

Sampling Procedures to Detect Mycotoxins in Agricultural Commodities (農産物中のマイコトキシン検出のための抜き取り検査手順)

(仮訳)

《注》本文献は、Whistaker らが国連の教育用プログラム用に編纂したものを在日米
国大使館を通じて入手したものであり、出典等が不明ではあるが、参考資料 2~4 に
掲載した AOAC の論文の基となっており、重要な情報と考えられることから、敢えて
仮訳を掲載した。

Thomas B. Whitaker U. S. Department of Agriculture, Agricultural
Research Service, North Carolina State University

M. Bruno Doko International Atomic Energy Agency, Joint
FAO/IAEA Division of Nuclear Applications in Food and Agriculture,
Food and Environmental Section

Arpad Ambrus International Atomic Energy Agency, Joint
FAO/IAEA Division of Nuclear Applications in Food and Agriculture,
Food and Environmental Section

Andrew B. Slate U.S. Department of Agriculture, Agricultural
Research Service, North Carolina State University

1.0 緒言

マイコトキシンは種々の農産物で発育する種々のカビが産生する有毒の発ガン性物質である⁽¹⁾。カビは幅広い含水率のトウモロコシ穀粒等の宿主で集落を形成して増殖する。カビは活発に増殖して宿主に残留する化学物質としてマイコトキシンを産

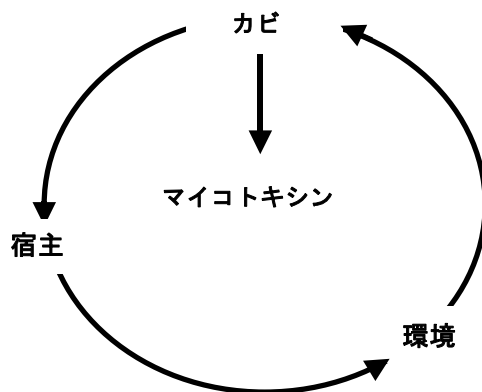


図 1 マイコトキシンの産生に寄与するカビ、宿主および環境条件の系統図

生する。図 1 に示したカビ、宿主および環境条件の全てがマイコトキシンの産生に関与している^[2]。

また、図 2 に示したように多種類のマイコトキシンが存在する^[3]。農産物へのマイコトキシン汚染は農地あるいは貯蔵施設のいずれでも発生する。収穫前および収穫後の汚染予防対策には、毎年転作、高温乾燥気候での灌漑、昆虫数を減らすための殺虫剤の使用、安全な含水率までの穀物の乾燥および防除対策を施した保管が考えられる^[4]。

-
- アフラトキシン
 - フモニシン
 - オクラトキシン A
 - デオキシニバレノール
 - パツリン
 - ゼアラレノン
-

図 2 種々のカビが産生するマイコトキシンの例

測定されたマイコトキシン量は、濃度あるいは農産物中のマイコトキシン量の割合で表現する。測定の単位は通常マイコトキシンのグラム数を農産物のグラム数で除したものである。通常マイコトキシンは極めて微量なために、その単位には 10 億分の 1 単位 (ppb) あるいは 100 万分の 1 単位 (ppm) を用いる。1ppb は農産物 1 グラム当たりマイコトキシンが 1 ナノグラムあるいは 0.000000001g/1g あるいは 1ng/g に相当する (図 3)。

-
- 月までの距離に対する 1 フィート
 - 10,000 km 中の 1 cm
 - 31.7 年中の 1 秒
-

図 3 1ppb に相当する単位の例

マイコトキシンは動物において有毒かつ発ガン性を有するため、多くの国々で食品および飼料中の最大値を規制している。天然に産生されるマイコトキシンの中でアフラトキシンの毒性および発ガン性が最も強いため、ほとんどの規制はアフラトキシン対策に重点をおいている。近年行われた FAO/WHO の調査によると、ほぼ 100 ヶ国で食品および飼料中のアフラトキシンを規制している^[5]。しかしながら、ヒトにおける最大安全量についての合意がないために、その最大値は国により異なっている (図 4、Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995 FAO & Nutrition Paper 64、FAO/WHO)。

このように、アフラトキシンの規制値には国によって差があるため、FAO/WHO はコーデックス委員会を通して貿易の拡大と消費者の保護を図るべく、規制値の国際的

ハーモナイゼーションを試みており、生落花生穀粒中のアフラトキシンの最大値の設定（全アフラトキシシ 15ng/g）では成功を収めている^[6]。

➤ 米国	20 T
➤ 欧州連合	8 B ₁ / 15 T
➤ オーストラリア	15 T
➤ カナダ	15 T
➤ エジプト	20 T（トウモロコシ） / 10 T（落花生）
➤ ナイジェリア	20 B ₁
➤ フィリピン	20 T
➤ 南アフリカ	10 T

図4 各国のアフラトキシシ規制値の例(T-全アフラトキシシ、B₁-アフラトキシシ B₁)

ロットの用途に関する正しい決断には、研究、信頼性保証および規制活動において、ロット中のマイコトキシシの濃度を正確かつ高精度で測定可能にすることが必須である。通常、バルクロット中のマイコトキシシの濃度は、ロットの少量の部分あるいはロットから抜き取った検体中のマイコトキシシの濃度を測定して推定する。バルクロット中のマイコトキシシ濃度は、測定した検体中の濃度と同一であると仮定する。次いで、検体の測定濃度に基づき、バルクロットの食品・飼料としての品質、あるいは、ロット全体のアフラトキシシを低下させる処置あるいは加工を決定する。例えば、検体中のマイコトキシシ濃度と規制値を比較して、そのロットを合格あるいは不合格と分類する。

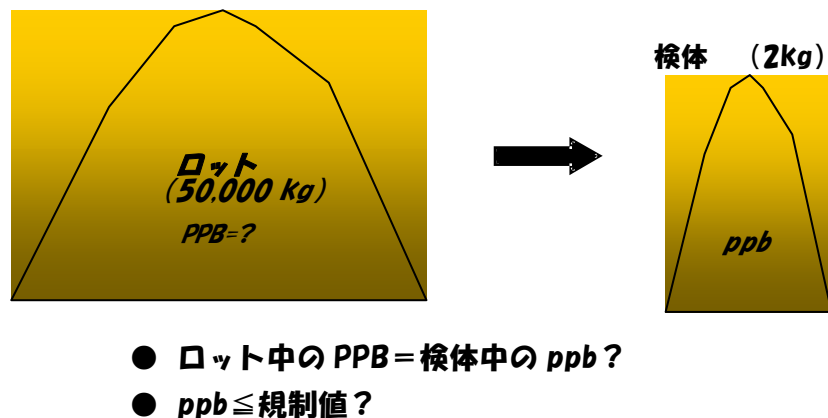


図5 ロット中のマイコトキシシ濃度と少量の検体中のマイコトキシシ濃度は等しいと仮定

食品および飼料中のマイコトキシシを検出し、定量出来ることが重要である。流通する検体中のマイコトキシシ濃度がロット全体の濃度が正確に反映されていない場合には、このロットは誤って分類され、経済上および/あるいは健康上の問題を引き

起こす。幸いなことに、誤ったロットの分類を最小限にし、バルクロットの用途に関する規制処置による望まれない結果を低減出来るような抜き取り検査法を設計することは可能である。本書では抜き取り検査法を定義し、マイコトキシンの抜き取り検査に関連する不確実性の原因を明確にし、ロットの誤った分類によるリスクを考察し、ロットの誤った分類を低減する方法を記述している。

2.0 抜き取り検査法の定義

マイコトキシン抜き取り検査法はマイコトキシンの検査手順と設定された合格/不合格限界値によって定義される。マイコトキシンの検査手順（図 6）は多段階の過程で、一般的には検体採取、検体の調製および分析（定量）の3段階からなる。

検体の採取段階では、検体の選択法あるいは採取法と検体の採取量を特定する。顆粒状の製品では、検体の調製段階または検体を粉砕機により粒子を小さくする段階と、粉砕した検体から2次検体を取り出す段階の2段階からなる。最後の分析段階では微粉砕した2次検体からマイコトキシンを溶媒抽出して、承認された方法を用いて定量する。

検体中で測定されたマイコトキシン濃度を、バルクロット中の真のマイコトキシン濃度の推定や、最大濃度あるいは法的規制値と同一の場合が多い設定された合格/不合格限界値との比較に用いる。合格/不合格限界値との比較は、測定された濃度（およびロット中の濃度）そのものよりも、測定された濃度が法的規制値よりも高いか低いかが重要なので、しばしば受入検査と呼ばれる。信頼性保証および研究の見地からは、真のマイコトキシン濃度の正確で精度の高い推定が重要となる。

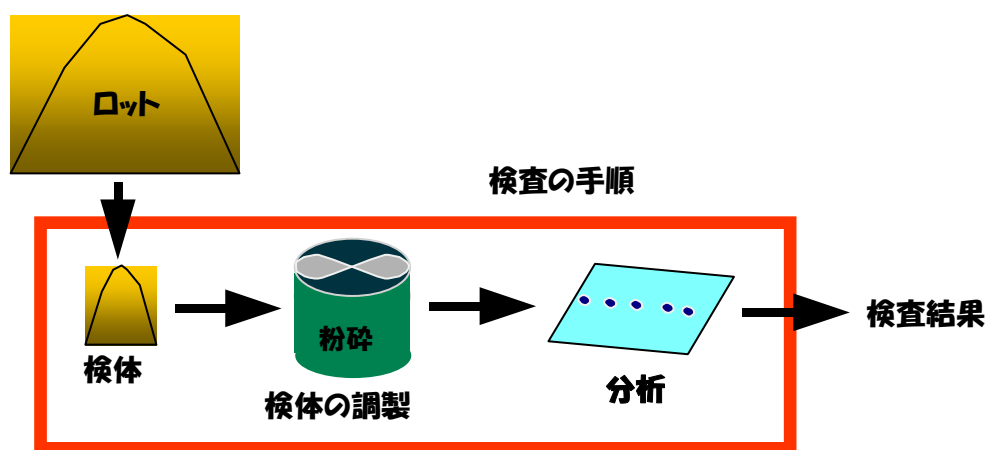


図 6 検体採取、検体の調製および分析の段階からなるマイコトキシンの検査手順

3.0 不確実性

抜き取り検査法にはある程度の不確実性は避けられない。抜き取り検査法に存在する不確実性のために、バルクロット中の真のマイコトキシン濃度は 100% 確実には測定できず、全てのロットが法的規制値に基づく良好ロットと不良ロットに 100% 正確に分類される保証もない。以下に述べる正確度および精度が抜き取り検査法での 2 種類の不確実性である^[7]。

3.1 正確度

正確度とは、測定値の真の値への近さと定義される。正確度に影響する他の因子は偏りである。偏りとは測定値を真の値から一貫した形で引き離す、平均値に対するある種の力あるいは影響である。例として射撃訓練を考えると、標的の中心は真の値で、貫通孔は測定値と同じである。図 7 に示した左側のライフル銃痕は標的の中心に集まっている右側のライフル銃痕ほど正確ではない。

