

# まえがき

食品の偽装表示、輸入食品の毒物混入など、食品に係る不安を煽る事件が頻発しており、国民の食品に対する信頼が損なわれている。信頼回復には、食品の安全や適正表示を保証する技術の開発が重要であり、そのような技術開発は食品総合研究所（食総研）の責務のひとつである。農産物の品種、産地、遺伝子組換え体などの判別技術、有害微生物や有害物質の検出技術は、食品の安全・信頼の確保の有力な手段となるものである。食総研は、米の品種判別技術、米や野菜の産地判別技術、大豆やトウモロコシの遺伝子組換え体の検出・定量技術、農産物中の重金属の分析技術、アクリルアミドやトランス脂肪酸のような食品加工中に生じる有害物質の分析技術、食中毒菌の簡易迅速検出技術など、多くの食品の安全・信頼確保に資する研究を実施している。

従前の食総研は、新しい技術を開発して学会などで発表すれば責務を果たしていたが、独立行政法人となった現在、開発した技術が社会に利活用されなければならない。食総研は、判別・検知技術のような分析技術について、新しい技術を開発するだけでなく、それらが適切かつ有効に利用されることを目的とした研究を実施している。すなわち、試料のサンプリング法とデータの取扱法、開発した技術の試験室間共同試験による妥当性確認、研究室の技能試験（プロフィシエンシィテスティング）への参加、標準物質の作製と配付・頒布など、数年前までは食総研のほとんどの研究者が用語も知らなかった研究・業務が、日常的に実施されている。

食糧46巻では、これら一連の研究・業務について、具体例を示しながら、分かりやすく解説する。食品に係る研究者や技術者だけでなく、食に関心をお持ちの多くの方々にも広く活用して戴くとともに、分析技術の開発・普及に至る作業及び現在の食総研の活動について少しでもご理解戴ければ幸いである。

平成20年3月

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所  
所 長 林 徹

# I 食品分析に求められていること

## はじめに

分析値の「質」が問われている。分析値は数字に過ぎず、そのものの試験は不可能であり、数字が一人歩きしてはしばしば問題を起す。そのため、分析値の信頼性を確保して提示することが、食品分析を行う機関にとっては重要な課題である。

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 (Codex Alimentarius Commission: 以下 CAC) では、食品の輸出入に係わる試験所の条件として、① ISO/IEC Guide25 (1990) [現 :ISO/IEC17025 (2005)] (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項；通称、試験所認定) に適合していること、②適切なプロフィシエンシテスティング<sup>1)</sup> (Proficiency Testing, 以下 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(品)質管理<sup>2)</sup> (内部精度管理) を行っていること、をガイドライン (CAC/GL27-1997) で挙げている。そして、食品規制に係わる試験所の管理：推奨事項のガイドライン (CAC/GL28-1995, Rev.1-1997) で、試験所の品質保証のために、PT と試験室間共同試験 (以下、室間共同試験) のプロトコル<sup>1,3)</sup> と内部(品)質管理の<sup>2)</sup> ガイドラインを挙げている。

農林水産省は2005年6月、農産物や食品に含まれる有害化学物質を対象にした「サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン」のうち、「評価・公表」の部分を行先行して策定・公表しているが、そこでは、分析によって得られた数値・情報を確認・評価する項目 (表1) が報告様式に挙げられている。

**表1 分析によって得られた数値・情報の確認・評価項目**

- 
1. 試料の保管期間と保管方法
  2. 分析法の妥当性確認
  3. 定量限界と検出限界の適切さ
  4. 検量線及び使用標準試薬の適切さ
  5. 標準添加回収率
  6. 測定の不確かさ (繰返し分析又はその他の方法による)
  7. 分析値
  8. 有効数字
  9. 内部精度管理
  10. 外部精度管理
  11. ISO/IEC 17025 認定
  12. サンプリング法 (実施した場合)
-

また、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」（H9.4.1, 衛食117号）を通知し、内部精度管理と外部精度管理を規定している。

これらの項目は、今後、一般の食品分析試験室においても、分析値を外部に発表する時には考慮することが必要である。ここでは、食品の分析値の信頼性を確保するために必要な事項について、概説する。

## 1. 使用する分析法

### 1.1 分析法の妥当性確認 (Method Validation)

「妥当性確認とは、意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、客観的な証拠を用意すること (ISO/IEC17025)」であり、「意図する特定の用途」によって、要求事項とその優先度が異なってくる。目的が、サーベイランス（問題の程度を知る、又は、実態を知るために調査すること）であるのか、モニタリング（矯正措置をとる必要があるかどうかを決定するために、傾向を知ること）であるのか、あるいはコンプライアンス（経済上あるいは法律上の命令遵守を決めるため）であるのかによって、適用性、実用性あるいは信頼性（表2）のどれを優先させるかを考えなければならない。サーベイランスであれば、多数点の試料を分析する必要から、実用性の中の迅速性が最も要求されるだろうし、コンプライアンスの判定では、信頼性が最重要である。

分析法の妥当性を確認するには、いくつかの方法があるが、複数の分析試験室が参加して行う共同試験によるものが最も有効である。これは、規制や規格に係わる分析では、室間での再現性が最も重要な性能であることによる。均質性が担保された複数の試験材料が複数の分析試験室に配付され、各分析試験室は決められた分析手順書に従って分析し、報告する。化学分析における定量分析のIUPAC（国際純正応用化学連合）などによる合意プロトコルでは、外れ値を報告した試験室を除いた有効なデータを出す試験室数は、8以上で、試験材料数は最低5である<sup>3)</sup>。繰返し精度推定のための試験材料当たりの反復数は2で、2試料の濃度差が5%以内のユーデン対や同じ試験材料をそれと分からないように2試料とする非明示反復が推奨されている。このプロトコルは、ゴールデンスタンダードと呼ばれ、これに基づいた室間共同試験は、フルコラボ（full collaborative

表2 分析法の特性とその性能項目

適用性	試料の種類の種類
実用性	経費効率、迅速性、訓練の制約、分析者の安全性/快適性
信頼性	選択性、検量線の直線性、真度、回収率、精度、範囲、 検出限界、定量限界、感度、頑健性

study) と呼ばれている。食総研は、国立医薬品食品衛生研究所、(独)農林水産消費技術センター等と協力して遺伝子組換え農産物(以下GMO)の定量法を開発し、室間共同試験によって、その妥当性を確認した。日本、韓国の標準分析法に採用され、ISO21570(食品-遺伝子組み換え生物及び派生製品の検出のための分析方法-定量的核酸基準法)の付属書にも収載されている。(独)農林水産消費安全技術センターは、JAS法の見直しにおいて、使用する分析法については、フルコロポで妥当性の確認を行っている。また、定性分析では、国際的に合意されたプロトコールはまだないが、AOAC INTERNATIONAL(以下、AOAC)のガイドラインでは、有効試験所数は10カ所以上、試料は1マトリックス(分析対象成分を含有する基材)当たり2濃度、1濃度当たり6試料、1マトリックス当たり陰性コントロール6個とされている。

分析法の確立のためには、室間共同試験の実施が重要であることが認識される必要があり、農水省の特別プロジェクト「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」においても、品種識別等の分析法の確立に、室間共同試験による妥当性確認を積極的に取り入れている。

室間再現性に関しては、AOACによって実施された多くの室間共同試験の結果から、室間再現精度(室間相対標準偏差,  $RSD_R\%$ , で表す)は、分析対象試料の種類、分析対象成分や定量法にかかわらず、濃度の変数になり、次式(Horwitz式と呼ばれる)で示されることが報告されている<sup>4)</sup>。

$$RSD_R(\%) = 2c^{-0.1505} \dots (1)$$

ここで、 $c$ は質量分率で、濃度100%では1、1%では0.01、1ppmでは $10^{-6}$ を代入すれば良い。

ただし、この式(1)に従うと、極微量では室間再現精度は際限なく大きくなるので、近年、Thompsonによって次の修正式(2)が提案され<sup>5)</sup>、こちらにも使われるようになってきている。

$$RSD_R(\%) = \begin{cases} 22 & c < 1.2 \times 10^{-7} \\ 2c^{-0.1505} & 1.2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0.138 \\ c^{-0.5} & c > 0.138 \end{cases} \dots (2)$$

この式(2)では、濃度が120ppb未満では、室間の相対標準偏差は22%の一定となり、120ppb以上、13.8%以下では、先のHorwitz式と同じで、13.8%を超える濃度では質量分率の平方根の逆数となる。各濃度レベルのHorwitz式とその修正式による室間相対標準偏差を表3に示す。

次式(3)で示される室間共同試験で得られた相対標準偏差のHorwitz式による相対標準偏差との比であるHorRatは、化学分析法の室間共同試験の評価に用いられ、CACにおける分析法のチェックリストにも使用されていて、HorRat<sub>R</sub>が、2

表3 各濃度レベルにおける室間相対標準偏差, %

濃度		室間相対標準偏差, %	
質量分率	一般的な単位	Horwitz式による	修正式による
		1	100%
0.01	1%	4	4
0.0001	0.01%	8	8
0.000001	1ppm	16	16
0.00000001	10ppb	32	22
0.000000001	1ppb	45	22

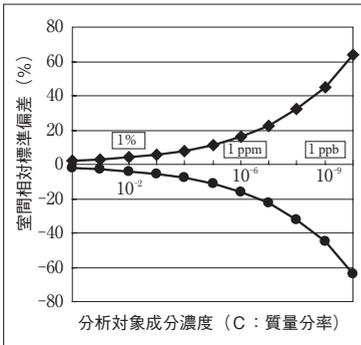


図1 Horwitz 式によるグラフ

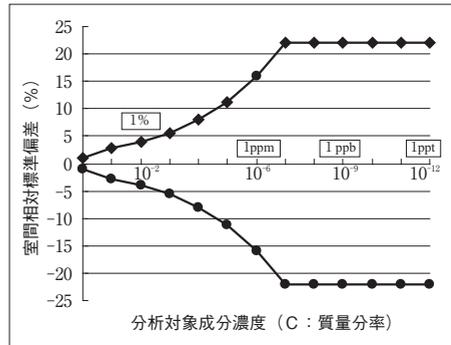


図2 Thompson による修正式のグラフ

以内ならば、分析法は良好と判断される。

$\text{HorRat}_r = \text{RSD}_R$  (室間共同試験による観測値)

／  $\text{PRSD}_R$  (Horwitz式からの予測値) … (3)

また、繰返し精度については次の式が提案され、 $\text{HorRat}_r$ が0.5～2であれば良好と判断される。

$$\text{RSD}_r (\%) = c^{-0.1505} \quad \dots (4)$$

しかし、室間共同試験によって妥当性が確認された方法が、必ずしも利用できるとは限らない。費用がかかる共同試験実施前の分析法の性能確認、共同試験のデータがないか共同試験の実施が現実的でない分析法の信頼性の提示、既存の妥当性が確認された分析法の適切な使用の確認には、単一試験室による分析法の妥当性確認が適当である<sup>6)</sup>。しかし、単一試験室による分析法の妥当性確認では、文字通り室間再現性は評価できず、使用できるのはモニタリングまでである。

## 1.2 不確かさの見積り

化学分析では、種々の要因により分析結果がばらつき、その信頼性は、真度や精度などで表現されてきたが、最近、それらにかわって「不確かさ」(uncertainty)を付けて分析値を評価するようになってきた。不確かさは、分析値の確からしさを示すもので、幅で示され、その幅の中に真の値が存在すると考える。不確かさは、サンプリング、分析方法などに含まれる多くの要因からなっている。不確かさの求め方には、それぞれの要因の不確かさを見積もって、総合的な不確かさを求めることが行われているが、室間共同試験の再現精度を用いる方法なども提案されている。

標準偏差として表すとき、不確かさは、標準不確かさと呼ばれる。各要因の標準不確かさをまとめたもの(各要因の分散の和の平方根)が合成標準不確かさで、信頼水準約95%(99%)では、包含係数 $k=2$ ( $k=3$ )を乗じた拡張不確かさが用いられる。

国内では、規制分野で規制値がある場合でも、測定値の不確かさをどのように扱うかについて、すなわち不確かさの範囲が規制値をまたぐ場合(図3)についての論議が行われていない。しかし、世界は確実に不確かさを評価する方向に進んでおり、行政サイドでの早急な対応が必要である。

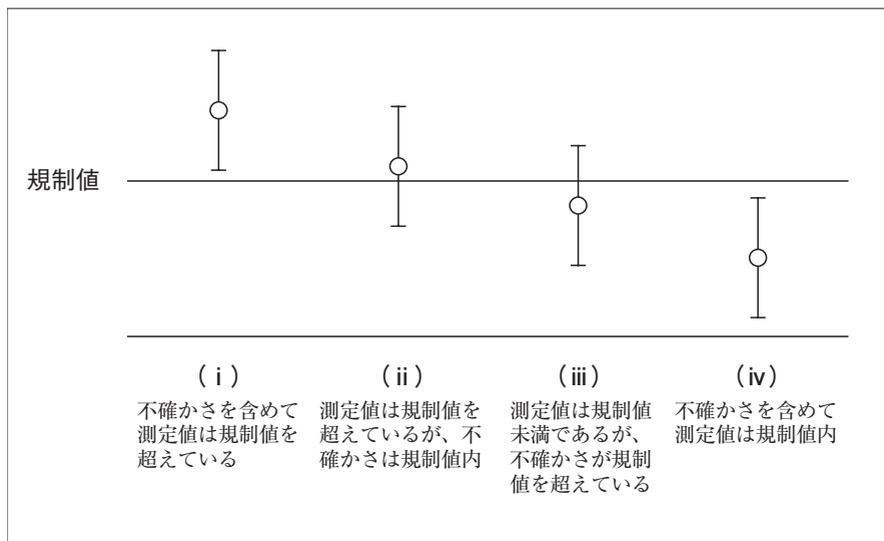


図3 規制値と測定値±不確かさ

## 2. 内部（品）質管理

### 2.1 分析法の真度の確認

#### 2.1.1 標準物質の利用

分析法の妥当性確認や内部(品)質管理における分析法の真度の確認には、分析対象試料と似たマトリックスで測定対象成分の認証値が決められている認証標準物質（Certified Reference Material: 以下CRM）がある場合は、これを利用する。また、化学分析における測定値も、国際単位系（SI）であるモルにトレーサビリティ（traceability）があることを要求されている。トレーサビリティとは、「もとをたどることができる」という意味であり、「測定結果または標準値が不確かさをつけて、切れ目のない比較の連鎖を通じて国家標準または国際標準に関連づけられ得ること」と定義されている。化学分析においては、CRMの測定を通して、トレーサビリティを確保する必要がある。

しかしながら、国内で作製された食品関係のCRMは、国立環境研究所が環境標準試料として作製したものの一部などに限られていて、外国のものを使用することが多いのが現状であるが、外国製は、植物防疫、動物検疫等の関係で輸入できない場合がある。(独産業技術総合研究所の計量標準総合センターは、知的基盤整備の一環として、精力的にCRMの開発を行っているが、食総研は、計量標準総合センターなどと連携して食品標準物質の作製を積極的に進める方針で、JIS Q0034 (ISOガイド34: 標準物質生産者の能力に関する一般要求事項) 及びJIS 17025 (ISO/IEC17025) による標準物質生産者の認定を2007年3月に取得して、現在、ダイズ及びトウモロコシのGM標準物質作製を行っている。

#### 2.1.2 標準物質のデータベース

目的とするCRMの検索には、次のデータベースが、いずれも、(独製品評価技術基盤機構)のweb.site (<http://www.rminfo.nite.go.jp/index.html>) から利用できる。

##### (1) 標準物質総合情報システムRMInfo

標準物質総合情報システム（RMInfo:reference materials total information services of Japan）は、国内の機関が供給している標準物質のデータベースで、(独製品評価技術基盤機構)の認定センターが運営している。標準物質に関する行政情報、海外動向なども入手できる。カテゴリーが、鉄鋼標準物質、非鉄標準物質、無機標準物質、有機標準物質、物理的特性用標準物質、生物学・臨床用標準物質、生活関係標準物質及び産業用標準物質に大分類されていて、食品は生活関係標準物質に含まれている。

##### (2) 国際標準物質データベース（COMAR）

COMAR（コマール）（COde d'indexation des MAteriaux Reference）は、世界16カ国以上で製造された総計1万件を超える標準物質が登録されている国際的なデ

ータベースで、(独)製品評価技術基盤機構が1990年以来コーディングセンターとして参画している。COMARには、物質の形状、製造業者の連絡先、化学特性や物理特性に関する特性値等、標準物質に関する様々な情報が収録されている。画面操作の多くが日本語表記となっていて、操作が容易である。

### (3) 海外の標準物質データベース

ベルギーのIRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)、アメリカのNIST (National Institute of Standards and Technology) など14機関のデータベースとリンクされている。

#### 2.1.3 添加回収試験の実施

回収率は、常に分析法の妥当性確認において検討されるべき項目で、実際の試料で添加回収試験を行い、十分な回収率が得られることを確かめる。ただし、添加は分析操作の初期の段階で行うことが重要である。一定の回収率が得られている場合には、その測定値を補正して値を報告する。それは、測定値そのものが規制値内の範囲であっても、補正することで規制値を超える場合が出てくることを意味する。EUでは、この方向で進んでいる。

添加回収試験は、分析対象試料が含有していた分析対象成分と添加したものとの違いがあるため、十分な回収率が得られても、必ずしも方法が妥当であることを示すことができない短所があるが、不十分な回収率は、方法が不適切であることを示すことになる。

「はじめに」で紹介した「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」(厚生省通知の理化学的検査における精度管理では、添加量が明らかな試験品として、検査対象成分の濃度の異なる2つの試験品(①基準値と同濃度になるように添加したもの、②基準値と定量下限値の中間値の濃度となるように添加したもの)と陰性対照の試験品を用意する。精度管理に必要な目標値の設定では、回収率の確認は、基準値が設定されているものでは、先の2レベルの濃度の試験品と不検出基準が設定されている場合は、定量下限値の2倍濃度に添加した試験品で、回収率が70%から120%を目安として確保するとしている。精度管理の回数は、検査等の実施頻度によって異なり、①週1回以上の検査では、週に1回以上、添加量が明らかな2レベルの濃度の試験品のどちらか一方と陰性対照の試験品について、回収率が少なくとも70%から120%であることを確認する。また、1週当りの検査が20回を超えるときは、20検体ごとに行う。②週1回未満の場合は、検査4回当たり1回以上の割合で上記の検査を行うとしている。

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) のガイドラインでは、回収率は、妥当性確認する濃度範囲をカバーする少なくとも3濃度から9個の回収率(例え

表4 食品中の残留動物薬の分析法の条件 (CAC/GL16-1993)

濃度 (µg/kg)	相対標準偏差 (繰返し) %	許容添加回収率 (%)
100~	15	80~110
10~100	20	70~110
1~10	30	60~120
~1	35	50~120

ば、3濃度について各3回の添加回収試験を行って)を求める<sup>7)</sup>。

CACの残留動物薬分析法では、濃度によって許容添加回収率が異なる(表4)。

## 2.2 分析法の精度の確認

併行精度(繰返し精度)は、前述の厚生省通知では、基準値が設定されている場合は、先の2レベルの濃度の試験品のいずれか、不検出基準が設定されている場合は、定量下限値の2倍濃度に添加した試験品で、①週1回以上の検査では、月1回以上、少なくとも5回以上(可能であれば10回)の繰返し検査で平均値および標準偏差を求め、各検出値のzスコアが2以下であることを確認する。②週1回未満の場合は、検査4回当たり1回以上の割合で上記の検査を行うとしている。

また、前述のICHのガイドラインでは、妥当性確認する濃度範囲をカバーするように最低9個の分析値(例えば、3濃度で各3回併行分析する)から求めるか、検討すべき濃度で最低6回併行分析して求める<sup>7)</sup>。目安は、Horwitz式による再現精度の1/2~2/3である。(表5)

表5 濃度別の精度の目安と回収率の許容範囲

濃度		再現精度 RSD <sub>r</sub> の目安	繰返し精度 RSD <sub>r</sub> の目安	回収率の範囲
100	%	2 %	1 (1) %	98-101%
10	%	3	1.5	95-102%
1	%	4	2 (2)	92-105%
0.1	%	6	3	90-108%
0.01	%	8	4 (5)	85-110%
10	µg/g (ppm)	11	6	80-115%
1	µg/g	16	8 (10)	75-120%
10	µg/kg (ppb)	32	16 (20)	70-125%

AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002)

RSD<sub>r</sub>の( )内は、AOACIのMOA AppendixE: Laboratory Quality Assurance (2005)の値

### 3. PT (技能試験) への参加

第三者機関が行う外部(品)質査定に参加することで、試験所の出す分析値の信頼性を保証することができる。参加者は任意の方法で分析できるので、開発した分析法の性能の確認や使用している方法の点検をすることができる。PTは外部(品)質査定の一つで、JISでは「技能試験」と呼んでいる。ISO/IECガイド43-1(試験所間比較による技能試験, 第1部:技能試験スキームの開発及び運営)には、PTの供給者についての規格の詳細が示され、PTスキームの種類、実施方法、評価方法などが記述されている。技能試験の多くは、試験所(分析所)間比較として行われ、国際的に合意されたプロトコールが改訂されている<sup>8)</sup>。食品分野でのPTは、AOAC (<http://www.aoac.org/proficiencytesting/proficiency.html>) や The American Association of Cereal Chemists (AACC) (<http://www.scisoc.org/aacc/checksample>)なども実施しているが、規模としては英国のCentral Science Laboratory(CSL) (<http://ptg.csl.gov.uk>) のFAPAS(化学分析)とFEPAS(微生物検査)が、世界最大と考えられる。国内に取次店(GSIクレオス<http://sid.gsi.co.jp/fapas/fapas.htm>)があるので、容易に利用できる。年度毎に、新しいプログラムが示され、一般成分、動物用残留抗菌剤、マイコトキシン類、汚染金属類、栄養素、硝酸塩、アクリルアミド等の試験項目が各種の食品試料について用意されている。参加者には、均質性が担保された試料が配付され、参加者は任意の分析法で測定し、分析値を期限(4~5週間後)内に事務局へ送付する。分析値は統計的に処理されて、参加機関による結果の一覧、zスコアによる分布図等を示した報告書が送付されるが、参加機関は、与えられた識別番号で、結果の評価ができる。報告書には、他の参加機関が用いた方法、前処理法などの情報も記載されている。付与された値(assigned value)からの偏りを表すzスコアの絶対値が、2以内であればその分析結果は「満足」、2より大きく3未満であれば「疑わしい」、3以上であれば「不満足」と判断される。

$$z = (x - X) / s$$

ここで、 $x$ は参加者の結果、 $X$ は付与された値、 $s$ はスキームの要求事項を満たすように選ばれた適切ならばつきの推定値または規準の一つで、参加者の結果から導かれる場合もあるが、CSLではHorwitzの修正式またはこれまでの室間共同試験の結果から求めている。

標準偏差 $s$  ( $\sigma_p$ ) を、先の(2)式から、求めると、次のようになる。

$$\sigma_p = \begin{cases} 0.22c & c < 1.2 \times 10^{-7} \\ 0.02c^{0.8495} & 1.2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0.138 \\ 0.01c^{0.5} & 0.138 < c \end{cases} \quad \dots (5)$$

食総研では2002年度から、CSLのFAPASとGeMMA（DNA分析）に参加しているが、ここでも、植物防疫、動物検疫等の関係で利用できないPTがある。国内では、(財)食品薬品安全センターが、厚生省より適合性の確認を受けて、衛生研究所、保健所や検査登録機関の公的検査機関を対象に、Good Laboratory Practice（適正試験所規範：以下GLP）の「食品衛生外部精度管理調査」として毎年6件の理化学調査と5件の微生物学調査を実施している。なお、民間企業の検査機関を対象とした外部精度管理として、同一試料を用いた食品衛生精度管理比較調査を実施している。食総研は、農水省のプロジェクト研究の中で、2003年度から(財)食品薬品安全センターに委託して、小麦中のカビ毒（デオキシニバレノールとニバレノール）分析のPTを実施し、さらに同じプロジェクトの中で2006年度からは精米粉末中のカドミウムと必須元素のPTを行っている。また、(社)日本分析化学会は、2004年度から食品分析の技能試験を開始し、全脂粉乳、魚肉ソーセージ、離乳食の一般成分とミネラルの技能試験が行われている。

#### 4. ISO/IEC 17025（試験所認定）の要求事項への適合

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中で受け入れられるようなワンストップテスト（One-Stop-Testing）の構築が指向されており、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、試験所において測定・試験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承認協定を結ぶことで、「ワンストップテスト」を実現しようとしている。そのための規格として、ISO/IEC 17025:2005（JIS Q17025:2005）が用いられている。

欧米等においては、購入者（ユーザー）が供給者（メーカー）に対して製品に関する試験データを添付することを要求することが多く、その際に供給者は、当事者とは無関係な第三者である試験所で得られた試験データを活用している。試験所認定というと、試験所全体の能力が認定されるように思えるが、GLPとは異なり、原則として、分析対象試料、分析対象成分及び分析方法の組み合わせで認定を受ける仕組みになっている。

ISO/IEC17025:2005の要求事項には、管理上の要求事項（15項目：組織／マネジメントシステム／文書管理／依頼、見積仕様書及び契約の内容の確認／試験・校正の下請負契約／サービス及び供給品の購買／顧客へのサービス／苦情／不適合の試験・校正業務の管理／改善／是正処置／予防処置／記録の管理／内部監査／マネジメントレビュー）に加えて、技術的要求事項（10項目：一般／要員

／施設及び環境条件／試験・校正の方法及び方法の妥当性確認／設備／測定の特  
レーサビリティ／サンプリング／試験・校正品目の取り扱い／試験・校正結果の  
品質の保証／結果の報告）がある。試験所認定は、日本の食品分野では、現在約  
30カ所が、残留農薬、微生物試験、貝毒などの分析法で取得している。認定の  
取得いかんにかかわらず、その要求事項への適合が重要である。

### おわりに

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。特に、規制や規格  
に係わる分析法は、分析値の同等性を確保する必要があるので、室間共同試験に  
よる妥当性確認が必要である。国際的問題では、試験所認定の要求事項に適合し  
ていない機関の出した分析値では通用しなくなる状況であるので、世界に通用す  
る分析値を出せる体制を整備していく必要がある。欧州の食品規制に係わる試験  
所は、官民を問わず、ISO/IEC17025の試験所認定を取得している。政府機関あ  
るいは大学などがその権威によって信頼されるのではなくて、試験所認定を取得  
して、品質保証が行われていることで、その分析値が信頼されるのであり、我々  
の意識を変えていく必要がある。

また、食品は食習慣、食材など、その国特有のものがあるので、CRMやPTで  
外国に供給を期待できないものがあり、また、外国にあっても検疫法や植物防疫  
法によって輸入できない場合もある。そのような食品や成分については、我が国  
自体でCRMの作製やPTの供給を図る必要がある、行政サイドのバックアップも  
必要である。

(食品分析研究領域長 安井 明美)

### 参考文献

- 1) Thompson, M and Wood, R: The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical)analytical laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, 65 (9) , 2123-2144 (1993).
- 2) Thompson, M and Wood, R: Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (4), 649-666 (1995).
- 3) Horwitz,W: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl.Chem.*, 67 (2) , 331-343 (1995).
- 4) Horwitz,W., Kamps, L.R. and Boyer, K.W.: Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, 63 (6) , 1344-1354 (1980).
- 5) Thompson, M.: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, 125, 385-386 (2000).

- 6) Thompson, M., Ellison, S.L.R., and Wood, R.: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure & Appl.Chem.*, 74 (5), 835-855 (2002).
- 7) ICH: Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1) (2005).
- 8) Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R.: The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories, *Pure & Appl.Chem.*, 78 (1), 145-196 (2006).

## Ⅱ 食品のサンプリング

### 1. はじめに

#### 1.1 サンプリングとは

ここで紹介する「サンプリング」という言葉は、英単語“sample”を-ing型に変化させた，“sampling”と言う単語を音訳したものである。辞典によれば，“sample”の語源は、ラテン語の“exemplum”，更に辿れば“extmere”となる。“extmere”は「出す」を意味する“ex”と、「取る」を意味する“mere”が結びつき、全体としては「取り出す」という意味になる。ちなみに、この“extreme”は「例」を意味する英単語の“example”の語源にもなっている。「サンプリング」を和訳した単語として、統計では「標本抽出」、分析化学では「試料採取」という用語が用いられる<sup>1)</sup>。食品の議論で用いられるサンプリングは、食品を検査するために、調査対象の代表的な一部を試料として取り出すことを意味する場合が多い。「サンプリング」の対をなす言葉は「全数検査」である。これは対象すべてを検査することを表す。「全数検査」の例として行われているものとして、牛肉のBSE検査がある。日本の食品の実態調査を全数検査するということは、一億人以上の国民が摂食しているものをすべて検査することであり、多大な費用を要するため、実現不可能である。さらに、均一化して分析するなどの破壊検査では全数検査を行うことができない。そこで、輸入植物の検疫、工場の品質管理など多くの場面でサンプリングによる検査が行われている。ただし、検査の信頼性を確保するためにはサンプリングの方法は注意深く設計する必要がある。そこで、具体的な食品のサンプリング方法の例として、以下の二つを考える。

サンプリング方法1：研究所の近くにあるスーパーマーケットで、6月1日14時25分に、Xというブランドの食品の棚の一番手前にあったパッケージを購入して分析用試料とし、分析試料を作成した。

サンプリング方法2：統計的な標本抽出計画法を用いて、日本全体の実態を表しうる食品を抽出して分析用試料とし、分析試料を作成した。

サンプリング方法1を用いると、そのスーパーで、6月1日に棚の一番手前にあったパッケージに関しては代表的な試料が得られていると主張することができるが、日本の他の食品に関する質問に関しては、統計的には不明であると答えざるを得ない。サンプリング方法2を用いれば、何%の確率で日本の他の食品もある範囲の中に入るとということが言及できるようになる。そこで、日本全体の代表値について議論する場合には、統計的な標本抽出計画法が必要となってくる。

## 1.2 国際規格制定とサンプリング

食品の品質はロットや部位により大きな不均一性を持つことが多いため、検査の結果がサンプリング方法によって変わることは多い。そのため、検査方法を定める際にはサンプリング法も重要な議題の一つになる。国際的に通用する検査方法を決定する国際機関のCodexでは、CCMAS（Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling）という委員会で検査方法のサンプリング法に関して議論している<sup>2)</sup>。

他に、サンプリングが重要になる場面として、Codexによる有害物質の濃度の基準値作成がある。この基準値を超過した場合には事実上輸出が不可能になってしまうことがあり、輸出業者には影響が大きい。また、Codexの規格は、国内においても大きな影響力をもつ。そのため、Codexの規格の原案に、自国で満たすことが困難である基準値が掲載された場合には、自国で満たすことが可能な規格となるように交渉する必要がある。しかしながら、消費者の保護も必要であり、原案に掲載された基準値よりも高い値を用いても消費者の健康を害すことがないことを、交渉の場で説明することも必要である。そのためには、自国で健康被害がないことと、自国の汚染実態のデータの二つを明らかにする必要がある。そのような汚染実態のデータは信頼性の高さを要求され、国際機関ではデータを取得する際に用いたサンプリング法も吟味の上、ランク付けされる<sup>3)</sup>。

Codexでは、サンプリングに関する一般ガイドラインも提示しており<sup>4)</sup>、これは規格が定まっていない場合に参考にすべき資料となる。ISOも農産物食品のサンプリングに関する規格を作成しており<sup>5)</sup>、JISも用語を整理している<sup>6)</sup>。

## 2. 食品中の化学物質濃度調査のためのサンプリングの現状と食総研の取り組み

### 2.1 カドミウムのサンプリング調査

カドミウムは、過剰に摂取すればイタイイタイ病の原因となることで有名である他、発ガン性もあると言われている<sup>7,8)</sup>。一方で、カドミウムが必須元素であるかについては更なる証拠が必要だといわれているが<sup>9)</sup>、カドミウム欠乏がヤギの成長を抑制するという報告もある<sup>10)</sup>。

カドミウムは、ほとんど全ての食品にわずかながら含まれており、ほうれんそうも例外ではない。Codexは、健康上のリスク等を考慮して、食品中のカドミウムの濃度の規制値を決定し、ほうれんそうを含む葉類野菜の場合は0.2mg/Kgとしている<sup>11)</sup>。そこで、生産されている食品中の濃度が基準値以下であることを調査する場合を考える。

カドミウムの定量分析は、前処理を行った後、原子吸光法やICP-AES、ICP-MS等によって行われる。この手法は破壊検査であるため、全数検査は不可能であり、サンプリングによる調査が必要になる。この際、国際的に認められるサンプリング計画をたてることがデータの利用可能性を上げるためには重要であり、

その次には、いかに安いコストで精度のよい結果が得られるかが重要になってくる。

集荷場に集まるほうれんそうすべてを調査の母集団とする場合を具体的に考えると、「調査対象の農家の軒数」、次に「各調査対象農家から集めるほうれんそうの数」の2つの数を決定することでサンプリングを行うことができる。この2つの数はそれぞれ多ければ多いほど母集団の平均値と推定平均値が近くなるが、サンプリングおよび分析にかかるコストも増大するため、調査精度を考えながら適度な数を選ぶ必要がある。これに加えて、各農家から集めるほうれんそうの数と、調査対象農家の軒数はコストに異なった影響を与える。すなわち、各農家から集めるほうれんそうの数を一つ増やすのに比べ、調査対象の農家の数を一つ増やす方が調査にかかるコストがより大きくなる。一方で、各農家から集めるサンプルは似たような濃度であることが多いため、多くの農家から集めた方がより母集団に近い値を得ることができるという面もあり、この「コストと精度のバランス」をどのように選ぶかも重要になってくる。さらに、ほうれんそうは大きさ、栽培法などの属性によって分類することができるが、これらの属性でグループ分けを行い、それぞれのグループから取り出すことで、より効率の良いサンプリング計画が立案できる場合もある。

そこで、著者らはほうれんそうのカドミウムの調査方法を確立するため、集荷場に集まるほうれんそうに含まれるカドミウムが箱内、農家内でどのように変化するかを、統計用語の「分散」という形で定量的に推定した<sup>12)</sup>。また、確率的な調査には、どのような分布型をしているかが大切なので分布型についても明らかにした。ほうれんそうの場合は左右対称な分布である正規分布ではなく、濃度が高い方に裾を引く対数正規分布に近い分布をしていた。また2峰性の分布もみられた。得られた結果を用いてサンプリング法のシミュレーションを行ったところ、生産者を層とした層別サンプリング法が精度がよいという結果であった。また効率的に高濃度の検体の有無を検査するには、生産者を選び、その後検体を選ぶ2段サンプリングが良いという提言をした。

## 2.2 食品成分表のためのサンプリング

食品からのエネルギーや栄養の摂取量を調査することを目的として、食品成分表が世界各国で作られている。この食品成分表に掲載するにあたって好ましいデータとしては、全国を代表するサンプリング計画を用いて取得したものであることがFAOから示されている<sup>13)</sup>。また、日本食品標準成分表の前書きには、掲載値が「年間を通じて普通に摂取する場合の全国的な平均値」という概念を表すこととしており、平均値に近い値を掲載することが成分表の目標になっている。

アメリカ農務省のNDL (Nutrient Data Laboratory) では、食品収集のために全国規模のサンプリング計画を立てている。その計画では、栄養値が地域によって変

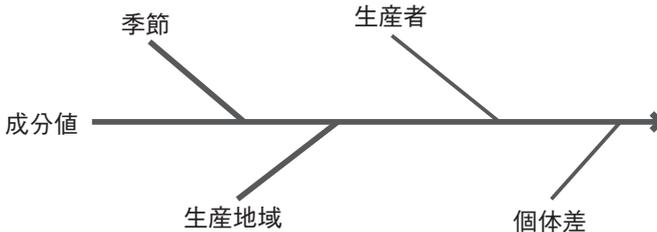


図1 にんじんの栄養値に及ぼす影響要因の例

動することや、購入地域の都市化の程度によって変動することなどを考慮し、アメリカ全土を4区域に分割し、それぞれから購入都市を選定するなど、地域バランスの良い購入を行っている。また、サンプリング地点は乱数を用いてランダムサンプリングになるように設計されている。そして、その計画によって得られたサンプルの分析値を用いて食品成分表の掲載値を順次置き換えている<sup>14,15)</sup>。また、成分表への掲載値を決めること以外の調査研究においても、そのサンプリング法を用いてサンプルを収集し、成分の調査を行っている<sup>16)</sup>。ブラジルにおいてもそれを参考にしたサンプリング法を決めている<sup>17)</sup>。また、ニュージーランドでは、食品成分表の監査が行われており、サンプリング法に関しても改善を求める意見が出されている<sup>18)</sup>。

さらに、同一の食品の平均値の他にも、より細分化された掲載値を求める声も多い。季節の栄養値に与える影響については5訂日本食品標準成分表の編集時に考慮されたものの、他の要因による変動も大きかった。その上、にんじんやほうれんそうの成分値の変動要因としては、産地や品種があることが知られていた(図1)。そこで、それぞれの大きさがどれくらいであるかの調査も行ったところ、季節変動が大きい食品の場合は、どんなに多くの産地から食品を集めても季節変動による推定誤差のため、最終的な推定精度が向上しないが、季節変動が小さい場合には多くの産地から食品を集めてコンポジットすることにより、分析コストの増加なしで推定精度を向上させることができた<sup>19,20)</sup>。

上記の研究では、にんじん、ほうれんそうに関しては、サンプルを収集する季節の数、地域の数、生産者の数、箱の数によって、調査精度がどのように変化するかに関する関係式が得られた。また、これら、各要因の分散に対する考慮とともに、統計学的には、すべてのサンプルが、同じ確率で集められるような計画を立てたときに初めて、偏りのない結果を得ることができ、反面、入手のしやすさで選ばれたサンプルは便宜サンプルと呼ばれ、信頼度が低いと見なされる。そこで、統計を用いて購入地点を決定し、その通りに購入することも重要となる。

成分表に掲載される成分には、ビタミンC等時間変化が大きいものもある。このような成分に対しては、サンプルの輸送および、購入から分析を始めるまで

にかかる日数も重要となる。より推定値を実際に食されているものに近づけるためには、現在主流の流通、貯蔵などを考慮する必要があるが、流通法、貯蔵法に関する統計資料はあまり纏まっていないのが現状である。

### 2.3 実態調査におけるサンプリング

食品を実際に市場から購入して行う調査は、消費者が実際に摂食している食品の安全性を評価するための調査として直接的な手法である。このとき、信頼できる調査結果を得るためには、収集する食品が代表的であることが必要になる。この食品の集め方もサンプリングの問題となる。まず、全国を代表する値を得るためには、多くの地域から収集する必要がある。農林水産省が公表している「**トータルダイエツトスタディーのためのガイドライン**<sup>21)</sup>」では、地域差がないことが明らかになっている場合は一地域のみでのサンプル収集でかまわないが、不明な場合には複数地域で行う必要があるとしている。購入地域としては、東京、名古屋、大阪、福岡の四都市で行うことを要求し、さらに高い精度を得るためには、札幌、仙台、新潟、広島においても調査することとしている。厚生労働省の行う「**トータルダイエツトスタディー**」においても、各地方の衛生研究所の協力を仰いで、10程度の都市から食品を購入してしている。諸外国でも同様に、なるべく多くの地域からの収集を試みている。

特に、オーストラリア・ニュージーランド食品基準（FSANZ）では、トータルダイエツトスタディーの設計で食品を3種類に分類した上、それぞれの種類に対して別々のサンプリング方法を用いている<sup>22)</sup>。一つ目の種類は、国民にとって重要な食品であり、Core Food というグループに位置づけている。ほかには、地域によって残留濃度が異なりうる食品をRegional Food というグループに位置づけ、全国で手に入り、あまり地域差がないと考えられる食品をNational Food のグループに位置づけている。このような食品を幾つかのグループに分割し、それぞれに異なるサンプリング法を用いる手法は、フランスでも用いられている<sup>23)</sup>。

アメリカでは、トータルダイエツトスタディーを一年に4度、各3都市ずつで行っている。それぞれ、また、行う毎に調査対象の3都市は変更している<sup>24, 25)</sup>。

このように、これまでは購入地域数が問題視されることが多かったが、同じ地域内でもばらつくため、どの程度代表性を確保するかも問題となる。そこで、私たちはサンプリング計画と調査精度の関係について、現在調査を行っている。

また、農林水産省が公表している「**トータルダイエツトスタディーのためのガイドライン**」中で規定されている「**マーケットバスケット調査**」では、厚生労働省から出版されている「**栄養調査**」に示されている各食品の国民平均摂食量をもとに様々な食品を混合して分析試料を作成するが、栄養調査の結果には摂食量に関して以下の点が記載されていない。

1) 公表されている一人一日あたりの摂食量は、個別食品ごとに掲載されずに、

いくつかの食品目をまとめた小分類ごとの値になっているものがある。

2) 一年間の平均値ではなく、11月の調査結果である。

3) 地域ごとの摂取量の平均値の詳細は掲載されていない。

このため、マーケットバスケット調査を行う時には、何らかの手法で栄養調査を補完する必要がある。そこで、夏期の野菜群の内訳について、家計調査や、中央卸売市場取扱量統計および栄養調査の値を用いて推計を行った<sup>26)</sup>。

ほかにも、食品安全の確保のため、イギリスの食品基準庁でも詳細なサンプリングのガイドラインを作成している。また、調理加工によってできる有害物質のトータルダイエツトスタディーの場合には、購入した原料の他に調理方法の決定も重要になる。一方で、どの食材がどのように調理されているかに関しては情報が公開されていないため、そのような情報を蓄積することは今後の課題であると考えられる。

### 3. 様々な食品のサンプリング法

#### 3.1 遺伝子組み換え食品のサンプリング調査

遺伝子組み換え技術によって、除草剤や害虫に対する抵抗性や栄養機能を向上させた農作物が現れている。それらの農作物は実際に栽培されているものもあり、生産量に占める割合が大きい国さえある。一方、EUや我が国などでは遺伝子組み換えでない食品の需要も多くあり、「遺伝子組み換えでない」という表示がアピールポイントになる。日本でそのような表示するためには、輸入検査時にGM食品の混入率が5%以下の原材料を用いる必要がある<sup>27)</sup>。そこで、実際に「遺伝子組み換えでない」という表示をされた食品がこの規定を満たしているかを確認するために、GM食品の混入率の検査が必要になっている。

一般に、混入率を求める場合には「定性試験」または「定量試験」のいずれかを用いる。Codexのサンプリングに関する一般ガイドラインでは、定性試験を“attributes plans”と呼び、定量試験を“variables plans”と呼称する。定性試験は存在の有無を判定する試験であり、定量試験は数値を求める試験である。混入率の算出に用いる場合、定性試験は試験回数に比べて試験精度が向上しないという難点がある。一方で、定量検査の測定誤差が大きい場合や、定性検査よりも検査費用が多くかかる場合もある。そのような場合、米のような粒状の食品に関しては、混入率度を調べるために定性検査を行うこともできる。定性検査で混入率を決定する場合に用いるサンプリング計画に関して詳しく説明している論文もある<sup>28)</sup>。ISTA(International Seed Testing Association)では、この論文の内容に基づいて作成された、バイオテクノロジーによって作成された種子の通常の種子のロットの中の純度や不純度の調査計画等に用いることが出来るソフトウェアSeedCalcをホームページ上で公開している (<http://www.seedtest.org/en/content/--1--1143.html>)。

<http://www.usda.gov/gipsa/biotech/biotech.htm>にある Sample Planner というソフト

ウェアを利用すれば、調査バッチ数、許容できる規格から逸脱したバッチの数、バッチ当たりの種子の数、サンプリング計画の特性値を入力することにより、そのサンプリング計画の消費者危険と生産者危険を算出することができる<sup>29)</sup>。

### 3.2 食品微生物のサンプリング法

国内では、食品衛生検査指針<sup>30)</sup>が食品衛生法に基づく検査のためのもっとも重要な文献である。国際ガイドラインは、食品衛生検査指針にも引用されているICMSF（国際食品微生物規格委員会：International Commission on Microbiological Specifications for Foods）がまとめたMICRO ORGANISMS IN FOODS 2 Sampling for microbiological analysis Guidance Notes on Sampling Plan for Microbiological Analysis<sup>31)</sup>と考えられる。

致死的でない微生物検査のサンプリング調査においては、 $m$ と $M$ という微生物の密度に関する二つの基準を設けることが多い。小文字の $m$ はよい品質の製品に含まれる微生物数の上限であり、大文字の $M$ は許容可能な製品のバクテリア数である。一般的に $m \leq M$ となる。あるロットのすべての製品のバクテリア数が $m$ 以下である場合は全く問題ない。ロット中に、バクテリア数が $m$ 以上 $M$ 以下の製品が存在する場合、少数ならば許容できるが、多数存在する場合にはそのロット全体が拒絶される。また、 $M$ 以上の製品が有った場合はそのロットは拒絶されるとしている。個別の食品、魚については各菌種について調査するサンプル数と、調査したうち、 $m$ 以上 $M$ 以下の菌数があるサンプル数の許容数が決められている。

また、アメリカ食品医薬品局FDAでは、食品と化粧品の微生物検査の好ましい手法をまとめて公表している<sup>32)</sup>。このガイドラインにおいても、“Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate”という章が一番最初にあるように、サンプリング法も重視されている。サルモネラ菌の検査のためのサンプリング計画は特に詳細に書かれている。具体的には、サルモネラ菌のリスクに応じて三つのカテゴリーに分けて別々のサンプリング方法でサンプルを抽出することが規定されている。また、一部の微生物については、8オンス（約230g）のサンプルを10個ずつ取り出すなどの規定が書かれている。オーストラリア・ニュージーランドにおいても、同様のガイダンスは定められている<sup>33)</sup>。

