

平成 29 年度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）

食品衛生検査を実施する試験所における品質保証システムに関する研究

### 総括研究報告書

研究代表者 渡辺 卓穂 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 部長

#### 研究要旨

厚生労働省は、食品の安全の担保と向上に加え健康危害リスクを管理することを目的に、有害物質等の上限濃度を規定した食品規格を策定し、その実効のために検査を実施する。検査での誤判定を避けるために、各試験所による分析値の品質保証が必須である。誤判定の回避は食品貿易上も重要であり、各国間での整合がCodex委員会等を通じて求められている。

本研究では、分析値の品質保証に関する取組みの指針となる業務管理要領を改訂し、品質保証に組み込まれる要素である新たな技能試験プログラムを開発する。業務管理要領は、平成7年の通知後抜本的な改訂がされていない。その間、基礎とされた国際的な品質保証の規格(当時、ISO Guide 25)は3回の改訂を重ね、現版はISO/IEC17025-2017である。そのため、現在の業務管理要領は国際的な品質保証への要求と大きく乖離しており国際整合を図るため、ISO/IEC17025の最新版を基礎とする改訂を検討する。また、改訂された業務管理要領が我が国の試験所における品質保証にどのような影響を与えるかを検証する。技能試験プログラムは、検査される全ての分析項目に対し開発されているのが理想であるが、困難さのため一部の分析項目しか開発されていない。この現実を踏まえ、新規技能試験プログラムを開発すると共に既存のプログラムの改善を図る。また、パイロットスタディにより実効性を検証し、新規プログラムとしての導入を検討する。そこで、今年度は、1. 国際整合性を踏まえた業務管理要領案の開発に関する研究（渡邊研究分担）、2. ISO/IEC 17025認定取得に向けた試験所の検討に関する研究（石井研究分担）、3. 既存技能試験プログラムの改善及び新規技能試験プログラムの導入に関する研究（渡辺研究分担）、4. 新規技能試験プログラムの開発及び統計学的評価に関する研究（松田研究分担）、5. 新規技能試験プログラム用試料の開発に関する研究（井部研究分担）の5課題について実施した。

研究分担者名 = 渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所室長）、石井里枝（埼玉衛生研究所室長）、渡辺卓穂（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所食品衛生事業部長）、松田りえ子（（公社）食品衛生協会技術参与、

井部明広（実践女子大学教授）

#### A. 研究目的

厚生労働省は、食品の安全の担保と向上に加え健康危害リスクを管理すること目的

に、有害物質等の上限濃度を規定した食品規格を策定し、その実効のために検査を実施する。検査においては、誤判定を避けるために、各試験所による分析値の品質保証が必須である。誤判定の回避は食品貿易上も重要であり、輸出入国間での係争を回避するためにも各国間での整合が Codex 委員会等を通じて求められている。

本研究では、分析値の品質保証に関する取組みの指針となる業務管理要領を改訂する。また、品質保証に組み込まれる要素である技能試験プログラムを新たに開発する。業務管理要領は、平成 8 年の通知後抜本的な改訂がされていない。その間、基礎とされた国際的な品質保証の規格(当時、ISO Guide 25)は 3 回の改訂を重ね、現版は ISO/IEC17025-2017 である。そのため、現在の業務管理要領は国際的な品質保証への要求と大きく乖離しており国際整合を図るためにも、ISO/IEC17025 の最新版を基礎とする改訂を検討する。また、改訂された業務管理要領が我が国の試験所における品質保証にどのような影響を与えるか、ISO/IEC 17025 による認定取得に向けた試験所の課題を精査することによって、実行可能性も含め検証する。技能試験プログラムは、検査される全ての分析項目に対し開発されていることが理想であるが、困難さのため一部の分析項目しか開発されていない。新規技能試験プログラムの開発を困難にしている大きな要因は、新規試料開発における技術的課題と少数データの統計的評価方法の不在にある。試料開発に関しては、貝毒及び動物用医薬品等を分析項目とする新規試料を開発する。さらに粉体工学技術を導入し、保存安定性や均質性に優れた試料の開

発も検討し、学術的にも有益な成果を得る。少数データの評価を可能にする新たな統計的評価方法の構築を検討し、スプレッドシートの開発を目指す。上記 2 つに大別される研究は、厚生労働省によるリスク管理をより堅実なものとし、健康危害の未然防止や食品貿易時の係争回避に直結する成果が期待されるため、必要かつ早急に着手すべきであり、当研究班の目的である。

## B. 研究方法

### 1 国際整合性を踏まえた業務管理要領案の開発に関する研究(渡邊研究分担)

業務管理要領の改定案(以下、ガイドライン案とする。)を開発するに当たり、まず、食品衛生法(以下、法とする)及び、食品衛生法施行規則(以下、施行規則とする)を調べ、法の規定する検査(以下、検査とする)及び、その実施施設(あるいは組織)となる試験所について整理した。ISO/IEC 17025-2005 (JIS Q 17025:2005; 試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項)を調べ、国際的に認められる試験所に必要とされる能力について整理し、特に検査を実施する試験所に必要とされる能力について抽出した。ISO/IEC 17025-2017についても調べ、2017年に行われた改定をガイドライン案の作成においてどの様に考慮すべきか検討した。試験所の能力への国際的な要求また、国際的に整合した用語の定義を、Codex委員会が発行するガイドライン(CAC/GL 27、CAC/GL 70、CAC/GL 72、CAC/GL 83等)を用いて調べた。業務管理要領と呼称される文書を別紙として示した、2通の

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知(「登録検査機関における製品検査の業務管理について」「食品衛生検査施設における検査等の業務管理について」)を調べ、ガイドライン案の開発における現行業務管理要領の活用を検討した。

## 2 ISO/IEC 17025 認定取得に向けた試験所の検討に関する研究(石井研究分担)

### 1) ISO/IEC 17025を基礎とした取組みの品質保証への影響の検討

#### 1)-1 研修会及び講習会の開催

ISO/IEC 17025を基礎とした改定案と現行の業務管理要領とを比較検討するために、また、地方自治体の設置する食品衛生検査施設(以下、「試験所」という。)へのISO/IEC 17025を基礎とした取組みが円滑に導入される一助になることを目的として、ISO/IEC17025に関する研修会を2回、講習会を1回開催した。

#### 1)-2 業務管理に関するアンケート調査

試験所の業務管理の現状を把握することを目的として実施した。調査対象施設として地方衛生研究所全国協議会の会員82機関及び本研究班の研究協力機関1機関(非会員)の合計83機関にメールによりアンケートを配布し、メールにより回収した。

#### 1)-3 ISO/IEC 17025を基礎とする取組みの試験所への導入による影響、課題及び方策の検討

アンケート調査の結果を精査し、班会議等においてISO/IEC17025を基礎とする新たな取組みが試験所へ導入された場合の

検査の品質保証に対する影響並びに人的、物的及び組織的課題を明らかとし、それらを解決する方策を検討した。

### 2) 残留農薬技能試験への参加

平成29年10月3日～11月17日に(一財)食品薬品安全センターで開発した農薬4種(クロルピリホス、ダイアジノン、フェントロチオン及びマラチオン)を含む玄米試料2試料について研究協力機関16機関が参加し、技能試験を実施した。

## 3 既存技能試験プログラムの改善及び新規技能試験プログラムの導入に関する研究(渡辺研究分担)

### 3.1 残留農薬技能試験プログラムのパイロットスタディ:

#### 1) 調査試料の作製

試料基材には玄米(平成27年産の市販の玄米を予め遠心粉碎機で粉碎した玄米粉)を、浸漬溶媒にはアセトンを用いた。粉体攪拌用フラスコにアセトンを690 mLとり、これに添加農薬混合標準溶液A(ダイアジノン7.2 µg/mL、クロルピリホスおよびマラチオン3.0 µg/mL、フェントロチオン14.4 µg/mL、アセトン溶液)10 mLを正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で5分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準溶液Aを調製した。これに、玄米600 gを量り入れ、同様に5分間回転混合した後、室温で遮光下24時間静置による浸漬を行った。浸漬後、浸漬溶媒を留去し、内容物をテフロンシート上に移し、厚さが均一になるように広げ、室温下で5日間乾燥した。得られた乾燥試料全てをロッキング・ミキ

サー用混合容器 (10 L 容) に移し、ロッキング・ミキサーを用いて回転・揺動混合し、試料 A とした (溶媒留去後理論値: ダイアジノン 0.12 µg/g、クロルピリホスおよびマラチオン 0.050 µg/g、フェニトロチオン 0.24 µg/g)。また、添加用農薬混合標準液 B (ダイアジノン 3.0 µg/mL、クロルピリホスおよびマラチオン 7.2 µg/mL、フェニトロチオン 6.0 µg/mL、アセトン溶液) 10 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、室温下、常圧で 5 分間回転混合し、予め均質な浸漬用農薬混合標準溶液 B を調製した。以下、試料 A と同様に操作し、作製した試料を試料 B とした (溶媒留去後理論値: ダイアジノン 0.050 µg/g、クロルピリホスおよびマラチオン 0.12 µg/g、フェニトロチオン 0.10 µg/g)。作製した試料 A および B をそれぞれ分注し、配付試料とした。

## 2) 調査試料の品質評価

作製した試料 A および B それぞれについて、均質性 (作製直後) および安定性確認試験 (検査機関からのデータ回収後) を実施した。試験は、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」(農産物)(厚生労働省)を準用し、主として個別試験法 (GC-FPD) を、また参考として一斉試験法 (GC/MS) を用いて行った。分析試料は 10 容器とし、作製した調査試料全体から代表となるように、作製数量を「10」で除し、おおよそ得られた数の倍数ずつ系統的に抽出した。均質性の確認は、Journal of AOAC International, Vol. 76, No. 4, 926-940 (1993) の方法に従い、一元配置分散分析 (F 検定) により評価した (Microsoft

