieties on the measured value of GM soy by a quantitative PCR method. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, 49, 294-302 (2008).
- 11) Watanabe, T., Tokishita, S., Kikuchi, H., Sakata, K., Hino, A., Akiyama, H., Maitani, T.: Comparative study of four methods to extract genomic DNA for quantification of genetically modified maize by real-time polymerase chain reaction. *Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi (Jpn. J. Food Chem.)*, 13, 63-71 (2006).

食品添加物検査の外部精度管理調査について
(平成25年5月 第105回 日本食品衛生学会学術講演会シンポジウム
—食品中の食品添加物分析の現状と課題—)

渡辺卓穂*

External Quality Control for Food Additives Inspection

Takaho WATANABE

Division of Food Hygiene, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center:
792-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

1. はじめに

食品分析を行う機関にとって分析値は食品の安全性を考えるうえで大切であり、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。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極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。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、検疫所、衛生研究所、保健所、そのほか自治体の公的検査機関や食品衛生登録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。他方、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。一方、FAO/WHO合同食品規格計画の下で活動している国際食品規格委員会 (通称、コーデックス委員会)では、食品の輸出入にかかわる試験所の条件として、①試験所認定に適合していること (ISO/IEC17025 (2005) など)、②適切な Proficiency Testing (PT) に参加してい

ること、③妥当性が確認された方法を用いていること、④内部精度管理を行っていること、をそのガイドラインで挙げている。特に、第三者機関が行う外部精度管理 (外部 (品) 質査定)に参加することで、試験所が出す分析値の信頼性を保証することができる。この査定に1つにPTがあり、JISでは「技能試験」と呼ばれ、試験所間の分析技能レベルの比較を行うために用いられており、国際的にハーモナイズされたプロトコルが作成されている。これらの試験では、分析値が統計的に処理され、参加機関による結果の一覧、 \bar{x} スコアによる分布図等を示した報告書が送付される。その結果を基に各試験所では自機関の現状を把握し、全体の中での技能レベルの位置づけの確認の手段としている。このように、試験データの信頼性を確保するうえで、外部精度管理は非常に重要な役割を担っている。

平成9年に外部精度管理調査がスタート後、食品添加物検査は定量のみであったが、平成14年度より食品添加物Iで食用色素の定性検査と食品添加物IIで定量検査が始まり、食品添加物検査は理化学検査の中で参加者が最も多い項目となった。

本稿では、一般財団法人食品薬品安全センターが行っている食品衛生外部精度管理調査の中の食品添加物検査についてご紹介する。

2. 食品衛生外部精度管理調査の流れ

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およ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、必要であれば改善を行う。

* 一般財団法人 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

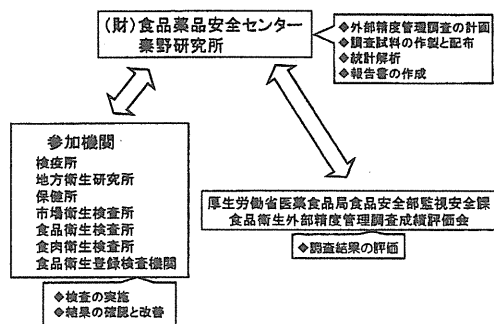


図1. 食品衛生外部精度管理の流れ

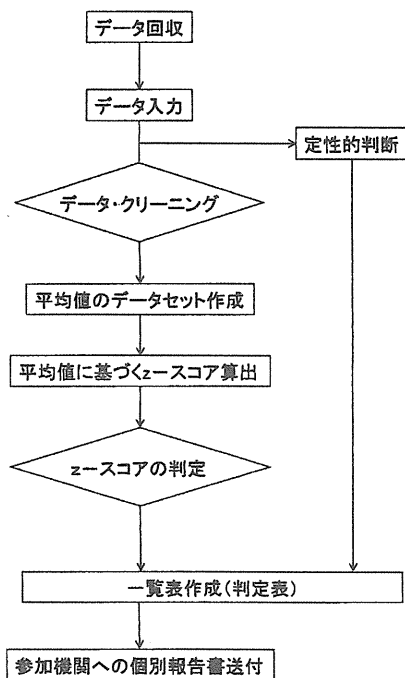


図2. 外部精度管理調査の解析フロー

3. 食品衛生外部精度管理調査の理化学検査の統計処理

これまでの評価法（従来法）における外部精度管理調査の解析フローを図2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以下および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、報告値が5個未満を回答した機関については、その機関の報告値すべてを以後の解析対象から除外する。すなわち、5個の報告値がそろっていない場合、統計的に処理できないのである。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±2×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。また、理化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。

