

示す。

①添加回収試験について、冷凍食品の成分規格である細菌数（生菌数）により実施した。使用した菌液は生菌数測定内部精度管理用として市販されている枯草芽胞液を使用し、基準値については、菌数を $1 \times 10^5 \text{cfu/g}$ に調製したもの、基準値の $1/5$ の菌数については $2 \times 10^4 \text{cfu/g}$ に調整した菌液を検体に添加し、試験品とした。添加回収率試験の結果、基準値における添加菌数は $4.1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5 \text{cfu/g}$ で添加回収率の平均値は 99%（中央値 100%）であった。基準値の $1/5$ の菌数では添加菌数は $7.6 \times 10^3 \text{cfu/g} \sim 2.5 \times 10^4 \text{cfu/g}$ で添加回収率の平均値は 98%（中央値 99%）であった。

②大腸菌群、E.coli 等の陰性基準のある試験品については、検出下限値を理論値 1cfu/g と設定し検体を段階希釈して試料原液を作成することから検出下限値を $1 \times 10^2 \text{cfu/g}$ とした。試験の結果、検出下限値の添加菌数は、 $2.1 \times 10^2 \text{cfu/g} \sim 1.0 \times 10^4 \text{cfu/g}$ で、大腸菌群及び E.coli の形態観察による同定鑑別はすべて陽性であった。

添加回収試験について精度管理の一般ガイドラインにおいては、「添加した既知の微生物の回収を少なくとも 70%~120% を目安とし確保すること」となっていることから、今回の基準値及び基準値の $1/5$ の菌数における添加回収試験は良好な結果が得られた。

また、陰性基準のある試験品において正確に同定鑑別された。今後、この結果を踏まえ、例えば、精度管理の一般ガイドラインに示されている添加回収試験に

おいては、基準値及び基準値の $1/5$ の濃度の計 2 検体で実施とあるが、今回の結果から「基準値又は基準値の $1/5$ の濃度で実施する」など今後この結果を踏まえ、検査機関においては日常の微生物試験における内部精度管理の実施についての資料とされたい。

E. 結論

1. 食品衛生検査関連の既存国際的ガイドラインの調査

本年度は、コーデクス「分析・サンプリング方法部会」において検討され、総会において採択されたガイドラインのなかから、「単一試験における分析法の妥当性確認に関する IUPAC ガイドラインの単一試験室による分析バリデーションのための同一ガイドライン」について翻訳し、登録検査機関に配布できた。次年度は、昨年実施した「サンプリングに関する一般ガイドライン」、「測定の不確かさに関するガイドライン」及び本年度の「単一試験室による分析バリデーションのための同一ガイドライン」の翻訳を基に現在実施しているサンプリング法との比較並びに測定の不確かさ導入に対する問題点や単一試験室における分析バリデーション等の検討を行う予定である。また、残りの未翻訳ガイドラインについても、本年同様、翻訳の継続を予定している。

2. 輸入検査機関における精度管理実施状況の調査と対処

1) 「食品衛生に係わる試験の品質保証研究会」：当研究会で討議された結果を踏まえ、今後継続して実施する事項を決め、以下に示した。

①当面、厚生局、検疫所、登録検査機関を中心に検討会を行う。

②今後の活動における基本的合意事項：
当研究会の事務局は登録検査協会に置く（関東地域から全国への展開、作業部会の設置等を考慮する）。

ア. 各作業部会等を通じて各登録検査協会が現在抱えている問題の抽出、整理等を行う。

イ. 本研究会で討議した事項の中でプライオリティーの高い事項から検討する。
例えば、検査法のバリデーション（またはヴェリフィケーション）の仕方の統一化（ガイドライン）、実質的な内部精度管理ガイドラインの作成、基準値を超える違反事例時の対応（検査データの補足、異種検査法での確認等）、検査技術情報の共有化のための情報収集ネットワーク構築と設置等

2) 登録検査機関における内部精度管理実施状況に関する調査：本年度は、登録検査機関協会の微生物作業部会の会員 13 機関の協力をえて、「精度管理の一般ガイドライン」にそって試験を実施した。各検査機関においては日常検査での内部精度管理の実施への参考資料とされたい。今後は、微生物試験に係る内部精度管理試料について、現在外部精度管理で実施しているような試

料が日常検査における内部精度管理試料としての利用について検討いたしたい。

なお、微生物試験における諸外国における実施状況については、検索できなかった。

内部精度管理については今後も実施内容を整理し、登録検査機関協会の各作業部会を通じて議論しながら適切な対処策の提示に向けて検討することとした。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成18年度 厚生労働省科学研究補助金
(食品の安心・安全確保研究事業)

食品安全施設等に関する国際協調のあり方に関する研究

分担研究報告 (平成18年度)

「国際規格における分析サンプリング法の制定に関する研究」
——食品衛生法に基づく登録検査機関のコーデックスへの対応——

| | | |
|-------|---------------------------|-----------------------|
| 主任研究者 | 玉木 武 (社) 日本食品衛生協会理事長 | 食品衛生研究所長 |
| 分担研究者 | 松木 容彦 (社) 日本食品衛生協会食品衛生研究所 | 試験検査センター長 |
| 研究協力者 | 高谷 幸 (社) 日本食品衛生協会 | 常務理事 |
| | 阿部 幸秀 (社) 日本食品衛生協会食品衛生研究所 | 課長 |
| | 辰濃 隆 | 食品衛生登録検査機関協会 専務理事 |
| | | 食品衛生登録検査機関協会 輸入食品検査部会 |