数学的には、正確度 (A) は真の値 (U) と n 回の測定値の平均値 (X_i) の差である。

$$[\text{式 1}] \quad A = U - [\text{SUM} (X_i) / n]$$

正確度は偏りと関係がある。偏りは検査手順の検体の選択段階、検体の調製および定量段階で生ずる可能性がある。偏りは最も容易に管理することが出来るはずであるが、ロット中の真のマイコトキシン濃度を知ることの難しさから、偏りを減ずる方法の評価は困難である。検体の選択および検体の調製機器並びに分析方法は、偏りを少なくするために継続的にその成績を評価されるべきである。

正確度

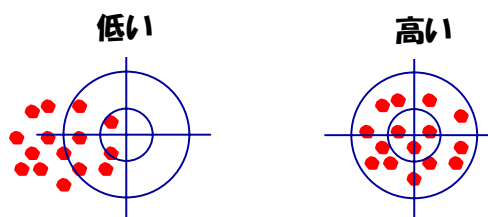


図 7 射撃訓練に例えた低い正確度と高い正

3.2 精度

精度とは測定値間の近さと定義される。精度に関する他の用語にはバラツキがある。精度の定義には測定値の真の値への近さは入っていない。精度について射撃訓練を考えると、貫通孔同士の近さが精度の尺度である (図 8)。

精度

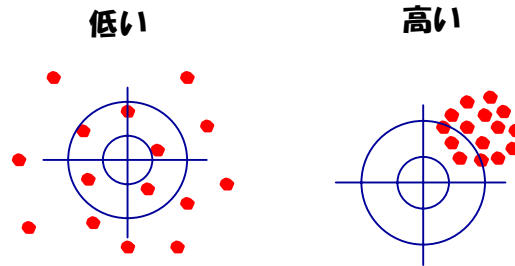


図 8. 射撃訓練に例えた低い精度と高い精度の例

分散 (V)、標準偏差 (S) および変動係数 (CV) の 3 種が、バラツキあるいは精度 (P) の尺度として用いられる。ここで、 x_i は測定値、 m は x_i 値の平均値である。

$$[式 2] V = \left[\sum (x_i - m)^2 / n - 1 \right] \quad (i = 1, 2, \dots, n)$$

$$[式 3] S = V \text{ の平方根}$$

$$[式 4] CV \text{ は \% で表す。} CV = 100 \times (S/m)$$

精度はバラツキと関係がある。バラツキはマイコトキシンの検査手順のどの段階でも起こり得て、通常はロットの汚染粒子間のマイコトキシンの分布に関連している。後述のとおり、検査材料の量（検体量、二次検体量、定量の検体数）が増えるとバラツキが減少する、あるいは精度が改善される。処理の不確実性を論ずる場合は、起こりうる正確度と精度の種々の組み合わせを考慮する必要がある。図 9 に示したとおり、正確度と精度の極端な組み合わせには 4 種類ある。最悪の条件とは低い精度、低い正確度で処理を行うことである。最善の条件とは高い精度、高い正確度で処理を行うことである。バルクロットにおけるマイコトキシンの検出に関する目標は、高い精度で高い正確度のマイコトキシン検査手順あるいは検体採取法を設計することである。

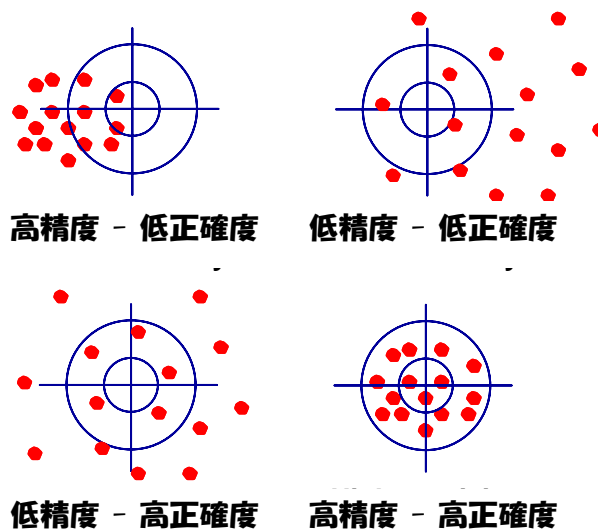


図 9. 抜き取り検査で生ずる不確実性の 4 種類の極端な組み合わせ

4.0 検体の選択

バルクロットから検体を採取する手順は特に重要である。ロット中に存在するいずれもが平等に選択されるべきである（これを無作為抽出と呼ぶ）。検体を抽出する器具や手順がロット中に存在する全ての対象物が平等に選択される機会を妨害したり減少したりする場合に、検体採集法による偏りが発生する。図 10 に示した検体の選択過程で生ずる偏りの例は、大きな粒子を取り込めない穀刺の使用、積み荷のあらゆる場所に到達しない穀刺の使用および均質でないロットの一ヶ所からの採取である。

材料取り扱いの種々の作業により完全に混合されたロットでは、汚染粒子は恐らくロット中に均等に分散しているとみなせる^[8]。このような場合では、検体を取り出すロット中の位置は余り重要ではない。しかしながら、そのロットマイコトキシン汚染が高含水率の塊を生じる湿気の侵入や他の局所的な原因による場合は、マイコトキシンに汚染された粒子は限局的に存在する位に限局されているであろう^[9]。検体を一ヶ所だけから採取すると、汚染粒子を採取し損なうか、過剰な汚染粒子を採取することになる（図 11）。

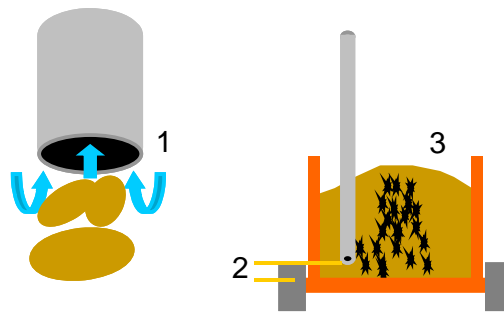


図 10 バルクロットからの検体の選択過程で生ずる偏りの例

(1) 穀刺の開口部よりも大きな粒子、(2) 穀刺が届かない位置の粒子、(3) 未混合のロットの一ヶ所からの穀刺

非均質な分布および均質な分布

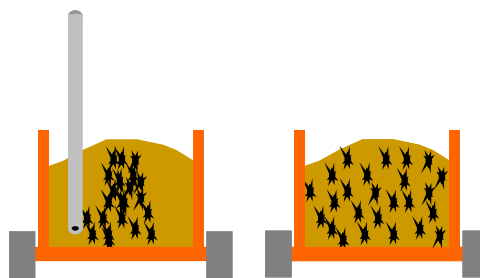


図 11 非均質ロットからは多くの部位から採取する必要がある

汚染粒子がロット中に均質に分布しているとは限らないので、検体はロット中の多くの部位から少量ずつ採取したものを集積する必要がある^[10, 11]。FAO/WHO は、一ヶ所からの採取量を 200g として製品 200kg につき一ヶ所から採取することを推奨している^[12]。多くの採取単位から少量ずつ採取して集積したものをバルク検体と呼ぶ。バルク検体の量が必要量よりも多い場合は、バルク検体を混合してから分割し、必要量を採取する（図 12）。

バルク検体から分割して検体調製段階でグラインダーにより細かくすりつぶした最小検体量を検査用検体と呼ぶ。静置されたロット（静的ロット）から代表的な（偏りのない）検査用検体を採取することは、ある箇所から他の箇所へと移動する製品のロット（動的ロット）から採取することよりも困難である。検体の採取法はそのロットが静的か動的かによって異なる。



図 12 検査用検体をバルク検体から取り出す。多くの異なった採取単位から少量ずつ採取して集積したものをバルク検体と呼ぶ

4.1 静的ロット

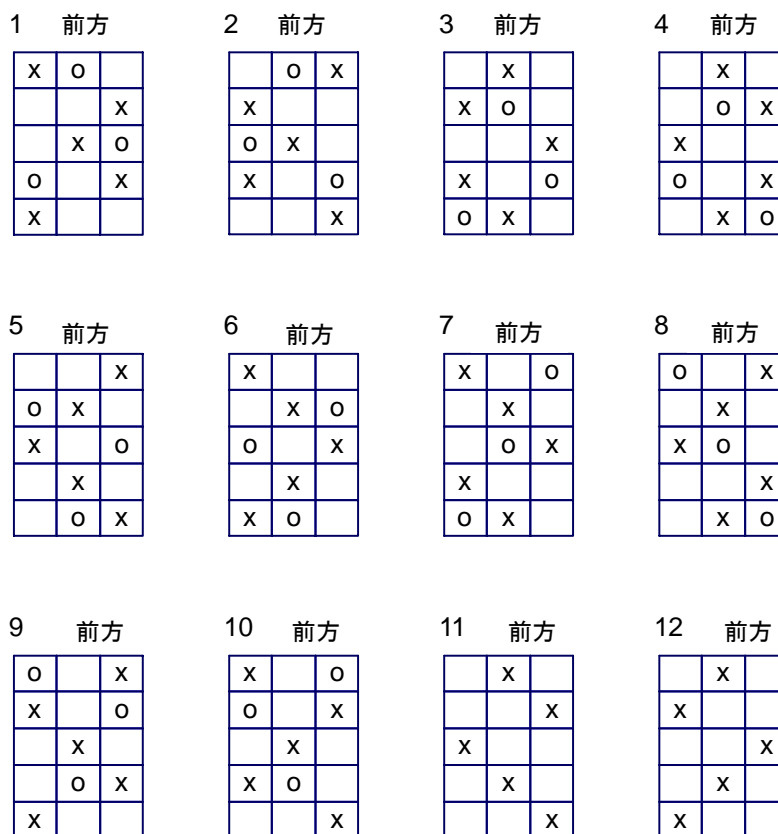
静的ロットの例は貯蔵ビン、貨車あるいは袋のような小分け容器に収められた農産物である。バルク容器から検体を取り出す場合には製品がロット中の異なった場所から収集出来るように穀刺場所のモデルを開発しておく必要がある。USDA の落花生の検体採取における穀刺のモデルの例のいくつかを図 13 に示す^[13 - 15]。

検体採取用穀刺は、可能な限り容器の底に達するような十分な長さが必要である。前述の 200kg 当たり 200g の検体採取率となるよう心がける。しかしながら、検体採取用具の形、容器の大きさ、1 ロットの量によっては推奨される採取率のとおりには検体を採取することが困難な場合がある。例として、25,000kg のロット（LS）から 5,000g の検査用検体（TSS）の採取を考えてみよう。望ましい採取単位（ISS）は 200g である。5,000g の検査用検体を得るのに必要な採取単位数は TSS/ISS、つまり 200g ずつの 25 箇所の採取が必要となる。25,000kg のロットから合計 25 の採取単位を採取する場合は、採取単位は 1,000kg (25,000/25) となる

(ロット 1,000 kg 当たりの採取単位は推奨されるロット 200 kg 当たりの採取単位よりも大きい)。ロット 200kg 当たり 200g を採取単位採取する場合は 125 (25,000/200) の採取単位が必要となり、バルク検体量は 25,000g、つまり 5,000g の必要検査用検体量の 5 倍となる。5,000g の検査用検体を得るためには 25,000g のバルク検体を分割しなければならない。変数間の相互作用を示す流れを図 14 に示す。

