

いが含まれる。単一試験室によるバリデーションでは、適切な試料を何回かの別個のランでくり返し分析する実験を行って、ラン効果を推定する。試験室間の変動は、標準溶液の変動、試験室によるプロトコルの解釈の違い、試験装置あるいは試薬の供給元の違い、または平均的な気候条件のような環境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）及び技能試験の結果に現れ、分析法間の変動が技能試験の結果に明瞭に現れる場合もある。

一般に併行精度、ラン効果、試験室効果の大きさは同程度であるので、バリデーションにおいてどれかを無視してもよいということはない。過去には、不確かさの情報を推定し報告する場合に、色々な面を無視する傾向がみられた。そうすると、不確かさが小さすぎる値となる。たとえば、通常行われるようなコラボ試験では、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できないので、コラボ結果が全ての誤差の影響を示すわけではない。このような不確かさは別個に（多くはコラボ試験前の単一試験室での検証で）扱わなくてはならない。上記のリスト中で、試験室のバイアスが単独で最も大きな不確かさへの寄与を持っているが、単一試験室による分析法バリデーションではこれが見逃される危険性が特に大きい。そのため、単一試験室による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試料の特定の分類に適用される分析法に対して行われるので、その結果の適用範囲にも限界がある。規定された試料の種類内で、マトリックスのタイプに大きな変動がある場合には、マトリックス効果が新たな変動の原因となるだろう。もちろん、その分析法を規定された種類以外の試料（すなわち、分析法のバリデーション範囲外）に使用したなら、その分析システムはバリデートされたとは見なせない。マトリックスの効果という、大きさ不明の新たな誤差が、測定の過程に入ってくるからである。

分析者は、分析対象物質濃度が変われば、それに伴って分析性能も変化することを考慮すべきである。多くの例において、試験結果のばらつきは濃度と共に確実に増大するし、高濃度と低濃度での回収率がかなり異なる可能性がある。これらの効果及び他の濃度依存性の要因によって、試験結果に伴う測定の不確かさは、濃度と共に変化する。幸いにして、分析性能と分析対象物質濃度との間に単純な関係を仮定することは、たいてい合理的である。最も一般的な仮定では、誤差が分析対象物質濃度に比例するとしている¹。しかし、非常に異なる濃度においての分析法の性能を知りたいのなら、分析性能と分析対象物質濃度との関係についての、上記の仮定を確認する事が重要である。想定される濃度範囲の両端、あるいは範囲内の数レベルを選択して、分析性能を確認するのが典型的な方法である。直線性の確認からも、同様の情報が得られる。

4.4 分析方法及び試験室の効果

単一試験室による分析法バリデーションでは、分析法のバイアスと試験室の効果に注意を払うことがきわめて重要である。特別な施設を持っていて、分析法のバイアスを無視できる試験室も少数あるが、それらは全く例外的な環境である。（ある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異なる意味を持つ。）通常、分析法と試験室の効果は不確かさに含まれているが、併行誤差とラン効果に比べて扱いが難しいことが多い。一般に、特定の試験室に依存しない情報に基づいて、個々の不確かさを推定する必要がある。そのような情報の中で一般的に最も有用なものは、(i) コラボ試験から得た統計量（多くの場合、単一試験室によるバリデーションでは利用できない）、(ii) 技能試験から得た統計量、(iii) 認証標準物質の分析結果である。

コラボ試験は試験室バイアスの分散を直接推定する。このようなコラボ試験計画には理論的な欠点があるかもしれないが、得られた分散の推定値は、多くの実用的な目的に適切

¹検出限界 10 倍未満の濃度では適用できると限らない。

に使用できる。単一試験室によるバリデーションにより得られた不確かさの推定値と、コラボ試験による室間精度の推定値とを比較すれば、単一試験室によるバリデーションの検証となり、役に立つことが多い。もしも単一試験室の結果のほうがかなり小さいならば、分析法の不確かさの重要な要因が無視されている可能性がある。(逆に、特定の試験室が実際にコラボ試験結果より小さな不確かさで分析しているのかもしれない。そのような試験室がその主張を正当化するには、特別な手段を取る必要がある。) 特定の分析法/試料の組み合わせでコラボ試験が実施されていない場合には、分析対象物質濃度 c がおよそ 120ppb 以上であれば、室間精度の標準偏差 σ_H の推定値は Horwitz 関数 $\sigma_H = 0.02c^{0.8495}$ から得ることができる。Horwitz 関数中の 2 つの変数はいずれも質量分率で表されている。(Horwitz 推定値はコラボ試験結果による値の 2 分の 1 から 2 倍の範囲にある。) 約 120ppb 以下の質量分率では、Horwitz 関数は正しくないことが観測されており、修正式がより適切である [21, 25]。このような情報はすべて、最小の変更により単一試験室のバリデーションでも利用できる。

技能試験からは一般に、試験室及び分析法のバイアスを一緒にした時の大きさが分かる。また、試験参加者にはその特定のラウンドでの総誤差の情報が提供されるので、技能試験から得た統計量は特に興味深い。試験のあるラウンドで 1 つの分析対象物質について得られた、結果のロバスト標準偏差のような統計量は、原理的にはコラボ試験から求めた室間精度標準偏差と同じように使用できる。つまり、これを全不確かさの基準として、単一試験室によるバリデーションで求めた推定値と比較することができる。実際には、技能試験から得られた統計量は、コラボ試験結果のように系統的な表として公表されていないし、参加者だけが入手可能であるので、利用は難しい。このような統計量を使用するならば、それらは適切なマトリックスと分析対象物質濃度で得られていなくてはならないのは当然のことである。技能試験参加者は、連続したラウンドの指定値に伴う値と、それぞれの試験室の不確かさ推定値とを比較して、その妥当性を評価できる [26]。ただし、これは継続的な活動であり、厳密に言えば(一度限りの活動である)単一試験室によるバリデーションの範囲には入らない。

適切な認証標準物質 (CRM) が利用できれば、単一試験室において CRM を何回か分析することにより、試験室のバイアスと分析法のバイアスを結合して評価できる。結果の平均値と認証値との差が、結合したバイアスの推定値である。

適切な CRM が常に利用できるわけではないので、それ以外の試験材料を使用せざるを得なくなる。技能試験試料の残りが目的に使えることがある。その試料に付与された値の不確かさには疑問があるかもしれないが、総合的なバイアスを確認できることは確かである。技能試験で付与された値は、一般にバイアスが最小限度になるような推定値が選ばれているので、そのような試料を用いて有意なバイアスを検定するのは賢明な方法である。その他の代替法として、添加と回収率の情報 [4] を利用してバイアス推定値を得る方法がある。しかし、これらの方法には測定不能な不確かさの原因があるかもしれない。

現在のところ、規定された試料分類内でのマトリックスの変動による効果が、分析法バリデーションで最も認識されていない。この不確かさ成分を推定するための、理論的な必要条件は、1 ランで分析される代表的試料の種類、それぞれの種類のバイアスの推定値、得られたバイアスの分散である。(1 ランの分析とは、上位レベルのバイアスが分散に何ら影響を及ぼさないことを意味している。1 つのランに広範囲の濃度を含む場合、濃度に伴うバイアスの変化を考慮しなければならない。) 代表する試料の CRM があれば、結果と参照値の差からバイアスが直接推定できるので、全手順は簡単である。CRM の種類が不十分であることは良くある。このようなときには、適切な注意を払って、典型的な試料での回収率試験に頼ることが可能であろう。現在のところ、この方法からの不確かさの大きさについての定量的な情報はごくわずかしかないが、大きいと疑われる例がいくつかある。

