

平成 30 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、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（埼玉衛生研究所副所長）、渡辺卓穂（（一財）食品薬品安全センター秦野研究所公益事業部長）、松田りえ子（国立医薬品食品衛生研究所客員研

究員、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)

精度管理の一般ガイドラインの改定案(以下、内部品質管理ガイドラインとする)を開発するに当たり、整合させるべき国際的に認められた文書として、

「Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories」(Pure & Appl. Chem., vol. 67, No. 4, pp. 649-666, 1995)を選定した。本論文は、CXG 65 として、Codex 委員会において採択されており、SPS 協定の条文に照らしても、整合させるべき文書として妥当である。

試験所の能力への国際的な要求水準、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; Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of foods、CAC/GL 70; Guidelines for settling disputes over analytical (test) results、CAC/GL 72; Guideliens

of analytical terminology、CAC/GL 83; Principles for the use of sampling and testing in international food trade等)を用いて調べた。また、CXG 65にも参照されているISO規格を含む各種文書を解析し、内部品質管理が基礎としている統計学的な原理を明らかにし、内部品質管理ガイドラインに示すべき内容について検討した。

## 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認定取得の視察及び情報交換

既にISO/IEC 17025の認定を取得している公的検査機関である横浜検疫所輸入食品・検疫検査センターを視察し、ISO/IEC 17025への取組み状況について、組織、資源、マネジメントシステムや現在通知されている業務管理要領との併行した運用の状況を学習した。

### 2) 地方衛生研究所全国協議会加盟機関への情報提供

地方衛生研究所全国協議会・臨時総会において、現在の業務管理要領に代わり、導入が予定されているガイドラインの内容や昨年度の当分担研究班の研究成果である導入に向けての課題やそれに対する解決策について地方自治体の食品衛生検査機関の長に伝達し、情報共有を図った。

### 3) 品質マニュアル等の例示文書の作成

マネジメントシステムの導入に求められる要求事項と業務管理要領を比較し、異なる要素を明らかにすることにより、具体

的な課題を抽出した。これらの検討から地方自治体の食品衛生検査施設においてガイドラインに従った新たな品質保証に関する取組みを実施する場合の一助となるよう、これまで業務管理要領には規定されていなかった「マネジメントシステム」、「測定の不確かさの推定と評価」及び「測定のトレーサビリティ」に関する以下の11種類のマニュアル及び手順書等の例示文書を作成し、問題点の整理を行った。

## 4) 技能試験への参加

### (1) 残留農薬

平成30年10月11日～11月22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、フェニトロチオン及びマラチオン)を含む枝豆ペースト2試料について研究協力機関17機関が参加し、技能試験を実施した。

### (2) 動物用医薬品

平成30年12月6日～12月31日に井部・松田分担研究班が開発した動物用医薬品3種(エンロフロキサシン、シプロフロキサシン及びセフチオフル)を含む豚筋肉1試料について研究協力機関が参加し、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

試料基材には市販の枝豆ペーストを用い

た。添加農薬および添加農薬の違う枝豆試料 A (以下、試料 A) および枝豆試料 B (以下、試料 B) を作製した。

ブリクサー容器に試料基材 1.80 kg を入れ、水 200 mL を添加し、パルスモードで 5 ~ 6 秒間の混合を 5 回行った後、低速運転で 20 秒間混合し、ヘラおよび大型スパテルで全体を混合した。同様の操作を繰り返し、合計 5 回行ったものを水添加枝豆試料とした (5 回目は低速運転のみ行った)。

これに、添加用農薬混合標準溶液 A (ダイアジノンおよびマラチオン 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、クロルピリホス 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、フェニトロチオン 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 10 mL を正確に添加し、パルスモードで 5 ~ 6 秒間の混合を 5 回行った後、低速運転で 20 秒間混合し、ヘラおよび大型スパテルで全体を混合した。同様の操作を繰り返し、合計 5 回行ったものを容器 No.1 とした (5 回目は低速運転のみ行った)。以上の操作を更に繰り返し、合計 4 個 (容器 No.1 ~ No.4) 作製後、順次、ステンレス製のボール (50 L 容) に合わせた。その後、シリコーンゴム製ヘラで 5 分間混合し、分注用試料 A とした。(作製予定濃度:ダイアジノンおよびマラチオン 0.020  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、クロルピリホス 0.50  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、フェニトロチオン 0.60  $\mu\text{g}/\text{g}$ )。

また、添加用農薬混合標準溶液 B (ダイアジノン 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、クロルピリホスおよびフェニトロチオン 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、マラチオン 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アセトン溶液) 10 mL を正確に加え、以下、分注用試料 A と同様に操作し、作製した試料を分注用試料 B とした (作製予定濃度:ダイアジノン 0.50  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、クロルピリホスおよびフェニトロチオン 0.020  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、マラチオン 0.60  $\mu\text{g}/\text{g}$ )。

作製した分注用試料 A および B をそれぞれ分注し、凍結後、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、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。

## 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 17 機関を対象に室間共同試験を実施した。検査機関には試料 A および B を 1 個ずつ配付 [平成 30 年 10 月 10 日発送、ヤマト運輸 クール宅配便 (冷凍タイプ)] し、試料到着後の保管条件は冷凍 (約 -15 ~ -30 ) とした。試料処理および測定操作は各検査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、専用の返信用封筒で回収した。なお、結果報告書等の提出期限は平成 30 年

11月26日とした。

#### 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)

各検査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、この範囲外となる報告値および欠測値のある報告値 (5個未満) については、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検査機関の回収率 (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 ( $RSD_r$ , %) 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 ( $RSD_r$ , %) 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 ( $RSD_r$ , %) 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標準偏差 ( $S_R$ ) 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)

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 (以下、メジアン・クリーニング)。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)

Horwitz式は、化学分析法によって得られた測定値のばらつきを経験則に基づいて判断するための方法として食品分析分野で広く利用されている。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  $PRSD_R$  (%) を算出し、これらと得られたロバスト平均値から  $z$ -スコアを算出した。

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) 外部精度管理調査の実施

外部精度管理調査には 60 機関が参加した。これらの機関には平成 30 年 9 月 3 日に調査試料と実施要領を宅配便（冷凍）にて送付した。

測定には、基本的には各機関、日本ハム(小麦)キット、モリナガ(小麦)キット)、プリマハム(小麦)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。また、報告書の回収期限は平成 29 年 10 月 5 日とした。

参加機関から提出された測定値は、通知法の別紙 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。

これらのデータについては統計解析システム JMP (SAS Institute Japan) を用い、 $\bar{X}$ -R 管理図を代用した解析を実施した。この際、 $\bar{X}$  管理図の管理限界線の値は(中央値 $\pm$ 中央値の 50%)とした。これは、前述したガイドラインの 4. の提言にタンパク質の回収率が「50%以上、150%以下であること」との記載があることから、キットの測定誤差の範囲についてもこれ以下で設

定した。また、測定値から算出した各キットで測定された小麦タンパク質の含有率については、用いるキットにより検出される抗原のプロファイルが異なることから、各試料およびキットごとに算出したロバスト平均値を付与値として解析を行った。

ロバスト方式の統計は、Huber の proposal 2 の推定方式による統計をエクセル・マクロによるプログラム〔作成：システムサポート、大隅昇〕により行い、得られたロバスト平均値およびロバスト標準偏差を用いて z-スコアを算出した。さらに、アンケート結果をとりまとめ、検討を加えた。今回の外部精度管理調査研究でモリナガ(小麦)キットを使用した機関は 60 機関、日本ハム(小麦)キットを使用した機関は 55 機関、プリマハム(小麦)キットを使用した機関は 4 機関であった。プリマハム(小麦)キットは使用機関数が少なかったことからキットごとの統計解析は行わなかった。

#### 2) 3 種タンパク質添加試料の検討

3 種タンパク質添加サンプルの調製は、小麦粉抽出液、そば粉抽出液および卵調製液を用いた試料検討用サンプルの調製を以下のように行った。

基材としてかぼちゃペースト、ベビーフードおよびこしあんを用いた。

タンパク質添加前に、かぼちゃペーストおよびベビーフードを均質となるよう十分に混和した。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。

添加用小麦タンパク質調製液、添加用そばタンパク質調製液および添加用卵タンパク質調製液をそれぞれ 10  $\mu\text{g}/\text{g}$  となるように添加量を計算後、各基材にそれぞれ