### 4 Codexのサンプリングに関する一般ガイドライン

Codexはサンプリングの原則を明らかにするため、サンプリングに関する一般ガイドライン（general guideline on sampling）（CAC/GL 50-2004）を採択している。このガイドラインでは、幾つかの例（不均一な商品、測定誤差がサンプリング誤差よりも大きな場合、いくつかの複雑なサンプリング計画等）は扱われていないため、参照する際には注意を要するが、重要な原則が掲載されている。このガイドラインは基本的にはISO（International Standard Organization）等の他の標準化団

体と整合性を持たせるようにしており、ISO基準と調和的に行われる必要があるとしている。サンプリングに関する国際的な文献としては、ISO guide 25の10および11パラグラフ、EN45001（ヨーロッパ基準）の5.4.5章が挙げられる。

#### 4.1 サンプリング法の満たすべき条件

CAC/GL50-2004では、サンプリング計画を実装するには以下のことが必要となるとしている。

- 1) サンプルの代表制を確保する。もし、コンサインメント（一時に引き渡される荷物の集まり<sup>6)</sup>）が幾つかのロットから成り立つ場合には、サンプルは個別のロットの代表として集められなければならない。
- 2) サンプルはランダムに採取されなければならない。この方法がロットの品質をもっとも反映する可能性が高い。しかし、サンプリング誤差は存在する。
- 3) サンプルを構成するそれぞれの要素のロットやコンサインメントから取り出す数や量
- 4) 収集、扱いおよび記録の手順。

このうち2)に用いられている「ランダムに採取」という用語は、すべての母集団が同一の確率で抽出されるように採取することを意味する。実行に際しては、例えば乱数表（ISO 2859-0:1995のTable3）を用いる<sup>2)</sup>。通常行われるような、haphazard（無計画な）サンプリングでは無いとしている<sup>5)</sup>。このランダムという言葉は、統計学の知識を持つ人が査読に回ったときには、かなり厳密に用いられることがある。もしランダムに採取することが不可能な場合にも、1) 手に入れやすい、または視覚的に他と特徴があるものを積極的に採取すること、2) 調査対象成分変動に周期性がある場合は、その周期と同一の間隔でとること、の2点は避けるようにという指示がある。

#### 4.2 サンプリング法の決定法

CAC/GL50-2004では、検査で用いるサンプリング法を決定する際には以下のことを考慮するとしている。

- 1) サンプリング対象の母集団の特性がどのように分布しているか。
- 2) サンプリングにはどれくらいのコストがかかるか。
- 3) リスク評価はなされているか（そのサンプリング方法を用いることで、状況に適応的な、客観的なリスク評価を基本に、食の安全を確保することを目的としているか。可能ならば、国際的に受け入れられたリスク評価法であることが望ましい）

1) は、調査対象全体で、均一に一樣分布をしているのか、均一にランダムな分布をしているのか、どのような分布型をしているのか、あるいは時間、空間的に相関があるのかということが考えられる。（図2）。

2) は、サンプルを収集するためにかかる人件費、及びサンプリング方法の違いによるサンプルを分析する費用の増減、サンプルを収集するために流通が遅くなることによる時間の損失、また、試験方法がサンプルを破壊するものであったり、試験後のサンプルを販売することができないものである場合には、分析サンプルを取り出すことにより商品が減少することによる損失等が考えられる。

3) は、調査対象の危害要因の毒性試験の結果及びそこから定められた摂取基準を考慮してリスクを評価することを意味する。摂取基準として、ADI（一日摂取許容量）やPTWI（耐用一週間摂取量）、LOAEL（最小毒性量）、NOAEL（無毒性量）

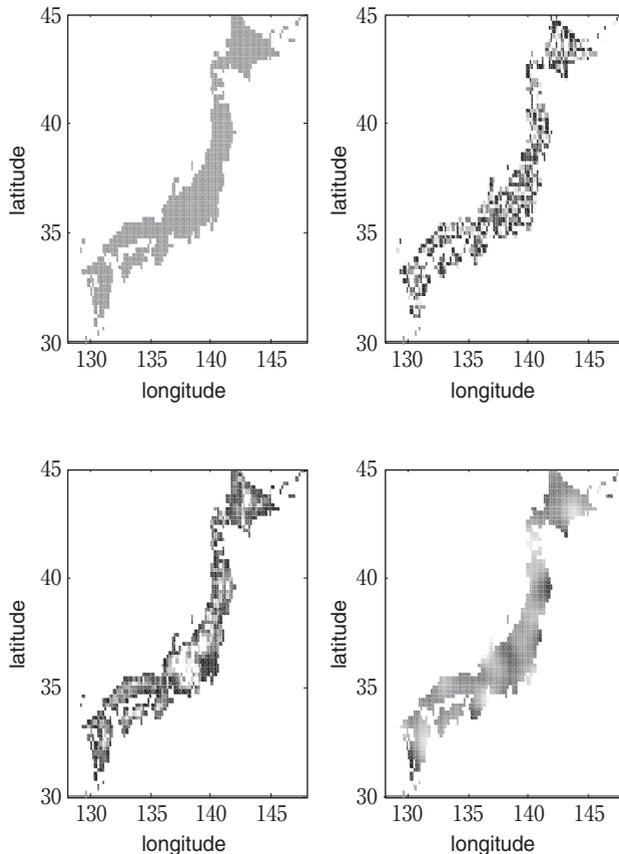


図2 調査対象の分布の例。図の濃淡が調査対象の濃度を示す。一様分布（左上）、ランダム分布（右上）、別の情報に依存した分布（左下）（ここでは例として標高を示す。）空間的に相関した分布（右下）

等が国際的な機関により決定されている場合は、食品等からの摂取による暴露量が基準を超えないようにすることが必要になる。各サンプリング法によって、この暴露量がどのように変化するかを考慮するためのツールとして、アメリカ環境保護庁EPAのDEEM (Dietary Exposure Evaluation Model)、ワーヘニンゲン大学のMCRA (Monte Carlo Risk Analysis) 等のソフトウェアが開発されている。

また、アメリカのFDAやEPAでは、無視できるリスクとして、“one-in-a-million lifetime risk” (人生の中で、100万分の1の確率でガンになる) を挙げている<sup>34)</sup>。

### 4.3 サンプリング計画の説明で明らかにすべき点

CAC/GL50-2004では、以下の点の説明が必要であるとしている。

- 1) 国際的な参考文献の存在。
- 2) 制御の状態。ロット内のそれぞれの個体に当てはまる事柄であるか、ロット全体について当てはまる事柄であるかについて。
- 3) 制御する特性の状態。制御するのは定性的な事柄か、定量的な事柄か。定性的とは、○か×かのものであり、例えば病原微生物の存在のように、存在すれば即×となるものがあげられる。定量的とは、連続的な尺度で測定されることを指し、化学物質の濃度などがあげられる。
- 4) 品質の水準 (AQLやLQ)。致死的な場合とそうではない場合には、AQLやLQを変更することがある。
- 5) ロットの性質 バルクのものや、パッケージに詰められた商品であるか。また、制御する特性に関する大きさ、均一性、そして分布によって変わる。
- 6) サンプルの組成 単一のサンプリング単位によって成り立つもの。複数の単位によって成り立つもの (コンポジットサンプルも含む)
- 7) サンプリング計画の選択 統計的品質制御

このほかにも、平均値を制御するのか、それとも規格から外れたロットの確率を制御するのかについて明らかにする必要があるとしている。

1) については、CodexやICMSFなど、国際機関が個別食品毎に策定している食品の危害物質がある。Codexの規格は、ホームページ上で検索することができる (<http://www.codexalimentarius.net/>)。

4) の説明にある、AQLやLQに関しては、文献6) に詳しい。例えば、基準値を超過することが直ちに健康に被害を及ぼさない場合は2.5ないし6.5%等、大きいAQLを設定し、衛生的な問題などでは低いAQL (0.1%ないし0.65%等) とする必要があるとしている。基準値を超過することで直ちに健康に被害を及ぼす場合はより厳しい検査が必要になるとしている。

5) にあるような事柄によるサンプリングの参考として、様々なサンプルに対する、サンプリング誤差の推定式が総説されている<sup>35, 36)</sup>。

#### 4.4 サンプルの大きさ

サンプルの大きさはロットの大きさに比例させることもあるが、そのことには批判もある。例えば、Codexのガイドラインでは、サンプリングサイズをロットの大きさに応じて大きくすることに統計的な意味はないとし、便宜的にロットの大きさの平方根に比例するような大きさで取ることもあるとしている。また、最適なキウイの検疫における、ロットサイズと最適なサンプルサイズの関係が提案されている<sup>37)</sup>。また、95%の確率で1パーセントの違反率のロットを見つけ出せるサンプリングプランを勧めている研究者もいる<sup>38)</sup>。

#### 5. 食品総合研究所のホームページの活用

食品総合研究所では、食品のサンプリングに関する疑問に対して情報発信をするために、「食品のサンプリングに関するガイダンス」を公開している（図3）。

<http://nfri.naro.affrc.go.jp/yakudachi/sampling/index.html>

こちらには、サンプリングに関する統計的な基礎的な情報や、各国際機関で要求されるサンプリングのガイドライン及び実際のサンプリングの例が掲載されている。



図3 食品のサンプリングに関するガイダンスの表示例

<http://nfri.naro.affrc.go.jp/yakudachi/sampling/index.html>

具体的には、アフラトキシンの濃度検査のような定量的な結果を得るためのサンプリング方法や、OC曲線、発生率と見逃し率についての説明が示されている。また、マイコトキシンの検査のためのサンプリングとしては、詳しい文献もある<sup>39-41)</sup>。

(食品分析研究領域 品質情報解析ユニット 塚越 芳樹・内藤 成弘)

### 参考文献

- 1) JIS K 0211, 分析化学用語 (基礎部門), 日本規格協会 (2005)
- 2) 安井明美, 世界の動向, 食品分析法の妥当性確認ハンドブック (サイエンスフォーラム, 東京), 39-41.
- 3) WHO, Instructions for electronic submission of data on chemical contaminants in food and the diet. <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/msmanual.pdf>, (2003)
- 4) Codex, general guideline on sampling [CAC/GL 2004], (2004)
- 5) ISO 7002-1986 Agricultural food products-layout for a standard method of sampling from a lot.
- 6) JIS Z 8101-2 統計 - 用語と記号 - 第2部 統計的品質管理用語, (1999)
- 7) IARC, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing industry. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 58. Lyon, France; international Agency for Research on Cancer. 444, (1993)
- 8) NTP, Report on Carcinogens, Eleventh Edition; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, (2005)
- 9) F.H. Nielsen, Ultratrace Elements in Nutrition: Current Knowledge and Speculation, The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine 11, (2-3), 251-274, (1998)
- 10) Anke M, Henning A, Groppe B, Partschfeld M, Grun M, The biochemical role of cadmium. In Kirchgessner M (ed): "Trace Element Metabolism in Man and Animals -3" Freising-Weiherstephen: Tech Univ Munchen, 540-548, (1978)
- 11) CCFAC, Maximum Levels for cadmium in wheat grain; potato; stem and root vegetables; leafy vegetables; and, other vegetables, ALINORM 05/28/12; para. 175 and Appendix XXVI, (2005)
- 12) 食品総合研究所, 平成15年度農林水産省消費・安全局委託事業報告書 有害物質リスク管理等委託事業 - 有害物質の実態調査に関するサンプリング法の検討 - 平成16年3月, (2004)
- 13) J.M. Holden, Sampling strategies to assure representative values in food composition data, Food, Nutrition, and Agriculture 12-Food Composition data (FAO) <http://www.fao.org/docrep/V6000/v6000t04.htm>, (1994)

- 14) P.R. Pehrsson, D.B. Haytowitz, J.M. Holden, C.R. Perry and D.G. Beckler, USDA's National Food and Nutrient Analysis Program: Food sampling, *Journal of Food Composition and Analysis*, **13**, (4), 379-389, (2000)
- 15) P.R. Pehrsson, D.B. Haytowitz, J.M. Holden, The USDA's National Food and Nutrient Analysis Program: update 2002, *Journal of Food Composition and Analysis*, **16**, (3), 331-341, (2003)
- 16) N. Weizmann, J.W. Peterson, D Haytowitz, P.R. Pehrsson, V.P. de Jesus, S.L.Booth, Vitamin K content of fast foods and snack foods in the US diet, *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, (3-4), 379-384, (2004)
- 17) Galeazzi, M. A. M, Lima, D. M., Coulgmati, A. B., Padovani, R. M., Rodriguez -Amaya, D. B. Sampling Plan for Brazillian TACO Project, *Journal of Food Composition and Analysis*, **15**, (4), 499-505, (2002).
- 18) Greenfield, H. Audit of the New Zealand Food Composition Database (NZFCD) Service, [http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/Files/NZFCDFinalAuditReport/\\$file/NZFCDFinalAuditReport.pdf](http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/Files/NZFCDFinalAuditReport/$file/NZFCDFinalAuditReport.pdf), (2003)
- 19) 食品総合研究所, 「食品成分データの収集に関するサンプリング方法に関する調査報告書」, 平成17年度文部科学省資源室委託調査報告書, (2006)
- 20) 食品総合研究所, 「食品成分データの収集に関するサンプリング方法に関する調査報告書 (第2期)」, 平成18年度文部科学省資源室委託調査報告書, (2007)
- 21) 農林水産省, トータルダイエツトスタディに関するガイドライン, [http://www.maff.go.jp/syohi\\_anzen/risk/totaldiet.html](http://www.maff.go.jp/syohi_anzen/risk/totaldiet.html), (2006)
- 22) FSANZ, The 21st Australian Total Diet Study, FSANZ, Canberra, ISBN 0 642 34504 X, (2005)  
[http://www.foodstandards.govt.nz/\\_srcfiles/21st%20ATD%20Study%20report-Aug051.pdf](http://www.foodstandards.govt.nz/_srcfiles/21st%20ATD%20Study%20report-Aug051.pdf)
- 23) Leblanc, JC, Guerin, T., Noel, L, Clalamassi-Tran G, Volatier, J.L. and Verger P., Dietary exposure of 18 elements from the 1st French total Diet Study, *Food Additives and Contaminants*, **22**, (7), 624-41, (2005)
- 24) J.A.T. Pennington and E.L. Gunderson, History of the Food and Drug Administration's Total Diet Study-1961 to 1987, *Journal of Assoc. Off. Anal. Chem*, **70**, (5) 772-782, (1987)
- 25) J.A.T. Pennington, S.G. Capar, C.H. Parfitt and C.W. Edwards, History of the Food and Drug Administration's Total Diet Study (PartII), 1987-1993. *Journal of AOAC International*, **79** (1), 163-170, (1996)
- 26) 塚越 芳樹・内藤 成弘・石田 信昭, トータルダイエツトスタディー調査における夏期の野菜類マーケットバスケット試料の構成品目, *食研報* **72**,

pp 1-7, (2008)

- 27) 食品産業センター, バルク輸送非GMO流通マニュアル (とうもろこし・大豆)  
<http://www.shokusan.or.jp/sys/upload/85pdf1.pdf>, (2001)
- 28) J-L Laffont, K. M. Remund, D. Wright, R. D. Simpson and S. Gregoire, Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation, *Seed Science Research*, **15**, (3), 197-204, (2005)
- 29) K.M. Remund, D.A. Dixon, D.L. Wright and L.R. Holden, Statistical considerations in seed purity for transgenic traits, *Seed Science Research*, **11**, (2), 109-119, (2001)
- 30) 厚生労働省, 食品衛生検査指針 微生物編, 日本食品衛生協会, (2004)
- 31) ICMSF, 1986, *Microorganisms in Foods. 2. Sampling for Microbiological Analysis Principles and Specific Applications*, 2nd ed. University of Toronto Press, Buffalo, NY.
- 32) FDA, *Bacteriological Analytical Manual*, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bamtoc.html>
- 33) FSANZ, <http://www.foodstandards.gov.au/newsroom/publications/guidelinesformicrobiol306.cfm>
- 34) Merrill, Richard A. "Food Safety Regulation: Reforming the Delaney Clause" in *Annual Review of Public Health*, **18**, 313-40, (1997)
- 35) Kratochvil, B., Wallace, D., and Taylor, J.K., 'Sampling for Chemical Analysis', *Anal. Chem.* **56**, (5), 113R-129R, (1984)
- 36) Garfield, F.A., 'Sampling in the Analytical Scheme', *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1989, **72** (3), 405-411.
- 37) Yamamura, K., Sugimoto, T. Estimation of the Pest Prevention Ability of the Import Plant Quarantine in Japan, *Biometrics*, **51**, (2), 482-490, (1995)
- 38) Weiss, C., Conte, A., Milandri, C., Scortichini, G., Semprini, P., Usberti, R., Migliorati, G., Veterinary drugs residue monitoring in Italian poultry: Current strategies and possible developments, *Food Control*, **18**, 1068-76, (2007)
- 39) Whitaker, T.B. Sampling foods for mycotoxins, *Food additives and contaminants*, **23**, 1, 50-61, (2006)
- 39) 内藤成弘・塚越芳樹 食品のサンプリングに関する最近の動向 農業技術 第62巻 第4号 166-171, (2007)
- 40) 内藤成弘・塚越芳樹・山田由紀子サンプリング, 食品分析法の妥当性確認ハンドブック (サイエンスフォーラム, 東京), 111-133, (2007)

## Ⅲ データの統計的取り扱い

### 1. はじめに

分析法の妥当性確認についてはいくつかの国際的なガイドラインが存在し、そのなかにはデータ解析方法などの統計的な記述も含まれている。実験計画を立てたり、報告書をまとめるにはガイドラインを参照するのが一番であるが、要点については食品総合研究所ホームページ<sup>1)</sup>及び参考文献<sup>2)</sup>でこれまでに紹介してきた。したがって、ここでは、ガイドラインにそって報告書をまとめる際に必要になるデータ解析のなかの、1) ランダム性確保のための乱数の使い方、2) 化学分析法の精度の妥当性判断基準に用いられている Horwitz の式、3) 室間共同試験又は技能試験などの配付試料の均質性確認試験、4) 化学分析の定量法の室間共同試験、5) 定性分析法の室間共同試験、について例題を用いて説明する。

なお、本稿では IUPAC/ISO/AOAC International のハーモナイズドプロトコルはハーモナイズドプロトコル、AOAC International は AOAC と記する。

また、本稿では実験データから計算した不偏標準偏差（母集団の標準偏差  $\sigma$  の推定値）の頭文字には  $S$  を用いることにする。

### 2. データの表示方法と桁数

室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>には、報告のための最終的な平均値および標準偏差を計算するときは、計算途中で四捨五入、切り上げ切り下げのような丸めを行わず、計算機またはコンピュータで直接計算するように記載されている。そして、最終的に報告する標準偏差及び相対標準偏差の有効数字は2桁にし、平均値の有効数字は標準偏差の表示に合わせる。

例えば、室間再現標準偏差  $S_R = 0.012$  ならば平均濃度は  $0.147$ 、室間再現相対標準偏差  $RSD_{R\%} = 0.012/0.147 \times 100 = 8.2\%$  と報告する。なお、平均濃度を  $0.1473$  あるいは  $0.15$  としてはならないと、室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>に例示されている。

ただし、他の計算に使用する平均値や標準偏差は、桁数が多くなっても元データから直接計算した値をそのまま報告書に記載しておいた方が、他の計算で求める値の丸め誤差が大きくなる。平均値や標準偏差の桁数を多く記載する場合は、計算に使用した測定値の有効数字や定量下限を併記しておけば、必要に応じて丸めることもできる。

### 3. ランダム性の確保

分析法の妥当性確認のデータ解析では、一元分散分析や枝分かれ実験のような実験計画法に含まれる分散分析というデータ解析法をよく利用する。例えば、一元分散分析は配付試料の均質性確認試験データの解析や定量分析法の室間共同試

験データの解析に、枝分かれ実験は単一試験室における中間精度のデータ解析に用いる。中間精度は、併行精度 (repeatability) と室間再現精度 (reproducibility) の中間の大きさをもつ精度のため、このように呼ばれる<sup>4)</sup>。一つの試験所内で時間、オペレータ、校正、機器などの変動要因を一つ又は複数変更して各変動要因の標準偏差及び総合的な室内精度を推定することを中間精度の評価という<sup>4)</sup>。

ランダム性の確保は、代表性のあるサンプリング、並びに誤差の評価及び制御に用いる実験計画法に必須の基本原則であり、実験計画法におけるFisherの3原則(反復、無作為化、局所管理)の一つである。

配付試料の均質性確認試験では、分析する試料を抜き取る時、及び抜き取った試料を分析する順番を決めるときに、抜き取り方法及び順番が「ランダム」である必要がある。適当に無計画に抜き取っただけではランダムさは十分に確保できていない<sup>5)</sup> ため、ランダムであることを保証するには乱数を用いる必要がある。

乱数を得るために乱数表を使う場合には、JIS Z9031:2001に乱数表が記載されており、その使い方として、

- 1) 乱数表の使用開始ページ、開始点をランダムに決める。
- 2) 10進数の1桁又は2桁の乱数が必要な場合には乱数表の右方向に進み、右端になったら次の行の左端に移動する。
- 3) 10進数の3桁以上の乱数が必要な場合には乱数表の下方向に進み、下端になったら次の列(同じページなら右方向)の上端に移動する。

のような注意点が記載されている。

電卓やパソコンソフトでも乱数が得られるが、本当に乱数として問題ないか確認した方がよい。例えば、Excel2003で乱数を発生させる関数RAND()は修正プログラムを適用する必要がある<sup>6)</sup>。

Excelで2桁の乱数が欲しい場合には、任意のセルに「=INT(RAND()\*100)」と式を入力すると0~99の乱数(1桁の乱数は十の位が0の2桁とみなす)が得られ、この式の100の部分を変えて1000にすれば0~999の3桁の乱数が得られる。 $n$ 個のセルにこの式を入力すれば $n$ 個の乱数が得られる。

### 例題1 乱数の使用例

- 1) 300個の試料の中から10個をランダムに抜き取る。
  - a) 300個の試料に任意に1~300の通し番号を付ける。
  - b) 3桁の乱数000~999を乱数表、電卓、パソコンなどから得る。
  - c) 001~300の乱数が出たら、その乱数と同じ通し番号をもつ試料を抜き取る。
  - d) 次の乱数に進む。それまでに出た乱数と同じ3桁の乱数のときは、その乱数は捨てて次の乱数に進む。
  - e) 10個の試料を抜き取るまで、c)とd)を繰り返す。

c)の方法では3桁の乱数1000個のうち300個しか使わないので効率が悪い。そこで、3桁の乱数を300で割った余りに1を足した数を試料番号として抜き取ると、000~899の900個の乱数が使えるようになり効率が良くなる。このとき、900~999の乱数が出たら捨てて次の乱数に進む。こうしないと1~100番の試料が111~300番の試料よりも選ばれやすくなり、300個の試料がどれも等しい確率で抜き取られることにならないためである。乱数の種類数（例えば2桁の乱数なら100種類、3桁の乱数なら1000種類）が、通し番号を付ける全試料数の整数倍でない場合は、捨てる乱数があることに注意する。

## 2) 18個の試料を分析する順番をランダムにする。

- a) 18個の試料に任意に1~18の通し番号を付ける。
- b) 2桁の乱数00~99を乱数表、電卓、パソコンなどから得る。
- c) 2桁の乱数を18で割った余りに1を足した数を試料番号とする。このとき、90~99の乱数が出たら捨てる。
- d) 次の乱数に進む。それまでに出了た乱数と同じ2桁の乱数のときは、その乱数は捨てて次の乱数に進む。
- e) 1~18のうちの17個の乱数が決まるまで、c)とd)を繰り返す。乱数が決まった順に試料を分析する。

## 4. Horwitzの式

妥当性を判断するには何かしらの判断基準が必要である。食品分析の分野において、化学分析法によって得られた測定値のばらつきの判断基準として広く利用されているHorwitzの式<sup>7)</sup>について説明する。Horwitzの式は、例えば、配付試料の均質性の判定及び均質性の確認に用いた分析法の併行精度の妥当性の判定<sup>8)</sup>、定量分析法の併行精度及び空間再現精度の妥当性の判定<sup>9, 10)</sup>、保管期間中の試料の安定性の判定<sup>11)</sup>などに用いられている。

Horwitzは1980年に、化学分析法の空間共同試験から得られる空間再現相対標準偏差 $RSD_R, \%$ は、分析法・マトリックス・分析対象成分にかかわらず濃度 $C$ が1% ( $C=0.01$ ) のときおおよそ4%であり、濃度が1/100になるごとに2倍になることを報告し<sup>7)</sup>、その関係式 $PRSD_R, \% = 2^{(1-0.5\log_{10} C)}$ をThompson<sup>12)</sup>が以下の使いやすい形の式に変形した<sup>13)</sup>。

$$PRSD_R, \% = 2C^{-0.5\log_{10} 2} = 2C^{-0.1505} \quad \dots (1)$$

$PRSD_R, \%$ は空間再現相対標準偏差の予測値 (predicted reproducibility relative standard deviation) である。 $PRSD_R, \% = \frac{\hat{\sigma}_R}{C} \times 100$ なので、濃度 $C$ における空間再現標準偏差の推定値 $\hat{\sigma}_R$ の式を(1)式から導出すると、

$$\hat{\sigma}_R = \frac{C \times RSD_R, \%}{100} = \frac{C \times 2C^{-0.1505}}{100} = 0.02C^{1-0.1505} = 0.02C^{0.8495} \dots (2)$$

になる。ここで、 $\hat{\sigma}_R$  はギリシャ文字  $\sigma$  が母集団パラメータ（母数）であることを、 $\hat{\phantom{\sigma}}$  が推定値であることを示す。

(1)式又は(2)式の Horwitz の式を妥当性確認に利用するときの注意点として、1) 食品分析の分野では、おおよそ 10ppb から 10% の濃度範囲（Horwitz region）における室間再現標準偏差の予測値として利用可能なこと、2) Horwitz の式は室間共同試験データを回帰分析して求めた式ではないこと、3) 分析法固有のバイアスが含まれていないため不確かさの目安として利用するには過小評価した値になっていることなどを Thompson は挙げている<sup>14)</sup>。

また、Horwitz は上記の式とともに、室間再現標準偏差  $S_R$ （異なる試験所で分析したときの測定値のばらつきを考慮した標準偏差で、多数ある試験所のなかのある一カ所で 1 回分析したときの測定値の不確かさを示す推定値）は、併行標準偏差  $S_r$ （同一の試験所において、同一のオペレータが同一の機器を用いて、分析用試料から均質な条件下で分析試料を取り出して行う併行分析を可能なかぎり短い時間内で複数回行ったときの測定値のばらつきを示す標準偏差で、併行分析の条件下で 1 回測定した測定値の不確かさを示す推定値）の通常 1.5～2 倍であることも報告している<sup>7)</sup>。

化学分析の定量法の性能指標として、室間共同試験で得られた室間再現相対標準偏差  $RSD_R, \%$  と、Horwitz の式で予測される室間再現相対標準偏差  $PRSD_R, \%$  の比である HorRat（Horwitz Ratio の略語で、HORRAT 又は Horrat と表記されてきたが、2004 年に造語の語源を示唆する HorRat という表記が提案されている<sup>13)</sup>）が、妥当性の判断に利用されている。HorRat による判断基準を以下に示す。

HorRat による室間再現標準偏差  $S_R$  の妥当性の判断基準

- ・AOAC の室間共同試験のガイドライン<sup>9)</sup> では  $0.5 < \text{HorRat} \leq 2$  なら妥当
- ・EU<sup>15)</sup> では  $\text{HorRat} < 2$  なら妥当

Codex の CCMAS（Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling）では「Analytical Terminology for Codex Use」（step 3）のなかで HorRat についても検討されている<sup>16)</sup>。

Horwitz の式は、化学分析法については、分析法・マトリックス・分析対象成分に依存せず、濃度だけで測定値のばらつき（標準偏差）を予測できることを示している。マトリックス・分析対象成分に依存しないことから、広い範囲の試料に適用可能な点が、妥当性の判断基準が必要という理由とともに Horwitz の式が広く利用されている理由である。ただし、低濃度側と高濃度側については Horwitz の式の実データへの当てはまりが良くないため、Thompson が 2000 年に

以下の修正式を提案している<sup>17)</sup>。

$$\hat{\sigma}_R = \begin{cases} 0.22C & (C < 1.2 \times 10^{-7}) \\ 0.02C^{0.8495} & (1.2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0.138) \\ 0.01C^{0.5} & (0.138 < C) \end{cases} \quad \dots (3)$$

(3)式から室間再現相対標準偏差  $PRSD_R, \%$  の式を導出すると以下になる。

$$PRSD_R, \% = \begin{cases} 22 & (C < 1.2 \times 10^{-7}) \\ 2C^{-0.1505} & (1.2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0.138) \\ C^{-0.5} & (0.138 < C) \end{cases} \quad \dots (4)$$

(3)式と(4)式の修正式は、FAPASの技能試験プロトコル<sup>18)</sup>に採用されており、技能試験のハーモナイズドプロトコル<sup>8)</sup>でも言及されているが、HorRatについて記載しているAOACの室間共同試験のガイドライン<sup>9)</sup>には今のところ記載されていない。

$S_R = 1.5S_r \sim 2S_r$  の関係から、(1)~(4)式は  $S_r$  の妥当性の判断にも利用可能である。つまり、内部精度管理における測定値のばらつきの妥当性確認にも Horwitz の式は利用できる<sup>10, 19)</sup>。

多くの化学分析法が HorRat の対象になるが、1) 粘度、屈折率、密度、pH、吸光度等の物理特性値、2) 食物繊維、酵素、水分、又はポリマーのように分子量不定なものの分析法等の経験的分析法 (empirical methods)、3) 固形物重量 (drained weight) のような品質測定 ("Quality" measurement, 品質の善し悪しを判定する測定法) は、HorRat の対象外である<sup>9)</sup>。

## 例題 2 Horwitz の式の計算例

化学分析法を用いて以下の濃度を測定したときの室間再現標準偏差及び室間再現相対標準偏差の予測値を Horwitz の修正式を用いて求める。

1) 20mg/kg    2) 100ppb    3) 20%    4) 100g/kg    5) 0.05ppm

(3)式を用いて室間再現標準偏差  $\hat{\sigma}_R$  を計算し、(4)式を用いて室間再現相対標準偏差  $PRSD_R, \%$  を計算する。濃度によって Horwitz の修正式は 3 通りあるので、どの式を選択するか注意する。また、濃度  $C$  には 1 ppb なら  $1 \times 10^{-9}$ 、1 ppm 又は 1 mg/kg なら  $1 \times 10^{-6}$ 、1 g/kg なら  $1 \times 10^{-3}$ 、1 % なら  $1 \times 10^{-2}$  を代入する点にも注意する。

例えば、 $C = 1 \text{ ppm}$  のとき、

$$\hat{\sigma}_R = 0.02(1 \times 10^{-6})^{0.8495} = 1.6 \times 10^{-7} = 0.16 \times 10^{-6} = 0.16 \text{ (ppm)}$$

$$PRSD_R, \% = 2(1 \times 10^{-6})^{-0.1505} = 16 \text{ (\%)}$$

になる。表 1 に例題 2 の解答を示す。

表1 例題2の解答

濃度	$\hat{\sigma}_R$	$PRSD_R, \%$
1) 20 mg/kg	2.0 mg/kg	10 %
2) 100 ppb	22 ppb	22 %
3) 20 %	0.45 %	2.2 %
4) 100 g/kg	2.8 g/kg	2.8 %
5) 0.05 ppm	0.011 ppm	22 %

## 5. 均質性確認試験

室間共同試験や技能試験では、均質性を確認した試料を配付する。この均質性の確認方法について、具体的な方法を記載したガイドラインがいくつか存在する<sup>8, 20, 21)</sup>。どのガイドラインでも、予備も含めて必要数を調製した配付試料のなかから、乱数を用いてランダムに複数個（AOACでは8個以上<sup>21)</sup>、技能試験のハーモナイズドプロトコルでは10個以上<sup>8, 20)</sup>の分析用試料（test sample）を抜き取り、抜き取った各分析用試料から併行分析用に複数個（AOACでは3個以上<sup>21)</sup>、技能試験のハーモナイズドプロトコルでは2個以上<sup>8, 20)</sup>の分析試料（test portion）を取り出す。均質性確認に用いる分析用試料は、配付試料の一部であり、その測定値から残りの未測定配付試料の均質性を判定するためには、配付試料を代表するように分析用試料を乱数を用いてランダムサンプリングすることが必須である。

均質性確認のために分析する試料の総数は20個以上になるが、これらの試料を分析する順番も乱数を用いてランダムにする。測定値が時間とともにシフト（ドリフト）すると試料間の濃度差にドリフト分が加算され、均質性の判定結果に影響を及ぼす危険性があるため、分析する順番をランダムにすることも重要である。

次に、試料量について注意しておく。分析法のプロトコルの妥当性確認が目的で行う室間共同試験では、試験所に配付する試料量は、基本的には試験所が2回併行分析できない必要最小限の量である。したがって、均質性の確認試験は、分析プロトコルで定めた試料量より少ない量（約1/2になる場合あり）で分析を行うことになる。そこで、試料量が少ないと分析精度の低下が懸念される場合（例えば、検出器の感度不足など）は事前に分析精度を確認する。

以上のようにして得られた20個以上の測定値を用いて配付試料の均質性を確認するが、判定方法がガイドラインによって異なる。また、得られた測定値の外れ値検定を行うかどうかや外れ値検定の危険率もガイドラインによって異なる。よって、均質性確認試験の方法を報告するときは、参照したガイドラインを明記する。ここでは、均質性確認試験の代表的な判定方法について、図1のフローに従って例題を用いて説明する。

均質性確認試験では、変量モデルを用いた一元分散分析を行い、分析用試料間

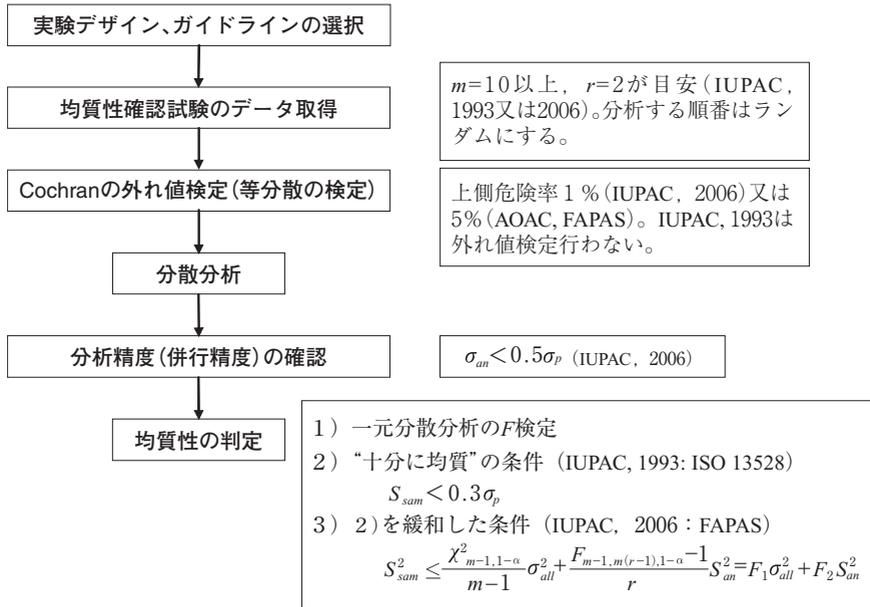


図1 均質性確認試験の実施手順

図中のIUPACは技能試験のハーモナイズドプロトコルの1993年版<sup>20)</sup>、2006年版<sup>8)</sup>、AOACは均質性確認のガイドライン<sup>21)</sup>、FAPASはFAPASの技能試験プロトコル<sup>18)</sup>を示す。 $m$ は分析用試料の数、 $r$ は各分析用試料の併行測定回数である。 $\sigma_p$ は、妥当性確認を行う目的に適合した標準偏差を表しており、添え字のpはfitness for purposeのpurposeの頭文字である。化学分析法では $\sigma_p$ にHorwitzの式から計算した空間再現標準偏差を用い、3)の均質性判定式中の $\sigma_{all} = 0.3\sigma_p$ である。各分析用試料の併行測定回数 $r$ が不揃いで、回数を揃えたい場合は、余分な測定値を乱数を用いてランダムに選択して取り除く<sup>22, 23)</sup>。複数の材料の均質性を判定する場合は、均質性の判定方法1)～3)のなかの同じ方法を採用することが望ましい。

の測定値のばらつき(サンプリング誤差)と併行分析による測定値のばらつき(併行精度)のそれぞれの大きさ(分散)を推定する。均質性確認試験によって得られる測定値の変量モデルとして、

$$x_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \cdots (5)$$

を考える。ここで、 $x_{ij}$ は分析用試料*i*から取り出した分析試料*j*を分析して得られた測定値、 $\mu$ は測定値の真値、 $\alpha_i$ は分析用試料が異なることによって測定値が変動する主変動因子のサンプリング誤差を表し、併行分析による測定値のばらつき $\varepsilon_{ij}$ とは独立な平均0、分散 $\sigma_{sam}^2$ の正規分布 $N(0, \sigma_{sam}^2)$ に従って変動すると仮定する。 $\varepsilon_{ij}$ は誤差因子で、各分析用試料は共通の分散をもち、互いに独立な平均0、

併行測定回数	分析用試料 1	.....	分析用試料 $m$	
1	$x_{11}$	.....	$x_{m1}$	} $\sigma_{an}$ の推定
.	.		.	
.	.		.	
$r$	$x_{1r}$	.....	$x_{mr}$	
平均値	$\bar{x}_1$	.....	$\bar{x}_m$	$\bar{\bar{x}}$ (総平均値)

$\sigma_{sam}$  の推定

図 2 均質性確認試験のデータ構造

1 個の分析用試料から取り出した 1 個の分析試料を 1 回分析したときの測定値  $x$  の不確かさを表す分散  $\sigma_x^2 = \sigma_{an}^2 + \sigma_{sam}^2$

分散  $\sigma_{an}^2$  の正規分布  $N(0, \sigma_{an}^2)$  に従って変動すると仮定する。(5)式の未知パラメータ  $\mu$  はデータの総平均値で推定し、 $\sigma_{sam}$  と  $\sigma_{an}$  は一元分散分析によって推定する。均質性確認データから求めた  $\sigma_{sam}$ 、 $\sigma_{an}$  の推定値をそれぞれ  $S_{sam}$ 、 $S_{an}$  とする。

均質性確認試験で得られた  $m \times r$  個の測定値 (図 2) から、(6)式と(7)式の左辺を計算する。これらの式の左辺は、一元分散分析のグループ内分散 (6 式) とグループ間分散 (7 式) の計算式であり、右辺は、(5)式の変量モデルを用いて求めた左辺の期待値である。

$$\frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{m(r-1)} = S_{an}^2 \quad \dots (6)$$

$$\frac{r \sum_{i=1}^m (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{m-1} = S_{an}^2 + rS_{sam}^2 \quad \dots (7)$$

併行標準偏差  $S_{an}$  は、 $i$  番目の分析用試料の測定値  $\bar{x}_i$  とそこから取り出した分析試料の測定値  $x_{ij}$  の差の 2 乗を  $r$  個 ( $j = 1, \dots, r$ ) 足し、それを  $m$  個 ( $i = 1, \dots, m$ ) の分析用試料分足したものを自由度  $m(r-1)$  で割った不偏分散の平方根になる。ここで、分析用試料の測定値  $\bar{x}_i$  は  $r$  個の分析試料の測定値  $x_{ij}$  の平均値である。

$m \times r$  個の全測定値の総平均値  $\bar{\bar{x}}$  と  $i$  番目の分析用試料の測定値  $\bar{x}_i$  の差の 2 乗を  $m$  個 ( $i = 1, \dots, m$ ) 足したものを  $r$  倍し自由度  $m-1$  で割った不偏分散は、併行精度の分散  $S_{an}^2$  とサンプリング誤差の分散  $S_{sam}^2$  の  $r$  倍の和に等しい。

よって、(7)式の左辺の値から(6)式の左辺の値を引き、 $r$ で割ると  $S_{sam}^2$  が得られ、

その平方根が $S_{sam}$ になる。

Excelでは、「分析ツール」内の「一元分散分析」を行うと出力される分散分析表の「グループ内の分散」=  $S_{an}^2$ 、「グループ間の分散」=  $S_{an}^2 + rS_{sam}^2$ になる。したがって、Excelを用いると

$$S_{an} = \sqrt{\text{グループ内の分散}} \quad \dots (8)$$

$$S_{sam} = \sqrt{\frac{\text{グループ間の分散} - \text{グループ内の分散}}{r}} \quad \dots (9)$$

で $S_{an}$ と $S_{sam}$ を求めることができる。「グループ間の分散 < グループ内の分散」の場合については、例題3の4)の解答で説明する。

### 例題3 均質性の確認試験データの解析例

図1のフローに従って表2のデータを用いて均質性の確認を行う。

- 1) Cochran検定(危険率は上側1%)を行い、外れ値があれば除外して再検定し、なければ次に進む。
- 2) 併行精度(併行標準偏差)は、技能試験のハーモナイズドプロトコル(2006)<sup>8)</sup>の基準を満たしているか確認し、基準を満たしていれば次に進む。
- 3) 一元分散分析のF検定で、試料は均質といえるか確認する。
- 4) 技能試験のハーモナイズドプロトコル(1993)<sup>20)</sup>の判定によって、試料は「十分に均質」といえるか確認する。
- 5) 技能試験のハーモナイズドプロトコル(2006)の判定によって、試料は均質といえるか確認する。

表2 均質性確認試験のデータ

	単位 (mg/kg)									
	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7	試料8	試料9	試料10
測定値	5.64	5.52	5.48	6.15	5.48	5.57	5.43	5.40	5.69	5.48
	5.46	5.55	5.35	5.45	5.43	5.44	5.60	5.38	5.59	5.53

注)「試料」は分析試料の略

#### 1) Cochran検定

配付試料の均質性の判定をするために、表2のデータを用いて一元分散分析を行うが、「各分析用試料の分散が等しい」という分散分析の前提条件を満たしているかはじめに確認する。均質性確認試験における外れ値検定について記載しているガイドライン<sup>8, 21)</sup>では、この等分散の検定にCochran検定を採用している。Cochran検定は、分析用試料の測定値のばらつきは正規分布に従うと仮定して、

表3 Cochran検定の1回目

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7	試料8	試料9	試料10	計	Cochranの 検定統計量
測定値	5.64	5.52	5.48	6.15	5.48	5.57	5.43	5.40	5.69	5.48		
	5.46	5.55	5.35	5.45	5.43	5.44	5.60	5.38	5.59	5.53		
標準偏差 $S_i$	0.127	0.021	0.092	0.495	0.035	0.092	0.120	0.014	0.071	0.035		
$S_i^2$	0.01620	0.00045	0.00845	0.24500	0.00125	0.00845	0.01445	0.00020	0.00500	0.00125	0.30070	0.815
偏差 $D_i$	0.18	-0.03	0.13	0.70	0.05	0.13	-0.17	0.02	0.10	-0.05		
$D_i^2$	0.0324	0.0009	0.0169	0.4900	0.0025	0.0169	0.0289	0.0004	0.0100	0.0025	0.6014	0.815

「分析用試料の分散はすべて等しい」という帰無仮説を検定する。Cochran検定の結果が有意な場合は、当該の分析用試料のデータを除き、残りの分析用試料のデータでCochran検定を繰り返す。ただし、技能試験のハーモナイズドプロトコル(2006)<sup>8)</sup>には外れ値になる分析用試料が2個以上含まれる均質性確認データは疑わしいので破棄すべきと記載されている。

Cochranの検定統計量を求めるために、分析用試料毎に測定値の分散 $S_i^2$ を計算する。測定値が2個の場合は2個の測定値の偏差の2乗 $D_i^2$ を計算しても同じ検定統計量が得られる。各分析用試料の測定値が3個以上ある場合は、そこから測定値2個を取り出す全ての組み合わせについて偏差の2乗を計算し、それらの和が $D_i^2$ になる。つまり、併行測定回数 $r=2$ のときは $D_i^2=(x_{i1}-x_{i2})^2$ であり、 $r=3$ のときは $D_i^2=(x_{i1}-x_{i2})^2+(x_{i1}-x_{i3})^2+(x_{i2}-x_{i3})^2$ である。

Cochranの検定統計量は、最大の $S_i^2$ 又は $D_i^2$ が、全分析用試料の $S_i^2$ 又は $D_i^2$ の和に占める比率なので以下の式で計算する。

$$\text{Cochranの検定統計量} \quad C = S_{\max}^2 / \sum_{i=1}^m S_i^2 \quad \dots (10)$$

$$C = D_{\max}^2 / \sum_{i=1}^m D_i^2 \quad \dots (11)$$

表2の分析用試料では、分析用試料4のばらつき( $S_i^2$ 又は $D_i^2$ )が最大(表3)なので、

$$\text{Cochranの検定統計量} \quad C = S_{\max}^2 / \sum_{i=1}^m S_i^2 = 0.245 / 0.3007 = 0.815$$

$$C = D_{\max}^2 / \sum_{i=1}^m D_i^2 = 0.49 / 0.6014 = 0.815$$

となる。

Cochran検定統計量は、0より大きく1より小さい値をとる。等分散の仮定の

もとで、Cochran検定統計量の分布は、右に裾を引いた分布になるが、分析用試料数及び各分析用試料の併行測定回数によって分布の形が変化する。したがって、Cochran検定統計量の棄却限界値は、上側危険率、分析用試料数、及び各分析用試料の併行測定回数によって定まる値である。

Cochran検定統計量の上側危険率5%又は1%の棄却限界値は、JIS Z 8402-2:1999又は技能試験のハーモナイズドプロトコル(2006)<sup>8)</sup>に記載された数表で確認する。ただし、ハーモナイズドプロトコルの数表は各分析用試料の併行測定回数が2回の場合だけ記載しており、JIS Z 8402-2の数表には併行測定回数が2～6回の場合が記載されている。