5 バリデーシヨンの実施

分析法バリデーシヨ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われているので、ここでは繰り返さない。ただし、主要な原則は直接関係するので、以下に考察する。

バリデーシヨンは代表性を有していることが必須である。すなわち、分析が対象としている濃度範囲と試料のタイプを含めるだけでなく、その分析が通常に行われる際に影響を与える因子の数と範囲を可能な限り再現しなくてはならない。たとえば精度試験中に、(室温のような)因子がランダムに変化し、その変化が現実を代表しているならば、その因子の効果は観測された分散中に直接現れるので、更なる分析法の最適化を望まなければ、それ以上の検討は不要である。

分析法のバリデーシヨンにおける「代表的な変動」とは、検討対象となっているパラメーターの数値が、予想される範囲内で適切に分布していることを意味する。測定可能な連続量のパラメーターでは、そのパラメーターの許容される範囲、指定された不確かさ、あるいは変動が予測される範囲となるだろう。一方、不連続な因子、あるいは試料のマトリックスのように影響が予測できない因子については、分析法を通常の状態で使用する際に許可される様々なタイプの変化、あるいは起こりうる変化を「因子レベル」としたものが代表的な変動に相当する。理想的には、代表的な変動には値の範囲だけでなく、分布まで含まれるべきである。しかし不幸にして、多くのレベルで多数の因子を最大に変動させるような設定は、経済的ではない。多くの実際的な目的では、予想される範囲の両端、あるいは予想範囲より大きな範囲で行われた試験が許容される最小限である。

変動させる因子を選択する際に、他の因子より大きな効果を持つ因子を含めていることの確認が重要である。たとえば、(おそらく再検量から生じる)日間の変動が併行精度に比べてかなり大きい場合には、1日5回の分析を2日行うよりも、1日2回の分析を5日間に行う方が室内精度の良い推定値を与える。充分管理された状況で、別の日に1回ずつ10回定量分析すればより良い結果となるが、日内の併行精度についての情報は得られない。

有意性のある検定を計画する際は、実際的に重要な効果(つまり、最大の不確かさ要素と同等程度)を事前に検出する十分な検出力のある検討を行わなければならないのは明らかである。

さらに、以下に示す検討は重要であろう。

- 因子間に相互作用があることが分かっている、あるいはその可能性が考えられる場合は、その相互作用の影響を考慮に含まれたことの保証が重要である。これを達成するには、相互作用するパラメーターを異なるレベルから確実に無作為に選択するか、または「相互作用」の影響あるいは共分散に関する情報が得られるよう注意を払った系統的実験計画を立てる。
- 全般的なバイアスの検討を行う際には、標準物質と認証値が、日常検査で実際に扱われる試料に適用できることが重要である。

6 バリデーシヨンの範囲

試験室が、新規分析法、修正した分析法、あるいはなじみのない分析法をバリデートする場合の検討範囲は、その分析法の現在の状況と試験室の能力による。異なった状況における、バリデーシヨン及び確認(ヴェリフィケーション)の範囲についての提案を以下に示す。特に言及しない限り、分析法の使用目的は日常検査とする。

- 試験室が「完全にバリデートされた」分析法を使用する場合。分析法がコロボ試験で検討されているので、試験室は公表された分析性能特性を達成できる(あるいは、その分析法の要求条項を満たすことができる)ということを証明すればよい。試験室は、精度の検討、バイアスの検討(マトリックスの変動に関する検討を含む)、おそらくは直線性を検討する。頑健性のような他の試験は省略することができる。

- 試験室が完全にバリデートされた分析法を使用するが、新しいマトリックスに適用する場合。分析法がコラボ試験で検討されているので、試験室は新しいマトリックスが分析システムに新たな誤差原因を持ち込まないことを確認しなければならない。前項と同じ範囲のバリデーションが必要である。
- 試験室が十分に確立されているが、コラボ試験で検討されていない分析法を使用する場合。前項と同じ範囲のバリデーションが必要である。
- 分析法がその分析特性を含めて科学文献に発表されている場合。試験室は、精度の検討、バイアスの（マトリックスの変動に関する検討を含む）、頑健性の検討、直線性の検討を行うべきである。
- 分析法バリデーションが科学文献に発表されているが分析特性は発表されていない、あるいはその試験室で開発した方法の場合。試験室は、精度の検討、バイアスの（マトリックスの変動に関する検討を含む）検討、頑健性の検討、直線性の検討を行うべきである。
- 分析法が経験法である場合。経験分析法は、示された手順に従って得られた結果が、そのまま測定量となる分析法である。このような分析法では、分析法によるバイアスはゼロであると決められており、マトリックスの変動は（規定された分類内では）意味を持たない。このような点から、試料中の特定の分析対象物質濃度のような、分析法に依存しない量の評価を目的とした方法とは異なっている。試験室のバイアスは無視できない可能性があるが、単一試験室による分析試験による推定は困難であろう。さらに、標準物質も利用できない。コラボ試験で得られたデータがないならば、特別にデザインされた頑健性試験、あるいは Horwitz 関数により室間精度が推定できる。
- 分析が「臨時分析」である場合。「臨時分析」は、大きな費用をかけずに、さほど重要ではない数値の一般的範囲を定める際にしばしば必要となる。従って、バリデーションに費やせる労力は、非常に限定される。バイアスの検討は回収率試験や分析対象物質添加法により、精度はくり返し分析によって行える。
- 検査スタッフや試験装置が変更された場合。重要な例は以下の通りである。主要な分析器機の変更、非常に変化しやすい試薬（例えばポリクローナル抗体）の新しいバッチへの変更、試験室の建物の変化、新しいスタッフがその分析法を初めて実施する場合、長期間使用しなかったバリデートされた分析法を再使用する場合。これらの場合には、有害な変化が起きていないことの証明が必須である。1回のバイアス確認が最低限の試験である。条件変更の前後に典型的な試料あるいは管理試料を分析する。一般には、分析手順の変化の影響はその試験結果に現れる。

7 推奨事項

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推奨事項を、以下に示す。

- 可能な限り、また実用的である限り、試験室は、国際プロトコルに準拠したコラボ試験により性能特性が評価された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、顧客への分析値の提供に使用する前に、分析法を試験室内でバリデートしなければならない。
- 単一試験室による分析法バリデーションでは、以下の項目から適切な評価特性を選択する。適用性、選択性、検量、正確さ、精密さ、範囲、定量限界、検出限界、感度、頑健性。試験室が分析特性を決定する際には、顧客からの要求を考慮しなければならない。
- 顧客により、これらの特性が評価された証拠の開示が要求された場合には、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意点

分析法に関する個々の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結果の報告書は、性能仕様に加えて、以下の情報を提供しなければならない。