3 種類のタンパク調製液を加えた。その後、フードプロセッサ（MK-K58、National）で均質化し、試料とした。

安定性試験は、ベビーフードおよびかぼちゃ基材について、各基材 4 容器から n=1 でサンプリングして、ELISA 法により卵、小麦およびそばタンパク質濃度の測定を行った。また、こしあんに 3 種類のたんぱく質を加えたサンプルについて過熱により検出力変化の検討を行った。

3 種タンパク質含有こしあんサンプル（約 10 g/tube）4 本から各チューブ n=6 で 1 g/50-mL チューブに分取した。うち、任意の 3 本について沸騰湯浴中で、5 分間加熱後、放冷した。各キット当たり、4 本の各チューブから非加熱および加熱を 1 本ずつ計 8 本について ELISA キットにより卵、小麦およびそばタンパク質の測定を行い、加熱、非加熱の比較を行った。つぎに、試料の凍結融解による影響を検討するために、すでに作製してある試料（特定原材料：卵、基材：かぼちゃペースト）を用いて凍結融解 0 回、1 回、3 回、5 回の 4 サンプルを作製し、卵タンパク含有量の測定を行った。

試料は室温で 3 時間、放置し融解したのち、再度、冷凍庫で凍結する、という作業を繰り返した。

卵タンパク質の含量測定には日本ハム（卵）キット、モリナガ（卵）キット、プリマハム（卵）キットの 3 キットを使用した。

約 10 g ずつ試料を分注してあるチューブを 1 条件につき、2 チューブずつ用いた（n=2）。

各チューブからは、1 g ずつ 3 本分注し、1 キット当たり 1 本使用し、ELISA キットにより卵タンパク質の測定を行った。

### 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玄米粉（まるだけ）及び自家製玄米粉（宮城ひとめぼれを粉碎した）を用い、20 %懸濁溶液を作製した。すなわち、玄米粉 10 kg を 0.125 mg/L カドミウムおよび 0.125 mg/L 鉛溶液 40 L に懸濁させた（米粉の理論作製濃度：0.5  $\mu\text{g/g}$ ）。また、予備検討用として玄米粉（まるだけ）の 10 %懸濁溶液（理論作製濃度 1.0  $\mu\text{g/g}$ ）も調製した。これをスプレードライヤに供した。一方、残留農薬用試料は自家製玄米粉を用い、玄米粉 1 kg をアセトニトリル 4 L に懸濁させ、スプレードライヤに供した。

#### 2) スプレードライヤによる玄米粉試料作製条件

作製検討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、スケールアップには ODA-30 及び残留農薬用試料作製のためには窒素ガス密閉循環型スプレードライヤ CL-8i を用いた。玄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送液した。L-8i 及び CL-8i では 2 kg/h、ODA-30 では 30 kg/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 型あるいは MC-125 型を使用した。回転数は L-8i 及び CL-8i では 20000 rpm、ODA-30 では 18000 rpm に設定した。また、入り口温度は 180、出口温度は 100 とした。残留農薬試料作製では作製温度を検討した。得られた玄米粉

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、得られた玄米粉は原子吸光度計でカドミウムを測定または、GC/MS で残留農薬を測定した。また、作製した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

### 3.4 EU から検査を求められている物質に関する試験法の妥当性評価の実施：

#### 1) 妥当性評価

アフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub>

##### 1) 特異性

20 個のブランク試料のデータを採取し、特異性を確認した。

##### 2) 真度

CRM 入手困難なため、添加回収率で評価した。豚筋肉試料 50 g にアフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> がそれぞれ 1、1.5、2 µg/kg となるように添加し、本試験法に従って操作を行った。なお、試験は 1 日試行 6 回、3 日間実施し、-50 % ~ +20 % (50 ~ 120 %) を評価基準とした。

##### 3) 検量線

アフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> の検量線を作成した。測定に使用した標準溶液は 5、2.5、0.625、0.25 及び 0.1 µg/L の計 5 点とした。

##### 4) 精度

添加試料の繰り返し分析により得られる試験所内変動係数(相対標準偏差；CV)が、Horwitz 式(修正式)により求めた室内再現精度の 2/3 レベル(CV:15 %)を超えないことを評価基準とした。

##### 5) 決定限界(CC )

1-6 2)で実施した添加回収試験のデータについて、添加濃度を X 軸、分析濃度を Y 軸にプロットし、y 切片及び y 切片の室内再現性の標準偏差を求め、以下の式からアフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> の CC を求めた。

$CC = y \text{ 切片の平均値} + y \text{ 切片の室内再現性の標準偏差の } 2.33 \text{ 倍}$

##### 6) 検出能力(CC )

1-6 2)で求めた CC の値が定量限界(1 µg/kg)を下回ったことから、CC の算出には定量限界相当の添加回収試験のデータを使用した。

1-6 2)で実施した定量限界相当の添加回収試験結果(18 個)に、2 回の追加試験の結果を加えた計 20 個のデータから CC を算出した。また、各アフラトキシン毎に全ての分析値の標準偏差を求め、以下の式からアフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> の CC を求めた。

$CC = CC + 20 \text{ 個のデータの標準偏差の } 1.64 \text{ 倍}$

チルバロシン

##### 1) 特異性

20 個のブランク試料のデータを採取し、特異性を確認した。

##### 2) 真度

CRM 入手困難なため、添加回収率で評価した。鶏肝臓試料 10 g にチルバロシン及び 3-0-アセチルタイロシンがそれぞれ 25、50、75 µg/kg となるように添加し、本試験法に従って操作を行った。なお、試験は 1 日試行 6 回、3 日間実施し、-20 % ~ +10 % (80 ~ 110 %) を評価基準とした。

### 3) 検量線

チルバロシン及び3-*O*-アセチルタイロシンの検量線を作成した。測定に使用した標準溶液は0.002、0.001、0.0005、0.0002及び0.0001 mg/Lの計5点とした。

### 4) 精度

添加試料の繰り返し分析により得られる試験所内変動係数(CV)が、Horwitz式(修正式)により求めた室間再現精度の2/3レベル(15%)を超えないことを評価基準とした。

### 5) 決定限界(CC)

1-6 2)で実施した基準値(MRL)相当(50 µg/kg)の添加回収試験結果(18個)に、2回の追加試験の結果を加えた計20個のデータからCCを求めた。

CC = 20個のデータの標準偏差の1.64倍

### 6) 検出能力(CC)

CCは、先に算出したCC相当濃度の添加試料を20回分析し、算出した標準偏差の1.64倍をCC相当濃度に加算算出される。

本研究では、CC相当濃度 = MRL相当濃度とし、MRL相当濃度の添加試料(50 µg/kg)を20回分析し、算出した標準偏差の1.64倍を決定限界(CC)相当濃度に加算算出した。

CC = CC + 20個のデータの標準偏差の1.64倍

### 2) 内部精度管理の実施

EU輸出モニタリングを実施する際には、適切な内部精度管理の実施が求められる。そこで、模擬的に内部精度管理を実施した。畜種ごとの30物質について、試験対象物質が検出しないこと

が明らかな試料(以下「陰性対照試料」)にEUのMRL以下の濃度(MRLが設定されていない物質については定量限界相当)となるように標準溶液を添加し、試行数1回で日を変えて3回実施した。また、各試験日には陰性対照試料についても同時に試験(ブランク試験)を実施した。選択性の許容範囲は、「定量限界 基準値 1/3」の場合、基準値相当濃度に相当するピークの1/10以下、「定量限界 > 基準値 1/3」及び「不検出」の場合、定量限界濃度に相当するピークの1/3以下とした。添加回収試験の回収率の許容範囲は70~120%とした。また、3回の添加回収試験の結果からCVを求め、Horwitz式(修正式)により求めた室間再現精度の2/3レベル(15%)以内を暫定的な管理目標とした。

### 3.5 精度管理システムの運用に係るEUリファレンスラボラトリーの現地調査の実施:

#### 1) 訪問先および訪問日時

German Federal Office of consumer Protection and Food Safety (BVL)  
Marienfelde、12277  
Berlin、Germany

2019年3月5日

9:00~18:00(現地時間)