上側危険率1%、抜き取った分析用試料数 $m = 10$ 、各分析用試料の併行測定回数 $r = 2$ のCochran検定統計量の棄却限界値は0.718であり、上記のCochran検定統計量0.815が棄却限界値0.718を超えているため、分析用試料4の2個の測定値のばらつきは上側危険率1%で外れ値である。この検定では、分散が小さいことは外れ値と考えず、最大分散だけを外れ値候補として検定するので上側危険率を設定した片側検定である。

表4 Cochran検定の2回目

	試料1	試料2	試料3	試料5	試料6	試料7	試料8	試料9	試料10	計	Cochranの 検定統計量
測定値	5.64	5.52	5.48	5.48	5.57	5.43	5.40	5.69	5.48		
	5.46	5.55	5.35	5.43	5.44	5.60	5.38	5.59	5.53		
標準偏差 $S_i$	0.127	0.021	0.092	0.035	0.092	0.120	0.014	0.071	0.035	0.05570	
$S_i^2$	0.01620	0.00045	0.00845	0.00125	0.00845	0.01445	0.00020	0.00500	0.00125		0.291
偏差 $D_i$	0.18	-0.03	0.13	0.05	0.13	-0.17	0.02	0.10	-0.05	0.1114	
$D_i^2$	0.0324	0.0009	0.0169	0.0025	0.0169	0.0289	0.0004	0.0100	0.0025		0.291

分析用試料4のデータを除外して、再度Cochran検定を行う。残り9個の分析用試料のなかでは分析用試料1のばらつきが最大である(表4)。

$$\text{Cochranの検定統計量} \quad C = S_{\max}^2 \left/ \sum_{i=1}^m S_i^2 \right. = 0.0162 / 0.0557 = 0.291$$

$$C = D_{\max}^2 \left/ \sum_{i=1}^m D_i^2 \right. = 0.0324 / 0.1114 = 0.291$$

上側危険率1%、 $m = 9$ 、 $r = 2$ のCochran検定統計量の棄却限界値は0.754であり、Cochran検定統計量0.291は棄却限界値0.754以下なので、外れ値は存在しない。

表5 表4の18個の測定値の一元分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F境界値
グループ間	0.089878	8	0.011235	1.815305206	0.196257	3.229587
グループ内	0.0557	9	0.006189			
合計	0.145578	17				

## 2) 併行精度（併行標準偏差）のチェック

分析用試料4を除外した9個の分析用試料の2回併行測定データを用いて一元分散分析を行う。Excelで計算した分散分析表を表5に示す。分散分析表の「グループ間の分散」の自由度は分析用試料数-1, 「グループ内の分散」の自由度は分析用試料数×(併行測定回数-1)になっていることを確認する。

(8)式より一元分散分析のグループ内の分散の平方根が、併行標準偏差 $S_{an}$ なので、

$$S_{an} = \sqrt{0.006189} = 0.0787 \text{ (mg/kg)}$$

18個の測定値の総平均値5.50 (mg/kg) を(2)式のHorwitzの式に代入して、

$$\hat{\sigma}_R = 0.02 \times (5.50 \times 10^{-6})^{0.8495} = 0.6807 \text{ (mg/kg)}$$

$S_{an} = 0.0787 < 0.5 \hat{\sigma}_R = 0.34$ なので、均質性確認試験に用いた分析法の併行精度に問題はない。

## 3) 一元分散分析のF検定による均質性確認

表5より一元分散分析の観測された分散比 $F_{cal} = 1.8$ は、上側危険率5%のF境界値3.2よりも小さく、P-値 = 0.196 > 0.05で5%有意ではないため、試料は均質といえる。

F検定によって二つの分散の大小を検定する場合は、「分散1 = 分散2」という帰無仮説に対する対立仮説が「分散1 ≠ 分散2」ならば、F分布の上側と下側の両方に危険率を設定した両側検定になり、「分散1 < 分散2」又は「分散1 > 分散2」ならば下側危険率又は上側危険率のどちらかを設定した片側検定になる。均質性確認試験の場合は、変量モデルを用いた一元分散分析を行っており、このF検定の帰無仮説は「(5)式の変量モデルの $\sigma_{sam}^2 = 0$ 」であり、対立仮説は「 $\sigma_{sam}^2 > 0$ 」である。したがって、このF検定は、上側危険率を設定した片側検定である。

#### 4) 「十分に均質」の判定

技能試験のハーモナイズドプロトコル (1993)<sup>20)</sup> で採用された「十分に均質」の判定式

$$S_{sam} < 0.3 \sigma_p \quad \cdots (12)$$

が成り立つか計算する。化学分析法では  $\sigma_p$  に Horwitz の式から計算した室間再現標準偏差  $\hat{\sigma}_R$  を用いる。この判定式の右辺の 0.3 は次のような意味をもつ。サンプリング誤差  $\sigma_{sam}$  が  $\sigma_R$  の 0.3 倍の場合、このサンプリング誤差は各試験所に配付した試料濃度の違いに反映されるため、

$$\sqrt{\sigma_R^2 + \sigma_{sam}^2} = \sqrt{\sigma_R^2 + (0.3 \sigma_R)^2} = \sqrt{1.09 \sigma_R^2} = 1.04 \sigma_R \quad \cdots (13)$$

のように室間再現標準偏差  $\sigma_R$  が約 5 % 大きくなる。5 % 程度の誤差は許容できる<sup>24)</sup> ので、 $\sigma_{sam}$  が  $0.3 \sigma_R$  より小さければ、 $\sigma_R$  の推定に  $\sigma_{sam}$  は影響しないと考える。

表 5 の分散分析表の「グループ間の分散」と「グループ内の分散」から (9) 式を用いて  $S_{sam}$  を求めると、

$$S_{sam} = \sqrt{(0.011235 - 0.006189) / 2} = 0.0502 \text{ (mg/kg)}$$

上記の 2) で求めた  $\hat{\sigma}_R = 0.6807$  を用いると、

$$S_{sam} = 0.0502 < 0.3 \hat{\sigma}_R = 0.3 \times 0.6807 = 0.204$$

なので「十分に均質」といえる。

技能試験のハーモナイズドプロトコル (1993)<sup>20)</sup> では、外れ値検定を行わずに (12) 式の判定を行うので、1993 年のプロトコル通りに判定するには表 1 のデータの一分散分析を行う。表 6 に表 1 のデータの分散分析表を示す。表 6 では「グループ間の分散 < グループ内の分散」なので、(9) 式の平方根の中が負の値になりサンプリング誤差  $S_{sam}$  を求めることができない。AOAC の均質性確認のガイドライン<sup>21)</sup> では、一元分散分析の分散比は理論的には 1 以上が期待されるのに 1 未満の値が得られる原因として、測定順をランダム化していないか、一元分散分析モデルの仮定が成り立っていないことを挙げている。実際には測定順をランダム

表 6 表 1 の 20 個の測定値の一元分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	0.25068	9	0.027853	0.926283117	0.541075	3.020382
グループ内	0.3007	10	0.03007			
合計	0.55138	19				

ム化しても「観測された分散比」が1未満になることは起きており、そのときは  $S_{sam} = 0$  とみなすが、外れ値検定を行っていない場合は、外れ値検定を利用した場合の結果を検討してから均質性の最終的な判断をした方がよい。

#### 5) 「十分に均質」の判定条件を緩和した判定

技能試験のハーモナイズドプロトコル (1993)<sup>20)</sup> の  $S_{sam} < 0.3\sigma_p$  による「十分に均質」の判定は、併行標準偏差が小さい分析法を用いた場合などに判定条件が厳しすぎることがあるため、FAPASの技能試験プロトコル (2002)<sup>18)</sup> では、この判定条件を緩和した条件<sup>24)</sup>を採用した。技能試験のハーモナイズドプロトコル (2006)<sup>8)</sup> でもFAPASと同じ判定条件を採用している。

配付試料の均質性を判定するために、データから一元分散分析を用いて計算したサンプリング誤差  $S_{sam}$  は、真のサンプリング誤差  $\sigma_{sam}$  の推定値である。計算された  $S_{sam}$  はデータから考えて最も確からしい真の  $\sigma_{sam}$  の推定値であるが、推定誤差があるため真の  $\sigma_{sam}$  がもっと小さい値になる可能性は存在する。そこで、 $\sigma_{sam}$  の95%信頼区間（ただし、片側危険率5%を使用）の下限値を真の  $\sigma_{sam}$  の推定値とみなせば、一元分散分析で計算した  $S_{sam}$  よりも小さな値になり、 $S_{sam} < 0.3\sigma_p$  の判定式の左辺が小さくなって均質と判定される可能性が高くなる。この考え方に基づいた均質性の判定式が以下の式である。

$$S_{sam}^2 \leq \frac{\chi_{m-1, 1-\alpha}^2}{m-1} \sigma_{all}^2 + \frac{F_{m-1, m(r-1), 1-\alpha} - 1}{r} S_{an}^2 = F_1 \sigma_{all}^2 + F_2 S_{an}^2 \quad \dots (14)$$

ここで、 $m$  は分析用試料数、 $r$  は分析用試料の併行測定回数、 $\alpha$  は上側危険率5%なので0.05を用いる。 $\sigma_{all}$  は許容可能なサンプリング誤差の上限で、十分に均質の判定式の(12)式と同じ  $0.3\sigma_p$  を用いる。

$m = 7 \sim 20$ 、 $r = 2$  のときの  $F_1$  と  $F_2$  の値は技能試験のハーモナイズドプロトコル (2006)<sup>8)</sup> の数表に掲載されている。この数表にない  $m$  と  $r$  については、 $\chi_{m-1, 1-\alpha}^2$  はExcelのCHIINV( $\alpha, m-1$ ) 関数で計算し、 $F_{m-1, m(r-1), 1-\alpha}$  はExcelのFINV( $\alpha, m-1, m(r-1)$ ) で計算すると、 $F_1$  と  $F_2$  を求めることができる。例えば、 $m = 10$ 、 $r = 2$  のとき、

$$\text{CHIINV}(0.05, 10-1) = 16.91896 \text{ より } F_1 = 16.91896/9 = 1.88$$

$$\text{FINV}(0.05, 10-1, 10(2-1)) = 3.020382 \text{ より } F_2 = (3.020382-1)/2 = 1.01$$

となる。

$m = 9$ 、 $r = 2$  のとき、技能試験のハーモナイズドプロトコル (2006)<sup>8)</sup> に記載された数表より(14)式の  $F_1 = 1.94$ 、 $F_2 = 1.11$  である。この例題3の2)及び4)より、外れ値除去後の18個のデータの分散分析表（表5）から計算した  $S_{an} = 0.0787$  (mg/kg)、 $S_{sam} = 0.0502$  (mg/kg) である。例題3の2)より  $\hat{\sigma}_R = 0.6807$  (mg/kg)

なので、(14式中の  $\sigma_{all} = 0.3 \sigma_p = 0.3 \hat{\sigma}_R = 0.3 \times 0.6807$  になる。したがって、

$$(14\text{式の不等式の左辺}) = (0.0502)^2 = 0.0025$$

$$(14\text{式の不等式の右辺}) = 1.94(0.3 \times 0.6807)^2 + 1.11(0.0787)^2 = 0.088$$

なので(14式の不等式が成立し、試料は均質といえる。

(14式の右辺第1項がないと一元分散分析のF検定と同じ不等式になるため、一元分散分析のF検定で均質な材料は(14式では必ず均質になる。

この例題では3種類の均質性判定式を全て計算したが、実際の均質性確認では、用いる判定式を先に決めて、その判定式の計算だけ行えばよい。

## 6. 化学分析の定量法の室間共同試験のデータ解析

化学分析の定量分析法については、室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>及びAOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>を参考にデータ解析を行う。ISO 5725-2<sup>25)</sup>(JIS Z 8402-2はこれの一致規格)も室間共同試験のガイドラインであるが、以下に示す実施上の最低条件は記載されていない。一元分散分析を用いて室間共同試験のデータから室間再現標準偏差  $\sigma_R$  と併行標準偏差  $\sigma_r$  を推定するという基本的部分はIUPAC、ISO、AOACの三者共通であるが、外れ値検定の方法などに多少の違いがあるので、報告する場合には参考にしたガイドラインを明記する。

AOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>に記載された試験実施上の最低条件を以下に示す。

### AOACの定量分析法の室間共同試験実施上の最低条件

- ・外れ値検定後の有効試験所数が8以上(必要な設備・機器を所有している試験所が限定される場合は5以上)。
- ・分析法の適用範囲と考えているマトリックを代表する材料数が5以上(1マトリックスに1濃度のときは3材料に減らしてもよい)。
- ・各試験所の併行測定回数は、室間共同試験で  $S_r$  を求めないときは1回、 $S_r$  を求めるときは2回。併行測定は非明示の2反復(blind duplicate)又はsplit levels(Youdenペア)で通常は行うべきである。

材料数の注意点として、規制値との比較が目的の分析法では、少なくとも規制値未満と規制値超の2材料で妥当性を確認する必要がある、1マトリックス2濃度以上で試験する必要がある。

試験所間の測定値のばらつき(分散)と試験所内の測定値のばらつきを推定するために、室間共同試験によって得られる測定値の変量モデルとして、

$$x_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad \cdots (15)$$

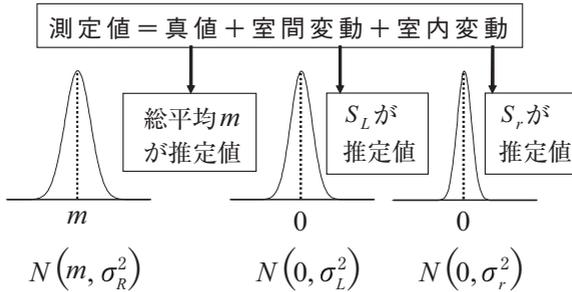


図3 定量分析法の室間共同試験によって得られる測定値の変量モデル

表7 化学分析法の室間共同試験の模擬データ

試験所	濃度 (%)		
	測定値 1	測定値 2	測定値 3
1	7.25	7.21	7.17
2	7.32	7.42	
3	7.67	7.57	
4	7.00	7.08	
5	5.80	5.70	
6	7.42	7.62	
7	7.24	6.94	7.42
8	7.32	7.48	
9	7.09	6.69	7.00
10	6.79	7.69	
11	6.87	6.67	
12	7.16	6.76	
総平均	7.09 (n=27)		

を考える (図3)。ここで、 $x_{ij}$  は試験所  $i$  が  $j$  番目に分析して得られた測定値、 $\mu$  は測定値の真値、 $\alpha_i$  は試験所が異なることによって測定値が変動する主変動因子を表し、併行分析による測定値のばらつき  $\varepsilon_{ij}$  とは独立な平均0、分散  $\sigma_L^2$  の正規分布  $N(0, \sigma_L^2)$  に従って変動すると仮定する。 $\varepsilon_{ij}$  は誤差因子で、各試験所は共通の分散をもち、互いに独立な平均0、分散  $\sigma_r^2$  の正規分布  $N(0, \sigma_r^2)$  に従って変動すると仮定する。(15)式の未知パラメータ  $\mu$  はデータの総平均値で推定し、 $\sigma_L$  と  $\sigma_r$  は一元分散分析によって推定する。室間共同試験データから求めた  $\sigma_L$ 、 $\sigma_r$  の推定値をそれぞれ  $S_L$ 、 $S_r$  とする。(15)式は均質性確認試験の変量モデル(5)式と同じ形なので、図2の分析用試料を試験所と読み替えることができ、(6)式の  $S_{am}^2$  を  $S_r^2$ 、(7)式の  $S_{sam}^2$  を  $S_L^2$  として計算に利用できる。室間再現標準偏差  $\sigma_R$  の推定値  $S_R$  は

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2} \quad \cdots (16)$$

で求める。 $S_R$ は、 $S_R$ を求めた分析法を用いて、多数ある試験所のなかのある一カ所で1回分析したときに得られる測定値の不確かさの推定値である。

定量分析法の室間共同試験で各試験所から集まるデータを、行方向に試験所、列方向に併行分析の測定値で配置すると、表7のようなデータになる。室間共同試験は通常2回併行分析を行うので、測定値は通常2列になる。

表7の行方向の測定値の変動から(15)式のモデルパラメータ $\sigma_L$ の推定値 $S_L$ を、列方向の測定値の変動から(15)式のモデルパラメータ $\sigma_r$ の推定値 $S_r$ を求め、室間再現標準偏差 $\sigma_R$ の推定値 $S_R$ は(16)式を用いて求める。

Excelで計算する場合は、「分析ツール」内の「一元分散分析」を行うと出力される分散分析表の「グループ内の分散」が $S_r^2$ 、「グループ間の分散」が $S_L^2 + rS_r^2$ に等しいので、 $S_r$ 及び $S_R$ を簡単に求めることができる。出力された分散分析表の「グループ間の分散」の自由度は試験所数-1、「グループ内の分散」の自由度は試験所数×(併行測定回数-1)になっていることを確認する。

各試験所が $r$ 回併行分析した場合の $S_r$ と $S_R$ は、

$$S_r = \sqrt{\text{グループ内の分散}} \quad \cdots (17)$$

$$S_R = \sqrt{\frac{\text{グループ間の分散} - \text{グループ内の分散}}{r} + \text{グループ間の分散}} \quad \cdots (18)$$

で求めることができる。

#### 例題4 化学分析の定量法の室間共同試験データの解析例

表7の室間共同試験データを、室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>及びAOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>の手順に従って解析する。両者はほぼ同じ手順であるが、異なる点については後述する。

試験所によってデータ数が異なる場合に、データ数をそろえたいときは余計なデータを乱数を用いてランダムに選択して取り除く<sup>22, 23)</sup>。3個のデータを報告した試験所1, 7, 9については、そのうちの1個をランダムに取り除く。また、プロトコルに従わなかったなど有効なデータではない理由が明確な試験所のデータ(異常値)は外れ値検定の前に除外し、数値の記載ミスなど試験所に確認して修正が可能なデータ(異常値)は修正してから外れ値検定を行う。外れ値検定の手順を図4に示す。

##### 1) Cochran検定

室間共同試験の精度指標の計算の中心は分散分析である。分散分析では、各群の分散の大きさは等しいと仮定して解析するため、はじめに各試験所の分散がす

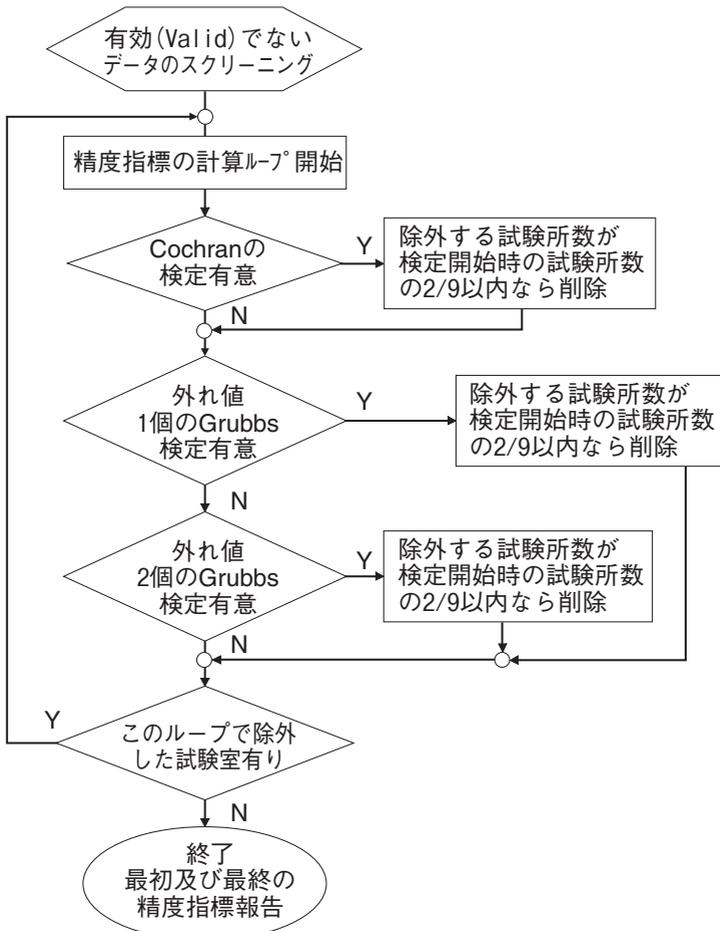


図4 室間共同試験データの外れ値検定のフロー

べて等しいといえるか検定する。室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>及びAOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>では、この等分散の検定にCochran検定を採用している。例題3の1)で説明したように、Cochran検定の検定統計量は(10)式又は(11)式で計算する。Cochran検定統計量の棄却限界値は、上側危険率、試験所数、及び各試験所の併行測定回数によって定まる値である。室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>及びAOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>のCochran検定の数表には、上側危険率2.5%の棄却限界値がパーセント表示されている。これらの数表で試験所数 $L=12$ の行と、各試験所の併行測定回数 $r=2$ の列が交差

表8 Cochran検定の結果

試験所	測定値1	測定値2	分散
1	7.21	7.17	0.0008
2	7.32	7.42	0.005
3	7.67	7.57	0.005
4	7.00	7.08	0.0032
5	5.80	5.70	0.005
6	7.42	7.62	0.02
7	7.24	6.94	0.045
8	7.32	7.48	0.0128
9	6.69	7.09	0.08
10	6.79	7.69	0.405
11	6.87	6.67	0.02
12	7.16	6.76	0.08
Cochran検定統計量 59.40 (%)			

注) この表は、表7で測定値が3個ある試験所は1個をランダムに削除したデータを示す。

する箇所の棄却限界値は59.2%である。(10式を用いて計算した表8のCochran検定統計量59.40%は棄却限界値の59.2%を超えているので上側危険率2.5%で有意である。したがって、最大分散を与えた試験所10の2個の測定値は外れ値として以後のデータ解析からは除外する。残りの11試験所のデータについてCochran検定を行った結果、検定統計量は28.90%になった。試験所数 $L = 11$ 、併行測定回数 $r = 2$ のときの上方危険率2.5%の棄却限界値は62.2%なので、11試験所の分散に上方危険率2.5%で有意差は認められない。

## 2) single Grubbs検定

次に、各試験所の平均値のなかに外れ値がないかsingle Grubbs検定を行う。まず、11個の平均値の標準偏差 $SD$ を計算する。次に、11個の平均値のなかの最大値を除いた残り10個の平均値の標準偏差 $SD_H$ 及び11個の平均値のなかの最小値を除いた残り10個の平均値の標準偏差 $SD_L$ を計算する。外れ値1個を除けば標準偏差は小さくなるはずなので、 $SD_H$ 又は $SD_L$ の $SD$ に対する減少率(%),  $100(1 - SD_H/SD)$ ,  $100(1 - SD_L/SD)$ をそれぞれ計算し、減少率の大きい方をsingle Grubbs検定の検定統計量にする<sup>3,9)</sup>。

Single Grubbs検定の検定統計量

$$100(1 - SD_H/SD) \text{ と } 100(1 - SD_L/SD) \text{ の大きい方の値} \quad \cdots (19)$$

$100(1 - SD_H/SD)$  と  $100(1 - SD_L/SD)$  は、「すべての試験所の平均値は同じ正規分

表9 single Grubbs 検定

試験所	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	7.21	7.17	7.19	0.0008
2	7.32	7.42	7.37	0.005
3	7.67	7.57	7.62	0.005
4	7.00	7.08	7.04	0.0032
5	5.80	5.70	5.75	0.005
6	7.42	7.62	7.52	0.02
7	7.24	6.94	7.09	0.045
8	7.32	7.48	7.40	0.0128
9	6.69	7.09	6.89	0.08
11	6.87	6.67	6.77	0.02
12	7.16	6.76	6.96	0.08
Cochran 検定			検定統計量 28.90 (%)	
single Grubbs 検定				
	$SD(L=11)$		0.5093	
	$SD_H(L=10)$		0.4991	
	$SD_L(L=10)$		0.2832	
	$100(1-SD_H/SD)$		2.00 %	
	検定統計量： $100(1-SD_L/SD)$		44.39 %	

布の母集団からランダムサンプリングによって得られた値である」という帰無仮説のもとで同じ分布をする。そして、 $100(1-SD_H/SD)$  と  $100(1-SD_L/SD)$  のどちらも 0～100%の間の値をとり、外れ値がなければ小さな値になり、外れ値があれば大きな値になるから、多くの場合は小さな値になって右に裾を引いた分布になる。したがって、この検定は上側危険率を設定した検定になる。ただし、各試験所の平均値のなかの最小値又は最大値のどちらが外れ値になるか事前に決まっていなければ、最小値が外れ値候補になる場合と最大値が外れ値候補になる場合の両方を検定するので両側検定になる。室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup> 及び AOAC の室間共同試験のガイドライン<sup>9)</sup> には両側危険率 2.5% (片側危険率 1.25%) の数表が記載されている。

表9より single Grubbs 検定の検定統計量は  $100(1-SD_L/SD) = 44.39\%$  になる。Grubbs 検定の数表<sup>3, 9)</sup> で、試験所数  $L = 11$  の行と One highest or lowest の列の交差する箇所の棄却限界値は 39.3% である。よって、検定統計量 44.39% は、上側危険率 1.25% の棄却限界値 39.3% よりも大きいため、11 個の平均値のなかの最小値 5.75(%) は両側危険率 2.5% で外れ値である。そこで、試験所 5 の報告した 2 個の測定値を解析から除外する。残りの 10 試験所のデータについて、Cochran 検定、

表10 paired Grubbs検定

試験所	測定値1	測定値2	平均	分散
1	7.21	7.17	7.19	0.0008
2	7.32	7.42	7.37	0.005
3	7.67	7.57	7.62	0.005
4	7.00	7.08	7.04	0.0032
6	7.42	7.62	7.52	0.02
7	7.24	6.94	7.09	0.045
8	7.32	7.48	7.40	0.0128
9	6.69	7.09	6.89	0.08
11	6.87	6.67	6.77	0.02
12	7.16	6.76	6.96	0.08
Cochran検定			検定統計量 29.43 (%)	
single Grubbs検定				
	$SD(L=10)$		0.28321	
	$SD_H(L=9)$		0.25288	
	$SD_L(L=9)$		0.25751	
検定統計量 : $100(1-SD_H/SD)$			10.71 %	
100(1- $SD_L/SD$ )			9.07 %	
paired Grubbs検定				
	$SD_{2L}(L=8)$		0.23892	
	$SD_{2H}(L=8)$		0.22242	
	$SD_{HL}(L=8)$		0.22689	
100(1- $SD_{2L}/SD$ )			15.64 %	
検定統計量 : $100(1-SD_{2H}/SD)$			21.46 %	
検定統計量 : $100(1-SD_{HL}/SD)$			19.89 %	

single Grubbs検定を行う（表10）。Cochran検定の検定統計量29.43%は上側危険率2.5%の棄却限界値65.5%（ $L = 10, r = 2$ ）より小さいので上側危険率2.5%で有意差は認められない。Single Grubbs検定の検定統計量 $100(1 - SD_H/SD) = 10.71\%$ は、上側危険率1.25%の棄却限界値42.8%（ $L = 10$ ）よりも小さいので両側危険率2.5%で有意差は認められない。

### 3) paired Grubbs検定

次に、2個の外れ値が互いに外れ値であることをマスキングしてsingle Grubbs検定では外れ値を検出できない場合があるため、各試験所の平均値のなかの最小値と2番目に小さい平均値の2個、最大値と2番目に大きい平均値の2個、又は最小値と最大値の2個の3通りについて、これら2個の平均値を除いたときの標準偏差（ $SD_{2L}, SD_{2H}, SD_{HL}$ ）の減少率から外れ値を検出するpaired Grubbs検定を行う<sup>3,9)</sup>。

AOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>では、3種類の減少率(%)、 $100(1-SD_{2L}/SD)$ 、 $100(1-SD_{2H}/SD)$ 、 $100(1-SD_{HL}/SD)$ のなかで最も大きな減少率が検定統計量になる。

AOACの室間共同試験ガイドラインのPaired Grubbs検定の検定統計量

$100(1-SD_{2L}/SD)$ 、 $100(1-SD_{2H}/SD)$ 、 $100(1-SD_{HL}/SD)$ のなかで最も大きな値  
… (20)

室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>では、paired Grubbs検定について、AOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>とは異なる2段階の検定手順を採用している。はじめに $100(1-SD_{2L}/SD)$ と $100(1-SD_{2H}/SD)$ のなかで大きな減少率を検定統計量にして検定し、この検定で外れ値が検出されたらCochran検定に戻り、外れ値が検出されなかったら $100(1-SD_{HL}/SD)$ を検定統計量にして次の検定を行う。

paired Grubbs検定の3種類の検定統計量は、「すべての試験所の平均値は同じ正規分布の母集団からランダムサンプリングによって得られた値である」という帰無仮説のもとで、どれも0~100%の間の値をとり、外れ値がなければ小さな値になり、外れ値があれば大きな値になるから、多くの場合は小さな値になって右に裾を引いた分布になる。したがって、この検定も上側危険率を設定した検定になる。ただし、最小値側の2個又は最大値側の2個が外れ値候補になる場合は、検定統計量の分布の形は同じであり、どちらが外れ値になるか事前に決まっていなければ、最小値側が外れ値候補になる場合と最大値側が外れ値候補になる場合の両方を検定するので両側検定になる。最小値と最大値の2個が外れ値候補の場合は、最小値側の2個又は最大値側の2個が外れ値候補になる場合と形が少し異なる検定統計量の分布に上側危険率を設定した検定になるが、この検定の対立仮説は「最小値と最大値はともに、他の値と同じ正規分布の母集団からランダムサンプリングして得られる値とはいえない」であり、この仮説に方向性はないので、両側検定か片側検定かの区分は当てはまらない。したがって、paired Grubbs検定の結果を説明するときに、危険率や検定の方向性を示すには、室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>のように、最小値側の2個又は最大値側の2個が外れ値候補になる場合と、最小値と最大値の2個が外れ値候補の場合に分けた方が説明しやすい。paired Grubbs検定による外れ値の有無を報告するだけならば、AOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>の手順の方が簡便である。

室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>及びAOACの室間共同試験ガイドライン<sup>9)</sup>には両側危険率2.5% (片側危険率1.25%)の数表が記載されている。

室間共同試験のハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>の検定手順では、表10よりPaired Grubbs検定のはじめの検定統計量は $100(1-SD_{2H}/SD) = 21.46\%$ になり、上側危険率1.25%の棄却限界値56.4% ( $L = 10$ の行とTwo highest or two lowestの列の交差する箇所値)より小さいので両側危険率2.5%で有意差は認められなかった。

表11 表10の20個の測定値の一元分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F境界値
グループ間	1.4437	9	0.160411	5.901806884	0.005213	3.020382
グループ内	0.2718	10	0.02718			
合計	1.7155	19				

表12 報告書に記載する項目例

項目名	
材料名（平均値の低い順に記載）	-
参加試験所数	12
データ解析に有効な試験所数	10
外れ値になった試験所数	2
各試験所の併行測定回数	2
平均値（%）	7.19
併行標準偏差 $S_t$ （%）	0.16
併行許容差 $2.8S_t$ （%）	0.46
併行相対標準偏差 $RSD_t$ （%）	2.3
室間再現標準偏差 $S_R$ （%）	0.31
室間再現許容差 $2.8S_R$ （%）	0.86
室間再現相対標準偏差 $RSD_R$ （%）	4.3
HorRat	1.4

注1）表中の値は表8のデータを解析した結果を示す。

注2）回収率を報告できるときは回収率の定義と値を報告する。

注3）参照したガイドラインを明記する。

注4）計算に使用したソフトウェア名、メーカー名、バージョンを明記する。

注5）データ解析から除外した試験所データも生データの表には記載し、解析から除外した理由を注記する。

異常値として除外した試験所も把握できるように記載する。

Paired Grubbs検定の次の検定統計量  $100(1 - SD_{HL}/SD) = 19.89\%$  は、上側危険率1.25%の棄却限界値59.5%（ $L = 10$ の行とOne highest and one lowestの列の交差する箇所の値）より小さいので、上側危険率1.25%で有意差は認められなかった。

#### 4）一元分散分析

外れ値を除外した表10の10試験所それぞれが2回併行分析したデータを一元分散分析で解析し、精度指標を計算する。分散の大きさを推定することが目的である変量モデルを用いた一元分散分析のF検定では、例題3の3）で説明したように、F分布の上側危険率を設定した片側検定を行う。

表11にExcelの「分析ツール」内にある「一元分散分析」の出力（分散分析表）を示す。表11の「観測された分散比」は「グループ間の分散」0.160411を「グル

ープ内の分散」0.02718で割った値で、 $F$ 値という。「グループ内の分散」は、一つの試験所内で併行分析を行ったときの平均的なばらつきの指標になり、「グループ間の分散」は「グループ内の分散」以上の大きさが期待されるので、 $F$ 値は1以上が期待される。実際のデータ解析では、一元分散分析の $F$ 値が1未満になることがあるが、その原因としては、実験の割付けをランダムに行わなかったか、解析に用いた一元分散モデルの仮定が、そのデータでは成り立っていないかが考えられる<sup>21)</sup>。よって、配付試料の番号には乱数を用いて、分析の順番が一定にならないように気をつける必要がある。このような実験上の注意をして得られたデータでも $F$ 値が1未満になった場合は、 $F$ 値=1、つまり $S_L=0$ で $S_r=S_R$ として<sup>3)</sup>、精度指標を計算する。

併行標準偏差 $S_r$ は、(17)式より $S_r=0.16$ (%)である。室間再現標準偏差 $S_R$ は、(18)式より $S_R=0.31$ (%)である。定量分析法の室間共同試験の報告書に記載する項目例<sup>3,9)</sup>を表12に示す。

## 7. 定性分析法の室間共同試験のデータ解析

定性分析法の室間共同試験について、定量的な化学分析法に関するIUPAC/ISO/AOACのハーモナイズドプロトコル<sup>3)</sup>のような国際的ガイドラインは2008年3月現在制定されていない。IUPACでは、2006年2月から定性的な分析法及びスクリーニング法(例えば、ELISA法によるアレルギー物質の検知、PCR法によるGMO検知、Lateral flow デバイスによる迅速検査)の室間共同試験に関するドラフトの作成を開始した<sup>26)</sup>が、ドラフトはまだ公開されていない。

AOACの室間共同試験のガイドライン<sup>9)</sup>は定量分析法についてのガイドラインであるが、定性分析法の室間共同試験についてもハーモナイズドプロトコル以外と明記した上で、実施上の最低条件が記載されている。

### AOACの定性分析法の室間共同試験実施上の最低条件

- ・10試験所が、陽性試料については1マトリック当たり2濃度、各濃度で6試料の結果を報告する。
- ・陰性試料については、マトリック当たり6試料の結果を報告する

2000年版までのAOACの室間共同試験ガイドラインには、McClureの提案<sup>27)</sup>を受けて定性分析法の室間共同試験の最低実施条件として15試験所、5試料と記載されていたが、2002年のガイドラインから上記に変更された。

また、AOACには、食品微生物の定量及び定性の公式分析法の妥当性確認に関するメソッドコミティーのガイドライン<sup>28)</sup>がある。これには、食品微生物の定性分析法について、単一試験室で行うメソッド比較試験(代替法と対照法の性能比較)及び室間共同試験の設計ガイドラインが含まれている。室間共同試験の試験所数などの条件は、上記の最低条件と同じである。

上記の試験所数及び併行測定回数の最低条件は、感度（陽性試料の正解率）又は特異性（陰性試料の正解率）の真値が80%と仮定したときに、その±10%の範囲内（72～88%）に、正規分布近似を用いて計算した比率（正解率）の90%信頼区間が入るのに必要な試験所数 $L$ と併行測定回数 $m$ の条件を与える式、 $362 \leq Lm^2$ をほぼ満たすように決められている<sup>27)</sup>。

ISO 16140:2003 食品及び動物用飼料の微生物に関する代替法の妥当性確認プロトコル<sup>29)</sup>では、以下の定性分析法の空間共同試験プロトコルを定めている。

**ISO 16140:2003の定性分析法の空間共同試験実施上の最低条件**

- ・ 外れ値のない最低10試験所の結果を報告する。
- ・ 陰性試料、代替法の検出限界よりも少し高い濃度の試料、及び検出限界の約10倍の濃度の試料の最低3濃度の試料を用いる。
- ・ 各試験所は、代替法及び対照法を用いて、各濃度の非明示試料（blind sample）を最低8回併行測定する。
- ・ 以上より、1試料について最低480個（2メソッド×10試験所×3濃度×8回併行）の測定結果を報告する。
- ・ 代替法については、微生物毎に試験が必要な試料タイプがまとめられているAnnex Bのリストから選択した各食品カテゴリーについて、少なくとも1種類の製品を用いて試験する。

## 7.1 DNA マーカの妥当性確認

DNA マーカを用いた品種<sup>30)</sup>、魚種<sup>31)</sup>などの判別技術の開発が活発に行われているが、DNA マーカを用いた判別法の空間共同試験による妥当性確認に関するガイドラインは今のところ存在しない。法医学分野では、アメリカ国立標準技術研究所（NIST）がDNA分析に関する妥当性確認の情報提供<sup>32)</sup>を行っており、アメリカ連邦捜査局（FBI）はDNA分析を行う試験所の品質保証基準<sup>33)</sup>を公表している。さらに、法医学分野のDNA分析について、Forensic Science Communicationsに妥当性確認のガイドラインの改訂版<sup>34)</sup>が2004年に発表されている。このガイドラインには、法医学に新たに用いるDNA分析法の妥当性確認（Developmental Validation）と、各試験所がDNA分析法を法医学に適用する前に行うべき試験所内部の妥当性確認（Internal Validation）について記載されている。Internal Validationといっても、分析法の性能指標については、メインラボとサテライトラボが独立にそれぞれ試験することを要求しているので、同じDNA分析法を導入したい試験所が集まって行う空間共同試験の一種である。

Internal Validationは複数の試験所で行うことを想定しているため、妥当性確認された分析法を利用したい試験所ごとに、妥当性確認試験で示された性能の範囲内で、その分析法を利用可能か、利用開始前に確認する検証作業（method

表 13 定性分析結果の2×2分割表

試料	判定結果		合計
	陽性	陰性	
陽性 (既知)	$N_{pp}$ (正解)	$N_{pn}$ (不正解)	$N_{pp} + N_{pn}$
陰性 (既知)	$N_{np}$ (不正解)	$N_{nn}$ (正解)	$N_{np} + N_{nn}$
合計	$N_{pp} + N_{np}$	$N_{pn} + N_{nn}$	$N = N_{pp} + N_{pn} + N_{np} + N_{nn}$

注)  $N_{pp}$ ,  $N_{pn}$ ,  $N_{np}$ ,  $N_{nn}$  は各セル頻度,  $N$  は頻度の総計。

verification) と全く同一とはいえないが, 両者の目的には共通性がある。

室間再現性 (reproducibility) は, Method Validation と Internal Validation の両方の試験項目であるが, 試験所数及び各試験所の併行測定回数などの室間共同試験の具体的な条件は示されていない。

## 7.2 定性分析法の精度指標

互いに関連のある感度 (sensitivity rate), 特異性 (specificity rate), 偽陽性率 (false positive rate), 偽陰性率 (false negative rate) の4種類の精度指標を報告する<sup>28)</sup> (表13)。感度は, 陽性 (positive) であると既知の試料を陽性と判定した比率と定義され, 表13の各セルの頻度を用いると

$$\text{感度 (\%)} = N_{pp} / (N_{pp} + N_{pn}) \times 100 \quad \cdots (21)$$

である<sup>28, 35)</sup>。特異性は, 陰性 (negative) であると既知の試料を陰性と判定した比率と定義され,

$$\text{特異性 (\%)} = N_{nn} / (N_{np} + N_{nn}) \times 100 \quad \cdots (22)$$

である<sup>28, 35)</sup>。偽陽性率は, 陰性であると既知の試料を陽性と判定した比率と定義され,

$$\text{偽陽性率 (\%)} = N_{np} / (N_{np} + N_{nn}) \times 100 = 1 - \text{特異性 (\%)} \quad \cdots (23)$$

である<sup>28, 35)</sup>。偽陰性率は, 陽性であると既知の試料を陰性と判定した比率と定義され,

$$\text{偽陰性率 (\%)} = N_{pn} / (N_{pp} + N_{pn}) \times 100 = 1 - \text{感度 (\%)} \quad \cdots (24)$$

である<sup>28, 35)</sup>。

定性分析法の室間共同試験の最低実施条件に関する McClure の提案<sup>27)</sup> のなかで用いられている偽陽性率と偽陰性率の定義は, (23)式, (24)式とは異なる<sup>36)</sup> が, (23)式, (24)式を用いる方がよい。

(21)~(24)式の4指標以外では, 定量分析法の併行精度 (repeatability) と室間再

現精度 (reproducibility) に対応する定性分析法の精度指標として, *accordance* と *concordance*, さらに COR (Concordance Odds Ratio) という 3 指標が 2002 年に提案され<sup>37)</sup>, ISO 16140:2003 の Appendix L にも記載されている<sup>29)</sup>。*accordance* と *concordance* の計算では, 陽性試料と陰性試料は別々に計算する。

*accordance* は,

$$\text{accordance (\%)} = \frac{\text{同一試験所内で同じ結果(++又は--)を示したペアの数の全試験所の合計}}{\text{全ペア数}} \times 100 \quad \dots (25)$$

と定義されている。同一試験所内で 6 回併行測定したならば 1 試験所内のペア数は  ${}_6C_2 = \frac{6!}{(6-2)! \times 2!} = \frac{6 \times 5}{2} = 15$  ペアになる。全ペア数は 1 試験所のペア数  $\times$  試験所数である。

*concordance* は,

$$\text{concordance (\%)} = \frac{\text{試験所間で同じ結果(++又は--)を示したペアの数の全試験所の合計}}{\text{全ペア数}} \times 100 \quad \dots (26)$$

と定義されている。この場合には, 同一試験所内のペアは数える対象外にする。1 材料について 10 試験所が 6 個ずつ結果を報告した場合, ある試験所の 1 個の結果は, 他の 9 試験所の 6 個ずつの結果と比較するので  $6 \times 9 = 54$  通りある。1 試験所には 6 個の結果があるので,  $6 \times (6 \times 9) = 324$  通り, 他の試験所の結果と比較するペアがある。これが 10 試験所なので全ペア数は  $\{6 \times (6 \times 9)\} \times 10 = 3240$  通りになる。全ペア数 3240 通りは, 同じペアを 2 重に数えているので重複なしの全ペア数 1620 通りの 2 倍になっているが, (26) 式の分子, 分母ともに 2 重に数えれば *concordance* の値は変わらず, 計算は簡単である。

COR は,

$$\text{COR} = \frac{\text{accordance(\%)} \times (100 - \text{concordance(\%)})}{\text{concordance(\%)} \times (100 - \text{accordance(\%)})} \quad \dots (27)$$

と定義されている。ここで, *accordance*, *concordance* はパーセント表示の値である。COR は *accordance*, *concordance* 及びこれら二つの比よりも感度に依存しない指標である。COR = 1.2 ならば, 同じ試験所で分析した方が異なる試験所で分析するよりも同じ結果が 1.2 倍出やすいことを示す。COR が大きい程, 試験所間の結果の違いが大きいことを意味する。*accordance* = 100% のとき, COR は無限大になるが, *accordance* と *concordance* が両方とも 100% のときは試験所内も試験所間も同じ結果が得られる確率は等しいので COR = 1 とする。

ISO の食品及び動物用飼料の微生物に関する代替法の妥当性確認プロトコル<sup>29)</sup> では, 相対精確さ (relative accuracy), 相対感度 (relative sensitivity), 相対特異

性 (relative specificity) を定義している。表13の「判定結果」を「対照法の結果」, 行方向の「陽性 (既知)」と「陰性 (既知)」を「代替法の結果」と読み替えて各セルの頻度の記号はそのまま用いると

$$\text{相対精確さ} \quad AC (\%) = (N_{pp} + N_{mn}) / N \times 100 \quad \cdots (28)$$

$$\text{相対感度} \quad SE (\%) = N_{pp} / (N_{pp} + N_{np}) \times 100 \quad \cdots (29)$$

$$\text{相対特異性} \quad SP (\%) = N_{mn} / (N_{mn} + N_{pn}) \times 100 \quad \cdots (30)$$

である。これらは対照法に対する代替法の性能を示す精度指標である。

### 7.3 定性分析法の空間共同試験データの外れ値検定

McClure<sup>27)</sup> は外れ値検定として Cochran の Q 検定を紹介しているが, 著者らが確認した2000年以降に発表された定性分析法の空間共同試験の論文32報中1報しか Cochran の Q 検定を利用していなかった。

Cochran の Q 検定については参考文献<sup>1,2)</sup> の定性分析法の説明のなかに計算方法が記載されている。

#### 例題5 定性分析法の空間共同試験データの解析例

表14に示す定性分析の結果について, 定性分析法の妥当性確認に必要な精度指標を計算する。感度は, 陽性試料の正解率なので,  $82/90 = 0.911 = 91.1 (\%)$  である。偽陰性率は,  $100 - \text{感度} (\%)$  なので,  $100 - 91.1 = 8.9 (\%)$  である。

特異性は, 陰性試料の正解率なので, 表14のデータが陰性試料の結果ならば, 特異性は91.1 (%), 偽陽性率は  $100 - \text{特異性} (\%) = 8.9 (\%)$  になる。

定量分析法の repeatability に相当する accordance (25式) は, 表15に示すように84.0 (%)になる。定量分析法の reproducibility に相当する concordance (26式) は, 表16に示すように83.6 (%)になる。

concordance は以下の式で直接計算することもできる<sup>37)</sup>。

$$\text{concordance} (\%) = \frac{2r(r - nL) + nL(nL - 1) - AnL(n - 1)}{n^2L(L - 1)} \times 100 \quad \cdots (31)$$