袋あるいは小売り容器のような別々の容器に入った静的ロットから検体を採取する場合は、ロット中に分散している多数の容器から検体を抜き取らなければならない。倉庫内に袋を保管する場合には、内側の袋に近づけるような通路を造っておく必要がある。容器の推奨抜き取り数は小さなロット (20 トン以下) では 4 個につき 1 個、大きなロット (20 トン以上) では容器数の平方根となる^[12]。

検体を採取しにくい容器に収めたロットでは、製品を容器から取り出す時点あるいは入れる時点で抜き取りをしなければならない。集めたバルク検体の量が必要量よりも多い場合には、バルク検体を完全に混合し、適切な分割器を用いてバルク検体から無作為に検査用検体を採取する。



x = 5 箇所 8 箇所の穀刺場所の雛形

x + o = 8 箇所の穀刺場所の雛形

図 13 USDA の落花生格付け用検体採取における 5 箇所および 8 箇所の穀刺場所の雛形の例

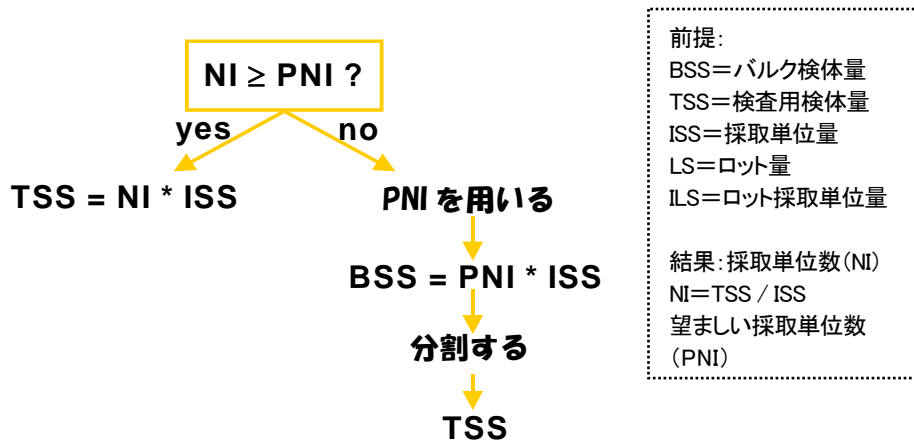


図 14. ロット量、採取単位数および検査用検体量間の相互作用

4.2 動的ロット

製品をある箇所から他の箇所へ移送（例えばベルトコンベア）する際の流れ作業中からバルク検体を選択する場合には、より真実に近い無作為抜き取りが可能となる。流れ作業中から抜き取る場合は、少量の採取単位を流れの横断面から全行程に渡って抜き取るべきである（図 15）。製品の少量の採取単位を混合してバルク検体とする。バルク検体が必要量よりも多い場合は、バルク検体を混合後分割して、必要量の検査用検体を得る。

流れ作業中に予め設定した一定の間隔で自動的に取り込みカップを挿入するタイマーを備えた切り込み式検体採取器（図 16）のような自動検体採取器が市販されている。自動採取器がない場合は、定期的に流れにカップを挿入してバルク検体を手動で収集する担当者を指名する。自動あるいは手動のいずれの場合も、少量の採取単位の製品を、採取点を通過する全期間中に頻繁かつ定期的に収集して混合する。

切り込み式検体採取器を以下の通りに設置する。

- 検体採取カップの開口面は流れの方向に対して垂直に取り付ける。
- 検体採取カップは流れ全体に渡って横断面を通過する。
- 検体採取カップの開口部は目的とするロットから全ての大きさの検体を採取できる十分な幅を有する。原則として、検体採取カップの幅はロットの最大粒径の 2~3 倍とする。

切り込み式検体採取器で採取されるバルク検体量 S kg は

$$[式 5] S = (D) (L) / (T) (V)$$

ここで、 D は検体採取カップの幅 (cm)、 L はロット量 (kg)、 T はカップの流れ中の移動間隔 (秒) で、 V はカップの速度 (cm/秒) である。

切り込み間隔 T の様な他の変数の計算にも [式 5] を用いることも出来る。例えば、5.08cm (2 インチ) の開口部を有する検体採取カップを用い、流れへの切り込み速度を 30cm/秒とすると、30,000kg のロットから 10kg の検体を抜き取るのに必要な間隔 T を (5) 式によって計算すると、

$$T = (5.08 \text{ cm} \times 30,000 \text{ kg}) / (10 \text{ kg} \times 30 \text{ cm/秒}) = 508 \text{ 秒}$$

ロットが毎分 1,000 kg の速度で移動する場合、ロット全体は 30 分で採取器を通過してしまい、ロットへのカップの切り込み回数は 3~4 回のみになってしまう。切り込みの間に非常に大量の製品が採取点を通り過ぎてしまい、この回数は余りにも少ないと見なせよう。集積検体量や製品の採取頻度に関して、〔式 5〕の変数間の相互作用を十分に理解するべきである。

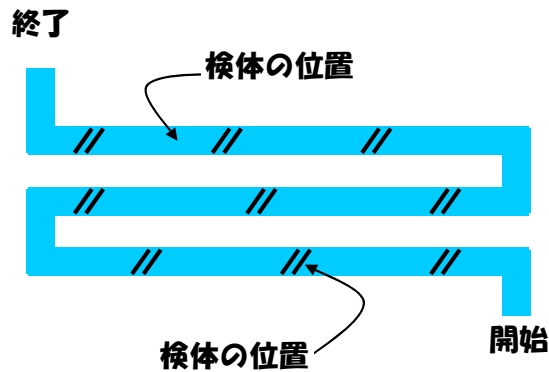


図 15 製品の流れ作業中からの検体は、製品の流れの開始点から終了点までの多くの採取単位から選択して集積する。

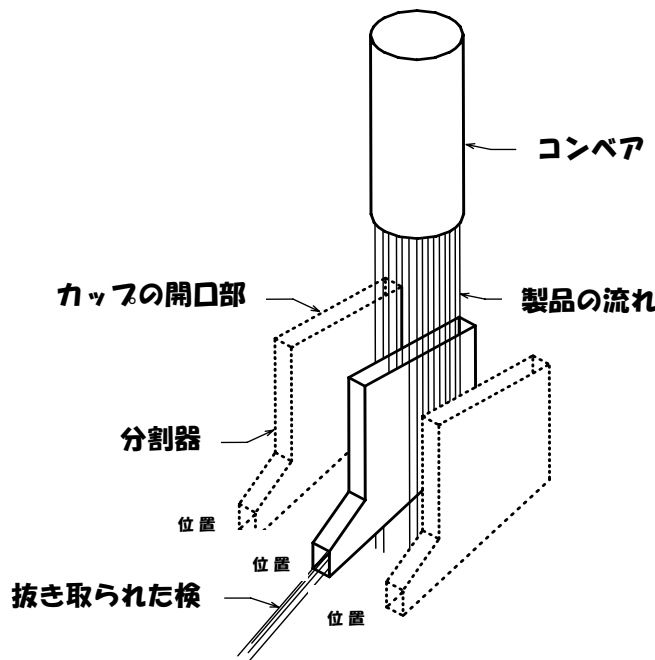


図 16 自動検体採取器のカップは一定の速度で動き、製品の流れの全体に渡って切り込

4.3 バルク検体対検査用検体

汚染粒子はロット中に均等に分散していないので、ロット中の多くの部位から多くの採取単位を採取して集積し、バルク検体とする。その結果、通常バルク検体量は、ロット中のマイコトキシン濃度の推測に用いる所定検査用検体よりも多

くなる。顆粒状の材料では、検査用検体は検体調製段階で粉碎機を用いて微粉碎した顆粒状製品の最小検体となる。製粉した材料（トウモロコシ粉）あるいは液体（牛乳）では、検査用検体はマイコトキシンを定量する分析段階の最小検体となる。

表 1. 米国食品医薬品局が使用する製品別検体量

製品	性状	包装形態	ロットの量	検体の 単位数	単位 量	検体 (ポンド)
ピーナッツバター	平滑	小分け バルク		24 12	0.5 1	12 12
落花生	クランチバター、生、焼き、トッピング用挽き割り	小分けおよび バルク		48	1	48
ツリーナッツ	殻付き、皮むき薄切り、粉末、ペースト	小分けおよび バルク		10 50 12	1 1 1	10 50 12
ブラジルナッツ	輸入殻付き	バルク	<200 袋 201~800 袋 801~2,000 袋	20 40 60	1 1 1	20 40 60
ピスタチオ	輸入殻付き	バルク	75,000 ポンド <75,000 ポンド	単位の 20% 単位の 20%		50 25
トウモロコシ	穀粒、挽き割り、粉、グリッツ	小分けおよび バルク		10	1	10
綿実		バルク		15	4	60
油実粕	落花生、綿実	バルク		20	1	20
食用種実	カボチャ、メロン、ゴマ等	バルク		50	1	50
牛乳	全乳、低脂肪、脱脂	バルク 小分け		10	1	10 10
細粒穀物	マイロ、コムギ、オオムギ等	バルク		10	1	10
乾燥果実	即ちイチジク	小分けおよび バルク		50	1	50
混合物	大粒の農産物 製粉した農産物	小分けおよび バルク		50 10	1 1	50 10

バルク検体量が検査用検体量よりも多い場合は、分割器を用いてバルク検体から所定量の検査用検体を取り出す。バルク検体から所定量の検査用検体を取り出す場合は、無作為に分割できるとみなされているボーナー型分割器あるいはリップル型分割器^[14]のような機械的分割器を用いるのが最良である。無作為に分割できる分割器を使用する場合は、検査用検体の取り出し前にバルク検体の混合の必要ない。しかしながら、検査用検体をバルク検体から 4 分割法あるいはカップ

やスコップを用いて手動的に取り出す場合には、検査用検体の取り出し前にバルク検体の混合を要する。

検査用検体がトウモロコシ穀粒やナッツ類の場合は、検体調製段階の微粉碎の前に検査用検体量を減ずるべきではない。検査用検体量が少なくなると、真のロット中マイコトキシン量の算定に関連する不確実性は大きくなる。後述のとおり、粉碎機に入れる検体は可能な限り量を増やす。種々の農産物における推奨検体量を表 1 に示す。

5.0 検体の調製

ロットから検体を採取したら、直ちにマイコトキシン定量用の検査用検体を調製する。大量の検査用検体からマイコトキシンを抽出することは実際的ではないため、通常検査用検体から取り出した少量の検体（二次検体）からマイコトキシンを抽出する。

農産物がトウモロコシ穀粒のように粒状の場合、二次検体を取り出す前に適切な粉碎機を用いて粉碎する^[16,17]。粉碎工程の前に検査用検体から全粒の二次検体を取り出すと、粒状製品の大量の検査用検体採取の利点を損なう。検査用検体の粉碎後に二次検体を取り出してマイコトキシンの抽出を行う（図 17）。