### 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) 動物用医薬品技能試験のための試料作製

動物用医薬品技能試験のための試料基材として、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チオフル及びエンロフロキサシンを選択した。試料の作製として、セフチオフル及びエンロフロキサシンを投与したブタの肉から作製した試料と、豚肉にエンロフロキサシンを添加した試料を作製した。試料作製の概要を以下に示す。

セフチオフル 2 mg/kg、エンロフロキサシン 3 mg/kg の用量で、豚の頸部筋中に注射により投与した。投与約 6 時間後に屠殺し、投与試料作製用の豚枝肉を得た。得られた豚枝肉からロース芯を切り出し、サイレントカッターを用いて均質化した。これを 100 mL 容のポリプロピレン製容器に 30 g ずつ小分けし、真空フィルムに入れ真空・冷凍した。

添加試料の作製 動物用医薬品の残留がない豚ロース肉から、ロース芯を切り出しサイレントカッターで粗く粉砕したものを 4.74 kg 得た。これに、エンロフロキサシンの 2 mg/mL アセトン溶液を 5 mL 添加した(添加濃度 2.1 mg/kg)。さらにサイレントカッターで十分に均質化し、100 mL 容のポリプロピレン製容器に 60 g ずつ小分けし、真空フィルムに入れ真空・冷凍した。

## 2) 分析法の性能確認

均質性確認のためのセフチオフル及びエンロフロキサシン分析法の性能を確認した。セフチオフル分析法の性能確認は、豚肉 5 g にデスフロイルセフチオフル濃度が 0.2 mg/mL となるように添加し、一日 2 併行分析を 5 日間実施した。エンロフロキサシン分析法の性能確認は、豚肉 5 g にエンロフロキサシン及びシプロフロキサシン濃度が 1 mg/mL となるように添加し、一日 2 併行分析を 5 日間実施した。

## 3) 試料の均質性確認

試料の均質性を確認するために、作製した試料からランダムに 10 個を抜き取り、それぞれの内容物を均質化し、それぞれから 2 試験試料を採取し、セフチオフル及びエンロフロキサシン濃度を測定した。

## 4) パイロットスタディ

国内の試験所から参加者を募集し、ブタ筋肉中セフチオフル及びエンロフロキサシン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、冷凍宅配便により送付した。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。

## 5) 添加試料のエンロフロキサシン分析

技能試験試料のエンロフロキサシン濃度の平均値に近い濃度のエンロフロキサシンを添加した試料を作製し、希望する試験所で、技能試験試料と同様に分析した。分析を行った試験所は 10 か所であった。

## 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) 技能試験のための試料開発

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。体重約 100 kg の豚に対して 300 mg のエンロフロキサシン、200 mg のセフチオフル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。技能試験に適した均質な試料を得るために、薬剤を生体中に十分に拡散させる目的で屠殺までの時間を 6 時間とした。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、全量を買上げた。得られた豚枝肉からロース芯を切り出し、サイレントカッターを用いて約3分間、均質化処理をした。これを100 mL容のポリプロピレン製容器（株式会社シントー化学製、品番 3-100）に30 g ずつ小分けし、ナイロンラミネート加工を施したポリエチレン袋（大倉工業株式会社製、品番 PNH-11 号）に入れ真空・冷凍した。技能試験用の試料として42個の試料を得た。

添加試料の作製では、動物薬の残留がない豚ロース肉から、ロース芯を切り出しサイレントカッターで粗く粉碎したものを4.74 kg 得た。これに、エンロフロキサシン 2 mg/mL のアセトン溶液を5 mL 添加した（添加濃度 2.1 mg/kg）。さらにサイレントカッターで十分に均質化し、100 mL 容のポリプロピレン製容器（株式会社シントー化学製、品番 3-100）に60 g ずつ小分けし、ナイロンラミネート加工を施したポリエチレン袋（大倉工業株式会社製、品番 PNH-11 号）に入れ真空・冷凍した。技能試験用の試料として35個の試料を得た。また、作製した試料の均質性を確認するために、投与試料42個、添加試料35個から、それぞれランダムに10個を抜き取り、均質性の評価試料とした。均質性の評価は課題4「新規技能試験プログラム開発及び統計学的評価に関する研究」において実施した。

## 2) 開発試料の安定性確認

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。本研究では一年目に二枚貝中の下痢性貝毒、

豚肉中の動物薬を測定対象とした2種の試料について、技能試験に供するに十分な均質性が確保された試料の開発を行った。本年度は、一年目に作製した下痢性貝毒の技能試験試料、動物薬の検討試料について1年後の安定性を確認した。

## 3) 一般生菌数定量試験の予備試験

複数の機関が参加する技能試験パイロットスタディに先立ち、輸送条件、分析方法を管理することが可能な参加者を募り、一般生菌数定量技能試験の予備検討を行った。参加者は試料作製を委託している研究協力機関の日本ハム株式会社の品質保証担当部署から募った。

予備検討試料の作製と同様に、添加物を配合したすり身4 kg をサイレントカッターを用いて均質化処理し、滅菌済ポリ袋（Fisher Scientific 社製、Sterile Sampling Bags 3' × 7'、Cat. No. 14955183）に約100g ずつ小分けした。小分けしたものをナイロンポリ袋（旭化成製、コーパック、品番 ST1525）に入れ、真空包装し、冷凍保管したものを予備試験用試料とした。

## C.D. 研究結果および考察

### 1 渡邊研究分担

#### 1) 国際的に整合すべき文書

前述の通り、国際的に整合すべき内部品質管理について示した文書は、CXG 65 [Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories (Pure & Appl. Chem., vol. 67, No. 4, pp. 649-666, 1995)] である。ただし、本文書は、様々な分析分野、特に臨床生化学、地球化学、環境研究、職業衛

生学、そして食品分析の分野で発展してきている内部品質管理の手法のハーモナイゼーションを取り扱ったものである。そのため、必ずしも、食品衛生法下で検査を行う試験所において使用される内部品質管理のガイドラインとして適当であるとは言えない。そのため、本文書を十分に解析した上で、内部品質管理の原理・原則を変えることなく示し、それに加え、食品分析分野における現実を踏まえた取組を示すことを意図して、記載内容を検討した。

## 2) 内部品質管理ガイドラインの主旨(序文)並びに対象(スコープ)

食品衛生法下での検査を実施する試験所宛ての文書であることを明確に意識し、内部品質管理の原理に言及した上でそれに取組む必要(必然)について、主旨及び対象の項を設けて説明した。

以下、主旨及び対象の項における記載を抜粋する。

### ・主旨

「本ガイドラインは、食品衛生法(以下「法」という。)に基づく検査を実施する機関(以下「試験所」という。)が、分析結果の品質保証の一環として取組む内部品質管理について、基本的な考え方と具体例を示すものである。本ガイドラインに示す基本的な考え方は、Codexガイドライン(CXG 65; *Codex guidelines [Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories]*)を基礎としている。

分析結果の品質保証は、試験所にとって本質的な組織インフラであり、全ての信頼できる分析結果の基礎となる。内部品質管理は、試験所における品質保証の一部であり、各試験所による実施が必須の取組である。内部品質管理における取組は、その試験所において得られる分析結果の品質の同時的な確認並びに、その変化の継続的なモニターを中心とする。

### ・対象

「法に基づき、食品等の成分規格への適合を判定する、すなわち検査を実施する、登録検査機関、並びに地方自治体等が所管する食品衛生検査施設により実施される、内部品質管理を本ガイドラインの対象とする。統計的管理状態のもとで継続的に実施される検査と、統計的管理状態が確立しない、一時にしか実施されない検査(アドホックな分析)とは、内部品質管理の考え方並びに取組が異なる。そのため、本ガイドラインにおいても区別されていることに留意する。」

## 3) 内部品質管理ガイドライン案の構成

内部品質管理ガイドラインは、本文と別添により構成した。

本文には、前出の序文と対象の項が含まれる。本文では、CXG65により示された内容を十分に踏まえ、内部品質管理の原理や原則を混乱なく理解するための記述とすることを意図した。特に、「統計的管理状態が確立されている分析システム」と、それが確立されていない(確立されない)「ア

ドホックな分析」とでは、内部品質管理の手法が大きく異なることを明確にした。また、内部品質管理のために分析する「管理用試料」の考え方を明確にした。さらに、内部品質管理のコンセプトは、「ラン毎に統計的管理状態の変化をモニターし、ラン毎に得られる分析結果の品質を保証することにある」ことにも言及した。その上で、各試験所が蓄積等した分析結果の品質に関する情報を根拠として活用し、試験所が自ら内部品質管理における取組を設計可能であるとした。このことによって、原理に従い、より合理的で効果的な、さらには継続可能な内部品質管理への取組が、試験所毎に行われ、発達していくことが期待される。

