食品分析における信頼性確保

Quality Assurance in Food Analysis.

独立行政法人 食品総合研究所 **安井　明美**
AKEMI YASUI
National Food Research Institute

1．はじめに

「コーデックス（Codex）」という言葉をお聞きになったことがおありと思います。WHOとFAOによって1963年に設立された食品に関する規格の委員会で、正式にはCodex Alimentarius Commission（国際食品規格委員会）といい、略してCACとも呼んでいます。ラテン語で、Codexは法典、規律を意味し、Alimentariusは栄養、食物を意味します。その役目は、FAO/WHO合同食品規格計画の下で食品規格、ガイドライン、関連文書の作成を行います。その目的は消費者の保護、公正な貿易の保証、国際的な政府・非政府組織による食品規格に関する全ての仕事の調整を促進することです。その仕事は、FAOやWHOの枠組みの範囲内で、加盟国に国際食品規格についての勧告をすることですが、CACの勧告そのものには強制力はありません。その代わりにSPS協定（Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures:衛生および植物検疫に係る措置に関する協定）の下、WTO（World Trade Organization, 世界貿易機関）加盟国はCACの勧告に基づいて自国の措置を作成し、各国政府が実行して規制することになります。ここで決められたあるいは決めようとしている食品の規格や食品中の汚染物質の規制値が、国内のものと整合性がとれていないと皆さんの関心を引くことになりますが、ここでは、それ以前の問題として、どこかで、誰かが分析して報告された分析値は信頼できるものであるかを論点にしたいと思います。報告された分析値は、誰がどのようにして測定したかにかかわらず、数値のみが一人歩きをしてたびたび問題を起こします。分析値についても、その品質がしっかりと管理されているかが重要となっています。

分析試験室の役目の一つは、社会に品質の高い分析データを提供することで、そのためには、目的にあった信頼性のある分析法を使用しなければなりません。また、グローバル化の中で、WTOのTBT協定においても、One-Stop-Testingが指向されており、分析の信頼性が求められています。TBT協定とは、貿易の技術的障害に関する一般協定（Agreement on Technical Barriers to Trade, TBT）で、国際貿易において、工業製品等の規格や、その規格の適合性を評価する手続きが、不要な貿易障害を起こさないようにするために、強制規格、任意規格や適合性評価手続きの策定における透明性を確保し、国際規格や国際的ガイドを基礎とすることにより国際的な調和を進め、その結果として、貿易障害としての基準・認証制度を可能な限り低減させることを目的としています。また、One-Stop-Testingとは、一般的に、一つの試験所で得られたデータが、世界中で受入れられるような仕組みのことを意味しますが、このOne-Stop-Testingが世界的に構築されれば、国際間の取引において、重複して行われていた試験を省くことが可能となり、その結果、製品のコストを下げることができる製品が市場に出るまでの時間が短縮することができるなど、多くのメリットを享受することができるようになります。

工業製品や農水産物であれば、手元に実物がありますから、その品質を調べることができますが、分析値は、そのようなことはできません。分析値を報告した分

析試験室の分析システムとその能力を判定する必要があります。

一方、分析試験室は、それだけの分析システムと能力を確保する必要があります。

CACでは、国際的に通用する（食品の輸出入に関係する）試験所の条件として、1）妥当性が確認された方法を用いていること、2）内部品質管理（内部精度管理）を行っていること、3）外部品質査定（外部精度管理）に参加していること、4）ISO/IEC17025:1999の要求事項を満たしていることをガイドライン（CAC/GL27-1999）として挙げています。

2. 分析法の性能特性

試験に用いる分析法が意図した目的に合っていることを科学的に立証し、判定の誤りの確率が規制ないし基準で取り決めた許容の範囲内であることを実証することを分析法の妥当性確認といいます。分析法の性能特性として多くのものがありますが、ここでは以下のものを挙げておきます。

「真度（trueness）」
「繰返し精度（repeatability）」
「室間再現精度（reproducibility）」
「定量限界（limit of quantitation）・検出限界（limit of detection）」
「回収率（recovery）」

「真度」とは、真の値、付与された値あるいは合意値からの偏りの程度で、偏りが小さい方がより真度が良い、または高いといいます。「精度（precision）」とは、同一の試料に対し、定められた条件の下で得られる独立な観測値・測定結果のばらつきの程度で、ばらつきが小さいほうがより精度が高い、または良いといいます。精度には、「併行精度（繰返し精度）」と「室間再現精度」があり、併行精度（繰返し精度）というのは、「併行条件による観測値・測定結果の精度で、併行条件とは、同じ方法を用い、同じ試験窒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」をいいます。通常、2点併行や3点併行で測定値を得ています。一方、室間再現精度とは、「室間再現条件による測定結果の精度で、室間再現条件とは、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の条件」をいいます。また、真度と精度を総合的に表したものを「精確さ（accuracy）」と定義しています。