国際純生応用化学連合

分析試験室を対象とする品質保証システム同一化のための
分析、応用、臨床、物理化学部局間調査委員会*

単一試験室による分析法バリデーションのための 同一ガイドライン

『IUPAC：国際純正応用化学連合技術報告書』

1999年11月4日、5日ハンガリー、ブダペストにて開催された国際IUPAC、ISO、AOACの後援で行われたシンポジウム、「分析試験室を対象とする品質保証システムの同一化」に関する報告書。

発行作成者：マイケル・トムソン¹、ステオーブン L.R.エリソン²、ロジャー・ウッド^{3†}

¹ ロンドン大学バーベック・カレッジ、化学科。英国、ロンドン、WC1H 0PP。

² 英国政府化学者試験室。英国、ミドルセックス TW11 0LY、テディントン、クイーンズロード。

³ 食品基準庁。英国、ノリッジ、コロニー、ノリッジ・リサーチ・パーク、食品調査研究所気付、NR4 7U。

† 1997年～2000年調査委員会の会員は、以下の通りである。

議長：A. ファジゲルジ。1997年～、(国際原子力機関、オーストラリア)。

会員：K・ベクナット(ノルウェー)。カルメン・カマラ(スペイン)。

K・カマン(ドイツ)。ジュエッテ・モリン・クリステンセン(デンマーク)。

S・コーツ(AOAC インターナショナル、米国)。P. ド・ビエーブル(ベルギー)。

S. L. R・エリソン(英国)。T・ギルス(米国)。J・フラビー(ハンガリー)。D. G・ホウルコム

(英国)。P. T・ホー実行ド(ニュージー実行ド)。W・ホリッジ(米国)。A・カナー(スウェー

デン)。H・クリッチ(ドイツ)。E. A・メアー(ベルギー)。C・ニエト・ド・カストロ(ポルトガル)。

M・パーカニー(スイス)。J・パウヴルス(ベルギー)。M・トンプソン(英国)。M.J・ヴァー

ネンゴ(アルゼンチン)。R. ウッド(英国)。

* IUPACの正式な許可なしに電子手段による本書の再版、復刻、あるいはその保管ならびに宣伝、またはそのどちらかが許される条件は、著作権記号©、IUPACの名前、発行年度に加えて、出典の根拠が十分伴う謝辞がはっきりと目に見えるものであること。別の言語に翻訳したものの出版は、IUPAC関連の全国加盟組織から事前承認という特別の条件を受けなければいけない。

†Corresponding author: 論文共著者

単一試験室による分析法バリデーションのための

同一ガイドライン

『IUPAC : 国際純正応用化学連合技術報告書』

要約:分析法バリデーションは、分析化学における品質保証の総合的なシステムに必要な要素として一般に認められた手段の一つである。従来、ISO、IUPAC、AOAC インターナショナルは、「分析方法の性能調査の設計、実行、解説」[1]、「(化学)分析試験室の技能試験」[2]、「分析化学試験室の内部品質管理」[3]、「分析測定回収情報の使用」[4]に関して合意を得たプロトコル(実施手順書)、もしくはガイドラインの作成を共同で行ってきた。これらのプロトコル(実施手順書)／ガイドラインを作成した特別調査委員会は、現在 IUPAC によって単一試験室の分析法バリデーションについてのガイドラインを作成する権限を与えられている。これらのガイドラインは、実施手順に関する最低限の分析手順を推奨するもので、分析法バリデーションを保証するために用いなければならない。

本ガイドラインの草案は、化学試験室の品質保証システムの同一化に関する国際シンポジウムでこれまで論議されてきた内容であり、英国王立化学協会によって出版されたものをもとにしている。

目次

- 1 序論
 - 1.1 背景
 - 1.2 既存プロトコル(実施手順書)、規格、指針
 - 2 定義および用語
 - 2.1 一般
 - 2.2 本ガイドラインのみに用いられる定義
 - 3 分析法バリデーション、不確かさ、品質保証
 - 4 分析法バリデーションの基本原則
 - 4.1 分析法バリデーションの仕様とバリデーション範囲
 - 4.2 試験の仮定条件
 - 4.3 分析誤差の原因
 - 4.4 分析方法および試験室結果
 - 5 バリデーション検討の実施
 - 6 バリデーション検討の範囲
 - 7 推奨事項
- 付録 A:分析性能特性検討のための必要条件に関する注記
- A1 適用性
 - A2 選択性
 - A3 検量線ならびに直線性
 - A3.1 直線性ならびに切片
 - A3.2 一般的マトリックス効果試験
 - A3.3 最終検量線操作
 - A4 真度
 - A4.1 真度の測定
 - A4.2 真度の試験条件
 - A4.3 真度の測定に対する標準値
 - A.4.3.1 認証標準物質
 - A.4.3.2 標準物質
 - A.4.3.3 標準分析法の使用
 - A.4.3.4 添加／回収率の使用
 - A5 精度
 - A6 回収
 - A7 範囲
 - A8 検出限界
 - A9 定量限界