#### 4) 内部品質管理ガイドラインに残された課題（微生物分析分野における具体的な取組み例の検討）

開発した内部品質管理ガイドラインの対象には、微生物がアナライト(分析対象)となる分析(分析システム)も含まれる。現行の精度管理の一般ガイドラインでは、「微生物学的検査における精度管理」として項が設けられている。しかし、そこに示された取組は、基本的に理化学的検査に伴う内部品質管理と同じ内容である。例えば、回収率等の確認として、「添加した既知の微生物の回収率を少なくとも、70%から120%を目安として確保すること(別途、回収率が定められている場合を除く)」と指示されている。微生物の分析において「回

収」という概念が適切であるかについては議論しないにせよ、分析結果が10の乗というオーダーであり、多くの場合に培養を伴う微生物を対象とする分析において、ここで設定されている数値の実行性には疑問を感じざるを得ない。内部品質管理ガイドラインに示すことを目的に、当該分析分野の専門家からの意見を聞きながら、実行性のある取組について検討することが、今後の課題となる。

## 2 石井研究分担

### 1) ISO/IEC 17025認定取得期間の視察及び情報交換

平成30年7月10日に、研究協力機関18機関30名が横浜検疫所輸入食品・検疫検査センターを視察し、同所のISO/IEC 17025への取組み状況について説明を伺い、施設や運用状況等について学習した後、活発な意見交換を行った。

当センターでは、平成9年に通知された業務管理要領に基づく管理が運用されている一方で、5つの分野でISO/IEC 17025の認定を取得していた。業務管理要領に規定されている管理内容をISO/IEC 17025の諸規定に紐づける形で運用しており、今後、ISO/IEC 17025に準拠した管理体制を整備する地方自治体の食品衛生検査施設にとって、非常に参考となる内容であった。また、質疑応答では、サンプリング、トレーサビリティ体系、不確かさの評価、試薬・試液の管理、検査データの管理、機器の管

理等の技術的必要事項のほか、手順、マニュアル及び記録類の作成、教育訓練とその評価手法及び判断基準、内部点検、マネジメントレビュー、組織、リスクマネジメント等のマネジメント上の必要事項について活発な意見交換がなされた。

## 2) 地方衛生研究所全国協議会加盟機関への情報提供

平成30年6月8日、東京都健康安全研究センターにおいて地方衛生研究所全国協議会・臨時総会が開催され、分担研究者が「ISO/IEC 17025認定取得に向けた試験所の検討に関する研究」と題して、平成29年度の当分担研究班の研究成果を講演した。講演内容は地方自治体の食品検査施設を対象とした業務管理に関するアンケート調査結果及び現在の業務管理に代わり、ISO/IEC 17025に準拠した取組みが地方自治体の食品衛生検査施設に導入された場合の検査の品質保証への影響、また、人的、物的及び組織的な課題とその解決策についてであり、地方自治体の食品衛生検査機関の長との情報共有を図った。

## 3) 品質マニュアル等例示文書の作成

新たな取組みの指針となるガイドラインと現行の業務管理要領との違いを明らかとするために、両者の規定内容を比較した。

マネジメント上の必要事項（以下「マネジメントシステム」という。）のうち、現行の業務管理要領にはなく、新たに規定される事項は、トップマネジメント及びマネジメントレビューである。マネジメントシ

ステムでは、組織体制において、総括的に管理するトップマネジメントから責任と権限を与えられた信頼性確保部門責任者や検査部門責任者等が定められた事項の管理を行う。

一方、業務管理要領では、トップマネジメントを規定しておらず、また、信頼性確保部門責任者については検査部門からの独立性が規定されており、地方自治体の組織体制として、主管課などの組織に信頼性確保部門責任者が配置されているケースがある。

当研究班が平成29年度に行ったアンケート調査の結果では、信頼性確保部門責任者を検査機関以外の組織に配置している機関の割合は、都道府県等49%、指定都市68%、特別区・中核市87%であった。これら地方自治体の食品衛生検査施設では、今後、トップマネジメントや信頼性確保部門責任者の組織構成について関係機関との協議が必要になるものと思われる。同様に、試料の採取を行う収去部門とも、当該ロット等を代表する試料の採取について綿密な情報共有が必要になるものと思われる。

マネジメントシステムの中で改善は新たな項目に相当し、マネジメントシステムの要となる。名称や内容が変更される事項は、内部点検が内部監査に、また、研修が教育訓練になり、それぞれ求められる内容も変更される。

現行の業務管理要領では体系的な文書の管理は行っていない。一方、ガイドラインでは、文書の管理は具体的に規定されていないが、実際にマネジメントシステムを構築するためには、品質マニュアルを一次

文書、手順書を二次文書、標準作業書等を三次文書及び記録類とし、各文書を紐づける階層構造の体系的管理が必要ではないかと考える。

マネジメントシステム導入の課題に対応するために必要でかつ重要と考えられる文書として、全体の枠組みを提供する「品質マニュアル」、それぞれのプロセスの手順を規定する「教育訓練に関する手順書」、「マネジメントレビューに関する手順書」及び「内部監査に関する手順書」を作成した。

ガイドラインではマネジメントシステム構築のためにトップマネジメント、信頼性確保部門責任者、検査部門責任者及び検査区分責任者を責任者として配することが規定されている。マネジメントシステムの運営や技術上の必要事項の達成のためには、職員の育成が必要であり、教育訓練は重要な位置づけとなる。また、さまざまな文書の適切な管理も必要となることから、今回例示した「品質マニュアル」及び「教育訓練に関する手順書」では、責任者としてガイドラインには記載されていない「教育訓練責任者」及び「文書管理責任者」を規定した。

また、技術的な必要事項として新たに加わる内容としては「測定の不確かさの推定と評価」及び「測定のトレーサビリティ」が挙げられるが、それらに対応する文書として「不確かさ評価（トップダウン方式）標準作業書」、「不確かさ評価（ボトムアッ

プ方式）標準作業書」、「天びんの内部校正、不確かさ評価、定期点検及び日常点検標準作業書」及び「分銅の内部校正標準作業書」を作成した。

なお、これらの文書類はあくまでも例示であり、それぞれの自治体の実情に合わせた文書類を作成する際の参考文書として作成したものである。

### 3) 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」（渡辺卓穂研究代表者）および「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」（松田りえ子研究分担者）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

合計約 8 kg 相当の濃度の異なる 2 種の試料を作製した（試料 A および B）。作製した試料を 180 ~ 185 g ずつ分取しジッパー付袋に入れ（試料 A : 41 袋、試料 B : 41 袋）、ヒートシール後冷凍保管（約 -15 ~ -30 ）した。

#### 2) 調査試料の品質評価

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、検査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 92.5% ~ 103% 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、調査試料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枝豆ペーストは添加農薬の測定に問題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)

17 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。

試料 A および B を各農薬で低濃度群および高濃度群 (以下、低濃度および高濃度) に分類して、妥当性評価ガイドラインの回収率 (真度) についての評価基準との関係から、農薬ごとに低濃度および高濃度の回収率を機関別に比較したところ、いずれの濃度および農薬も 1 ~ 4 機関が管理限界線の範囲外となったが、他の機関においては概ね 70% ~ 120% の回収率が得られた。また、機関間において低濃度および高濃度で回収率に差があるものの、機関内での回収率はいずれの農薬でも類似していた。さらに、低濃度および高濃度間の回収率の有意差について t 検定により確認した結果、いずれの農薬でも回収率は等分散であり、2 標本の結果には有意差は認められなかった。

経過記録書を基に、回収率に影響を及ぼす要因として抽出方法、測定機器 (検出器) および検量線に着目して回収率との関係を調べた。抽出方法について回収率との関係性を調べたところ、公定法 (通知法) が 2

機関、公定法一部変更法が 8 機関、QuEChERS 法が 5 機関ならびに液-液分配および STQ 法がそれぞれ 1 機関であり、採用している抽出方法の機関数に偏りがあった。さらに、これらそれぞれには用いた測定機器 (検出器) および検量線の種類の違いがあり、明らかな関係性を見出すには至らなかった。他の着目した 2 項目についても明らかな相違は認められなかった。

