

200939029A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究

(課題番号) H20—食品—一般—011

平成21年度 総括・分担研究報告書

[差替版]

研究代表者 松岡 英明

平成22 (2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
食品の企画基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究	1
松岡英明	
II. 分担研究報告	
1. 「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワークの構築	4
松岡英明	
2. 理化学的試験法の不確かさの推定	14
松田りえ子	
3. 生化学的試験法の不確かさの推定	27
渡邊敬浩	
4. 微生物学的試験法の不確かさの推定	62
工藤由起子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	79

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究
総括研究報告書

研究代表者 松岡英明 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻 教授
研究分担者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部 部長
渡邊敬浩 国立医薬品食品衛生研究所食品部 第三室長
工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 室長

研究要旨

Codex のガイドライン(CAC/GL54 2004)に基づく要請に応えるために、食品分析各分野の具体的な試験例に即して、不確かさの推定に関する実験研究（理化学、生化学、微生物）、及び調査研究を行うことを目的としている。なお本年度の実験研究は全て単一試験室内での繰り返し試験によった。

理化学的試験では、食品添加物である保存剤（安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル類、ソルビン酸）、甘味料（サッカリンナトリウム）及び発色剤（亜硝酸ナトリウム）を、食品に添加し、その分析結果から得た室内精度から拡張不確かさ（RSD 表示）を推定した。安息香酸、ソルビン酸などでは 10%、パラオキシ安息香酸エステル類では 20%と推定された。しかし、食品の種類により変動する場合もあり、不確かさの一般的な値を求めることは困難であった。

生化学的試験では、リアルタイム PCR 分析における、全工程（DNA 抽出過程＋機器分析）での拡張不確かさ（RSD 表示）を推定した。大豆の同一の認証標準試料から 4 種の DNA 抽出法(mini、resin、quicker、maxi 法)で比較した結果、24～55%の範囲で方法により異なる値となった。

微生物学的試験では、自然汚染鶏肉、自然汚染そば粉、枯草菌芽胞液などにおける細菌数測定に伴う不確かさを推定した。その結果、拡張不確かさ(\log_{10})は 0.17～0.36 の範囲であり、マトリックス(食品の種類・成分)や試料の調製方法によって異なる値であった。

調査研究では、専門調査委員会で、他に比べ不確かさの要因が非常に複雑な微生物学的試験を重点的に、国内外の動向について分析、討論を行った。その結果、離散量（菌数）の扱い、外れ値検定、ロバスト法、生菌標準物質などの課題についての議論を深め、重要な認識を得た。この経験を踏まえ、食品分析分野と統計学分野との連携活動を企画した。

A. 研究目的

食品分析における不確かさの推定を求めるガイドラインが Codex 委員会により

作成されているものの、具体性に欠けている。特に、生化学的試験及び微生物学的試験により得られる分析値の不確かさ

を推定した研究結果はほとんど報告されておらず、今後の食品に関わる分析値の正当性を保つためにも重要な課題であると考えられる。

平成 17 年～19 年に実施した厚生労働科学研究において、理化学的試験の単一試験室内データから不確かさを推定する標準的なガイドラインを作製した。

Codex のガイドライン (CAC/GL54 2004) に基づく要請に応えるために、理化学的、生化学的、微生物学的の各分野における具体的な試験例に即して、不確かさの推定法や、不確かさに影響を与える要因分析などに関して実験研究、及び調査研究を行うことを目的としている。それによって、将来ガイドライン等を提示するための資料を作成する。また、不確かさに関する研究やガイドライン策定等に関する国際動向の継続的調査を推進するために、産官学を横断的に結ぶ研究者・技術者ネットワークの構築を目指す。

B. 研究方法

本年度の実験研究は全て単一試験室内での繰り返し試験によった。理化学的試験では、食品添加物である保存剤（安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル類、ソルビン酸）、甘味料（サッカリンナトリウム）及び発色剤（亜硝酸ナトリウム）を、食品に添加し、その分析結果から得た室内精度から拡張不確かさ（RSD 表示）を推定した。生化学的試験では、大豆の同一の認証標準試料を用いて、リアルタイム PCR 分析における全工程（DNA 抽出過程＋機器分析）での拡張不確かさ（RSD 表示）を推定した。微生物学的試験では、自然汚染鶏肉、自然汚染そば粉、枯草菌芽胞液、などにおける細菌数測定