- 適用できる分析対象物、化学種の特定を含む（例「総ヒ素」）；
- 分析法のバリデーションで評価された濃度範囲（例「0～50ppm」）；
- 分析法バリデーションで評価したマトリックスの範囲（例「海産物」）；
- 試験装置、試薬、試験手順（許容範囲を含む「例「100±5℃で30±5分間加熱する」）、検量線作成方法と、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。
- 意図された適用目的と、その目的に必要な不確かさの限界（例「スクリーニングを目的とした食品分析。検査結果 c の標準不確かさ $u(c)$ は、 $0.1 \times c$ 未満である」）。

A2 選択性

選択性とは、定量結果に干渉するものが存在するときに、その分析法により分析対象物質を正確に定量できる程度である。理想的には、存在する可能性のあるすべての重要な干渉に対して選択性を評価すべきである。分析法の化学原理から、その試験で応答を与える可能性のある物質について、選択性を検査することは特に重要である。たとえば、第一級脂肪族アミンは、アンモニアの比色分析法で応答を与えるという予想は合理的である。また、存在する可能性のある干渉すべてを考慮し、試験することは実用的でないだろう。そのような場合には、可能性のある中で最悪のケースをチェックすることが推奨される。一般原則として、いかなる干渉に対しても選択性が無視できる程度であることが望ましい。

多くの種類の分析において、選択性評価の本質は、干渉の存在の有無に有意の差があるかの検定、あるいはその他の適切な検定に基づいた定性的評価である。しかし、有効な定量的尺度もいくつか存在する。1つの定量的尺度は選択性指数 b_{an}/b_{int} である。 b_{an} はその分析法の感度（検量線の傾き）、 b_{int} は干渉となる可能性のある物が単独で起こす反応の傾きであり、この2つの比である選択性指数は干渉の定量尺度となる。マトリックスブランク、及び干渉の可能性のある物質を適切な濃度で添加したブランクに、分析法を適用すれば、 b_{int} の大きさを近似的に求められる。マトリックスブランクが入手できず、代表的な材料を代用とする場合に、このような単純な実験で b_{int} を推定できるのは、マトリックスの相互効果がないと仮定できる場合のみである。分析対象物質の感度自体が干渉物質によって影響を受ける場合（マトリックス効果）、妨害の効果が他のタイプの妨害と混同されるので、マトリックスが存在しないほうが b_{int} を求めやすい。

A3 検量線と直線性

検量に用いる材料調製に伴う大きな誤差を除けば、検量の誤差は、普通は（必ずしも常にとは限らないが）不確かさ全体の主要成分ではないので、「トップダウン」方式で推定される各種のカテゴリーに含めても問題ない。たとえば、検量による偶然誤差は、全体として推定されるランバイアスの一部であり、一方、検量に伴う系統誤差は試験室バイアスとして現れるので、全体の一部として推定できる。しかしながら、検量のいくつかの特性は、分析手順を最適に開発するための戦略に影響するので、分析法バリデーションの最初の段階で、このような特性を知っておくと便利である。検量関数が (a) 直線であるか、(b) 原点を通過するか、(c) 試料のマトリックスに影響されないか、といった問題がこの特性に含まれる。ここで述べている手順は、日常分析で行われる検量よりも厳密な、バリデーションにおける検量の検討に関連している。たとえば、バリデーションで検量線が原点を

通る直線であることが確立されれば、より簡単な検量線（二点繰返し法など）が日常分析で使用できる。この簡略化した検量方法による誤差は、バリデーションで推定の対象であるより高水準の誤差に含まれるだろう。

A3.1 直線性と切片

適切な一連の検量セットにおいて、応答を濃度に直線回帰して得られる残差をプロットすれば、略式ではあるが直線性を検定できる。残差プロットが曲線パターンを示せば、検量関数が非線型であるため、直線にうまく当てはめられないことが示唆される。当てはめの欠如による分散と、純粋な誤差による分散を比較すれば、有意性検定が行える。しかしながら、ある種の分析の検量では、当てはめがうまくできない原因は非線型性以外にもあるので、有意性検定と残差プロットとを組み合わせる必要がある。相関係数は当てはめの指標として現在広く使用されているが、直線性の検定法としては誤りが多く不適当であるので、使用すべきではない。

非直線性と一定の傾向をもった変化（ドリフト）は混同されやすいので、当てはめの欠如の検定では、デザインが非常に重要である。ドリフトではない純粋誤差の推定値を独立に示せない場合には、反復測定によって誤差を推定する必要がある。特別の指示がない場合、（一変量線形検量には）下記事項を適用する。

- 検量標準は6点以上とする；
- 検量標準の濃度は対象範囲で一定の間隔となるように作製する；
- 濃度範囲は実際に分析する可能性のある濃度の0%から150%あるいは50%から150%のより適切な方とする；
- 検量標準は、少なくとも2回、できれば3回以上をランダムな順番で反復測定する。

試験的に単回帰分析を行った後、残差プロットに明かなパターンがないかを検討する。分析の検量では、分散が不均一であることが多く、残差プロットから非等分散性が示された場合には、重み付きの回帰分析を行うことが最適である。このような状況で重み付き回帰を行わないと、検量関数の低濃度側での誤差が過大となる。

当てはめの欠如の検定は、単純な回帰分析でも重み付き回帰分析でも行える。当てはめの有意な欠如がなければ、そのデータで切片が有意にゼロと異なるかどうかの検定も行える。

A3.2 一般的マトリックス効果試験

検量標準試料を分析対象物質の単純な溶液として調製できる場合には、検量は非常に簡単になる。この方法を採用する際には、バリデーションにおいて、一般的マトリックス不整合の影響があるかを推定すべきである。代表的な試料から得られる試験溶液への分析対象物質の添加（「標準添加」とも言う）により、一般的マトリックス効果が検定できる。この検定では、通常の実験手順と同じ希釈となるように試験を行い、添加濃度範囲は、分析法により既定された検量バリデーションと同じ範囲を含まなければならない。検量関数が直線の場合は、通常の実験線の傾きと、マトリックスに分析対象物質を添加したプロットの傾きを比較すれば、有意の差があるかが分かる。有意の差がなければ、検出できる一般的マトリックス効果がないと結論できる。検量線が直線でない場合には、有意性検定のためにより複雑な分析法が必要となるが、通常は同じ濃度で目視による比較をすれば十分である。この試験で有意差がなければ、マトリックスの変動効果（A13章）もないことが多い。

A3.3 最終検量手順

検量の誤差は不確かさの推定値に含まれるが、分析手順で規定された検量操作を個別にバリデーションする必要がある場合もある。ここで重要な点は、直線性などに対する特定のデザインで推定された不確かさは、分析実施手順に規定されたより簡単な検量による不

確かさより小さいことである。

A4 真度

A4.1 真度の推定

真度は、試験結果と測定すべき性質の認められた参照値との一致の程度である。真度は定量的にバイアスという用語で表現され、バイアスが小さければ真度は大きい。バイアスは、標準試料に試験方法を適用した応答と、試料に付与された既知の値とを比較して求められる。有意性の検定が推奨される。参照値の不確かさが無視できない場合には、統計的変動に加えて標準試料の不確かさを考慮して、結果を評価しなければならない。

A4.2 真度の試験条件

ランのバイアス、試験室のバイアス、分析法のバイアスのような、分析システムの異なった段階から分析値のバイアスが発生する。バイアスを求める種々の方法において、どのバイアスが扱われているかを覚えていることが重要である。特に