妥当性評価ガイドラインに基づき、回収率および併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ , %) の結果を確認した。回収率の評価基準は、低濃度および高濃度ともに 70% ~ 120% に対し、各機関の回収率は、ダイアジノンは 49.1% ~ 178%、クロルピリホスは 56.4% ~ 128%、マラチオンは 42.4% ~ 182%、フェニトロチオンは 28.6% ~ 127% であり、低濃度および高濃度ともいずれの農薬においても管理限界線から外れる機関があった。一方、併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ , %) の評価基準は、いずれの農薬についても低濃度は 15% 未満、高濃度は 10% 未満が相当する。それに対し、管理限界線外は、フェニトロチオンについて低濃度および高濃度においてそれぞれ 1 機関が該当した。ちなみに、当該機関の回収率は低濃度については 70% ~ 120% の範囲内であり、高濃度については 70% ~ 120% の範囲外であった。

検量線に内標準法を採用した機関を黒色マーカーで示し、回収率および併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ , %) の関係を調べた。その結果、内標準法は、測定装置の感度や注入量、溶解溶媒の揮発による誤差を補正することができるかとされているが、本調査研究結果では内標準法の採用の有無による併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ , %) の明らかな差は認めら

れなかった。

### 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) 外部精度管理調査結果

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(小麦)キットは60機関が、日本ハム(小麦)キットは55機関が、プリマハム(小麦)キットは4機関が使用した。プリマハム(小麦)キットを使用した機関が少なか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(小麦)キットと日本ハム(小麦)キットのデータを比較すると、測定値の平均は試料1、試料2ともモリナガ(小麦)キットが、日本ハム(小麦)キットよりもやや高い数値を示した。変動係数はモリナガキットで0.0882~0.0899、日本ハム(小麦)キットでは0.0940~0.0974と日本ハム(小麦)キットでやや高い値を示した。キット別集計結果では、モリナガ(小麦)キットにおいて試料1では、 $\bar{X}$ 管理図で管理限界線の範囲を超えた機関はなかったが、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関が3機関あった。また、試料2では、メジアン・クリーニング後の $\bar{X}$ 管理図で管理限界線の範囲を超えたデータはなかった。また、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関が3機関あった。日本ハム(小麦)キットにおいて、試料1では、メジアン・クリーニング後の $\bar{X}$ 管理図で管理限界線の範囲を超えたデータはなかった。また、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関あった。試料2では、メジアン・クリーニング後の $\bar{X}$ 管理図で管理限界線の範囲を超えたデータはなかった。また、 $R$ 管理図で上部管理限界線を超えた機関が1機関あった。プリマハム(小麦)キットにおいては、プリマハム(小麦)キットを用いて測定した機関は

4機関であったため、統計解析は実施しなかった。

検量線については、本調査研究ではキットのロットは指定していないことから、各機関が入手可能なロットを使用しての参加となった。このため、各キット、複数ロットが使用されており、検量線の反応性を比較することが可能であった。モリナガ(小麦)キットおよび日本ハム(小麦)キットの検量線を比較するとモリナガ(小麦)キットの検量線は日本ハム(小麦)キットの検量線よりも幅が広がっていた。また、両キットとも集団から外れた検量線が数機関ずつ認められた。

プリマハム(小麦)キットについては、4機関とデータ数が少ないので参考扱いとはなるが、ロット間より機関ごとの差が大きいように見受けられた。

検査手法については、ピペット操作に関して、抽出溶液等の希釈操作はすべての機関が手動で行っていたが、プレートの洗浄方法については、手動が30機関、自動が30機関と半数ずつであった。また、検量線の近似曲線は56機関で4パラメーターロジスティック(4PL)が、4機関で5パラメーターロジスティック(5PL)が採用されていた。検量線の相関( $R^2$ )はほとんどの機関で $>0.99$ となり、手技に問題がないと考えられた。試料溶液の添加はすべての機関が20分以内に行っていた。抽出液についてはほとんどの機関が抽出当日に試験を行っていたが、7日以上保存を行った機関も認められた。抽出液の保存状態および温度による測定値の中央値からの乖離は特に認められなかった。

#### 2) 3種のタンパク質を用いた試料の検討

3種タンパク質を用いた試料の安定性については、小麦タンパク質調製液、そばタ

ンパク質調製液、卵タンパク質調製液の 3 種をベビーフードとかぼちゃペーストの 2 種の基材に添加し、初期検討を行った。測定は各特定原材料につき 3 種のキットを用い ELISA 法により行った。

そばタンパク質については 6 ヶ月、小麦タンパク質と卵タンパク質については 5 ヶ月の安定性を確認した。

3 種タンパク質ともに測定した期間内では安定しており、基材に 3 種混合した試料は外部精度調査試料として使用可能であると考える。

3 種タンパク質を添加した試料としてこしあんを基材にした試料を作製し、加熱(5 分、100 )の影響を検討した。加熱前後の含有量については、キットによって反応性が異なるものの、非加熱と加熱サンプルでは、どの特定原材料についてもほぼ同じ数値を示しており、本条件下では加熱による影響は認められない。また、加熱により鶏卵アレルギーが食品マトリックス中のグルテンなどと複合体を形成するなどにより、反応性の変化が報告されているが、今回作製した、こしあん基材中に 3 種類の特定原材料を添加した試料においては、ELISA 法による検出では、加熱によってもお互い干渉せず、安定であることがわかった。添加した各タンパク質量は微量であるため、お互いに影響がなかったことが理由として考えられた。

### 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： スプレードライヤによる玄米粉試料作製検討

昨年度、カドミウムを含む 20%米粉懸

濁液(最終作製理論濃度：0.5  $\mu\text{g/g}$ ) 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。その結果、ディスクの回転数と入り口温度は 20,000 rpm および 180 のとき最も回収率が高かった。そこで、以降の検討はこの条件を用いた。これまで、白米粉での検討を行ってきたが、玄米粉について今年度は検討を行った。玄米粉は白米粉に比べ粘性が高いことから 10%懸濁液とした。同条件下で、白米粉及び玄米粉を用い、カドミウムの最終作製濃度をそれぞれ 0.5  $\mu\text{g/g}$  および 1.0  $\mu\text{g/g}$  で作製した。白米の平均粒子径は 51.30  $\mu\text{m}$  であり、玄米は白米よりやや粒子径が小さく 46.15  $\mu\text{m}$  であったが、いずれも球状と不定形が混在した粉体であった。実際、白米粉および玄米粉共に原粉は平均粒子径が約 200  $\mu\text{m}$  と大きな粒子も多数混在しているので、造粒した粒子と大きな不定径の粒子が混在しているものと考えられた。いずれも作製理論濃度に近い粉体が作製できることが確認された。

予備検討の結果、玄米粉を白米粉と同条件下で作製できることが確認された。つぎに、実際の作製量にスケールアップすることを試みた。予備検討では米粉 1 kg の作製であったが、10 倍の 10 kg の作製検討を行った。大型のスプレードライヤ ODA-30 はこれまで検討用に用いた L-8i に比べ、直径が約 4 倍であり、試料の処理量は格段と多くなる。実際に作製する量に匹敵する量として 10 kg を作製検討した。すなわち、20%玄米粉懸濁液(最終作製理論濃度：0.5  $\mu\text{g/g}$ ) 50 L を試料とした。試料懸濁液は、スプレードライヤに供する前

にさらに均一にするために十分に撹拌した。今回の検討に用いた玄米粉は、予備検討で使用したものと同様の市販の玄米粉を用いた。予備検討の条件を参考に原液処理量は装置の性能から 35kg/h とし、ディスクは MC-125 を、その回転数は、18000rpm を、入口温度、出口温度はそれぞれ 180 および 99 とした。スプレードライヤで作製した市販玄米粉は平均粒子径 184  $\mu$ m と大きな粒子径の紛体ができた。これは、原粉と比べ平均粒子径はほとんど変わらないものの粒子径の小さいものは消失した。つぎに、市販の玄米粉は安定供給品ではないことから、今後、販売されない可能性もあり、自家製玄米粉を用いた検討を行った。市販の玄米（宮城ひとめぼれ）をスクリーンサイズ 1.0 mm で遠心粉碎し、自家製玄米粉とした。スプレードライヤの作製は市販玄米粉と同様の条件で行った。作製理論濃度も同様の 0.5  $\mu$ g/g とした。玄米粉は 2.5 kg ずつ 4 袋にサンプリングした。その 2 袋目と最後の 4 袋目を図 5 で比較した結果、終了時の方が平均粒子径はやや大きくなったが、市販玄米粉を用いて作製した時と比べ、はるかに小さい粒子径となった。市販玄米粉のときと比べ、自家製玄米粉は、プレ撹拌（羽根撹拌）（10 分）ホモミキサーを用いた本撹拌（30 分、5000rpm）およびスプレードライヤに導入する前にプレ撹拌と同様羽根撹拌を 1 時間行った。これにより、原液は細かい粒子へと分散していることが確認された。よって、スプレードライヤへ導入する前の撹拌により、粒子径は小さくなることから、撹拌条件をコントロールする必要があると考えられた。作製された自家製玄米粉中の