に伴う不確かさを、推定した。

調査研究では、専門調査委員会で、他に比べ不確かさの要因が非常に複雑な微生物学的試験を重点的に、国内外の動向について分析、討論を行った。

C. 研究結果の総括

理化学的試験では、安息香酸、ソルビン酸などでは 10%、パラオキシ安息香酸エステル類では 20% と推定された。しかし、食品の種類により変動する場合もあり、不確かさの一般的な値を求めることは困難であった。

生化学的試験では、例えばコピー数に基づき算出される混入率の変動に関して、4 種の DNA 抽出法 (mini、resin、quicker、maxi 法) で比較した結果、RSD (%) が 12.2～27.3% の範囲で方法により異なる値となった。この場合の拡張不確かさ (RSD 表示) は 24～55% と推定される。

微生物学的試験でも、拡張不確かさ (\log_{10}) はマトリックス (食品の種類・成分) や試料の調製方法によって異なる値となり、0.17～0.36 の範囲であった。

調査研究では、不確かさの考え方に関する国際動向に関する文献調査に加え、統計解析の専門家を含む専門調査委員会で議論した。特に、微生物試験が直面している問題点に関しては、統計モデルの妥当性に遡って議論した結果、重点課題として、分散量 (菌数) の扱い、外れ値検定、ロバスト法、生菌標準物質が抽出された。さらに、食品分析分野と統計学分野との連携活動を企画した。

D. 結論

実験研究では、理化学、生化学、微生物いずれの分野でも、拡張不確かさの推

定事例を示したが、食品の種類、試料の処理法、などが異なると結果が異なるため、その試験法固有の値として確定することはできなかった。

調査研究では、微生物学的試験法が直面している重点課題は、統計学分野においても国際的に重要課題になっている、との認識が得られた。そのため、今後は、統計学分野との緊密な連携が重要であるとの結論を得た。