- 1つのランで実施された標準試料の分析結果の平均値は、その特定のランにおける分析法、試験室及びランの影響の合計についての情報を与える。ランの影響は、ラン毎にランダムであると仮定されるので、試験結果において観測されるばらつきから予測される値よりも、ラン毎の結果の変動は大きくなる。試験結果の評価においては、このことを考慮に入れる必要がある。(たとえば、個別に試験したランの間の標準偏差に対して、測定されたバイアスを検定する)。
- 複数のランで行った標準試料のくり返し分析の平均値から、特定の試験室における分析法と試験室バイアスを結合した値が推定できる(特定の方法によりその値が与えられる場合を除く)。

A4.3 真度の測定に対する参照値

A4.3.1 認証標準試料 (CRM)

認証標準試料 (CRM) は、既知の不確かさを持って国際標準にトレーサブルであり、マトリックスの不整合がなければ、バイアスのあらゆる面(分析法、試験室間及び試験室内)を同時に定めるために使用できる。従って、実行可能ならば、認証標準試料を真度のバリデーションに使用すべきである。認証値の不確かさが、重要となるバイアスを検出できる程度に十分小さいことを保証することが重要である。不確かさが十分に小さくない場合にも、認証標準物質の使用は推奨されるが、追加の試験を実施する必要がある。

代表的な真度の測定では、標準試料からの応答の平均値を得る。試験結果を解釈する際には、試験室における統計的変動から生じる不確かさと共に、認証値に伴う不確かさを考慮しなければならない。統計的変動の不確かさは、実験の意図に応じて、ラン内、ラン間、あるいは試験室間の標準偏差推定値を基礎としている。認証値の不確かさが小さい場合には、適切な精度の項を用いた **student t** 試験を実施する事が一般的である。

必要であり実行可能ならば、適切なマトリックスと分析対象濃度の複数の CRM を試験すべきである。多数の認証標準物質を試験し、それらの認証値の不確かさが分析結果の不確かさより小さいければ、単純な回帰分析による試験結果の評価は妥当と見なす。このような方法を用いると、バイアスを濃度の関数として表わすことができ、切片がゼロ(「遷移」あるいは一定バイアス)、あるいは傾きが一定でない(「循環」あるいは比例バイアス)関数として現れる可能性がある。マトリックス範囲が大きい場合は、結果の解釈は十分注意して行う必要がある。

A4.3.2 標準試料

認証標準試料が入手できない場合、あるいは認証標準試料以外にデータを追加したい場

合には、使用目的を満足しているなら、どのような試料を使っても良い（標準試料 [10] 参照）。その際には、バイアスが有意でなくても、バイアスが無いことの証明にはならないが、ある試料で有意なバイアスが得られたらそれは検討の対象となることに、常に留意すべきである。標準試料の例には以下のものを含む：標準試料の製造者により値付けされているが、その値の品質が不確かさあるいはその他の方法で示されていないもの；標準試料として使用するために試験室が値付けした試料；限定的な持ち回り試験で使用された試料あるいは技能試験で配布された試料。これらの試料のトレーサビリティには疑問があるが、全くバイアスを評価しないよりは、これらの試料を使用する方がずっと良い。これらの試料は CRM と同じ方法で使用できるが、不確かさが与えられていないので、有意性検定は試験結果で観測された精度に依存せざるを得ない。

A4.3.3 標準分析法の使用

標準分析法は、原理的には、バリデートされる別の分析法のバイアスの検定に使用できる。すでに試験室でバリデートされ使用されている確立された標準分析法の代替法あるいは修正法を確認するためには、この方法は有用である。2つの方法を用いて、できれば有用な濃度範囲を均一にカバーするような、多くの代表的試料を分析する。適切な統計手法（例えば、分散の均一性と正規性を確認するための対になった t-検定）により、ある範囲の試験結果を比較すれば、分析法間のバイアスを示すことができる。

A4.3.4 添加／回収率の使用

標準試料がない場合、あるいは標準物質による検討結果を支持するために、添加と回収によってバイアスを検討できる。代表的な試料の一部を使い、なにも添加しないものと、既知量の分析対象物質を添加したものを、バリデートしようとしている分析法で分析する。添加量に対する2つの結果の差の割合は、サロゲート回収率または限界回収率と呼ばれる。1と有意に異なる回収率が得られた場合は、バイアスが分析法に影響を及ぼしていることを示している。厳密に言えば、ここで解説している回収試験は、添加した分析対象物質の操作に影響するバイアスを評価するのみである；つまり、自然に存在する分析対象物質と同じ程度の影響が適用できるとは限らないし、自然に存在する分析対象物質にはここで見られる以上の影響がある可能性もある。従って、添加回収試験結果から得られた良好な回収率は真度の保証とはならないが、不良な回収率は明らかに真度が欠けていることを示している、という考え方に従うべきである。添加回収データの取り扱い方法は、他のところで詳細に扱われている [4]。

A5. 精度

精度は指定された条件で得られた、個々の試験結果間が一致する程度を表す。通常、精度は標準偏差、もしくは相対標準偏差で表される。精度とバイアスの区別は基本的事項であるが、分析システムを評価するレベルに依存する。つまり、1回の定量分析の視点からは、そのランに使う検量線に影響する逸脱は全てバイアスとみなされる。1年間の結果を見直す分析者の視点からみれば、ランのバイアスは毎日変化し、精度を伴ったランダム変数としての挙動を示す。精度推定で指定される条件は、このような視点の変化を考慮している。

単一試験室によるバリデーションでは、次の2つの条件が関連する：(a) 1つのラン内で、期待値 0、標準偏差 σ_r の変動として観測される併行条件下の精度、及び (b) ランとランの間で、期待値 0、標準偏差 σ_{run} のランバイアス δ_{run} の変動として観測される精度。通常、両者の誤差原因が個々の分析結果に影響しているため、分析結果の精度は2つが合わされた $\sigma_{tot} = (\sigma_r^2/n + \sigma_{run}^2)^{1/2}$ となる。 n は、報告値を得るために1つのラン内で平均されるくり返し結果の数である。2つの精度の推定値を最も簡単に得るためには、連続し

たラン内で選択した試料を二回分析する。一元配置の分散分析により、個々の分散成分が計算される。個々の二回分析は、別々の試料に分析法を独立に適用して行わなければならない。別法として、連続したラン毎に試料を一回分析し通常用いられる数式によって標準偏差を推定して、結合した精度 σ_{tot} を直接推定することもできる。(標準偏差の観測値には一般に記号 s が与えられ、母標準偏差 σ とは区別されていることに注意する)。

精度の値は、実際に起こりうる試験条件の変化を代表していることが重要である。第一に、ラン間の条件の変動は、試験室の日常検査／ルーチン分析で分析法を使用するとき、普通に起こる変動を代表しなければならない。たとえば、試薬のロット、分析者、装置の変動が通常の範囲を代表していることが望ましい。第二に、使用する試料は、マトリックスと(理想的には)粉末化の状態が、日常検査／ルーチン分析において現れる試料の状態を代表するものであることが望ましい。従って、当然実際の試料は適切であり、それよりは程度が落ちるけれども、マトリックスが一致している標準試料も適切である。しかし、分析対象物質の標準溶液は不適切である。認証標準物質及び調製した標準物質は、均一化の程度が通常の試料よりかなり高いことが多く、従って、それらの分析から得られた精度は、実際の試料で観測される変動を過小評価する可能性にも注意すべきである。