カドミウム濃度を測定した結果、袋番号 1 は濃度がやや低いもののそれ以外はほぼ理論値濃度であることが確認された（カドミウムの濃度は水分換算した）。これらの結果より、スプレードライヤを用いることで自家製玄米粉を基材とし技能試験用重金属検査試料が作成できることが確認された。次年度は、均質性を確認し、パイロットスタディを実施し、使用の可能性を検証する。

つぎに、技能試験用試料として残留農薬検について検討した。残留農薬は水溶性のものは少なく、有機溶媒を用いた作製の検討となった。これまで用いたスプレードライヤはいずれも水溶液用であり、有機溶媒を用いる場合は、窒素ガス密閉循環型スプレードライヤがその作製には有効の装置である。本装置 CL-8i は予備検討に使用した L-8i の密閉系の装置であり、難水溶性物質の乾燥、造粒が可能であり、窒素循環させていることから酸化防止にもなり、残留農薬検査用試料作製には適した装置であると考えられた。基材としては重金属と同様の自家製玄米粉を用い、4 種の農薬を試料作製した。本装置を使用することで、溶媒も回収でき、溶媒の沸点が低いので入口温度は低く設定できる。農薬は沸点の低いものもあり、どこまで回収できるかは不明である。そこで、アトマイザーの回転数は 20000rpm とし、重金属の条件を参考にして処理量は 2kg/h に設定し、入口温度を 120、100、80 の 3 条件で検討を行った。今回用いた溶媒はアセトニトリルであり、玄米粉と懸濁させたとき玄米粉の沈降速度が速くペリスタポンプで上方へ送液中に玄米粉粒子が沈降するスピードが速く、微細な粒

子が先に導入されて、大きな粒子が遅れて導入されることがわかった。また、吸い込み口を下げると、大きな粒子も導入されるため、回収量が多くなることも確認された。よって、攪拌や導入口の位置など検討する必要があることがわかった。熱風入口温度を変えた時の粒子径を比較した顕微鏡写真から、温度が下がるに従い平均粒子径は大きくなることが確認された。Lot 1、Lot 2 および Lot 3 はそれぞれ 120、100、80 のときの回収率を示している。これらの結果から、Lot2 はいずれの農薬も回収率が低く、おそらく送液および攪拌方法を変更したことから回収率が変化したものと考えられたが、詳細は不明である。いずれの農薬も Lot1 (120) よりも Lot3 (80) の方が回収率は高くなった。また、低沸点の農薬程回収率が低くなった。これは沸点の低い農薬は容易に揮散することが推察された。これらの結果から、重金属の作製においては水を溶媒として用いたのに対して、農薬は有機溶媒を使用していることから玄米粉への溶媒の浸透度の違いがあり、農薬は玄米粉中への浸透は少なく、回収率が低くなったと考えられた。次年度は、水を添加することで回収率が改善するか検討する予定である。今後さらなる検討が必要である。

### 3.4 EU から検査を求められている物質に関する試験法の妥当性評価の実施：

#### 1) EU 規制に基づく妥当性評価

アフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub>

##### 1) 特異性

アフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> のいずれにおいても、定量を妨害するピー

クがないことを確認した。

##### 2) 真度(回収率)

真度の評価基準、-50 % ~ +20 % (50 ~ 120 %) に対し、いずれの添加濃度においても基準を満たす結果が得られた。

##### 3) 検量線

アフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> の決定係数はいずれも 0.995 以上の結果が得られた。

##### 4) 精度

いずれの添加濃度においても、アフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub> 及びアフラトキシン G<sub>2</sub> は評価基準を満たす結果が得られた。

##### 5) 決定限界(CC)

算出した。

##### 6) 検出能力(CC)

算出した

### チルバロシン

##### 1) 特異性

チルバロシン及び 3-0-アセチルタイロシンともに、定量を妨害するピークがないことを確認した。

##### 2) 真度(回収率)

真度の評価基準、-20 % ~ +10 % (80 ~ 110 %) に対し、いずれの添加濃度においても基準を満たす結果が得られた。

##### 3) 検量線

チルバロシン及び 3-0-アセチルタイロシンの決定係数はいずれも 0.995 以上の結果が得られた。

##### 4) 精度

いずれの添加濃度においても、チルバロシン及び 3-0-アセチルタイロシンは評価基準を満たす結果が得られた。

#### 5) 決定限界(CC )

算出した。

#### 6) 検出能力(CC )

チルバロシンの CC は 62.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、  
3-*O*-アセチルタイロシンの CC は 67.7  
 $\mu\text{g}/\text{kg}$  と算出された。

以上のことから、アフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、  
G<sub>1</sub> 及び G<sub>2</sub> の試験法は豚筋肉を対象とした定  
量下限 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  での残留分析法として、ま  
た、チルバロシンの試験法は鶏肝臓を対象  
とした基準値 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を評価する残留分  
析法として、いずれも妥当であると評価さ  
れた。

### 2) 内部精度管理の実施

3 回のブランク試験結果、添加回収試験  
の回収率及び3回の添加回収率の CV を求め、  
いずれの分析法においてもブランク試験で  
は定量を妨害するピークがないことを確  
認した。また、添加回収率は全て 70 ~ 120 %  
を満たしていた。CV は乳のエリスロマイシ  
ンで 14.7 %であったが、いずれの項目でも  
暫定目標とした 15 %以内であり、管理目標  
として概ね妥当と考えられた。

以上のことから、試行回数 3 回と評価回数  
は少ないものの、設定した管理基準に対し、  
これらの試験はいずれも安定的に実施出来  
ている結果が得られた。

### 3.5 精度管理システムの運用に係る EU リ ファレンスラボラトリーの現地調査の実 施：

#### 1) EU モニタリングシステムと BVL の役割

EU のモニタリングシステムは、EU  
reference laboratories (EURL)、National  
reference laboratories (NRL)、Routine

field laboratories により構成されてい  
る。その頂点に EURL、次いで NRL、Routine  
field laboratories とピラミッド構造に  
なっている。NRL は EU 加盟国ごとに設置  
されている。EURL 及び NRL はバリデーシ  
ョンコンセプトの開発、外部精度管理の実  
施、分析法開発と妥当性評価、疑義が生じ  
た際の確認試験などをタスクとしている。  
また最大のタスクは EU 加盟国間の違いを  
埋めていくことである。EURL と NRL は下  
位のラボを技術的、科学的にサポートする。

BVL はドイツの Braunschweig に本部を  
置く EU のリファレンスラボである。5 つ  
の部門からなり、EU 内及びドイツ連邦の  
食品安全管理に関与している。1999 年に  
ISO17025、2017 年に ISO17043 の認証を受  
けている。

訪問したラボは残留農薬や抗生物質のモ  
ニタリングを担当しており、検査法の確立  
などを任務としている。

#### 2) 外部精度管理

BVL では外部精度管理も実施している。  
外部精度管理試料の作製も行っており、作  
製した試料は自ら測定するとともに他機  
関へ配付する。外部精度管理試料は代謝物  
の評価を行うために動物への投与により  
行っている。最近では鶏の羽根を試料とし  
た外部精度管理試料も作製している。

日本では検疫の問題で獣畜肉等をマト  
リックスとする外部精度管理試料の輸入  
が困難であるが、ドイツにおいても同様の  
問題は発生しており、南米からの輸入など  
は困難なことがある。