Excel 2010)。また、安定性の確認は、均質性確認試験と同様の試験操作を行い、均質性確認試験で得られた平均濃度に対する割合 (%) で評価した。個別試験法で用いた試料溶液の調製方法は以下のとおりである。試料 10.0 g (1 容器につき、n=2) を量り採り、水 20 mL を加え 2 時間膨潤させた後、オムニミキサーを用い、アセトン 100 mL で 1 回、更に 50 mL で 2 回抽出した。抽出液を合わせ、40 °C 以下でアセトンを留去した。濃縮物に飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL を合わせ、これにヘキサン 100 mL を加え振とうした。ヘキサン層をとり、残った水層に酢酸エチル/ヘキサン (1:4) 100 mL を加え振とう後、酢酸エチル/ヘキサン (1:4) 層を先のヘキサン層に合わせた。さらに、上記の操作を 2 回繰り返した。得られた溶液に適量の硫酸ナトリウム (無水) を加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置後、ろ過し、得られたる液を 40 °C 以下で酢酸エチル/ヘキサンを留去した。残留物をアセトニトリル飽和ヘキサン 30 mL に溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて振とうした。アセトニトリル層をとり、残ったヘキサン層にヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、さらに上記の操作を 2 回繰り返し、アセトニトリル層を合わせた後、アセトニトリルを留去した。残留物にヘキサンを加え正確に 10 mL とし、試料溶液とした。また、定量はマトリックス非添加・絶対検量線により行った。別に、調査試料の作製に用いた試料基材 (ブランク試料) を試料溶液の調製と同様に操作して、ブランク試料溶液とした (試料 A および B について各 n=1)。試料溶液と同様に測定し、得ら

れたクロマトグラム上に添加農薬の測定に影響を及ぼす妨害ピーク等がないことを確認した。

### 3) パイロットスタディ (室間共同試験)

残留農薬検査のパイロットスタディとして本研究の研究分担協力機関である公的機関 16 機関を対象にパイロットスタディ (以下、室間共同試験) を実施した。参加機関には試料 A および B を 1 個ずつ配付した。試料処理および測定操作は各機関の方法で実施することとし、併行分析数を 5 とした。また、結果報告書、経過記録書およびアンケートを送付し、回収した。

### 4) データの解析

解析は当財団が実施している食品衛生外部精度管理調査で採用している以下に述べる従来方式による手法を主に、参考として、ロバスト方式、Horwitz 式および棄却検定による解析を行った。また、経過記録書およびアンケートについてもとりまとめ、解析を行った。

従来方式 (算術平均値および標準偏差を用いた評価方法) : 各機関よりデータを回収後、データ・クリーニング (添加量の 1/10 以下および 10 倍以上の報告値を除外) を行い、この範囲外となる機関および欠測値のある報告値 (5 個未満) の機関については、その機関の報告値全てを以後の解析対象から除外した。次いで各機関間および機関内の変動を参加機関の回収率 (機関別平均値を添加濃度で除した百分率、%) および併行相対標準偏差 ( $RSDr$ , %) で観察した後、機関別平均値について、基本統計量、順序統計量および正規確率プロットを作成することによりデータ分布を把握した。分布に極端な歪みや尖りが観察

された場合には、2 シグマ (総平均値  $\pm 2 \times$  標準偏差) 以上の値を報告した機関を除外した後、同様の処理を行うこととした (以下、2 シグマ処理)。最終的に各機関の  $z$  - スコア、回収率 (%) および併行相対標準偏差 ( $RSDr$ , %) に基づいて各検査機関の解析を行った。なお、回収率 (%) および併行相対標準偏差 ( $RSDr$ , %) は「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」(平成 22 年 12 月 24 日、食安発 1224 第 2 号、以下、妥当性評価ガイドライン) の評価基準を参考にして評価した。 $z$  - スコアは、機関別平均値の平均値を求めてそれを付与値としてみなし、この平均値と室間再現相対標準偏差 ( $RSDR$ , %) を用いて算出し、「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」(別添) 精度管理の一般ガイドライン (衛食第 117 号、平成 9 年 4 月 1 日) の評価基準に基づき評価した。

ロバスト方式 (Huber ' s H15 のロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いた評価方法) : 従来方式で得られた解析対象データについて The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories の recommendation に従い、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。その後、有効データについて得られたロバスト平均値を付与値としてみなし、この平均値とロバスト標準偏差を用いて  $z$  - スコアを算出した。

Horwitz 式 (Huber ' s H15 ロバスト平均値および Horwitz 式から算出した標準偏差を用いた評価方法) : 本調査研究では

Horwitz 式の Thompson による修正式 (以下、Horwitz の修正式) を参考として当該調査試料濃度における室間再現相対標準偏差の予測値である *PRSDR* (%) を算出し、これらとロバスト方式で得られたロバスト平均値から *z* - スコアを算出した。また、「Guidelines on Analytical Terminology」(Codex, CAC/GL 72-2009、以下、CAC/GL 72-2009) を参考に、室間共同試験から得られた室間再現相対標準偏差 (*RSDR*, %) と室間再現相対標準偏差の予測値 (*PRSDR*, %) の比である HorRat (*R*) および各参加機関の併行分析から得られた併行相対標準偏差 (*RSDr*, %) と室間再現相対標準偏差の予測値 (*PRSDR*, %) の比である HorRat (*r*) を算出した。

棄却検定: Cochran 検定と Grubbs 検定による棄却検定を行った。

### 3.2 アレルギー物質技能試験プログラムのパイロットスタディ:

#### 1) 基材

基材としてはかぼちゃペースト(ミクロペースト®(野菜ペースト)、新進)、ベビーフード(ハッピーレシピ 白身魚と野菜の雑炊、キューピー)、冷凍カスタードクリーム(以下カスタードクリーム、ADEKA AA)、井村屋謹製こしあん(以下こしあん、井村屋)を用いた。かぼちゃペーストとベビーフードについては ELISA 法を用いて卵、小麦、そばのいずれも検出されないことを確認した。カスタードクリーム、こしあんでは ELISA 法を用いてそばが検出されないことを確認した。

#### 2) 各種添加溶液の調製

##### 2)-1 添加用卵タンパク質の調製

鶏卵加工品として市販されている乾燥全卵粉末、乾燥全卵 No.1(キューピータマゴ)を注射用水(光製薬)で希釈し、添加用卵タンパク質調製液とした。

##### 2)-2 添加用小麦タンパク質の調製

日清 全粒粉お菓子・料理用(以下料理用小麦)またはパン用(以下パン用小麦)(日清フーズ)を 1g/50-mL チューブに分取し、0.6% SDS 及び 0.1 M 亜硫酸ナトリウムを含有する 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6) を 20 mL/チューブ添加後、室温で 1 晩振盪した。懸濁液は遠心(10,000 × g, 30 min)し、上清を 0.8 μm のフィルターでろ過し、添加用小麦タンパク質調製液とした。

##### 2)-3 添加用そばタンパク質の調製

そば粉(中国産、マルサンパントリー)を 1g/50-mL チューブに分取し、0.6% SDS、0.1 M 亜硫酸ナトリウムおよび 0.5 M NaCl を含有する 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)(以下 NaCl 含有緩衝液)または 0.6% SDS、0.1 M 亜硫酸ナトリウムを含有する 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)(以下 NaCl 不含有緩衝液)を 20 mL/チューブ添加後、室温で 1 晩振盪した。懸濁液は遠心(10,000 × g, 30 min)後、上清を 0.8 μm のフィルターでろ過し、添加用そばタンパク質調製液(NaCl 含有または不含有)とした。

#### 3) 試料調製

##### 3)-1 外部精度管理調査試料の調製

外部精度管理調査で配布の卵タンパク質添加試料をかぼちゃペーストおよびベビーフードを基材として作製した。各基材に添加用卵タンパク質調製液をそれぞれ 8 μg/g となるように加え、ロボ・クープブリクサー5 プラス(エフ・エム・アイ)で均質化することで試料を作製した(約 2

kg)。それぞれの試料はいずれも約 10 g ずつ分注し、-20 で凍結保存した。ベビーフード試料を試料 1、かぼちゃペースト試料を試料 2 とした。均質性および安定性はこれらの試料を用いて確認を行った。

### 3)-2 試料検討用サンプルの調製 (小麦)

小麦粉抽出液を用いた試料検討用サンプルの調製は初期検討用とスモールスケールの調製を行い、各基材に添加用卵タンパク質調製液をそれぞれ 8 µg/g となるように加え、フードプロセッサー (MK-K58、National) で均質化し、試料とした。それぞれの試料はいずれも約 10 g ずつ分注し、-20 で凍結保存した。

### 3)-3 試料検討用サンプルの調製 (そば)

コントロールとして精製水にそば粉から調製した添加用調製液を加えたものを使用した。基材としてこしあん、カスタードクリーム、かぼちゃペースト及びベビーフードを用いた。こしあんには 10%の精製水を加え、十分に混和したものを使用した。

## 4) ELISA キット

特定原材料である、卵タンパク質、小麦タンパク質及びそばタンパク質の検出は、「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(参考)」(平成 26 年 3 月 26 日消費者庁食品表示企画課通知)に従い、日本ハム、森永、プリマハム ELISA キットをそれぞれ使用した。

## 5) 外部精度管理調査試料の均質性および安定性

外部精度管理調査使用は作製後、均質性および安定性の確認を行った。均質性の確認は、試料の作製後、各基材につき、10 容器から n=1 でサンプリングして、ELISA