E. 健康危険情報

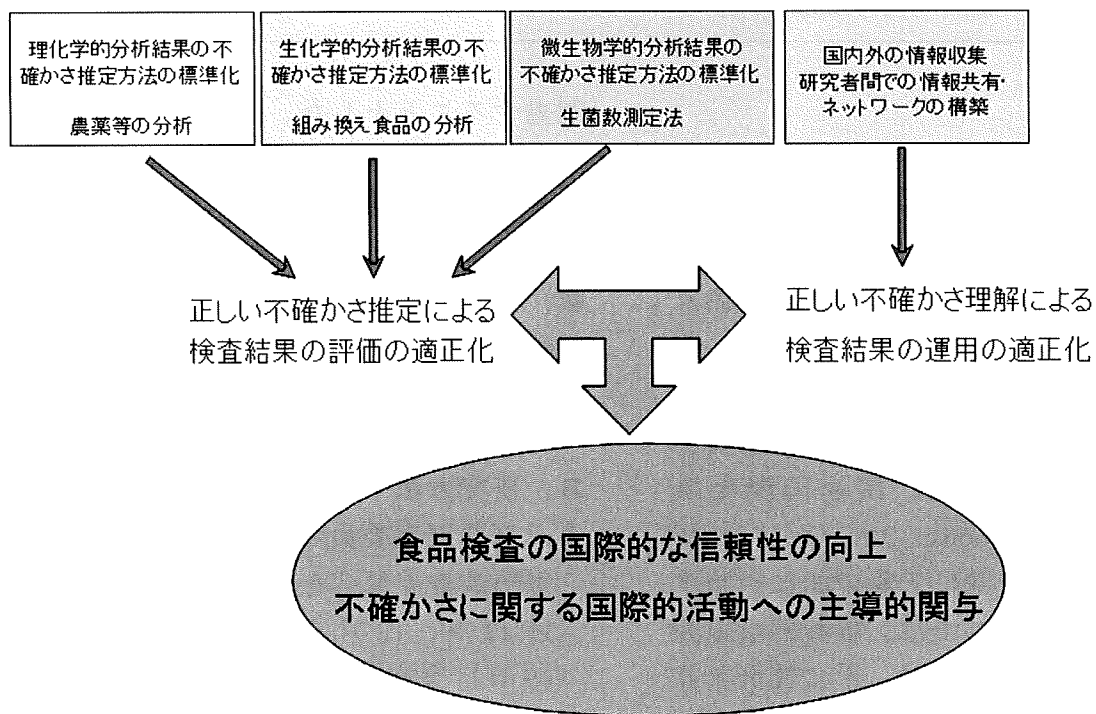
なし。

F. 研究発表

各分担研究課題の項参照。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究
分担研究報告書

「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワークの構築
研究分担者 松岡英明 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻教授

研究要旨

食品分析法における不確かさの推定に関する国際動向を継続的に調査するために、学術・産業・行政各分野を横断的に結ぶ、「食品分析法の不確かさ」研究者・技術者ネットワーク構築を目指し、特に統計学の専門家の 3 名を加えた専門調査委員会を設置した。そして、理化学的試験や生化学的試験に比較して、不確かさの要因が非常に複雑な微生物試験を重点的に、国内外の動向について分析、討論を行った。その結果、離散量（菌数）の扱い、外れ値検定、ロバスト法、生菌標準物質などの課題についての議論を深め、重要な認識を得た。

A. 研究目的

現在、食品分析においては「不確かさ」の推定が要請されている。しかし「不確かさ」とは何か、そしてそれをどのように推定するか、についての理解が関係者の間でも十分とはいえない。そこで、食品分析に関係している、学術・産業・行政各分野の専門家による専門調査委員会を設置し、文献調査、関連国際組織（AOAC、ISO、Codex、JIS など）の活動状況調査などを基に、集中的に討論することとした。そこでは、統計的な議論が大きな比重を占めるが、単に統計計算の技術的問題にとどまらず、統計モデルの妥当性にまで遡って議論しようとする方針である。それゆえ、上記委員会には統計数理研究所から 3 名の方にご参加頂いている。

なお、食品分析の内容が、理化学分析か生化学分析か、あるいは微生物分析かによって課題が異なるが、最も複雑で議論が遅れている微生物分析に的を絞って

調査することとした。

初年度は主として文献調査であったが、本年度は重点項目の抽出とそれに関する集中討論を行った。その結果、離散量（菌数）の扱い、外れ値検定、ロバスト法、生菌標準物質について問題点が整理された。以下にその議論の詳細を報告する。

B. 研究方法

1. 専門調査委員会(図 1)による討論

専門調査委員会を 3 回（平成 21 年 6 月 12 日、12 月 21 日、平成 22 年 2 月 19 日）実施した。

2. 調査した資料

- (1) ISO16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods（新規の試験法を提案する場合は、既往の標準法あるいは参照法に対する「代替法」として位置づけられる。この規程は微生物試験における代替法のバリデーションの具体的手続きに

ついて規定している。定量試験の項でロバスト法の一例としてメジアンによる方法が示されている。)

- (2) JIS Z 8402-1~5; 1999~2002 (ISO 5725-1~5; 1994~1998): 測定法及び測定結果の精確さ (真度及び精度) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results (次の5分冊からなり、用語の定義から始まり、室内試験データ数と室間試験における試験室数とのバランス、ロバスト法、などに関する記述がある。)

第1部 一般的な原理及び定義

General principles and definitions.

第2部 標準測定方法の併行精度及び再現精度を求めるための基本的な方法

Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

第3部 標準測定方法の中間精度

Intermediate measures of the precision of a standard measurement method

第4部 標準測定方法の真度を求めるための基本的な方法

Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method

第5部 標準測定方法の精度を求めるための代替法

Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method

- (3) ISO/TS 19036:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations および ISO/TS 19036:2006/Amd 1:2009, AMENDMENT 1: Measurement uncertainty for low counts. (2006に出された「食品および家畜用飼料の微生物

物定量試験における不確かさ測定) に対して、2009年に「低濃度における菌計数の場合の不確かさについて」の改訂版が出された。)