ここで,  $r$  は正解の総数,  $L$  は試験所数,  $n$  は1試験所当たりの併行測定回数,  $A$  は比率で表した accordance (accordance (%) / 100) である。表14のデータを(31)式に当てはめると以下のようになる。

$$\begin{aligned} \text{concordance} (\%) &= \frac{2 \times 82 \times (82 - 6 \times 15) + 6 \times 15 \times (6 \times 15 - 1) - 0.84 \times 6 \times 15 \times (6 - 1)}{6^2 \times 15 \times (15 - 1)} \times 100 \\ &= \frac{-1312 + 8010 - 378}{7560} \times 100 = \frac{6320}{7560} \times 100 = 83.6 (\%) \end{aligned}$$

Concordance Odds Ratio (COR, 27式) は以下のようになる。

$$\text{COR} = \frac{\text{accordance}(\%) \times (100 - \text{concordance}(\%))}{\text{concordance}(\%) \times (100 - \text{accordance}(\%))} = \frac{84 \times (100 - 83.6)}{83.6 \times (100 - 84)} = 1.03$$

表 14 定性分析の室間共同試験における、ある濃度の陽性試料の報告例

試験所	陽性試料の判定結果					
	併行測定回数					
	1	2	3	4	5	6
1	1	1	1	1	1	1
2	1	0	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1
5	1	1	0	1	1	0
6	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	0	1
9	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1
12	1	1	0	0	1	1
13	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	0	1
15	0	1	1	1	1	1

注) 1 : 陽性, 0 : 陰性

表 15 定性分析法の室内精度の指標 accordance の計算

試験所	結果が 陽性の数	結果が陽性 のペア数	結果が陰性 のペア数	同一結果 の総ペア数	同一結果 の比率(%)
1	6	15	0	15	100
2	5	10	0	10	66.7
3	6	15	0	15	100
4	6	15	0	15	100
5	4	6	1	7	46.7
6	6	15	0	15	100
7	6	15	0	15	100
8	5	10	0	10	66.7
9	6	15	0	15	100
10	6	15	0	15	100
11	6	15	0	15	100
12	4	6	1	7	46.7
13	6	15	0	15	100
14	5	10	0	10	66.7
15	5	10	0	10	66.7

同一反応の比率の平均 (= accordance) 84.0

表 16 定性分析法の室間精度の指標 concordance の計算

試験所	結果が陽性の数	結果が陰性の数	室間で同一反応のペア数	室間の総ペア数
1	6	0	456	504
2	5	1	392	504
3	6	0	456	504
4	6	0	456	504
5	4	2	324	504
6	6	0	456	504
7	6	0	456	504
8	5	1	392	504
9	6	0	456	504
10	6	0	456	504
11	6	0	456	504
12	4	2	324	504
13	6	0	456	504
14	5	1	392	504
15	5	1	392	504
計			6320	7560
concordance (%) = 6320/7560 = 83.6				

### 例題 6 カイ 2 乗検定による二つの定性分析法の結果の比較

食品微生物の有無を検出する定性分析法の室間共同試験などでは、代替法と対照法の結果に有意差があるか検定して報告している論文が多い。このような検定を行う場合に、比較する二つの定性分析法に用いた試料が対応のある試料の場合は McNemar 検定<sup>38)</sup> というカイ 2 乗 ( $\chi^2$ ) 検定を行い、対応がない試料の場合は、 $2 \times 2$  分割表における独立性のカイ 2 乗検定<sup>39)</sup> を行う。著者が確認した食品微生物の論文の場合、二つの定性分析法で培養法が同じ試料を用いる場合は McNemar 検定を行い、培養法が異なる試料を用いる場合は独立性のカイ 2 乗検定を行っていた。

#### 1) 対応のある試料を比較に用いた場合 (McNemar 検定)

表 17 中の各セルの頻度  $a \sim d$  を用いると、McNemar 検定の検定統計量  $\chi_{cal}^2$  は

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(|b-c|-1)^2}{b+c} \quad \dots (32)$$

で計算する。二つの方法の結果が一致した頻度の  $a$  (陽性の場合) と  $d$  (陰性の場合) は (32) 式の計算では用いない。この検定の帰無仮説は「二つの方法の結果に差はない ( $b=c$ )」であり、対立仮説が「二つの方法の結果に差がある ( $b \neq c$ )」なら

表17 対応のある試料を用いた定性分析法の比較結果の例

		対照表	
		陽性	陰性
代替法	陽性	50 (a)	5 (b)
	陰性	10 (c)	55 (d)

注) 各セルは頻度を示す。

ば両側検定になり、「 $b < c$ 」又は「 $b > c$ 」の方向性を問題にするならば片側検定になる。両側検定を行う場合、(32式)の $\chi_{cal}^2$ がカイ2乗分布の棄却限界値（自由度1、上側危険率 $100\alpha\%$ ）より大きければ危険率 $100\alpha\%$ で有意になり<sup>38)</sup>、代替法と対照法の結果は両側危険率 $100\alpha\%$ で等しいとはいえない。カイ2乗の定義より、自由度1のカイ2乗値の平方根は標準正規分布のZスコアに等しいため、この検定結果は、(32式)の計算値 $\chi_{cal}^2$ の平方根と標準正規分布の両側危険率 $100\alpha\%$ の棄却限界値を比較した検定結果と一致する。例えば、自由度1のカイ2乗分布の上側危険率5%の棄却限界値3.841の平方根1.96は、標準正規分布の上側危険率2.5%の棄却限界値、つまり、両側危険率5%の棄却限界値に等しい。標準正規分布の片側危険率 $100\alpha\%$ に対応した片側検定のMcNemar検定を行いたい場合は、自由度1のカイ2乗分布の上側危険率 $200\alpha\%$ の棄却限界値と(32式)の計算値 $\chi_{cal}^2$ を比較する。例えば、対照法よりも代替法の方が検出感度が優れているといえるか検定したい場合は、 $b$ は $c$ よりも大きくなる方向だけを考える片側検定になり、カイ2乗分布の上側危険率 $200\alpha\%$ の棄却限界値と比較する。(32式中)の-1はYatesの連続性の補正項であり、この検定は自由度1なので通常はこの補正を行う<sup>38)</sup>。表17のデータについて、対立仮説に「二つの方法の結果に差がある」と設定して両側検定を行う場合、

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(|5-10|-1)^2}{5+10} = \frac{16}{15} = 1.067$$

となり、自由度1のカイ2乗分布の上側危険率5%の棄却限界値3.841より小さいので、上側危険率5%で有意ではなく、「二つの方法の結果に差はない」という帰無仮説を両側危険率5%で棄却できない。カイ2乗分布の棄却限界値3.841はExcelではCHINV(0.05, 1)で計算することができる。

$\frac{b+c}{2} \leq 5$ のように $b$ と $c$ の頻度が低いときはMcNemar検定の精度が良くないので、 $n = b+c$ 、 $x = b$ (or  $c$ )の2項検定が推奨されている<sup>38)</sup>。表17のデータを用いると $n = b+c = 5+10 = 15$ 、 $x = b = 5$ になる。代替法と対照法には差がないと仮定すると $p = 0.5$ の2項検定になる。 $b$ と $c$ のどちらかの頻度が高くなると対立仮説に設定できる試験でない場合は、15回試行して $x$ が5回以下の確率と $x$ が10回以上の確率の和を求める。以下の計算より $P(x \leq 5 \& x \geq 10) = 0.30$ なので、2項検定を用いても両側危険率5%で二つの方法の結果に有意差は認められない。

表 18 対応のない試料を用いた定性分析法の比較結果の例

	代替法	対照法	計
陽性	55 (a)	60 (b)	115 (a + b)
陰性	65 (c)	60 (d)	125 (c + d)
計	120 (a + c)	120 (b + d)	240 (N)

注) 各セルは頻度を示す。

$$\begin{aligned}
 P(x \leq 5 \& x \geq 10) &= \sum_{x=0}^5 {}_n C_x p^x (1-p)^{n-x} + \sum_{x=10}^{15} {}_n C_x p^x (1-p)^{n-x} \\
 &= \sum_{x=0}^5 {}_{15} C_x (0.5)^x (1-0.5)^{15-x} + \sum_{x=10}^{15} {}_{15} C_x (0.5)^x (1-0.5)^{15-x} \\
 &= \sum_{x=0}^5 \frac{15!}{(15-x)!x!} (0.5)^{15} + \sum_{x=10}^{15} \frac{15!}{(15-x)!x!} (0.5)^{15} = 0.3017578
 \end{aligned}$$

Excelでは、BINOMDIST(5, 15, 0.5, TRUE) + {1 - BINOMDIST(9, 15, 0.5, TRUE)}、又は  $p = 0.5$  の 2 項分布は左右対称なので BINOMDIST(5, 15, 0.5, TRUE) × 2 で上記の確率の計算ができる。

## 2) 対応のない試料を比較に用いた場合 (2 × 2 分割表における独立性のカイ 2 乗検定)

表 18 中の各セルの頻度  $a \sim d$  を用いると、2 × 2 分割表における独立性の検定統計量  $\chi_{cal}^2$  は

$$\chi_{cal}^2 = \frac{N(|ad - bc| - N/2)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)} \quad \dots (33)$$

で計算する。試験する陽性試料数と陰性試料数を試験前に決めてあれば、この検定の帰無仮説は「二つの方法の陽性試料と陰性試料の判定比率は等しい」である。そして、対立仮説が「二つの方法の陽性試料と陰性試料の判定比率は等しくない」ならば両側検定になり、二つの方法の陽性試料と陰性試料の判定比率の大小関係(方向性)を問題にするならば片側検定になる。両側検定の場合、(33)式の  $\chi_{cal}^2$  がカイ 2 乗分布の棄却限界値(自由度 1, 上側危険率 100 $\alpha$ %)より大きければ危険率 100 $\alpha$ % で有意になり<sup>39)</sup>、代替法と対照法の結果は両側危険率 100 $\alpha$ % で等しいとはいえない。この検定も自由度 1 のカイ 2 乗検定なので、標準正規分布の z スコアとの関係は上記の McNemar 検定と同じであり、片側検定を行う場合はカイ 2 乗分布の上側危険率 200 $\alpha$ % の棄却限界値と(33)式の計算値  $\chi_{cal}^2$  を比較する。(33)式中の  $-N/2$  は Yates の連続性の補正項であり、この補正を行うことが通常は推奨され

ている<sup>39)</sup>。表18のデータについて、対立仮説に「二つの方法の陽性試料と陰性試料の判定比率は等しくない」と設定して両側検定を行うと、

$$\chi_{cal}^2 = \frac{240(|55 \times 60 - 60 \times 65| - 240/2)^2}{(55+60)(65+60)(55+65)(60+60)} = \frac{55296000}{207000000} = 0.267$$

となり、自由度1のカイ2乗分布の上側5%の棄却限界値3.841より小さいので、両側危険率5%で有意ではない。

(33)式を用いたカイ2乗検定よりもFisherの正確検定を推奨している統計学の専門書<sup>39)</sup>もあるが、ここでは紹介しない。理由は、表18のような2×2分割表の周辺度数(a+b, c+d, a+c, b+d)がすべて固定されている場合はFisherの正確検定が適用できるが、行方向と列方向の周辺度数の片方又は両方が固定できない場合は、Fisherの正確検定の適用について専門家の間で議論があるためである。表18のデータでは、試験する陽性試料数と陰性試料数を試験前に決めてあれば、a+cとb+dは固定されるが、a+bとc+dは試験結果次第のため固定できない。もし、二つの方法の結果から試料が陽性が陰性かを決定するならば、a+cとb+dも固定できないが、この場合にも(33)式によるカイ2乗検定は利用できる。

(食品分析研究領域 品質情報解析ユニット 内藤 成弘, 塚越 芳樹)

## 参考文献

- 1) 食品総合研究所. 分析法の妥当性確認に関するガイダンス.  
<http://nfri.naro.affrc.go.jp/yakudachi/datosei/index.html>
- 2) 内藤成弘. データの統計的取り扱い, 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, サイエンスフォーラム, 163-186 (2007).
- 3) Horwitz, W. (1995). Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies. *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331-343.  
<http://www.iupac.org/publications/pac/1995/pdf/6702x0331.pdf>
- 4) JIS 8402-3 (1999). 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度) — 第3部: 標準測定方法の中間精度.
- 5) ISO 7002 (1986). A.34 random sampling. Agricultural food products — Layout for a standard method of sampling from a lot.
- 6) マイクロソフト. Excel 2003 で RAND 関数の使用時に負の値が返される.  
<http://support.microsoft.com/default.aspx?kbid=834520>
- 7) Horwitz, W., Kamps, L.R. and Boyer, K.W. (1980). Quality assurance in the analysis foods for trace constituents. *J. AOAC*, **63**(6), 1344-1354.
- 8) Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R. (2006). The International Harmonized

- Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure & Appl. Chem.*, **78**(1), 145-196.  
<http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf>
- 9) AOAC Int. (2005). Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 18 ed., Gaithersburg, MD, USA.  
[http://eoma.aoac.org/app\\_d.pdf](http://eoma.aoac.org/app_d.pdf)
- 10) AOAC Int. (2002). AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.  
[http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv\\_guidelines.pdf](http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf)
- 11) ISO 13528 (2005). Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
- 12) Thompson, M. (1999). A natural history of analytical methods. *Analyst*, **124**(7), 991.
- 13) Horwitz, W. and Albert, R. (2006). The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *J. AOAC Int.*, **89**(4), 1095-1109.
- 14) Thompson, M. (2007). Limitations of the application of the Horwitz Equation: A rebuttal. *Trends in Analytical Chemistry*, **26**(7), 659-661.
- 15) EU (2007). Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo (a) pyrene in foodstuffs. Commission Regulation (EC) No 333/2007.  
[http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2007/l\\_088/l\\_08820070329en00290038.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2007/l_088/l_08820070329en00290038.pdf)
- 16) Codex. (2007). Report of the twenty-eighth session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling.  
[http://www.codexalimentarius.net/download/report/679/al30\\_23e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/report/679/al30_23e.pdf)
- 17) Thompson, M. (2000). Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, **125**(3), 385-386.
- 18) FAPAS (2002). Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) protocol for the organisation and analysis of data 6th ed., FAPAS central science laboratory, UK.  
<http://www.fapas.com/pdfpub/FAPASProtocol.pdf>
- 19) AOAC Int. (2005). Appendix E: Laboratory Quality Assurance. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 18 ed., Gaithersburg, MD, USA.  
[http://eoma.aoac.org/app\\_e.pdf](http://eoma.aoac.org/app_e.pdf)
- 20) Thompson, M. and Wood, R. (1993). The International Harmonized Protocol for the

- Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories. *Pure & Appl. Chem.*, **65** (9), 2123-2144.  
<http://www.iupac.org/publications/pac/1993/pdf/6509x2123.pdf>
- 21) AOAC Int. (2002). OMA Program Manual Appendix E. A Statistical Model to Evaluate Analyte Homogeneity for a Material.  
[http://www.aoac.org/vmeth/Manual\\_App\\_E.pdf](http://www.aoac.org/vmeth/Manual_App_E.pdf)
  - 22) Youden W.J. and Steiner, E.H. (1975). Reduction of data to standard form. *Statistical Manual of the AOAC*, p.73.
  - 23) JIS Z 8402-2 (1999). 7.2.2 過剰のデータ. 測定方法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) — 第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法.
  - 24) Fearn, T. and Thompson, M. (2001). A new test for 'sufficient homogeneity'. *Analyst*, **126** (8), 1414-1417.
  - 25) ISO 5725-2 (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
  - 26) IUPAC (2006). Establishment of guidelines for the validation of qualitative and semi-quantitative (screening) methods by collaborative trial: a harmonized protocol.  
<http://www.iupac.org/projects/2005/2005-024-2-600.html>
  - 27) McClure, F. D. (1990). Design and analysis of qualitative collaborative studies: minimum collaborative program. *J. AOAC*, **73** (6), 953-960.
  - 28) Feldsine, P., Abeyta, C. and Andrews, W.H. (2002). AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Int.*, **85** (5), 1187-1200.  
<http://www.aoac.org/testkits/2002Guidelines.pdf>
  - 29) ISO 16140 (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs—Protocol for the validation of alternative methods.
  - 30) 農林水産省. DNA 品種識別について. <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>
  - 31) 農林水産消費安全技術センター. 品質表示の確認に係る分析法.  
[http://www.famic.go.jp/technical\\_information/hinpyou/index.html](http://www.famic.go.jp/technical_information/hinpyou/index.html)
  - 32) NIST. Validation Information to Aid Forensic DNA Laboratories.  
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/validation.htm>
  - 33) FBI DNA Advisory Board (2000). Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories, *Forensic Science Communications* **2** (3).  
<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/codis2a.htm>
  - 34) Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) (2004). Revised

Validation Guidelines. Forensic Science Communications **6**(3).

[http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2004/standards/2004\\_03\\_standards02.htm](http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2004/standards/2004_03_standards02.htm)

- 35) Trullols, E., Ruisánchez, I. and Rius, F.X. (2004). Validation of qualitative analytical methods. Trends Anal. Chem., **23**(2), 137-145.
- 36) Fleiss, J.L., Levin, B. and Paik, M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions 3rd Ed., John Wiley & Sons, p.6.
- 37) Langton, S.D., Chevennement, R., Nagelkerke, N. and Lombard, B. (2002). Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. Int. J. Food Microbiol., **79**, 175-181.
- 38) Zar, J.H. (1999). Paired-sample testing of nominal-scale data. Biostatistical analysis 4th ed., Prentice Hall, pp.169-175.
- 39) Zar, J.H. (1999). The  $2 \times 2$  contingency table. Biostatistical analysis 4th ed., Prentice Hall, pp.491-494.

## IV 分析法の妥当性確認

(試験室間共同試験による妥当性確認)

### 1. 定 量 法

#### ① 遺伝子組換え (GM) 農作物の定量分析法

##### 1. GM農産物分析法の必要性

GM食品に対する表示制度の施行に伴い、農林水産省及び厚生労働省は、これを監視するためのGM農産物の検査技術を必要とした。また、食品企業においても自ら調達した非GM農産物の品質管理を行うために本技術が必要であった。我が国のGM表示制度には非意図的混入を考慮した5%の閾値が設定されており、この判定には定量分析法が必要である。

組換え体の定量的検知技術としては、組換えDNAをポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法により増幅し、Taq-Man<sup>®</sup>等の蛍光標識プローブによって検知する方法や、検知対象の組換えDNAに由来するタンパク質に特異的な抗体を用いた酵素抗体法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA) がある<sup>1)</sup>。これらのうちELISA法の開発には検知対象の組換えDNAに由来するタンパク質を抗原とする抗体がまず必要で、検査時にはリアルタイムPCR装置のような大がかりな機器を必要としない利点はあるが、加工工程中に抗原となるタンパク質が変性又は分解したサンプルについては検査が困難である。他方、PCR法は検知対象の組換え体及び組換えDNAの配列情報が入手できれば、一定の知識と設備を有する研究機関等で開発可能である。DNAを用いた検査法は、一般にタンパク質を検知する検査法のように検知対象の立体構造が保持されていることが必須とならない。従ってPCR法はDNAの分解が起きていなければ定量分析が可能であるため、世界中で多くの検知技術開発が行われるようになった。独立行政法人 農業・食品産業技術研究機構 食品総合研究所 (旧; 独立行政法人 食品総合研究所) では独立行政法人 農林水産消費安全技術センター (旧; 独立行政法人 農林水産消費技術センター)、厚生労働省 国立医薬品食品衛生研究所と共にGM農産物分析法を開発し、これが日本の「標準分析法」<sup>2,3)</sup>となっている。本稿では、DNAを用いたGM農作物の定量分析法について述べる。

## 2. DNA抽出

従来の植物に関するDNA実験では、抽出の容易さから抽出対象の多くは「葉」を用いるものが一般的であった。しかし、検査対象が穀物や加工食品である場合には、それらからPCRに好適な品質のDNAを抽出することが必要となる。品質の評価基準については、紫外線の吸光度を測定後、 $OD_{260}$  値からDNA量を求め、 $OD_{260} / OD_{280}$  及び  $OD_{260} / OD_{230}$  値から品質を推測することが一般的である。「標準分析法」ではO.D.260 nm/ O.D.280 nmが1.7~2.0程度（CTAB法では1.8~2.0程度）としている。また、O.D.260 nm/ O.D.230 nmはこれまでの経験から0.6以上であることが望ましい。この他には測定原理が異なる方法、例えばdsDNAに特異的に結合するPicoGreen®等のインタカレーターを利用した蛍光測定法で測定したDNA量を紫外線の吸光波長から求めたDNA量と比較することで品質を評価することも可能である。

DNAを抽出する手法としては、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド（Cetyl trimethyl ammonium bromide ; CTAB）等を利用した方法や、シリカメンブレン、イオン交換体等を利用した市販のDNA抽出用のキット等が市販されているが、これらを利用する場合には検査試料からのDNA抽出に適しているものを選定する必要がある。最近のGM農産物の検査の必要性に併せて種子からのゲノムDNA抽出に向けたキットの販売も始まっている。

GM農作物からのDNA抽出を行う際には、国際規格であるISO 21571及びISO 24276<sup>4)</sup>が参考となり、これに従うか、又は「同等の結果」が得られることを確認してから用いるべきである。

## 3. リアルタイムPCR機器

リアルタイムPCR機器は多くの会社から供給されているが、この方法は温度を上昇・下降することで鋳型となるDNAを増幅する技術であるため、定量結果は機器の温度制御方法、性能や増幅プログラム等に影響される。そのため、妥当性試験を行う際には複数機種を対象として実施する必要も考慮すべきである。また、妥当性が確認された分析手法で使用したリアルタイムPCR機器と異なる機種を用いて試験を行う場合には「同等の測定結果」が得られることを明らかにしてから行うことが肝要である。また、リアルタイムPCR機器は、同一機種であっても装置間で測定値がばらつく場合があるので、定期的なメンテナンスを実施することにより装置の性能を一定水準以上に保っておくことも大切である。

## 4. 認証標準物質

認証標準物質（Certified Reference Materials ; CRM）は、分析法としての妥当性確認や分析機関内または機関間の精度管理には有用である。GM農産物のCRMは、現在のところ欧州委員会の標準物質計量研究所（Institute of Reference

Materials and Measurements; IRMM)<sup>5)</sup>, アメリカ油化学協会 (The American Oil Chemists' Society; AOCS)<sup>6)</sup> から入手できる。IRMM 製は一部の GM 系統種子を重量%で一定量含む粉末試料, AOCS からは GM 系統の一部について種子粉末試料又は DNA 試料が提供されており, 日本においてはシグマアルドリッチジャパン株式会社<sup>7)</sup> 及び AOCS の Web<sup>6)</sup> 上でそれぞれ購入可能である。また, 筆者らのグループは CRM といえる品質の, GM 農産物を一定量含む粉末試料を製造して分析法の検証に使用してきていることから, これらの実績を基に CRM 製造の国際規格である ISO guide34<sup>4)</sup>, 及び GM サイズ・トウモロコシの定性及び定量試験について試験所認定である ISO/IEC 17025<sup>4)</sup> の認定を受けた (本書「ISO ガイド 34 に基づく品質システムの構築から認定まで」参照)。しかしながら, GM 系統種子を重量%で一定量含む粉末試料の場合には, 1つの遺伝子組換え系統からは多数の品種が作出されており, 非 GM 作物の品種も多数あるため, 入手した CRM による測定結果は CRM の製造時に使用した種子の品種からの影響を反映したものにならざるを得ないことを留意しておく必要がある。加えて, CRM の作製に用いた種子は作物であるので, 産地, 年, 気候によって成分組成等は一定でないため, 常に製造ロット間のばらつきについて考慮する必要がある。

## 5. キャリブレーター

GM 農産物を定量する際に, GM 系統種子の粉砕物で作製した CRM を使用して検量線を描くと, 日常の分析の度に DNA 抽出操作や前述した理由によるばらつきを考慮する必要性が生じ, またコスト的にも負担となる。そのため, GM 農作物の混入率を測定する際には, 測定対象の配列を含むプラスミド等の DNA をキャリブレーターとして使用することで検量線の再現性向上が期待できる。分析法の妥当性確認試験を行う際にこれを使用しておけば, キャリブレーターと CRM の関係もトレーサブルとなる。

## 6. 内在性 DNA 配列

GM 農産物をリアルタイム PCR 法で定量分析する際には, 対象とする農作物の生物種が特異的に持っている DNA 配列である内在性 DNA 配列が必要となる<sup>7)</sup>。その設計にあたっては, 次の要件を満たすことが望ましい。

- ・測定対象の生物種のみが特異的に持つ DNA 配列 (検知対象以外の主要農作物で非特異的 PCR 産物が生じない)
- ・測定対象の生物種の中で保存性が高い DNA 配列 (代表的な 20 品種以上で同一長の PCR 産物が得られる)
- ・測定対象の品種間でコピー数が安定している DNA 配列であり, かつシングルコピーであるものが最も望ましいが, そうでない場合には, 低コピーであるものこれらの要件を満たす DNA 配列は, サイズやトウモロコシなど 2 倍体の植物で

は比較的容易に見いだせるが、倍数性の高いバレイショ、テンサイ、コムギなどでは困難なことが多い。

## 7. 汚染防止

PCRは鋳型となるDNAを増幅する技術である。このため、実験上最も注意すべきことはPCRによって増幅した後のDNAによる汚染防止である<sup>2,4)</sup>。汚染防止には試料の粉碎、DNA抽出、PCR、電気泳動等を行う作業エリアを区分けし、相互の汚染を防止する必要がある。また、誤判断を防止するために試料の粉碎、DNA抽出、PCR実験における適切な陽性対照、陰性対照の試料を準備し、実験の適切性を管理することも必要である。

## 8. 分析法としての妥当性確認試験

検査を行う場合には、試験室間共同試験（以下、共同試験）で分析法としての妥当性が確認されたものを使用することが望ましい。しかし、共同試験には費用と時間を要するため、試験の目的によっては1試験室内での妥当性確認することも考える必要がある。妥当性確認試験の在り方についてはIUPAC、ISO、AOACが共同で定めたハーモナイズドガイドライン<sup>8)</sup>に準ずるべきである。

## 9. 定量分析法の妥当性確認試験

リアルタイムPCR法によるGM農作物の定量は、一定量の試料に含まれる内在性DNA及び組換えDNAのコピー数をそれぞれ測定後、比率を求めることでGM農作物の混入率を相対的に求める。代表的な方法には、TaqMan<sup>®</sup> Chemistryを使用したものがあり、プライマーに挟まれたDNA配列間に鋳型DNAと相補的な配列からオリゴヌクレオチドを作製し、これに蛍光色素と消光色素が結合させたTaqMan<sup>®</sup>プローブを使用する。TaqMan<sup>®</sup>プローブは遊離状態で蛍光色素に蛍光を発する波長の光を当てても、消光色素が隣接するため共鳴エネルギーが吸収され、蛍光は抑制される。PCRによるDNA増幅の際にTaqMan<sup>®</sup>プローブが鋳型DNAに結合し、DNAポリメラーゼによってプライマーからTaqMan<sup>®</sup>プローブの5'末端までDNA合成反応が進むと、DNAポリメラーゼの持つ5'→3'エキソヌクレアーゼ活性が作用し、鋳型に結合したTaqMan<sup>®</sup>プローブは一塩基ずつ加水分解・除去される。プローブから遊離した蛍光色素と消光色素は物理的距離が離れることで共鳴エネルギーが吸収されず、蛍光を発する。従って、TaqMan<sup>®</sup>プローブ1分子からの発光はPCR産物1分子に対応するため、蛍光増加量はPCR産物の増幅量に相当する。リアルタイムPCR装置は、定量PCR時に増加する蛍光量を経時的に取得する測定に用いられる。

## 10. 共同試験の設計と実施

わが国のGM農産物の検査法である「標準分析法」<sup>2,3)</sup>に掲載されているリアルタイムPCR装置を使用したGMダイズ及びトウモロコシの定量法の検証のために実施された妥当性確認試験はAOAC Internationalの共同試験のガイドライン<sup>8)</sup>及びISO TS 21098<sup>4)</sup>に従った。

## 11. 参画試験室

実施機関は、共同試験に参画試験室の事前評価（ISO/IEC 17025<sup>4)</sup>等の国際規格に基づいた品質及び技術管理が行われていることの確認や、試験担当者が共同試験の技術に習熟しているか確認する等）を実施すべきである。また、参画試験室同士が共同試験実施中に連絡しないように、参画試験室名、分析者に関する情報は試験終了まで開示は控える。

## 12. 必要となる参画試験室数、サンプル数

AOAC Internationalの共同試験のガイドライン<sup>8)</sup>は、定量分析における共同試験について外れ値検定後に有効試験室数が8試験室数残っていることが必要条件とされているため、参画試験室数は無効試験室数を見越して設定すべきである。ただし、特殊な分析を行う場合又は特に高額な機器を必要とするような理由がある場合には、棄却後の有効試験室数は5機関以上と規定されている。

参画試験室に配布するブラインド試料の点数は5材料以上と規定されている。共同試験の際に、試料濃度は非表示で行われるが、2点併行又はYouden pairsで設定されるべきである。GM農産物の共同試験については、同一濃度試料をブラインドで2点送付して実施した。

## 13. ブラインド試料

分析法の妥当性確認のための共同試験には、CRMを使用することが望ましいが、GM農作物についての分析法については系統ごとの安全性審査が承認されるとともに開発が行われるため、殆どの場合、CRMが提供される前に共同試験を実施せざるを得ない。このため、筆者らのグループではCRMと同等の品質管理を行いながらブラインド試料を製造、配付してきた。ブラインド試料は、1g毎に秤分けしたボトルに乱数を用いて番号を付与後、ランダムに10本サンプリングし、共同試験で使用する分析法により求められたGM混入率を一元配置分散分析で解析して有意差がないことをもって均一と判断している。均一性を確認済みの試料を実際に配付する際には、参画試験室が容易に試料の濃度、併行点数が分からないように表示し、1ボトルに含まれる量も手順書に従って操作すると使い切る量にする。また、参画試験室へ試料を再送付する場合には、その理由が妥当であると確認する必要がある。

表 1 各 GM 系統の種子を用いて測定された内標比

ターゲット	平均値	SD <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	ターゲット配列の導入コピー数
CaMV 35S プロモータ				
RR soy	0.99	0.006	0.64	1
Bt11	0.97	0.045	4.61	2
T25	0.34	0.011	3.12	1
Event176	0.88	0.042	4.74	2
MON810	0.45	0.017	3.73	1
NOS ターミネータ				
RR soy	1.09	0.015	1.41	1
Bt11	1.05	0.026	2.43	2
GA21	1.12	0.083	7.37	2 + $\alpha$
GM 系統特異的				
RR soy	0.96	0.010	1.01	1
Bt11	0.50	0.027	5.45	1
GA21	1.54	0.042	2.73	2+ $\alpha$
T25	0.35	0.047	13.4	1
Event176	1.94	0.169	8.71	4
MON810	0.42	0.008	1.96	1

<sup>a</sup> 標準偏差

<sup>b</sup> 相対標準偏差

実験は 15 研究室で 3 回ずつ実験した

#### 14. 統計解析

共同試験の参画試験室から回収したデータは、材料（1 成分 1 濃度）ごとに生データをチェックし、測定値に異常がないかを確認した上で、室内誤差の外れ値を検出する Cochran 検定及び試験室ごとの平均値の中の外れ値を検出する Grubbs 検定をそれぞれ行い、無効機関を棄却する。この際の棄却検定は、棄却された機関数が分析結果を提出した機関数の 2/9 を超える前に終了することとなっているが、これを超えた場合には、外れ値を全く除かず全データを用いて精度指標を計算するか、分析法自体に問題があることを疑う必要がある。これらを行った後に、平均値、バイアス、室内再現性（repeatability）、室間再現性（reproducibility）等の統計解析を実施する。

#### 15. 定量検知下限

定量分析法の定量検知下限（Limit Of Quantification; LOQ）については GM 農産物の分析法のための一般要求事項が書かれている ISO 24276<sup>4)</sup> において、一般に共同試験の室間再現性の値が 25% 未満である最低試料濃度と規定されている。

表2 開発した定量PCR法による真度と再現

GMO 系統名	GMO 混入率 (%)	真度		再現性		検知下限以下 ( < 20 コピー)
		平均値	偏差 (%)	室内再現性 (%)	室間再現性 (%)	
Bt11	0.10%	0.091	-9.0	22.3	22.3	21/22
	0.50%	0.510	+ 2.0	23.7	23.7	0/28
	1.00%	1.150	+ 14.7	18.9	18.9	0/28
	5.00%	6.08	+ 21.6	13.7	13.7	0/28
	10.00%	12.10	+ 21.1	10.4	11.5	0/28
GA21	0.10%	0.095	-5.4	20.5	20.6	4/24
	0.50%	0.538	+ 7.7	12.6	21.8	0/26
	1.00%	1.200	+ 20.2	12.3	18.6	0/26
	5.00%	5.830	+ 16.6	8.2	15.9	0/24
	10.00%	11.500	+ 15.0	7.9	13.6	0/26
T25	0.10%	0.139	+ 38.6	23.7	26.5	22/22
	0.50%	0.577	+ 15.3	28.2	28.2	1/28
	1.00%	1.200	+ 20.0	6.8	11.5	0/26
	5.00%	5.580	+ 11.6	12.4	14.8	0/28
	10.00%	10.800	+ 8.1	13.3	14.7	0/28
Event176	0.10%	0.125	+ 11.3	16.3	21.3	1/24
	0.50%	0.547	-1.6	5.8	10.3	0/22
	1.00%	1.050	-7.7	7.1	11.4	0/26
	5.00%	4.780	0.0	8.1	11.2	0/26
	10.00%	9.820	-3.8	5.8	9.5	0/24
MON810	0.10%	0.111	+ 25.0	32.3	32.3	19/22
	0.50%	0.492	+ 9.4	15.1	19.6	0/26
	1.00%	0.923	+ 4.6	11.8	15.1	0/28
	5.00%	5.000	-4.3	13.5	13.5	0/26
	10.00%	9.620	-1.8	10.5	11.6	0/26
RRsoy	0.10%	0.108	+ 8.1	13.4	13.4	4/22
	0.50%	0.571	+ 14.3	12.0	15.9	0/24
	1.00%	1.160	+ 16.1	11.2	13.9	0/24
	5.00%	5.760	+ 15.1	7.6	11.5	0/24
	10.00%	11.700	+ 17.2	8.5	10.6	0/24

## 16. わが国のGM農産物の定量分析法

「標準分析法」<sup>2,3)</sup>に掲載されているわが国のGMダイズ及びトウモロコシの定量法は、検量線作成用のキャリブレーターとしてプラスミドを用いることを特徴としている。筆者らのグループはGMダイズ、5系統のGMトウモロコシを特異的に検知できるPCR用プライマーを設計し、その増幅産物をプラスミド上に連結した分子を作製した。プラスミドは大腸菌で高品質のキャリブレーターを安定的に大量調製できることから、検査の度に標準物質を入手することなく安定した検量線を作製でき、再現性のある測定が可能になると期待された。

「標準分析法」では、GM農作物を定量するにあたって、まず定量対象のGM系統ごとに代表的かつ純粋な品種種子を選び、これらの組換えDNA配列及び内在性DNA配列のコピー数をリアルタイムPCRで測定し、内標比（組換えDNA配列のコピー数／内在性DNA配列のコピー数）をそれぞれ求めておく必要がある。「標準分析法」では各GM系統ごとに代表的品種の種子を用いて15研究室での共同試験において求めた内標比の平均値を固定値として公表している。このことにより、各ラボにおいて内標比を求める必要がなくなると共に、再現性のある測定が可能となった。共同試験において求めた内標比の平均値を表1に示す。各GM系統で求められた内標比は、安全性評価資料等から入手した導入DNAのコピー数から理論的に導かれる値と大きく矛盾するものはなかった。このため、測定者はキャリブレーターのプラスミドを使用することで、各系統のCRMを入手・測定することなく未知試料の定量分析が行えるようになった。具体的には、検査対象の試料からゲノムDNAを抽出後、リアルタイムPCRで組換えDNA配列及び内在性DNA配列のコピー数を求め、それぞれを下記の式 (I) に代入すれば混入率 (%) が算出できる。

$$\text{混入率 (\%)} = \text{組換えDNA配列のコピー数} / \text{内在性DNA配列のコピー数} \times 1 / \text{内標比} \times 100 \quad \cdots (I)$$

この定量法は15試験機関で実施した共同試験でその信頼性が実証された<sup>10)</sup>。表2に共同試験の統計解析結果の概要を示す。この検証試験からMON810, T25, Bt11系統の0.1%GM混入サンプル以外は、室内再現性、室間再現性が共に概ね20%以内に収まる結果が得られ、各GM農作物の定量下限値は、RRダイズが0.1%、GMトウモロコシのMON810, T25, Bt11系統が0.5%、GMトウモロコシのGA21, Event176系統が0.1%と判断された。

(食品分析研究領域 GMO検知解析ユニット 古井 聡)

## 参考文献

- 1) アズマックス社 HP  
[http://www.azmax.co.jp/idx02\\_product/kensa/field\\_05\\_index.htm](http://www.azmax.co.jp/idx02_product/kensa/field_05_index.htm)
- 2) 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル「<改訂第2版>独立行政法人 農林水産消費技術センター」：[http://www.famic.go.jp/technical\\_information/jashandbook/index.html](http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/index.html)
- 3) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について（平成13年3月27日 厚生労働省 食発第110号）：<http://www.mhlw.go.jp/topics/idenishi/kensa/kensa.html>
- 4) ISO/IEC 17025:2005, ISO TS 21098:2005, ISO 21570:2005, ISO 24276:2006, ISO 21569:2005, ISO Guide 34:2000, International Standardization Organization, Geneva, Switzerland
- 5) EC/DG JRC/IRMM, CERTIFIED REFERENCE MATERIALS 2006,  
[http://www.irmm.jrc.be/html/reference\\_materials\\_catalogue/catalogue/cat.pdf](http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/cat.pdf)
- 6) アメリカ油化学協会 HP  
<http://www.aocs.org/tech/crm/>
- 7) Sigma-Aldrich Co. HP  
[http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Analytical\\_Chromatography/Analytical\\_Reagents/Food\\_Analysis.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Analytical_Chromatography/Analytical_Reagents/Food_Analysis.html)
- 8) Lipp M., Shillito R., Giroux R., Spiegelhalter F., Charlton S., Pinero D., Song P., *J. AOAC Int.*, 88, 136-155 (2005)
- 9) AOAC Int. (2003). Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 17 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA
- 10) Shindo Y., Kuribara H., Matsuoka T., Futo S., Sawada C., Shono J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M. and Hino A., *J. AOAC Int.*, **85**, 1119-1126 (2002)



## ② 燃焼法による玄米中の全窒素測定の室間共同試験

### 1. はじめに

食品中の基本的な栄養素の一つであるたんぱく質の含量は、測定した食品中の全窒素定量値に換算係数を掛けて決めている。その全窒素成分を定量するケルダール分析法は、分析誤差が少ない非常に優秀な全窒素測定法である<sup>1~10)</sup>。しかし、その分析過程で、分解操作では濃硫酸と硫酸銅（以前は水銀化合物<sup>6~7)</sup>やクロムを使用)、中和に濃水酸化ナトリウム溶液、アンモニアの捕集にはホウ酸溶液、滴定には希塩酸または希硫酸を使い、有機成分の分解過程で生じる亜硫酸ガスを除去しながら安全に分解操作を行うためのドラフト施設が必要であり、銅含有廃液も出る。複数サンプルを同時に処理できる自動化装置も開発されているが、分解と蒸留に時間がかかるため、朝一番で分析を始めても結果が出るのは午後になってしまう。そのため、品質管理や成分含量確認、それによる在庫削減などに必要な、迅速な検査のできる測定法としての要求には応えられなかった。

それに対して、燃焼法による全窒素測定<sup>1,11~19)</sup>、その中で、改良デュマ法による燃焼法は、小麦、大麦、マイロ、ダイズ、トウモロコシなどの穀類のたんぱく質含量の定量法としてAOACインターナショナルの公定法<sup>13)</sup>として認知され、肉類<sup>14)</sup>や飼料<sup>15)</sup>、肥料<sup>16)</sup>などの公定法にもなっている。しかし、不均一で水分含量も高い食品では燃焼方法の工夫が必要であった。即ち、最低1~2gが必要な大量の試料全体の完全な酸化、発生した大量の燃焼ガスの還元方法、塩分除去法など、解決せねばならない多くの問題点があった。それらを解決した食品分析用の装置が最近種々のメーカーにより開発され、精確で再現性良くかつ迅速な食品中の全窒素測定が可能となり、日本国内でもJASや飼料の公定分析法として採用されている。残念ながら、窒素酸化物を還元するための銅由来の廃棄物が出るが、試料重量の測定以外はほぼ自動的にしかも一点数分で測定できるため<sup>1)</sup>、ほぼリアルタイムで正確な品質管理機器として使われ始めている。

燃焼(改良デュマ)法が、食品中の全窒素成分の測定法として、ケルダール分析法の代替法となりうるかを定めるには、ケルダール法と同等の測定結果を得られること<sup>17)</sup>が重要である。試料中の窒素化合物をアンモニア化しないと全窒素として定量できないケルダール法では食品中に含まれる硝酸塩のアンモニア化率が少し低いため、硝酸塩などの無機態窒素も全窒素として測定する燃焼法の値がケルダール法による値より若干高めに出るのが一般的である<sup>1)</sup>。ケルダール法と燃焼法による定量値が統計的にも一致することが望ましいが、両法による全窒素成分の測定値の比較については、文献<sup>13),14)</sup>にも、燃焼法で少し高めの値は出るとの記載はあるが、両者の値の統計的な評価の記載はない。

そこで、食品中の全窒素の測定法として、燃焼法がケルダール分析法と同等の

測定精度を有していること及び燃焼法の有用性を確認し、食品中の全窒素測定の公定分析法として燃焼法を日本国内でも採用・普及させることを目的に、欧米のものを中心である AOAC インターナショナルの、「穀類」の公定法<sup>18)</sup>では取り上げられていないが、日本の食品では最も摂取量が多い米を試料として用いて、室間共同試験を実施し、まずは、燃焼法自体が食品中の窒素成分分析法としての精度や再現性が高く、多くの試験室で食品への適用が可能で妥当な分析法であることの確認を行った<sup>19)</sup>。

## 2. 材料と方法

### 2.1 試料

室間共同試験を3回行った。一回目の試料は、民間米商社が定量したたんぱく質含量を参考にして日本産玄米を購入し、当研究室での定量データをもとに選定し、配付した。二回目と三回目の試料は、市販の日本産白米とタイ産白米から選定し、配付した。三回目の試料では、アミノ酸類を添加して窒素含量を増加させた日本産白米も配付した。

それらの玄米や精白米を、0.25 mmあるいは0.50mm 篩目のスクリーンを装着した超遠心粉碎機（Retsch社製）で粉碎し、一回目の試料作製では篩（250 $\mu$ m, JIS Z 8801）を通したが、この粉碎機は篩の役目もするスクリーン付きなので、二回目と三回目の試料は篩い分けは行わなかった。

### 2.2 均一性の確認

粉碎試料の小分け方法は、業務用攪拌機で良く混合した後に、表層部分に沿って順次採取を進め、配付容器容量に合わせて採取して保存した。なお、10サンプルを採取したら、攪拌を1分間行い、その後に小分けの試料採取を再開した。

配付前に、その小分けした容器20袋から試料を2点ずつ採取し、燃焼法でその全窒素成分を測定して、文献に従って統計処理して、均一性を確認した<sup>20~22)</sup>。

均一性の確認方法にはいくつかの方法<sup>20~24)</sup>があるが、今回は食品関係の技能試験を多く行っているFAPAS [Food Analytical Performance Assessment Scheme, 英国環境食料農村地域省中央科学研究所 (CSL) が行っている食品化学分析技術評価の技能試験] で採用されている方法<sup>20, 21)</sup>で行った。また、均一性を確認する為にサンプリングする小分け試料数は、同一試料から作った小分け試料50から10試料と20試料を選んで測定した場合と50試料全て測定した場合の均一性の指標を比較したが、特に変わりはなかった。

### 2.3 明示及び非明示反復について<sup>22~24)</sup>

一回目と二回目の室間共同試験は各試料について3回反復で異なる3日で測定、即ち9回、明示反復 (known replicates) で測定した (測定試料が同じことが

表1 玄米6試料中の燃焼法(改良デュマ法)による全窒素量の  
室間共同試験参加16試験室の測定平均値とそのRSDの結果

試験室番号	配布試料番号												使用試料 重量 (g)	燃焼室 温度 (℃)
	I		II		III		IV		V		VI			
	平均値	RSD	平均値	RSD	平均値	RSD	平均値	RSD	平均値	RSD	平均値	RSD		
1	1.082	0.50	1.083	0.53	0.976	0.59	1.398	0.26	1.181	0.26	1.224	0.20	0.5	950
2	1.128	0.41	1.139	0.92	1.023	0.85	1.455	0.65	1.239	0.95	1.280	0.95	0.1	850
3	1.070	1.06	1.069	1.64	0.973	1.51	1.377	0.82	1.164	0.90	1.207	1.35	0.1-0.15	850
4	1.075	1.09	1.075	0.53	0.976	0.57	1.374	0.58	1.170	0.75	1.213	0.65	0.2	850
5	1.111	0.46	1.119	0.55	1.011	0.50	1.432	0.36	1.216	0.58	1.269	0.35	0.3	950
6	1.061	1.75	1.032	0.90	0.930	1.50	1.348	0.90	1.121	0.35	1.166	0.71	0.25	950
7	1.121	0.62	1.117	0.78	1.002	1.18	1.435	0.70	1.220	0.58	1.259	0.40	0.15	950
8	1.112	0.80	1.114	1.36	1.010	1.18	1.425	0.81	1.213	0.67	1.271	0.66	0.2	950
9	1.087	0.44	1.095	0.45	0.986	0.56	1.410	0.29	1.198	0.45	1.248	0.29	0.3	950
10	1.053	1.87	1.064	1.53	0.959	1.30	1.360	1.34	1.158	0.88	1.204	1.49	0.75-1.13	1200
11	1.087	0.33	1.092	0.28	0.987	0.56	1.402	0.36	1.197	0.40	1.235	0.27	0.3	1350
12	1.080	0.62	1.075	0.34	0.974	0.44	1.393	0.31	1.178	0.27	1.221	0.50	0.4	1350
13	1.064	2.64	1.060	2.84	0.955	2.90	1.380	1.85	1.164	1.57	1.211	1.74	0.2	1300
14	1.097	1.06	1.101	0.95	0.994	0.96	1.423	0.90	1.206	1.06	1.241	1.30	0.7	1350
15	1.076	0.45	1.082	0.67	0.968	0.46	1.392	0.31	1.173	0.66	1.220	0.76	0.2	1350
16	1.087	0.63	1.092	0.57	0.983	0.20	1.413	0.41	1.191	0.26	1.244	0.20	0.5	1250
総平均	1.087		1.086		0.978		1.397		1.184		1.228			