分析対象物質濃度によって、精度が変化することが多い。典型的な仮定は、(i) 分析対象物質濃度によらず精度は一定である、あるいは(ii) 標準偏差は分析対象物質濃度に比例するか、あるいは線型の関係にある、の2つである。分析対象物質濃度が実質的に変化する(中央値から約30%以上)と予想されるなら、どちらの場合でも、その仮定を確かめる必要がある。もっとも経済的に実験するには、濃度範囲の両端かその近傍で精度を単純に評価し、それらの分散の差を適当な統計手法で検定する。正規分布する誤差にはF-検定が適している。

ここに示した最低限の併行、ラン間変動以外の、広い範囲の異なる条件で、精度データを採取することにより、追加情報が得られる可能性がある。たとえば、異なる操作者やラン効果、日間及び日内の効果、1台あるいは複数の装置を使って得られる精度などは、分析結果の評価、あるいは測定法の改良のために有用であろう。これらの研究のための種種の実験計画及び統計解析技術が利用できるのも、注意深い実験計画が強く推奨される。

A6. 回収率

回収率を推定する方法は、真度推定方法に関連して議論した。

A7. 範囲

バリデートされた分析法の範囲とは、分析法がバリデートされたときと見なしうる、分析対象物質濃度の範囲である。この範囲は検量線の有効範囲と必ずしも同一ではないことを認識すべきである。検量線が広範な濃度範囲を含むとしても、バリデーションされた部分(通常は不確かさに関してより重要な部分)は、さらに限定された範囲である。実際には、ほとんどの分析法は、1あるいは2レベルの濃度だけでバリデートされる。バリデートされた範囲は、これらの濃度から合理的に外挿できる範囲と見なされるかもしれない。

分析法が検出限界よりかなり高い特定の濃度で使用されるなら、その特定レベルでバリデートすることが適切である。個々の分析システムに依存する部分が多いので、この結果を分析対象物質の他の濃度に外挿できる安全域を定義することは不可能である。故に、バリデーション結果報告では、実施者が専門家として、不確かさ推定値が正しいと判断した、特定濃度付近の範囲を示すべきである。

対象とする濃度範囲がゼロあるいは検出限界に近い場合、絶対不確かさあるいは相対不確かさいずれも、一定と仮定することは正しくない。このよく起こる状況では、次式に示すような、不確かさ u と濃度 c の間に、正の切片を持つ一次関数を仮定することが有効な近似となる。

$$u(c) = u_0 + \theta c$$

θ は限界検出よりも高濃度で推定された相対不確かさである。 u_0 は濃度ゼロで推定された標準不確かさで、ある状況では $\frac{c_L}{3}$ と推定できる。このような状況では、ゼロからバリデーションされた濃度を小さな整数倍した濃度までを、拡張したバリデーション範囲としてみなすことが妥当であろう。これについても、専門的な判断によるべきである。

A8. 検出限界

広義の検出限界は、信頼性を持ってゼロと区別可能な、試料中の分析対象物質の最小量、もしくは最小濃度である[22、23]。バリデーション範囲がゼロを含まない、あるいはゼロに近づかない分析システムでは、バリデーションに検出限界を含める必要はない。

この考え方は一見簡単に見えるが、検出限界という主題全体は、以下に略述するような問題を含んでいる。

- この主題を扱う概念は複数存在し、それぞれの概念が少しずつ異なる検出限界の定義を示している。この問題を解明しようとする試みは、もっと混乱しているように見える。
- それぞれの取り組みは、ゼロ濃度あるいはその近傍濃度での精度推定値に依存しているが、推定のために併行条件あるいは他の条件が指定されているのかは、明らかではない。
- 膨大な量のデータが集められない限り、検出限界の推定値には極めて大きなランダム変動が伴う。
- 検出限界の推定値は操作上の要素によって、低い側のバイアスを持つことが多い。
- 検出限界に関する統計的推論は正規分布を仮定しているが、この仮定は低濃度域では疑問である。

分析法バリデーションでの最も実用的な目的のためには、簡単な定義を選ぶほうが良いだろう。この定義からは、すぐに実施できる推定値が得られるが、その使用は分析法の有用性の大きなガイドのみに限られる。ただし、分析法開発で推定された検出限界は、分析法を完全に記述するために使用される検出限界とは、概念的にも数値的にも同一ではないと認識すべきである。たとえば、文献や分析装置パンフレットで引用され、希釈の調整に使われる「分析装置の検出限界」は、「現実」の検出限界よりはるかに小さい値であり、分析法バリデーションには不適當である。

従って、分析法バリデーションでは、典型的マトリックスブランクもしくは低濃度試料中の分析対象物質濃度を、少なくとも 6 回全操作測定し、ゼロや負の結果を削除せずに求めた精度推定値(S_0)を用い、検出限界の近似値を $3 S_0$ とすべきである。推奨される最小の自由度を持っていても、この数値は極めて不確かであり、係数 2 の誤差を持っている可能性があることに留意すべきである。より厳密な推定値が必要な場合（検出に基づいた決定を支持する、あるいは異なる試料の場合）は、適切な指針を参照することが望ましい（参考文献 22-23 参照）。

A9. 定量限界

これ以下では分析法が受容できる精度で使用できない濃度、という定義が有用なことがある。このような精度として RSD 10% が任意に決められることもあれば、同じように任意に、定量限界が検出限界の一定の倍数（代表的なものは 2）とされることもある。これらの定義はこの濃度以上での操作にある程度の安心感を与えるが、濃度の全く人為的な二分法であることを認識すべきである。そのような限界以下の測定値に全く情報がないわけではないし、また目的に適合している可能性もある。それゆえ、このような限界値をバリ

レーションに使用することは、ここでは推奨しない。それよりも不確かさを濃度の関数として示し、この関数と試験室、顧客、分析結果の最終利用者間で合意した目的への適合性基準とを比較することが望ましい。

A10. 感度

分析法の感度は、検量線の傾きである。通常、感度は分析機器の設定に依存した任意の量であり、バリデーションには有用ではない。(ただし、分析機器が一定に作動し、基準を満足していることを確認するための品質保証では有用であろう。)

A11. 頑健性

分析法の頑健性とは、分析手順に示された実験条件からの僅かな逸脱があったときに、分析法による結果が変化しない能力である。実験パラメーターの許容範囲は、分析法プロトコルに定められるべきであり(このことは、過去に決まってきたわけではないが)、このような許容された逸脱は、個々にあるいはどのように組み合わせられても、分析結果に意味のある変化を起こしてはならない。(ここで言う「意味のある変化」とは、目的への適合性を定義するように合意された不確かさの限界内で、分析法が機能できないことを意味している)。分析値に影響を及ぼす可能性のある要因を特定し、その分析性能への影響を頑健性試験を用いて評価すべきである。