A10 感度

A11 頑健性

A12 目的適合性

A13 マトリックスによる変動

A14 不確かさの測定

付録 B バリデーション試験の不確かさの推定に関する追加的要件

B1 検出感度分析

B2 判定

客と同意し、試験法を決定することが重要である。しかしながら、いくつかの状況下では、これらの特性は、法律によって規定されている(たとえば、食品での動物用医薬品、および残留農薬)。試験室が引き受ける評価の範囲は、法律に沿っているものでなければならない。

それにもかかわらず、複数の分析分野では、規定されたマトリックスにおける安定化合物の同定に多くの試験室が同じ分析法を使用している。コラボ試験された分析法がそれらの試験室で役に立つものであれば、そのコラボ試験のための費用は正当であると評価されるべきである。コラボ試験による分析法は、日常検査に採用される前の、試験室による広範囲にわたる確認作業の労力を大幅に軽減してくれる。意図する目的に合致することがわかっているコラボ試験を採用している試験室がすべきことは、その分析法で規定された分析性能特性に到達できるかを示すのみである。このように分析法が正しく使用されているかについての検証は、単一試験室の分析法バリデーションに比べ費用はかからない。ある特定の分析法について、コラボ試験でそのバリデーションを確認した後、それを採用しようとする試験室が分析性能を検証するためにかかる総費用は、多くの試験所がすべて自主的に単一試験室でバリデーションを行うよりも安くつくことがしばしばある。

1.2 既存プロトコル(実施手順書)、規格、指針

分析法バリデーションと不確かさに関するプロトコル(実施手順書)、ならびにガイドライン[8-19]の多くは、特に AOAC インターナショナル、同一化世界会議(ICH)、Eurachem で文書化されてきた:

- AOAC の統計手引き書[13]。これにはコラボ試験に先立って単一試験室によるバリデーションに関するガイダンスが含まれる。
- ICHテキスト[15]ならびに方法論[16]。これは、医薬品承認の許可を得るために行う試験について、そのバリデーションに必要な最低条件を規定している。
- *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (1998) [12]
- *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* (2000) [9]

分析法バリデーションはまた、1997年12月にFAO(国連食糧農業機関)とIAEA(国際原子力機関)の合同専門家会議で広く議論され、食糧管理における分析法のバリデーションとして、入手可能な報告書となっている[19]。

本ガイドラインは、上記の文書の重要な科学的原則をまとめたものであり、国際的承認を受けるための情報を示すとともに、さらに重要な単一試験室が分析法のバリデーションを実施する上で最高の指針となるものである。

1 序文

1.1 背景

信頼性のある分析方法には、あらゆる分野における国内規定、国際規定の遵守が求められている。従って、質の高いデータを提供できる試験室が適切な測定(方法)を採用しなければならないことは国際的な認識である。そのような方法には、次のようなことが含まれる。

- バリデートされた分析方法を採用している。
- 内部精度管理手順を運用している。
- 技能試験に参加している。
- 国際規格、通常 ISO/IEC 17025 に認定されている。

ISO/IEC 17025 の認定では、前述のすべてを含む技術的、及びマネジメントの規定範囲に従う必要があるだけでなく、特に測定のトレーサビリティの確立に取り組む要求をしていることに注意すべきである。

試験室は信頼性の高い分析データを得なければならないため、分析法のバリデーションは、測定には欠くことのできない構成要素である。上記以外の面については、以前より IUPAC が「試験室における品質保証手順の同一化作業部会」で取り組んでおり、コラボ試験[1]、技能試験[2]、内部精度管理 [3]の分析性能についてのプロトコル／ガイドラインが特に示されている。

さまざまな分野、特に食品分析の分野では、完全にバリデートされた分析法の必要条件が法律で規定されている [5, 6]。分析法の完全なバリデーションには、一般に試験室間で行うその方法の特性試験 (コラボ調査、あるいはコラボ試験と呼ばれる)が含まれる。国際的に認められたプロトコルでは、コラボ試験、特に国際統一プロトコル [1] や ISO 手順[7]によるものを行うことによって分析法の完全なバリデーションが立証されている。これらのプロトコル／規格では、バリデーションを完全にするために最小限の試験室と試料を要求している。しかしながら、分析法の完全なバリデーションを規定することが必ずしも常に実用的、あるいは必要なことであるとは限らない。そのような場合は、「単一試験室が行う分析法バリデーション」が適当であろう。

単一試験室による分析法バリデーションは、以下のような場合において実施するのがふさわしい。

- 費用のかかる正式なコラボ試験の前に、分析法が実施可能であることを確実にするため
- コラボ試験データが入手できない場合、あるいは正式なコラボ試験が実施できない場合に分析法が信頼できるものであるという証拠を得るため
- 既存のバリデートされた分析法を正確に実施できることを確実にするため
試験室独自の分析法の場合、試験室は正確に評価された分析法の特性をその顧

2. 定義および用語

2.1 一般

本文書において使用する用語は、可能な限り ISO ならびに IUPAC の定義を尊重している。以下の文献は、関連する用語の定義を収録したものである。

- IUPAC:『化学専門用語解説』第2版(『ゴールド・ブック』)
A.D・マックノウトならびに A・ウイルキンソン、1997 年。
- ISO :『度量衡学における基本的一般的な国際専門用語集』1993 年。