平均値；9測定値の平均 (g/100g), RSD；相対標準偏差 (%)

使用した機器の商品名：試験室番号1はSUMIGRAPH NC-220, 同2はJ-SCIENCE JM1000CN, 同3～8は

Leco FP-528, 同9はLeco True Spec, 同10～16はLeco FP-2000

検量線作製の標品として, 試験室番号1はアスパラギン酸, 同2は馬尿酸, 同3～16はEDTAを使用

第一回目の室間共同試験結果

明らかな場合を「明示」と表現)。異なる日に測定したことにより, 室間再現精度(全体の分析誤差)を試験室間誤差(測定した試験室間の誤差), 試験室内誤差(測定した試験室内の日間変動)とその他の試験室内誤差(測定した試験室内の日内変動, 測定法自体に由来するものも含まれる)に分けて解析できた。

三回目の室間共同試験は, 同一試料を試料番号を変えて二つずつ配付し, 各試料を1回だけ測定する, 非明示反復(blind replicates)で試験を行った。明示した場合, 被験者は同じ試料の測定値は同じはずと考えて, それらの測定値に差がない方向で値を選んでしまう危険がある。そこで, 出てきた値を操作できないように非明示の試料を測定してもらう。しかし, このような試験方法を知っていると非明示であってもペアが推定できてしまうので, さらに測定成分の含有量が5%以内の「Youden pair」<sup>26)</sup>を作り, 測定値のチェックをした。

## 2.4 測定機器と参加試験室

燃焼法(改良デュマ法)による測定に用いた機種は, Leco-FP-2000, Leco-FP-528とLeco-TrueSpec [以上, 日本アナリスト(株)(現在名, LECOジャパン(株)], SUMIGRAPH NC-220 [株住化分析センター], PROTEIN CORDER JM1000NとJM1000CN (ジェイ・サイエンス・ラボ), VarioMax, VarioMacoron, とrapidN (エ

レメンタール社)で、一回目の試験での燃焼室の設定温度と使用した試料重量は表1の通りである。

参加試験室数は、同一試験室で異なる2機種で測定を行った場合には別の試験室として扱い、その数は16から24であった。

第一回目の試験開始時には、燃焼法の機器を食品用に使用している機関が少なく、機種も限られていた。そこで、当研究所が食品用として選択・導入したLeco社製の機器の使用機関を紹介してもらった。そのため、表1の参加機種はほとんどLeco社製で、その他の2機種も開発されたばかりの機器であった。また、参加試験室は食品成分を測定する専門機関から食品会社の検査室もあったが、みな良いデータを出してくれた。また、食品会社では忙しい季節がありその時期は参加できないので、試験は年一回のペースでしかできなかった。

## 2.5 測定について

参加試験室には試料の測定方法やデータの取扱いなどを記したプロトコール[測定に関する事項は以下の通り：同じ機器で測定。校正には同じ標準物質(同一バッチ)を使う。試料は100 mg以上使う。3点繰返して測定し、室内再現性試験は3回、異なる日に行う(一回目及び二回目の試験)あるいは1回だけ測定する(三回目)。測定値は水分含量で補正しない。これら以外は、各試験室で使っている機器を使い、通常の測定手順・測定方法で測定すること。結果の報告は全ての生のデータを送付。]を付け、それに従って測定を行わせた。また、測定値の報告は、乾燥重量当たりではなく送付した試料そのままの重量当たりとした。これは、窒素測定時の誤差に加えて水分測定による誤差まで含まれることを防ぐためである。

## 2.6 集計データの選択, Cochran及びGrubbsの検定<sup>22~25)</sup>

集計したデータは、まず、外れ値の検定を行う。

最初に測定値の振れ具合(分散)を比較するコクラン(Cochran)の検定を行う。

JISハンドブックの表<sup>25)</sup>には1%と5%の棄却限界値が載っているが、AOACの公認された方法<sup>24)</sup>では2.5%の値である。棄却試験室がある場合には、それを除いて、同じ手順で検定を続ける。ただし、参加試験室の2/9を超えては棄却できないルールがある<sup>22, 24)</sup>ので、検定で棄却とされる試験室が多く出ても、例えば20試験室の参加では4試験室が棄却できる最大数である。

この検定では、測定値を揃えてしまうデータ操作をした試験室が多いと、正確に報告して分散値が少し大きい試験室のデータが外れ値と見なされる場合がある。

次に、コクランの検定で棄却したデータを使い、試験室間の平均値を比較するグラブス(Grubbs)の検定を行う。文献<sup>24)</sup>のグラブス検定の棄却限界値の表で、

参加研究室数と測定数から読み取って判定する。これも2.5%で検定する。先に一番目、次に二番目までの検定をする。

この検定でも、外れ値が出たらそれを除いて再検定をするが、参加した試験室の2/9を超えてはやはり棄却はできない。コクラン検定で棄却された試験室数が上限に達していれば、本検定で外れ値とされても棄却できない。

## 2.7 データ解析

集計データから外れ値を除いたデータを解析に使用したが、外れ値も入れた全データも解析に使用して、そのデータを採用する場合もある。

今回の試験の解析では、Microsoft Excelの、「繰り返しのある分散分析」で計算し、「繰り返し誤差の分散値」が「併行分散 =  $S^2_r$ , Repeatability」, 「列の分散 =  $S^2_d$ 」とJISハンドブックのZ8402-2にある式<sup>25)</sup>から、「室間分散 =  $S^2_L = S^2_d - S^2_r/n$  (ここではnは1回・2回の試験の場合の繰り返し数9) や「室間再現精度 =  $S^2_{Rr} = S^2_r + S^2_L$ 」, 「併行相対標準偏差 =  $RSD_r$ 」, 「室間相対標準偏差 =  $RSD_R$ 」を求めた。また、「Youden pair」の解析は別式<sup>26)</sup>で行った。

同時に、数多くの共同分析試験から得られた $RSD_R$ から経験的に導き出された $PRSD_R$ <sup>27)</sup> (% , Predicted  $RSD_R$ ) =  $2 \times C^{-0.1505}$  (ここでCは測定平均値で、1%ならば「0.01」で計算) や  $\sigma_p$ <sup>28)</sup> =  $2 \times C^{0.8495}$  もMicrosoft Excelで求めた。

また、参加試験室の測定値の傾向の把握のため、技能試験 (Proficiency testing) の判定指標であるz-score<sup>27, 29)</sup>を各試験室毎に計算した。

z-scoreの計算は、(各試験室の測定平均値 - 全試験室の測定平均値) /  $\sigma_p$ である ( $\sigma_p$ は測定対象成分の濃度により異なり、濃度が0.12ppm~13.8%の場合、濃度の0.8495乗×2、13.8%以上は濃度の0.5乗、0.12ppm以下では一律0.22。ほとんどの場合、 $\sigma_p = 2 \times C^{0.8495}$ )<sup>22, 28)</sup>。その測定平均値は、CochranやGrubbsの検定で棄却をしない、参加試験室の全測定値の平均を使った。

HorRatは、 $RSD_R / PRSD_R$ で計算した<sup>29~30)</sup>。その値は、0.5~1.5の間であればその室間試験は満足の行くもの、逆に0.5以下だと測定値の作為的な操作が行われたのではないかと見なされる<sup>22, 31)</sup>。ただし、ケルダール分析法のHorRatでは0.2~0.5が報告されている<sup>8~10)</sup>、これはケルダール分析法が正確な測定法であることを示している。

## 3. 試験結果

### 3.1 測定結果

室間共同試験では報告されたデータを紹介することになっているので、それを表1に示す。場合によっては全ての測定値を示すこともある。

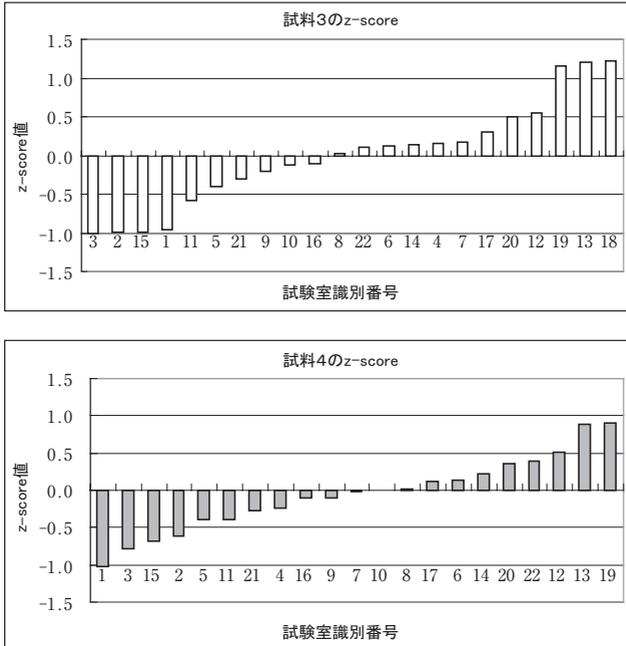


図1 第二回室間共同試験でのz-score

### 3.2 z-score

二回目の試験のz-scoreを図1に示す。

z-scoreが±2以下だと満足のいく結果<sup>22)</sup>といわれるが、今回の室間共同試験で試算したz-scoreが±1以上になったのは各試料で1～2試験室程度で、ほとんどの試験室は±1以下だった。FAPASの室間試験で報告されてくる結果でも6割以上は±1以下であるので、今回の試験結果は、参加した試験室並びに測定法としての燃焼法がともに優秀であることを示している。

また、測定用試料が異なっても、ある試験室の測定値は全試験室の測定値分布の中のある一定の位置（高い値あるいは中心値付近など）近くに集まるという特徴を示した。

### 3.3 測定法の妥当性について

室間試験のデータ解析により、併行分散 (Repeatability) や室間再現精度 (Reproducibility, 分析誤差),  $RSD_R$  を求めた<sup>22-25)</sup>。併行分散は単独試験室の試験でも求まるが、室間再現精度は室間試験を行わなければ求まらない<sup>22)</sup>。

第一回の共同試験で得られた $RSD_I$ と $RSD_R$ を表2に示す。棄却済データで0.32

表2 検定棄却データによる室間共同試験の種々の結果

試料番号	1*	2*	3	4	5	6
棄却後の試験室数	12	15	14	15	13	
平均値 ( $\bar{x}$ , %)	1.095	1.099	0.983	1.405	1.188	1.238
併行標準偏差 ( $S_t$ )	0.003*		0.009	0.009	0.008	0.008
併行相対標準偏差 ( $RSD_t, S_t/\bar{x}$ , %)	0.32	0.32	0.91	0.64	0.66	0.64
室間再現標準偏差 ( $S_R$ )	0.019*		0.025	0.029	0.030	0.031
室間再現相対標準偏差 ( $RSD_R, S_R/\bar{x}$ , %)	1.74	1.73	2.52	2.09	2.56	2.53
予測相対標準偏差 ( $PRSD_R, 0.02\bar{x}^{-0.1505}$ , %)	3.95	3.94	4.01	3.80	3.90	3.87
HorRat ( $RSD_R/PRSD_R$ )	0.44	0.44	0.63	0.55	0.66	0.65

\* 試料番号1と2はヨーデン対として評価した  
第一回目の室間共同試験結果

表3 室間再現標準偏差 ( $S_R$ ) を,  
原因別に分類した割合 (%)

誤差の種類		試験室間	試験室内日間	その他*
検定棄却済みデータ				
配布試料番号	3	84.9	7.6	7.4
	4	89.2	6.2	6.6
	5	92.7	3.1	4.3
	6	92.1	5.9	2.0
全試験室データ				
配布試料番号	3	77.5	15.4	7.0
	4	84.0	9.4	6.6
	5	90.1	5.8	4.1
	6	86.3	8.2	5.5

\* 試験室内日内誤差とその他の誤差  
第一回目の室間共同試験結果

～0.91%と1.73～2.56%，全試験室データでも0.62～1.13%と2.21～2.62%の範囲であった。小麦や大豆などの穀類中のたんばく質含量を燃焼法で求めた文献値<sup>13, 18)</sup>があるので（ただし，文献では全窒素量ではなくたんばく質換算係数を掛けた，たんばく質含量として示されている），それらのRSD<sub>T</sub>の0.77～2.57%やRSD<sub>R</sub>の1.24～3.15%と比較すると，第一回の共同試験で得られたRSD<sub>T</sub>やRSD<sub>R</sub>はこれらの範囲に収まっていた。また，HorRatは0.44～0.66の範囲であった。以上の結果から，第一回の室間共同試験では，本測定法の妥当性が評価される満足のいくものであること，即ち，燃焼法が米中の全窒素の定量法として十分な測定精度を有する妥当な測定法であることを示していた。

第二回及び第三回の室間共同試験で得られたRSD<sub>T</sub> (0.76～1.64, 0.27～0.83) やRSD<sub>R</sub> (2.00～2.85, 1.03～2.92), HorRat (0.51-0.70, 0.28-0.73) も，第一回の室間共同試験で得られた結果とほぼ同じであり，燃焼法が米中の全窒素の定量法として十分な測定精度と再現性を有する妥当な測定法であることを示していた。

第一回，二回の室間共同試験では，日を変えて3回反復で測定したデータから，室間再現精度（Reproducibility,  $S^2_R$ , 分析誤差）を，試験室間の変動と試験室内の日間変動（測定日による）の分散，試験室内日内変動（測定法自体に由来するなどのその他の誤差）とに分けて算出した（表3）<sup>32)</sup>

第一回の試験の結果は，分析誤差の78～93%が試験室間に由来する変動で，棄却していない全試験室データで解析しても78～90%と，どちらの場合でも高い割合を占めた。それに対して，試験室内の日間変動は試料3の全試験室データ以外では10%以下，試験室内の日内変動（その他の誤差）の割合も10%以下と小さかった。即ち，本共同試験の測定値の変動の主体は各試験室間での測定値の誤差に由来するものであった。第二回の試験も第一回の試験結果とほぼ同じで，分析誤差のほとんどは試験室間由来（89～96%）であった。

（食品分析研究領域 分析ユニット 堀田 博）

## 参考文献

- 1) 新・食品分析法，日本食品科学工学会，新・食品分析法編集委員会編，1-3 蛋白質，pp30-pp45，光琳，1999
- 2) 分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説，財団法人日本食品分析センター編集，たんばく質，pp29-pp36，中央法規，2001
- 3) 五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル，文部科学省，科学技術・学術審議会，資源調査分科会食品成分委員会編集，たんばく質，pp12-16，国立印刷局，2005
- 4) 安井明美，小泉英夫，堤 忠一，松永隆司，吉川誠次，二酸化チタンと硫

- 酸銅を触媒として用いるケルダール改良法のクロスチェックによる精度の検討, (第1報) きなこ, 小麦, 小麦粉および精白米を用いての解析, 食総研報, **32**, 108, 1977.
- 5) 安井明美, 小泉英夫, 堤 忠一, 松永隆司, 吉川誠次, 二酸化チタンと硫酸銅を触媒として用いるケルダール改良法のクロスチェックによる精度の検討, (第2報) コーンスターチ及び2種類のはちみつを用いての解析, 食総研報, **33**, 79, 1978.
  - 6) P. F. Kane, Comparison of HgO and CuSO<sub>4</sub> as Digestion Catalysts in Manual Kjeldahl Determination of Crude Protein in Animal Feeds: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **67**, 869, 1984.
  - 7) P. F. Kane, Comparison of HgO and CuSO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> as Catalysts in Manual Kjeldahl Digestion for Determination of Crude Protein in Animal Feeds: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **70**, 907, 1987.
  - 8) S. Nozawa, A. Hanada, K. Sakaida, T. Suzuki and A. Yasui, Method Performance Study of the Determination of Total Nitrogen in Soy Sauce by the Kjeldahl Method, *Anal., Sci.*, **21**, 1129, 2005.
  - 9) J. M. Lynch, D. M. Barbana and J. R. Fleming, Determination of Total Nitrogen Content of Hard, Semi hard and Processed Cheese by the Kjeldahl Method: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **85**, 445, 2002.
  - 10) 野澤慎太郎, 坂井田健一, 鈴木忠直, 安井明美, Kjeldahl法によるしょうゆの全窒素定量における分解条件の最適化, 分析化学, **55**, 15, 2006.
  - 11) G. Bellomonte, A. Costantini and S. Giammarioli, Comparison of Modified Automatic Dumas Method and the Traditional Kjeldahl Method for Nitrogen Determination in Infant Food, *J. AOAC Int.*, **70**, 227, 1987.
  - 12) R. A. Sweeney and P. R. Rexroad, Comparison of LECO FP-222 "Nitrogen Determinator" with AOAC Copper Catalyst Kjeldahl Method for Crude Protein, *J. AOAC Int.*, **70**, 1028, 1987.
  - 13) R. C. Bicsak, Comparison of Kjeldahl Method for Determination of Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds with Generic Combustion Method: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **76**, 780, 1993.
  - 14) M. K. Brink and J. G. Sebranek, Combustion Method for Determination of Crude Protein in Meat and Meat Products: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **76**, 787, 1993.
  - 15) R. A. Sweeney, Generic Combustion Method for Determination of Crude Protein in Feeds: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **72**, 770, 1989.
  - 16) D. F. Tate, Determination of Nitrogen in Fertilizer by Combustion: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **77**, 829, 1994.

- 17) 大能俊久, 熊谷昌利, 堀 一之, 元素分析装置による米1粒の粗たんぱく質定量, *食科工*, **47**, 37, 2000
- 18) Edited by W. Horwitz, 32.2.02 AOAC Official Method 992.23, Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds, Generic Combustion Method First Action 1992, "Official Methods of Analysis of AOAC Int. " 17th ED, volume II, Ch 32 CEREAL FOODS, p24-25 (2003), AOAC Int., Gaithersburg, MD, USA.
- 19) 堀田 博, 燃焼法による玄米中の全窒素定量の室間共同試験, *分析化学*, **55**, 323, 2006.
- 20) T. Fearn, M. Thompson, A New Test for 'Sufficient Homogeneity', *Analyst*, **126**, 1414, 2001.
- 21) Protocol for the Organization and Analysis of Data, 6th edition, 2002, Food Analysis Performance Assessment Scheme ( FAPAS ), Central Science Laboratory, UK.  
<http://www.fapas.com/pdfpub/FAPASProtocol.pdf>
- 22) 分析法の妥当性確認に関するガイダンス, (独)農研機構 食品総合研究所ホームページ, (<http://nfri.naro.affrc.go.jp/yakudachi/datosei/index.html>)
- 23) M. Thompson and R. Wood, *Pure & App. Chem.*, **65**, 2123, 1993.
- 24) W. Horwitz, Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 331, 1995.
- 25) 日本規格協会編, 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度) - 第2部: 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的方法(Z 8402-2) "JISハンドブック 57 品質管理 2004", p269-301 (2004) 日本規格協会.
- 26) F. D. McClure, A Statistical Evaluation of the Youden Matched-Pairs Procedure, *J. AOAC Int.*, **82**, 375, 1999.
- 27) M. Thompson, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385, 2000.
- 28) 安井明美, 食品分析における信頼性確保, *The Chemical Times*, **191**, 13, 2004. (関東化学ホーム [http://www.kanto.co.jp/times/t\\_pdf/CT\\_191\\_5.pdf](http://www.kanto.co.jp/times/t_pdf/CT_191_5.pdf))
- 29) M. Thompson, R. Wood, International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories, *J. AOAC Int.*, **76**, 926, 1993.
- 30) F. D. McClure and J. K. Lee, Computation of HORRAT Values, *J. AOAC Int.*, **86**, 1056, 2003.
- 31) Edited by W. Horwitz, "Official Methods of Analysis of AOAC Int. ." 17th ED, volume II, Appendix D, p9 (2003), AOAC Int., Gaithersburg, MD, USA.
- 32) 日本規格協会編, 測定方法及び測定結果の精確さ(真度及び精度) - 第3部: 標準測定方法の中間精度(Z 8402-3) "JISハンドブック 57 品質管理 2004", p302-320 (2004) 日本規格協会.

### ③ アクリルアミド分析の国際室間共同試験への参加

#### 1. はじめに

アクリルアミドは、120℃以上の高温での加工・調理過程でアミノ酸の一種であるアスパラギンが果糖（フルクトース）やブドウ糖（グルコース）と反応して生じる物質である<sup>1,2)</sup>。この物質は、細胞試験や動物試験における遺伝毒性、生殖・発生毒性に関して報告があり、国際がん研究機関（IARC）による発がん性の分類で、「ヒトに対しておそらく発がん性がある」という2Aグループに分類されている。従来食品中には存在するはずがないと考えられていたアクリルアミドが、ppbから多い場合にはppmのオーダーで食品中に存在するという事は、2002年にスウェーデン食品庁とストックホルム大学が初めて発表した<sup>3),4)</sup>。この発表以降世界中で、経口摂取されたアクリルアミドの代謝や毒性に関する研究とともに、食品中のアクリルアミドの分析が行われた。

アクリルアミドは、土壌凝固剤、土壌改良剤、紙力増強剤、水処理用凝集剤等として使用されるポリアクリルアミドの原料として知られており、工場や工事現場などで使用されたポリアクリルアミド中に残存しているアクリルアミド単体が地下水や河川水に混入して水道水を汚染することは従来から心配されていた。世界保健機関（WHO）はアクリルアミドの水道水基準のガイドラインを0.5μg/Lとしている。日本では、水道水中のアクリルアミドの分析には、臭素化誘導体にしてガスクロマトグラフ（GC）で定量する方法が用いられている<sup>5)</sup>。

#### 2. 食品中のアクリルアミドの分析法

アクリルアミドが含まれることが判明した食品は、揚げ物、焼き物、焙煎したものなど広範囲にわたり、それぞれのサンプルに含まれる夾雑物も様々である。従って、夾雑物の少ない水道水の分析とは異なり、食品中のアクリルアミドの分析には前処理の手間が必要になる。また、GCにおける保持時間を同じくする夾雑物の妨害を避けるために、検出にはガスクロマトグラフ質量分析法（GC-MS）を使う必要が出てくる。

我々の研究室（ラボ）では、水抽出の後に混合相の固相抽出カートリッジを通過させて精製し、臭素化後にGC-MSで定量する方法を採用している<sup>2),6)</sup>。なお、アクリルアミドに関しては、様々な食品が分析対象になり、それらからのアクリルアミドの回収率も常に高いとは言えないので、測定対象のアクリルアミドと似通っていてかつ分離測定可能な既知の量の内標準物質を分析サンプルに添加し、内標準由来のピーク強度を基準としてサンプル中のアクリルアミド由来のピークの強度からアクリルアミドの含有量を算出する内標準法を採用することが多い。我々は内標準として、重水素化アクリルアミド（アクリルアミド- $d_3$ ）を

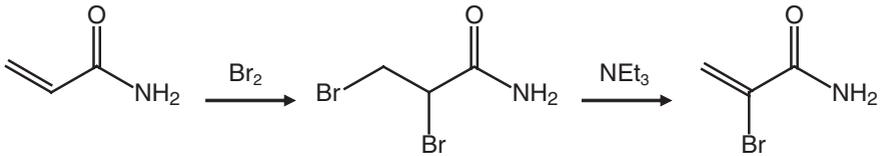


図1 GC-MS法の標準手順書によるアクリルアミド分析における反応

抽出前の分析サンプルに添加している。GCには中極性カラムを用い、2,3-ジブromoプロパンアミドの脱臭素フラグメントイオンピーク  $[C_3H_5NO^{79}Br]^+$  ( $m/z$  150) と  $[C_3H_5NO^{81}Br]^+$  ( $m/z$  152) を選択イオンモニタリング (SIM) で検出し、内標準由来のピーク  $[C_3H_2D_3NO^{79}Br]^+$  ( $m/z$  153) と  $[C_3H_2D_3NO^{81}Br]^+$  ( $m/z$  155) との面積比からサンプル中のアクリルアミド濃度を算出する。臭素の安定同位体  $^{79}Br$  と  $^{81}Br$  の天然存在比は 1 : 1 なので、この方法では分析対象のアクリルアミドについても内標準についても二つのイオンが同じように定量に使用できるので、二つのイオンピークがともに夾雑物の妨害を受けない限り定量が出来るという堅牢性がある。

臭素化後にトリエチルアミンで脱HBrし、生じた2-ブromoプロパンアミドの分子イオン  $[C_3H_4NO^{79}Br]^+$  ( $m/z$  149) を使用してGC定量する方法 (図1)<sup>7)</sup> もあるが、この場合は内標準にアクリルアミド-*d*<sub>3</sub>を使用すると、同位体ピーク  $[C_3H_4NO^{81}Br]^+$  ( $m/z$  151) が内標準の  $[C_3H_2D_2NO^{79}Br]^+$  ( $m/z$  151) と重なるので、定量は  $[C_3H_4NO^{79}Br]^+$  ( $m/z$  149) と  $[C_3H_2D_2NO^{81}Br]^+$  ( $m/z$  153) の比較によらねばならない。これを避けて二つの同位体ピークを定量に使えるようにするためには、内標準に<sup>13</sup>C標識アクリルアミド (アクリルアミド-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>) を使用して、脱HBr後も分析対象分子と内標準の分子量の差が3に保たれるようにする必要がある。なお、誘導体化を行わないでGC-MSで分析する場合には、GCに注入するサンプル溶液にアスパラギンと還元糖が含まれていると、それらが導入部の温度で反応してアクリルアミドを生じるため、前処理でアミノ酸や糖を十分に除いておく注意が必要である。

アクリルアミドの分析には、GC-MS法の他に液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いる方法もある<sup>2,3,4,6,7)</sup>。食品中のアクリルアミドを発見したスウェーデンのグループが分析にLC-MS/MS法を用い、この方法が感度の良い方法であると報告したために、装置が高価でGC-MSに比べて一般的ではないにもかかわらず、アクリルアミドの分析にはLC-MS/MS法もよく用いられている。LC-MS/MS法では誘導体化の必要がなく、その前処理の手間が省けるが、普通は濃縮の操作が入らないので、濃度の低いサンプルの場合は希釈による測定濃度の低下に気をつけなければならない。アクリルアミドは非常に極性が高いために、通常の液体クロマトグラフ用逆相ODS系のカラムでは保持が良く

ない。そこで、グラファイトカーボンカラムや極性物質用のC18カラムが分離に用いられている。検出は、エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) を用いてイオン化を行い、ポジティブモードにより、 $[M + H]^+$  ( $m/z$  72) を検出し、更に  $m/z$  72 $\rightarrow$ 55/54/44/27 を選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) で検出し、 $m/z$  72 $\rightarrow$ 55 を定量に用いる。内標準にはGC-MS法の場合と同じく、アクリルアミド- $d_3$  またはアクリルアミド- $^{13}C_3$  を用い、 $m/z$  75 $\rightarrow$ 58 を定量に用いる。

LC-MSで分析を行っている例も少数あるが、LCのSIMでの検出はMS/MSにおけるSRMに比べて選択性が低く、夾雑物の影響受けやすく、特にアクリルアミドのような低分子化合物に関しては、十分な分離分析が困難である。そのため、4種類のカラムを使用してカラムスイッチングを行う<sup>7)</sup>などの工夫がなされている。

以上のように、食品中のアクリルアミドの分析法は、GC-MSによるものとLC-MS/MSを使用するものとの大きく二つに分けられるが、その中でも、前処理の方法や、カラムの選択、検出するイオンの選択などに関して、ラボによって様々である。そこで、分析法の妥当性確認を行おうという動きがあり、その中で我々は2005年の欧州共同体 (EC) の Directorate General Joint Research Centre (DG JRC) の呼びかけによるアクリルアミドの室間共同試験に参加した。

### 3. ECのアクリルアミド室間共同試験の実施

この室間共同試験は、HEATOXプロジェクトと共同で、DG JRCの Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) が行ったものである。HEATOXプロジェクトは、加熱によって食品中に生じるアクリルアミド等の有害物質について様々な角度から研究するために、欧州連合 (EU) のサポートの元で2003年11月から3年間の予定で始まったものである。このプロジェクトには、DG JRCの他に Central Science Laboratory (CSL), Swedish National Food Administration (SNFA), the Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) 等が参加している。この室間共同試験はISO 5725及びIUPAC Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies<sup>8)</sup> に従って、LC-MS/MS法とGC-MS法の二本立てで行われた。分析対象の食品サンプルは両法に共通で、揚げじゃがいも製品及びパン、クリスプブレッド、クッキーであった。我々は、このGC-MS法の室間共同試験に参加した。

#### 3.1 室間共同試験の申し込み

2005年8月24日に室間共同試験への招待状と参加申込書がIRMMからEメールに添付されて送られてきた。参加料は無料であるが、分析に必要な同位体標識内標準、器具、カラムの類は参加者側で用意しなければならない。したがって、

この室間共同試験の標準手順書（Standard Operating Procedure, SOP）と大きく異なる方法で分析を行っているラボが参加することになると、分析に必要な試薬や器具をそろえるために自腹を切らねばならなくなる。正式な標準手順書は分析サンプル送付時に送られてくるのだが、大まかな方法は招待状に記載されており、自分のラボがこの方法で分析が出来るかどうかは判断できる。また申込書には、分析に必要な内標準や、カラムや機器を保有しているかどうかをチェックする欄があり、それによりこのラボが参加可能かどうか主催者側も判断できる。ただしLC-MS/MS法に関しては、分析の前処理で使用する固相抽出カートリッジがあまり一般的ではないタイプのものであり、在庫も限られて手に入れにくい場合もあることから、主催者側で固相抽出カートリッジを供給することになっていた。

招待状には、サンプルの数は約24個で、それぞれ1回分の分析のための量があり、その他に標準手順書に従った分析操作の練習用にアクリルアミド濃度が既知の標準サンプルが送られる予定であると書かれていた。また、サンプルを受け取ってから結果を返すまでの期間は1ヶ月となっていた。申込締め切りは9月9日であったが、主催者側の都合により参加者数に制限があるので、申込数が受入の制限に達した段階で受付を閉め切ることになっていた。

### 3.2 分析サンプルの受け取り

参加申し込みをしてから約2ヶ月後の10月22日に、IRMMより翌週に分析サンプルを発送するという連絡があり、サンプルはドライアイス詰めで凍結して送られるので、冷凍庫で保存するようという指示があった。なお、申し込み者の要望で、当初1ヶ月と言われていた分析期間は6週間に延長された。

ところが、10月29日付けの参加者宛のEメールで、危険物と見なされるドライアイスを入れた荷物の長距離輸送に関して、契約している運送会社とのトラブルにより、まだサンプルを発送できないでいるが、10日後に発送の予定であるという連絡があった。さらに、11月16日、筆者宛に、IRMMのあるベルギーには、ドライアイス詰めの荷物を直接日本の筆者のラボまで届けてもらえる運送会社がないので、荷物は東京の空港止めの発送となるが、空港まで取りに行けるかとの問い合わせがあった。成田空港でも羽田空港でも取りに行けると返事をしたところ、11月24日にサンプルは成田空港止めで発送されたとの連絡メールが来た。成田空港のキャセイパシフィック航空のオフィスからも電話連絡があり、荷物は26日午後には到着するので、空港の貨物地区に入りキャセイパシフィックのオフィスで書類を受け取って、それを持って税関で手続きをしてから荷物を受け取るようにとのことであった。貨物地区へ入る入構証をゲートでもらえるよう、あらかじめ荷物を受け取りに行く車の車種とナンバーをキャセイパシフィックの担当者に伝え、荷物の載せられる便名と荷物の伝票番号を教えてもらった。

11月26日に、予定通り成田空港の貨物地区内のキャセイパシフィックのオフ

イスで輸入のための書類を受け取り、税関の特別通関部門で通関手続きを行った。この日は土曜日だったので、特別手数料（臨時開庁承認申請料）が必要で、2050円の印紙を購入する必要があった。税関の手続きでちょっととまどったのは、荷物の中身がどういう種類の品物かを書類に記入しなければならないことであった。品物の種類により関税の扱いが異なるので、受け取る品物についてコード番号が付されたリストの中のどれかに分類しなくてはならないが、このような分析テストのサンプルは適当な分類がなく、税関の職員ともども分類に悩んで、結局一番近そうなところで食品の「認証標準物質」として手続きを行った。分類区分「認証標準物質」は関税がかからず、無税で受け取ることができたことに加え、送付状に「TEST SAMPLES FOR CHEMICAL ANALYSIS」としか記載されていなかったため、アクリルアミドとしてではなく、食品として通関できたことは面倒が少なく幸いであった。実際の荷物は、日本航空倉庫の受け取り窓口へ通関の書類を持参して、施設使用料と保管料を支払って受け取った。午後1時に空港に到着し、3カ所を回って荷物を手にしたのは4時を過ぎていた。

成田空港で行った上記の手続きは、個人輸入の手続きであり、研究目的であっても、海外からサンプルを受け取る時には輸入の手続きが必要であることをこの時改めて認識した。代理店が仲介するプロフィシエンシィテスティングでは、その代理店が輸入の手続きをしてくれるので、研究者は手続きの心配をする必要はないが、仲介業者なしに直接分析サンプルを受け取る場合は、自分で税関へ出向く覚悟がいる。なお、送付された荷物の受取人が税関へ行けない場合には、委任状が必要である。

届いた荷物は二つで、そのうち一つはガラスのバイアル瓶に入った分析サンプル27本のドライアイス詰め、もう一つはドライアイスなしの常温で送られてきたガラスのバイアル瓶に入った標準溶液12本であった。発送時のドライアイスの一部はまだ残っており、中のガラスバイアルはどれも損傷なく、無事に手にすることができた。空港から研究所までは、冷凍サンプルには持って行ったドライアスを追加して運搬し、研究所に到着後冷凍庫へ保管した。

### 3.3 分析手順

送付された分析用サンプルは、パン、クリスマスブレッド、クッキー、揚げじゃがいも製品に由来する24種類で、それぞれ番号の書いたラベルが付されているものの、送付時にはそれぞれのサンプルの内容も、もちろんその中のアクリルアミド濃度も明らかにされていない。この他に添加回収試験用のサンプルが二つと、それぞれに添加するための二種類のアクリルアミド溶液があり、添加回収試験用サンプル2.0gに各1000 $\mu$ Lを添加して分析することになっていた。分析用サンプルは各1回のみの分析のための量が送られてきている。さらに、分析の練習と再現性の検定用に、最低10回の分析が可能な量の練習用サンプルが同封されていた。

サンプル（粉碎済み）

秤量 2g

← 内標準（アクリルアミド-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>400ng）200 μL  
 ← 脱脂溶媒（酢酸エチル-シクロヘキサン 1:1）3mL

超音波 5分間

← 水 20 mL

振とう 15分間（オービタルシェーカー使用）

遠心 3,000 × g 以上， 5分間

水相採取 10 mL

← 臭素化試薬 15 mL

静置 4°C， 1時間

← チオ硫酸ナトリウム水溶液  
 ← 酢酸エチル 8 mL

振とう 15分間（オービタルシェーカー使用）

遠心 3,000 × g 以上， 5分間

酢酸エチル相採取約 4 mL

← 無水硫酸ナトリウム 0.5 g

振とう 15分間（オービタルシェーカー使用）

酢酸エチル相採取

0.5mL 以下に濃縮 40°C（窒素吹きつけ）

← トリエチルアミン 50 μL

GC-MS 分析

中極性カラム：50%-phenyl-50%-polymethylsilicone, 0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 mm  
 キャリアガス：ヘリウム，流速：1 ml/min  
 注入部温度：250 °C，スプリットモード（15:1）  
 昇温条件：40 °C（1 min）-（20 °C/min）-175 °C（5 min）-（20 °C/min）-280 °C（5 min）  
 インターフェース温度：280 °C，イオン化法：EI+（70 eV）  
 検出：SIM *m/z* 106, 133, 135, 149, 151, 152, 154

図2 GC-MS法の標準手順書によるアクリルアミドの分析手順

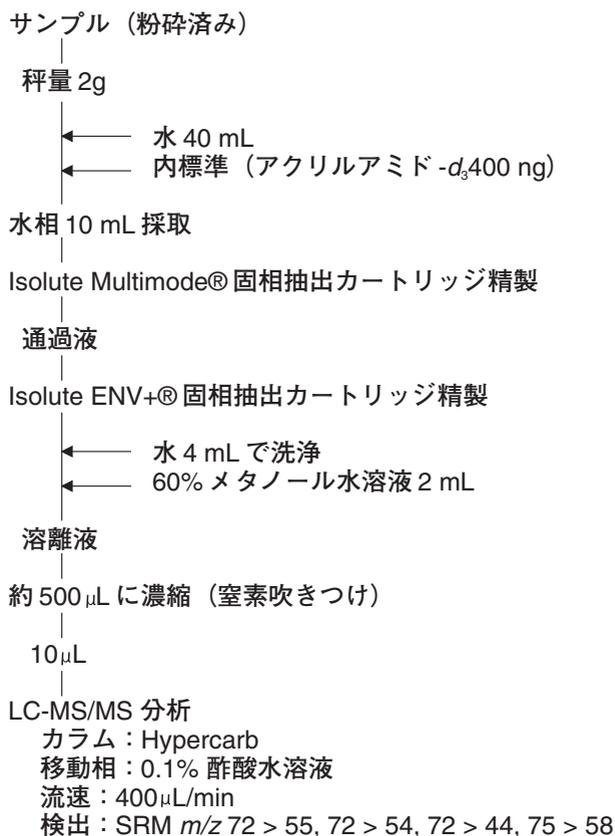


図3 LC-MS/MS法の標準手順書によるアクリルアミドの分析手順

上記のサンプルの他に、400ngの内標とともに0~20,000ngのアクリルアミドを含む標準溶液10種類が10mLずつバイアル瓶に入って送付された。これは分析装置の較正のチェックに用いるものであるが、実際のサンプルの分析の際には、標準手順書に従って各自で標準溶液を調製し、それで較正を行うことになっている。その較正時のデータも分析結果とともに提出することになっていた。

サンプル発送の連絡のEメールに添付され、またサンプルにも同封されていたGC-MS法の標準手順書による分析手順は図2のフローチャートにある通りである。有機溶媒で脱脂後に水抽出し、カラム精製などはせずそのまま臭素化を行う。GC-MS分析はトリエチルアミンで脱HBr後、2-プロモプロペンアミドとしての分子イオンを検出する（図1）。この方法は、パン、トースト、クリスピーブレッド、

バタークッキー、ビスケット、フライドポテト、ポテトチップ、ポテトパンケーキのアクリルアミド分析に適した方法であると標準手順書には書かれていた。内標準にはアクリルアミド- $^{13}\text{C}_3$ の他にアクリルアミド- $d_3$ を用いてもよいことにはなっていたが、MSによる検出の際に前述のような問題がある他に、これまで報告はされていないとしながらも、分析サンプル調製の際のH-D交換の可能性が標準手順書に指摘されており、我々はアクリルアミド- $^{13}\text{C}_3$ を用いた。

実際に分析を始めようとして問題となったのは、標準手順書によれば、まず分析サンプルを容量40mLのねじ蓋付きバイアル瓶に秤り取って、3 mLの酢酸エチル-シクロヘキサン(1:1)での脱脂、その後20mLの水で抽出を行うことになっているが、有機溶媒が使用できる容量40mLのガラスのバイアル瓶は日本では一般的でなく、我々のラボでは保有していなかったことである。分析法の妥当性確認が目的である室間共同試験においては、抽出効率を一定にするため、抽出容器は標準手順書に記述されている容量のものを使うべきと考え、分析に必要な数のバイアル瓶を急遽購入することになった。さらに標準手順書によれば、バイアル瓶中のサンプルに水を加えて浸透した後、そのまま $3000 \times \text{g}$ 以上の遠心分離を行って水相を取るようになっていたが、このバイアル瓶が $3000 \times \text{g}$ に壊れずに耐えられるか不安があり、結局遠心分離は遠心管に移して行った。遠心分離に耐えられる容量40mLのバイアル瓶は欧州では一般的で、食品の分析を行っているどこのラボにもあるようなものなのかもしれないが、国が違うとそれが手に入りにくいということもある。この辺も国際的な室間共同試験を行う際には注意が必要な点である。

### 3.4 結果の提出

サンプルの受け取りが遅れたので、我々に関する分析結果提出の締め切りは1月いっぱいまで延期され、1月31日に指定された書式の表に数値を書き込んでEメール添付で提出した。書き込むべき情報は、各サンプルについて、分析日、GC-MS注入回数、定量限界、内標準のピーク( $m/z$  154)強度、アクリルアミドのピーク( $m/z$  151及び106)強度、アクリルアミド濃度であった。

分析結果とともに、質問票への記入も科されている。質問票の中身は下記のようなものであった。

- ・この分析手順に慣れているか。
- ・同じような分析法でアクリルアミドを分析したことがあるか。
- ・分析の各ステップで問題があったか。問題があった場合はそのサンプル番号とどんな問題があったのか。
- ・どのような型式の振とう機や遠心機を使用したか。
- ・GC-MSへの注入サンプルとなる酢酸エチル溶液は無色透明であったか。無色透明でなければどのサンプルがどうであったか。

- ・GC-MSへの注入サンプルとなる酢酸エチル溶液の濃縮方法。
- ・GC-MS装置の型式。
- ・標準手順書にあるGC-MSの分析条件を変更する必要があったか。
- ・GC-MSへの注入量。
- ・分析対象の保持時間とその安定性。
- ・各サンプルについてすべてのイオンを検出できたか。
- ・夾雑物の妨害はあったか。
- ・各イオンピークはベースライン分離していたか。
- ・分析対象イオンと確認用のイオンのピーク比は安定していたか。
- ・ピークの積分値の正確さをチェックしたか。
- ・標準手順書に従って較正用標準溶液を調製したか。
- ・標準溶液調製に使用したアクリルアミドのメーカーと純度。
- ・使用した内標準の種類とメーカーと純度。
- ・その他に標準手順書と異なる方法を用いた所はあるか。あるならばどこをどのようにしたのか。

さらに全般的なことについて、以下のような質問があった。

- ・標準手順書の記述は適切であったか。
- ・分析値について疑問が残るサンプルはあるか。あるならばその番号と理由。
- ・手順を説明するスライドやビデオがあればいいと思うか。
- ・標準手順書の方法についての助言はあるか。

分析結果と質問票はEメール添付で送付するが、分析したすべてのサンプルについて、 $m/z$  151, 154, 106のピークに関するクロマトグラムを印刷して郵送することを要求された。

#### 4. ECのアクリルアミド室間共同試験のまとめ

この食品中のアクリルアミドに関する国際室間共同試験のまとめは、2006年11月に発行されたJournal of Chromatography Aの1132巻211-218ページに掲載され<sup>9)</sup>、別刷が各参加者に送られた。

そのまとめの報告によると、EU内13カ国とそれ以外5カ国の合計64のラボに参加を呼びかけ、参加の意思表示があった32のラボにサンプルを送付し、そのうち25のラボが分析結果を返送したということである。その25のラボのうち、EU外からの参加は、米国、オーストラリア、中国、トルコ、日本から各1ラボずつであった。なお、LC-MS/MS法で分析を行ったのは16ラボ、GC-MS法で分析したのは9ラボであった。

試験はblind duplicate studyで行われ、それぞれのラボには各サンプルがペアで送られ、各ラボ内での分析値のばらつきがチェックできるようになっていた。よって分析サンプルは表1にあるように、ブランク2種、アクリルアミドを含む食

品サンプル10種、標準物質候補1種の合計13種類で、それぞれ約3gずつをバイアル瓶に分注して参加者へ送られていた。

#### 4.1 LC-MS/MS法について

LC-MS/MS法の標準手順書は図3に示すとおりであった。前処理において、混合相の固相抽出カートリッジ精製の後にもうひとつ固相抽出のステップを入れ、60%メタノールで溶出して濃縮を行うような改良がなされていた。

LC-MS/MSで分析を行った16ラボの分析結果について、Mandel's  $h$ を見たところ図4のようになった。このMandel's  $h$ は、あるサンプルについて各ラボの報告値の平均が全ラボの報告値の平均値からどれだけ離れているかを表す指標である。このグラフを見ると、各ラボの報告値の偏差はランダムではなく、どのサンプルに関しても正の方向または負の方向にそろって出がちな傾向が見られた。Mandel's  $h$ の他に、Mandel's  $k$ , Cochran's test, Grubb's testにより外れ値の検定を行った。いずれかの検定において外れ値と見なされたものは、表2のLC-MS/MS法による分析報告値のまとめの表においてグレイに色付けして示してある。16番のラボは、\*をつけたサンプルを分析した日にLC-MS/MS装置の調子がおかしかったと報告しており、それが外れ値を出した原因と思われる。標準物質候補ERM-BD272に関しては、サンプルや分析手法に由来する分析値の不確かさを報告値と認証値の差と比較して、外れ値を決定した。