法による卵タンパク質濃度の測定を行った。平均値、標準偏差、変動係数を算出した後、測定値の平均から算出した添加量に対する各キットで測定された卵タンパク質の含有量(以下含有量)および含有率を求め、均質であるかどうかを判断した。

また、安定性は、作製後に行った均質性試験の結果を 0 ヶ月、100%として作製後 1 ヶ月、2.5 ヶ月及び 5 ヶ月の 3 回試料を測定し、0 ヶ月における濃度に対する割合として安定性を算出した。0 ヶ月(含均質性試験)以外では、各基材につき、4 容器から n=1 でサンプリングして、ELISA 法による卵タンパク質濃度の測定を行った。測定には均質性、安定性ともモリナガキット、日本ハムキットおよびプリマハムキットの 3 種類の ELISA キットを使用した。

吸光度測定および濃度計算にはマイクロプレートリーダー EL 808IU および計算ソフトウェア DeltaSoft JV Ver.1.80 (Bio-Tek Instruments, Inc.) を使用した。

## 6) 外部精度管理調査の実施

外部精度管理調査には 43 機関が参加した。測定には、各機関、消費者庁食品表示課事務連絡「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(参考)」に記載されている卵測定用キット 3 種(モリナガキット、日本ハムキット、プリマハムキット)のうち、任意の 2 種類を使用した。測定法は測定キットのプロトコール通り、サンプリング数は 1 試料につき 2 抽出、ELISA 測定は 1 抽出につき 3 ウェル併行とした。

## 7) 外部精度管理調査結果の解析

参加機関から提出された測定値は、消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品

の検査方法について」の別紙5「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」の「4. 特定原材料検知法開発者が公表すべき検査方法の性能とその範囲に関する提言」に「免疫化学反応に基づく定量法では、用いる抗体により定量値が異なることが予想される」との記載より、試料別、測定キット別に集計した。

### 3.3 スプレードライヤを用いた新規技能試験用試料の作製検討：

#### 1) 試料の作製

試料基材には市販の米粉(日本製粉)を用い、20%懸濁溶液を作製した。すなわち、米粉1kgを2.5mg/Lカドミウムおよび2.5mg/L鉛溶液4Lに懸濁させた(米粉の理論作製濃度：10 $\mu$ g/g)。また、低濃度として、理論作製濃度0.5 $\mu$ g/gの米粉も懸濁させ調製した。これをスプレードライヤに供した。

#### 2) 試料溶液の調製

##### 2)-1 カドミウムおよび鉛 10 $\mu$ g/g 添加試料およびカドミウム 0.5 $\mu$ g/g 添加試料

試料を精密に量り取り、硝酸を用いた湿式分解法により分解を行った。分解後、0.1mol/L硝酸溶液を加えて残留物を溶解し、更に0.1mol/L硝酸溶液を加えて全量を一定容量とし試料溶液とした。なお、各元素の添加濃度により、適宜0.1mol/L硝酸溶液で希釈した。

##### 2)-2 鉛 0.5 $\mu$ g/g 添加試料

試料をPFA製耐圧容器に精密に量り取り、硝酸を用いたマイクロ波湿式分解法により、出力500W(積算処理時間：5分)あるいは700W(積算処理時間：20分)の組み合わせにより分解を行った。分解後、

0.01mol/L硝酸溶液を加えて残留物を溶解し、更に0.01mol/L硝酸溶液を加えて全量を一定容量とし試料溶液とした。

#### 3) スプレードライヤによる米粉試料作製条件の検討

作製に用いたスプレードライヤは大川原化工機株式会社製研究開発用スプレードライヤL-8iを用いた。米粉懸濁溶液は事前に攪拌し、均一な懸濁溶液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに2kg/hで送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクはMC-50型を使用した。回転数(20000rpm~12000rpm)、入り口温度(180~220)、出口温度(100~110)で作製条件を検討し、得られた米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラックMT3200を用い平均粒子径を測定した。また、得られた米粉は原子吸光光度計でカドミウムおよび鉛含量を測定し、その米粉中の金属の分布の物性を検討した。なお、Lot.1は回転数20,000rpm、入り温度180、出口温度100、Lot.2は回転数12,000rpm、入り口温度180、出口温度100、Lot.3は回転数12,000rpm、入り口温度220、出口温度110とした。

#### 4) 米粉試料の物性評価

米粉の表面および内部の構造解析を行い、カドミウムと鉛の分布状態を可視化した。すなわち、飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)を用い検討した。作製した米粉(理論値：10 $\mu$ g/g)では、検出感度が足りないため理論値として1.0%米粉(カドミウムおよび鉛)を作製し、評価に用いた。

#### 4 新規技能試験プログラムの開発及び統計学的評価に関する研究（松田研究分担）

##### 1) 二枚貝中オカダ酸群分析技能試験のパイロットスタディ

###### 1)-1 試料作製

二枚貝中オカダ酸群分析技能試験の試料開発は、本研究の分担課題である「新規技能試験プログラム用試料の開発に関する研究」により行われた。ホタテガイむき身（全体）5kg にオカダ酸（和光純薬株式会社製（code-158-03273））1,000 µg を添加し、サイレントカッターを用いて粉碎・均質化処理を行った。均質化した試料を平3号缶に約85g ずつ小分けし、ミニシーマMS4X（木村エンジニアリング株式会社製）を用いて製缶した。

###### 1)-2 試料の均質性及び安定性の確認

作製した試料からランダムに10缶を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、2試験試料を採取し、オカダ酸濃度を測定した。さらに、試料作製2か月後に3缶のオカダ酸濃度を測定した。分析は一般社団法人青森県薬剤師会衛生検査センターで実施した。測定溶液作製は、試料2g から90%メタノールでオカダ酸を抽出し、2.5 M 水酸化ナトリウムを加え76℃で加水分解した。加水分解後の溶液をODSカートリッジカラムにより精製し、LC-MS/MSにより定量した。

###### 1)-3 パイロットスタディ

国内の試験所から参加者を募集し、二枚貝中オカダ酸分析技能試験のパイロットスタディを実施した。参加試験所にはそれぞれ試料1個を、冷蔵宅配便により送付した。また、希望する試験所にはオカダ酸及びジノフィシストキシン-Iの標準品を送付した。

分析回数は1回とした。同時に使用した分析法の概略も報告することとした。

##### 2) 実際に動物薬を投与した畜肉を試料として用いる技能試験のための分析法の確立

###### 2)-1 技能試験の対象とする化合物の選定

技能試験のための基材として検査数の多いブタ肉を選択した。ブタに投与する動物用医薬品として、使用頻度の高いセフトオフル及びエンロフロキサシンを選択した。

###### 2)-2 セフトオフル分析法

測定には高速液体クロマトグラフは島津製作所製Nexera X2を、質量分析計はSCIEX製SCIEX TQ-6500を使用した。試料はデスフロイル化を行った。すなわち、試料5.00g にジチオエリスリトール・ホウ酸緩衝液70 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行い、上澄液3 mLを採取し、50℃の水浴中で15分間振とうした。ヨウ化アセトアミド・リン酸緩衝液0.6 mLを加え、振り混ぜた後、室温で30分間静置後、4℃に冷却し、毎分3,000回転で10分間遠心分離を行い、上澄液を4℃とした。試料の精製は以下に示す。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにメタノール5 mL及びリン酸緩衝液(pH7)5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに(a)デスフロイル化で得られた溶液を注入した後、リン酸緩衝液(pH7)5 mLおよび水5 mLを注入し流出液は捨てた。次いで、メタノール及び水の混液(2:8)5 mLを注入し、流出液を採取し、メタノール及び水の混液(2:8)を加えて10 mLに定容し試験溶液とした。検量線用溶液作製は、各濃度のセフトオフル標準液を0.2 mL採取し、ジエリスリトール・ホウ酸緩衝液3 mLを加え、50℃の水浴中で15分間振とうした後、

試料溶液の調製法に従って、デスフロイル化および精製を行い、検量線作成用標準溶液 1- 100 ng/mL を作製した。

## 2)-3 エンロフロキサシン分析法

測定にはセフチオフルと同様の装置を用い、試験溶液の調製には、試料 5.00 g を量り、添加用内部標準溶液 0.25 mL を添加した後、アセトニトリル 20 mL、アセトニトリル飽和ヘキサン 20 mL、無水硫酸ナトリウム 10 g を加え、ホモジナイズした。これを毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採取した。得られた有機層からアセトニトリル層を分取した。遠心分離した沈殿物に残った n-ヘキサン層を加え、さらにアセトニトリル 20 mL を加えて激しく振り混ぜた後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採取した。得られた有機層からアセトニトリル層を分取し先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルで 50 mL に定容した。定容した溶液 0.25 mL に蒸留水を加えて 1 mL とし、アセトニトリル飽和ヘキサン 0.5 mL を積層して振り混ぜた後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。アセトニトリル-水層を試験溶液とした。

## 2)-4 分析法の性能確認

セフチオフル分析法については、豚肉試料 5 g にセフチオフル標準溶液 10 µg/mL を 0.5 mL (1 µg/g 相当) 添加し、2 回併行分析を 5 日間実施した。エンロフロキサシン分析法については、豚肉試料 5 g にエンロフロキサシン標準溶液 10 µg/mL 及びシプロフロキサシン標準溶液 10 µg/mL をそれぞれ 0.5 mL (1 µg/g 相当) 添加し、2 回併行分析を 5 日間実施した。