2.2 本ガイドラインのみに用いられる定義

相対不確かさ:不確かさは、相対標準偏差を意味する。

バリデートされた範囲:バリデーションする分析法の濃度範囲の確認部分。

3 分析法バリデーション、不確かさ、品質保証

分析法バリデーションは一連の試験を活用し、分析法に基づく仮定条件をすべて試験し、分析法の分析性能特性を確立し、文書化することである。その作業を行うことにより、その分析法が特定の分析目的にふさわしいかどうかを立証する。分析法の代表的な分析性能特性は、適用性、選択性、検量線、真度、精度、回収、操作範囲、定量限界、検出限界、検出感度、頑健性である。これらの特性に不確かさの測定と目的適合性を加えることができる。

分析法バリデーションとは、厳密に言えば「分析法」と言うよりむしろ「分析システム」と言うべきであろう。その分析システムは、規定の分析法のプロトコル(実施手順書)、分析のための規定の濃度範囲、および特定タイプの試料で構成されている。本文書では、「分析法バリデーション」の言及は、全体として分析システムのことを指しているとみなす。そのような分析手順を扱う場合、本文書ではそれを「プロトコル」(実施手順書)と呼ぶ。

本文書における分析法バリデーションは、内部品質管理(IQC)、あるいは技能試験のような現在継続中の活動とは異なるものとみなす。ある分析法の有効期間中に分析法バリデーションが一度、もしくは比較的間隔をあけて実施されると、それにより将来その分析法から期待できる分析性能がわかる。内部品質管理は、長期にわたり分析法がどれくらい機能するかを教えてくれる。そのため内部品質管理は、IUPAC 同一化プログラムとは別のものとして取り扱う[3]。

分析法バリデーションにおいて、対象となる定量特性は、予想される分析結果の正

確性と関連している。そのため、分析法バリデーションの作業は、ほとんど測定の不確かさを推定するようなものだと言われている。分析法バリデーションの目的では、上記に列挙したそれぞれの項目を基準として、分析性能特性のさまざまな面を示すことが長年の慣例となっている。また、それらのガイドラインは、かなりの範囲でそのパターンを反映している。ただし、分析法バリデーション目的のための適合性と試験結果の信頼性の両方の基本的な指標として、測定の不確かさについて信頼が増せば、分析化学者は不確かさの推定をするために、測定のバリデーションにもっと着手するであろう。また、現場の人のなかには、すぐにでもそれを実行したいと思う人もいるだろう。従って、測定の不確かさは、分析法の性能特性として付録 A で簡潔に取り上げる。また、付録 B では、他で扱わない複数の実施手順に関する追加ガイダンスを提供する。

4 分析法バリデーションの基本原則

4.1 分析法バリデーションの仕様とバリデーション範囲

バリデーションは、明確に規定されたプロトコル(特定目的に使用する、特定タイプの試料の分析対象物質と濃度範囲を測定するための)に適用できる。一般にバリデーションでは、分析対象物質の濃度範囲と試料の全般にわたって、その分析法が目的にふさわしく機能しているかを調査する必要がある。その結果として、分析目的の適合性基準の説明と共に、それらの特徴を完全に特定してから、分析法バリデーションを行うのが望ましい。

4.2 試験の仮定条件

分析目的の適合性を示し、またバリデーションデータの実用的活用を裏づける性能係数の提供に加え、バリデーションの検証は、分析法に基づく仮定条件の客観的試験として行う。たとえば、ある試験結果が単一直線の検量線から計算されるなら、分析は重大なバイアスがないということ、その反応は分析対象物質濃度に比例するということが、また確率的誤差のばらつきは、対象範囲全体にわたって一定であるということが暗に想定できる。ほとんどの状況で、このような試験の仮定条件は、分析法の開発期間中、もしくは長期間にわたって蓄積された経験をもとに作られたものである。結果として、信頼に値する。それにもかかわらず、適切な測定科学は、仮説検定を土台としている。そのことが理由で、多くのバリデーションの検証が統計的な仮説検定に基づいて行われているのである。その目的は、分析法の原則にもとづく妥当な仮定には、重要な欠点がないという基本的な確認を提示することにある。

この明らかに難解な文書には、重要で実的な意味合いがある。信頼できる仮定条件からのなほだしい逸脱を確認するほうが、ある特定の仮定条件の正しさを「証

明する」より簡単である。そのため、分析対象物質やマトリックスの全域にわたって、特定の分析技術(ガスクロマトグラフィー分析、あるいは酸分解法のような)を上手に使いこなすのに長い時間の訓練が必要となる場合、バリデーションは当然ながら用心のための比較的軽い試験となる。その反対に、経験があまりなければ、前提となる仮説が検査中の特別な事例において適切であるという確固たる根拠をそのバリデーションの検証作業で提示しなければならない。また、一般に状況を最大限にわたって詳細に検討することが必要になるだろう。従って、例を挙げると、必要となるバリデーション検証の範囲は、蓄積された分析技術の経験に幾ぶん左右されることになる。

以下に述べることを読めば、試験室が対象となる分析技術に十分習熟することは当然のことだと思われるであろう。また有意性検定の目的は、特別なプロトコルに基づく仮定条件を軽視できるほどの確固たる根拠がないことを確認することだということも当然のことと思われるであろう。読者は、測定技術に熟知していなければ、あるいは測定技術が確立していなければ、さらに厳密な試験が必要になるということを心に留めておく必要がある。