検査用検体中の種子の粒径を可能な限り小さくする粉碎機を使用すべきである。微粉碎機を用いることでより均質な検査用検体を調製でき（図 17）、その結果、二次検体中のマイコトキシン濃度は、検査用検体中のマイコトキシンの真の濃度により近づく。ローマー社製粉碎機^[18]あるいは USDA 落花生粉碎機^[19]のような粉碎機は、粉碎過程で自動的に二次検体を作るように設計されている。粉碎機に二次検体採取機能が付属していない場合には、リップル分割器を使えば二次検体を得られる。スコップのような手動の器具で二次検体を得る場合は、二次検体を取り出す前に、破碎した検査用検体を混合する。

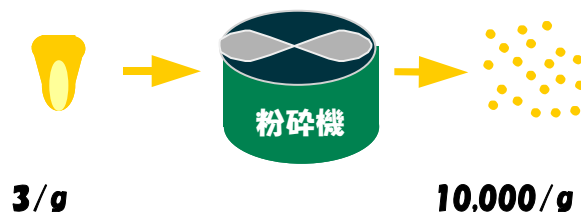


図 17 粒状製品の検査用検体は粉碎機を用いて粒径を減ずる

液体（牛乳）やペースト（ピーナッツバター）状の製品では、通常、検体調製段階が省かれる。全検体の分析は不可能なので、少量の検体でアフラトキシンの分析を行う。アフラトキシン分析用に少量の検体を取り出す前に、液状検体およびペースト

状検体を混合することが重要である。二次検体の量は様々であるが、通常粒子の大きさによって 25g～1kg ほどである。粒径が小さいほど誤差あるいは不確実性を増加させずに二次検体の量をより少なくできる。

6.0 定量分析

粉碎した検査用検体から二次検体を取り出したら、直ちに二次検体に溶媒を混合してマイコトキシンを抽出する。溶媒中に抽出されたマイコトキシンを定量する前に、干渉成分（すなわち油類）の除去および定量するマイコトキシンの濃縮等、数段階の処理を行う。これらの段階には遠心分離、ろ過、乾燥、希釈を含む^[19-22]。二次検体から抽出したマイコトキシンの定量には、薄層クロマトグラフィー、抗原抗体反応を利用した ELISA 法および高速液体クロマトグラフィーを用いる⁽²²⁾。米国公定分析化学者協会（AOAC）等の団体が共同研究によって分析法を評価している。

分析法に関連する偏りにはいくつかの原因がある。①マイコトキシンが二次検体から 100%抽出されていない、②マイコトキシン以外の物質が溶媒に抽出されて誤ってマイコトキシンとして定量される、③定量に使用されるマイコトキシン標準品の実量が誤っている、④マイコトキシンを測定する機器類が正確に校正されていない、などである。

7.0 合格/不合格限界値

マイコトキシン濃度が定量されると、その検体の濃度は輸送物中の真の濃度の推定値として用いられるか、合格/不合格限界値（ARL）と比較される。ARL は予め設定されている閾値で、通常は規制の際に用いられる法的規制値に等しい。検体中のマイコトキシン値が ARL 以下であればそのロットは合格とする。そうでない場合は不合格となる。当局がロットを検査する場合、ARL は通常、法的規制値に設定される。しかしながら、消費者向けの製品を生産する業者は、規制当局による規制値以上のマイコトキシン濃度の判定のリスクを低減させるために、法的規制値より低い ARL を設定する。企業はしばしば法的規制値の半量の ARL を採用する。

多くの国々は法的規制値設定の必要性には同意しているが、規制値そのものについては合意していない。1995 年の FAO による調査^[5]では、ある国はアフラトキシン B₁のみを、ある国は全アフラトキシン（B₁+B₂+G₁+G₂）を規制しており、法的規制値はまちまちである。コーデックス食品添加物・汚染物質委員会は、国際市場の落花生のアフラトキシン限界値を全アフラトキシンとして 15ppb に設定した^[6]。この規制値は、いずれの国の国内市場向け規制値にも抵触するものではない。

8.0 不規則変動

認可されている検体の採取法、検体の調製および分析の手順^[17-22]にしたがっている場合でも、上記のマイコトキシン検査手順^[19-32]の各段階で発生する誤差（誤差はバラツキを意味する）が存在する。これらの誤差により、ロット中の真のマイコトキシン濃度をロットから抜き取った検査用検体を用いて 100%確実に測定することは不可能である。例として、6 ロットのアフラトキシン汚染殻なし落花生 10 検体の検査結果を表 2 に示した^[23]。この表では、同一汚染ロットから採取した検体の反復検査結果の重要な特徴を示すために、各ロットの 10 検体検査結果は低い値から順に並べてある。

表 2 6 ロットの殻なし落花生から採取した 4.5 kg10 検体のアフラトキシン検査結果の分布^{a, b}

ロット番号	検体の検査結果 (ppb)										平均 (ppb)	SD ^c (ppb)	CV ^d (%)
1	0	0	0	0	2	4	8	14	28	43	10	15	150
2	0	0	0	0	3	13	19	41	43	69	19	24	126
3	0	6	6	8	10	50	60	62	66	130	40	42	105
4	5	12	56	66	70	92	98	132	141	164	84	53	63
5	18	50	53	72	82	108	112	127	182	191	100	56	56
6	29	37	41	71	95	117	168	174	183	197	111	66	59

a/ Whitaker et al. (1972)より

b/ アフラトキシンの検査結果はアフラトキシン濃度 (ppb) の順に並べた

c/ SD = 標準偏差

d/ CV = 変動係数 = SD × 100/平均

各検査結果でのアフラトキシン検査手順は以下のとおりである。(a) Dickens および Satterwhite が開発した USDA 二次検体用粉砕機^[19]を用いて検査用検体である落花生穀粒 5.45kg を粉砕する、(b) 粉砕した検査用検体から 280g の二次検体を取り出す、(c) AOAC 法 II^[20]によって 280g の二次検体から溶媒抽出を行う、(d) 薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて濃度測定法によりアフラトキシンを定量する。

同一ロット間での反復検体の幅広い分析結果は、バルクロット中の真のマイコトキシン量の推定に関連した大きなバラツキを反映している。表 2 では、バラツキを標準偏差 (SD) と変動係数 (CV) で示した。10 検体の最大値はロット中濃度 (検体の平均値がロット中濃度の最も近い推定値) の 4~5 倍となっている。次に、10 検体の分析値のバラツキの量はロット中濃度の関数のように見える。ロット中の濃度が増加するにしたがって検体の分析値の S が増加するが、ロットの平均値に対する SD、すなわち CV は減少する。三番目に、表 2 に示した各ロットの 10 検体の分析値の分布は、ロット中濃度に対して必ずしも対称的ではない。検体の分析値の半数以上は真のロット中濃度よりも低い値で、分布は歪んでいる。しかしながら、ロット中濃度が増加するにしたがって検体の分析値の分布はより対称的になる。この歪みは、表 2 のロ

ロット中濃度（10 検体の分析値の平均値）以上および以下の検体数で示される。汚染ロットから 1 検体を採取して分析すると、真のロット中濃度よりも低い分析値が得られる確率は 50%以上となる。表 2 には示されていないが、歪みは少量の検体で大きく、検体量を増加するにしたがって、より対称的になる^[28]。表 2 に示した落花生中のアフラトキシンの特徴は、他のマイコトキシンや他の農産物でも一般に認められる現象である^[29, 32 - 26]。

表 2 に示したマイコトキシンの検査結果間のバラツキの原因は、マイコトキシンの検査手順の各段階にある（図 6）。マイコトキシンの検査手順の検体の採取、検体の調製および分析段階のそれぞれが、表 2 に示したマイコトキシンの検査結果間の総合的なバラツキに寄与している。図 18 に示したように総合的な誤差あるいはバラツキは、検体の採取、検体の調製および分析でのバラツキが合算されたものである。

式 (2) ~ (4) で示したバラツキの統計値の中で、分散のみが加法的なものである。したがって、マイコトキシン検査手順に関連した総合的な分散は、検体の採取、検体の調製および分析での分散を合わせたものと考えられる。

$$\text{〔式 6〕 } VT = VS + VSP + VA$$

マイコトキシン検査手順の各段階が総体的バラツキに寄与する理由を以下に考察する。各段階が総体的なバラツキに寄与する程度をトウモロコシ穀粒のアフラトキシン検査例で示す。

8.1 検体採取でのバラツキ

様々な農作物（落花生、トウモロコシ穀粒およびピスタチオ）における研究によると、マイコトキシンの検査手順の中で、検体の採取段階（特に、検体採取量が少ない場合）がバラツキの主因となっている^[23 - 31]。認可された検体収集器具および無作為検体収集手順を用いたとしても、ロット内の汚染粒子の極端な分布によって検体収集での誤差は大きくなる。落花生、トウモロコシ穀粒等の広範囲な農作物での研究によると^[36 - 38]、ロット内の穀粒中の極めて限られたもの（0.1%）がマイコトキシンに汚染されており、その穀粒 1 個の汚染の程度は極端に高い。Cucullu ら^[36]は、個々のピーナッツ中に 1,000,000ng/g (ppb)、綿実に 5,000,000ng/g を越えるアフラトキシンを報告している。Shotwell ら^[38]は、1 個のトウモロコシ穀粒中で 400,000ng/g を越えるアフラトキシンを報告している。

アフラトキシン濃度が極端に高い少量の穀粒によって、抜き取り検査間のバラツキは大きくなる傾向にある。例として、トウモロコシ穀粒の検査における検体採取の分散 VS を経験的に推定した検体量 ns における分散を式で示した^[34]。

$$\text{〔式 7〕 } VS = (12.95/ns) M0.98$$

ここで、M は ng/g あるいは ppb で表したロット中のアフラトキシン濃度、ns は kg で表した検体のトウモロコシ穀粒の量（1 グラム当たりの穀粒数は 3.0）である。式 (7) から、検体採取の分散はロット中のアフラトキシン濃度 M と検体量 ns の関数であることが理解できる。トウモロコシ穀粒のロットから採取した 0.91kg

(2 ポンド) 反復検体間の 20ppb での分散は 268.1 である。変動係数は 81.8% となる。研究者達は数種類の農産物のマイコトキシン検体採取の分散の推定式を開発している^[23-31]。それらはマイコトキシンの種類および農産物の種類毎に個別のものであるが、一般的には、検体採取の分散は濃度の関数で、濃度が増加すると分散も上昇し、検体量が増加すると分散は減少する。