## 5 新規技能試験プログラム用試料の開発に関する研究 (井部研究分担)

### 1) 二枚貝中オカダ酸群分析技能試験のパイロットスタディに供する試料開発

#### 1)-1 試料作製

技能試験に供する試料に求められる要件は、均質性に加えて長期の安定性、望ましくは常温での保管・管理が可能な事である。従って、本研究では少なくとも 1 年間常温で保管できる試料の開発を行った。オカダ酸の熱安定性試験として、高圧化におけるオカダ酸の熱安定性を確認するために、121 で 5 分、10 分、15 分間加熱を行い加熱履歴によってオカダ酸がどのような挙動を示すのか、確認を行った。オカダ酸群により自然汚染した貝の入手が困難であったため、試料の作製には市販されているホタテガイむき身 (全体) とオカダ酸 (和光純薬工業株式会社製 (code No. 158-03273)) を用いた。冷凍状態のホタテガイむき身 1059.7g をサイレントカッター (KILIA 社製) にて粗く粉碎し、そこにあらかじめ 1 mL のメタノールに溶解したオカダ酸 200 µg を添加し、サイレントカッターを用いて均質化処理を行った。均質化した試料を平 3 号缶に約 85g ずつ小分けし、ミニシーマ MS4S (木村エンジニアリング株式会社製) を用いて製缶した。製缶した缶詰を熱水循環式レトルト殺菌装置 UHR-W70 (藤森工業株式会社製) を用いて、121 で 5 分、10 分、15 分間加熱殺菌を行った。試料中のオカダ酸の測定は、5 分、10 分、15 分間それぞれの加熱時間で 2 缶ずつオカダ酸濃度を LC-MS/MS で測定した。

#### 1)-2 パイロットスタディ用試料の作製

均質性評価、安定性評価、パイロットス

タディ 3 つの用途に用いるため試料の作製は 40 缶を目途とした。予備検討の結果より、加熱時間は 15 分間とした。予備試験用試料と同様に試料の作製には市販されているホタテガイむき身（全体）とオカダ酸（和光純薬工業株式会社製（code No. 158-03273））を用いた。冷凍状態のホタテガイむき身 5167.0g をサイレントカッター（KILIA 社製）にて粗く粉碎し、そこにあらかじめ 5 mL のメタノールに溶解したオカダ酸 1000 □g を添加し、サイレントカッターを用いて均質化処理を行った。均質化した試料を平 3 号缶に約 85g ずつ小分けし、ミニシーマ MS4S（木村エンジニアリング株式会社製）を用いて製缶した。製缶した缶詰をレトルト殺菌装置 UHR-W70（藤森工業株式会社製）を用いて、121 で 15 分間加熱殺菌を行った。得られた試料は 50 缶であった。試料の均質性の確認は、本研究の分担課題である「新規技能試験プログラムの開発及び統計学的評価に関する研究」により行われた。均質性評価は、作製した 50 缶の試料からランダムに 10 缶を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、2 試験試料を採取し、オカダ酸濃度を測定した。安定性試験は、試料作製 1 か月後、3 か月後に 2 缶のオカダ酸濃度を測定し、経時的な変化がないか確認を行った。

## 2) 実際に動物薬を投与した畜肉を試料として用いる技能試験のための試料開発

### 2)-1 動物用医薬品により汚染された豚肉試料の作製

豚の飼育、屠殺は茨城県内の契約農場へ委託した。投与する動物用医薬品は、通常の飼育に用いているエンロフロキサシン製剤およびセフチオフル製剤とした。豚へ

のエンロフロキサシンの投与用量、用法は体重 1kg に 2.5~5.0 mg、頸部の筋肉内に注射すると定められているので、今回は約 100 kg の豚に対して 300 mg の量を頸部筋肉中に注射した。セフチオフルに関しては投与用量、用法は体重 1kg に 1~3 mg、頸部の筋肉内に注射すると定められているので、今回は約 100 kg の豚に対して 200 mg の量を頸部筋肉中に注射した。エンロフロキサシンとセフチオフルは 1 頭の個体に対して同時に投与した。薬剤投与からの時間が異なる 2 つの区で試験を実施した。投与から屠殺までの時間が約 24 時間の区を試験区 1、約 6 時間の区を試験区 2 とした。研究用に薬剤を投与した豚は休薬期間を遵守せず屠畜をするので、肉が市場に出回らないよう屠畜場の通常作業が全て終了した後屠畜し、屠体には識別用の札を付し、二頭とも全量を買上げた。

### 2)-2 投与した動物用医薬品の各部位への分布および残留量の確認

薬剤投与からの適切な経過時間を検討するために、薬剤投与の 6 時間後に屠殺した試験区 2 の半身から、ウデ、ロース、モモを切り出した。切り出した 3 つの部位から約 200g のサンプリングを 2 ヶ所行い、動物用医薬品の測定を行った。測定対象項目はエンロフロキサシン、セフチオフルとし、それぞれの代謝物は含めなかった。測定は、公定法である「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 第 2 章 HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法（畜水産物）」に準じた。

### 2)-3 薬剤投与から屠殺までの経過時間および試料の粉碎処理による動物用医薬品の残留確認

先の筋肉中の分布を確認した試験において、ウデ、ロース、モモへの局在は確認されなかったため、筋繊維が複雑ではないロースを用いて薬剤投与からの経過時間および粉碎処理による薬剤の残留確認を行った。薬剤投与の24時間後に屠殺した試験区1の半身、6時間後に屠殺した試験区2の半身から、ロース肉を切り出し、切り出したロース肉を20等分し、奇数の10試料は粉碎せずにそのまま1試料あたり2試験試料採取し動物用医薬品の測定に、偶数はサイレントカッター（KILIA社製）を用いて3分間粉碎したものを10個に小分けしたものを試料とした。試験の総数は、薬剤投与から屠殺までの時間が異なる2つの区、試料粉碎の有り無しの2種と計4つの区分において10試料2試験の80試験を実施した。

#### C.D. 研究結果および考察

##### 1 渡邊研究分担

###### 1) ガイドライン案が整合すべき文書

ISO/IEC 17025は、試験・校正機関がその能力を示すために満たすべき必要事項を一般的な内容としてまとめた文書である。様々な産業における試験・校正において重要な役割を担っており、分析結果の品質保証等の分野においても活用されている。食品分析の分野においても、輸出入時検査を実施する試験所が満たすべき能力への要求を示したCodexガイドライン（CAC/GL 27）において中心的な役割を担うなど、ISO/IEC 17025は、試験所の能力（試験所が必要とされる能力を有することを証明するための取組）に関する国際整合の

基礎とされている。ISO/IEC 17025に準拠していない試験所から得られた分析結果では、係争解決の手続きを進めることすらできない。各国政府系の試験所がISO/IEC 17025に基づく認定取得を進めている点からも、ガイドライン案は、本文書への整合を基本として開発されるべきと考えた。

##### 2) ガイドライン案のスコープ

ISO/IEC 17025には、試験・校正機関がその能力を示すために満たすべき必要事項が、一般的な内容としてまとめられている。あくまで一般的な内容としてまとめられているため、ガイドライン案によって求められるべき能力の特定と具体化のために、スコープを明確にする必要があった。試験所の活動は、検査に限定されていない。一方で、法に関連する文書となるガイドライン案は、業務管理要領の改訂案であることから、その対象は、法に基づく検査である。しかし、一般的な認識も含め、検査という用語が様々に解釈されている現状がある。ガイドライン案に沿って試験所が取組を行う際に誤解を生まないようにするためにも、はじめに、検査を以下のように定義した。「検査とは、ロットから試料をサンプリング（採取）し、サンプリングした試料を分析し、得られた分析結果を食品成分規格の値と照らして適合若しくは不適合の判定を下すまでの一連の行為をいう」このように定義される検査あるいは、判定を除いたサンプリングと分析を実施する施設（施設を運営する組織）として、現在の業務

管理要領は、その対象を登録検査機関と食品衛生検査施設とに分け、2通の通知によって示されている。上記した2つの形態の施設を試験所と定義し、ガイドライン案の対象とした。

### 3) ガイドライン案の構造

現在の業務管理要領に示された細則や具体的事項は、試験所が自らの取組を決める上での参考とされることを意図し、ガイドライン案の別添とした。従って、ガイドライン案は大きく、本文と別添からなる構造をもつ。そのほか、必要事項の正確な理解に不可欠であることから、国際整合に留意し、用語の定義を示した。また、開発の途中であるが、品質保証の実践に係る、内部品質管理と技能試験への取組かたについても次年度以降、まとめる予定である。

### 4) ガイドライン案に含まれる新たな要素

ガイドライン案では、試験所あるいはそれが属する組織におけるマネジメントシステムの構築とマネジメントレビューが必要事項として新たに加えられた。これらは現行の業務管理要領には含まれていない要素であり、大きな変更となる。現行の業務管理要領が基礎とするGuide 25の策定当時は、以後マネジメントシステムと呼ばれるようになった概念の形成とそれに付随する必要事項の特定が未成熟であった。そのため業務管理要領にマネジメントシステムに関連する事項は含まれていないに等しい。本研究では、Guide 25 にマネジメントシステム規格であるISO 9001の要

素を加えて発行されたISO/IEC 17025に整合する内容でガイドライン案の開発を検討した。マネジメントシステムの構築とマネジメントレビューを必要事項としたことは、その結果として生じた当然の変化である。また、マネジメントシステムの構築にも不可欠であることから、中心的な役割を果たすトップマネジメントに明確に言及した。さらに法あるいは施行規則にある名称を活用し、マネジメント要員となる検査部門責任者、検査区分責任者、信頼性確保部門責任者の権限と責任、また関係を明らかにした。前項の「ガイドライン案の構造」においても言及したとおり、細則や具体的事項を示しそこからの逸脱がないことを主として求めるのではなく、試験所が自ら取組を決め、従い、見直し、必要に応じて改善するための総合的な能力を求めるといふ、根底となる考え方の変更も新たな要素である。