外れ値を除外したものについて、繰返し相対標準偏差と空間再現相対標準偏差を計算した(表1)。バタービスケット(A)については、アクリルアミド濃度が低くて定量限界以下となった場合が多いため、繰返し相対標準偏差と空間再現相対標準偏差を算出できなかったが、その他の場合においてはこれらの精度パラメータはすべて1以下となり、Horwitzの式による相対標準偏差よりも小さく、精度はよいという結果が得られた。なお、ベーカリー製品の繰返し相対標準偏差(0.3-0.5)はジャガイモ製品(0.5-0.8)に比べて小さかった。

分析値の真度については、マッシュポテト粉のアクリルアミド添加品(添加レベル500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )及び標準物質候補ERM-BD272(アクリルアミド濃度980 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )の報告値の平均から評価したところ、偏りはないという結果が得られた。よって、このLC-MS/MS法は、ベーカリー製品やじゃがいも製品のアクリルアミド分析において、精度、真度ともに良い方法であると言えた。

#### 4.2 GC-MS法について

GC-MS法では9つのラボが結果を返したにもかかわらず欠測値があり、また報告値の変動も大きかった(表3)。22番のラボは、トリメチルアミンで脱HBrをした後の2-プロモプロペンアミドの検出が困難で、その操作を行った場合は欠測値となっており、報告値はトリメチルアミン処理を省いての分析結果である。

表1 分析サンプルとLC-MS/MS法及びGC-MS法による分析結果

サンプル内容	LC-MS/MS					GC-MS				
	付与値 ( $\mu\text{g/kg}$ )	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Ho <sub>r</sub>	Ho <sub>R</sub>	全体の 平均値 ( $\mu\text{g/kg}$ )	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Ho <sub>r</sub>	Ho <sub>R</sub>
白パン粉	ブランク									
マッシュポテト	ブランク									
バタービスケット(A)	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
トースト	38	5.5	8.5	0.3	0.3	-	-	-	-	-
バタービスケット(B)	96	7.8	11.8	0.5	0.5	82	18.2	30.8	1.2	1.3
スパイスビスケット	249	3.7	10.4	0.3	0.5	218	5.7	27.4	0.4	1.4
ポテトチップ特別調製品(A)	324	6.0	12.7	0.5	0.7	563	81.9*	81.9*	7.1*	4.7*
マッシュポテト粉の アクリルアミド添加品	500	5.4	8.8	0.5	0.5	562	6.6	7.7	0.6	0.4
ポテトチップ市販品(A)	628	8.9	13.2	0.8	0.8	768	27.4*	27.4*	2.5*	1.6*
クリスプブレッド (標準物質候補ERM-BD272)	980	3.1	5.4	0.2	0.3	-	-	-	-	-
ポテトチップ特別調製品(B)	2512	5.9	11.7	0.6	0.8	-	-	-	-	-
ポテトチップ市販品(B)	4051	4.3	8.9	0.5	0.7	-	-	-	-	-
ポテトチップ特別調製品(C)	9082	5.0	9.1	0.7	0.8	-	-	-	-	-

RSD<sub>r</sub>: 繰返し相対標準偏差, RSD<sub>R</sub>: 空間再現相対標準偏差, Ho<sub>r</sub>: 繰返し精度についてのHor<sub>r</sub>,  
\*RSD<sub>r</sub>がRSD<sub>R</sub>より大きかったので, RSD<sub>R</sub>をRSD<sub>r</sub>のレベルとみなした。

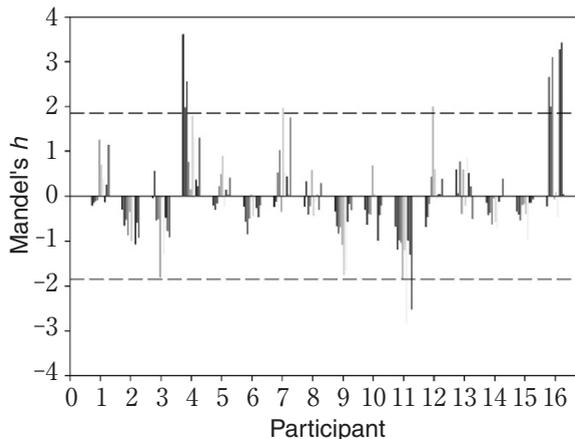


図4 LC-MS/MS分析における全サンプルセットについてのMandel's hパラメータ<sup>9)</sup>  
破線は危険率有意水準5%における限界を示す。

表2 LC-MS/MS法による分析報告値<sup>9)</sup>

Participant	Blank - white bread crumb		Blank - mashed potato powder		Butter biscuits (A)		Toasted bread		Butter biscuits (B)		Spiced biscuits		potato crisps (A)	
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
1	<LOD	4	<LOQ	<LOQ	15	15	39	39	100	101	261	273	330	344
2	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	35	39	81	97	232	247	304	260
3	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	14	40	41	44	130	103	245	231	333	279
4	198	224	<LOQ	<LOQ	31	27	121	109	146	150	438	448	464	331
5	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	15	15	39	39	89	105	259	268	370	347
6	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	15	<LOD	39	38	89	93	250	189	299	317
7	<LOD	<LOD	50	40	8	12	41	36	99	103	320	297	418	414
8	<LOD	<LOD	<LOD	30	15	15	37	40	108	114	241	253	324	331
9	<LOD	<LOD	<LOD	10	15	16	38	35	88	90	222	218	286	302
10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	17	<LOD	37	37	85	94	238	257	334	293
11	<LOD	<LOD	4	5	12	13	30	30	77	78	210	210	270	270
12	<LOD	<LOD	12	78	16	15	25	34	91	96	264	261	351	398
13	<LOD	80	<LOD	<LOD	<LOD	20	70	40	130	80	260	390	310	320
14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15	12	42	39	96	93	243	257	304	293
15	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	15	16	36	37	96	93	243	234	338	320
16	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	16	16	36	42	221	106	263	548*	821*	311

Participant	Spiked mashed potato powder		Commercial Potato crisps (A)		Crispbread (CRM;980 ± 90µg / kg)		potato crisps (B)		Commercial Potato crisps (B)		potato crisps (C)	
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
1	528	534	662	723	1006	1019	2620	2491	4229	4577	9915	10107
2	458	479	545	532	934	908	2070	2040	3690	3820	6590	9150
3	417	407	695	557	865	881	2558	2184	3782	3459	7669	8099
4	493	483	744	842	1090	1090	2879	2772	4368	4436	10030	10320
5	487	515	752	669	984	937	2671	2734	4280	4217	9176	9319
6	512	455	567	610	989	961	2374	2598	3953	3767	7769	9454
7	449	488	819	799	977	1070	3113	2619	4113	4379	10242	11042
8	507	503	620	557	957	983	2561	2715	4105	3876	8727	9511
9	439	442	288	650	860	827	2205	2434	4066	4118	8610	8391
10	520	497	666	599	937	947	2050	2143	3924	3858	8685	8526
11	410	410	520	520	750	740	2100	2100	3200	3200	6300	6100
12	545	574	638	730	968	982	2585	2708	4398	4132	9190	9249
13	550	460	690	530	1060	1040	2750	3060	4070	4730	8790	7800
14	486	474	570	582	925	917	2575	2550	4215	4230	9080	9360
15	477	474	609	575	902	899	2520	2580	4050	4190	8880	8640
16	474	485	611	663	891	992	2655	6160*	9470*	4482	8749	8986

グレイのセルは外れ値, <LOD; 検出限界以下, <LOQ; 定量限界以下.

\*分析時に機器に問題があったと報告されている。

表3 GC-MS法による分析報告値<sup>9)</sup>

Participant	Blank white bread crumb		Blank mashed potato powder		Butter biscuits (A)		Toasted bread		Butter biscuits (B)		Spiced biscuits		potato crisps (A)	
	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg
21	4	5	6	5	27	24	30	39	112	103	234	230	452	496
22	10	29	27	10	25	32	41	35	46	90	315	227	×	×
23	9	6	13	14	20	20	44	43	51	81	92	98	323	375
24	12	49	<LOQ	<LOQ	17	<LOQ	49	<LOQ	<LOQ	46	37	233	324	1522
25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	37	39	94	96	280	281	505	405
26	41	32	40	26	14	13	48	40	129	108	240	276	479	413
27	<LOQ	<LOQ	25	96	<LOQ	<LOQ	55	<LOQ	85	93	207	221	475	299
28	8	9	13	7	22	10	26	28	58	73	216	226	2430	1401
29	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	21	22	53	53	212	235	1525	300

Participant	Spiked mashed potato powder		Commercial Potato crisps (A)		Crispbread (CRM;980 ± 90μg / kg)		potato crisps (B)		Commercial Potato crisps (B)		potato crisps (C)	
	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg	μg/kg
21	537	526	766	751	814	841	3460	4250	3930	3230	9500	10200
22	508	583	703	534	×	×	2293	1378	×	×	4401	×
23	529	534	643	683	933	989	×	×	×	×	×	×
24	1005	312	608	1098	nq	<LOQ	8884	nq	7449	5696	16859	22164
25	573	539	758	780	793	910	3070	2920	5080	5940	10400	10070
26	652	571	700	737	1066	1018	2739	2470	3018	3696	8327	7194
27	371	383	534	×	820	980	2285	2502	3159	3143	8895	11676
28	586	623	2312	2153	1003	978	5908	5430	7979	7089	13081	13746
29	543	562	1290	702	1054	1138	3946	4417	6343	8246	9930	11989

グレイのセルは外れ値, ×: 欠測値, <LOD: 検出限界以下, <LOQ: 定量限界以下, nq: 定量不能

なお、食品総合研究所のラボ番号は21番であり、どの分析値も妥当な値であった。

室間共同試験の結果の解析に有効とされている8カ所以上からの報告値が得られたサンプルのみについてデータ解析を行い、外れ値を除いたものについてLC-MS/MS法による結果と比較した(表1)。LC-MS/MS法とGC-MS法では、どちらかの報告値が低いとか高いというような一定の傾向は見られなかったが、マッシュポテト粉のアクリルアミド添加品の場合を除いて、繰返し相対標準偏差も室間再現相対標準偏差もGC-MS法の方がLC-MS/MS法よりも大きかった。

今回の室間共同試験におけるGC-MS法の結果からは信頼性のある精度パラメータの推定は不可能と判断された。しかしこれがすなわち、このGC-MS法では信頼のおける分析値が得られないということではなく、これまでのプロフィシエンシテスティングの結果からは、きちんとした分析値を出せるラボがあることが示されている。今回のGC-MS法による結果が思わしくなかったのは、LC-

MS/MSに比べて前処理の手順が多いにも関わらず、要所で押さえておくべき事柄が十分に標準手順書に記載されておらず、前処理をうまく行えなかったラボがあったことが一番の原因であろう。また、もともと参加ラボ数が少なかった上に、GC-MS装置のトラブルにより外れ値を報告したラボもあり、妥当な結果を報告できたラボ数はかなり少なくなってしまった。

## 5. 最後に

国際室間共同試験に参加してみて、サンプルの受け取りに通関手続きが必要だったり、標準手順書で日本では一般的ではない分析器具の使用を求められたり、思わぬ手間がかかって若干とまどう場面もあったが、良い経験になった。これは今後、当研究所で室間共同試験を行う際に役立つと思われる。また、いつも行っている分析法とは異なる方法で分析する必要がある、やや不安もあったが、結果として満足のゆく分析値が出せていることが確認できた。

しかし、GC-MS法は参加ラボ数が少なくても妥当な分析値を報告できるラボが少なく、きちんと分析法の妥当性確認ができる結果とならなかったのは残念であった。GC-MS法はLC-MS/MS法に比べて前処理は複雑であるが、使用する分析機器が安価でより多くのラボでの実施が可能である。標準手順書の改善と誘導体化GC-MS法に慣れた多くのラボが参加することにより、この方法の妥当性確認は可能であると感じている。

(食品分析研究領域 状態分析ユニット 吉田 充, 小野 裕嗣)

## 参考文献

- 1) 吉田充, 調理食品中のアクリルアミド, 食糧, 42, 97-109 (2004).
- 2) 食品総合研究所, <http://aa.iacfc.affrc.go.jp>.
- 3) Rosén, J. and Hellenäs, K., Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Analyst*, 127, 880-882 (2002).
- 4) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Törnqvist, M., Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4998-5006 (2002).
- 5) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課, 水道用薬品類の評価のための試験方法ガイドライン, pp.34-36 (2000).
- 6) 吉田充, 小野裕嗣, 亀山真由美, 忠田吉弘, 箭田浩士, 小林秀誉, 石坂真澄, 日本で市販されている加工食品中のアクリルアミドの分析, 食科工, 49, 822-825 (2002).
- 7) Wenzl, T., Beatriz de la Calle, M. and Anklam, E., Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review, *Food Addit. Contam.*, 20,

885-902 (2003).

- 8) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).
- 9) Wenzl, T., Karasek, L., Rosen, J., Hellenaes, K., Crews, C., Castle, L., and Anklam. E., Collaborative trial validation study of two methods, one based on high performance liquid chromatographytandem mass spectrometry and on gas chromatographymass spectrometry for the determination of acrylamide in bakery and potato products. *J. Chromatography A*, **1132**, 211-218 (2006).



## 2. 定 性 法

### ① GMO 定性検知法の妥当性確認

#### 1. はじめに

1996年に遺伝子組換え技術を利用した（GM; Genetically Modified）農産物の商業栽培が開始されてから、既に10年以上が経過した。この間、GM農産物の生産は毎年増加し続け、生産国も当初の6カ国から22カ国に、また耕作面積も60倍に増大し、承認を受けたGM農産物の耕作面積は2006年の段階で一億ヘクタールを上回った<sup>1)</sup>。わが国においても安全性審査を終了し商業利用が可能なGM農産物は、2008年2月現在88品種を数える（表1）。この技術の産業利用について社会的合意を得るための一つ的手段として、2001年から表示制度が導入されている。しかしながら、現在市場を見渡してみても、「遺伝子組換え体不使用」の表示が大勢を占めこの技術の受け入れが進んでいるとは言い難い状況にある。これは、表示制度の導入に際し、消費者の関心の高さから小売業者が組換え体由来の食品の販売に消極的になったこともその一因であると考えられる。現在、多くの食品企業が調達している非遺伝子組換え（non-GM）農産物であるが、適切な分別生産流通管理（Identity Preserved Handling; IPハンドリング）を行うことが必要である。しかし、米国、カナダ等からの輸入の場合、現状の流通制度から組換え体の意図しない混入は避けられない。そこで、わが国ではIPハンドリングを実施しても非意図的に混入してくる組換え体の許容限度を設け、ダイズ、トウモロコシについては最大5%としている。そのようななかで、農林水産省及び厚生労働省は、新たに導入した表示制度を監視するGM農産物の検査技術を必要とした。これはまた、企業が自ら調達したnon-GM農産物の品質管理を行うために必要な技術でもあった。このようなことを背景にGM農産物の検知技術の開発が進展し、それと並行して国際基準の策定作業も進んできた。わが国では、食品総合研究所等を中心とするグループにより新しいGM農産物検知技術が開発され、「標準分析法」として「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」＜改訂第2版＞<sup>2)</sup>及び「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」<sup>3)</sup>に掲載されている。この分析法を使用して、農林水産省、厚生労働省がモニタリングを実施しており、これにより表示の適切性の管理も行われている。本稿においては、開発された定性検知法について、実際の試験結果等についても言及しながら試験室間共同試験による妥当性確認の概説を行う。

表1 わが国で食品用として商品化が可能なGM農作物の現状

2008. 2 現在

GM農作物の種類計 88件	種類数
除草剤の影響を受けないダイズ	4
オレイン酸高生産ダイズ	1
除草剤の影響を受けないトウモロコシ	5
害虫（ガの仲間）に強いトウモロコシ*1	6
害虫（ガの仲間）に強い及び除草剤の影響を受けないトウモロコシ*2	23
高リシントウモロコシ	1
害虫（ガの仲間）に強い及び高リシントウモロコシ*3	1
害虫（甲虫類）に強いジャガイモ	2
害虫（甲虫類）に強い及びウイルスに強いジャガイモ	6
除草剤の影響を受けないテンサイ	3
除草剤の影響を受けないナタネ	13
除草剤の影響を受けない雄性不稔ナタネ	1
除草剤の影響を受けない稔性回復ナタネ	1
除草剤の影響を受けないワタ	6
害虫（ガの仲間）に強いワタ	3
害虫（ガの仲間）に強い及び除草剤の影響を受けないワタ*4	9
除草剤の影響を受けないアルファルファ*5	3

\*1：1種はすでに安全性審査済みの2種類の害虫に強いトウモロコシの後代交配種

\*2：16種はすでに安全性審査済みの害虫（ガの仲間）に強いトウモロコシと除草剤の影響を受けないトウモロコシの後代交配種

\*3：1種はすでに安全性審査済みの害虫（ガの仲間）に強いトウモロコシと高リシントウモロコシの後代交配種

\*4：7種はすでに安全性審査済みの害虫（ガの仲間）に強いワタと除草剤の影響を受けないワタの後代交配種

\*5：1種はすでに安全性審査済みの2種類の除草剤の影響を受けないアルファルファの後代交配種

出典：厚生労働省医薬食品局食品安全部「安全性審査の経た遺伝子組換え食品及び添加物一覧」  
<http://www.mhlw.go.jp/topics/idenshi/dl/list.pdf>

表2 遺伝子組換え食品の表示

分類		表示例	表示	
従来のもと組成，栄養価等が著しく異なるもの（高オレイン酸大豆・高リシンとうもろこし）		「大豆（高オレイン酸遺伝子組換え）」等	義務表示	
従来のもと組成，栄養価等が同等のもの				
①	加工後も組換えられたDNAまたはこれによって生じたタンパク質が残存する加工食品			
	i	遺伝子組換え農産物を原材料とする場合	「遺伝子組換えのものを分別」等	義務表示
	ii	遺伝子組換えのものと非遺伝子組換えのものが分別されていない農産物を原材料とする場合	「遺伝子組換え分別」等	義務表示
	iii	生産・流通段階を通じて分別された非遺伝子組換え農産物を原料とする場合	表示不要(当該対象農産物の名称のみ)「遺伝子組換えでない」等可能	任意表示
②	加工後に組換えられたDNA及びこれによって生じたタンパク質が残存しない加工食品（大豆油，醤油，コーン油，異性化液糖等）		表示不要(当該対象農産物の名称のみ)「遺伝子組換えでない」等可能	任意表示

## 2. GMOの現状

### (1)わが国の食品安全性規制

遺伝子組換え技術を用いた食品または添加物としての利用は，長い人類の食経験からすると短い。従って，この技術を用いて製造される食品及び添加物については，その安全性について十分配慮する必要がある。食品としての安全性評価については1991年に「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」を策定し，開発者等が自主的に提出する安全性評価資料を食品衛生調査会が審査を行い，厚生大臣が指針適合確認を行うという形を取っていた。1996年にはGM食品（7品種）の安全性を初めて確認し，わが国におけるGM食品の商品化の端緒となった。しかしながら，社会的な関心の高さや，国際的な組換え技術応用食品の開発・実用化の進展に合わせて，安全性を審査していないものが国内で流通しないようにするために，2001年4月からは食品衛生法のもと安全性評価基準に基づく審査が義務づけられた。その後，2003年7月の食品安全委員会発足に伴って，GM食品のリスク評価は，同委員会のもとに設置された「遺伝子組換え食品等専門調査会」が担当することとなった。同年9月から同専門調査会が活動を開始し，同委員会としての安全性評価基準の策定を進め，安全性評価の審査を開始している。前項で述べたように，現在88品種の食品としての安全性評価が終了している。

### (2)わが国における遺伝子組換え食品の表示概要

遺伝子組換え農産物含有可能食品について、「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS法）」の「遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準<sup>4)</sup>」に基づき、表示の義務化が2001年4月から導入された。同様の表示義務は食品衛生法によっても課されている。表示義務の対象となるのは、大豆、とうもろこし、ばれいしょ、なたね、綿実、アルファルファ、てん菜の7種類の農産物と、これを原材料とし、加工工程後も組換えられたDNAまたはこれによって生じたタンパク質が検出できる加工食品32食品群及び高オレイン酸遺伝子組換え大豆、高リシン遺伝子組換えとうもろこし及びこれを原材料として使用した加工食品（大豆油等）である。表示の概要は表2に示したとおりである。高オレイン酸大豆のように、従来のものと組成、栄養価等が著しく異なるものについては表示義務が課されている。従来のものと組成、栄養価等が同等のものに関しては、加工後も組換えられたDNAまたはこれによって生じたタンパク質が残存する加工食品が表示の対象となっている。さらに、対象加工食品は表中の i, ii, iiiの3つに分類されている。遺伝子組換え農産物を原材料とする場合は、「遺伝子組換え」等と表示することが義務づけられている（i）。また、遺伝子組換えのものと非遺伝子組換えのものが分別されていない農産物を原材料とする場合は「遺伝子組換え不分別」等と表示することが義務づけられている（ii）。一方、IPハンドリングされた非遺伝子組換え農産物を原料とする場合には、表示義務はないが、任意で「遺伝子組換えでないものを分別」等の表示が可能である（iii）。加工後に組換えられたDNAおよびこれによって生じたタンパク質が残存しない大豆油、醤油、コーン油、異性化液糖等は表示が不要であり、表示を行うのは任意となっている。

### (3)GM作物の検知技術と標準分析法

組換えDNAの科学的検知技術としては、ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction; PCR）法によるDNA分析や、標的とするタンパク質に特異的な抗体を用いた酵素免疫測定（Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA）法やラテラルフロー法がある。このうち、抗原抗体反応に基づくELISA法等の手法は検知するタンパク質が加工工程中に変性してしまえば検査することが困難であり、標的とするタンパク質に特異的な抗体の生産が必要である。GM農産物の開発企業等では、商品化に合わせて当該系統で発現するタンパク質を検査するキットとして、ELISAまたはラテラルフローを販売している場合が多い。一方でPCR法は、食品や飼料のような複雑な成分を含む対象物からでも精確に検出でき、DNAの分解が起きていなければ定量することも可能であるため、世界中で多くの検知技術開発が行われるようになった。PCR法による検知技術は、わが国の「標準分析

法」にも数多く採用されており、その主体をなしている。本稿においては、このうちPCR法に基づく定性検知法について取り上げる。

### 3. 妥当性確認の必要性

食品を含む物流のグローバル化が進行し、食品供給の広域化・多様化はとどまるところを知らない。また、様々な加工食品の開発も進み、食料供給の仕組みそのものも大きく変貌を遂げている。このようななか、食品の供給者は、食品の情報を的確に消費者に伝えることが、従来にも増して強く求められている。行政においては食品のリスク管理を厚生労働省と農林水産省が担当しているが、食品の供給者と同様に、管理者である行政も、品質や来歴の科学的検証に求められる要件を整理・理解し、その手法を使いこなすことが望まれてきている。食品の品質を保証するための分析は、科学技術の進展により、著しい進歩を遂げてきた。そして、食品検査の分析法に妥当性確認が欠かせないという認識も、国際機関、食品業界そして行政部局をはじめとする関係者にも広がっている。世界最大級の食料輸入国であり、また食品産業の発展著しいわが国では、妥当性確認のなされた分析法によって食品分析を行っていくことが今後さらに望まれていくことは確実である。規制を伴うGM食品の表示において、信頼のおける検査結果を得ることは必要不可欠であり、そのためにも妥当性確認のなされた検査法を提供することは重要な課題である。

### 4. 定性分析法の妥当性確認のための試験室間共同試験

分析法の妥当性確認の方法として最も望ましいのは試験室間共同試験（以下、共同試験）であり、英語ではinterlaboratory test, collaborative study, ring trial testなどと呼ばれている。定量分析法と異なり、定性分析法の妥当性試験のあり方については、現在のところ国際的に合意されたガイドラインは存在しない。しかし、AOACの定めたガイドライン<sup>5)</sup>中に国際的に合意されたガイドラインに含まれない旨但し書きもあるが、定性分析法の共同試験に関する記載もある。また、McClureの論文<sup>6)</sup>を参考にした定性分析法の共同試験も報告されている。本項においてこれらを参考に、定性分析法の共同試験の要件の概要を記す。また、共同試験において注意すべき一般的な要件等も一部記すが、詳細については他書<sup>7)</sup>を参照にされたい。

#### (1)共同試験における定性分析法の特徴

分析種を含まない（陰性）試料と、有意の量を含む（陽性）試料を区別できる必要がある。また、定量分析法よりも統計解析に必要な一濃度当たりの反復試料数が一般に多くなる。

## (2)定性分析法の共同試験に必要な試験室数と試料数

AOACのガイドラインによれば、参加試験室数は少なくとも10試験室以上とし、1試験室当たり、陽性であると既知の試料6反復、陰性であると既知の試料6反復が最小規模となるとしている。また、McClureによれば参加試験室数は、最低10試験室以上とし、かつ $362 \leq Lm^2$  (L:参加試験室数, m:1濃度レベルの試料数)となることが望ましいとしている。

## (3)外れ値検定

実施機関に集められた各参画試験室の判定結果について、外れ値検定を行い無効試験室の棄却を行う。このとき用いる外れ値検定はCochranのQ検定<sup>8)</sup>であり、他の試験室と正解率が異なる機関の有無を検出するものである。

## (4)定性分析法の精度指標 (Performance Indicator Rate; PIR)

定量分析法の繰り返し精度 (repeatability)、室間再現精度 (reproducibility) の代わりに、定性分析法では互いに関連のある感度 (sensitivity)、特異性 (specificity)、偽陽性率 (false positive rate)、偽陰性率 (false negative rate) の4種類の精度指標に関して解析を行う。

## 4 指標の定義

- ・ 感度, sensitivity rate (p+)
  - 陽性 (positive) であると既知の試料を陽性と判断した比率
  - $= N_{pp} / (N_{pp} + N_{pn})$
- ・ 特異性, specificity rate (p-)
  - 陰性 (negative) であると既知の試料を陰性と判定した比率
  - $= N_{nn} / (N_{np} + N_{nn})$
- ・ 偽陽性率, false positive rate (pf+)
  - 陰性であると既知の試料を陽性と判定した比率
  - $= 1 - N_{nn} / (N_{np} + N_{nn})$
- ・ 偽陰性率, false negative rate (pf-)
  - 陽性であると既知の試料を陰性と判定した比率
  - $= 1 - N_{pp} / (N_{pp} + N_{pn})$

## (5)検出限界 (Limit of Detection; LOD)

GM農作物の分析のための一般原則について書かれているISO 24276<sup>9)</sup>では、定性分析法においてLODは偽陰性率が5%以下である最低濃度と規定されている。

### (6) 参画試験室及び分析者

分析者は1試験室1名と規定されているため、同一機関に複数の試験を依頼する必要が生じた際には、(物理的、品質管理的に)異なる試験室を使用する必要がある。また、参画試験室同士が共同試験実施中に連絡を取り合わないよう、参画試験室名、分析者に関する情報は開示してはならない。

### (7) ブラインド試料

分析法の妥当性確認のための共同試験には、認証標準物質 (Certified Reference Material; CRM) を使用することが望ましい。しかしながら、GM農産物分析法に関しては、必ずしも望ましいCRMが提供されているわけではない。このため、筆者等のグループではこれまで共同試験の実施に際しては、CRM製造と同等の品質管理を行いながらダイズ、トウモロコシ種子粉砕物の混合試料を製造、配付してきた。さらに、2007年には国際規格 (ISO Guide 34: 2000 (JIS Q 0034: 2001) 及び (ISO/IEC 17025:2005 (JIS Q 17025: 2005) に基づいた標準物質生産者としての認定を取得し、GM農産物分析法のためのCRM製造・配付を計画している。

GM食品分析における定性PCR法では、試料中のGM農産物の混入の有無は、電気泳動に供したPCR産物を、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外光照射下により目視で確認することで判断している (図1)。この際、目的とするバンドが不明瞭な場合が予想されるが、そのような場合は、陽性対照、陰性対照の試料の検査結果が妥当であることを確認の上、実験の再試行を検討する必要がある。また、サーマルサイクラーの性能、増幅DNAの有無を検出する方法等について事前に十分に調査し、更には一般的に使用されているゲル電気泳動による判定の

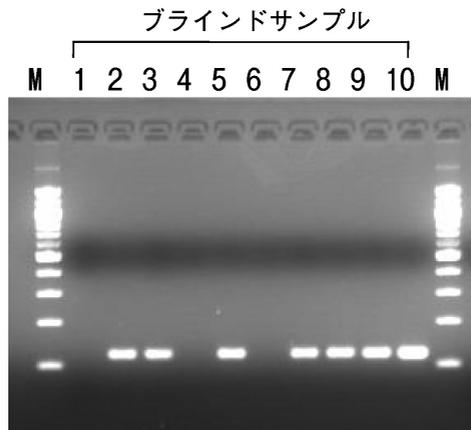


図1 電気泳動におけるRRSのバンドの有無による判定例

表3 組換えダイズ検知用プライマー対\*

対象遺伝子	記号	増幅長	増幅部分	備考
内在性遺伝子 <i>Lel</i> 用	Lel-n02	118 bp	<i>Lel</i>	
組換え遺伝子 p-35S用	P35S-1	101 bp	P-35S	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外のCMVに感染した植物等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 NOS-ter用	NOSter-2	151 bp	NOS-ter	このプライマー対は遺伝子組換え農産物以外の土壌細菌等の混入によっても増幅を示すので結果の判定に注意すること
組換え遺伝子 RRS用	RRS-01	121bp	CTP4from <i>P. hybrida</i> - CP4EPSPS 間	

\* 独立行政法人食品総合研究所、アサヒビール株式会社及び日本製粉株式会社により、特許出願中である。

出典：遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

場合は、写真撮影装置の感度等についても考慮した上で、分析法の詳細な手順書を（報告様式等を含める）を作成する必要がある。また、分析に使用する機器の限定等についても検討しておく必要があり、複数機種を対象とする場合には、機種ごとに必要な部分も考慮の上、共同試験手順書を作成する。

## 5. RRS定性検知法

食品総合研究所等を中心とするグループによりGM農産物分析技術が開発され、「標準分析法」としてその詳細がJASハンドブック<sup>2)</sup>、及び厚生労働省の「組換えDNA技術応用食品の検査法について」<sup>3)</sup>に掲載されていることは前述したとおりである。本項では、遺伝子組換え食品分析のための試験法のなか、PCR法による組換え遺伝子の定性検出法についてJASハンドブックから概要を抜粋し以下に記す。詳細についてはJASハンドブックを参照のこと。

### (1)試験における一般事項

PCRでは、微量の鋳型DNAであっても増幅されるので目的外のDNA（特にPCR産物）の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐために、人間の皮膚表面等から分泌されているDNaseの混入を防止しなければならない。そのため、JASハンドブックのコンタミネーション防止編を参照し、適切な操作を行うことが必要である。

表4 PCR溶液の組成

	液量 / tube	終濃度
滅菌水	15.375 $\mu$ L	
AmpliTaq™ Gold	0.125 $\mu$ L	0.625U
10x PCR bufferII	2.5 $\mu$ L	1 x
dNTP (2mmol/Leach)	2.5 $\mu$ L	200 $\mu$ mol/Leach
MgCl <sup>2</sup> (25mmol/L)	1.5 $\mu$ L	1.5 mmol/L
プライマー対 (25 $\mu$ mol /Leach)	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ mol/Leach
鋳型DNA (10ng/ $\mu$ L)	2.5 $\mu$ L	25ng
全量	25 $\mu$ L	

出典：遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

表5 PCR温度条件

	温度	時間	サイクル数
最初の変性	95℃	10 min	1 サイクル
変性	95℃	30 sec	40 サイクル
アニーリング	60℃	30 sec	
伸長反応	72℃	30 sec	
最後の伸長反応	72℃	7 min	1 サイクル
保存	4℃		

出典：遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル

## (2)DNA抽出

シリカスピнкаラムを使用した方法、イオン交換カラムを使用した方法または、CTABを使用した方法によりDNAを抽出する。JASハンドブック中では、シリカスピнкаラムを使用した方法としてQIAGEN社DNeasy Plant Maxi kit、イオン交換樹脂カラムとしてQIAGEN社Genomic tip 20/Gを使用した方法が示されているが、これらに限定するものではない。但し、同程度の品質のDNAが抽出できることを確認した上で試験を行わなければならない。

抽出後のDNA溶液はTE緩衝液を加えて希釈し、200~300 nmの範囲で紫外吸収スペクトルを測定し、230、260及び280 nmの吸光度を測定する。これは、DNAは、230 nmで吸収極小を示し、260 nmで吸収極大を示し、またタンパク質等不純物は、280 nm付近に吸収を示すことによるものである。1 O.D. 260 nmを50 ng/ $\mu$ l DNA溶液としてDNA濃度を算出し、滅菌水によりPCR用の溶液を調整する。

## (3)PCR増幅及びゲル電気泳動

抽出DNAを鋳型として、JASハンドブックの記載に従いPCRを行う。JASハンドブックにおいてはサーマルサイクラーとしてMJ Research社PTC-200

DNA Engine, 宝酒造(株)製 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP, Applied Biosystems 社 GeneAmp system 9700 (昇温モード:MAX), またはこれらの機器を用いて行った PCR の結果と同等であるもの, との指示がある。JAS ハンドブックに記載されている組換えダイズ検知用プライマー対は表 3 の通りである。また, PCR 溶液の組成及び温度サイクルはそれぞれ表 4 及び表 5 に記したとおりである。

ダイズについては, 適用範囲は遺伝子組換えダイズ RoundupReady<sup>®</sup> Soy (RRS) (40-3-2 系統) の特異的検知である。

反応終了後の試料は冷蔵或いは冷凍保存をするか, 或いは直ちに電気泳動を行う。電気泳動は, 「前染色によるゲル電気泳動」または, 「後染色によるゲル電気泳動」を行う。泳動後のゲルはトランスイルミネーター上にて紫外線を照射し, CCD カメラによる撮影で泳動パターンを確認し, DNA 分子量マーカーと比較して目的のバンドが得られたか確認する。

#### (4)結果判定

PCR の成否を, ネガティブコントロールでバンドがみられず, ポジティブコントロールから予想される長さのバンドが見られることで確認する。ダイズ用標準プラスミドとして「GM ダイズ (RRS) 陽性コントロールプラスミド」が市販されているので, PCR 反応のポジティブコントロール, 及び遺伝子組換え農産物検知の判定のためのポジティブコントロールとして使用する。

結果の判定は目的の PCR 産物の有無を電気泳動結果から判定して行う。すなわち, 内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られ, かつ遺伝子組換え農産物に対応する長さの PCR 産物が得られた場合, 遺伝子組換え農産物が検出されたとする。

尚, 内在性遺伝子に対応する PCR 産物が認められない試料については, 既に抽出している DNA 溶液を用いて, 再度 PCR を行う。それでも, 内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は, 再度 DNA の抽出を行い, PCR を行う。それでも, 内在性遺伝子に対応する長さの PCR 産物が得られない場合は, 「検出不能」とする。

## 6. 定性分析法の試験室間共同試験例

今回, GM ダイズ (RRS) について, PCR 法を用いた定性検知技術の分析法としての妥当性確認試験を行ったので, その結果を本項に示す。

### (1)共同試験の流れ

GMO 定性分析は, 大きく「サンプリング」, 「DNA 抽出 (前処理)」及び「PCR (電気泳動を含む)」操作の 3 段階に区分できる。本共同試験では, 「DNA 抽出」及び「PCR」操作について, 妥当性を検証した。また, 本共同試験は, 「画像最

適化試験]、「PCR装置最適化試験]、「プレテスト」及び「ブラインド試験」の4試験からなるが、本項においては、「ブラインド試験」の結果についてのみ述べる。定性分析法の妥当性試験の設計については定量試験と異なり、現在のところ国際的なガイドラインは存在しない。また、上述のようにJ.AOAC Int.にはMcClureの報告を参考にした共同試験が報告されている。そこで、McClureの報告を参考にしてブラインド試験を計画した。

## (2)共同試験の実施

参加試験室：本共同試験には国内の14試験室が参加した。McClureは、参加機関数は10機関以上で、かつ $362 \leq Lm^2$ （L：参加機関数，m：1濃度レベルの試料数）となることが、望ましいと述べている。本共同試験では、 $L = 14$ ， $m = 6$ すなわち、 $Lm^2 = 504$ （ $> 362$ ）であり、この要件を十分に満たすものであった。

試料：GMダイズ（RRS）種子は、開発企業（MonsantoCo.）より入手し、Non-GMダイズ種子は、IPハンドリングされたダイズを入手した。GMダイズは、3濃度（重量比：0, 0.05, 0.1%）含有するようにnon-GMダイズの粉碎物と混合し、共同試験用の均一な試料（ブラインド試料）を作製した。

試薬：プライマー及びポジティブコントロール用プラスミドは、JASハンドブックに記載のものを購入、配付した。

DNAの抽出：DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN社製）を用いたDNA抽出法を新たに開発して用いた。

PCR：ダイズ内在性遺伝子（soy lectin (*Lel*））検知用プライマー対とRRS検知用プライマー対を用いた2検知系によりPCRを行った。PCR反応液組成及びPCR温度条件は、JASハンドブックに従った。尚、参加試験室のPCR機器は各試験室が検査等に通常使用しているものを用いた。

ブラインド試験：各参加試験室へ3濃度のGMダイズブラインド試料（0, 0.05, 0.1%）を各濃度6点ずつ配付した。各機関は予め配付されたプロトコルに従い、DNA抽出、及びPCR反応を行い、内在性遺伝子（*Lel*）及びRRS配列の検出を行った。

統計解析：McClureの報告に従って、集められた各機関の判定結果について、外れ値検定（CochranのQ検定を用いて、他の機関と正解率が異なる機関の有無を検出する）を行って無効機関の棄却を行った。その後、定性分析法の4つの精度指標（感度、特異性、偽陰性率、偽陽性率）を算出した。

## (3)共同試験結果

試験室間共同試験には国内の14試験室が参加した。ダイズ内在性遺伝子*Lel*検知系を用いたPCR反応では、全ての試験室において全試料から期待された増幅長のPCR産物が得られた。これにより、配付した全ての試料からPCRに適した

表6 RRS定性分析法の精度指標

試料濃度	感度	特異性	偽陽性率	偽陰性率
0.05%	94.0%	100.0%	0.0%	6.0%
0.1%	97.6%		0.0%	2.4%

DNAが抽出されることが確認された。

RRS検知系を用いたPCRを行い、試料中のGMダイズRRSの混入の有無について分析した。CochranのQ検定 ( $\alpha = 0.05$ ) を実施した結果、他の試験室と正解率が異なる試験室（棄却試験室）は存在しなかった。

GMダイズに対する定性PCR法の感度、特異性、偽陽性率及び偽陰性率は表6に示すとおりであり、0.05%試験区より0.1%試験区の方が良好な値を示した。0.1%試験区の偽陰性率は2.4%であり、ISOにおける定性分析法の検知下限の基準である5%より小さい値であった。従って、本分析法の検知下限は0.1%程度であることが示された。

以上の通り、GMダイズ（RRS）の定性分析法について妥当性が検証された。

## 7. おわりに

遺伝子組換え技術は日々進歩しており、GM農産物の生産は毎年増加し続けているが、現在わが国の市場を見渡してみても「遺伝子組換え体不使用」の表示が大勢を占めこの技術の受け入れが進んでいるとは言い難い状況にある。しかし、食糧の60%以上を海外からの輸入に頼るわが国において、GM農産物の食品としての利用は増加していくことが見込まれる。一方、近年食品表示の信頼性を揺るがすような事件が立て続けに起こっている。このようななか、信頼性における分析法によって得られた分析結果に基づく、信頼における表示がますます求められていくことは確実である。

そのためにも、今後も増加していく種々のGM農産物に対応できる実用的な検知技術の開発は必要不可欠であり、その妥当性確認も重要な課題である。

(食品分析研究領域 GMO検知解析ユニット 橘田 和美)

## 参考文献

- 1) James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA Brief No. 35, ISAAA: Ithaca, NY, 2006
- 2) 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル<改訂第2版>. 2002, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター  
([http://www.famic.go.jp/technical\\_information/jashandbook/index.html](http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/index.html))
- 3) 組換えDNA技術応用食品の検査方法について. 2001, 厚生労働省（平成13年

3月27日食発第110号)

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/kensa/kensa.html>)

- 4) 遺伝子組換えに関する表示に係る加工食品品質表示基準第7条第1項及び生鮮食品品質表示基準第7条第1項の規定に基づく農林水産大臣の定める基準. 2000, 農林水産省 (平成12年3月31日農林水産省告示第517号, 改正:平成19年10月1日第1173号)  
([http://www.maff.go.jp/j/jas/hyoji/pdf/kijun\\_03.pdf](http://www.maff.go.jp/j/jas/hyoji/pdf/kijun_03.pdf))
- 5) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. 2002, AOAC Int.
- 6) McClure, FD., Design and analysis of qualitative collaborative studies: minimum collaborative program. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1990, 73(6), 953-960
- 7) 日野明寛, 古井聡, 児玉貴志, 標準化のための試験室間共同試験. 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, 永田編, サイエンスフォーラム:東京, 2007, 231-240
- 8) Cochran, WG., The comparison of percentages in matched samples. *Biometrika*, 1950, 37 (3-4), 256-66
- 9) ISO24276: 2006 (E), Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions. 2006, ISO



## ② 国際度量衡委員会、物質量諮問委員会(CCQM)の パイロットスタディへの参加

### 1. 国際単位系

古には、長さ、面積（度）、体積（量）及び質量（衡）の制定に関する権限は統治者が有していたため、これらの単位は歴史的な背景を含め社会や地域によって様々であった。社会や地域毎に異なる単位を使用することは、地域間の交流が限定されている場合には問題が少ないが、近代において連絡、交通、輸送手段の発達に伴って国際間の貿易が盛んとなり、これを効率よく行うために諸国の事情に依らない客観的な標準が必要になった。このような国際通商上の障壁を軽減するため、18世紀末のフランス国で世界レベルでの単位制度の統一を目的として、1875年にメートル法が定められた。メートル法は、狭義には長さの単位であるメートルを基準として定められた単位系のことを指し、広義にはこれから派生した各種単位系の総称を指す。単位制度の一元化に際しては、誰もが自らが用いている単位をそのまま使用できれば好都合と考えるため、自然科学を論拠とする単位を新たに制定し、皆がそれに従うよう提案することが必要とされた。例えば長さの単位である「メートル」は、当初地球の北極から赤道までの子午線の長さの1000万分の1と定められ、これを基にメートル原器が作製された。その後、メートル原器は、基準を「物」にした場合には、破損等の物理的ダメージが避けられないこと、光の速度測定技術が向上したこと及び原子時計が開発されたことにより精確に「時間」を定義することが可能になったことから、現在は真空中で1秒の299792458分の1の時間に光が進む行程の長さへと定義が変更されている。現在では、長さ(m)、質量(kg)、時間(s)、電流(A)、温度(K)、光度(cd)、物質量(mol)がSI(SI:Le système international d'unités)基本単位として定められている<sup>1,2,3)</sup>。

### 2. メートル条約への加盟

1875年に各国の公的な単位としてメートル法の導入に努力することを定めたメートル条約が17ヶ国で締結された。現在、メートル条約加盟国は51カ国に至っている。日本はメートル原器の交付を契機として1885年(明治18年)にメートル条約を批准し、1891年(明治24年)に尺貫法と併用する形で導入した。1959年(昭和34年)からは計量法の下に尺貫法と共にメートル・ヤード法も使用が禁止され、土地や建物等、一部を除きメートル法の使用が定められ、7年後の1966年(昭和41年)には公的な表記としてメートル法のみを使用することが義務づけられた。

表1 BIPMの元に設置されている10の諮問委員会

略称	正式名称	検討内容	設立年
CCEM	Comite consultatif d'electricite et magnetisme	電磁気	1927
CCPR	Comite consultatif de photometrie et radiometrie	即衡・放射測定	1933
CCT	Comite consultatif de thermometrie	測温	1937
CCL	Comite consultatif des longueurs	長さ	1952
CCTF	Comite consultatif du temps et des frequences	時間・周波数	1956
CCRI	Comite consultatif des rayonnements ionisants	放射線	1958
CCU	Comite consultatif des unites	単位	1964
CCM	Comite consultatif pour la masse et les grandeurs apparentees	質量関連量	1980
CCQM	Comite consultatif pour la quantite de matiere	物質質量	1993
CCAUV	Comite consultatif de l'acoustique, des ultrasons et des vibrations	音響・超音波・振動	1998



図1 フランス、セーブルの丘に建つBIPM

### 3. グローバルMRA

経済の国際化に伴い、1999年10月にメートル条約加盟国において計量標準を国際的に相互承認する協定（グローバルMRA: Global mutual recognition arrangement）が調印された。これは各国の計量標準研究所が保持する国家計量標準の同等性の確認と各国の計量標準研究所などの国家計量機関が発行する校正証明書を相互承認することで、国際的な標準、基準の統一化が行うことを目的としている。

### 4. メートル条約に関する国際組織

メートル条約が締結され、これに基づいて国際度量衡総会（CGPM: Conférence générale des poids et masures）、国際度量衡委員会（CIPM: Comité international des poids et masures）、国際度量衡局（BIPM: Bureau international des poids et masures）が設置された。CGPMはこれらの組織の中の最高機関であり、メートル条約加盟国が4年に一度、フランス国パリで開催される会議として機能している<sup>4)</sup>。CGPMで決議された事項は、CIPMによって代理執行されることになっており、CIPMはCGPMから委託された標準に関する国際的な課題を具体的に検討する任務を持っている。BIPMはCIPMの下に設置され、CIPMの事務局と標準