実施手順を意図的に少し変動させ、それが分析結果に及ぼす影響を調べることにより、分析法の頑健性が試験される。分析法の多くの要因を考慮する必要があるが、大部分の影響は無視しうるので、通常はいくつかの要因を同時に変動させる。一部実施要因計画に基づいた経済的な実験を、Youden が示している [13]。たとえば、7 個の要因の 8 種類の組み合わせを用いた方法が、定式化されている。つまり、8 回の分析結果から 7 個の要因の影響が調査できる。一変量のアプローチも適用できるが、この方法では一度に 1 つの変数のみが変化する。

頑健性試験の対象となる変動要因の例：機器、操作者、試薬メーカー、試薬濃度、溶液の pH、反応温度、一過程を終わる時間。

A12. 目的への適合性

目的への適合性とは、分析者と分析結果の利用者間で合意した、結果利用者の必要条件を記述した規準と、分析法の性能が適合している程度である。たとえば、データの誤差が大きくて、規定された小さな確率を超えて誤った判断がなされてはならないが、誤差を小さくするあまり、結果利用者の不必要な費用を増大させてもいけない。目的への適合性規準は、この付録に記載したいくつかの性能特性に基づくが、最終的には許容できる結合不確かさで表されるだろう。

A13. マトリックスによる変動

マトリックス変動は、多くの分野において、分析誤差の要因として最も重要であるにもかかわらず、最も認知されていなかった。分析システムをバリデートする際に、多くの他の事項の中で特に、特定のマトリックスを定義したときに、その分類中でかなりの変動範囲があるだろう。極端な例をあげるなら、「土壌」という分類の試料は、粘土、砂、白亜石灰岩、ラテライト(紅土)(主成分は Fe_2O_3 と Al_2O_3)、泥炭等々、あるいはそれらの混合物から構成される。それぞれの土壌のタイプが、固有のマトリックス効果で、原子吸光分析のような分析法に影響することは、容易に想像できる。分析している土壌のタイプについての情報がなければ、この変動マトリックス効果によって、分析結果に不確かさが加わるだろう。

マトリックス変動による不確かさは、分析法のバリデーションの他の過程で検討されないので、個別に定量化する必要がある。定義した分類中で想定される代表的なマトリック

スで、分析対象物の濃度範囲が適切な一連の試料を収集すれば、情報が得られる。プロトコルに従って試料を分析し、結果のバイアスを推定する。試料が認証標準物質でない場合は、添加と回収率推定の手法によって、バイアスを推定しなければならない。不確かさは、バイアスの標準偏差から推定される。(注意: この推定値は、併行分析の分散の寄与を含む。添加を使用した場合には、この大きさは $2\sigma_r^2$ である。厳密な不確かさが必要ならば、二重の計上を避けるために、マトリックス変動の分散からこの項を差し引くべきである)。

14. 測定値の不確かさ

測定値の不確かさの公式推定方法は、数式あるいは数学モデルによる計算である。分析法バリデーションで示される手順は、あらゆる種類のランダム誤差を十分許容した上で、試験結果の推定に使用される数式に、結果に対する、認識されかつ有意な影響が全て取り込まれ、数式が有効な表現であることを保証するように設計されている。つまり、以下に示す留意点の下で、バリデートされた数式あるいは「数学モデル」は、測定の不確かさ推定に使用できる。これは「不確かさの伝播法則」に基づいて確立された原則に従って行われる。「不確かさの伝播法則」では、個々の入力効果は次式で加算される

$$u[y(x_1, x_2, K)] = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2}$$

$y(x_1, x_2, K)$ は独立した変数 x_1, x_2, K の関数であり、 c_i は y の x_i による偏微分 $c_i = \partial y / \partial x_i$ で表される感度係数である。 $u(x_i)$ 及び $u(y)$ は標準不確かさ、つまり標準偏差の形式により表された測定値の不確かさである。 $u[y(x_1, x_2, K)]$ は個別の不確かさ推定値の関数であるので、合成標準不確かさと呼ばれる。

結果の計算に使用される数式 $y = f(x_1, x_2, K)$ から測定値の不確かさを推定するためには、第一に個々の変数 x_1, x_2, K について不確かさ $u(x_i)$ を求め、次にこの不確かさとバリデーションで得られたランダム効果を現すために必要な項を結合し、最後に他の効果を考慮する必要がある。上述の精度の議論では次の統計モデルが想定されていた。

$$y = f(x_1, x_2, K) + \delta_{run} + e$$

e は特定の結果に伴うランダム誤差である。精度の実験から、 δ_{run} と e の標準偏差がそれぞれ σ_{run} 及び σ_r であることは既知なので、後ろの2項 (厳密にはその推定値 s_{run} と s_r) は追加された項に伴う不確かさである。ラン内で個々の結果が平均された場合は、これら2項に伴う合成不確かさは、(前述したように) $s_{tot} = (s_r^2/n + s_{run}^2)^{1/2}$ となる。精度の項が分析対象物質レベルによって変化することが示されている場合には、与えられた結果に伴う不確かさの推定では、そのレベルに対応する精度項を含めなければならないことに留意する。従って、不確かさ推定値の基本は、分析法のバリデーションにおいて仮定され、検定された統計モデルに直接的に従っている。特定の不均一性とマトリックス効果 (付録 A13 を参照) の説明が必要ならば、上記の推定値にそれらの項を追加しなければならない。最後に、算出された標準不確かさに「包含係数」 k を乗じて拡張不確かさ、つまり「測定量に結びつけられ得る値の分布の大部分を含むと期待される区間」[8]、を得る。統計モデルが完全に確立され、分布が正規であることが分かっており、推定値に伴う自由度が高いならば、一般に k の値として2が選ばれる。これに対応する拡張不確かさは、近似的に95%信頼区間に相当する。

ここで付け加えるべき重要な注意点が一つある。それは、仮定した統計モデルを検定する際に、不完全な検定方法を用いざるを得ないことである。すでに述べたように、これらの検定では、どの効果についてもゼロであると証明できない。効果が小さいため、特定の有意性検定に伴う不確かさの範囲内で検出できないことを示すだけである。特に重要な例は、試験室バイアスの有意性検定である。真度を確かめる試験がこれだけならば、その分

析法にバイアスが全くないかどうかに関しては、不確かさが残っていることは明かである。そのような不確かさが、それまで算出した不確かさに関して有意である場合は、検討を追加すべきである。

参照値に不確かさがある場合、試料に付与された不確かさに、適用した試験の統計的不確かさを結合した値が最も簡単な推定である。詳細な議論は本文書の範囲を超えている；参考文献 9 には詳細な解説が示されている。ただし、仮定した統計モデルから直接推定した不確かさは、分析結果に関連づけられる最小限度の不確かさであって、ほぼ確実に過小評価であることに注意が必要である；同様に、同じ考察に基づいた $k=2$ を使用した拡張不確かさも、十分な信頼性を提供できない。

ISO ガイド [8] は、信頼性を高めるために、条件を勝手に加えるのではなく、むしろ必要に応じて k 値を増加させることを推奨している。実際の試験からは、不確かさがバリデーションされた統計モデルに基づいているが、その統計モデルの信頼性の証拠がバリデーション以外で存在しない場合には、 k は 3 未満では示唆されている。バリデーションが包括的であることを疑う強固な理由がある場合、必要に応じて k の値をさらに増加させるべきである。