### 5) ガイドライン案の開発に伴うその他の考察

#### 5)-1 ISO/IEC17025認定の取得とガイドライン案に沿った取組との連続性

ISO/IEC 17025に基づく認定は、試験所全体の取組に対してされるのではなく、分析法(分析原理)と分析対象の組み合わせごとにされる。分析依頼者が試験所の能力を推測する際の目安になることや、認定取得機関間での分析結果の相互利用が可能になることなど、認定により得られる利点は多い。しかし、認定が限定された範囲に

されることを正確に理解すれば、ある特定の範囲において取得された認定が、試験所が実施する検査に係る取組全ての証明とはならないことが容易に理解できる。そのため、その試験所が実施する検査の全てに適切な取組を求めるのであれば、認定ではなくガイドライン案に沿った取組を求めることが妥当であると考えられる。もちろん、取組の結果として認定が取得されることには矛盾がなくむしろ、推奨されるべき事でもある。そのため、ガイドライン案に沿った取組と認定取得とが齟齬なく、効率的、効果的に連続可能な状態にあることが望ましい。ガイドライン案ではこの連続性についても配慮した。

#### 5)-2 ガイドライン案に沿った試験所であることを明確にすることの効果

国がガイドライン案に沿った取組を通じてISO/IEC 17025への準拠を試験所に求めていることを明確にすることにも大きな効果が期待される。具体的な方法としては、ガイドライン案において「本ガイドライン案はISO/IEC 17025を基礎とし、食品衛生法に基づく検査の目的に応じて作成された」と宣言することが考えられる。このように宣言することで、第一に、取組に対する試験所の理解や意識付けが明確になるという効果が期待される。第二に、下記する、試験所により実施される取組の適正の程度が適切に評価されることと対をなすことで、試験所の能力が客観的に評価され、輸出入時における輸入(輸出)先国を

含む検査の関係者から、試験所の能力に関する疑義が呈される可能性が低くなる効果が期待される。試験所により実施される取組の適正の程度は、第一に組織内で実施する内部監査(信頼性確保部門による査察)によって、第二に外部監査(外部の第三者機関による査察)によって評価され、必要な場合には改善が求められることになる。登録検査機関については、登録を所掌とする外部機関(厚生労働省の部局)による適切な査察により、認定に相当する評価がされていることも、国として積極的に説明すべきであろう。食品衛生検査施設については、外部機関による査察に相当する評価は行われませんが、内部監査員の養成に国が協力し資格を与えるなどして、可能な限り客観性を高めた、査察あるいは認定に相当する評価が行われるよう、その仕組みについて今後検討する必要があるだろう。

#### 5)-3 ガイドライン案を実効させる上での法、特に施行規則との整合

ガイドライン案が対象とする試験所のうち登録検査機関に対しては、適合条件の他にも法により様々な規定が設けられている。また、ガイドライン案における必要事項に関連する事項が、施行規則により規定されている。一方の食品衛生検査施設に対しては、施行規則により具備すべき施設や設備が規定されている。また同じく施行規則により、登録検査機関と同様に各種規定が示されている。ガイドライン案においては、ISO/IEC 17025に整合させるため、

試験所がその活動を自らマネジメントするとともに、具体的な取組もまた自ら決定し、管理し、見直し、必要に応じて改善する能力を持つことを必要事項としている。

#### 5)-4 施行規則において使用される用語の国際的に定義された用語からの乖離

現在の施行規則では、国際的に整合しない用語が使用されている。例えば、「内部点検」、「精度管理」、「外部精度管理調査」が該当する。ガイドライン案では、ISO/IEC 17025に該当する項目がないことを主たる理由とし、また試験所に求められる取組を明確化するためにも「内部点検」を削除し、代わりに「内部監査」を必要事項の1つとした。また「外部精度管理調査」の用語は「技能試験」に置き換えた。ガイドライン案では、用語も国際的に整合させたため、施行規則中で使用されている用語との間で乖離が生じている。この乖離を原因とする混乱をさけ、試験所が確実な用語認識に基づき国際領域からの知識も入手し、自らが実施すべき取組への理解をさらに深め能力を向上させるためにも、施行規則中で使用される用語は修正されるべきと考えらる。

#### 5)-5 施行規則の改正に関する提言

現在の業務管理要領と施行規則との関連を考察する過程において、1つの課題が明らかとなった。業務管理要領は、施行規則の第37条に関する具体的事項あるいは第40条により言及されるその他業務の細則を定めることを意図した文書であると

考えられる。また、施行規則は、その内容から、Guide 25に基づいていると考えられる。法の第35条は、「登録検査機関は、公正に、かつ、厚生労働省令で定める技術上の基準に適合する方法により製品検査を行わなければならない」としており、施行規則に基づく、すなわちGuide 25に基づく試験所の取組を命じている。従って、法により国際的に整合した取組を試験所に命じるためには業務管理要領だけではなく、施行規則の改正が必要と考える。

#### 5)-6 試験所が実施する取組の適正の評価と改善のための指示

ガイドライン案に沿って、各試験所はその活動に応じた取組を自ら決定するとともに実施し、管理し、見直すことになる。この一連の取組が適正であることが確認され、適正でない場合には適切な修正が指示され、その指示に基づく改善がされて初めて、試験所の能力が向上し、国際的に整合し認められる水準に達する。達した水準を少なくとも維持するためには、上記の継続が不可欠である。試験所の取組とその適正の確認、必要に応じた改善と継続のための仕組みとしては、ガイドライン案があるだけではなく、先に言及した通り、そこに示された内部監査が効果的に機能するように人員を養成することまた、登録検査機関に対しては外部機関が監査を実施することが必要となるだろう。ガイドライン案に沿った試験所による適正な取組とその監査が揃って一組となり、国全体として国際的に整合した、すなわち国際的に通用する試験所の管理がされた状態を達成することができる。

## 2 石井研究分担

### 1) ISO/IEC 17025に準拠した取組みの品質保証への影響の検討

#### 1)-1 研修会及び講習会の開催

第1回目の研修会は研究協力機関17機関を対象に平成29年10月2日、東京都健康安全研究センターにおいて(一財)日本食品分析センター山田明子氏を講師として「ISO/IEC 17025規格解説」と題し、実施した。研究協力機関17機関36名が参加した。研修内容は主にISO/IEC 17025の2017年改正前の内容について、規格の背景や狙いを確認することによって、規格要求事項への理解を深め、試験所のあり方、管理体制の整備、技術力の整備等について理解を深めた。

第2回目の研修会は、平成30年1月12日、埼玉県衛生研究所と協力し、研究協力者を含む関東甲信静ブロックの自治体職員を対象として、同所においてISO/IEC 17025の認証を取得し、国際的な取組みを行っている農林水産消費安全技術センター有害物質等分析調査統括チーム チーム長原弘幸氏を講師として、「信頼性の高い試験結果を提供するために～ISO/IEC 17025に基づく品質保証について～」と題し、実施した。研究協力機関10機関17名を含む自治体職員84名が参加した。実践的かつ具体的なISO/IEC 17025に基づく取組みについて学習した。

講習会は平成29年11月21日、全国衛生化学技術協議会(奈良県にて開催)の教育講

演に、ISO/IEC 17025 試験所認定制度等について国際的にも著名で経験豊富な東京都市大学平井昭司名誉教授を講師として「試験検査の信頼性確保とISO/IEC 17025」と題し、基礎的な内容から2017年改正の骨子の内容について御講演いただいた。

#### 1)-2 業務管理に関するアンケート調査

23項目のアンケートを行い、回収状況は、調査対象機関83機関のうち77機関から回答が得られた(回答率:92.8%)。今回の調査では内容の整合を図るため、地方衛生研究所全国協議会会員の試験所のみを対象とし、地方自治体の他の食品衛生検査施設(保健所検査室、市場等検査室、食肉衛生検査センター検査室等)については回答に含めないこととした。また、集計については都道府県・独立行政法人(都道府県等)指定都市及び特別区・中核市(特別区等)の3区分に分類し、集計した。

導入を進める上で、以下の5つの課題が班会議等で意見として出され、またその課題を解決する方策について議論した結果を以下に示す。「1)試験所のISO/IEC 17025認定取得について」は、認定取得ではなくISO/IEC 17025を基礎とする改定案に沿った取組みをしていくことが妥当であると考える。「2)信頼性確保部門責任者の研修制度について」は、国主導による研修を受講することによって一定レベル以上のスキルを持つと認める仕組みを作ることが一つの方策と考えられる。「3)技術的な必要事項の実施について」は、技術的必要事

項（方法の妥当性確認と検証、内部品質管理、技能試験及び不確かさの推定と評価等）について、具体的な実施の指針あるいはガイドライン等を国が提示することによって、新たな取組みの導入及び実施に対し、より効果的であり、より実効性のある改定となるものとする。「4）収去部門が行うサンプリングについて」は、検疫所のようなロット全体が把握できる場合を想定した案となっているが、地方自治体の収去検査において、輸入食品あるいは他県で製造、生産され、一度、流通にのった食品のロットサイズを収去現場で把握することは不可能に近い。いずれにしても、改定案に沿ったサンプリングを確実に実施していくこととなれば、今後、各自治体が監視指導計画に基づく検査のあり方や目的を整理することや検疫所と地方自治体での検査の住み分け等の整理が必要になると考えられる。「5）アウトソーシング拡大への懸念」は、アウトソーシングが拡大すると、試験所においては検査に必要な機器の購入、保全や人員の確保、技術の継承が困難になることが容易に予想される。また、今後起こりうる将来の食品に関連する健康危機管理事故、事件に対して、自治体の試験所では対応できなくなる可能性が出てくると危惧される。