8.2 検体調製でのバラツキ

ロットから検体を採取したら、直ちにマイコトキシン分析用に検体を調製する。大量の検査用検体からマイコトキシンを抽出することは実際的ではないので、検査用検体を粉砕機で微粉砕し、微粉砕した検査用検体から少量の二次検体を得て、マイコトキシンを抽出する。農産物がトウモロコシ穀粒のように顆粒状の場合は、全検査用検体を適切な粉砕機を用いて粉砕してから二次検体を取り出すことが必須である^[17]。検査用検体からの種子をそのまま二次検体として取り出すことは単に検体量を減少させるだけで、ロットから大量の検体を採取することの利点を無視することになる。検体を粉砕機で粉砕して粒子径を減じた後、二次検体として取り出してマイコトキシンの抽出を行う。粉砕した検体中のマイコトキシン汚染粒子の分布は、ロットの穀粒間の分布と近似したものになると仮定される。その結果、同一の検査用検体から取り出した反復二次検体間にもバラツキが生じる。しかしながら、二次検体中には多数の粉砕した粒子が存在するために、検体調製での分散は検体採取での分散ほど大きくない。例として、二次検体量 nss でのトウモロコシ穀粒の検体調製による分散 VSS を式で示した^[34]。

$$\text{〔式 8〕 } VSS = (62.70/nss) M^{1.27}$$

ここで、M は ppb で表したロット中のアフラトキシン濃度、nss は g で表した二次検体中のトウモロコシ穀粒の量である。式 (8) の分散には粒子が 20 号篩を通過するようにローマー粉砕機を用いて粉砕したことが反映している。式 (8) から、検体調製の分散は検体中のアフラトキシン濃度と二次検体量の関数であることが理解できる。検体から 50g 採取した場合の 20ppb での分散は 56.3 で、変動係数は 37.5% となる。

研究者達は数種の農産物、粉砕機およびマイコトキシンに対する検体調製による分散の公式を開発している^[23-31]。それらの公式は検査に用いられたマイコトキシンの種類、粉砕機の型式（粒子径）および農産物の種類毎に個別のものである。粉砕機の型式は粒子径の分布に影響する。平均粒子径が小さくなると（単位重量当たりの粒子数は増加）、任意の検体量における二次検体での分散は減少する。

8.3 分析でのバラツキ

破砕した検査用検体から二次検体を取り出したら、直ちに溶媒抽出を行う。分析法は通常、溶媒抽出、遠心分離、乾燥、稀釈および定量等の数段階からなる^[39]。その結果、同じ二次検体の抽出物の反復分析でもかなりの変動が認められ

る。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による検体数 na でのトウモロコシ穀粒のアフラトキシン測定分散 VAh を式で示した⁽³⁴⁾。

$$〔式 9〕 VAh = (0.143/na) M1.16$$

ここで、 M は ppb で表した二次検体中のアフラトキシン濃度、 na は HPLC 法で定量した検体数である。HPLC 法によって分析した粉砕した二次検体中のアフラトキシン $20ppb$ での分散は 4.6 で、変動係数は 10.7% となる。

高速液体クロマトグラフィーは、薄層クロマトグラフィー（TLC）や免疫測定法（ELISA）のような他の分析法に比べて変動が少ない傾向にある⁽⁴⁰⁾。共同研究の精度推定法を用いたトウモロコシのアフラトキシン測定における TLC（ VA_t ）法と ELISA（ VA_e ）法の分析分散を、〔式 10〕 および〔式 11〕 に示した。

$$〔式 10〕 VA_t = (0.316/na) M1.744$$

$$〔式 11〕 VA_e = (0.631/na) M1.293$$

$20ppb$ での二次検体の TLC 法および ELISA 法によるアフラトキシンの測定値の変動係数はそれぞれ 38.3% および 27.5% である。HPLC 法（ 10.7% 、〔式 9〕）によるバラツキは TLC あるいは ELISA よりも少ない。

上記の分析での分散の情報は一箇所の検査施設のもので、検査施設間の変動を反映するものではない。したがって、他の施設では公式（9）、（10）および（11）に示されたバラツキより大きいかも知れず、小さいかも知れない。施設間の分散は施設内の分散の約 2 倍である⁽⁴⁰⁾。

8.4 総合的バラツキ

図 18 および式（6）に示したとおり、マイコトキシン検査手順の総合的バラツキ VT （バラツキの統計値を分散で示す）は検査手順の各段階である検体採取（ VS ）、検体調製（ VSS ）および分析（ VA ）の分散の和である。

トウモロコシ穀粒をローマー粉砕機で破砕して免疫測定法でアフラトキシンを定量した場合のアフラトキシン検査における総合的バラツキは、〔式 7〕、〔式 8〕 および〔式 11〕 の総和である。

$$〔式 12〕 VT = (12.95/ns) M0.98 + (62.70/nss) M1.27 + (0.631/na) M1.293$$

これを用いて、 $0.91kg$ の検体（ ns ）をローマー粉砕機で微粉砕し、微粉砕した検体から $50g$ の二次検体（ nss ）を取り出し、1 検体（ na ）の免疫測定法による定量を行ったときの濃度（ M ）に対するトウモロコシ穀粒ロットの検査の検体採取、検体調製および分析の分散およびその合計を図 19 に示した。

トウモロコシ穀粒の積み荷～検体を採取した場合のアフラトキシン検査手順の各段階での $20ppb$ での分散の程度〔式 12〕を下記の〔式 13〕に示した。

$$〔式 13〕 VT = 268.1 + 56.3 + 30.4 = 354.8$$

図 21 に示したとおり、検体採取、検体調製および分析での分散は、総合的分散

のそれぞれ 75.5、15.9 および 8.6% を占める。

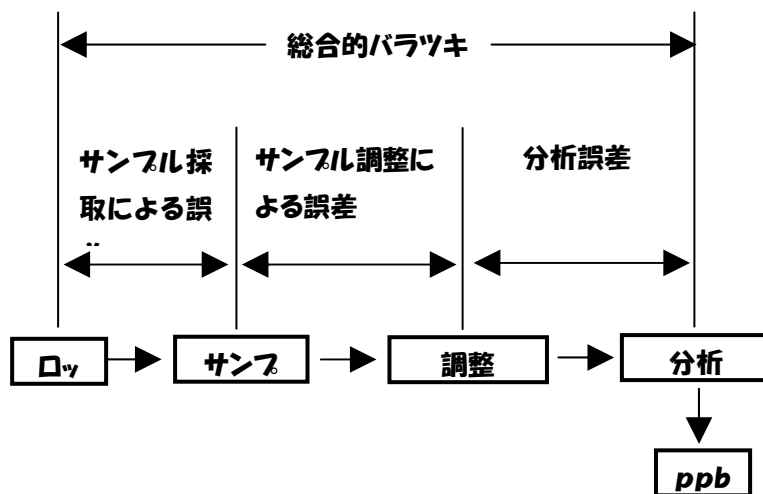


図 18 マイコトキシン検査における総合的バラツキ

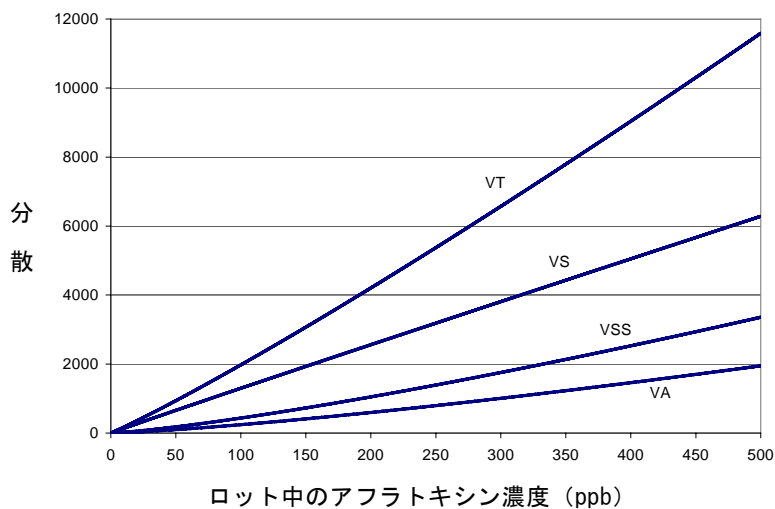


図 19 分散(V)で示したアフラトキシンの検査手順の各段階におけるバラツキは、アフラトキシン濃度の上昇に伴い増加する。総合的分散(VT)は、検体採取の分散(VS)、検体調製の分散(VSS)および分析の分散(VA)の合計である

上記の例が示すように、ロット中の汚染穀粒の極端な分布のために、検体採取段階での誤差がマイコトキシンの検査手順の総合的バラツキ（不確実性）の大部分を占める。穀粒 10,000 個につき 6 個の汚染で 1 ロット中の濃度が 20ppb となる^[41]。汚染ロット中の穀粒間の極端なマイコトキシンの分布によって、少量の検体では汚染穀粒を見逃し易く、ロット中濃度を過小評価することになる。これと

は逆に、検査用検体に高度に汚染した穀粒が1個入っただけで、ロット中濃度を過大評価することになる。適切な検体選択法を用いた場合でも、上述のマイコトキシンの分布が原因となって検査用検体間の濃度のバラツキは大きくなる。

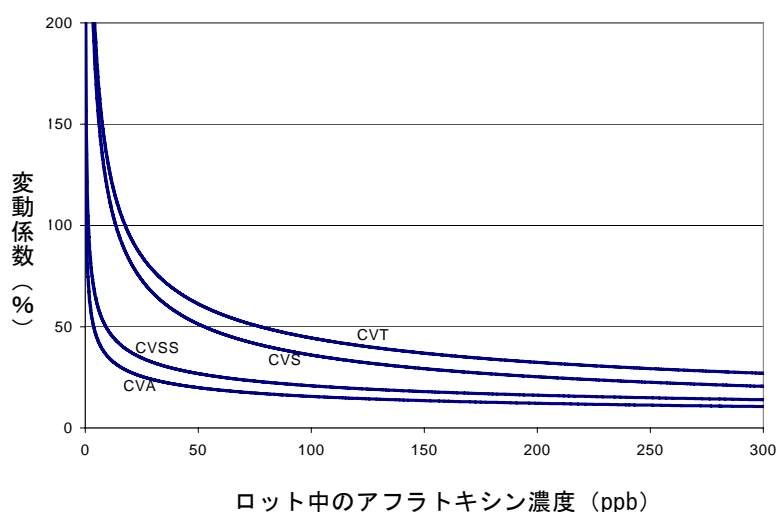


図 20 変動係数(CV)で示したアフラトキシンの検査手順の各段階におけるバラツキはアフラトキシンの濃度の上昇に伴い減少する。総合的 CV(CVT)は、検体採取の CV(CVS)、検体調製の CV(CVSS)および分析の CV

検査手順	変動	比率(%)
0.91kg ローマー、50g	268.1	75.5
ELISA、1 検 体	30.4	8.6
	354.8	100.0

図 21 0.91kg の検体採取、ローマー粉砕機で破砕した 50g の二次検体および1検体の免疫測定法による 20ppb でのトウモロコシ穀粒中のアフラトキシンの測定分散で示したバラツキ。検体採取、検体調製および分析の誤差は、全誤差のそれぞれ 75.5、15.9 および 8.6%を占める

9.0 マイコトキシンの検査手順でのバラツキの低減

ロット中の真の濃度のより正確な推定値を得る唯一の方法は、検査手順の総合的バラツキを減らすことである。検査手順の総合的バラツキの減少、マイコトキシン検査手順の各段階のバラツキを減らすことで達成できる。検体量を増やすことで検体採取のバラツキを減らすことが出来る。二次検体量を増やすことおよび/あるいは微粉砕の程度を上げる（二次検体の単位重量当たりの粒子数を増やす）ことで調製時のバ