に関する国際的な研究課題の幾つかを直接担当する研究所として機能している。BIPMはフランス国、パリ郊外に位置するセーブルの小高い丘に建てられており、キログラム原器の保管場所として有名である(図1)。また、BIPMの下には10の諮問委員会(CCs:Comités communs)と呼ばれる専門部会が設置され、それぞれの組織が各国の政府や国際機関、国立標準研究所と協調している(表1)。物質質量諮問委員会(CCQM:Comité consultatif pour la quantité de matière)とは、10の委員会の中でも比較的新しく設置された委員会の1つで、化学計測の国際的整合性と長期的有用性に関する問題解決のため、化学計測関連の諮問を行っている。

## 5. バイオ産業

21世紀は生命科学の世紀と言われ、生命科学の基礎研究や応用面としてのバイオ産業には大きな注目と期待が集まっている。それに伴い、国際間におけるバイオ関連品の取引も増加しており、今後はさらに増えていくものと考えられている。このような事情により、従来の化学関連品だけでなくバイオ関連品に関する度量衡を新たに設ける必要性が生じてきた。バイオ計測標準となる度量衡は、トレーサビリティ、コンピュータビリティ(比較互換性)、国際整合性、標準化等についてCIPMのもとで論議が行われている。バイオ計測標準に関する課題のうち、トレーサビリティについては体外診断検査、臨床検査データの互換性、食料品の輸出入、遺伝子組換え(GM:Genetically modified)食品検査、種の保存・外来種の防疫等が具体的な例として挙げられるが、同一の標準および試験方法を用いて試験・検査を行っても、各試験所の能力(スタッフ、設備等を含む)が異なる場合、各試験所毎に測定結果が異なってしまう。従って、試験所についても第三者機関から国際基準を満たした技術的、管理的な能力を有していることの客観的な証明を受ける必要があり、その一例としてISO/IEC 17025:2005(JIS Q 17025)「試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項」等の認定制度がある。GMO検知解析ユニットでは、平成19年4月にGMダイズ及びトウモロコシの定性及び定量試験についてISO/IEC 17025、これらに従った認証標準物質作製についてISO guide34(JIS Q 0034)「標準物質生産者の能力に関する一般要求事項」の資格を取得した。これにより、当ユニットでは、GM農作物の認証標準物質を製造し、GM食品の分析を行う試験機関に提供することで、分析結果の信頼性確保及び試験所認定に貢献する予定である<sup>5)</sup>。

## 6. 計測標準の重要性

適当な計測標準が無い場合、例えば国際社会に通用する客観的なデータを取得する必要が生じた場合、混乱を生ずる可能性がある。また、製造企業サイドからすると、海外への輸出を視野に入れて商品を開発する際に、その商品に関する国際的な規格・基準が予め判っていれば、それに適合する製品を効率的に開発する

表2 CCQMの元に設置されている7のワーキンググループ

略称	正式名称	検討内容
KCWG	<u>Key comparisons and CMC quality</u>	基盤比較・CMC登録*
GAWG	<u>Gas analysis</u>	ガス分析
EAWG	<u>Electrochemical analysis</u>	電気化学分析
IAWG	<u>Inorganic analysis</u>	無機分析
OAWG	<u>Organic analysis</u>	有機分析
BAWG	<u>Bioanalysis</u>	生物分析
SAWG	<u>Surface analysis</u>	表面分析

\* : Calibration and measurement capability の略

表3 BAWGで進行中のパイロットスタディー

略称	検討内容
P-44*	PCR法による合成プラスミドの定量
P-53	DNAプロファイリング
P-54	DNAとオリゴヌクレオチドの定量
P-55	ペプチド及びタンパクの定量
P-58	蛍光測定
P-59	円二色性 (Circular Dichroism ; CD)
P-60	DNA抽出法
P-94	メチル化DNAの定量
P-101	糖鎖の定量

\* : 但し, P-44については現在K-61に移行し, 基幹国際比較を実施している。

ことが出来る。この基準が整っていない場合、我が国のバイオ分野を含む産業は開発競争に遅れが生じることになりかねない。また、標準物質がない場合には、試験を行ったデータの信頼性を証明することが難しくなり、異なる方法で試験が行われたデータについては、試験結果の整合性がとれないため、比較する事が難しくなる。標準物質の重要性については前述したメートル条約加盟国が51カ国に及んでいるということからも理解できる。

## 7. CCQMでの検討内容

4. 「メートル条約に関する国際組織」で述べたように、BIPMにおける化学計測関連の諮問については、7つの作業部会から成るCCQMで行われている(表2)。これらのうちバイオ計測標準はバイオアナリシスワーキンググループ(Bioanalysis Working Group ; BAWG)で検討が進められている。BAWGでは、表3に示したような内容の試験的研究(Pilot study)が行われている。Pilot studyが終了した課題で、特に重要性が認められるものについては、各国の国家標準の同等性を確認する比較試験である基幹国際比較(Key comparison)に移行され、グローバルMRAを締結するために必要な技術的基盤が同等であること、各国が同

じ基準を運用することが可能であることを調べる試験が行われている。

## 8. 試験室間国際共同試験への取り組み

筆者は、バイオ産業の振興に伴って設置されたBAWGに産業技術総合研究所と共に参加した。その中で、IRMM (The Institute for Reference Materials and Measurements ; ヨーロッパ国際計量研究所) が中心となって行ったPilot study P-60「DNA抽出法」について試験室間共同試験に参加した<sup>6)</sup>。P-60はDNA抽出法の違いがリアルタイムPCRによる遺伝子組換え(GM) トウモロコシBt176 トウモロコシの定量に与える影響を調査するものであり、8機関の国立計量研究所間で国際的なCCQM-P60パイロットスタディが計画された。本調査ではBt176 トウモロコシ粉から抽出されたDNAの質と定量値に関して、一般的に使用されている4種類の抽出法が比較された。その結果、CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) ベースの方法は鋳型DNAの量と質が最も優れており、260nm/ 230nmの吸光度比はDNA抽出法の間で違いが認められた。また、リアルタイムPCRによりGM混入率を測定したところ、PCR反応に用いた鋳型DNAの量と質による影響を受けており、その鋳型DNAを希釈したもの、あるいは精製したもので再測定したBt176の混入率は、適用した抽出法により統計学的に異なっているという研究成果が得られた。

## 9. バイオツール分野での国家計量標準の重要性

日本がバイオツール分野での国家計量標準を整備するためには、国際動向を踏まえた積極的な対応、取り組みが必要である。さらに、我が国で必要とされている計測手法及び計量標準を我が国で自ら供給出来る体制を整備し、それらが世界的に普及するように努めることが重要である。また、国家計量標準が必要とされる関連分野は多岐に及ぶので、今後も各省庁が連携し、戦略的なバイオ計量標準を開発することが必要と思われる。

(食品分析研究領域 GMO検知解析ユニット 古井 聡)

### 参考文献

- 1) [http://www.bipm.org/utis/common/pdf/si\\_brochure\\_8\\_en.pdf](http://www.bipm.org/utis/common/pdf/si_brochure_8_en.pdf)
- 2) <http://www.nmij.jp/chishiki/SI8JC.pdf>
- 3) <http://www.nmij.jp/chishiki/SI8J.pdf>
- 4) <http://www.bipm.org/>
- 5) <http://nfri.naro.affrc.go.jp/pdf/ASNITE-RM.pdf>
- 6) Corbisier P, Broothaerts W, Gioria S, Schimmel H, Burns M, Baoutina A, Emslie K, Furu S, Kurosawa Y, Holden M, Kim H, Lee Y, Kawaharasaki M, Sin D, Wang J, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3249-3257 (2007)



## V 標準物質の作製と頒布

### 1. 茶葉のアクリルアミド

#### 1. はじめに

アクリルアミドは $C_3H_5NO$ の分子式をもつ分子量71.08, CAS No. 79-06-1の化学物質であり, 工業製品の原料として年間6万トン程度が内需向けに生産されている<sup>1)</sup>。そのため, 環境を汚染する化学物質として排出や移動の監視, 環境から人体への暴露という観点から調査, 研究がなされてきた<sup>2)</sup>。ところが, 2002年になってスウェーデンから加熱加工食品中のアクリルアミドの存在が発表されると状況は一変した<sup>3,4)</sup>。各国の追調査結果により, アクリルアミドの人体への暴露経路として, 食品からの経路が最大である事が明白となったためである。化学物質によるハザードのリスク管理では, 科学データである分析値は情報の伝達や対策等のさまざまな場面で意思決定の論拠となるものであり, 数値の信頼性, 妥当性を客観的に説明できることが大切である。そのためには, 分析を行う試験所は第三者の主催する技能試験への参加と継続的な内部精度管理を行うことが望ましい。食品分析の内部精度管理では, 同じマトリクスで分析値が特性値として担保された組成標準物質を利用することが非常に有効であるが, 多様化する分析ニーズに標準物質の供給が追いついていないのが現状である。食品総合研究所では, 主に日本やアジアを中心に製造・消費される食品について, アクリルアミドの特性値をもつ標準物質を開発中である。本稿では現在取り組んでいる茶葉をマトリクスとした組成標準物質について現状を述べる。

#### 2. 茶のアクリルアミド

加熱加工食品中のアクリルアミドは, 加熱前に含まれていたアミノ酸(主にアスパラギン)と糖(主に還元糖と呼ばれるグルコース, フルクトース)が高温でアミノカルボニル反応を起こすことで生成する。生の茶葉は糖とアミノ酸を含んでいるため, 高温加熱によりアクリルアミドを生成する要因を備えているが, 特にほうじ茶は, 170℃以上の高温で焙煎するため, 乾燥茶葉中に, 数百 $\mu\text{g}/\text{kg}$ という濃度でアクリルアミドを含んでおり, 中には500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超える分析値を示す製品もある<sup>5)</sup>。浸出液としてのアクリルアミド濃度は数十分の1程度に薄まるものの, 香りを生かした低刺激性の無糖飲料として多飲されているため, 分析値はリスク評価のための基礎データとして重要である。

### 3. 製造方法

食品総合研究所で採用しているほうじ茶をマトリクスとした標準試料の製造方法を以下に順を追って記述するが、工程の見直しを絶えず行っているため、今後、改良のため変更が加えられる可能性がある。

#### 3.1 工程図

アクリルアミド標準物質生産のための工程図<sup>6)</sup>を図1に示す。

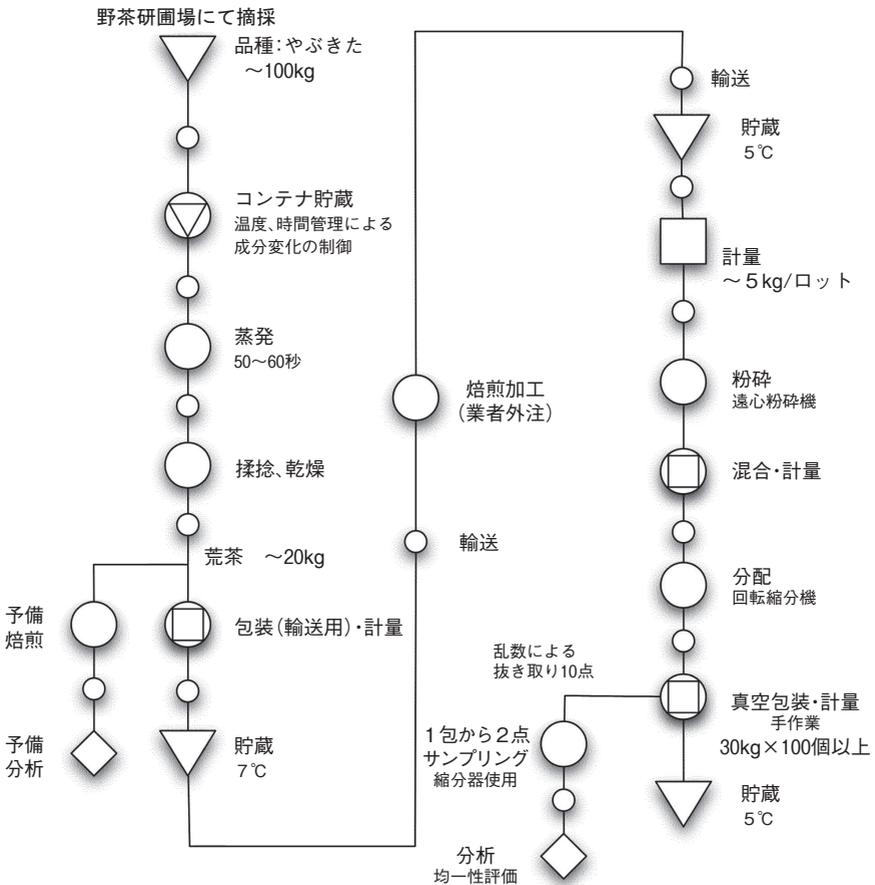


図1 ほうじ茶標準試料の製造工程

### 3.2 原材料

ほうじ茶は、原材料の特性によって焙煎後のアクリルアミドの生成濃度が数百～数千 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の大きな範囲で変動する。望みの濃度範囲の標準物質を製造するには、人為的に純品のアクリルアミドを添加・混合して標準物質とすることも可能であるが、1.低水分含量のため添加後の均一化が困難、2.工程数の増加と本来の製茶工程との解離、3.添加段階によっては外注困難な工程の発生、などの問題点がある。また、抽出操作時のアナライトの挙動や実サンプルにおけるアクリルアミド濃度に応じたマトリクスの違いなどを正しく反映した物とならないため、可能な限り避けることが望ましい。

ほうじ茶のアクリルアミド濃度は、原料茶葉中のアミノ酸（アスパラギン）濃度が高くなることで、大きく上昇することがわかっており、収穫後の貯蔵が要因であることも突き止められている<sup>7)</sup>。そこで、茶畑と製茶設備を備えた試験研究機関である野菜・茶業研究所を協力機関として、収穫後の貯蔵条件を指定して荒茶を製造してもらい、この荒茶を原料として製茶工場で焙煎することで、アクリルアミド濃度範囲が数段階に異なる原料ほうじ茶を入手している。

### 3.3 粉碎

超遠心粉碎機（Retch社、ZM200、1 mmメッシュ、14000rpm）により粉碎している。粉碎中の過熱を押さえるため、粉碎機への試料供給は振動式の自動供給装置（Retch社、PT100）を使用して少量ずつ一定速度で行うとともに、粉碎物をサイクロン付き捕集器へ導いて熱がこもらないようにしている。ふるい分けは行っていない。装置側の粉碎条件を一定にしても、原料によって粉碎程度は異なるため、粉碎物の粒度分布を参考データとして測定している。ただし、ロット間の粒度分布の違いは実用上差し支えないと考えられるため、生産時の品質管理項目には含めない予定である。

### 3.4 縮分装置による分配

粉碎物を大きなビニール袋の中に入れ、上下返ししながら全体を混合した後、回転縮分機（Retch社、DR100）を用いて1個あたり約30 gずつ均等に分配している。

### 3.5 均一性確認試験

出来上がった標準物質候補の均一性については、ランダムに選んだ10個の試料から2回ずつ反復分析した後、一元配置分散分析で判定している<sup>8)</sup>。

### 3.6 安定性確認試験

均一性の確認された試料は、一定期間経過後、乱数を用いてランダムに選んだ3本以上から2回ずつサンプリングし、得られた分析値の平均を均一性確認時の

平均値と比較することで安定性を判定している<sup>9)</sup>。

### 3.7 分析方法

5 g の試料に内標準としてアクリルアミド-d3を添加し、水抽出液を固相抽出カートリッジで精製したものを臭素化物へ誘導体化し、酢酸エチルで抽出、濃縮後、GC-MSで分析している<sup>10,11)</sup>。

## 4. 認証値設定への取り組み

食品中のアクリルアミドは、食材中の還元糖とアミノ酸（アスパラギン）が高温加熱でメイラード反応を起こすことで生じている。この反応は大変複雑で、アクリルアミド以外の化学物質も多く生成する。そのため、対象物中のアクリルアミドを分析物、それ以外をマトリクスと考えれば、加熱によって分析物とマトリクスが同時に生成していると言える。このことから、アクリルアミドを含まないブランクマトリクスを得る事は不可能である。また、マトリクス中にアクリルアミドの生成要因となる糖やアミノ酸が残存しているため、分析のための抽出操作において、新たにアクリルアミドが生成してくることも考えられる。また、注意深い分析操作においても、分解してアクリルアミドを生じる不安定な未知の前駆化合物が分析値へバイアスを与えることも否定できない。このような抽出過程で生じたアクリルアミドは、分析機器の検出器で異なる物質として区別する事は不可能である。しかし、現時点で知り得ることのできるアクリルアミドに関する知見が十分考慮された上で、技能試験や添加回収試験等から十分な妥当性が期待される分析方法から得られた複数の測定値なら、互いの測定値がある不確かさの範囲内で一致するとみてよいだろう。このような考え方は、国際的にも妥当性があると認められており、室間共同試験による分析値から妥当な値として認証値を決定することができる<sup>12)</sup>。その場合、先に述べたような真値とのずれの可能性について使用者が判断できるようデータを開示し、使用条件等の形で認証書へ要約する必要がある。

## 5. 標準物質頒布にかかる法的状況について

冒頭に述べたようにアクリルアミドは大量生産される工業化学薬品であることから、さまざまな法的な管理が求められている。物質そのものの持つ有害性、有毒性以外にも、環境汚染防止や労働者の安全管理など、主な法規として次のようなものがある。

特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律  
(化学物質管理促進法(化管法),PRTR法)

毒物及び劇物取締法

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)

## 労働安全衛生法

アクリルアミドはいずれにも該当するが、食品をマトリクスとする組成標準物質の場合、濃度規定から除外されるケースとそうでないケースがあるので実際の頒布にあたってはその時点での法的状況を政令まで確認しておく必要がある。法令の適用を受ける場合、各種表示や情報伝達のための文書の添付が必要となる。このような表示や文書について現在、国際的な統一の動きがあり、国内法も準拠しつつあることに注意しておきたい<sup>13)</sup>。

## 6. おわりに

本稿執筆時点で、ISO GUIDE34に基づく文書の整備と認証値を得るための室間共同試験を行っていないため、製造した標準物質の用途は、所内における分析法の開発・改良と内部精度管理に限られている。今後、複数ラボによる分析値の取得が課題である。

(食品分析研究領域 状態分析ユニット 小野 裕嗣)

## 参考文献

- 1) 15107の化学商品, 化学工業日報社, 2007年1月
- 2) 環境省: 化学物質の環境リスク評価 (第2巻), p 1-11, アクリルアミド, 平成15年3月
- 3) Rosén, J. and Hellenäs, K., Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Analyst*, **127**, 880-882 (2002).
- 4) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Törnqvist, M., Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4998-5006 (2002)
- 5) 農林水産省消費安全局, 平成16年度加工食品中のアクリルアミドの含有実態調査, [http://www.maff.go.jp/syohi\\_anzen/acrylamide/syosai/03/h16/h16.html](http://www.maff.go.jp/syohi_anzen/acrylamide/syosai/03/h16/h16.html), 2004年12月
- 6) JIS Z8206: 工程図記号
- 7) 水上裕造, 木幡勝則, 山口優一, 沢井祐典, 林宣之, 小野裕嗣, 箭田浩士, 吉田充, 忠田吉弘, 摘採後の生葉管理がばい煎後のアクリルアミド生成量に及ぼす影響, 茶業研究報告, No.100 別冊 Page.152-153 (2005.10.31)
- 8) 内藤, 6.3 均一性判定方法. 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, p176, (2007)
- 9) ISO 13528: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons (2005)
- 10) 吉田充, 小野裕嗣, 亀山真由美, 忠田吉弘, 箭田浩士, 小林秀誉, 石坂眞澄,

日本で市販されている加工食品中のアクリルアミドの分析, 食科工, **49**, 822-825 (2002).

- 11) Mizukami Y, Kohata K, Yamaguchi Y, et al., Analysis of acrylamide in green tea by gas chromatography-Mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **54** (19), 7370-7377 (2006)
- 12) ISO Guide 35: Certification of reference materials-General and statistical principles (1989); JIS Q 0035: 標準物質の認証 - 一般的及び統計学的原則 (1997)
- 13) GHSに基づく化学物質等の表示 JIS Z7251-2006, 化学物質等安全データシート JIS Z 7250-2005

## 2. 日本型食品の無機元素

### 1. はじめに

標準物質は、NIST（National Institute of Standards and Technology, 米国）や IRMM（Institute for Reference Materials and Measurement, ベルギー）、日本では国立環境研究所（NIES）や産業総合研究所計量標準総合センターの有害成分含有の環境組成標準物質など、種々の国々で生産され<sup>1~5)</sup>、各国に供給されている。

日本で生産されている食品をマトリックスとした標準物質は少なく、国立環境研究所が環境標準試料として生産・頒布しているカドミウム濃度が異なる三種の玄米粉末、魚肉粉末、「日本人の食事」だけである<sup>4)</sup>。最近、産業総合研究所計量標準総合センターも食品系標準物質の生産を計画しているが、やはり環境成分が中心である。

そのため、食品系の標準物質はほとんど海外で生産されたものを使うことになる。標準物質はその国で多く食べるものをマトリックスにしているのので、欧米で主食である小麦や乳製品は充実している。しかし、BSEなどの疫病の発生を理由にして牛肉類や豚肉などが輸入禁止の場合には、その標準物質も輸入できず手に入らない。植物系の標準物質でも植物防疫検査で封を開けられ、例えば、手に取られたり、机上に空けられて元に戻されたら、汗や埃、その他の植物由来のミネラルが入り込むなどの場合もあるので、その確認ができる態勢を取っていないと、せっかくの認証値が当てにならなくなる。

そこで、食品総合研究所では、国際的に余り取り上げられないが日本国内では消費量が多く一般的な食品である、米や緑茶、さらに、豆腐、牛乳、じゃがいも、リンゴ、豚肉など、厚生労働省が行っている国民栄養調査や農林水産省が行っている食料需給表を参考にして、日本国内での消費量が多い食品をマトリックスとし、日本国内での測定値の精度管理を目的とした、重金属類（セレン、ヒ素、クロム、銅、亜鉛など）の国際的にも通用する標準物質の生産を計画し、それらの標準物質を日本国内での食品中の重金属類測定の本項アイテムとなることを目指して、「食品をマトリックスとした重金属類含有標準物質の作製とその評価手法の開発」という課題名で研究を開始している。

そのために、①試料調製法として、微量重金属類の汚染が少ない粉碎法や均質化法、②長期安定保存法として、ガンマー線照射や殺菌剤添加による殺菌法の応用と室温での長期間保存試験、③含有元素類の値付け方法として、試験室間共同試験による特性値の決定法や既存の認証標準物質による国際単位系（SI）へのトレーサビリティの確保などを、④ISO Guide 34の規格にある「標準物質生産者の技術及び生産に関する要求事項」<sup>6)</sup>に沿って行い、それらを記載した標準作業手順書の作成も必要である。これらをクリアして、米を試料とした標準物質の

調製と生産を行う予定である。

## 2. 無機成分の標準物質の作製法

既存の標準物質を使ってみて、ユーザーとして感じたことを生産者として生かすことを、以下のようにまとめた。

### 2.1 水分含量の決め方

最も一般的なのが、85～135℃程度の範囲での送風熱風乾燥法であり、この機器なら何処の試験室にもある。1～4時間ならば短時間で済み容易であるが、8～10時間を指定されると逆に大変であるので、むしろ一晩連続になる16～24時間が良い。(0.5 g前後で、容器の大きさや材質に影響されない)

二番目に乾燥剤として過塩素酸マグネシウムや五酸化リンを使った乾燥剤入りデシケータ中に保存して、乾燥重量を求める方法がある。作業的には非常に容易だが、7日間以上の長時間の放置が必要である。

三番目の減圧乾燥法は、比較的低温条件かつ短時間の乾燥操作で水分含量が求められる。高水分含量の青果物や高温条件では飛んでしまう揮発性の油分が多い試料に適応されるが、減圧するための専門機器類として、密閉型の減圧用乾燥機、減圧ポンプ、低圧力を維持する制御装置などが必要となる。

以上のように、種々の方法が水分含量の測定法として指定されている、温風乾燥法が、使用する立場としては最も使い勝手が良いと考えている。

### 2.2 最低使用試料量

標準物質の測定に使用する試料量はある量以上と指定されている。その理由は、標準物質の均質性を維持できる試料量であること、特に不均質な食品系の標準物質の場合は、ある程度の量が必要である。粒度や定量目的成分の含量に依存するが、具体的には、種々の重量の試料を量り取り、測定試料の調製を行い、定量目的成分のバラツキ即ち分散が一定になる重量が、必要最小量となる<sup>7)</sup>。

標準物質の使用者としてはできるだけ少量であることを希望する(0.5 g前後)。ただし、含量が少ない成分の測定の場合では(例えば米中のCd含量測定)、1 g以上を最低使用量としている場合もある。

### 2.3 保存条件と開封後の保存、質的变化(特に水分含量)

無機成分は、有機成分のように分解して減少したり、逆に重合体や複合体の分解により増加することはない。しかし、生物的な要因、虫やカビにより均質性が損なわれる可能性があるため、殺虫や殺菌の必要がある。そのため、ガンマー線照射を行うのが一般的である。そうすれば開封までは室温で十分保存できる。冷蔵保存を指定した標準物質も一部ある。

開封後は常温保存指定の標準物質でも、密閉できる遮光性の袋に入れ、デシケータか冷蔵保存する。できれば酸素を通さないガスバリアー性袋を使ってシールして密封するくらいの注意が必要である。ただ、デシケータでの乾燥保存では、計量時の吸湿に注意する必要がある。多水分の試料以外は、冷凍保存してしまうのも良い。理由は開閉が多い冷蔵庫内の温度は意外に高く、開封後ではカビが繁殖する可能性があるからである。

### 3. 具体的な作製方法

#### 3.1 使用機器類

元素類の標準物質の付属のレポートには、作製にはメタルフリーの機器の使用の記載がある。例えば、鉄系ではないタングステンカーバイト製のハンマーミルやボールミルで粉碎し、フィルターはナイロン製（50～200 $\mu\text{m}$ ）、攪拌による均質化には、メタクリル樹脂でコーティングしたV型混合機や、ポリエチレン、PTFEなどのプラスチック類でコーティングした回転ドラムを使用している。

しかし、このような特殊な機器類は揃えられないので、当研究室での粉碎や攪拌、縮分にはステンレス製のものを使用している。

#### 3.2 密閉容器の選択

長期保存を考慮すると、ピンホールができる可能性がある袋よりビン、それもプラスチック製よりもガラスがよい。また、ガラスの方がガンマー線照射に強く、ポリプロピレンやフッ素樹脂は弱い。

#### 3.3 ガンマー線照射

開封までは室温(常温)保存を前提とすると、糸状菌の殺菌が主目的のガンマー線照射は必須である。ガンマー線の照射量は12～30KGy、2～2.5Mrad ( $^{60}\text{Co}$ )と記載されている。この操作はガンマー線照射施設がある専門の業者に依頼している。

#### 3.4 粉碎、攪拌・混合と小分け法

粉碎には超遠心粉碎機（Retch社製）を用いている。この粉碎機では、高速回転する粉碎用刃の外側に一定径の穴が空いたスクリーンが付いており、粉碎物はそのスクリーンを篩のように通るので、粉碎試料は選定したスクリーンに空いた径以下になっている。

大量の試料を先ず二等分するには試料縮分器を使う。さらに回転式攪拌機で一定時間（30分以上）攪拌し、小分け採取を10回（10個）行ったら5分間攪拌し、その後また小分け採取を10回行う、このような操作を必要な回数繰り返した。

### 3.5 均質性試験

小分けしたビンから試料を2か3反復で調製し、測定対象成分を定量する。分析誤差 ( $S_{an}^2$ ) やサンプリング誤差 ( $S_{sam}^2$ ) を算出し、均質性を確認する計算式に当てはめて、以下の2方法により検証した。

①二反復の測定データから  $S_{an}^2$  と  $S_{sam}^2$  を算出し、 $\sigma_{all}^2 = (0.3 \times \sigma_p)^2$  から  $C = F_1 \sigma_{an}^2 + F_2 S_{sam}^2$  を求め、 $S_{sam}^2 < C$  から均質性を確認<sup>8) ~ 9)</sup>。(ここで、 $\sigma_p = \text{Target Value, Horwits Function}$ )<sup>10 ~ 11)</sup>

②三反復の測定データから分散分析より  $S_{an}^2$  と  $S_{sam}^2$  を求め、 $S_{sam}^2 < 0.3 \sigma_p$  から均質性を確認<sup>12 ~ 13)</sup>。

### 3.6 値付け

標準物質中の成分含量を測定し正確な認証値は、通常複数の研究室の参加による試験で決定するが、単独の研究室で決める場合もある。また、無機成分の測定法には、原子吸光分析やICP-OES (誘導結合高周波プラズマ-発光分析装置)、ICP-MS (同-質量分析装置)、一次標準測定法となっている同位体希釈法によるID-ICP-高分解能MS、放射化分析などがあり、これらの複数の方法で測定する。

標準物質の成分含量は認証値として記載されるが、認証は受けていないが定量の参考となる参考値を同時に記載している場合もある。また、認証値に付いているのは標準偏差ではなく、測定の際の種々の誤差を考慮に入れた不確かさと呼ばれるものである<sup>14)</sup>。

## 4. 無機元素の標準物質の頒布方法

作製した標準物質の頒布は、直接販売したり (国立環境研究所, NIES)、業者に委託したりしている (産業総合研究所計量標準総合センター)。海外の標準物質でも、その生産機関のホームページで直接購入できる場合もある。世界各国の標準物質を専門に取り扱っている業者もある。また、表1の茶の標準物質 (NCSのDC73351とZC78004) のように、中国で生産された標準物質を自機関の識別ラベルに変えただけのものもある。

送付形態については、無機元素は有機成分のように増減することはないので、多水分系で腐りやすい場合を除いて常温で良い。また、ほとんどの保存容器はガラス製であり、破損しないように配慮する必要がある。実際には、衝撃緩衝フィルムを巻いただけの場合でも破損せずに届いているが、プラスチック製の専用カプセルに収納して送付したい。

## 5. 無機元素の標準物質の作製・頒布の具体例

表1にあるIRMM-804に付いている取扱書を参考にして具体的な作製例などを示す。原料は日本で生産・粉碎され、ビンに詰められた。粒子径計測により

表 1 米, 茶などの標準物質リスト

名 称	内容量	保存	最低使用量	水分測定条件
NIST SRM 1568a Rice Flour	80g	10~30℃	500mg以上	25℃・0.5mmHg以下で24hrs
NIES CRM No.10a (玄米粉末, Cd低レベル)	約60g	室温デシケータ	400mg以上	85℃・4hrs
NIES CRM No.10b ( , Cd中レベル)				
NIES CRM No.10c ( , Cd高レベル)				
GBW 08510 (NCS ZC76004) Rice Cadmium (high level)	40g	冷暗所	0.3g以上	80℃・4hrs,
GBW 08511 (NCS ZC76005) Rice Cadmium (medium level)	40g	冷暗所	0.5g以上	80℃・4hrs
GBW 08512 (NCS ZC76006) Rice Cadmium (low level)	40g	冷暗所	1g以上	80℃・4hrs
IRMM 804	15g	4℃	100mg以上	80℃・24hours以上
NCS DC 73351 (GBW 07605) Tea	35g	drier中	0.5g以上	95~100℃, 100mmHg以下・5hrs
NCS ZC 78004 (GBW 08505) Tea	35g	冷暗所	250mg以上	水分補給?
NCS ZC 78007 Tea	35g	冷暗所	250mg以上	水分補正?
NIES CRM No.27 日本の食事 Typical Japanese Diet	約18g	4℃以下	500mg以上	凍結乾燥24hrsか減圧乾燥24hrs
NIES CRM No.3 クロレラ Chlorella	36g	室温デシケータ	300mg以上	85℃・4hrs

NIST: National Institute of Standards and Technology (USA)

GBW: State Bureau of Technical Supervision, China

NIES: National Institute for Environmental Studies (Japan), 国立環境研究所

IRMM: Institute for Reference Materials and Measurement (Belgium)

NCS: National Resources Council Canada

500 μm以下であることを確認している。均質性や最低使用量, 短期および長期の安定性試験, 水分含量測定方法, 値付けの方法や参加機関別の測定方法と測定元素種が表で示されている。その結果, 保存は4℃, 最低使用量は100mg以上, 水分含量測定は85℃・24hours以上と決められた。

(食品分析研究領域 分析ユニット 堀田 博)

### 参考文献

- 1) NIST (National Institute of Standards and Technology) 米国,  
<http://www.nist.gov/>
- 2) IRMM (Institute for Reference Materials and Measurement) ベルギー,  
[http://www.irmm.jrc.be/html/reference\\_materials\\_catalogue/catalogue/index.htm](http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/index.htm)
- 3) GBW, National Research Center for Certified Reference Materials, 中国
- 4) 国立環境研究所 (NIES), <http://www.nies.go.jp/>
- 5) 産業総合研究所計量標準総合センター認証標準物質 (NMIJ CRM),  
<http://www.nmij.jp/kosei/user/crm.html>
- 6) 日本規格協会編, 標準物質の生産者の能力に関する一般要求事項 (JIS Q 0034) “JISハンドブック 58-3 適合性評価 2005”, p409-431 (2005) 日本規格協会.
- 7) F. D. McClure, OMA PROGRAM MANUAL, Appendix E, 2002.  
[http://www.aoac.org/vmeth/Manual\\_App\\_E.pdf](http://www.aoac.org/vmeth/Manual_App_E.pdf)
- 8) T. Fearn and M. Thompson, A New Test for ‘Sufficient Homogeneity’, *Analyst*, 126,

1414, 2001.

- 9) Protocol for the Organization and Analysis of Data, 6th edition, 2002, Food Analysis Performance Assessment Scheme ( FAPAS ), Central Science Laboratory, UK.  
<http://www.fapas.com/pdfpub/FAPASProtocol.pdf>
- 10) M. Thompson, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385, 2000.
- 11) 安井明美, 食品分析における信頼性確保, *The Chemical Times*, **191**, 13, 2004. (関東化学ホーム [http://www.kanto.co.jp/times/t\\_pdf/CT\\_191\\_5.pdf](http://www.kanto.co.jp/times/t_pdf/CT_191_5.pdf))
- 12) M. Thompson and R. Wood, The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories, *Pure & App. Chem.*, **65**, 2123, 1993.
- 13) 分析法の妥当性確認に関するガイダンス, (独) 農研機構 食品総合研究所ホームページ, (<http://nfri.naro.affrc.go.jp/yakudachi/datosei/index.html>)
- 14) 日本規格協会編, 標準物質の認証 (JIS Q 0035) “JISハンドブック 58-3 適合性評価 2005”, p432-479 (2005) 日本規格協会.

## Ⅵ プロフィシエンシィテスティング (技能試験：PT)への参加

### 1. アクリルアミド

#### 1. はじめに

アクリルアミドは人体へ発ガン作用をもつと考えられている化合物であり<sup>1)</sup>、その重合体であるポリアクリルアミドは塗料、製紙や水処理等へ利用されている<sup>2)</sup>。このアクリルアミドが加熱加工食品に含まれている事を2002年にスウェーデン食品庁とストックホルム大学が初めて発表した<sup>3,4)</sup>。以来、今日までの多くの調査から、油揚げしたり焼いたり調理加工を経た極めて広範な食品に多かれ少なかれアクリルアミドが含まれていることがわかっている。サブppmレベル以上の濃度でアクリルアミドを含む例が多く知られている食品として、高温加熱されたいも類、穀類加工製品、コーヒー、ほうじ茶(粒)などがある<sup>5,6)</sup>。このような食品中のアクリルアミドの多くは、食品成分であるアミノ酸(アスパラギン)と糖が高温の加熱により化学反応して生成することがこれまでの研究で明らかになっている。また、アクリルアミドは、食品中で危害要因として知られている化学物質の中で消費者の関心度が高く、現在進められている暴露量の推定からも優先的に調査、対策がなされるべき物質として国際的に認識されている<sup>7)</sup>。アクリルアミドを含む同一種類の加工食品でもロットにより大きく濃度がばらつく事が知られているため、実行可能な範囲でできるだけ低い濃度に押さえるべく、世界的に低減の努力が求められている。

#### 2. FAPAS<sup>®</sup>によるアクリルアミド技能試験

FAPAS<sup>®</sup> (food analysis performance assessment scheme) とは英国環境・食糧・農村地域省 (Defra, Department for Environment, Food and Rural Affairs) 傘下のセントラル・サイエンス・ラボラトリー (Central Science Laboratory, CSL) の実施する食品分野の化学分析技能試験プログラムである<sup>8)</sup>。食品をマトリクスとするアクリルアミドの技能試験は、シリーズ30として2002年からFAPASが実施を開始した(表1)。FAPASは技能試験の識別に、シリーズ番号とラウンド番号を用いていたが、2005年5月からは、シリーズ番号、ラウンド番号を組み合わせた4桁の数字で表記するようになった。変更前の最後は、FAPAS<sup>®</sup> Series 30 Round 11、変更後の最初はFAPAS<sup>®</sup> Proficiency Test 3012である。なお、この3012の分析対象はアクリルアミドではなく、フランであり、タイトルはACRYLAMIDE (AND

OTHER FOOD PROCESSING DERIVED CONTAMINANTS) となっている。食品中のアクリルアミドの発見後の2004年になって、フランも食品の加工によって生じる危害要因として新たに認識された化合物であることから<sup>9,10)</sup>、アクリルアミドを代表として広く食品加工により発生する汚染物質という、より上位の概念を持ったシリーズに変化したと言える。ただし、3000番台のシリーズでこれまでアクリルアミド以外の汚染物質が分析対象となったのはこの3012の回と2007年6月の3017の回だけである。アクリルアミドを対象とした技能試験は、2007年10月までに15回を数えている。なお、食品中のアクリルアミドの存在が知られた2002年は2回開催され、2003年と2004年は4回ずつに増えたが、2005年、2006年は2回、2007年は2回（2回目は11月中旬の予定）のペースの開催となっている。

この6年間の15回の技能試験の報告書をもとにFAPASによるアクリルアミド技能試験の傾向の推移を追ってみた（表1）。試験試料のアクリルアミド濃度範囲は60.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （朝食シリアル）から1843  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （オープン調理ポテト）まで広い。参加者の回答率は、初回（クリスプブレッド）の67%と第6回（朝食シリアル）の64%がやや低かったが、あとはいずれの回も75%を超えていた。これまでのマトリクスを回数の多いものから順に平均参加機関数（1機関から複数参加もあるため延べ数）と共に挙げると、朝食シリアル（breakfast cereal）：5回、40機関、クリスプブレッド（crispbread）：4回、55機関、ポテトチップ（potato crisp）：2回、44機関、コーヒー（coffee）：2回、33.5機関、ベビーラスク（baby rusk）：1回、38機関、オープン調理ポテト（冷凍品）（oven chip（potato））：1回、28機関、である。これらのマトリクスはいずれも欧米型の食習慣として摂食頻度の高いも

表1 FAPASによるアクリルアミド技能試験のマトリクスと参加者数

ラウンド	開始年月	試験マトリクス	均一性確認試験時の分析値 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	アクリルアミド濃度(付与値) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	濃度範囲 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ( $ z <2$ )	申込件数	申込者の国数	回答件数(回答率%)	満足な結果の報告件数(回答件数に対する%)
30-01	2002年7月	クリスプブレッド	1158	1213	836-1590	55	16	37 (67)	32 (86)
30-02	2002年11月	ポテトチップ	142	167	97-237	42	17	40 (95)	34 (87)
30-03	2003年2月	朝食シリアル(全粒小麦)	340	109	61-158	41	18	35 (85)	25 (71)
30-04	2003年7月	コーヒー	307	312	193-431	41	17	31 (76)	27 (87)
30-05	2003年8月	クリスプブレッド	1012	707	468-945	57	24	45 (79)	32 (71)
30-06	2003年11月	朝食シリアル(米)	118	95	53-137	45	22	29 (64)	23 (82)
30-07	2004年3月	オープン調理ポテト	2000	1843	1306-2381	28	15	23 (82)	22 (96)
30-08	2004年7月	コーヒー	170	174	102-247	26	10	20 (77)	17 (85)
30-09	2004年9月	ベビーラスク	1196	711	471-950	38	14	32 (84)	30 (94)
30-10	2004年11月	朝食シリアル	70.5	60.9	34.1-87.7	40	19	31 (78)	26 (84)
30-11	2005年3月	ポテトチップ	1276	1404	977-1830	46	16	40 (87)	34 (85)
3013	2005年8月	クリスプブレッド	258	232	139-324	51	20	44 (86)	39 (91)
3014	2006年1月	朝食シリアル	68.5	65.8	36.9-94.8	39	19	31 (79)	27 (87)
3015	2006年11月	クリスプブレッド	1071	1179	811-1547	57	24	49 (86)	43 (88)
3016	2007年3月	朝食シリアル	292	279	171-387	35	14	28 (80)	25 (89)

の、含有量の高いものが選定されており、参加者数の違いから、現在、各国で行われている研究や調査の精度管理ニーズを大まかに伺い知ることができて興味深い。ただし、日本やアジア諸国の食習慣は欧米と異なる部分も多く、現在、我が国で進められている各種調査分析ではより広範な多種多様の食品や料理が分析対象となっている。参加者数は時期による変動があるようにも見受けられるが、クリスピーブレッドのように開催時期を問わずいつも多くの参加者のあるマトリクスもある。筆者らの研究室では、様々な日本で食されている食品や料理の分析を行っているので、FAPASのアクリルアミドの試験にはマトリクスを限定せず、第2回以降すべて参加しているが、マトリクスの種類によって参加の有無を決める機関も多々存在し、主催者側がいつどのようなマトリクスで試験を計画するかがその時々参加者数に影響を与えているのではないかと考えられる。

### 3. 第1回目の技能試験

FAPASによる第1回目の技能試験が行われたのは2002年7月である。スウェーデンから食品中のアクリルアミドの存在が発表されたのが同年4月であるから、その僅か3ヶ月後には試験試料が配付された事になる。

本稿執筆の著者らがこの第1回アクリルアミド技能試験が行われたことを知ったのは、9月を過ぎてからであり、残念ながらこの技能試験へは参加していない。第1回目のアナウンスがなされた当時、食品中のアクリルアミドの分析は、分析手順に関する情報だけでなく、分析に必要な標準品の入手も不自由な状況であった。また、そもそも本当にアクリルアミドが食品に入っているのかという疑問が各国の追試データが徐々に伝わることでようやく晴れてきた段階でもあった。分析メソッドの開発からスタートし、食品総合研究所でGC-MS、LC-MS/MSによる分析が可能となったのは、8月上旬であり、この技能試験の存在を知っていたとしても、「満足な結果」が得られない可能性も高く、実際に分析に取り組んだ研究者が自発的に参加を決めていたかどうかは疑問である。しかし、当時アクリルアミドの分析を研究所のミッションとして取り組んでいた状況で、組織としては申込みに躊躇する必要はなかったはずである。2002年4月に端を発したアクリルアミド問題への取り組みの初動において意思決定や情報収集に甘さがあったと言わざるを得ない。

技能試験への参加者は、参加者集団における自身の結果の位置をzスコアとして知る事ができる以外に、全参加者（具体的な参加者名は伏せられる）が採用した分析法の概略と個々の報告値をいち早くレポートとして手にすることができる。論文やウェブページで報告される分析法やデータが極めて少ない段階であればあるほど、これらの情報は貴重である。このラウンドの参加者の回答率は67%と、第6回（朝食シリアル）の64%について低い値であり、分析態勢が十分に整わない状況で参加を決めた機関が多かったことを示している。

なお、FAPASの技能試験に用いられた試験試料は在庫があれば販売されており、認証値を持たないものの均一性確認データと技能試験参加機関による付与値を参考値として利用できるため、技能試験に参加し損ねた場合はそれを購入して各自の分析法、分析技術の確認に用いることができる。ただし、技能試験試料は標準物質を想定した長期安定試験は行っていないため、販売元に認証標準物質のようなレスポンスビリティを期待することはできず、利用は自己責任となる。

#### 4. 第2回～第10回（2002～2005年）

第2回の回答率は95%と全15ラウンド中最高であったが、ロバスト変動係数は30%と極めて大きく、参加者の分析値の分布が大きく広がっていたことを示している。さらに、第3回、第5回の2回は分析値の分布が正規分布から外れて2峰性を示し、全回答者の7割程度しか $|z| \leq 2$ を満足していない（表1）。第3回では値が高い方に、第5回では値が低い方に不満な回答が多かった。この原因はよくわからない。この2回を除くと、全ラウンドの回答数のうち満足な分析値が得られた割合は80%を超える。この時期、分析法そのものが研究対象であり、さまざまなアクリルアミドの分析法が報文として報告された。中には、一旦、世に発表されながら、後に抽出操作中にアクリルアミドが生成してバイアスがかかる事が指摘された抽出操作もあった。このように評価の定まらない分析法が多く世に出たなかで、他の技能試験参加者がどのような分析法を採用してzスコアがどのような位置にあるかを知る事ができることに大きな意義があった。また、FAPASのラウンド毎の報告書で開示される均一性確認試験時の分析値がしばしば付与値（assigned value）と大きく異なるケースも見られた。

2004年3月の第7回の分析試料オープン調理ポテト（oven chip）は、冷凍品が受け取れる（あるいは解凍してしまっても構わない）という条件が付帯しており、参加者の最も少なかったラウンドであった。筆者の研究室では、事前に受け入れられるかどうか確認の後、英国から冷凍して航空便で送ってもらったが、保冷剤も分析試料も融けている状態で到着した。しかし、結果的には妥当な分析値が得られた。第6回の朝食シリアルは64%と、これまでで最も回答率が低かったラウンドであるが、アクリルアミド濃度がこの技能試験としては低い方の $95\mu\text{g}/\text{kg}$ だったことも影響しているかもしれない。ただし、第10回と第13回の朝食シリアルのアクリルアミド濃度はさらに低い、回答率は78-79%であった。