付録 B. バリデーションにおける不確かさ推定に関する追加的考察

B1. 感度分析

不確かさの測定に用いられる基本式

$$u[y(x_1, x_2, \dots, x_n)] = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2}$$

では、「感度係数」 c_i が必要である。不確かさの推定では、ある影響要因 x_i が既知の不確かさ $u(x_i)$ を持つときに、感度係数 c_i の性質が十分に分からない、あるいは結果を求める数式から求められないことがしばしば起こる。その効果が通常は有意でない、あるいは関連が十分に理解されていないために修正できないという理由から、測定のための数式に含まれていない効果については、特にこのようなことがありがちである。たとえば、溶液温度 T_{sol} の室温での抽出操作への効果が、詳細に確立されていることはほとんどない。

そのような効果に関係する測定結果の不確かさを推定したい場合に、実験的に係数を定めることは可能である。基本的な頑健性試験と非常によく似た手法で、 x_i を変化させて、その影響を観察する容易な操作である。名目値ではない x_i については、まず 2 種類の値を選択し、観測された結果からおおよそその変化率を計算すれば、ほとんどの場合は十分である。得られた変化率は、感度係数 c_i の近似値である。それから $c_i \cdot u(x_i)$ が決定される。(これは有意性か、そうでなければ分析結果への影響の可能性を示すための、実用的方法の一つであることに注意する)。

このような実験では、感度係数 c_i を信頼性を持って計算するに十分な、観察結果の変化があることが重要である。このことをあらかじめ予想することはむずかしい。しかし、影響量 x_i の許容範囲あるいはその拡張不確かさが与えられており、その結果が有意でないと期待されるなら、さらに大きな範囲の c_i の評価が重要であることは明らかである。従って、予想される範囲 $\pm a$ を持つ影響量の (たとえば $\pm a$ は、許容範囲、拡張不確かさ区間、または 95% の信頼区間である) 感度を求める実験で信頼性のある結果を保証するには、可能ならば少なくとも値を $4a$ 変化させることを推奨する。

B2. 判定

ある影響が認められており、有意性があるかもかもしれない、必ずしも信頼できる不確かさの推定値が得られるとは限らない。そのような場合、不確かさを無視するよりも

専門的に考慮された推定値の方が望ましいと、ISO のガイドで明確にのべられている。従って、重要である可能性がある影響の不確かさの推定値が得られない時には、分析者は不確かさについて自分自身で最善の判定を行い、合成不確かさの推定に適用しなくてはならない。参考文献 8 は、不確かさの推定における判定の使用法についてのさらなるガイダンスとなる。

別添資料 2

平成 19 年度厚生労働科学研究 「微生物検査における内部精度管理のあり方」について

1. 実施目的

微生物検査の内部精度管理は、日常の検査において一連の操作が正しく行なわれ、得られた結果が正しいことを裏付けるために実施する活動である。

また、定量的及び定性的な試験いずれの場合においても、微生物検査の大半が検査員の手作業により実施されることから、検査員の技能を正しく把握しておくことも極めて重要となります。微生物検査における内部精度管理については、「登録検査機関における

製品検査の業務管理要領」（平成16年3月23日 食安監発第0323003号）においては、

- 1) 通常試験品を用いて、定められた方法により製品検査の再現性を維持できる技能
(添加回収試験)
- 2) 既知の微生物を含む特別な試験品から当該微生物を検出、分離、鑑別及び同定する技能
(陰性基準のある試験：陽性菌での分離、同定)
- 3) 既知の微生物を用い、培地、染色液、試薬等の性質を調べる技能
を実施することと示されています。

平成 19 年度においては、「登録検査機関における製品検査の業務管理要領」に沿い微生物検査を実施する機関の内部精度管理の実施方法について、「微生物検査における内部精度管理のあり方」としてまとめましたので以下に報告いたします。

「微生物検査における内部精度管理のあり方」

I. 概要

A. 日常検査における内部精度管理の実施方法

1. 細菌数（生菌数）検査における添加回収試験
2. 大腸菌群及び E. coli 等通常検出されない微生物を対象とした検査（陰性基準のある試験品）

B. 検査員の技能を定期的に確認する技能評価

1. 「細菌数（生菌数）測定技能」に関する技能評価試験
2. 「同定鑑別技能」に関する技能評価試験
 - 1) 形態観察（顕微鏡観察）による技能評価
 - 2) 生化学的性状試験による技能評価
 - 3) 血清学的試験による技能評価
3. 「画線分離技能」に関する技能評価試験
4. 技能評価方法

II. 実施方法

A. 日常検査における内部精度管理の実施

1. 細菌数（生菌数）における添加回収試験：通常の試験品を用いて、定められた方法により製品検査の再現性を維持できる技能

1) 対象食品 冷凍食品（加熱後摂取冷凍食品凍結直前加熱）

2) 基準値 $1 \times 10^5 \text{ cfu/g}$ 以下

3) 添加菌液調製

①使用菌液：枯草菌芽胞液（ $1 \times 10^7 \text{ cfu/mL}$ 含有・生菌数測定内部精度管理用栄研器材(株)）

②添加菌数：□基準値 $1 \times 10^5 \text{ cfu/g}$ または、基準値の $1/5$ $2 \times 10^4 \text{ cfu/g}$

4) 添加菌液の調整方法

①基準値： $1 \times 10^5 \text{ cfu/g}$ ($2.5 \times 10^6 \text{ cfu/25g}$) の調製

$1 \times 10^7 \text{ cfu/mL}$ の枯草菌芽胞菌を滅菌生理食塩水を用い 10 倍希釈し $1 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ とする。

検体 25g に対し $1 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ の菌液 2.5mL 添加 [$1 \times 10^5 \text{ cfu/g}$ ($2.5 \times 10^6 \text{ cfu/25g}$)] とする (①の試験品)。

②基準値の $1/5$ ： $2 \times 10^4 \text{ cfu/g}$ ($5 \times 10^5 \text{ cfu/25g}$) の調製

①の試験品で調製した $1 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ の菌液 2mL を 8mL の滅菌生理食塩水で希釈して、 $2 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$ とする。

検体 25g に対し $2 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$ の菌液 2.5mL 添加 [$2 \times 10^4 \text{ cfu/g}$ ($5 \times 10^5 \text{ cfu/25g}$)] とする (②の試験品)。

5) 試験操作

①または、②の試験品について厚生省告示第 370 号食品・添加物等の規格基準・加熱後摂取冷凍食品（凍結直前加熱）の検査方法により細菌数（生菌数）の測定を行う。また、検体への添加前の菌数も同時に測定し、①または②の試験品に添加した実測値（回収菌数）を求め、算出された菌数から回収率を求める。

6) 結果の記載方法

基準値 ($1 \times 10^5 \text{ cfu/g}$) 又は基準値の $1/5$ ($2 \times 10^4 \text{ cfu/g}$) の測定結果（有効数字上位 2 桁とし 3 桁目を四捨五入）及び添加回収率（目安とする回収率 70%~120%）

目標菌数	添加菌数	添加菌数	回収率	培地対照

注) 1. 目標菌数については、基準値又は基準値の $1/5$ の菌数を記載。

2. 培地対照は、検査時に使用した培地、希釈液等を使用し汚染の無いことを確認する。

2. 通常検出されない微生物を対象とした検査:陰性基準のある試験品既知の微生物を含む特別な試験品から当該微生物を検出、分離、鑑別及び同定する技能及び培地、染色液、試薬等の性質を調べる技能