- (4) B. Lombard: Estimation of measurement of uncertainty on food microbiology: The ISO approach. Accred. Qual. Assur. 17, 94-100 (2006). (著者はISO TC34/SC9の議長で、ISOの具体的取り組みとしてTS19036の内容を紹介している。)

- (5) L.I. Forster: Measurement uncertainty in microbiology. J. AOAC INTERN. 86, 1089-1094 (2003). (浄水中の汚染菌数の定量試験における不確かさの推定例を紹介している。)

3. 国内外関連研究グループとの連携

厚労科研 (食品の安心・安全確保推進研究事業) 「食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究」グループとの連携により、関連情報を得た。また、ISO TC34 (食品) /SC9 (微生物) の議長を迎えての討論会 (日本食品微生物学会の企画) に参加して、直接、討論した。さらに、ISO TC69 (統計学的方法の適用) /SC6 (測定方法と測定値) 国内委員会との連携をはかることとした。

C. 研究結果及び考察

1. 「不確かさ」の定義

「不確かさ」の概念は、1993年にISOを含む7つの国際機関の名前で出版された「計測における不確かさの表現のガイド」(Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement; GUM)によって国際的に次のように合意されている。

「測定の結果に付随した、合理的に測定

量に結び付けることができる値の、バラツキを特徴付けるパラメータ」

(A parameter associated with the result of a measurement, that characterizes the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand)

「測定の結果に付随した」とか「合理的に測定量に結び付けることができる」などと言われても、ピンとこない。「標準偏差」あるいは「信頼性区間」のようでもあるが、そのもの自体でも無さそう。ところが、この点を明快に記載したものがない。本報告でははじめに、この点について解説をこころみる。

不確かさとは、一つの分析法に対して

- ①よくバリデーションされた手順 (Protocol) で
- ②よく訓練された (Proficient) 試験者によって
- ③よく整備された (Accredited) 試験所で

実施された分析結果が、最大、どの程度変動するか、の推定値を指す。

重要なことは、その分析法の固有の特性の一つであり、新しい分析法に対して求めるべき値であり、既に確立した分析法の適用事例における評価指標ではない、ということである。

上記の①～③の条件を可能な限り満たしても、変動をゼロにすることは難しい。例えば、手順書で試験者の手の動かし方や間の取り方などに至るまで、100%手順を規定することは難しい。また、試験者の技量は一定のレベル以上ではあっても、同一とは言えない。さらに試験所にしても、設備の機種や整備状況が同一とは限らない。これらの避けがたい変動要因を勘案した上で、分析結果が最大、どの程

度変動するか、を推定する必要がある。

その具体的方法として、共同試験による評価がベストというのが共通認識である。したがって、室間再現標準偏差 s_R を不確かさの推定値の基準とする考え方が妥当である。しかし、ISO では、次節に述べるように、単一試験室内での室内再現精度、すなわち室内再現試験における標準偏差を「中間精度 (Intermediate Precision)」として、第一優先にしている (ISO/TS 19036)。試験者や装置など同じ条件で行う通常の試験室内の試験と違って、場所は同じ試験室内であるが、試験者も装置も試験日も、意識的に異なる条件にして行う試験であり、いわば、複数の試験所で行う共同試験と単一試験所の室内試験の「中間」という意味と理解される。恐らく、室間共同試験の実施を前提とする場合に比べ、試験条件の設計・実施がはるかに容易になるからであろう。

2. 不確かさ推定に関する ISO の考え方

B. Lombard の論文 (Accred. Qual. Assur. 17, 94-100 (2006)) に従って概説する。微生物試験における不確かさの要因は図2のようにまとめられる。食品マトリクスから始まり、サブサンプリング時の初期希釈条件、さらに連続希釈列の調製条件、最終的なコロニー計数におけるコロニーの基準、などいずれも不確かさの要因となる。それぞれの大きさを推定することは難しい。さらに、サンプリング条件やバイアスなどは、さらに不確かさの推定が難しいので、最初から考慮しないとしている。したがって、不確かさの原因を分析し、これをできるだけ小さくすることを努力目標とはするが、いわゆるボトムアップ方式での推定は行わな