#### 5. 第11回～第15回（2006～現在）

開催頻度が年2回となったが、参加者数は大きく変化していない。試験結果と一緒に返送されるレポートを見ると、参加者が参考にした参考文献の種類が増加していることから、分析法の細かなバリエーションが増えていることがわかる。また、以前はしばしば見られたFAPASの行う均一性確認試験時の分析値と付与

値の大きな不一致は見られなくなった（表1）。

## 6. 技能試験参加者の分析法

技能試験参加者は分析値を報告する際に、各自が用いた分析法についても、アンケート形式で質問票の欄を埋める方式で報告することになっている。その回答内容は、FAPASの各ラウンドの報告書に分析値に関する集計とともにまとめて掲載される。質問票を提出していなかったり記述が不十分な参加者もあるため、分析法に関する集計には一部情報の抜け落ちはあるものの、その集計を見ると分析法の傾向や推移を知ることができる（表2）。内標準についてみると、アクリルアミド- $d_3$ を使用している場合が最も多い。次に多いのが1,2,3- $^{13}C$ -アクリルアミドであるが、1,2,3- $^{13}C$ -アクリルアミドの使用割合は2004年あたりから高くなってきている。その他の内標準としては、メタクリルアミド、プロピオンアミドなどがある。アクリルアミド- $d_3$ や1,2,3- $^{13}C$ -アクリルアミドを用いた場合には分析値が $|z| > 2$ となった割合は1割前後であるのに対して、その他の内標準を使用した場合や内標準を用いなかった場合の $|z| > 2$ は3割程度と高かった。

抽出に使用する溶媒はほとんどの場合が水である。抽出液の分離には遠心分離や濾過が用いられる。ヘキサンで脱脂を行う場合もあり、Carrez 試薬で除タンパクを行う場合もある。精製に固相抽出を用いる場合もある。

検出・定量方法としては、GC-MS法とLC-MS/MS法が主であるが、2004年からはLC-MS/MS法を採用している数がGC-MS法の件数よりも多い傾向が見られ、LC-MS/MS法の普及がうかがえる。ただし実際に使用された装置は三連四重極型であるカイオントラップ型（MS<sup>n</sup>）なのか必ずしも明確でない。これらは

表2 FAPASによるアクリルアミド技能試験で用いられた内標準と検出法

ラウンド	内標準（報告件数（ $ z  > 2$ の件数））				検出法（報告件数 $ z  > 2$ の件数）						
	アクリルアミド- $d_3$	1,2,3- $^{13}C$ -アクリルアミド	その他	内標なし	GC	GC-MS		GC-MSMS	LC	LCMS	LC-MSMS
						誘導体化GC-MS	非誘導体化GC-MS				
30-01	18 (2)	5	10 (2)	2 (1)	1	18 (3)		1		14 (2)	8
30-02	21 (3)	7 (1)	8	2 (1)		18 (2)				12 (3)	9
30-03	20 (4)	6 (1)	8 (4)	2 (1)		13 (3)		1		9 (3)	13 (4)
30-04	20 (2)	10 (1)	2 (1)	3		10 (1)		1		3 (1)	17 (2)
30-05	26 (5)	9 (2)	7 (4)			20 (6)		1	1 (1)	2 (1)	21 (4)
30-06	16 (3)	7 (1)	5 (1)	1		15 (4)			1	2	12 (1)
30-07	13	8	2	1 (1)		7	4	1		1	10 (1)
30-08	15 (3)	3		1		5 (2)	1	1		1	11 (1)
30-09	9 (1)	14 (1)	2	1		8 (2)	1	1		1	15
30-10	15 (1)	4	3 (1)	1	1	5	2 (1)				14 (1)
30-11	16 (1)	13	2 (1)	1		8	3 (2)	3	1		18 (2)
3013	19 (1)	17	3	3 (2)	2	11	7 (3)	3		1	17 (1)
3014	14	9 (1)	3 (1)			7	4 (1)	1	3 (2)	1	12
3015	16	18 (3)	5 (2)	2 (1)		14	3	2	3	3 (2)	21 (4)
3016	14 (1)	6 (1)	4 (1)			10	1	1		1	13 (3)

プリカーサイオンとプロダクトイオンの分離を空間的に行うか時間的に行うかの違いがあり、同じMS/MS測定であっても原理的にまったく異なるものである。夾雑イオンの影響を受けにくく特に定量性に優れているのは前者の三連四重極型であり、初期のアクリルアミドの分析値はすべてこのタイプで出されたものである。LCのカラムはC18系を用いる場合が最も多いが、次いでグラファイト系が使用されている。第1回と第3回にかけてはLC-MS法も多く、第1回と第2回ではLC-MS/MS法の件数を上回っていたが、その後はLC-MS法を採用する参加者は少なくなっている。LC-MS/MS法では $|z| > 2$ となる割合が11%であるのに対して、LC-MS法では24%、LC法では33%と多くなっている。アクリルアミドは水溶性が高く分子量が小さいため、従来の逆相系のカラムでは保持が弱く夾雑物との十分な分離が難しいため、満足な分析には前処理とカラム選択を十分に吟味する必要がある。この分析メソッドに対する要求度が、高い選択性をもつ検出器の使用によって大きく下がるため、同じLCを用いた分析法であってもこのような違いとなって現れたと考えられる。

GCのカラムには50% phenyl 50% methyl-polysiloxaneが使われることが多いが、5% phenyl 95% methyl-polysiloxaneやpolyethylene glycolもよく使用される。GC-MS法に関しては、第7回目の報告から、誘導体化法と非誘導体化法を区別して報告することになった。主流である誘導体化法では $|z| > 2$ となる割合は5%であるのに対して、非誘導体化法では27%となっている。誘導体化法は非誘導体化法にくらべて操作が煩雑となりやすいが、誘導体化されたアクリルアミドは極性が下がるため、高極性の夾雑物との分離が容易になる利点がある。詳細は不明であるが、非誘導体化GC-MS法で $|z| > 2$ となった場合は必ず分析値が高くなっていることから、高極性の夾雑物としてアスパラギンと還元糖のように、GC導入部の温度で反応してアクリルアミドを生じるものが残存したケースもあるのではないかと思われる。

ちなみに著者らの研究所では、第2回目から参加しているが、この第2回のみLC-MS/MS法と誘導体化GC-MS法の二つの方法<sup>11)</sup>での参加で、3回目以降はすべて誘導体化GC-MS法だけの参加である。著者らの研究グループでは、誘導体化GC-MS法で日本で喫食される料理や食品中のアクリルアミドの分析を行っている。著者らの研究グループの方法は、アクリルアミド- $d_3$ を内標準として用い、水抽出、遠心分離、混合相固相抽出、臭素誘導体化後に、GC-MS法により定量を行う。定量には $m/z$  150と152（内標準については $m/z$  153と155）の2種類のフラグメントイオンが使用できるので、夾雑物の妨害を受けにくい方法と考えている。

なお、第6回までのFAPASのアクリルアミド技能試験の結果については、まとめの論文<sup>12,13)</sup>が出ているので参照されたい。

## 7. 最後に

不定期であってもアクリルアミドを継続的に分析する状況が続く限り、技能試験には参加を続けることが肝要である。z-スコアの値に一喜一憂するばかりでなく、継続的に参加する事で分析結果にバイアス傾向がみられないか、他の参加者が参考としている文献や新しい分析法を取り入れた参加者の結果がどうであったか、など、レポートから得られる情報を読み解く事で分析法の改良や分析の現場レベルの技術水準について世界的な動向の一旦を知る事に役立っている。

(食品分析研究領域 状態分析ユニット 小野 裕嗣, 吉田 充)

## 参考文献

- 1) 環境省：化学物質の環境リスク評価（第2巻），p 1-11，アクリルアミド，平成15年3月
- 2) 15107の化学商品，p347-348，アクリルアミド，化学工業日報社，平成19年1月
- 3) Rosén, J. and Hellenäs, K., Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Analyst*, **127**, 880-882 (2002).
- 4) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Törnqvist, M., Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4998-5006 (2002)
- 5) 農林水産省，アクリルアミドに関する情報  
[http://www.maff.go.jp/syohi\\_anzen/acrylamide/index.html](http://www.maff.go.jp/syohi_anzen/acrylamide/index.html)
- 6) 食品安全委員会，ファクトシート「加工食品中のアクリルアミド」，  
<http://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets.html>
- 7) 64回FAO/WHO合同食品添加物専門家会議（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA),）レポート，  
[http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary\\_report\\_64\\_final.pdf](http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en/summary_report_64_final.pdf)
- 8) FAPASのホームページ。日本語のページがあり，代理店情報も掲載されている。  
<http://www.fapas.com/>
- 9) Report of the CONTAM Panel on provisional findings on furan in food,2004.7,[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178620772979.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620772979.htm)
- 10) Maga, J. A., CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, "Furans in foods," pp. 355-400, 1979
- 11) 吉田充，小野裕嗣，亀山真由美，忠田吉弘，箭田浩士，小林秀誉，石坂眞澄，日本で市販されている加工食品中のアクリルアミドの分析，*食料工*，**49**, 822-825 (2002).

- 12) Clarke, D. B., Kelly, J. and Wilson, L. A., Assessment of performance of laboratories in determining acrylamide in crispbread. *J. AOAC Int.*, **85**, 1370-1373 (2002).
- 13) Owen, L. M., Castle, L., Kelly, J., Wilson, L. and Lloyd, A. S., Acrylamide analysis: Assessment of results from six rounds of Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS®) proficiency testing. *J. AOAC Int.*, **88**, 285-291 (2005).

## 2. 一般成分，無機元素ほか

### 1. はじめに

FAPAS (Food Analytical Performance Assessment Scheme, 食品化学分析技術評価, 英国環境食品農業部セントラス・サイエンス・ラボラトリー (CSL) が実施している技能評価試験プログラム) と日本分析化学会主催の食品成分の分析技能試験に参加している。

測定方法としては、当研究室で従来から行っている方法に準じているが、有害な有機溶媒を使う場合やHPLC、GC、ICP-OESなど高感度機器で測定が代替できれば、試料からの成分抽出法は公認された方法に従い、測定は最新機器に変更して行った。また、実績がなく新たに挑戦する測定項目や技能試験結果が思わしくない場合には、AOAC Int.で公認されている測定法<sup>1)</sup>、日本食品標準成分表分析マニュアル<sup>2)</sup>やその解説書<sup>3)</sup>、新・食品分析法<sup>4)</sup>などに記載の方法に従った。

通常、標準物質の測定はその測定法の妥当性確認が主目的であるが、技能試験での測定にも、試料と同じか類似のマトリックスで、技能試験の分析項目となっている認証値か参考値が付与されている標準物質を同時にサンプル調製し、測定している。試薬を高純度な溶液（水や酸）に溶かした標準溶液で定量用検量線を作成した場合、試料から溶出した種々の成分の影響が考慮されないため、正確な値が得られない場合がある。また、標準物質の測定結果を認証値と比較すれば、そのような現象が起きているか否かを検証できる。

種々のマトリックスで色々な成分の認証測定値が付与された標準物質が各国から供給されているが、適当な物が見つからない場合もある。その場合には、以前に同じ分析項目の技能試験に参加していれば、分析項目の中央値が記載されている試料が活用できる。それ故、技能試験に用いた試料は再密封をして確実に保管しておくべきである。

技能試験を報告する方法や単位は決まっており、乾燥重量当たりの報告も受ける場合もあるが、通常は送られてきた状態そのままの重さ当たりで報告するケースが多い。これは各参加機関が乾重量を測定すると意外に誤差が大きく、それを含量の計算に使われると測定対象成分の本当の誤差が分からなくなるためである。

また、基礎となる重量が「送られてきた状態そのままの重さ当たり」であり、通常は均一性を考えて細粉状態の試料がほとんどなため、空気中の湿度の影響を受けやすい。そこで、封を開いたらできるだけ短時間で試料の計量を済ませる、計量中の試料の口は開放状態にしないで閉じる等の注意を払う必要がある。さらに、計量後は速やかに密封（シールする）して水分含量が変わらないようにするのも、標準物質的な使用を考える場合には必要である。

## 2. FAPASの技能試験

小麦粉（分析項目：水分、灰分、窒素。総食物繊維は測定せず）、挽きコーヒー（分析項目：脱カフェと通常のコーヒー中のカフェイン）、オートミール（分析項目：水分、灰分、窒素。粗脂肪と総食物繊維は測定せず）、大豆粉（分析項目：アルミニウム、総砒素、カドミウム、鉛。総水銀は測定せず）、粉ミルク（分析項目：カルシウムとセレン。ヨウ素は測定せず）に参加した。

参加する分析項目に元素分析が加わったのは、研究テーマの変化により元素測定の研究も行うようになり、それと連動して、それにマッチする技能試験に参加したためである。

試料の送付形態は、アルミ入りラミネート袋やポリプロピレン製ビンである。試料数は一つだけで、結果報告も測定値一つだけであるが、報告単位がg/kgやmg/kgなどと指定してあるので注意する必要がある。

データ解析については、ホームページより入手できる<sup>5)</sup>。

### 2.1 FAPASの小麦粉とオートミールの分析

水分はAOACの方法で135℃・1時間<sup>6)</sup>、灰分はリンが多い小麦やオートミールに適應される酢酸マグネシウム添加法（そのまま灰化するとリン酸化合物が試料を包み込んで酸化されずに灰化が不完全になるので、灰化前にリン酸を中和させる）、で灰化を700℃で行った<sup>7)</sup>。ただ、FAPASから送られてくる報告書を見ると、水分含量は100℃前後、灰分も前記の添加操作を行わず500～600℃で灰化している機関も多い。

全窒素分析は、ケルダール法<sup>8)</sup>、燃焼法<sup>9)</sup> どちらの方法でも良いが、手間と時間を考えると燃焼法になる。ただ、実際は両方法により全窒素量を求め、ケルダール法と燃焼法の違いを確認している。畜肉、魚肉、粉乳など、窒素含量が高い（たんぱく質も多いが核酸も多く含む）食品は、ケルダール法に比較して燃焼法の方が高い値が得られる<sup>10)</sup> が、小麦など穀類ではほとんど同じである<sup>9,11)</sup>。

総食物繊維の測定も始めて参加した時は報告したが、当研究室で通常行う測定ではなく専用の器具類や大量の試薬を必要とし時間も取られるので、測定しなくなった。このように、技能試験の分析項目にあるもので参加できるものだけ測定・報告することもできる。

本技能試験の報告書から、参加機関の方法などを以下に要約した。

報告された $|Z| \leq 2$ の割合は、灰分で57～93%、水分65～90%、窒素分は90～96%と高かった。灰分では600℃以下で、水分では105℃以下で測定した場合の $|Z| \leq 2$ の割合がより低くなった。

水分、灰分、窒素分とも種々の公定法を参考にしている。窒素分では2003年には燃焼法とケルダール法が半々であったが、2004～2006年では燃焼法が20-25%に減少した。 $|Z| \geq 2$ を出した試験室は実験条件の記載がない傾向が強いが、窒

素分での $|Z| \geq 2$ の報告例はほとんどケルダール法だった。2005年から、灰分は400-600℃と700-910℃、水分は100-105℃と130-135℃で、結果が分けられた。また、2006年からは予備炭化の方法を記載するようになった。水分では放冷にデシケーターを使わない例で $|Z| \geq 2$ の報告が複数あった。

## 2.2 FAPASのコーヒー中のカフェイン分析

挽いてある通常のコーヒーと脱カフェインされたコーヒーが試料である。後者のカフェイン含量は前者の1/15~1/40と、大きな差がある。

AOACにあるカフェイン定量<sup>12)</sup>は、コーヒーからカフェインをお湯で煮出し、クロロホルムで抽出し、ケルダール法で全窒素を測定してカフェイン量を求める方法、あるいは、抽出試料を吸着させたカラムからエーテルやクロロホルムを通してカフェインを溶出させてその吸光度を測定する方法が載っている。エーテルやクロロホルムの使用は避けたいので、お湯で抽出した液をHPLCで測定した。

また、当研究室にあるHPLCはこの技能試験参加時は必ず稼働させるので、種々の部品の交換など、年に一回のメンテナンスの良い機会となっている。

本技能試験の報告書には、参加機関がどのような方法を参考にしたのか、サンプル処理・抽出法やHPLCの注入量やカラムの種類や温度、溶離液の種類やpH、アイソクラティックかグラジエントか、標品の入手先、検出器の種類と検出波長、他の定量方法の場合にはその方法についてまとめて記載してある。

報告された $|Z| \leq 2$ の割合は、レギュラコーヒーで64~90%、脱カフェインコーヒーでは50~75%であった

カラムはC18が70%、C8が15%位、グラジエントの割合が60%、標品はSigma/Aldrich製やMerck製、Fluka製が多い。測定波長は200-280nmの吸収を測定しており、年々波長幅を細かく報告させたため、2006年では272nmが60%で270-278nmに90%が集まっていた。ほとんどの機関がHPLCで測定しているが、違う方法による参加も2~3試験室あった。その場合の $z$ -scoreが10以上になるとの報告が複数あった。 $|Z| \geq 2$ の値を出す試験室は試験条件の報告がない傾向があり、試験条件が不明な場合が多いが、HPLCは使っていてもなぜそんなに測定値がずれたのか想像もできない例もあった。

私の場合は、濃度が極端に違うカフェイン濃度を一本の検量線で定量した場合に低濃度の脱カフェインコーヒーのカフェイン量が不正確になった。検量線自体の統計的な定量性は良かったが、低濃度、高濃度の2本の検量線を作るべきであった。

## 2.3 FAPASの大豆、粉ミルクの元素の定量

栄養成分であるカルシウム、セレンあるいは環境汚染物質であるアルミニウム、総砒素、カドミウム、鉛を測定した。測定専用器具類がない総水銀や測定実績がないヨウ素は参加しなかった。

これらの元素は、何れも硝酸と過塩素酸による開放系の湿式分解で試料調製を行い、ICP-OES (Inductivity Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer, 誘導結合高周波プラズマ発光分析装置) と ICP-MS (Inductivity Coupled Plasma Mass Spectrometer, 誘導結合高周波プラズマ質量分析計) により、元素の定量を行った。AAS (原子吸光分光装置) でも測定したが、技能試験の報告には使わなかった。

まずは、水素化物発生装置を使い、発生した気体化した砒素やセレンの水素化物の吸光度を原子吸光分光装置で定量する方法の測定を試みた<sup>12)</sup>。その感度は高いのだが、通常の農畜産物中の濃度では定量限界値近くとなり、満足な結果が得られなかった。

そこで、通常の湿式分解法で測定試料を調製し、ICP-MSにより砒素の原子イオン数75で定量した。この方法は公認されていないので、認証物質で定量性の確認をするため、NIST (National Institute of Standards and Technology) の玄米 (NIST SRM 1568a Rice Flour), リンゴ葉 (NIST SRM 1515 Apple Leaves), ほうれん草 (NIST SRM 1570a Spinach Leaves) の各認証標準物質を同じ操作方法で試料調製し、ICP-MSで定量した。その結果、Asの認証値範囲に入る結果を得られたので、定量性に問題はないと判断し、技能試験試料を定量したところ、その結果は満足のいくものであった。

カドミウムやセレン、鉛も、総砒素と同様に、通常の湿式分解による調製溶液を使い、ICP-MSで定量した。その結果、各元素の測定結果は認証標準物質中の各元素の認証値範囲に入る測定結果が得られ、かつ、各元素とも技能試験結果は満足なものであった。

本技能試験の報告書によると、報告された $|Z| \leq 2$ の割合は、大豆のアルミニウムが40%と低く、総砒素は72%、鉛は77%、カドミウムは91%と高かった。また、粉ミルクのカルシウム84%、セレン86%であった。試料調製に乾式灰化や湿式分解も使われるが、60%程度が密閉系で分解できるマイクロウェーブ分解装置であった。測定はAASやICP-OES、ICP-MSが使われているが、どの装置を使えば外れ値が少ないといった傾向はなかった。

総砒素の測定では、水素化物発生装置が30%以上使われ、AASだけでなくICP-OESとの組み合わせもあった。ICP-MSやICP-OESの単独使用がそれぞれ20%程度、残り15%はグラファイトファーネスAASであった。

アルミニウムでは報告結果の60%、総砒素でも約30%が $|Z| \geq 2$ であったが、共に測定値の変動を示唆する、ピークが二つのある測定分布図がついていた。

### 3. 日本分析化学会主催の食品成分の分析技能

この技能試験は平成16年度から始まり、年1回のペースで実施されている。参加は事業所単位で、日本分析化学会の団体会員は参加料が少し優遇される。試料が毎回変わるが、分析項目は、水分、タンパク質、脂質、灰分、Ca、P、Na、

Fe各元素の定量と、同じである。

第一回目はガラスビン入りの全脂粉乳，第二回目は販売形態と同様な棒状のロケット包装された魚肉ソーセージ，第三回目は販売形態と同じ金属蓋付きガラス容器に密閉されたベビーフードであった。何れも同一バッチが2試料送付され，試験結果の報告も各試料2反復で計4測定値を送付した。

また，第二回と三回は水分含量が多い試料であり，水分含量の測定方法は乾燥助剤としてケイ砂かケイソウ土を使い，秤量容器に収まる短いガラス棒で試料を乾燥助剤とかき混ぜて予備乾燥を行う必要があった<sup>14)</sup>。私が所属する研究室では，このような多水分系の試料は通常ほとんど扱わず，脂質の定量も年に一回だけなのだが，普段やらない分析方法を習得したり復習するのも，この技能試験への参加は良い機会となっている。

第二回目のタンパク質の定量は，測定法としてケルダール法が指定してあったが，燃焼法で報告した。一般に燃焼法による魚肉や畜肉の窒素測定値はケルダール法に比べて高くなり<sup>10)</sup>，報告値も中心値よりも11%程度高い値となった。ケルダール法は非常に優秀な測定法<sup>15)</sup>で，測定者や測定機関が異なってもその測定値はほとんど振れないので，計算された $z$ -scoreは4.4と不満足な結果となった。測定の手間を惜しんだ結果であった。そこで，第三回目の試験ではケルダール法で測定し，その $z$ -scoreは1以下であった。

元素分析の試料調製方法は乾式灰化法が54~78%と多く，逆に湿式分解は30%以下と意外に少ない。マイクロウェーブ分解装置の使用は10%前後で，日本国内ではまだ余り普及していないようである。

ナトリウムの定量に用いる塩酸抽出法も31~40%と意外に多い。この方法で抽出するとAASで測定することになる。私の場合，試料調製は湿式分解法だけでさらに一回の一斉分析で測定も済ませたが， $z$ -scoreは何れも1以下だった。

灰分は550℃~600℃での報告の中に800℃の報告が入っていたが，その $z$ -scoreは-4.1と完全な外れ値である。日頃の測定条件でこのように大きく外れた場合には，その測定条件を文献などで調査して改められるべきである。

乾燥助剤の使用は魚肉ソーセージで40%だったが，より水分含量が多いベビーフードでは74%と大幅に増えている。また，水分測定で $|Z| \geq 2$ を出した機関は，105℃か135℃という乾燥温度よりも乾燥助剤を未使用の場合に多かった。それでも，何も使わなくても中心付近の値を出した機関もある。また，報告の桁を間違えたと考えられる例もあった。

(食品分析研究領域 分析ユニット 堀田 博)

## 参考文献

- 1) Edited by W. Horwitz, "Official Methods of Analysis of AOAC Int." 17th ED, volume I and II, (2003), AOAC Int., Gaithersburg, MD, USA.
- 2) 分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説, 財団法人日本食品分析センター編集, 中央法規, 2001
- 3) 五訂増補 日本食品標準成分表 分析マニュアル, 文部科学省 科学技術・学術審査会 資源調査分科会 食品成分委員会 資料, 国立印刷局, 2005.
- 4) 新・食品分析法, 日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編, 光琳, 1999
- 5) Protocol for the Organization and Analysis of Data, 6th edition, 2002, Food Analysis Performance Assessment Scheme ( FAPAS), Central Science Laboratory, UK.  
<http://www.fapas.com/pdfpub/FAPASProtocol.pdf>
- 6) Edited by W. Horwitz, 32.1.03 AOAC Official Method 995.10, "Official Methods of Analysis of AOAC Int. " 17th ED, volume II, Ch32, p1 (2003), AOAC Int., Gaithersburg, MD, USA.
- 7) 新・食品分析法, 日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編, 1 - 6 灰分, pp104-pp105, 光琳, 1999
- 8) P. F. Kane, Comparison of HgO and CuSO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> as Catalysts in Manual Kjeldahl Digestion for Determination of Crude Protein in Animal Feeds: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **70**, 907, 1987.
- 9) 堀田 博, 燃烧法による玄米中の全窒素定量の室間共同試験, 分析化学, **55**, 323, 2006.
- 10) M. K. Brink and J. G. Sebranek, Combustion Method for Determination of Crude Protein in Meat and Meat Products: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **76**, 787, 1993.
- 11) R. C. Bicsak, Comparison of Kjeldahl Method for Determination of Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds with Generic Combustion Method: Collaborative Study, *J. AOAC Int.*, **76**, 780, 1993.
- 12) Edited by W., Horwitz, 30.1.11 AOAC Official Method 960.25及び30.1.12 AOAC Official Method 979.11, "Official Methods of Analysis of AOAC Int. " 17th ED, volume II, Ch30, p 2-3 (2003), AOAC Int., Gaithersburg, MD, USA.
- 13) 新・食品分析法, 日本食品科学工学会, 新・食品分析法編集委員会編, 2 - 4 -19 ヒ素, pp247-pp250, 光琳, 1999
- 14) 分析実務者が書いた五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説, I - 1 - 2 乾燥助剤添加法, p12-14, 財団法人日本食品分析センター編集, 中央法規, 2001
- 15) 野澤慎太郎, 坂井田健一, 鈴木忠直, 安井明美, Kjeldahl法によるしょうゆの全窒素定量における分解条件の最適化, 分析化学, **55**, 15, 2006.

## Ⅶ 用語集

凡例：数字，A B C 順，50音順に記載。本書中で説明を要すると思われる主な用語を収録した。

### 95%信頼区間 (95% confidence interval)

母集団パラメータの推定を100回試行したら，95回は推定したパラメータの値が含まれていると期待できる範囲のこと。危険率5%を両側に設定した場合は，95%信頼区間に下限と上限の両端が存在し，危険率5%を下側又は上側の片側で設定した95%片側信頼区間では，信頼区間の下限又は上限の一方のみに注目して利用する。

### AQL (accepted quality level:合格品質水準)

食品の品質の水準が，AQLよりも好ましい場合には高い確率で合格する。しかしながら，まれに不合格になり，このAQLに達しながら不合格になる確率は生産者危険と呼ばれる。生産者危険は通常5%に設定される。

### HEATOXプロジェクト

アクリルアミドをはじめとする加熱によって生成する食品中の有害化学物質に関して，協力して取組みを進めるため，欧州連合加盟国が2003年11月から立ち上げた3カ年のプロジェクト。14カ国から24団体が参加した。

### HorRat (Horwitz ratio)

化学分析の定量法の精度について，妥当性を判断する性能指標として用いられる比である。この比の分子は，実験から得られた室間再現相対標準偏差，分母はHorwitzの式から計算した室間再現相対標準偏差の予測値である。Horwitzの式は，化学分析法の室間再現精度がマトリックス，分析対象成分，分析法に依存せず濃度だけに依存することを示した経験則の式である。AOACの室間共同試験のガイドライン（2005）には，HorRatが0.5より大きく2以下なら妥当と記載されている。

### LC-MS/MS

液体クロマトグラフィータンデム質量分析。液体クロマトグラフに質量分析計を2台直列に接続し，試料混合物中の各成分を液体クロマトグラフで分離し，それを1段目の質量分析計のイオン化室でイオン化し，生成したイオン種のうちの一つをプリカーサーイオンとして選択して2段目の質量分析計に導入し，そのプリカーサーイオンの分解から生じるイオン（プロダクトイオン）を検出する方法。質量分析計を直列に接続する代わりに，イオントラップ型の質量分析計を使用して，1台の質量分析計の中で1段目と2段目の質量分析を行う方法もあるが，定量分析には直列接続型装置の方が適している。

## LQ (limited quality, LQL : limited quality level と呼ばれる:限界品質)

食品の品質の水準が、LQより悪い場合には高い確率で不合格とする。しかしながら、まれに合格になり、この合格になる確率を消費者危険と呼ぶ。

## 一元分散分析 (one-way analysis of variance)

分散分析は、実験計画法のなかの有力な手法であり、線形モデルをデータに当てはめて解析する。興味ある処理効果を検定によって確認する目的で、処理水準を意図的に変えた実験データを解析する場合は母数モデルを用いる。処理水準は確率的に変動すると考えて、モデル中の変動要因の分散を推定する目的で解析する場合は変量モデルを用いる。一元分散分析では、一つの主変動因子と一つの誤差因子の和で構成されたモデルを用いて、全体の分散を群間の分散と群内の分散の二つに分解して解析する。各群の平均値はすべて等しいといえるかを検定する場合は母数モデルを用いる。配付試料の均質性確認（主変動因子はサンプリング誤差）や空間共同試験（主変動因子は空間誤差）の解析では、変量モデル中の分散パラメータを推定するために一元分散分析を用いている。

## エレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI)

質量分析におけるイオン化法の一種で、キャピラリーに高電圧をかけて試料を噴霧、イオン化する方法。試料を気化させる必要がないため、熱不安定物質や難揮発性物質の測定に向いている。

## カラムスイッチング

液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) において、分析対象物質をバルブを切り替えながら複数のカラムを通過させて共存物質から分離して分析する方法。

## ガスクロマトグラフィー質量分析

### (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)

ガスクロマトグラフと質量分析計を接続し、試料混合物中の各成分をガスクロマトグラフで分離しながら溶出順に質量分析を行う分析方法。

## かたより (bias)

測定結果の期待値と、採択された参照値との差。(JIS Z8101-2)

## 帰無仮説

仮説検定において、母集団パラメータ（母数）に関する仮説のうち、検定統計量の確率分布を計算するために設定する仮説のこと。この仮説のもとでの発生確率が、あらかじめ設定した有意水準（危険率ともいう）以下の低い確率の場合は、この仮説を棄却して対立仮説を採用する。

## 均一性、不均一性 (homogeneity, heterogeneity)

特性が物質の量すべてにおいて一定に分布している程度。(Horwitz, 1990)

## グラブス検定 (Grubb's test)

データ分布として正規分布を仮定した外れ値検定法である。検定統計量は数種

類報告されているが、分析法の妥当性確認が目的の空間共同試験のハーモナイズドプロトコルには、外れ値候補の除去による不偏標準偏差の減少率(%)である $100(1 - \text{除去後の不偏標準偏差} / \text{除去前の不偏標準偏差})$ が検定統計量として記載されている。この検定統計量の数表に記載された棄却限界値よりも計算した検定統計量の値が大きければ有意であり、外れ値候補は外れ値としてデータから除外する。データのなかの最小値又は最大値を外れ値候補にするシングルグラブス検定(single Grubbs test)と、最小値と2番目に小さい値の2個、最大値と2番目に大きい値の2個、又は最小値と最大値の2個を外れ値候補にするペアグラブス検定(paired Grubbs test)を順に用いる逐次検定法が、空間共同試験のハーモナイズドプロトコルには各試験所の平均値の外れ値検定法として記載されている。

### コクラン検定 (Cochran's test)

分散分析の前提条件である各群内のばらつき(分散)が等しいという仮定が成り立つか確認するための検定法である。この検定では、各群の測定値のばらつきは正規分布に従うと仮定している。各群の不偏標準偏差の2乗(不偏分散)を計算し、(各群の不偏分散のなかの最大値)/(各群の不偏分散の和)によって求める値が検定統計量である。この検定統計量の数表に記載された棄却限界値よりも計算した検定統計量の値が大きければ有意であり、不偏分散が最大の群は外れ値としてデータから除外する。均質性の確認試験及び分析法の妥当性確認が目的の空間共同試験のデータ解析で、一元分散分析を行うデータについて、各群の分散の外れ値検定法として用いられている。

### 酵素免疫測定 (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA) 法

サンプル中に含まれる微量の目的物質を、酵素標識した抗体または抗原を用い、抗原抗体反応を利用して定量的に検出する方法。ELISA法は、測定原理の違いからサンドイッチ法と競合法の二つに大別される。また、同様の原理に基づく放射免疫測定(ラジオイムノアッセイ; RIA)と比べて、放射性物質を用いないため安全性が高く、安価で簡便であるため、微量タンパク質等の検出・定量に広く用いられている。

### 国際がん研究機関による発がん性の分類

世界保健機関(WHO)の付属組織国際がん研究機関(International Agency for Research on Cancer, IARC)では、化学物質の人に対する発がん性を疫学および動物実験の結果に基づいて以下の5つのグループに分類している。

- 1 : 人に対して発がん性がある。
- 2 A : 人に対しておそらく発がん性がある。
- 2 B : 人に対して発がん性があるかもしれない。
- 3 : 人に対する発がん性については分類できない。
- 4 : 人に対して恐らく発がん性がない。

### サンプリング誤差 (sampling error)

全体の誤差（母集団の値から、サンプルから推定した値を引いた値）のうち、母集団の一部のみを用いて、全体へ外挿したことにより、分析あるいは試験による誤差とは区別できるもの。これは、母集団の均一性が欠けているために生じる。（Horwitz, 1990）

### （採択された）参照値 (accepted reference value)

次のようにして得られた、比較のために容認された標準として役立つ値。a) 科学的原理に基づく理論値又は確定値。b) ある国家、又は国際機関の実験研究に基づく付与値、又は認証値。c) 科学又は技術集団の主催する共同実験研究に基づく合意値、又は認証値。d) a), b), c) のいずれにも拠ることができないときは、その量の期待値、すなわちその測定値の母集団の平均値。（JIS Z8101-2）

### 試験室間共同試験 (interlaboratry study)

複数の試験所によって行われる試験で、試験目的によっていくつかの室間共同試験が存在する。① Method-Performance Study: 分析法プロトコルの妥当性確認を目的に行う試験 (collaborative studyともいう) では、各試験所は配付された均質な試料を同一のプロトコルに従って分析し、その結果から分析法の性能評価を行う。② Laboratory-Performance (Proficiency) Study: 試験所の分析能力の評価が目的の試験 (技能試験, proficiency testing) では、各試験所は配付された均質な試料を得意な分析法で分析し、その結果から各試験所の分析能力の評価を行う。③ Material-Certification Study: 標準物質の値付けが目的の試験では、各試験所は配付された均質な試料を指定された分析法で分析し、その結果から分析対象成分の値及び不確かさを決定する。

①の引用文献: Horwitz, W. (1995). Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies. *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343.

<http://www.iupac.org/publications/pac/1995/pdf/6702x0331.pdf>

### （室間）再現精度 (reproducibility)

同一と見なせるような測定試料について、同じ方法を用い、異なる試験室で、異なるオペレーターが、異なる装置を用いて、独立な測定結果を得る測定条件による測定結果の精度。（JIS Z8101-2）

### （室間）再現標準偏差 (reproducibility standard deviation)

同一と見なせるような測定試料について、同じ方法を用い、異なる試験室で、異なるオペレーターが、異なる装置を用いて、独立な測定結果を得る測定条件で得られた測定結果の標準偏差。（JIS Z8101-2）

異なる試験室で分析したときの分析値のばらつきを考慮した標準偏差で、多数ある試験所のなかのある一カ所で1回分析したときの測定値の不確かさを示す。

**真度 (trueness)**

十分多数の測定結果から得られた平均値と、採択された参照値との一致の程度。  
(JIS Z8101-2)

**精確さ (accuracy)**

個々の測定結果と採択された参照値との一致の程度。(JIS Z8101-2)

**精度 (precision)**

定められた条件の下で繰り返された独立な測定結果の間の一致の程度。(JIS Z8101-2)

**選択イオンモニタリング (selected ion monitoring, SIM)**

液体クロマトグラフに質量分析計を接続し、試料混合物中の各成分を液体クロマトグラフで分離しながら溶出順に質量分析を行う液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) において、特定の質量のイオンを連続的に検出する方法。

**選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM)**

液体クロマトグラフに質量分析計を接続し、試料混合物中の各成分を液体クロマトグラフで分離しながら溶出順に質量分析を行う液体クロマトグラフィー質量分析 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) において、特定の質量のイオンを連続的に検出する方法。

**相対標準偏差 (relative standard deviation)**

標準偏差を平均値で除して、100 を乗じたもの、% で表す。変動係数とも呼ばれる。

**層別 (多層) サンプルング (stratified sampling)**

母集団を同質だと思われる幾つかの部分に分割する。この部分を層と呼ぶ。品種や産地、季節などが層として選ばれうる。そして各層から標本を抽出する。この方法によって、サンプルングの精度を向上させることができる。同質の層から、不必要に多くのサンプルを取り出すことがないためである。このような理由によって、Greenfield and Southgate (2003) は、層間で有意な差がない場合にも、多層サンプルングを薦めている。母手段を層に分割した後、各層から抽出する標本数は層の大きさに比例させる場合 (比例配分と呼ばれる) がある。また、各層の標準偏差が異なる場合には、標準偏差と層の大きさの積に比例させる (ネイマン配分) 場合もある。

H. Greenfield & DAT Southgate, 2003, Food Composition Data: Production, Management and Use, 2nd Edition, FAO Rome.

**測定試料 (test portion)**

測定用試料または試験室試料からとり分けた、一回の測定のために用いられる試料。分析試料ともいう。(JIS K0211)

### 測定用試料 (test sample)

測定を行うために、試験室試料について何らかの予備処理を行った試料。分析用試料ともいう。(JIS K0211)

### 対立仮説

仮説検定において、帰無仮説が棄却されたときに採択する、母集団パラメータ(母数)に関する仮説のこと。

### 中間精度 (intermediate precision)

併行精度 (repeatability) と室間再現精度 (reproducibility) の中間の大きさをもつ精度のため中間精度と呼ばれる。一つの試験室内で時間、オペレータ、校正、機器などの変動要因を一つ又は複数変更して各変動要因の標準偏差及び総合的な室内精度 (標準偏差) を推定することを中間精度の評価という。

引用文献 : JIS Z 8402-3:1999

### 特性 (characteristic)

測定され、比較され、あるいは記載される、物質の特性あるいは属性。(Horwitz, 1990)

### トレーサビリティ (traceability)

不確かさがすべて表記された、切れ目がない比較の連鎖を通じて、通常は国家標準または国際標準である決められた標準に関連付けられ得る測定結果又は標準の値の性質。(VIM:1993,6.10)

### 二段サンプリング (two-stage sampling)

ロットを幾つかの部分 (一次サンプリング単位) に分け、まず、第一段としてその中の幾つかの部分を選ばれ、次に、第二段として選んだ部分の中から各々幾つかのインクリメント (二次サンプリング単位) をランダムに抽出する操作。二段以上に何段にもわたってサンプリングすることを多段サンプリングという。(JIS K0211)

例えば、全国から市町村を幾つかランダムに抽出する。その次に、抽出された市町村から更にサンプルをランダムに抽出するという方法を二段サンプリングと呼ぶ。最初に選ばれる市町村を第1次抽出単位、次に選ばれるサンプル自身を第2次抽出単位と呼ぶ。また、更に段を追加して、3段、4段ということもある。それらも総称して多段サンプリング (multiple stage sampling) と呼ぶ。単純ランダムサンプリングと比べて、サンプル収集の対称範囲が狭まるため、調査が容易になる利点がある。一方、精度は単純ランダムサンプリングよりも劣ることが多い。

### 認証標準物質 (certified reference material; CRM)

認証書の付いた標準物質で、一つ以上の特性値が、その特性値を表す単位を正確な現示へのトレーサビリティが確立された手順によって認証され、各認証値にはある表記された信頼水準での不確かさが付いているもの。(JIS

Q0030:1997)

### 外れ値 (outlier)

同一条件下で得た一組の測定値の中で、同一母集団に属するものではないと判定され飛び離れた値。(JIS K0211)

### 外れ値検定

データから外れ値を除くための手法。

### 標準偏差 (standard deviation)

データのばらつきを測る指標の一つで、母集団の標準偏差を母標準偏差といい、母集団からサンプリングした標本データに基づいて計算した標準偏差を標本標準偏差という。標本標準偏差には、偏差平方和をデータ数-1で割った不偏分散の平方根と偏差平方和をデータ数で割った分散の平方根の2種類がある。前者は、不偏標準偏差といい、母集団の一部である標本データから求まる母標準偏差の推定値である。後者は、全数検査のように標本データが母集団全体のデータと同じになる場合に母標準偏差に一致する。分析法の妥当性確認では、測定データから、精度指標として併行標準偏差や室間再現標準偏差などの母標準偏差を推定することが目的のため、不偏標準偏差を計算する。

### 標本抽出 (サンプリング) 計画 (sampling plan)

サンプルとして、母集団から取り出される部分を選び、取り出し、保存し、輸送し、そして準備する、あらかじめ決定された一連の手続き。(Horwitz, 1990)  
W. Horwitz, 1990, Nomenclature for sampling in analytical chemistry, Pure and Applied Chemistry, 62, 6, 1193-1208.

### 不確かさ (uncertainty)

測定の結果に付随した、合理的に測定量に結びつけられる値のばらつきを特徴付けるパラメーター。(JIS K0211:2005)

不確かさは幅で示されるが、サンプリング、分析方法などに含まれる多くの要因からなっている。それぞれの要因の不確かさを見積もって、総合的な不確かさを求めることが行われるが、共同試験の室間再現精度を用いる方法なども提案されている。

### 分割水準 [Split levels (Youden pair) ]

分析法プロトコルの妥当性確認を目的とした室間共同試験において、1材料あたり2個配付する試料の濃度のみがわずかに(5%以内)異なる試料対のこと。統計学者のYoudenが紹介した試料の配付方法である。外観などによって対であることが分析者に明らかに分かる材料については、併行標準偏差の過小評価を回避する目的で、Split levelsの材料を少なくとも1材料は用いる実験計画を検討することを勧める。

### 分別生産流通管理 (Identity Preserved Handling; IPハンドリング)

我が国の遺伝子組換え食品の表示制度においては、原材料として遺伝子組換え

農産物を使用していない場合は、「遺伝子組換え不使用」の旨の表示が可能となっている。その際、非組換え体が、きちんと分別されて流通されたものかどうかを証明する根拠となるのがIPハンドリングである。IPハンドリングを行っていることを示す証明書は、農産物が生産者から流通業者、輸出入業者、加工業者等へと渡る各ポイントで発行され、最終的にすべての書類がそろふことにより、適切なIPハンドリングが実施されたとされる。

#### 併行精度，繰返し精度 (repeatability)

同一と見なせるような測定試料について，同じ方法を用い，同じ試験室で，同じオペレーターが，同じ装置を用いて，短時間のうちに独立な測定結果を得る測定条件による測定結果の精度。(JIS Z8101-2)

分析法に，抽出操作があるときに，抽出液を繰り返して測定することは該当しない。

#### 併行標準偏差 (repeatability standard deviation)

同一と見なせるような測定試料について，同じ方法を用い，同じ試験室で，同じオペレーターが，同じ装置を用いて，短時間のうちに独立な測定結果を得る測定条件で得られた測定結果の標準偏差。(JIS Z8101-2)

併行分析の条件下で1回測定したときの測定値の不確かさを示す。

#### ポジティブモード

質量分析において，正の電荷をもつイオンを検出する方法。

#### 母集団 (population)

統計学において，我々が知識，情報を得たいと考えている対象の全体を母集団と呼ぶ。母集団は，サンプリング法を決定する最初の段階として明確に決めなければならない。具体的には，どの期間の食品を対象にするか(時間的範囲)と，どの範囲を対象にするか(空間的範囲)の二つが必要である。

#### ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; PCR)

増幅対象(テンプレート)のDNAに対し，増幅したい領域の両端に相補的なプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドと耐熱性DNAポリメラーゼを用いてサイクル反応(プライマーとのアニーリング→伸長反応→二本鎖の解離)を行うことにより，目的とするDNA領域を増幅する方法。

#### マンデルのh統計量 (Mandel's h statistic)

室間共同試験データのグラフを用いた外れ値検定法のなかで，室間データの一致性の検定統計量として，ISO 5725-2 (JIS Z8402-2)に記載されている。材料毎に各試験所の平均値を計算し，(平均値 - 全試験所の総平均値)/(各平均値と総平均値の偏差2乗和から計算した不偏標準偏差)によって各試験所の平均値を標準化した統計量であり，総平均値から大きく離れた平均値をもつ試験所を検出する。

### マンデルのk統計量 (Mandel's k statistic)

室間共同試験データのグラフを用いた外れ値検定法のなかで、室内データの一致性の検定統計量として、ISO 5725-2 (JIS Z8402-2) に記載されている。材料毎に各試験所内の不偏標準偏差を計算し、(試験所内の不偏標準偏差)/(各試験所の不偏標準偏差の2乗和を試験所数で割った値の平方根で計算した試験所内の不偏標準偏差の平均)によって求める統計量であり、試験所内の不偏標準偏差の平均と比べて大きな不偏標準偏差をもつ試験所を検出する。

### ラテラルフロー法

イムノクロマト法 (immunochromatography) ともいう。検体中の抗原と色素標識抗体が結合した抗原抗体複合体が毛細管現象により試験紙上を移動する途上に、抗原に対する捕捉抗体を線状に塗布した部分を作成し、抗原-色素標識抗体が捕捉抗体により捕捉されることにより、標識色素が目視で可視化されることに基づく測定方法。

### ランダムサンプリング (random sampling)

全てのサンプルに通し番号を付ける。そして、乱数を生成し、それと一致する番号のついたサンプルを選び出して、そのサンプルを分析する。工場のように、製品に通し番号が付いている場合では実行は比較的容易である。母集団が全国の食品である場合、複数の生産者が様々な流通経路で食品を供給している。そのため、全国の食品を一度にランダムサンプリングすることは実行困難である。ランダムサンプリングより実行が容易な多段サンプリングもあるが、最終的には範囲を絞った上でランダムサンプリングを行うことになる。ランダムサンプリングは基本的なものといえる。