4.3 分析誤差の原因

分析測定の実誤差は、各組織の別々の段階で異なった原因¹により生じる。これらの原因(分析対象物質の特定濃度)を説明するのに役立つ方法は、以下の通りである²〔24〕:

- 測定の確率的誤差(繰返し精度)
- ラン結果(一回のランに対して一つのバイアスとしてみなし、またランダム変数が複数重なったものとしてみなす)
- 試験室結果(単一試験室による一つのバイアスとしてみなす)
- 分析法のバイアス
- マトリックス変動結果

これらの異なる原因は、必ずしも互いに無関係とは言えないが、本文書で挙げるものは、バリデーション検証の提言として、誤差の原因に取り組むのに役立つ方法を提示するものである。

繰返し精度分析中に、ありふれた重量誤差、容量誤差、試料の不均一性、分析の化学処理段階でのばらつきなどの誤差が生じるが、それは実施手順に起因するもの

¹大量の材料からの試験室用サンプルの準備は、厳密な意味で当然不確かさがあるのでサンプリングの不確かさについては、本文書における注意事項から除外する。試験室用サンプルから分析試料を抜き取ることに伴う不確かさは、測定の不確かさと切り離すことは出来ない。またそれは分析をするにあたって様々なレベルにおいて自然に含まれる。

²誤差の特別な原因を調べるには、グループに分けるかまたは誤差を分離するかを選択する。それは違った状況の範囲をこえて役立つ可能性がある。例えば、ISO 5725 の統計モデルは、一般に試験室とラン結果を結びつける。その一方で ISO GUM において不確かさの推定手順は個々に分けた結果と測定時の結果についての影響を算定するのによく合致している。

である。そして、それは繰り返し分析のばらつきとなって簡単に現れる。ラン結果は、毎日の分析で分散が付加されていることがわかる。たとえば、分析者の違い、試薬のロットの違い、試験器具の再検量の違い、そして試験室環境(たとえば温度変化)の違いなどである。単一試験室が行う分析法バリデーションについてのラン結果は、適切な試料で繰返し分析をする実験計画を立てて行うことにより推定できる。試験室間の変動は、標準溶液の変動値、プロトコルの部分的な解釈の違い、試験装置の違い、試薬の原料の違い、または平均気候条件のような環境的要因の違いから起こる。試験室間の変動は、コラボ試験(分析性能試験)と技能試験の結果によりはっきりと現れる。また室間の分析法の変動は、技能試験の結果によって現れる場合もある。

一般に繰返し精度、作業影響、及び試験室影響の規模は、同程度のものであり、バリデーションにおいて、どれも絶対に無視することはできない。従来、不確かさの情報を推定し、報告する場合に、特に様々な面を無視する傾向にあった。それは、不確かさの幅を小さく見る結果となった。たとえば、通常行われるようなコラボ試験では、その原因は目に見える形で完全には現れない。その理由は、コラボ試験では分析法のバイアスとマトリックスの変動からの不確かさは推定されないし、別々に取り組む(たいていは事前に単一試験室で検証される)方法をとるからである。単一試験室における分析法バリデーションには、特に試験室のバイアスを見逃す危険性がある。それが、上記に示した分析法の不確かさの最大の原因となる。そのため、単一試験室の分析法バリデーションでは、特に試験室のバイアスに注意を払わなければならない。

上述の問題に加えて、分析法バリデーションは、その応用範囲が制限される。すなわち、それは特定の種類の試料に適用される分析法なのである。決められた種類の試料でマトリックスタイプに本質的なバイアスがある場合、マトリックス効果はその種類のバイアスの原因となる。もちろん、その分析法が規定の種類以外の試料(すなわち、分析法のバリデーション以外)に引き続いて使用される場合、その分析法はバリデートされたものとは言えない。それは、まだ知られていないきわめて重大な特別の誤差が、測定のプロセスで持ち込まれるからである。

分析者は、分析性能が分析対象物質濃度によりその作用が変化するという事に注意を払うことも重要である。多くの場合、試験結果のばらつきは、濃度が増すにつれて確実に拡大し、回収率は高濃度、低濃度によってかなり異なる可能性がある。そのため、試験結果に伴う測定の不確かさは、これらの結果と濃度ごとに異なる他の要因の両方に左右されることが多い。幸いにも、分析性能と分析対象物質濃度との間に単純な関係があると仮定してみることは、無理のない考えであることが多い。たいていの場合、その誤差は分析対象物質濃度に比例する⁶。そのため、分析法の性能は、本質的に濃度の違いに係わっている。それで、分析性能と分析対象物質濃度との単一な関係を仮定することが重要となる。これは、起こりうる極端な範囲の濃度で、あるいは選ばれたいくつかのレベルで分析性能を確認するという代表的な方法である。また、直線性の確認からも、同じ類いの情報が得られる。