#### 3) 内部精度管理

内部精度管理には CRM を用いるのが望  
ましいが、CRM は手に入りにくい場合が多

い。そのため CRM が入手できない場合にはリファレンスマテリアルまたはスパイクしたブランクサンプルを用いて、分析バッチごとで添加回収試験を行う。同じ添加回収サンプルを 2 回測定する。

異なるサンプルを同時に分析する場合に何を用いて内部精度管理を行うかはメソッドによる。同じ方法でできるのであれば並行して実施する。

#### 4) 分析法の妥当性評価

残留動物用医薬品の残留管理は Commission Decision 2002/657/EC に規定されており、分析法の妥当性評価もこれに従う。

最近ではクラシカルなバリデーション手法ではなく開発されたソフトウェア「InterVal」を利用した Alternative Validation Approach が使われている。マトリックスや畜種などを包括的に評価できるように実験設計され、統計学的に変化の要因を組み合わせることで試験回数を減らすことができることから効率的な妥当性評価が可能となり頑健性評価も可能となる。

#### 5) 決定限界(CC )と検出能力(CC )

日本において、食品中の農薬や飼料添加物及び動物用医薬品の濃度が食品衛生法に定められている規格基準への適合性について判断を行うための試験法の妥当性評価は「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」(平成 22 年 12 月 24 日 食安発 1224 第 1 号)に示されているが、日本では食品衛生法の規格基準への適合判断において CC、CC は用いていないため、同ガイドラインには CC と CC についての記載はない。しかし EU においては各試験法の CC、CC は

結果判断の重要な判定基準となることから、その意味と算出方法を理解することは重要である。そのためそれらについてのレクチャーを受けた。

エラーは、不適合な測定値が得られたとしても、試験されたサンプルが適合している確率を意味する(誤った不適合の判断)。Commission Decision 96/23/EC の附属書 I のグループ A にリストされている物質及び基準値が設定されていない物質については、エラーは 1 % 以下でなければならない。他のすべての物質については、

エラーは 5 % 以下でなければならない。CC は過剰な生産者リスクを防ぐため、95 ~ 99 % まで本当に確かでない限りは生産者に責任を負わせず(生産者保護)、許容できる範囲を本当に超えた場合のみ生産者に責任を負わせるために使用される。

一方、エラーはサンプルが適合している測定値が得られているのに真に不適合となる確率を示す。CC は消費者リスクをなくするため(消費者保護)、偽陰性を 5 % 以下で排除できる分析能力を示すものである。

#### 6) 機器分析における精度管理

BVL において実際に分析を行う際の機器の精度管理についてレクチャーを受けた。

機器測定の際、測定バッチの最初と最後に同じ濃度の標準溶液(QC 標準溶液)を測定する。SN 比または AREA 値を毎回プロットして 2 を超えたらバッチを採用しない。

測定バッチは溶媒ブランク、QC 標準溶液、検量線、測定サンプル、溶媒ブランク、QC 標準溶液の順に測定する。検量線は毎回作成する。マトリックス検量線または添加検量線の場合はマトリックスごとに検

量線を作成する。検量線用の標準溶液はキャリアオーバーの影響を排除するためにランダムに注入する。

#### 7) その他

EUにおけるモニタリングはまずスクリーニング法が用いられる。スクリーニング法で不適合になった場合は確認法での試験を行い、結果判断される。スクリーニング法の妥当性評価は Community Reference Laboratories residues 20/1/2010 に従って実施する。

### 4 松田研究分担

#### 1) 分析法性能確認結果

検量線については、デスフロイルセフチオフル濃度 0.0025、0.005、0.025、0.05、0.1 mg/mL の検量線作成用標準溶液を測定し、検量性を作成した。検量線の相関係数は 0.999 以上であった。エンロフロキサシン及びシプロフロキサシン濃度 0.25、0.5、1、2.5 及び 5 µg/L の検量線作成用標準溶液を測定し、検量線を作成した。検量線の相関係数はいずれも 0.999 以上であった。

選択性は、ブタ筋肉を試験したところ、クロマトグラム上に、デスフロイルセフチオフル、エンロフロキサシン及びシプロフロキサシンの定量を妨害するピークは現れなかった。

真度及び精度は、性能確認結果 10 個の総平均の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。その結果、セフチオフル分析法の真度は 109%、併行精度は RSD 2.6%、室内精度は RSD 4.8% であった。エンロフロキサシンの真度は 85.1%、併行精度は RSD 2.3%、室内精度は RSD 3.1% であ

った。シプロフロキサシンの真度は 83.3%、併行精度は RSD 2.9%、室内精度は RSD 3.4% であった。Codex Procedural Manual<sup>1)</sup> に示された真度の規準は、セフチオフル添加量の 0.2 mg/mL、エンロフロキサシン及びシプロフロキサシンの添加量の 1.0 mg/mL では、80-110% である。性能確認で得られた真度はこの規準を満足していた。

Horwitz 式の Thompson 修正式<sup>2,3)</sup> (以下 Horwitz 式) により予想される室間精度は、セフチオフル添加濃度では RSD として 20%、エンロフロキサシン及びシプロフロキサシン添加濃度では RSD として 16% である。得られた室内精度はこれらの値の 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。

#### 2) 試料の均質性確認

作製した試料からランダムに 10 個を抜き取り、セフチオフル及びエンロフロキサシンを 2 回分析した結果を分散分析し、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。The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories<sup>4)</sup> に示されている Recommendation 7 及び 8 により試料の均質性の評価を行った。Recommendation 7 は、均質性試験に使用された分析法の繰り返しの標準偏差  $s_{an}$  が Horwitz 式から予測される室間精度  $\sigma_p \times 0.5$  以下であれば、妥当と評価される。Recommendation 8 は試料間の均質性の評価である。試料数 10、繰り返し分析数 2 であれば、試料間の分散を  $s_{sam}^2$ 、 $\sigma_{all} = 0.3 \times \sigma_p$  とするとき、

$$s_{sam}^2 < 1.88 \times \sigma_{all}^2 + 1.01 \times s_{an}^2$$

を満たせば試料は均質と判断される。均質性試験結果をTable 6に示す。全ての化合物において、Recommendation 7と8の条件を満足したため、試料は技能試験に適切な均質性を有すると評価した。

エンロフロキサシンを添加して作成した試料の均質性も、同様に確認した。この試料においても Recommendation 7 と 8 の条件を満足した。

### 3) 技能試験パイロットスタディ

19 か所の試験所から参加の申し込みがあった。1 か所が国の機関、12 か所が地方自治体の衛生研究所、6 か所が登録検査機関であった。各試験所に試料 1 個を送付した。分析方法は、各試験所が日常的に行っている方法とした。全ての試験所から報告があり、すべての試験所がエンロフロキサシンとシプロフロキサシンの結果を報告したが、1 試験所がエンロフロキサシンの結果のみを報告した。セフチオフルの結果を報告した試験所は5 か所であった。

エンロフロキサシンのヒストグラムは、中央が高く対称的だが、値の高い側と低い側に離れた値が見られた。シプロフロキサシンのヒストグラムは高濃度側に離れた値が2 つ見られた。エンロフロキサシン濃度はシプロフロキサシン濃度の30 倍程度のため、エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの和のヒストグラムは、エンロフロキサシンとよく似た形となった。

### 4) 参加試験所の評価

参加試験所が少数の場合の評価方法を示した IUPAC/CITAC ガイド “ Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants –chemical analytical laboratories ”<sup>5)</sup>では、参加試

験所数  $N < 20$  のとき、ロバスト統計は推奨されないとされている。このような場合の試料の付与値の決定法として、認証標準物質あるいは認証物質にトレーサブルな試料を開発することが示されている。また、標準偏差としては、Horwitz の式による室間再現標準偏差の予測値を用いることが示されている。昨年度のオカダ酸技能試験では、認証標準物質を用いて真度を検証した方法で試料を分析した結果を付与値とし、Horwitz 式により求めた室間標準偏差を標準偏差とした。本年度の分析対象物質であるエンロフロキサシン及びシプロフロキサシンには適切な認証標準物質がないため、添加により性能を確認した分析法により、試料濃度を求めた。

エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、両者の合計の通常の前平均値、ロバスト平均値、分析による付与値はほぼ一致した。一方、ロバスト標準偏差は通常の標準偏差よりも小さくなった。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ており、これらの値が通常の標準偏差を大きくしたと考えられた。Horwitz 式により推定したエンロフロキサシン、エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの合計の室間標準偏差は、ロバスト標準偏差よりやや大きかった。これに対して、シプロフロキサシンの推定室間標準偏差はロバスト標準偏差より小さかった。