い、との考えである。すなわち、トップダウン方式の考え方である。

定量試験に対する指針は次のように要約される。

- ①一つの試験法（菌種、マトリクス、生理学的条件、試験法の種類、ごとに規定）に対して、 s_R （Reproducibility Standard Deviation）を求める。
- ② s_R は、元来、室間共同試験（コラボスタディ）によって求める室間再現精度（Reproducibility）の標準偏差であるが、ISO/TS 19036では、次の優先順位で求めた値をもって s_R とする。
 - 1) 中間精度（下記に留意事項）
 - 2) メソッドバリデーションのために実施する室間共同試験で求めた室間再現標準偏差
 - 3) 技量認定試験のために実施する室間共同試験で求めた室間再現標準偏差
- ③ 標準偏差に包含係数（ k : Coverage factor）をかけた値 ks を、「拡張不確かさ（ U : Expanded uncertainty）」と定義。
- ④ 正規分布を仮定すれば、観測値が 95%、99%の信頼性でとりうる値は、各々、 $\text{平均値} \pm 2s$ 、 $\text{平均値} \pm 3s$ 、である。

一方、定性試験に関しては ISO は TC34/SC9 で検討中であり、AOAC の統計ワーキンググループも ISO TC34/SC9 への積極的な参加を提唱しているが、現時点では規定になっていない。

上記②の優先順位で、中間精度が第一優先となっているが、これを実施する場合の留意点は次のようになる（図3）。

- ①同一試料で、できるだけ異なる2条件（条件A、B：試験実施者、実施日時、

使用する装置類などを変える）で実施。不確かさが大きくなってしまいう原因を種々想定し、これらが生じた場合でも包含できるように。

- ②標的菌種とマトリクスの組み合わせごとに、10個以上の試料で反復。
- ③食品試料中の菌の分布はきわめて偏在しているので、サブサンプリングに際しては注意が必要。対のなる2個のサブサンプルの同等性の確保が重要。

3. 不確かさ推定の実例

浄水中の汚染菌数の定量試験における不確かさを推定した例（L.I.Forster, J. AOAC INTERN. 86, 1089 (2003)）を紹介する。図4に示すように n 個の試料をそれぞれ2分割し、希釈系列を作製し、寒天平板法でコロニー計数した。結果を図5に示す。試料の個数を t 、2反復試料の計測値を y_{i1} 、 y_{i2} 、($i=1\sim t$) とすれば、図5の場合は $t=16$ であり、分散は

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^t (y_{i1} - y_{i2})^2}{2t}$$

となる。計測値を対数変換した値とすれば

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^t (\text{Log}R_{i1} - \text{Log}R_{i2})^2}{2t} = \frac{0.105400}{32}$$

となる。これから、標準偏差 $S=0.0574$ 、したがって拡張不確かさ $2S=0.1148$ となる。これが、この試験法の固有の特性として定められる値である。したがって、この試験法で計測した場合は全てこの「不確かさ」で議論されることになる。例えば図5の中の No.1 の試料の試験結果のみに対しても。そのまま、この不確かさの推定値が適用される。

No.1 の試料では対数平均値は
 $av=(2.0492+2.1038)/2=2.0765$ であるの
 で、95%の信頼性区間 (Confidence
 interval) $=av\pm 2S$
 $=2.0765\pm 0.1148$
 $=2.1913\sim 1.9617$

となる。逆対数変換すると
 $92\sim 155$ cfu
 となる。

同じ論文から、もう一例、紹介する。図
 6に計数結果を示す。この例は各試料の
 反復数4である。

S : 全体の標準偏差

S_i : i 番目のサンプル標準偏差 ($i=1\sim k$)

n_i : i 番目のサンプルの反復数 (4)
 ($i=1\sim k$)

N : 全体の分析数 (48)

k : サンプル数 (12)