## 2) 残留農薬技能試験への参加

実施結果については、分担研究「既存技能試験試料の改善及び新規技能試験プログラムの導入に関する研究」（渡辺卓穂主

任研究員）の報告書に記載。

## 3 渡辺研究分担

### 3.1 残留農薬技能試験プログラムのパイロットスタディ：

#### 1) 調査試料の作製

粉体攪拌用フラスコを用い、混合、浸漬ならびに溶媒留去を行い合計 6 kg 相当の濃度の異なる 2 種の乾燥試料を作製した（試料 A および B）。作製した試料を約 160 g ずつ分取しジッパー付袋に入れ（試料 A：36 袋、試料 B：33 袋）、ヒートシール後冷凍保管（実測値： $-29^{\circ}\text{C}$ ～ $-27^{\circ}\text{C}$ ）した。

#### 2) 調査試料の品質評価

##### 2)-1 調査試料の均質性および安定性

一元配置分散分析による調査試料の均質性の判定は、試料 A および B のいずれの添加農薬においても評価基準である F 値  $< F$  境界値 (3.020)、かつ P-値  $> 0.05$  を満たし、均質であると判断された。また、参加機関からの結果回収後に実施した安定性確認試験では、両調査試料のいずれの添加農薬においても、均質性確認試験で得られた平均濃度に対する割合 (%) が 90.5%～105%であり、当財団の評価基準 80%～120%の範囲内であり調査期間中の安定性にも問題はなかった。また、試料溶液と同様に抽出したブランク試料から得られたクロマトグラムより、作製に用いた基材である玄米は添加農薬の測定に問題がないことを確認した。

#### 3) 室間共同試験

対象とした全 16 機関から結果を回収した。なお 1 機関において、併行分析数 5 個中 1 個について 10 倍高い数値が報告さ

れていたが、回収した測定装置からの出力データから転記ミスと判断し、報告値を当財団で 1/10 の値に修正したものを採用した。

#### 4) データの解析

16 機関から回収した結果について解析を行ったところ、いずれの試料および添加農薬でもデータ・クリーニングおよび欠測値により除外される機関はなかった。

従来方式：データ分布を観察したところ、概ね直線状に分布していると考えられた。また、今回の参加機関は 16 機関と少なく、いずれの試料および添加農薬でも機関別平均値の室間再現相対標準偏差 (*RSDR*, %) は 20%以下であったことから、明らかな異常値は存在しないものと判断し、2シグマ処理はいずれの試料および農薬でも行わなかった。*z*-スコアは、機関別平均値の平均値を付与値としてみなし、この平均値と室間再現相対標準偏差 (*RSDR*, %) を用いて算出した。その結果、試料 A について限界外機関数は、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  は各農薬で 1 機関ずつ該当した。このうち、ダイアジノンおよびフェニトロチオンについては同一機関であった。 $|z\text{-スコア}| \geq 3$  は該当しなかった。試料 B について限界外機関数は、クロルピリホスについて  $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  は 1 機関、その他のいずれの農薬については  $2 \leq |z\text{-スコア}|$  は該当しなかった。

ロバスト方式：ロバスト方式についても従来法と同様に正規確率プロットを作成した。ロバスト方式により解析した結果、試料 B のフェニトロチオンを除くいずれの試料および農薬でも 1~2 機関をメジアン ± メジアン × 50% の範囲を超える報告値に

より除外した。この結果得られたロバスト平均値を付与値としてみなし、この平均値とロバスト標準偏差を用いて *z*-スコアを算出したところ、試料 A について限界外機関数は、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  は各農薬で 1 機関ずつ該当した。そのうち、ダイアジノンとクロルピリホスについては同一機関であった。さらにダイアジノンについては、 $|z\text{-スコア}| \geq 3$  となる機関が 1 機関あり、これはフェニトロチオンについて  $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  となった機関と同一であった。試料 B について、フェニトロチオンでは限界外機関はなかった。 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  は、マラチオンは 1 機関、ダイアジノンは 2 機関が該当した。 $|z\text{-スコア}| \geq 3$  は、クロルピリホスは 1 機関が該当した。そのうち、クロルピリホスについて  $|z\text{-スコア}| \geq 3$  となった機関とダイアジノンで  $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  となった機関は同一であった。Horwitz 式：ロバスト方式で得られたロバスト平均値と Horwitz の修正式による室間再現相対標準偏差の予測値 (*PRSDR*, %) から *z*-スコアを算出した結果、試料 A について限界外機関数は、 $2 \leq |z\text{-スコア}| < 3$  は、ダイアジノンとフェニトロチオンで 1 機関ずつ該当した。 $|z\text{-スコア}| \geq 3$  は、いずれの農薬も該当しなかった。試料 B について、 $2 \leq |z\text{-スコア}|$  となる機関はいずれの農薬も該当しなかった。CAC/GL 72-2009 で採用されている HorRat (*R*) 値による室間再現標準偏差 (*SR*) の結果は、試料 A および B の 4 種農薬いずれも  $0.5 < \text{HorRat} (R) \leq 2$  の規定を満たす妥当な結果であった。また、HorRat (*r*) による各機関の併行標準偏差 (*Sr*)

の結果は、試料 A および B の 4 種農薬いずれも HorRat (r) 1.3 を満たす妥当な結果であった。

棄却検定：Cochran 検定（上側危険率 2.5%）と Grubbs 検定（片側危険率 1.25%）による棄却検定を行った結果、クロルピリホスでは外れ機関はなかったが、ダイアジノンについては、試料 A および B でそれぞれ 2 機関ずつ、マラチオンとフェニトロチオンはそれぞれ試料 A および B で 1 機関ずつ外れ機関が検出された。

### 3.2 アレルギー物質技能試験プログラムのパイロットスタディ：

#### 1) 外部精度管理調査試料の均質性

3 種のキットで測定し、得られた含有量は、添加卵タンパク質量 8  $\mu\text{g/g}$  に対し、試料 1 で 6.6~6.9  $\mu\text{g/g}$ 、試料 2 で 5.9~6.5  $\mu\text{g/g}$  となり、いずれのキットでも試料 1 に比べ試料 2 で低い値を示した。また、含有率および変動係数では、試料 1 は 3 キットとも含有率が 80% 台、変動係数が 0.023~0.033、試料 2 は含有率が 74.3~81.3%、変動係数が 0.026~0.043 とキット間、試料間ともに大きな差は認められなかった。したがって、試料 1、2 ともに均質であり、3 キットのどれを使用しても評価可能であると判断した。

#### 2) 外部精度管理調査試料の安定性

安定性は、作製直後に行った均質性試験の結果を 100% として作製後 1 ヶ月、2.5 ヶ月及び 5 ヶ月の 3 回を行った。その結果、試料 1 および試料 2 の安定性は約 90%~115% の範囲内であった。したがって、今回作製した外部精度管理試料は、調査期間中安定であったと判断した。なお、同じ調製

法により昨年度作製した調査試料では 1.5 年の安定性が得られている。

#### 3) 外部精度管理調査結果（回収データの集計結果）

参加機関の測定値を試料別かつ測定キット別に集計した。モリナガキットは 43 機関が、日本ハムキットは 42 機関が、プリマハムキットは 1 機関が使用した。プリマハムキットは 1 機関のみの使用であったことからキットごとの統計解析は行わなかった。モリナガキット(43 機関)と日本ハムキット(42 機関)のデータを比較すると、測定値の平均は試料 1 ではモリナガキットが  $7.352 \pm 0.510 \mu\text{g/g}$ 、日本ハムキットが  $6.800 \pm 0.483 \mu\text{g/g}$ 、試料 2 ではモリナガキットが  $6.753 \pm 0.514 \mu\text{g/g}$ 、日本ハムキットが  $5.970 \pm 0.450 \mu\text{g/g}$  と両試料ともモリナガキットで高い数値を示したが、測定値の分布形および変動係数では、キット間の相違はほとんど認められなかった。試料間ではモリナガキット、日本ハムキットの両方で試料 1 より試料 2 が低い平均値を示した。また、1 機関のみ行ったプリマハムキットにおいても試料 1 より試料 2 が低い傾向は同じであった。

#### 4) キット別集計結果

##### 4)-1 キットのロットと測定値について

今回の外部精度管理調査研究において、モリナガキットでは 9 ロット、日本ハムキットでは 4 ロットが測定に用いられた。どちらのキットにおいても若干の測定値の変動はあるものの、試料 1、試料 2 ともに明確なロット間差は認められなかった。

##### 4)-2 検量線について

今回の外部精度管理調査研究において、モリナガキットと日本ハムキットでは複

数ロットが使用されていたことから、検量線の反応性についての比較を行った。モリナガキットおよび日本ハムキットの全機関の検量線を比較するとモリナガキットの検量線の方がやや広がっていた。日本ハムキットでは異なる反応性を示す検量線が2機関ほどで認められた。本調査に使用されたキットはすべて使用期限内に用いられた。また、どちらのキットにおいても全体の平均と比較して明らかにロットごとに異なっているような反応は示しておらず、それぞれのキットは試験に供した複数のロットにおいて安定した検量線が得られた。両キットとも検量線は実験時の室温の高低によらず、ほぼ同じ反応を示しており、今回の調査においては室温(20~28程度)の違いによる検量線の反応性に大きな差は認められなかった。

#### 4)-3 測定値の相関性

##### 4)-3-1 同一キットにおける試料間の測定値の相関性

モリナガキットでは相関係数が0.821、日本ハムキットでは0.886といずれも強い相関が認められた。また、モリナガキットでの1機関を除くとすべての機関で試料1の測定値が試料2の測定値を上回っており、機関間の再現性は良好であった。