一方、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關与する検査機関の技能試験に關連して、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。統計手法の導入に關心を示す理由の1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しだいに複雑になり、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1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図るため、種々の方法のあるなか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±メジアン×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)」において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1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、まず暫定的に検査機関の報告値については全体に影響を与えるような報告値をデータ・クリーニング（添加量の10倍以上、1/10以下を除外）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} ±2×標準偏差sの範囲を超える）の値を報告した検査機関のすべ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。なお、ロバスト方式の場合は、上のデータ・

クリーニングのほかに、さら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、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きてしまう。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、その位置づけを測定値の標準化を行うことで相対的に示したものである。したがって、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取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となる場合には、その外れた値は確率から考えて、全体の傾向から明らかにはずれを生じていると判断しよう、と考える。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

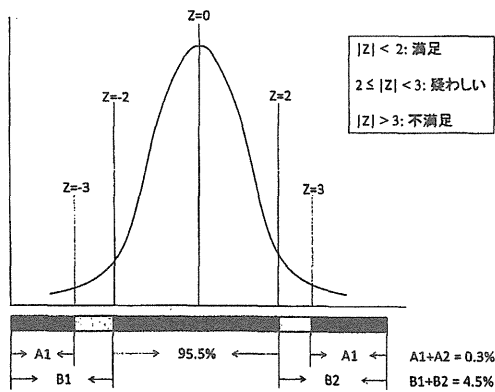


図3. zスコアの分布図

ることとなり、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スコアのほか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對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、点がその外側にあるときは、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、原因を究明し改善措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、前述のとお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1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）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%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となる。

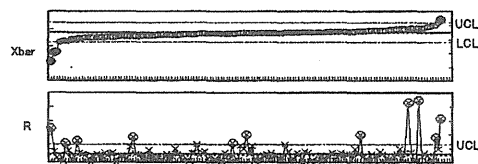


図4. \bar{X} -R管理図の例

表1. 食品添加物検査に採用した調査対象と使用基材

調査項目	調査対象	使用基材	
食品添加物	安息香酸+ソルビン酸	つゆ	
	ソルビン酸	ジャム, シロップ, 漬物	
	サッカリンナトリウム	シロップ, しょう油, ジャム, 飲料	
	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	清涼飲料水	
	安息香酸+パラオキシ安息香酸ブチル	清涼飲料水	
	安息香酸+ソルビン酸	シロップ	
	安息香酸	しょう油	
	食用色素	赤色102号	ジャム
		赤色102号+黄色4号+青色1号	清涼飲料水
		黄色4号+黄色5号	ジャム
赤色102号+黄色4号+黄色5号+青色1号		ゼリー	
赤色40号+赤色105号+赤色106号		清涼飲料水	
赤色102号+赤色106号		漬物	
赤色40号+赤色102号+黄色5号		漬物	
黄色4号+黄色5号+赤色102号		漬物	
黄色4号+赤色2号+赤色40号+赤色106号		漬物	
赤色2号+赤色102号+黄色4号+緑色3号		漬物	
黄色4号+赤色2号+赤色3号+赤色105号		ゼリー菓子	

4. 食品添加物検査について

食品衛生外部精度管理調査では、食用色素の定性検査と食品添加物の定量検査を行っている。表1にこれまで食品添加物検査に採用した調査対象と使用基材を示す。食品添加物の基材は液体を中心に採用してきたが、昨年度は漬物を基材として使用した。固体部と液体部からの測定となったので、一部の参加者から固体部と液体部を分けて測るのかなど、質問を受けた。固体部と液体部で濃度が同じであることを確認済みであったが、その点においては基材として適切であったのか反省材料となった。一方、食用色素については、当初単独の色素の定性であったのが、現在は種々の色素のミックスでおおかつ濃度も低くしてあることから、不検出機関も多い傾向にある。食用色素の定性の約半数はTLC法であり、HPLC法は2003年より約10%増え、おおよそ40%であることがアンケートよりわかった。また、図5に使用したTLCの種類を推移を示す。調査を開始した2003年より化学修飾型、シリカゲルおよびセルロースの使用比率がほとんど変わっていないことも確認できた。しかし、タール系色素の定性では、公定法には化学修飾型とシリカゲルで行うことになっていることを考えると、標準操作手順書の見直しなどはほとんどされていない印象を受ける。