とおくと、全体の分散は

$$S^2 = \frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^k (n_i-1) S_i^2$$

$$S^2 = \frac{1}{48-12} (3 \times 0.092033138)$$

となる。したがって、 $S=0.0876$ となり、
 拡張不確かさは $2S=0.1752$ となる。

対数平均値 $=1.8169$

95%信頼性区間 $=1.8169\pm 0.1752$

逆対数変換すると $44\sim 98$ cfu

となる。

3. 微生物試験における「不確かさ」に 関する重点課題

(1) 「室内試験データ数と室間試験数との
 バランス」(ISO 5725-1) について

$$P[-A < (s-\sigma)/\sigma < +A] = P$$

は、推定された標準偏差 (s) と真の標準
 偏差 (σ) の乖離の程度を表わす式で、

$(s-\sigma)/\sigma$ が $\pm A(\%)$ 以内にある確率が P である
 ことを示す式である。そして、 $P=95\%$
 となるような A の値は、併行精度に対し
 ては

$$A = A_r = 1.96 \sqrt{\frac{1}{2p(n-1)}}$$

室間再現精度に対しては

$$A = A_R = 1.96 \sqrt{\frac{p[1+n(\gamma^2-1)]^2+(n-1)(p-1)}{2\gamma^4 n^2 (p-1)p}}$$

で与えられる。 A_r の式は試験室数 (p)
 と1試験室1測定水準あたりの測定値の
 数 (n) の関数である。 A_R では、 p 、 n の
 ほか、 $\sigma_R/\sigma_r=\gamma$ の関数である。 σ_R 、 σ_r はそ
 れぞれ室間再現標準偏差、併行標準偏差
 である。 γ は未知数であるが、別途推定さ
 れた値が付表に載っていて、これを利用
 することができる。例えば $p=10$ 、 $n=2$ 、
 $\gamma=1$ のときは $A_r=44\%$ 、 $A_R=32\%$ となる。
 試験室数、を増やせば誤差の幅を小さく
 できる。

実際に共同試験を設計する場合に、試
 験室数をいくつにするかは、利用可能な
 人的、財政的、時間的などの資源と、不
 確かさのレベルを満足できる水準にまで
 下げたいという願望の間の妥協となる。
 もし $p=4$ 、 $n=2$ 、 $\gamma=1$ ならば、 $A_r=69\%$ 、
 $A_R=53\%$ となり、室間再現標準偏差、併行
 標準偏差は、それらの真の値から50%以
 上逸脱していることがあり得る。また
 $p>20$ であれば、試験室数が2、3増加し
 ても、これらの推定値の不確かさは僅か
 しか減少しない。その結果、 $p=8\sim 15$ の範
 囲で選択することが普通である。

(2) 「低濃度における菌計数の場合の不
 確かさについて」(ISO/TS 19036
 Amendment 2009)

通常の場合では、拡張不確かさは $U=2s_R$ (ただし s_R は室間再現標準偏差) である。しかし、菌濃度が低い場合には次式のように補正項が加わる。

$$\text{拡張不確かさ} : U = 2 \sqrt{s_R^2 + \left[\frac{0.18861}{\Sigma C} \right]}$$

補正項での ΣC は「全てのプレートでのコロニー計数値の総和」となっている。規格に載っている具体例について説明する。 10^3 倍希釈液をプレーティングして 102 個のコロニーを得、 10^4 倍希釈液をプレーティングして 8 個のコロニーを得たとき、各計数値を単純に加算して $\Sigma C=102+8=110$ とする。したがって、

$$U = 2 \sqrt{0.15^2 + \left[\frac{0.18861}{110} \right]} = 0.31$$

この結果に基づき、報告書では次のように表記される。

$$5.0 \pm 0.3 [\log(\text{cfu/g})]$$

$$5.0 [\log(\text{cfu/g})][4.7; 5.3]$$

$$1.00 \times 10^5 \text{ cfu/g} [4.9 \times 10^4; 2.0 \times 10^5]$$

$$1.0 \times 10^5 \text{ cfu/g} [-51\%; +100\%]$$

なお、通常 s_R を求める場合は複数試験室の試験結果から求めるわけであるが、上記の ΣC の計算に、その全ての試験室のデータを加算する必要があると思われるが、その説明はない。