##### 4)-3-2 同一試料におけるキット間の測定値の相関性

試料1では相関係数が0.315、試料2では0.417であった。試料1では日本ハムキットでの測定値がモリナガキットの測定値を上回っていたのは6機関、試料2では3機関あったが、残りの機関はすべて試料1および試料2でモリナガキットの測定値は日本ハムキットより高い値を示した。

#### 5) 小麦及びそばタンパク質を用いた試料の検討

##### 5)-1 小麦を用いた試料の検討

料理用の全粒粉小麦から抽出した小麦タンパク質をベビーフード及びかぼちゃペーストに添加した試料は再現性良く、外部精度管理調査試料として調製が可能であることが示唆された。今後は均一性、安定性及び、スケールアップを行っての調製について検討が要される。

##### 5)-2 そばを用いた試料の検討

そば粉から直接タンパク質を抽出する際の条件により、ELISA法での検出に影響する可能性が示唆された。外部精度管理調査試料とする場合、3種のキット間での検出力が同程度のものが望まれる。したがって、外部精度管理調査試料としてはさらなる検討が必要と考えられた。

#### 3.3 スプレードライヤを用いた新規技能試験用試料の作製検討：

##### 1) スプレードライヤによる米粉試料作製条件の検討

カドミウム、鉛を含む20%米粉懸濁液(最終作製理論濃度：10 µg/g)5Lを試料とし、スプレードライヤ(機種 L-8i：大川原化工機株式会社)を用い作製検討した。スプレードライヤはディスクの回転数と温度を変化させ、図2に示す3条件で比較を行った。最初に設定した20,000 rpm、180°が最も回収率が高かった。平均粒子径は59 µmであるが、大きな粒子も多数混在していた。回転数を12,000 rpmとすると平均粒子径はあまり変化しなかったが、回収率は低下した。これは回転数を下げたため、大きな粒子ができ、乾燥しないうちチャンバー

内壁に付着したためであった。そこで、乾燥を早めるために温度を 180 から 220 へ上げたが、回収率の改善は認められなかった。しかし、粒度分布はシャープなものとなった。よって、回収率から判断すると、ディスクの回転数 20,000 rpm、入り口温度 180 、出口温度 100 (Lot.1) が最適条件であることがわかった。

つぎに、検討した 3 条件で、低濃度 (最終作製理論濃度 : 0.5  $\mu\text{g/g}$ ) について検討した。条件は同様であり、平均粒子径は 10  $\mu\text{g/g}$  のときとほとんど変わらず、各ロット間で大きな差はなく、平均粒子径は Lot.1 で 56.82  $\mu\text{m}$ 、Lot.2 で 56.41  $\mu\text{m}$ 、Lot.3 で 54.43  $\mu\text{m}$  となった。これらの粒子には 50  $\mu\text{m}$  以下の造粒した粒子と 100  $\mu\text{m}$  以上の溶解せず懸濁した米粉が混在していることが図 3 から観察される。作製された米粉試料の生成過程は異なることから、濃度分布に差があるのではないかと考えた。そこで、もし、均質であれば最終作製理論濃度になるはずであることから、それぞれのロットについて 10  $\mu\text{g/g}$  と 0.5  $\mu\text{g/g}$  から  $n=5$  でサンプリングし原子吸光光度計で測定した。カドミウムについては、いずれの濃度においても、また、各ロットでも理論値に近い均質な米粉試料が作製できることが確認できた。一方、鉛においては、10  $\mu\text{g/g}$  ではほぼ理論値通りにできたが、0.5  $\mu\text{g/g}$  は約 20~30% ほど理論値より大きくなった。これには、コンタミネーションが疑われるが、米粉のブランクには鉛は含まれず、作製した容器からの溶出、または作製に用いたスプレードライヤからのコンタミネーションが考えられた。その結果、今回使用したスプレードライヤ装置は我々の使用前に、セラミッ

ク材料であるチタン酸ジルコン酸鉛の使用が確認され、微量のチタン酸ジルコン酸鉛由来であると推測された。これについては、今後確認する予定としている。しかしながら、今回のスプレードライヤによる米粉試料作製は技能試験プログラム用試料として使用できることが示された。次に、作製された米粉試料は平均粒子径が約 50  $\mu\text{m}$  であり、50  $\mu\text{m}$  以下の造粒した粒子と溶解せず懸濁していた大きな粒子の混合物となっている。先に測定した結果より、理論濃度に一致しており、均質であることが推測されたが、実際、カドミウムと鉛が米粉にどのように分布しているか表面と内部の可視化を試みた。その測定には飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) を用いた。作製した濃度では装置の感度が足りない事より、1%カドミウムと鉛を含む米粉試料を別途作製し、実験に供した。大きさの違う米粉粒子を米粉由来の最も感度の良い成分である  $m/z=55$  を指標として分布状態を可視化した。カドミウムは感度が悪く明瞭なイメージは得られなかったが、鉛については、粒子径が異なっても米粉の表面には、均一に分布していることが確認された。米粉試料の内部を観察するために断面を観察した結果、粒子径の違う断面においても、鉛が均一に分布していることが確認された。以上より、スプレードライヤを用いることで、米粉試料に鉛または今回、明瞭には示されなかったがカドミウムが均一に分布していることが確認され、技能試験プログラム用の試料として用いることが可能であることが示された。今後、他の試料に応用する予定である。

#### 4 松田研究分担

##### 1) 二枚貝中オカダ酸群分析技能試験のパイロットスタディ

###### 1)-1 オカダ酸分析の性能確認

国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センターの認証標準物質 CRM-7520-a 3 試料を分析した。結果は、オカダ酸が 0.201 mg/kg、0.202 mg/kg、0.202 mg/kg、ジノフィシストキシン-I が 0.340 mg/kg、0.348 mg/kg、0.349 mg/kg、であった。本認証標準物質の拡張不確かさを含めた認証値は、オカダ酸が  $0.205 \pm 0.061$  mg/kg (0.144 mg/kg ~ 0.266 mg/kg)、ジノフィシストキシン-I が  $0.45 \pm 0.11$  mg/kg (0.34 mg/kg ~ 0.56 mg/kg) であり、定量結果は認証値の範囲にあった。分析結果平均の認証値に対する比は、オカダ酸が 0.983、ジノフィシストキシン-I は 0.768 であった。また、後述する均質性試験結果から推定されたオカダ酸分析の併行精度は RSD として 1.7% であることが確認された。試料にはジノフィシストキシン-I を含んでいないため、均質性試験結果からは精度を推定できず、認証試料分析は回数不足のため、併行精度を確認することはできなかった。

###### 1)-2 試料の均質性評価

作製した試料からランダムに 10 缶を抜き取り、2 回分析した結果を Table 1 に示す。総平均は 0.146 mg/kg であった。この結果を分散分析し、繰り返しの分散と試料間の分散を求め、それぞれから標準偏差を計算した。繰り返し分析の標準偏差は、0.0024 mg/kg であり、相対標準偏差としては 1.7% であった。試料間の標準偏差は 0.0046 mg/kg であった。

The International Harmonized Protocol

for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories<sup>1)</sup>に示されている Recommendation 7 及び 8 により評価を行った。試料を 121 で 15 分間加熱した後の、オカダ酸濃度は 0.142 mg/kg 及び 0.145 mg/kg であった。この結果から、試料中のオカダ酸は常温で一年間程度安定と考えられた。確認のため、試料作製の 2 か月後に試料中のオカダ酸の測定を行った。3 缶を測定した結果は、0.144 mg/kg、0.139 mg/kg、0.148 mg/kg (平均 0.144 mg/kg) であった。均質性評価時の濃度(平均 0.146 mg/kg)と有意の差は認められず、試料は安定と判断した。

###### 1)-3 技能試験パイロットスタディ

28 か所の試験所から参加の申し込みがあった。2 か所が国の機関、17 か所が地方自治体の衛生研究所、9 か所が登録検査機関であった。各試験所に試料 1 缶を送付した。分析方法は、各試験所が日常的に行っている方法とした。報告〆切までに 24 試験所から報告があり、その後 1 か月の間に 3 か所から結果が報告され、報告を行った試験所数は 27 となった。オカダ酸群の分析法では、ジノフィシストキシン-I も測定されるが、今回は試料に添加していないため、技能試験における評価対象とはしなかった。

###### 1)-4 参加試験所の評価

参加試験所からの報告値から平均、標準偏差、ロバスト平均、ロバスト標準偏差を計算した。ロバスト平均および標準偏差の計算は algorithm A<sup>4)</sup>を用いた。平均値は 0.126 mg/kg、ロバスト平均は 0.127 mg/kg、標準偏差は 0.026 mg/kg、ロバスト標準偏差は 0.028 mg/kg であった。通常の統計量とロバストな統計量はほぼ同じ値であった。

報告値のヒストグラムには、外れ値と考えられるような離れた値が認められないことから、この結果は当然と考えられる。結果において述べたように、このオカダ酸分析技能試験では、z-スコアの計算に、試料の付与値と Horwitz 式から予測される室間精度を用いた。一方、IUPAC/CITAC ガイドでは、参加者が少数(N<30)の場合には信頼性が低いとしながらも、N<20 のとき、ロバスト統計は通常推奨されないと記載されており、今回の技能試験の参加試験所数である 27 において、通常のロバスト統計量の使用も可能と考えられる。報告値全体が 1 つの正規分布に従っておらず、高値と低値の 2 つのグループに分かれている。この状況で正規分布を前提としたロバスト統計量から計算した z-スコアによる評価は、妥当ではないと考えられる。試料の付与値はヒストグラムの中央ではなく、高値側から 2 番目のカラムに相当する位置にあった。このため、z-スコアの多くが負の値となった。試験所数が少ないことに加えて、経験が十分ではない分析においては、参加者報告値から求めた統計量による評価が必ずしも妥当とはいえず、可能であればトレーサブルな値を試料に付与し、これを用いることが重要と考えられる。