⁶ この場合、検出限界 10 倍未満の濃度で適用できるとは限らない。

4.4 分析方法および試験室結果

単一試験室の分析法バリデーションでは、分析方法のバイアスと試験室の影響に注意を払うことは、きわめて重要である。この分析法のバイアスを無視できる特別な施設を持つ試験室は少数あるが、その環境は全く例外的なものである。(ただし、特定の分析を実施できる試験室が一つしかなければ、そのときの分析法のバイアスと試験室のバイアスは、違ったものになる)。通常、分析法と試験室結果は不確かな集合が含まれており、繰返し誤差とラン結果に比べて説明するのが難しいことが多い。一般に、それぞれの不確かさを推定するには、試験室で独自に集めた情報を使用する必要がある。そのような情報のうちでもっとも一般に有益なものは、(i) コラボ試験による統計(単一試験室の分析法バリデーションの多くの状況は、入手できない)、(ii) 技能試験からの統計、(iii) 認証標準物質の分析結果である。

コラボ試験は、試験室間のバイアスの分散を直接推定する。だが、そのようなコラボ試験の実験では、理論的な欠点が生じる可能性があるとは言え、その分散推定値は多くの実用的な目的に対応できる。その結果、コラボ試験による室間再現精度の推定値と、不確かな推定値を比較することで、単一試験室の分析法バリデーションを検証することは常に得るところが大きい。もしも単一試験室結果がコラボ試験結果よりかなり小さいならば、分析法の不確かさの重要な要因がおろそかにされてきたと思われる。(あるいはまた、実際に特定の試験室がコラボ試験で発見されるものより小さな不確かさで機能するかもしれない。そのような試験室であれば、特殊分析をしたことの正当性を主張する特別な手段を取る必要がある)。コラボ試験が特別な分析方法/試料を組み合わせて実施されないならば、室間再現性標準偏差 $\sigma_{(H)}$ の推定値は、約 120ppb 以上の分析対象物質濃度 C で質量分率として表わした変数、Horwitz 式 $\sigma_{(H)} = 0.02c^{0.8495}$ を得ることができる。(Horwitz 推定値は、通常コラボ試験の検証結果から観察されたおよそ 2 つの因子の中の 1 つの因子である)。Horwitz 式は、約 120ppb 以下の割合で不正確であり、修正した式[21、25]は、それに比べ適切な式である。この情報はすべて、最小の変動で単一試験室の領域において実施できる。

技能試験の統計は、特に興味深い。なぜなら、技能試験は一般に試験室の規模と分析法の複合的なバイアスについて情報を提供し、また試験参加者に特別の場合に起こる総合的誤差についての情報を提供してくれるからである。試験の 1 ラウンドで 1 つの分析対象物質について得られる試験参加者のロバスト標準偏差の結果などの統計は、原則としてコラボ試験からの室間再現性標準偏差に似た方法で利用できる。すなわち、それは単一試験室の分析法バリデーションで得られる個々の推定値を比較するために、総合的な不確かさの基準を得ることなのである。実際に、技能試験による統計は、もっと入手が困難である。なぜならコラボ試験のように系統的に統計を表に示したり、出版したりしていないので、試験参加者のみ入手可能だからである。もちろん、このような統計を使用する場合、その統計でマトリックスと分析対象物濃度が適切であることに言及しなければならぬ。技能試験を計画するに当たり、それぞれの試験参加者も、連続試験で示される値と、技能試験の報告値とを比較することで、技

能試験で推定される不確かさの妥当性を測定することができる[26]。ただし、それは進行中の活動であり、従って厳密に言えば単一試験室の分析法バリデーションの範囲にはない(そしてそれは、一回限りの事象である)。

適切な認証標準物質(CRM)が入手できる場合、認証標準物質を何度も繰り返し分析することで、単一試験室が行なう試験は、試験室のバイアスと分析法のバイアスを合わせた試験の許容として評価することができる。バイアスを合わせた推定値は、平均結果と認証値との差である。

適切な認証標準物質が常に利用できるわけではない。従って、それ以外の試験材料を必然的に使用することになる。技能試験の試料の残りが時としてこの目的に役立つことがある。またその試料の示す値は、不確かさという点で疑問の余地があるかもしれないが、それを使用することで総合的なバイアスをチェックできることは確かである。技能試験で具体的に示された値は、一般的にバイアスが最小限度の推定値となるように選択されている。そのため、試料に重要なバイアスのある試験は、微妙なものとなる。それ以上の結果を求めるならそれに代わるものとして、これらのバイアスの推定値を示す添加ならびに回収情報[4]を利用することである。もつともこれらの技術を行ったとしても、不確かさを測定できない原因があるかもしれない。

現在、分析法バリデーションで最も価値がないとされるのは、試料の等級を明確にしたなかでマトリックスが一定でないことである。この不確かさの成分の推定についての理論的な必要条件は、1 ランで分析した試料の代表的な残留物に対してであり、その推定した試料の個々のバイアスから計算した分散に対してである。(1 ランにおいての分析で、さらに高いレベルのバイアスは分散に何ら影響を及ぼさないということがわかる。広範囲の濃度を含む場合、そのとき濃度に伴うバイアスの変動に対して許容幅を作らなければならない)。代表的な試料が認証標準物質である場合、そのバイアスは結果値と基準値の間を誤差として直接推定できる。また、実施手順全体はわかりやすい。不十分な数の認証標準物質しか入手できない場合でも、十分な注意を払えば代表的な試料の範囲で回収試験を行うことができるということは十分考えられる。現在のところ、この標準物質から得られる不確かさの規模についての定量分析情報はごくわずかしかないが、それが大きなものではないかと疑われる若干の例がある。