バラツキを減らすことが出来る。検体数を増やすことはより正確な定量法（TLC の代わりに HPLC）を用いることにより、分析の分散を減らすことが出来る。これらの内の 1 つ以上の段階でバラツキを減らせれば、マイコトキシン検査における総合的バラツキを減らすことが出来る〔式 6〕。

同一ロットで反復検査を行うことによってマイコトキシン検査手順の総合的バラツキが減少（精度が向上）し、アフラトキシン検査結果の開きが小さくなる。マイコトキシンの検査結果の幅は、いずれの検体量および二次検体量並びに反復分析数においても、検査手順の総合的分散 VT あるいは標準偏差 S（総合的分散の平方根）から推定できる。検査結果のおよそ 95% は最小値（ $M - 1.96 \times S$ ）および最大値（ $M + 1.96 \times S$ ）の間にある。

20 ppb の限界値で、トウモロコシ穀粒から 0.91 kg (ns) の検体を採取し、ローマ一粉砕機で検査用検体を微粉砕し、微粉砕検体から二次検体 50 g (nss) を採取し、1 検体 (na) 中のアフラトキシンを免疫測定法によって定量した例で、〔式 13〕は総合的分散および標準偏差はそれぞれ 354.8 および 18.8 であることを示している。アフラトキシン検査結果の幅は $20 \pm (1.96 \times 18.8)$ あるいは 20 ± 37 あるいは 0 と 57 ppb の間になるはずである（図 22）。

アフラトキシン検査結果の計算された幅は、検査結果が平均値に対して対称となる、正規分布する場合にのみ当てはまる。通常アフラトキシンの分析結果の分布には歪みがあるが、検体量が増加すると対称に近づく。

検査	分散
0.91 kg	268.1
ローマ一、50 g	56.3
TLC、1 検体	30.4
計	354.8

$$\text{幅} = 20 \pm 1.96 \sqrt{354.8} = 20 \pm 37 = 0 \sim 57 \text{ppb}$$

図 22 上記のアフラトキシン検査手順の分散 354.8 は、20ppb でのトウモロコシ穀粒のロット中のアフラトキシン検査値が 0ppb～57 ppb となることを示している。

9.1 検体量

汚染ロットをアフラトキシン 20ppb で検査する場合において、検体を 0.91kg から 4.54kg に増量した場合の総合的バラツキおよびマイコトキシン検査値幅の減少に対する効果を図 23 に示した。

検体量を 0.91kg から 5 倍量の 4.54kg に増量すると、検体採取での分散は 266.5 から 5 分の 1 の 53.3 となる。総合的分散は 350.7 から 137.5 へと減少する。

$$\text{〔式 14〕 } VT = 53.3 + 56.3 + 27.9 = 137.5$$

検体量を 0.91kg から 4.54kg に増量すると、アフラトキシン検査値の幅はそれぞれ 20 ± 37 から 20 ± 23 に減ずる。

検査	分散	検査	分散
0.91 kg	266.5	4.54 kg	53.3
ローマー、50 g	56.3	ローマー、50 g	56.3
TLC、1 検体	27.9	TLC、1 検体	27.9
計	350.7	計	137.5
幅 20±37		幅 20±23	

図 23 検体増量による検体採取でのバラツキの減少効果

9.2 二次検体量

二次検体を 50g から 100g に増量した場合の検体調製での分散の減少に対する効果を図 24 に示した。

検体調製時での分散は 56.3 から 28.2 に半減する。総合的分散は 350.7 から 322.6 に減少する。

$$〔式 15〕 VT = 266.5 + 28.2 + 27.9 = 322.6$$

アフラトキシン検査値の幅は 20±38 から 20±36 に減少する。

検査	分散	検査	分散
0.91 kg	266.5	0.91 kg	266.5
ローマー、50 g	56.3	ローマー、100 g	28.2
TLC、1 検体	27.9	TLC、1 検体	27.9
計	350.7	計	322.6
幅 20±37		幅 20±36	

図 24 二次検体増量による検体調製でのバラツキの減少効果

9.3 定量検体数

免疫測定法による分析で定量検体数を 1 から 2 に増加した場合の分析の分散の減少に対する効果を図 25 に示した。

分析での分散は 27.9 から 14.0 に半減する。総合的分散は 350.7 から 336.8 に減少する。

$$〔式 16〕 VT = 266.5 + 56.3 + 14.0 = 336.8$$

アフラトキシン検査値の幅は 20±38 から 20±37 に減少する。

マイコトキシン検査手順でバラツキを減少するコストは、手順の各段階によって異なる。所定のコストでバラツキの減少効果を最大にする必要がある。通常、マイコトキシン検査手順での総合的バラツキの低減を図る場合には、検体量を増

加することが一番効果的な方法である。

反復による効果—トウモロコシ穀粒 (20 ppb)			
検査	分散	検査	分散
0.91 kg	266.5	0.91 kg	266.5
ローマー、50 g	56.3	ローマー、50 g	56.3
TLC、1 検体	27.9	TLC、2 検体	14.0
計	350.7	計	336.8
幅 20±37		幅 20±37	

図 25 アフラトキシン定量の検体数の増加による分析でのバラツキの減少効果

10.0 マイコトキシン抜き取り検査法の設計

マイコトキシン検査値間のバラツキによって、マイコトキシン抜き取り検査法には2種類の誤判定が存在する。

一つ目は、良好ロット（法的規制値以下の濃度のロット）が抜き取り検査法によって不良と判定され、不合格となることである。この種の誤判定は、不合格によって製品の販売業者に無用のコストをもたらすので、しばしば販売者のリスク（偽陽性）と呼ばれる。

二つ目は、不良ロット（法的規制値を越える濃度のロット）が抜き取り検査法によって良好と判定され、合格となることである。この種の誤判定は、汚染ロットが食品あるいは飼料に加工されて健康問題および/あるいは経済的損失を製品の購入者にもたらすので、しばしば購入者のリスク（偽陰性）と呼ばれる。規制に従った品質を効率的に維持するために、検体採取法に関連する上記の二つのリスクを評価しなければならない（図 26）。これらの評価に基づき、検体採取法のコストと経済性（経済性とはマイコトキシン汚染ロット排除によるもの）を評価する必要がある。

検体検査値 X があらかじめ定めた合格/不合格限界値 X_c よりも大きい場合は不良と定義し、 X_c 以下の場合は良好と定義する。通常 X_c は法的規制値 M_c と同じであるが、 X_c は M_c よりも大きいか、あるいは小さい場合もある。ある検体の場合、マイコトキシン濃度 M のロットは、その検査法によりある確率 $P(M) = \text{prob}(X < X_c | M)$ で合格となる。ロット中濃度 M に対して $P(M)$ をプロットした曲線を検査特性 (OC) 曲線と呼ぶ。図 27 は OC 曲線の一般的な形を描いたものである。

M が 0 に近づくと、 $P(M)$ は 1 あるいは 100% に近づく。 M が大きくなると、 $P(M)$ は 0 に近づく。ほとんど汚染がないか全く汚染がない ($M=0$) ロットは抜き取り検査で常時合格し；高度に汚染した ($M=大$) ロットは抜き取り検査で合格することはなく（常時不合格）；合格/不合格限界値近くの汚染濃度のロットは合格しない場合がある。OC 曲線はその抜き取り検査法で指定検体量、微粉砕の程度、二次検

体量、分析方法および分析回数並びに合格/不合格限界値 X_c により特定の形を形成する。

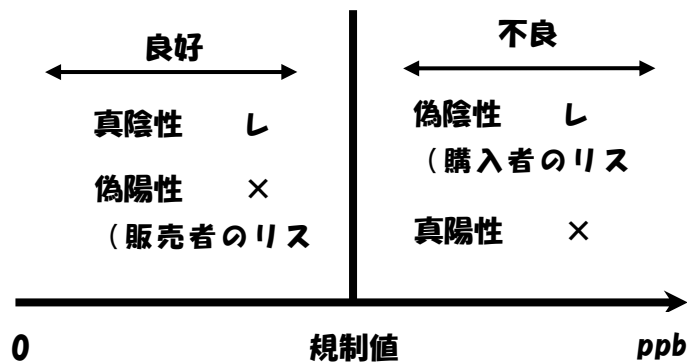


図 26 ロットを良好あるいは不良と分けした場合の 4 種の結末。不合格と判定された良好ロット(偽陽性)および合格と判定された不良ロット(偽陰性)は誤った判定。合格と判定された良好ロット(真陰性)および不合格と判定された不良ロット(真陽性)は正しい判定

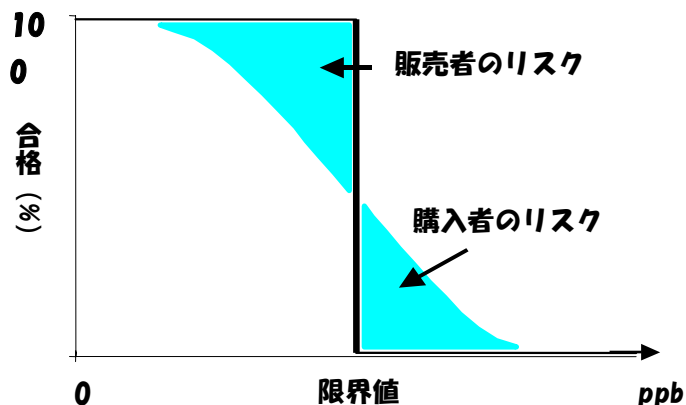


図 27 検査特性(OC)曲線の一般的な形。OC 曲線の形はアフラトキシンの検査手順に固有なもので、購入者および販売者のリスクの程度を表す

10.1 合格確率の計算

農産物のマイコトキシン抜き取り検査での合格の確率 $P(M)$ は、反復検査結果の分布が分かり、マイコトキシン抜き取り検査法の適切な分散の関係性が分かれば計算できる。数種類の農産物の数種類のマイコトキシンの検査値の分布は、負の二項分布や複合ガンマ分布のような歪んだ分布となることが示されてきた。トウモロコシ穀粒のアフラトキシン抜き取り検査法における合格の確率 $P(M)$ の計算方法を以下に記述する。

トウモロコシ穀粒のロット中のアフラトキシンの幅広い濃度の検査結果が複合ガンマ分布となることが報告されている^[41, 42]。濃度 M のトウモロコシ穀粒ロッ

トから n 個の反復検体を採取した場合、検体の濃度の分布は下記の関数で表される。

$$f_n(x) = e^{-\lambda} \quad x=0 \text{ の場合}$$

$$f_n(x) = \sum_{k=1}^n \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{\Gamma(k+1)} \frac{x^{k\alpha-1} e^{-x/\beta}}{\beta^{k\alpha} \Gamma(k\alpha)} \quad x>0 \text{ の場合} \quad \text{〔式 17〕}$$