室間再現精度に関しては、AOAC Internationalによって実施された多くの室間共同試験の結果、室間再現精度（RSD_R%）は、食品試料の種類や定量法にかかわらず、濃度の変数になっていることが報告されています[1]。それは、次式で示されます。

$$RSD_R\,(\%) = 2\,c^{-0.1505}$$ c は質量分率

質量分率の1は濃度100%、0.01は濃度1%を意味します。この式では、図1に示すようなグラフが得られ、これは研究者の名とグラフの形から「Horwitzのトランペット」と呼ばれています。ただし、x軸の濃度は右に行くほど小さくなっています。表1にも示しましたが、濃度が1/100になると、RSD_R%が2倍になります。この式に従えば、極微量では室間再現精度は際限なく大きくなることになりますが、近年、次の修正式が提案され[2]、こちらも使われるようになっています。

$$RSD_R(\%) = \begin{cases} 22 & c < 1.2\times10^{-7} \\ 2c^{-0.1505} & 1.2\times10^{-7} \leqq c \leqq 0.138 \\ c^{-0.5} & c > 0.138 \end{cases}$$

この式では、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の式と同じで、13.8%を超える濃度では質量分率の平方根の逆数となります。

定量する場合の重要な能力である「定量限界（quantitation limit または LOQ:limit of quantitation）」は、「適切な精確さをもって定量できる測定対象成分の最低量または最小濃度」と定義され、通常、ノイズに対するシグナルの値であるSN比10で定量限界を表現しています。通常、SN比が10以上でないと定量値はでないということです。定量限界の下に検出限界（detection limitまたはLOD:limit of detection）があり、「試料に含まれる

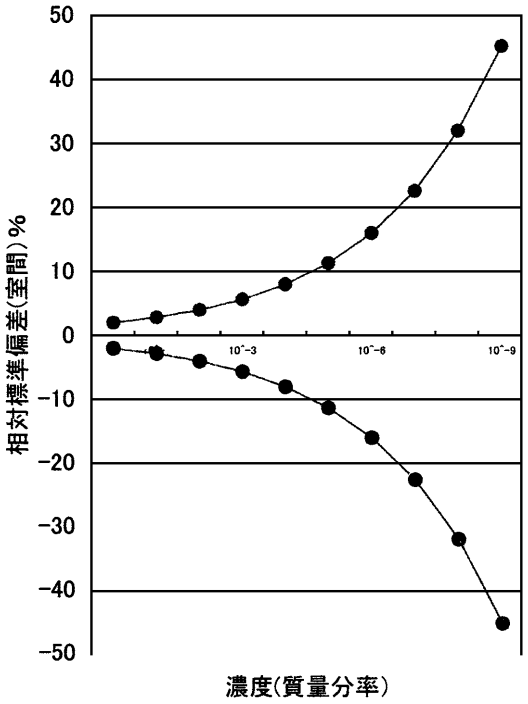

図1　Horwitzのトランペット

表1　各濃度レベルにおける相対標準偏差(室間)%

濃　度		相対標準偏差(室間)%	
質量分率	一般的な単位	Horwitzの式による	修正式による
1	100%	2	1
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

測定対象成分の検出可能な最低量または最低濃度」を表しています。この場合はSN比が(2あるいは)3という数字を使っています。すべての方法は定量限界、検出限界を持っているため、いずれの方法を使っても定量値がゼロという記載はあり得ず、検出限界未満、つまりSN比が(2あるいは)3よりも小さければ、「検出できなかった」ということで「ND(Not detected)」と表現されます。ふつう、あらゆるものにはあらゆる成分が含まれていると考えるほうが正しく、つまり、ゼロというのはあり得ず、表現できるのはNDです。

定量限界と検出限界との間は適切な精確さでは定量できないわけで、通常数値で表すことはありません。表現するなら、痕跡量(Trace)の意味で「Tr」と書くことになります。

「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、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ということが行われています。その結果、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します。ただし、これは世界的に共通の考え方にはまだなっておらず、ある国では回収率の補正を行う、ある国では行わないということが起こっているため、調整を含めて、現在、CACの中で論議がされているところです。また、国だけという問題ではなくて、分野においてもこれを使わなければならないところと、使っていないところがあります。例えばCACの中でも残留農薬では使っておらず、残留動物薬では使用しています。

3. 分析法の妥当性確認(Method validation)

通常、新規に開発した方法は次に示した方法の1つあるいはそれらを組み合わせて、方法の良否の確認を行います。

1) 試験室間共同試験(Collaborative study)