5 バリデーション検討の実施

バリデーションの詳細な計画と実施については、他の箇所で広範囲にわたって扱っているため、ここでは繰り返さないことにする。ただし、主要な原則は直接関係のあるものなので、以下に考察する。

バリデーション検討が代表性を有していることが必須の要件である。すなわち、バリデーションの検討は、出来得る限り、ある分析が通常に行われる際の現実的な実施数と効果が得られる範囲内で行われなければならない。また、濃度範囲とサンプルの種類が分析法の対象範囲に含まれていることについても同様である。たとえば、精度試

験の際に、ある因子分析時の周辺温度が典型的な不規則変化を見せたとする。その因子の効果は目に見える変化として観察されるので、更なる分析法の最適化が必要な場合以外、それ以上の検討を加えることは不要である。

分析法のバリデーションに関連した「代表的な変動値」とは、ある因子の数値が議論の対象となっているパラメーターの予想範囲内に適当に分散した値を取っていないということの意味している。測定可能な連続的なパラメーターなら、代表的な変動値とは、一定の許容された範囲、あるいは一定の不確かさ、あるいは予想された範囲を指すこともあるだろう。一方、不連続的な要素やサンプルによるマトリックス効果のような予測できない影響を伴う因子については、代表的な変動値とは、様々なタイプ、あるいは分析法が通常範囲で用いられる中で遭遇したり、許されたりする「係数レベル」に相当する。代表的な変動値の概念は、理想を言えば値の範囲だけでなく、その分散の状態にまで拡大されるべきであるが、多数の因子に対し、多くのレベルでの最大の変動値を決めることは割に合わないことが多い。ただし、ほとんどの実用的な目的のためには、予想された範囲内であっても極端な条件で試験を行った場合、あるいは予測範囲を超えて行われた場合には、試験結果は許容最小値となる。

変動値の因子を検討する場合、試験結果がそれより大きな値を示すものは、それができるだけ多くの「影響を及ぼす因子」であることを確認しておくことは重要である。たとえば、日々変化する変動値(おそらく検量線を作り直すことから生じる)は、反復性(繰返し精度)に比べてより実際的な問題となるだろう。5日間に行う2つの定量分析は、2日間に行う5つの定量分析よりも良い室内再現精度試験評価を与えるだろう。それぞれ別々の日に単独で10回行う定量分析は、十分管理されて行われるなら、やはり良い結果となるだろう。もっともこれは、1日の間に行われる分析の再現性に関する情報はもたらさない。

統計的に有意性のある検査を設計する際、どんな検証試験でも、それらの検査が実際に意義あるものになる(すなわち、不確かさの最大要素に匹敵するものになる)前に、こうした影響を見つけるための十分な検定力を持たなければならないことは明らかである。他にも、以下のような注意が重要である。

- 個々の原因が相互に作用しあうことがわかっているか、作用するかもしれないと考えられている場合、その相互作用の影響を明らかにできるということを保証しておくことが重要である。これは、相互に作用し合うパラメーターを、異なったレベルで無作為に選択することを確実に行うか、または「相互作用」の影響、すなわち共分散に関する情報を得るために系統だった念入りな実験計画を立てることで成し遂げることができるだろう。
- 全般的なバイアスの検討を行う際、標準物質と標準値が、業務分析で実際に使用されているものと関連しているということは重要である。

6 バリデーション検討の範囲

試験室が部分的に変更された新しい分析法、あるいはよく知られていない分析法バリデーションを行う場合、その検討範囲は、現行の分析法の程度と試験室の適正能力にある程度左右される。異なった状況におけるバリデーションと検定方法に関する提案を以下に示す。そこに述べられた以外の分析法は、日常検査用のものとみなす。

- **試験室は、「十分にバリデートされた」分析法を使用すること。**
バリデートされた分析法とは、試験所間のコラボ試験で検討されたものであり、従って試験室は公表されたその分析性能特性に到達できる(あるいは、その分析法の要求条項を満たすことができる)ということを証明しなければならない。試験室は、精度に関する検討、バイアスに関する検討(マトリックス変動値に関する検討を含む)、また頑健性に関する検討は省けるとしても、場合によっては検量性の直線性に関する検討を行わねばならない。
- **試験室は、分析法バリデーションが全面的になされた分析法を使用しなければならないが、その際新しいマトリックスが使用されていること。**
バリデートされた分析法とは、コラボ試験で検討されたものである。従って、試験室は、新しいマトリックスをシステムに採用しても、それが新たな誤差の原因にはならないことを証明しなければならない。なお、必要なバリデーション範囲は、上記と同じである。
- **試験室は、正しく確立された分析法、ただしコラボ試験で検討されていない分析法を使用すること。**
必要なバリデーション範囲は、上記と同じである。
- **分析法バリデーションは、その分析特性と合わせて科学文献に発表されているものであること。**
試験室は、精度に関する検討、バイアスに関する検討(マトリックス効果による変動値に関する検討を含む)、頑健性に関する検討、検量線の直線性に関する検討を行わなければならない。
- **分析法バリデーションは、自試験室で開発した内容を含まないもので、科学文献に発表されているものであること。**
試験室は精度に関する検討、バイアスに関する検討(マトリックス変動値に関する検討を含む)、頑健性に関する検討、検量線の直線性に関する検討を行わなければならない。