ここで x は n 個の検体中の全アフラトキシン濃度、 Γ はガンマ関数で α 、 β および γ は複合ガンマ関数のパラメータである。パラメータ α はロット内の個々の汚染穀粒間のアフラトキシンの分布の形に関連し、パラメータ β はスケールに、パラメータ γ はロット内汚染穀粒の百分率に関連している。パラメータ α 、 β および γ は下式で計算できる。

$$\text{〔式 18〕 } \gamma = [(\alpha+1) / \alpha] [M2/VT]$$

$$\text{〔式 19〕 } \beta = M / \alpha \gamma$$

$$\text{〔式 20〕 } \alpha = 2$$

ここで VT は式 (12) のアフラトキシン抜き取り検査手順の総合的分散で、M はロット中のアフラトキシン濃度である。

トウモロコシ穀粒中のアフラトキシン抜き取り検査手順での合格の確率あるいは OC 曲線は、以下の段階にしたがって計算する。

- I 最初に、検査法あるいは検査手順、検体量、検体調製法（粉砕機の種類および二次検体量）、評価すべき分析法（方法および反復数）および合格/不合格限界値 (X_c) を定める。図 23 の $n_s=4.54$ kg、ローマー粉砕機、 $n_{ss}=50$ g、ELISA、 $n_a=1$ および $X_c=20$ ppb の例を用いる。
- II 式 (14) を用いて、任意のアフラトキシン濃度 M のトウモロコシ穀粒のロットのアフラトキシン検査手順の総合的分散 VT を計算する。アフラトキシン濃度 $M=20$ ppb の場合の VT は、 $VT = (12.95/n_s) M^{0.98} + (62.70/n_{ss}) M^{1.27} + (0.631/n_a) M^{1.293}$ 、 $VT = 53.3 + 56.3 + 27.9 = 137.5$
- III 〔式 18〕、〔式 19〕 および 〔式 20〕 によって複合ガンマ分布のパラメータ α 、 β および λ を計算する。 $\lambda = [(\alpha+1) / \alpha] [M2/VT] = [(2+1) / 2] [(20 (20) / 137.5)] = 4.36$
 $\beta = M / \alpha \lambda = 20 / (2) (4.36) = 2.29$ 、 $\alpha = 2$
- IV 〔式 17〕 の複合ガンマ分布を用いて、 $M=20$ ppb、 $\alpha=2$ 、 $\beta=2.29$ および $\lambda=4.36$ で、 20 ppb の合格/不合格限界値 X_c 以下の検査結果 X 、 $P(X \leq X_c | M)$ を得る確率を計算する。
- V 一連の M 値について、計算 (I から IV) を繰り返す。 $P(X \leq X_c | M)$ が 0.0 を越えて 1.0 未満の M 値を選択する。 $P(X \leq X_c | M)$ 値と M 値を記録し、購入者のリスクおよび販売者のリスクの程度を決定する。

Iで記述した抜き取り検査法における一連のロット中濃度のトウモロコシ穀粒ロットの合格および不合格の確率を表4に示した。

表4 4.54kgの検体量、ローマー粉碎機、50gの二次検体量、ELISA法、1検体および20ppbの合格/不合格限界値を用いた抜き取り検査法における一連のトウモロコシ穀粒ロット中濃度のロットの合格および不合格の確率

ロット中濃度 M(ppb)	Mにおけるロットの合格の確率 $P(X \leq X_c M)$	Mにおけるロットの不合格の確率 $1 - P(X \leq X_c M)$
0	1.000	0.000
5	0.983	0.017
10	0.887	0.113
15	0.726	0.274
20	0.551	0.449
25	0.396	0.604
30	0.274	0.726
35	0.185	0.815
40	0.122	0.878
45	0.079	0.921
50	0.051	0.949
55	0.032	0.968
60	0.020	0.980

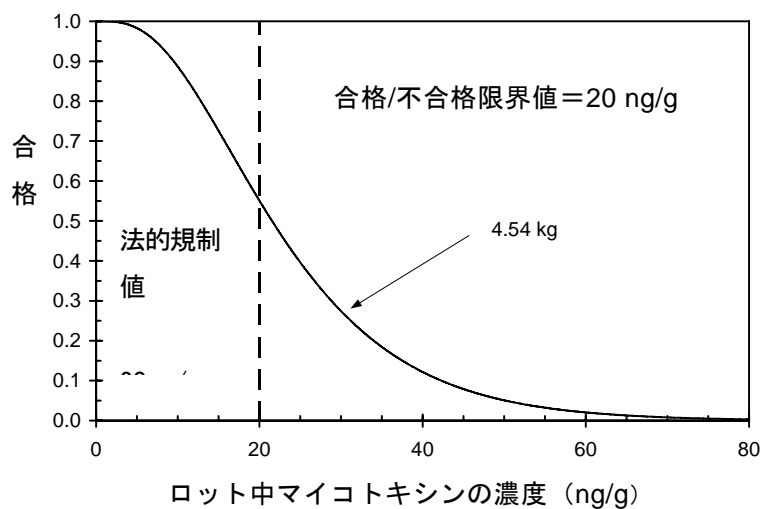


図28 4.54 kgの検体量、ローマー粉碎機、50 gの二次検体量、ELISA法、1検体および20 ppbの合格/不合格限界値を用いた抜き取り検査法における検査特性曲線

表4は10ppb以下のロットのほとんどはこの抜き取り検査法で合格と判定され、60ppbを越えるロットのほとんどは不合格と判定されることを示している。例え

ば、10ppb 以下および 60ppb 以上のそれぞれ 95% および 2% がこの抜き取り検査法で合格と判定される。ロット中濃度 M が増加すると、この抜き取り検査法で合格と判定される割合は減少する。表 4 の合格の確率を図 28 で図示したが、滑らかな曲線となった。

任意の抜き取り検査法で、OC 曲線は購入者のリスクおよび販売者のリスクを表す。 M_c を法的規制値あるいはロット中最大許容濃度と定義すると、 $M > M_c$ では不良ロット、 $M \leq M_c$ では良好ロットとなる。図 27 で $M > M_c$ の曲線下面積はある抜き取り検査法での購入者のリスク（不良ロットが合格）、 $M < M_c$ の OC 曲線上面積は販売者のリスク（良好ロットが不合格）となる。表 4 に示した例で、20 ppb 以下のロットを良好とし、20 ppb を上回るロットを不良とすると、20 ppb 以下で不合格となったロットは販売者のリスク（良好ロットが不合格）と見なされ、20ppb を上回って合格となったロットは購入者のリスク（不良ロットが合格）と見なされる。

OC 曲線の形は、検体量、微粉碎の程度、二次検体量、分析回数および合格/不合格限界値によって個別に決まるために、これらのパラメータはある抜き取り検査法での購入者のリスクおよび販売者のリスクの軽減に利用できる。

10.2 検体量のリスクへの影響

合格/不合格限界値を法的規制値の 20ppb としたトウモロコシ穀粒のアフラトキシン検査法における OC 曲線の形に対する検体量の増量の影響を図 29 に示した。

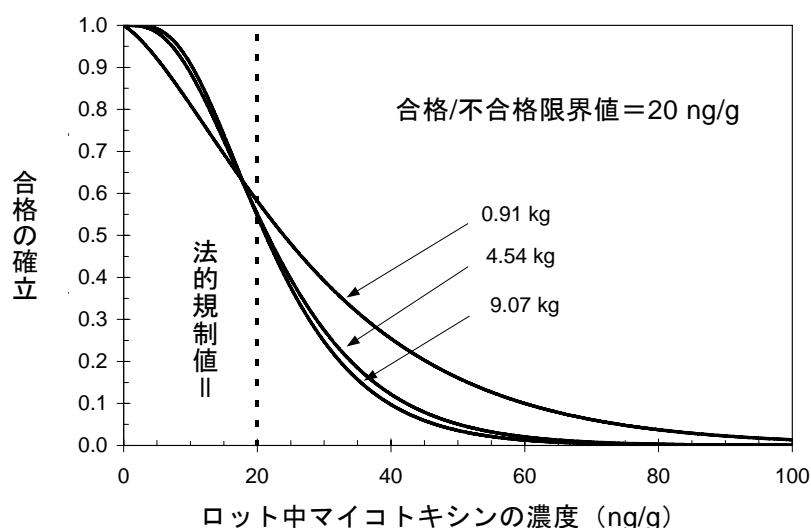


図 29 3 種類の検査特性曲線は、検体の増量が購入者リスクと販売者のリスクを共に軽減することを示している。

検体量を 0.91kg から 9.0kg に増量すると法的規制値付近の曲線の傾きは増加し、それぞれのリスクの面積は減少する。結果として、検体量の増量は購入者のリスクと販売者のリスクの両方を軽減する。検体の微粉碎の程度、二次検体量あるい

は分析回数を増加した場合にも同様の効果が得られる。

10.3 合格/不合格限界値のリスクへの影響

トウモロコシ穀粒ロットのアフラトキシン検査で、法的規制値に対して合格/不合格限界値を変更した場合の影響を図 30 に示した。

法的規制値が 20ppb で、 X_c を 20ppb より低い値に変えると、OC 曲線は左方移動する。 $X_c=20$ の検査法に比べて、購入者のリスクは減少するが、販売者のリスクは増加する。 X_c が 20 よりも大きくなると、OC 曲線は右方移動する。その結果、販売者のリスクは減少するが、購入者のリスクは増加する。法的規制値に対して合格/不合格限界値を変更した場合は、一方が減少すると他方が自動的に増加するため、二つのリスクの一方のみが減少する。

数種類の農産物のマイコトキシン検査において、販売者のリスクおよび購入者のリスク、合格および不合格と判定される全ロット数、合格および不合格と判定されるロット中のマイコトキシン量およびコストを予測する方法が開発されてきた^[43-45]。USDA 農業販売促進局および落花生業界は殻剥き落花生のアフラトキシン検査法の設定に^[46]、FAO は生落花生のアフラトキシン検査法の設定にこれらの方法を採用している^[42]。

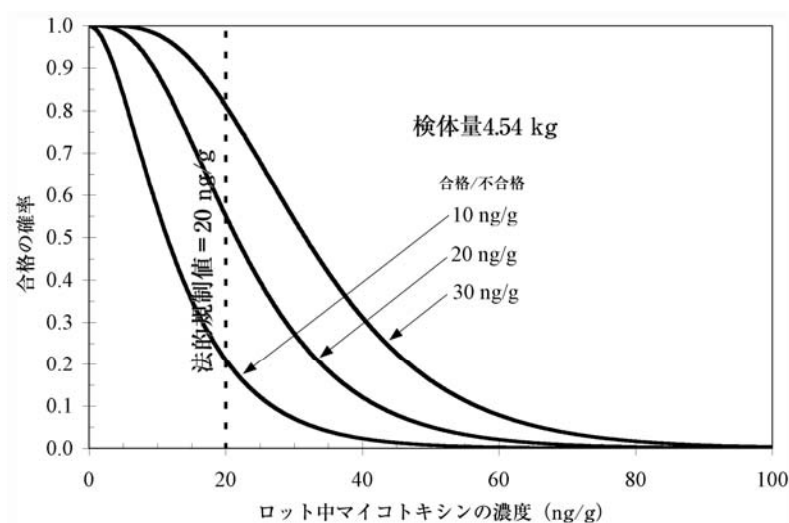


図 30 3 種類の合格/不合格限界値に対する 3 種類の検査特性曲線。合格/不合格限界値 (10ppb) が法的規制値 (20ppb) よりも低いと、販売者のリスクは増加し、購入者のリスクは減少する。合格/不合格限界値 (30ppb) が法的規制値 (20ppb) よりも高いと、販売者のリスクは減少し、購入者のリスクは増加する