また、 ΣC の算出に際して、希釈率の違うものをそのまま加算してしまう方法も妥当とは考えられない。菌数が低い場合にはポアソン分布がもっている不確か性を考慮する必要がある。すなわち計数値自体が持っている不確か性を織り込もうという考えである。したがって希釈率の異なる場合の計数値をそのまま足し算することは合理的とは考えられない。

しかし、ISO 方式では希釈率の異なるプレートの菌数をそのまま平均する。例えば、 10^3 倍希釈液 1mL をプレーティングして 280 個のコロニーを得、 10^4 倍希釈液 1mL をプレーティングして 31 個のコロニーを得たとすれば、 10^4 倍希釈液 1mL 中には 10^3 倍希釈液が 0.1mL 含まれていたことになるので、次の計算式によって平均値を求める。

$$\frac{280+31 \text{ cells}}{1.1 \text{ mL}} \times 10^3 = 2.83 \times 10^5 \text{ cells/mL}$$

上記の $\Sigma C=110$ も同様の考えに従って求められた値と考えられる。

一方、日本では、それぞれの希釈率で得られた結果から原液の濃度を算出し、それを平均する場合がある。すなわち

$$\frac{280 \times 10^3 + 31 \times 10^4}{2} = 2.95 \times 10^5 \text{ cells/mL}$$

最終結果の数値は大きな差が無いように見えるが、考え方の違いは大きい。

(3) 「外れ値検定と外れ値検定を行わないロバスト法の理論的背景や具体的利用方法について」(ISO 5725-5:1998, 及び ISO 16140 の第 6.3.4.2 節)

外れ値の検出と処理については、ISO TC69/WG3 で議論してきた。まだドラフトの段階であるが、ISO 16269 Statistical interpretation of data—Part 4: Detection and treatment of outliers. として出版予定である。その中にも明記されているが、「外れ値が検出された場合、それが測定上のエラーによるものであれば修正するか、あるいは実際の値が分からなければ削除する。しかし、もし外れ値となった理由が説明できなければ、それは削除し

てはならず、有効なデータとして扱わなければならない。その後の解析は、外れ値の影響を余り強く受けないロバスト法によって行う」としている。そして、外れ値を除かずに解析するロバスト法、および外れ値を除くロバスト法について記載している。

外れ値を除かないロバスト法の例は ISO 16140:2003 の第 6.3.4 節、Annex Q に記載されている「帰納的メジアン」(P. J. Rousseeuw, C. Croux: Alternatives to the median absolute deviation. J. Amer. Statist. Assoc., **88** (424) 1273-1283 (1993)) である。測定結果を大きさの順に並べ、その中央の値をメジアンというが、各測定値の差 $x_i - x_j$ の絶対値を全て書き出し、この 2 次元マトリクスの中でのメジアン s_n を求める。そして、 s_n に係数 $k_I = 1.1926$ をかけた値がロバストな s_R に相当する値となる。ただし、この k_I の値の根拠については確認できていない。

ロバスト法は精度が落ちる場合もあるが操作が比較的簡単なので、実用的には最初に外れ値を除かないロバスト法で行い、分析精度の高いデータの場合はロバストではない方法で扱うという方針が推奨される。

(4) 「離散量としての不確かさの推定について」

コロニー数は離散量であり、これを連続量の場合と同じように扱うことは統計学的にも難しい問題である。ISO TC69 でも現在検討中である。したがって、現時点では一連の分析作業は連続量とみなして求めた室間再現標準偏差で考えるようにすることが現実的である。ただし、その場合、一連の分析作業において、最終

的に「ばらつき」として出てくる成分と、真値が分からないために想定しなければならない「バイアス」成分を区別して議論しておくことが必要である、と結論した。

(5) 「微生物標準物質」

2003 年にオーストラリア、BTF 社の C.A. Morgan らによって開発された BioBall は、保存可能な生菌標準物質として極めて有用なものである。しかし、現在までに商品化されたものは 8 株に止まっている。他の菌株については、技術的、あるいは営業上の理由などにより生産されていない。そこで、試験法のバリデーションのために、任意の菌株の標準物質作製が要請されている。BioBall では、フリーズドライ法で乾燥菌としているが、多くの菌はこの処理に耐えられないのかも知れない。また、例え耐えられて生菌の状態を保持できたとしても、ストレスを受けた菌になっているかも知れない。