新規の分析法を提案するには、室内再現性だけではなくて、室間再現性を明らかにしておくことが必要です。実用面では、複数の分析試験室で行われた分析の室間再現性が最も重要です。均質性が担保された試験試料群が複数の分析試験所に配布され、各分析試験所は決められた分析手順書に従って分析し、報告します。有効な解析を行うには、AOAC Internationalのプロトコールによると、定量分析では8カ所以上、試料数は5種類以上(ブラインドあるいはオープンでの1組の同一試料又はYouden pairsは1種類として扱われます)で、定性分析では、試験所数は10カ所以上、試料数は1マトリックス当たり2レベル、1レベル当たり6試料及び1マトリックス当たり6陰性対照試料が必要です。

2) 標準物質の利用

分析試料と似た主要成分組成(マトリックス)を持ち、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:CRM)がある場合には、これを利用します。認証値の決め方はいくつかあり、原理の異なる複数の信頼できる方法によるも

の、共同試験によるもの、基準分析法によるもの、などがあります。無機元素については、これまでに多くの標準物質が作製され、配布されていますが、有機成分についての標準物質も増えてきています。国内で作製された食品関係の認証標準物質は極めて限られていて、外国のものを使用することが多いのが現状です。知的基盤整備の一環として、(独)産業技術総合研究所の計測標準研究部門が精力的に開発を行っていますが、食品関係についてはこれからです。

3) 標準添加回収試験の実施

実際の分析試料で標準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ます。

ただし、添加は、分析の初期の段階で行うことが重要です。添加する標準物質の化学形が試料に存在するものと必ずしも一致しないこと、内在するものと添加したものの存在状態が異なることが欠点にあげられます。

4) 公定法あるいは標準的方法を用いて得られた結果との比較

5) 合成試料の利用

マトリックスを構成成分で組み上げ、分析対象成分を添加して作製します。食品添加物などでは使えますが、自然汚染の分析対象成分については適用できず、利用範囲は限られます。

4. トレーサビリティと不確かさ

化学分析における測定値も、SI(国際単位系)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ます。トレーサビリティとは、「もとをたどることができる」という意味ですが、「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」と定義されています。

化学分析においては、認証標準物質である組成標準試料の測定を通して、トレーサビリティを確保する必要があります。

「不確かさ」は、分析における重要な性質です。化学分析では、種々の要因により分析結果がばらつきますが、従来、その信頼性は、誤差や精度などで表現されてきました。誤差とは、「真の値からの偏り」と定義されますが、真の値を我々は知ることができません。そのため、最近、誤差にかわって「不確かさ」(uncertainty)をつけて分析値を評価することが規定されるようになってきました。これは測定結果に付与される真の値が含まれる範囲の推定値ということで、標準偏差の形で、プラスマイナスの幅で示されます。通常、包含係数 k=2を乗じた「拡張不確かさ」が用いられます。世界的には、CodexやISOなどで分析値を評価するときに、これが必要な要件になっています。不確かさは、サンプリング、分析法などに含まれる多くの要因からなっているので、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ますが、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ます。

国内では、規制値がある場合に、測定値の不確かさをどのように扱うかについて、規制分野でもまだ論議されていないのが現状です。

5. 内部品質管理(Internal Quality Control)

内部品質管理では、認証標準物質を分析して分析値が認証値と一致するかをチェックすることが良く行われます。適当な認証標準物質が入手できない場合は、試験室用の標準物質を調製して用いるか、あるいは標準添加回収試験を行って真度の確認を行います。また、繰り返し測定を行なって、精度が良好かチェックします。

厚生労働省は、「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」(平成9年4月1日衛食第117号)で、食品衛生法施行規則に規定する精度管理および外部精度管理調査を通知しています。そこでは、内部精度管理は、「精度管理の一般ガイドライン」によるとされ、理化学的検査および微生物学的検査における精度管理があります。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、検査対象物質の濃度の異なる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します。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及び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こと、

また、それぞれの濃度で少なくとも5回以上（可能であれば10回）の繰返し検査を行い、平均値および標準偏差を求めておきます。精度管理の方法は、検査等の実施頻度によりますが、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%であることを確認します。また、1週当りの検査が20回を超えるときは、20検体ごとに行います。さらに月1回以上、5回以上の繰返し検査で平均値および標準偏差を求めて、zスコアーを求め、2以下であることを確認します。週1回未満の場合は、検査4回当り1回以上の割合で上記の検査を行います。

ここでは、許容添加回収率が一つの範囲でしか表現されていませんが、CACの残留動物薬分析法（CAC/GL16）では、濃度によって許容添加回収率が異なります（表2）。