エンロフロキサシンの  $z$ -スコアは-2.47 ~ 3.31 の範囲にあり、19 試験所中 17 試験所が  $|z\text{-スコア}| \leq 2$  となり、満足と評価された。 $|z\text{-スコア}| \leq 3$  となり、不満足となった試験所数は1 であった。シプロフロキサシンの  $z$ -スコアは-2.43 ~ 6.81 の範囲に

あり、18 試験所中 14 試験所が | z-スコア | 2 となり、満足と評価された。| z-スコア | 3 となり、不満足となった試験所数は 2 であった。エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの和の z-スコアは -3.07 ~ 3.75 の範囲にあり、18 試験所中 16 試験所が | z-スコア | 2 となり、満足と評価された。| z-スコア | 3 となり、不満足となった試験所数は 1 であった。また、エンロフロキサシン報告結果のロバスト標準偏差は予測された室間標準偏差よりも小さいために、ロバスト統計量から計算した z-スコアが 3 以上で、不満足となった試験所数は増加して 2 となった。

#### 5) 添加試料のエンロフロキサシン分析

技能試験試料のエンロフロキサシン濃度の平均値に近い 2.1 mg/kg を添加した試料の分析結果の平均値は 2.08 mg/kg、標準偏差は 0.44 mg/kg であった。数が少ないためロバスト統計量は計算しなかった。平均値は添加量に近い値となり、相対標準偏差も 22% で、技能試験試料の分析結果の RSD である 21% とほぼ同じであった。このことから、動物に投与して作成した試料と添加試料間で、エンロフロキサシン分析結果の分布に大きな違いはないと考えられた。2 試料の分析を行った 10 試験所中 8 試験所のプロットは直線状に並んだが、2 試験所の結果は直線から離れていた。この 2 試験所の技能試験試料のエンロフロキサシン結果は、低い方からの 2 つであったが、添加試料では平均値よりも高い分析結果となった。

以上の結果から、通常の試験所においては、エンロフロキサシンを投与した動物から作製した試料と、エンロフロキサシンを添加した試料との分析結果には強い相関が

あると考えられた。一方、2 か所の試験所はこのような相関に従わず、投与した試料においては低濃度の結果が得られた。実際の検査では、動物に投与した動物用医薬品が残留した試料が分析されるため、投与により作製した試料による技能試験は、添加により作製した試料を用いるよりも、実際の結果の変動をよく反映していると考えられた。

### 5 井部研究分担

#### 1) 試料の均質性評価

動物薬を投与した畜肉を用いて作製した試料および動物薬を添加して作製した試料について均質性の評価を行った。均質性の評価は、The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories に示されている Recommendation 8 に従った。試料数 10、繰り返し分析数 2 であれば、試料間の分散を  $s_{sam}^2$ 、 $\sigma_{all} = 0.3 \times \sigma_P$  とするとき、

$$s_{sam}^2 < 1.88 \times \sigma_{all}^2 + 1.01 \times s_{an}^2$$

であれば試料間は均質であるという条件を満たしていたので、試料は均質であると判断された。これにより、実際に動物薬を投与した畜肉を用いた技能試験用試料 42 試料、動物薬を添加した技能試験用試料 35 試料を得ることができた。

#### 2) 下痢性貝毒の保存安定性試験

一年目に作製した試料から、製造後 12 ヶ月目と 17 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。表 1 に示すとおり、12 ヶ月目は 0.139 mg/kg、0.140 mg/kg、17 ヶ月目は 0.147 mg/kg、0.144 mg/kg であった。均質性評価時の 10

試料の 2 併行試験の総平均 0.146 mg/kg ± 0.0049 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、安定性の分析値は 95%の信頼区間に納まっていた。このことから、下痢性貝毒の技能試験試料は常温で 1 年間は安定である事が確認された。

### 3) 動物薬を投与した検討試料の保存安定性試験

-20 で保管をしていた均質性評価時の 10 個の残試料中のセフチオフル、エンロフロキサシン濃度を測定した。それぞれから、2 試験試料を採取し測定した結果を表 2 に示す。11 ヶ月保存後の試料中のセフチオフルの総平均は 0.151 mg/kg、標準偏差は 0.012 mg/kg、エンロフロキサシンの総平均は 1.956 mg/kg、標準偏差は 0.080 mg/kg であった。均質性評価時の 10 試料の 2 併行試験のセフチオフルの総平均は 0.163 mg/kg、標準偏差は 0.011 mg/kg、エンロフロキサシンの総平均は 2.451 mg/kg、標準偏差は 0.158 mg/kg であった。11 ヶ月の冷凍保存により、セフチオフルは約 7.4 %減少、エンロフロキサシンは約 20.2 %減少し、安定性は確認されなかった。今後は、動物薬の種類による安定性の違い、どの期間まで動物薬が安定であるのかを検証していく必要がある。

### 4) 一般生菌数定量試験の予備検討

試料調製の委託先である日本ハム株式会社の品質保証担当部署に予備試験の参加を募ったところ、グループ会社も含めて 4 社 8 部署 26 名の参加者が得られた。参加者の都道府県は、青森県 2 名、茨城県 5 名、神奈川県 7 名、三重県 2 名、兵庫県 3 名、宮崎県 7 名であった。試料の配送温度を常温で

実施したことから、予備試験実施時期は外気温が比較的低い 3 月 6 日に実施した。

一般生菌数定量の予備試験結果は、参加機関から報告された一般生菌数とその常用対数変換値および z スコアを算出した。z スコアの算出には微生物試験において一般的な室間再現性と言われている 0.25 を標準偏差として用いた。参加機関から報告された一般生菌数の常用対数変換値より参加機関から報告された報告値は良好な正規分布を示していた。また、参加機関の z スコアは以下の通りであった

$|z| \leq 2$  : 25 人 (96.2 %)

$2 < |z| < 3$  : 1 人 (3.8 %)

$|z| \geq 3$  : 0 人

報告値が概ね正規分布を示す場合、 $|z| \leq 2$  となる確率は 95.5%、 $2 < |z| < 3$  となる確率は 4.28%、 $|z| \geq 3$  となる確率は 0.26% である。今回はパイロットスタディを行うにあたっての予備的な検討という事で 26 名という少数の参加者で試験を実施した。参加者数が少ないものの参加者の報告値が正規分布を示したこと、統計学的に期待される z スコアであったことから、今回の予備的な検討をスケールアップすれば、一般生菌数の技能試験パイロットスタディを問題なく実施できる事が期待される結果となった。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yarita T., Otake T., Aoyagi Y., Takasaka N., Suzuki T., Watanabe T.: 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.*, 101(4), 1199-1204 (2018)

2) Yoshimitsu M, Akutsu K, Kitagawa Y, Takatori S, Fukui N, Osakada M, Yamaguchi S, Namikawa M, Ban S, Okubo Y, Nakashima R, Maruyama R, Kakutani N, Miyamoto I, Yamashita K, Nishiyama T, Shinto M, Yamamoto N, Takai Y, Hinoshita K, Kajimura K, Obana H, Watanabe T: Enhancement of pesticide peak response in GC-MS in the presence of multiple co-existing reference pesticides, *Food Hyg. Saf. Sci.*, 59(3), 146-150 (2018)

3) Yamazaki T, Miyake S, Sato N, Hirakawa Y, Iwasa S, Narita H, Watanabe T: Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Analysis of Total Aflatoxins Based on Monoclonal Antibody Reactive with Aflatoxins B1, B2, G1 and G2, *Food Hyg. Saf. Sci.*, 200-205 (2018)

## 2. 学会発表

1) 池田真希, 久保田佳子, 八木真美, 平林尚之, 高坂典子, 鈴木達也, 渡辺卓穂: 玄米試料を用いた残留農薬技能試験プログラムのパイロットスタディ, 第114回日本食品衛生学会学術講演会(広島)2018

2) 若栗忍, 久保田佳子, 佐藤夏岐, 鈴木達也, 渡辺卓穂: アレルギー物質(卵タンパク質)を含む特定原材料検査のための技能試験プログラムのパイロットスタディ, 第114回日本食品衛生学会学術講演会(広島)2018

## F. 知的所有権の取得状況

なし