- **分析法バリデーションは、実験などで確認されたものであること。**

実験などで確認された分析法とは、分析上推定される数量が、決められた手順に従うことによるのみ確認された結果である分析法のことをいう。この分析法は、サンプル中の特定の分析対象物質濃度のように、分析法の『バイアス』がないということにおいて、他に影響されない独立した分析量の推定を目的とする測定とは異なる。また、マトリックス変動値(明らかにされているものに限ってではあるが)が当てはまらないものとは異なるものである。試験室特有のバイアスは無視できないまでも、単一試験室による分析試験でそれを推定することは難しいと思われる。さらに、標準物質は調達できそうもない。コラボ試験で得られたデータがない場合、試験室間での精度試験で得られるいくつかの推定は、特別に計画された頑健性試験の検討か、あるいは Horwitz 関数の検討により得ることができる。

- **分析法バリデーションは、「特定分析」であること。**

「特定分析」は、一般的な数値の範囲を定める際にしばしば必要となるが、大した費用もかからず、また知識や経験があまりなくともすむ。従って、バリデーションに費やす努力は、結果的に限られたものとなってくる。分析のバイアスに関する検討は、回収率試験や標準物質添加法、また反復試験による精度分析のような分析法によって行われるべきであろう。

- **検査スタッフや試験装置における違い。**

重要な例としては次の通りである。

主な分析器機において起きた何らかの変化。きわめて変化しやすい試薬の新種のバッチ (たとえば、多クローン抗体)。試験室の立地上の条件により生じた変化。新しいスタッフによって初めて行われる分析法。あるいは、バリデートされた分析法であっても、しばらく使用されたことがなかったもの。以上の場合、直ちに悪い影響を及ぼすような変化は起きなかった、ということを示されなければならない。最低でも行わなければならない試験は、分析のバイアス試験1回である。つまりそれは、分析業務の「最初 と最後」に代表的な試料や分析法の有効性を検討するのに用いる管理試料について行う試験のことである。そのバイアス試験が実施されるとたいてい、分析手順におそらく何らかの変化の影響が見られるはずである。

7 推奨事項

以下の推奨事項は、単一試験室による分析法バリデーションの使用に関するものである。

- どの試験室も可能な限り、また実用的である限り、国際実施手順書に準じて行うコラボ試験により有効性が確認された性能特性を持つ分析法を用いるべきである。
- そのような分析法が利用できない場合、顧客のための分析値を出す目的で分析法が使用される前に、自社内試験室でバリデートしなければならない。
- 単一試験室で分析法バリデーションの検討を行う場合、分析値を求めるために、次の項目から対応する特性を選択する必要がある。適用生、選択性、検量線、確度、精度、範囲、定量限界、検出限界、検出感度、頑健性である。試験室は、これらの分析特性を選ぶ際に、顧客からの要求を考慮しなければならない。
- 以上の特性が検討されたという証拠の開示を顧客が要求した場合には、試験室は顧客がそれを利用できるようにしなければならない。

付録 A：分析性能特性検討のための必要条件に関する注記

分析法に関する個々の分析性能特性の一般要求事項は、以下の通りである。

A1 適用性

分析法バリデーション後の報告書は、性能仕様に加えて、以下の情報を提示しなければならない。

- 適用できる分析種の成分名(例、「全ヒ素」)。
- 分析法のバリデーションで扱う濃度範囲(例、「0～50ppm」)；
- 分析法バリデーションで対象とする試料のマトリックス範囲の仕様(例、「シーフード」)；
- 試験装置、試薬、試験手順(特記される許容範囲を含む「たとえば、 $100 \pm 5^\circ\text{C}$ で 30 ± 5 分間加熱する」、検量線作成と、品質管理手順、特別に必要な安全上の注意事項などを記述したプロトコル。
- 適用目的、ならびに要求される不確かさの限界値の報告(たとえば、「食品分析のスクリーニング法で、検査結果 c の標準不確かさ $u(c)$ は、 $0.1 \times c$ 」未満となるのが望ましい)。

A2 選択性

選択性とは、干渉物質の存在下で分析方法が分析対象物質を正確に定量できる程度を示すことである。理想を言えば、選択性は存在すると考えられるすべての重要な干渉物質に対して測定することが望ましい。化学原理上、その試験に反応する可能性のある干渉物質を検査することが特に重要である。たとえば、アンモニアの比色分析は、第一級脂肪族アミンに反応すると理論上予想できる。また、存在する可能性のある干渉物質すべてを考察する、試験することは実用的でないかもしれない。そのような場合には、可能性のある最悪のケースをいくつかチェックすることを推奨する。一般原則として、選択性は、無視されやすいが、いかなる干渉物質に対しても十分にふさわしいものとなるはずである。

多くの種類の分析において、選択性は本質的に有意性に基づく定性評価であるか、または干渉物質に関する適切な検定法である。しかし、いくつかの有効な定量測定も存在する。特に、1つの定量測定は、選択性指数が $b_{\text{an}}/b_{\text{int}}$ である。 b_{an} がその分析法の検出感度(検量線の傾き)であり、 b_{int} は可能性のある干渉物質が単独で起こす反応の傾きである場合、この $b_{\text{an}}/b_{\text{int}}$ は干渉物質の定量測定を示す。 b_{int} は、マトリックスブランクと、ある適切な濃度となるように干渉可能性物質を添加したその同じブランク