## 2) 実際に動物薬を投与した畜肉を試料として用いる技能試験のための分析法の確立

### 2)-1 分析法性能確認結果

#### 2)-1-1 検量線

セフチオフル検量線作成用標準溶液 0-10 ng/mL の 7 濃度及び 2.0-40 ng/mL の 5 濃度を測定し、得られた応答値から検量線を作成した。検量線の相関係数 ( $r^2$ ) は 0.995 以上であった。前者の検量線は未添加試料

の測定に、後者は添加試料の測定に使用した。エンロフロキサシン検量線作成用標準溶液 0.125- 5.0 ng/mL の 6 濃度及び 2.5-125 ng/mL の 6 濃度を測定し、得られたエンロフロキサシン又はシプロキサシン応答値と内部標準の応答値の比から検量線を作成した。検量線の相関係数 ( $r^2$ ) は 0.995 以上であった。前者の検量線は未添加試料の測定に、後者は添加試料の測定に使用した。

#### 2)-1-2 添加試料による真度と精度の確認

セフチオフル分析法の性能確認結果及びエンロフロキサシン分析法の性能確認結果の総平均と添加量に対する比を真度とした。また、一元配置分散分析を行い、併行精度と室内精度を推定した。これらの分析法の使用目的は、技能試験試料の均質性の確認であることから、併行精度を評価した。セフチオフル分析の併行精度は 6.2%であった。セフチオフル添加量から、Horwitz 式により予想される室間精度は RSD として 16%である。得られた併行精度 6.2%はこの 1/2 以下であり、試料の均質性確認に使用可能と判断された。シプロフロキサシン及びエンロフロキサシン分析の併行精度は 5.5%及び 5.1%であり、添加量から予測される室間精度は 22%であることから、これらの分析も試料の均質性確認に使用可能と判断された。

セフチオフル分析法の真度は 87.7%、シプロフロキサシンとエンロフロキサシン分析法の真度は 77.8%及び 77.5%であり、試料の付与値を決定するための性能としては不十分と判断された。

## 5 井部研究分担

### 1) 二枚貝中オカダ酸群分析技能試験のバ

## パイロットスタディに供する試料開発

### 1)-1 オカダ酸の熱安定性試験

121 で 5 分、10 分、15 分間加熱した試料中のオカダ酸群の分析をした。分析は各加熱時間において 2 缶、それぞれの内容物を均質化し、1 試験試料を採取し、オカダ酸濃度を測定した。あわせて未加熱の試料を 1 缶分析した結果から、未加熱試料中のオカダ酸が 0.121 mg/kg、ジノフィシストキシン-I が 0.012 mg/kg であった。5 分加熱時のオカダ酸が 0.149 mg/kg、ジノフィシストキシン-I が 0.013 mg/kg、10 分加熱時のオカダ酸が 0.144 mg/kg、ジノフィシストキシン-I が 0.013 mg/kg、15 分加熱時のオカダ酸が 0.129 mg/kg、ジノフィシストキシン-I が 0.012 mg/kg であった。添加していないジノフィシストキシン-I が検出されたのは、試料作製に用いたホタテガイむき身の自然汚染によるものと考えられた。加熱によりオカダ酸が減少する傾向が確認されたが、15 分間の加熱後も技能試験を実施するにあたり十分な残存が確認されたことから、パイロットスタディ用の試料作製時の加熱条件は 15 分間とした。

### 1)-2 試料の安定性評価

作製した試料から、製造後 1 ヶ月目と 3 ヶ月目にランダムに 2 缶を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、2 試験試料を採取し、オカダ酸濃度を測定した。1 ヶ月目は 0.147 mg/kg、0.147 mg/kg、3 ヶ月目は 0.152 mg/kg、0.156 mg/kg であった。

### 1)-3 パイロットスタディ用試料の作製

パイロットスタディ用試料の作製に際し、オカダ酸の添加濃度は平成 27 年 3 月に変更された機器分析法による規制値 0.16 mg/kg を目安にした。高圧下での加熱によるオカ

ダ酸群の減少も鑑みて、0.2 mg/kg の濃度で試料配合を行った。予備試験として実施した加熱時間の検討において、15 分間の加熱後では配合濃度の 64.5%にあたる 0.129 mg/kg であった。一方で、同時に試験をした未加熱試料は配合濃度の 60.5%にあたる 0.121 mg/kg であった。これらから 15 分間加熱後の試料において配合濃度より低い結果が得られたのは、加熱による減少よりも混合時の作業においてロスしたものと示唆された。パイロットスタディ用の試料作成においては、試料の内在性酵素等による分解にも配慮し、混合時に試料のマトリクスであるホタテガイむき身とアナライトであるオカダ酸の常温での接触時間を短くし、混合後直ぐにレトルト殺菌を行った。5167.0 g の試料原料から 50 缶の試料を得、このうちランダムに 10 缶を抜き取り均質性の評価を実施した。均質性の評価は、本研究の分担課題である「新規技能試験プログラムの開発及び統計学的評価に関する研究」により評価され、技能試験に供するのに適切であると評価された。安定性に関しては、1 ヶ月目は 0.147 mg/kg、0.147 mg/kg、3 ヶ月目は 0.152 mg/kg、0.156 mg/kg であった。3 ヶ月目の 2 試料は高い値側に寄っていることが確認されたが、均質性評価時の 10 試料の 2 併行試験の総平均 0.146 mg/kg  $\pm$  0.00491 mg/kg から 95%の信頼区間を計算すると 0.136 mg/kg ~ 0.156 mg/kg であり、95%の信頼区間内に納まっており、t 検定の結果からも有意な変動は確認されなかった。

### 2) 実際に動物薬を投与した畜肉を試料として用いる技能試験のための試料開発

#### 2)-1 投与した動物用医薬品の各部位への分布および残留量の確認

投与した動物用医薬品が豚の筋肉中へどのように分布したかを確認したところ、エンロフロキサシンのウデの値は 2.4 mg/kg、2.6 mg/kg、ロースの値は 2.6 mg/kg、2.7 mg/kg、モモの値は 2.8 mg/kg、2.7 mg/kg であった。試験数は少ないが、ウデ、ロース、モモの結果から屠殺の約 6 時間前に薬剤を投与した試験区 2 では、薬剤が全身に均等に分布していることが確認された。一方、セフチオフルはすべての部位から検出されなかった。これは投与されたセフチオフルが即時体内で代謝され、代謝産物のデスフロイルセフチオフルの状態で残留しているためと考えられた。

## 2)-2 粉砕処理による動物用医薬品の残留確認

薬剤投与後 24 時間の筋肉においては、粉砕処理の有無に関わらず、セフチオフルは検出されない、もしくはごく微量検出された試料が一部あるのみで均質性の評価までは行えなかった。一方、エンロフロキサシンは投与後 24 時間の試料においても残留が確認された。その残留量は未粉砕の区で総平均 0.152 mg/kg、3 分間粉砕の区で総平均 0.136 mg/kg であった。薬剤投与後 6 時間の筋肉においては、未粉砕の区でエンロフロキサシンが総平均 2.512 mg/kg、セフチオフルが総平均 0.141 mg/kg、3 分間粉砕の区ではエンロフロキサシンが総平均 2.451 mg/kg、セフチオフルが総平均 0.163 mg/kg であった。各試験区の結果を分散分析し、繰り返し分析の分散と試料間の分散の計算結果から、均質性評価に用いた分析法の精度および試料の均質性の評価は、IUPAC により発表されている The International Harmonized Protocol for

the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratorie の Recommendation 7 及び 8 により行った。今回の検討では投与後 24 時間、6 時間の区においても 3 分間粉砕した場合のみ均質と判断され、粉砕試料のみ技能試験に適切と評価された。豚頸部の筋肉中に投与されたエンロフロキサシンおよびセフチオフルは投与後 6 時間以内に全身の筋肉中にほぼ均等に行きわたることが確認された。セフチオフルに関しては、投与後 6 時間の試料からでも、セフチオフルとしては検出されず、代謝物であるデスフロイルセフチオフルとしてのみ検出された。筋肉への残留量については、3 mg/kg の割合で投与したエンロフロキサシンが 6 時間後で投与量の 82.7%にあたる総平均 2.482 mg/kg、24 時間後では投与量の約 9.6%にあたる総平均 0.144 mg/kg であった。2 mg/kg の割合で投与したセフチオフルは 6 時間後で投与量の約 7.6%にあたる総平均 0.152 mg/kg、24 時間後では検出されなかった。本研究に使用したエンロフロキサシン、セフチオフルの休薬期間はそれぞれ 14 日間、3 日間と定められていることから、残留量については妥当であると考えられる。今年度の結果から、技能試験のパイロットスタディを行うための動物用医薬品の試料としてはエンロフロキサシン、セフチオフルを投与後 6 時間で屠殺した個体のロース肉を 3 分間均質化処理したものが最適であると考えられた。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yarita T., Otake T., Aoyagi Y., Takasaka N., Suzuki T., Watanabe

I: Comparison of assigned values from participants' results, spiked concentrations of test samples, and isotope dilution mass spectrometric results in proficiency testing for pesticide residue analysis, *Journal of AOAC int.*, *in press*

## 2. 学会発表

特になし

## F. 知的所有権の取得状況

なし