表2　コーデックス委員会による食品中の残留動物薬の分析法の条件

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

6. 外部品質査定（External Quality Assessment, Proficiency Testing）

第三者機関による外部品質査定に参加することによって、分析値の信頼性を保証することができます。参加者は任意の方法で分析することができるので、新しく開発した分析法の有効性と能力を立証し、また、使用している方法を点検することができます。これは、proficiency testing（JISでは、技能試験）と呼ばれています。proficiency testingの多くは、試験所（分析所）間比較として行われます。食品分野でのproficiency testingは、AOAC International（http://www.aoac.org/proficiencytesting/proficiency.html）やThe American Association of Cereal Chemists（AACC）（http://www.scisoc.org/aacc/checksample）なども実施していますが、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、世界最大のものと思います。国内に取次店（GSIクレオスhttp://sid.gsi.co.jp/fapas/fapas.htm）があるので、利用が容易です。年度毎に、新しいプログラムが示され、今年（2003）度のFAPAS用プログラムでは、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、126ラウンドが用意されています。参加者には、均質性が担保された試料が配布され、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）内に事務局へ送付します。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ます。参加機関には、番号が与えられており、全体の中での自分の位置が分かります。他の参加機関が用いた方法、前処理法などの情報も報告書には収載されています。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」と判断されます。zスコアは、次の式で求められます。

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

ここで、xは参加者の結果、Xは付与された値で、通常、頑健な平均値が用いられます。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ばらつきの推定値または規準の一つで、CSLでは先のHorwitzの修正式またはこれまでの共同試験の結果から、sを求めています。参加者の測定値に基づいたものではありません。

国内では、先の「食品衛生法施行規則に規定する精度管理および外部精度管理調査」の外部精度管理調査の実施機関として、（財）食品薬品安全センター（http://www.fdsc.or.jp/）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、「食品衛生外部精度管理調査」としてクローズドで実施しています。15年度は、理化学調査6件、微生物学調査5件を行っています。一般の分析試験所は、同じ調査項目で参加できますが、まとめ方が「食品衛生外部精度管理比較調査」という形で異なっています。一般にも、オープンなものになることが望まれます。また、国内でも他にproficiency testingの供給者が出てくることが望まれます。

7. 試験所認定

試験所認定とは、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（ISO/IEC17025:1999、JISではQ17025:2000）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す。先のOne-Stop-Testingの実現には、世界各国の試験所認定制度を同じ基準で運用することが必要不可欠となります。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ます。この場合、購入者にとっても、供給者にとっても、取引の合理化･効率化のためには、試験所から出される試験報告書がより信頼できるものであることが重要です。

ISO/IEC17025の要求事項は、品質システム（ISO 9001）に関する要求事項（品質方針の表明、内部監査、経営者による見直し）に加えて、技術的能力に関する要求事項（不確かさの推定、測定器の校正とSI（国際単位系）へのトレーサビリティの現示、試験方法とバリデーション、技能試験への参加、適切な要員、試験報告書）があります。

認定と認証を混同される方がおられますが、認定（Accreditation）は、権威のある“機関”が、ある組織又は個人が特定の職務を果たす能力のあることを、公式に認める手続きで、認証（Certification）は、製品、方法又はサービスが所定の“要求事項”に適合していることを“第三者”が文書で保証する手続きです。すなわち、認証である品質システム審査登録と試験所認定の違いは、品質システム審査登録制度は、設計、製造、付帯サービスにおける品質システムをシステム規格に対して認証するものであるのに対して、試験所認定制度は試験所及び校正機関を対象に、品質システムだけでなく試験評価を行う能力をISO/IEC17025の規格に対して認定するものです。

欧州連合の指令（EU Additional Measures Directive 93/99 EEC）では、食品の規制（food control）に関わる試験室は、①妥当性が確認された方法を用いること、②外部品質査定に参加していること、に加えて③試験所認定を受けていることが要求されています。今後は、一般の食品試験所にも要求されることになると考えられます。試験所認定においては、GLP（Good Laboratory Practice:適正試験所規範）とは異なり、原則として、分析試料、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ようになっています。分析値の信頼性の確保のためには、「きちんと分析している」と口で言っても国際的には通用せず、第三者機関の審査を受けて、認定されていて通用します。国際的問題では、試験所認定を受けていない機関の出した分析値では通用しなくなるので、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ります。日本の食料自給率は供給熱量ベースで40%と先進国の中では最低です。60%を輸入するという状況では仕方がなかったのかも知れませんが、今後、高品質の農水産物の輸出を増やしていこうとなると、外国に対して信頼性のある分析値を提示するためには、試験所認定の重要さが益々大きくなると思います。すでに、国内でも食品成分の分析法で、10数カ所の機関が認定を取得しています。

官民を問わず、欧州の食品規制に係わる試験所はISO/IEC17025の試験所認定を取得しています。政府機関あるいは大学であるから、そのデータが信頼されるということではなくて、試験所認定を取得しているから、そのデータが信頼されるのであり、我々の意識改革が必要ですし、行政サイドでの基盤整備等の対応も必要です。

参考文献

1）Horwitz,W. et al:Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents, J.Assoc.Off.Anal.Chem., 63(6),1344-1354(1980).

2）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).