1) 検査項目及び対象食品

- ① 大腸菌群 [加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱)]
- ② E. coli [加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱以外)]

2) 基準値及び添加菌:陰性、検出下限値 $1 \times 10^2 \text{cfu/g}$ の5倍量

3) 添加菌液調整

- ① 使用菌株 : E. cloacae 等の大腸菌群及び E. coli (各検査機関において日常使用している菌株)
- ② 添加菌数 ; 検出下限値を $1 \times 10^2 \text{cfu/g}$ ($2.5 \times 10^3 \text{cfu/25g}$) とし、その5倍量の $5 \times 10^2 \text{cfu/g}$ ($1.3 \times 10^4 \text{cfu/25g}$) とする。
- ③ 添加菌液の調整方法 : 試験前日からトリプトソイブイオン培地等で一夜培養 (35℃、20±2時間) し、滅菌生理食塩水を用いて約 10^8cfu/mL の菌液を作製する。
さらに希釈して $5 \times 10^3 \text{cfu/mL}$ に調整し接種菌液とする。
検体 25g に対し、 $5 \times 10^3 \text{cfu/mL}$ の菌液 2.5mL 添加 [$5 \times 10^2 \text{cfu/mL}$ ($1.3 \times 10^4 \text{cfu/25g}$)] とする (試験品)。

4) 試験操作

試験品について厚生省告示第 370 号食品・添加物等の規格基準・加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前加熱) の検査方法により大腸菌群及び加熱後摂取冷凍食品 (凍結直前未加熱) の検査方法により E. coli の形態観察 (顕微鏡観察) を行う。

5) 結果の記載方法

① 大腸菌群検出試験結果 添加菌数 : (cfu/g)

試験菌	判定基準	試験結果
大腸菌群	グラム染色 (陰性・無芽胞桿菌)	
	乳糖ブイオンでのガスの発生	
大腸菌群の判定 (該当・非該当)		

② E. coli 検出試験結果 添加菌数 : (cfu/g)

試験菌	判定基準	試験結果
大腸菌群	グラム染色 (陰性・無芽胞桿菌)	
	EC 培地でのガス発生	
	乳糖ブイオンでのガスの発生	
E. coli の判定 (該当・非該当)		

B. 検査員の技能評価

1. 「細菌数（生菌数）測定技能」に関する技能評価試験

1) 微生物株を用いた技能試験

枯草菌芽胞数（ 1×10^7 cfu/mL 含有・生菌数測定内部精度管理用栄研器材株）等を $1 \sim 3 \times 10^4$ cfu/mL となるように調整し、試験菌液とし、試験菌液の生菌数を標準寒天平板法（ 35°C 、48 時間培養）により、測定し、得られた測定結果を回収率（70%～120%）または、Z スコアにより評価する。

2) 枯草菌芽胞液の生菌数測定結果

測定	生菌数測定結果[cfu/mL (対数)]			
	検査員 A	検査員 B	検査員 C	検査員 D
1 回				
2 回				
3 回				
4 回				
5 回				
平均値				
標準偏差				

3) Z スコアによる生菌数測定結果の評価

測定	Z スコア			
	検査員 A	検査員 B	検査員 C	検査員 D
1 回				
2 回				
3 回				
4 回				
5 回				
平均値				

4) Z スコアの算出式

$$Z = (X_i - \bar{X}) / S$$

X_i : 測定値 (対数)

\bar{X} : 平均値 (目標値)

S : 標準偏差値 (目標値)

5) Zスコアの評価基準

- | Z | ≤ 2.0 : 合格 (評価点数 2 点)
 2.0 < | Z | < 3.0 : 疑わしい (評価点数 1 点)
 | Z | ≥ 3.0 : 不合格 (評価点数 0 点)

6) 生菌数測定技能の評価内容

各検査員が試料の生菌数を定期的に測定することにより、

- ①「各検査員の技能はいつも安定しているか」
 ②「各検査員の測定値のバラツキはどの程度なのか」
 ③「検査員間の測定値の精度は許容範囲内なのか」等を確認する。
 ④評価 (記載例)

検査員	評価内容		
	添加回収試験 (70~120%以内)	Z スコア (許容範囲内)	標準偏差
A	2	2	0.06
B	2	0	0.05
C	0	1	0.031

- 注) 1. 添加回収試験において 基準内 (評価点数 2 点) 基準外 (評価点数 0 点)
 2. 標準偏差値についてはそのまま表記

7) その他

使用する菌液等については、自家調製したもの、または細菌検査精度管理用定量菌株として市販されている「EASY QA Ball」(日水製薬㈱から販売)等の菌数が常に一定の菌数が確保されているものを使用

2. 「同定鑑別技能」に関する技能評価試験

1) 形態観察 (顕微鏡観察) による技能評価

① *Esherichia coli*

- ② *Staphylococcus aureus* 等の 2 株を寒天斜面培地に接種・培養し、試験菌株とする。各試験菌株の形態観察及びグラム染色を実施し、当該微生物の形態及びグラム染色性を判定する。

③ 結果 (記載例)

試験菌	形態	検査員 A	検査員 B
E. coli (<i>Esherichia coli</i>)	グラム陰性	2	0
	無芽胞桿菌	2	2
黄色ブドウ球菌	グラム陽性	0	2

(S. aureus)	無芽球菌	0	2
-------------	------	---	---

注) 正しく判定された： 評価点数 2 点

判定に誤りがあった：評価点数 0 点

2) 生化学的性状試験による技能評価

- ①Esherichia coli (IMViC)
- ②Staphylococcus aureus (コアグラゼ試験)
- ③Salmonella typhimurium (食肉製品)
- ④腸管出血性大腸菌 0157

各試験菌株について生化学試験を実施し、当該微生物の性状が当該菌に該当するか否かを判定する。

3) 血清学的試験による技能評価

- ①Salmonella typhimurium
- ②腸管出血性大腸菌 0157

以上の 2 菌株を寒天斜面培地に接種・培養し、試験菌株とした。

市販免疫血清（デンカ生研(株)製）を用いて各試験菌株の O 群血清型を判定する。

形態観察（顕微鏡観察）、生化学的性状試験及び血清学的試験により検査員の同定鑑別技能を評価する。

同定鑑別の手法としては、通知法等に実施する形態観察（顕微鏡観察）、生化学的性状試験及び血清学的試験の他にも、同定キットを用いる手法、生物学的手法、遺伝子学的手法、様々な手法が示されている。必要に応じて、これらの手法についても検査員の技能を確認・評価しておくことが重要と考えられる。

③生化学的性状試験結果（記載例）

試験菌	生化学性状	検査員 A	検査員 B
Esherichia coli	省 略	2	2
Staphylococcus aureus		2	2
Salmonella typhimurium		0	2
腸管出血性大腸菌 0157		0	0

④血清学的試験結果（記載例）

試験菌	血清学的試験	検査員 A	検査員 B
Salmonella typhimurium	省 略	2	2
腸管出血性大腸菌 0157		0	2

注) 正しく判定された： 評価点数 2 点