11.0 結論

マイコトキシン抜き取り検査手順における不確実性（偏りとバラツキ）のために、バルクロット中の真の濃度を 100%確実に測定することは困難である。検体を正しく採取した（偏りが無い）としても、マイコトキシン抜き取り検査手順に起因するバラツキが生ずる。マイコトキシン抜き取り検査における分散は、検体採取、検体調製および分析における分散を合計したものである。検体量が少ない場合は、検体採取がバラツキの最大の原因となる。検体量、検体の微粉碎の程度、二次検体量および定量する検体数を増やすと、マイコトキシン抜き取り検査手順でのバラツキを低減することが出来る。マイコトキシン抜き取り検査手順でのバラツキを低減することにより、抜き取り検査において誤って分類されるロットの数を減少させることが出来る。

12.0 参考文献

- [1] Cullen, J.M. and P.M. Newberne. 1994. Acute Hepatotoxicity of aflatoxin. In: The Toxicology of Aflatoxin, eds:D.L.Eaton and J.D. Groopman, Academic Press, Inc. San Diego, CA, 921101,pp 3-26.
- [2] Moss, M.O. 1991. The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Mycotoxins and Animal Foods, eds: J.E. Smith and R.S. Henderson. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 33431, pp. 37-56.
- [3] Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: Risks in Plant Animal, and Human Systems. Task Force Report Number 139. Ames, IA, 500014, pp. 199.
- [4] Phillips, T.D., B.A. Clement, and D.L. Park. 1994. Approaches to reduction of aflatoxin in foods and feeds. In: The Toxicology of Aflatoxin, eds:D.L.Eaton and J.D. Groopman, Academic Press, Inc. San Diego, CA, 921101,pp 383-406.
- [5] Food and Agriculture Organization (1995) Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995. FAO Food and Nutrition Paper 64. FAO, Viale della Terme di Caracalla, 00100, Rome, Italy. pp.43.
- [6] Food and Agriculture Organization. 2001. Sampling Plan for Peanuts. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.
- [7] Cochran, W. G. and G.M. Cox. 1957. Experimental Design. John Wiley and Sons, Inc, New York, NY, pp. 15-16.
- [8] William, P.C. (1991) Storage of Grains and Seeds. in: Mycotoxins and Animal Foods. J.E. Smith and R.S. Henderson (Eds.) , CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 33431, pp. 721-746.
- [9] Shotwell, O. L., Goulden, M. L., Botast, R. J., and Hasseltine, C. W. (1975) Mycotoxins in hot spots in grains. 1. Aflatoxin and zearalenone occurrence in stored corn, Cereal Chem., 52:687.
- [10] Bauwin, G. R. and Ryan, H. L. 1982. Sampling inspection and grading of grain, in Storage of Cereal Grains and Their Products, Vol 5, Christensen, C.M. (Ed.) , Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota, p. 115.

- [11] Hurburgh, C. R. and Bern, C. J. 1983. Sampling corn and soybeans. 1 Probing method, Trans. Am. Soc. Agric. Engineers, 26:930.
- [12] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2001. Proposed Draft Revised Sampling Plan for Total Aflatoxin in Peanuts Intended for Further Processing. Joint FAO/WHO Food Standards Program, CODEX Alimentarius Commission, 24th Session, Geneva, Switzerland, July 2-7, 2001. FAO/WHO Joint Office, Viale della Terme di Caracalla, 00100, Rome, Italy. pp.276-280.
- [13] United States Department of Agriculture. 1975. Inspectors Instructions, Agricultural Marketing Service, Washington, D.C., pp. 22.
- [14] Parker, P.E., Bauwin, G.R., and Ryan, H.L. 1982. Sampling, Inspection, and Grading of Grain. IN: Storage of Cereal Grains and Their Products. C.M. Christensen (Ed.) , American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, pp.1-35.
- [15] Whitaker, T. B. and Dowell, F.E. 1995. Sampling methods to measure aflatoxin and grade factors of peanuts. in: Advances in Peanut Science. Pattee, H. E. and Stalker, H. T. (Eds.) Am. Peanut Res. Educ. Soc., Stillwater, OK.
- [16] Dickens J. W. and Whitaker, T. B. 1982. Sampling and sampling preparation, in Environmental Carcinogens-Selected Methods of Analysis:Some Mycotoxins, Egan, H., Stoloff, L., Scott, P., Costegnaro, M., O'Neill, I.K., and Bartsch, H., (Eds.) Vol. 5, ARC, Lyon, p17.
- [17] Campbell, A. D., Whitaker, T. B., Pohland, A. E., Dickens, J. W., and Park, D. L. 1986. Sampling sample preparation, and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. Pure and Applied Chem., 58, 305-314.
- [18] Malone, B. 2000. Solution Fluorometric Method for Deoxynivalenol in Grains. in: Mycotoxin Protocols. M.W. Trucksess and A.E. Pohland (Eds.) . Humana Press, Totowa, NJ, 07512, pp. 97-113.
- [19] Dickens, J. W. and Satterwhite, J. B. 1969. Subsampling mill for peanut kernels, Food Technol., 23:90-92.
- [20] Association of Official Analytical Chemists. 1990. "Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists", (Kenneth Helrich, (Ed.) , 15th edition, Association of Official Analytical Chemists, Inc., ARLington, Va., 22201-3301.
- [21] Nesheim, S. 1979. Methods of Aflatoxin Analysis, NBS Spec. Publ., (US) No.519, pp. 355.
- [22] Steyn, P.S., Thiel, P.S., and Trinder, D.W. 1991. Detection and Quantification of Mycotoxins by Chemical Analysis. in: Mycotoxins and Animal Foods. J.E. Smith and R.S. Henderson (Eds.) , CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 33431, pp. 165-221.
- [23] Whitaker, T. B., Dickens, J. W., and Monroe, R. J. 1972. Comparison of the observed distribution of aflatoxin in shelled peanuts to the negative binomial distribution. J. Am. Oil Chem. Soc., 49, 590-593.
- [24] Dickens, J. W., Whitaker, T. B., Monroe, R. J., and Weaver, J. N. 1979. Accuracy of subsampling mill for granular material, J. Am. Oil Chem., 56:842.

- [25] Remington, R. D. and Schrok, M. A. 1970. *Statistics and Applications to the Biological and Health Sciences*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 105.
- [26] Whitaker, T. B., Dickens, J. W., and Monroe, R. J. 1974. Variability of aflatoxin test results, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 51:214-218.
- [27] Whitaker, T. B., Whitten, M. E., and Monroe, R. J. 1976. Variability associated with testing cottonseed for aflatoxin. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 53:502-505.
- [28] Whitaker, T. B., Dickens, J. W., and Monroe, R. J. 1979. Variability associated with testing corn for aflatoxin. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 56:789-794.
- [29] Whitaker, T. B., Dowell, F. E., Hagler, W. M., Jr., Giesbrecht, F. G., and Wu, J. 1993. Variability associated with sampling, sample preparation, and chemically testing farmers stock peanuts for aflatoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem., Int.* 77:107-116.
- [30] Schatzki, T. F. 1995. Distribution of aflatoxin in pistachios. 1. Lot distributions. *J. Agr. Food. Chem.*, 43:1561-1565.
- [31] Schatzki, T. F. 1995. Distribution of aflatoxin in pistachios. 2. Distribution in freshly harvested pistachios. *J. Agr. Food. Chem.*, 43:1566-1569.
- [32] Whitaker, T. B., Truckess, M., Johansson, A., Giesbrecht, F. G., Hagler, W. M., Jr., and Bowman, D. T. 1998. Variability associated with testing shelled corn for Fumonisin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem., Int.*, 81:1162-1168.
- [33] Hart, L. P. and Schabenberger, O. 1998. Variability of vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year. *Plant Disease*, 82:625-630.
- [34] Johansson, A. S., T. B. Whitaker, W. M. Hagler, Jr., F. G. Giesbrecht, J. H. Young, and D. T. Bowman. 2000. Testing shelled corn for aflatoxin, Part I: Estimation of variance components. *J. Assoc. Off. Anal. Chem., Int.*, 83:1264-1269.
- [35] Whitaker, T. B., W. M. Hagler, Jr., F. G. Giesbrecht, and A. S. Johansson. 2000. Sampling, sample preparation, and analytical variability associated with testing wheat for deoxynivalenol. *J. Assoc. Off. Anal. Chem., Int.*, 83:1285-1292.
- [36] Cucullu, A. F., Lee, L. S., Mayne, R. Y., and Goldblatt, L. A. 1986. Determination of aflatoxin in individual peanuts and peanut sections, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43:89.
- [37] Cucullu, A. F., Lee, L. S., and Pons, W. A. 1977. Relationship of physical appearance of individual mold damaged cottonseed to aflatoxin content, *J. Am. Oil chem. Soc.*, 54:235A.
- [38] Shotwell, O. L., Goulden, M. L., and Hessletine, C. W. 1974. Aflatoxin: Distribution in contaminated corn, *Cereal Chem.*, 51:492.
- [39] Nesheim, S. and M. W. Trucksess. 1986. Thin-layer chromatography/high performance thin-layer chromatography as a tool for mycotoxin determination. In: *Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins*. Ed. R.J. Cole, Academic Press, Inc., Orlando, FL, 32887. pp. 239-264.

- [40] Whitaker, T. B., Horwitz, W., Albert, R., and Nesheim, S. 1996. Variability associated with methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities. *J. Assoc. Off. Analytical Chem., Int.* 79:476-485.
- [41] Johansson, A. S., Whitaker, T. B., Hagler, Jr., W. M., Giesbrecht, F. G., and Young, J. H. 2000. Testing shelled corn for aflatoxin, Part II: Modeling the distribution of aflatoxin test results. *Assoc. Off. Anal. Chem., Int.* 83:1270-1278.
- [42] Giesbrecht, F. G. and Whitaker, T. B. 1998. Investigations of the problems of assessing aflatoxin levels in peanuts. *Biometrics* 54:739-753.
- [43] Food and Agriculture Organization. 1993. *Sampling Plans for Aflatoxin Analysis in Peanuts and Corn*. FAO Food and Nutrition Paper 55. FAO, Viale della Terme di Caracalla, 00100, Rome, Italy.
- [44] Whitaker, T. B. and Dickens, J. W. 1979. Evaluation of the Peanut Administrative Committee testing program for aflatoxin in shelled peanuts. *Peanut Sci.* 6:7-9.
- [45] Johansson, A. S., Whitaker, T.B., Hagler, W.M., Jr., Giesbrecht, F.G., and Young, J.H. 2000. Testing shelled corn for aflatoxin, Part III: Evaluating the performance of aflatoxin sampling plans. *J. Assoc. Off. Anal. Chem., Int.*, 83:1279-1284.
- [46] Whitaker, T. B., Springer, J., Defize, P. R., deKoe, W. J., and Coker, R. 1995. Evaluation of sampling plans used in the United States, United Kingdom, and The Netherlands to test raw shelled peanuts for aflatoxin. *J. Assoc. Off. Analytical Chem., Int.* 78:1010-1018.