また、食品添加物の定量において、 z -スコアのはずれ機関を調査した結果、検量線外での定量を行っていることが頻りに観察された。そこで、参加機関で検量線のプロット数を確認したところ、10年前ぐらいまでは1点あるいは2点検量線での定量が行われていたが、現在はほぼ半数以上が5点以上のプロット数での検量線を採用していることがわかった。その中で原点を検量線に含めていたのが10年ぐらい前までは半数あったのが、現在は約30%と減少していることも確認された。このように、検量線の作成法も以前と変わりつつあり、適正な検量線になりつつある。た

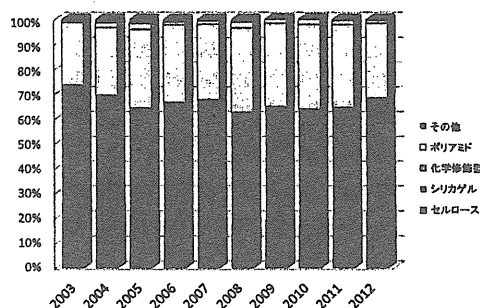


図5. 使用したTLCの種類を推移

だし、ここで取り上げた検量線に関しては、食品添加物に限らずほかの定量でも見受けられることを追記しておく。表2に食品添加物検査における変動係数を示す。これらの濃度範囲において、Horwitzの修正式と比較すると、全体的に近い変動係数（室間相対標準偏差）を示し、ロバスト法での変動係数が従来法と比べて小さいことが分かる。これは、ばらついた測定値を置き換えることにより、ばらつきが小さくなり、はずれ機関が多くなることが分かる。

5. 解析結果の基本的な考え方

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・クリーニングまたは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および運営に問題がある可能性がある。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い、転記ミス、希釈倍率など

表2. 食品添加物IIにおける変動係数

年度	検査対象	基材	添加量 (g/kg)	変動係数 (従来法)	変動係数 (ロバスト法)
2002	ソルビン酸	ジャム	0.34	0.1356	
2003	サッカリンナトリウム	しょう油	0.46	0.0805	
2004	サッカリンナトリウム	シロップ	0.15	0.0570	
2005	サッカリンナトリウム	ジャム	0.06	0.0798	
2006	パラオキシ安息香酸イソプロピル	清涼飲料水	0.02	0.0627	
	パラオキシ安息香酸ブチル	清涼飲料水	0.04	0.0925	
2007	安息香酸	清涼飲料水	0.18	0.0819	
	パラオキシ安息香酸ブチル	清涼飲料水	0.02	0.0943	
2008	ソルビン酸	シロップ	0.18	0.0468	
	安息香酸	シロップ	0.06	0.0528	
2009	安息香酸	しょう油	0.12	0.0576	0.0365
2010	サッカリンナトリウム	飲料	0.08	0.0472	0.0320
2011	ソルビン酸	シロップ	0.95	0.0639	0.0305
2012	ソルビン酸	漬物	0.34	0.0590	0.0527

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。一方、平均値から大きく離れた場合には、試験品の管理、試薬等の管理および試験法について内部点検を行うことを推奨する。また、一連の検査操作のばらつき状態を示す目安となるR管理図で管理限界線を越えた場合は、再現性の悪い操作で検査していることを示しているため、操作の熟練度およ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。

6. おわりに

外部精度管理調査の結果は「ただ単に、ある日、ある場所で、ある人がある試料を用いて検査をして得られた結果に過ぎない」ということで、1回の結果が悪かったということが検査施設として悪いという判断にはならず、「重要なのは、その結果をどう判断し、どう活用したかである。」ことである。

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 23 年度～平成 25 年度

研究成果の刊行物・別刷

学会発表