そこで、標準物質としては、むしろ、新鮮な菌をその場で調製する方式のほうが好ましいとも考えられる。そこで、BioBall 作製時と同様にセルソーターを使用して、微生物生細胞を 1 個ずつ 96 ウェルに分配する条件を検討した。大腸菌 NBRC 3301 など 5 株について、蛍光グルコース (2NBDG)、あるいはカルボキシフルオレッセインジアセテート (CFDA) で染色し、セルソーターで分注した。その結果、NBRC 3301 では、2NBDG で染色した場合は、単一生菌分注率が $97 \pm 2\%$ ($n=3$)、CFDA で染色した場合は $96 \pm 1\%$ ($n=3$) であった。すなわち、95%以上の確率で 96 ウェルに 1 個ずつ生菌が分注できることがわかった。他

の菌では、単一生菌分注率は低かったの
で、その原因を解析し、最適分注条件を
調べる必要がある、と結論された。

D. 結論

(1)不確かさの定義に関して、次の結論
を得た。すなわち、

- ①分析法の固有の特性の一つであり、
新しい分析法に対して求めるべき値
であり、既に確立した分析法の適用
事例における評価指標ではない。
- ②可能な限り試験条件を整えても、変
動をゼロにすることは難しい。
- ③室間再現標準偏差 s_R を不確かさの推
定値としているが、ISO では、単一
試験室内で行う室内再現精度
(Intermediate Precision) の標準偏差
の使用を第一優先としている。

(2)微生物試験法における不確かさの推
定の具体的な事例を示した。

(3)微生物試験における「不確かさ」に
関する重点課題に関して、次の結論を
得た。すなわち

- ①室内試験データ数と室間試験数によ
って、不確かさがどのように変動す
るか、定量的に規定した規格を理解
した。
- ②低濃度における菌計数の場合の不確
かさについて規定した規格を理解し
た。その過程で、菌数の平均値を求
める方法が ISO 法と日米法で異なる
ことが理解された。
- ③外れ値検定と外れ値検定を行わない
ロバスト法の理論的背景や具体的利
用方法について議論し、ロバスト法
の利用方法について理解を深めた。

④離散量としての不確かさの推定につ
いては、現時点では一連の分析作業
は連続量とみなして求めた室間再現
標準偏差で考えるようにすることが
現実的であるとの結論を出した。

⑤微生物標準物質に関しては、大腸菌
NBRC 3301 で、95%以上の確率で 96
ウェルに 1 個ずつ生菌が分注できる
ことがわかった。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

○シンポジウム等講演

- ・松岡英明 “迅速微生物検査技術の開発
とバリデーション”、日本食品衛生学会
第 97 回学術講演会 シンポジウム、東
京 (2009 年 5 月 15 日)
- ・松岡英明 “微生物検査・測定法とその
適用の基本的考え方”、日本防菌防黴学
会 第 36 回年次大会基礎講座、大阪、
(2009 年 9 月 15 日)
- ・松岡英明 “微生物試験における不確か
さ”、JAIMA コンファレンス「セミナー
：分析法の妥当性確認 (Method
Validation) の方法と実際」、幕張、
(2009 年 9 月 4 日)
- ・松岡英明 “微生物標準試験法の開発動
向”、AOACI 日本セクション・食品分析
懇話会 2010 合同シンポジウム、熱海、
(2010 年 1 月 22 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

氏名	所属機関	担当専門分野
松岡英明	東京農工大学	AOAC・微生物試験法
後藤哲久	信州大学	AOAC・理化学分析
布藤 聡	ファスマック	AOAC・遺伝子組換え食品分析
小高秀正	日水製薬	AOAC・微生物試験
田中廣行	日本食品分析センター	ISO SC9・微生物試験
杉本敏明	日本食品分析センター	Codex・理化学分析
椿 広計	統計数理研究所	統計理論
藤田利治	統計数理研究所	統計理論
逸見昌之	統計数理研究所	統計理論

図 1. 専門調査委員会

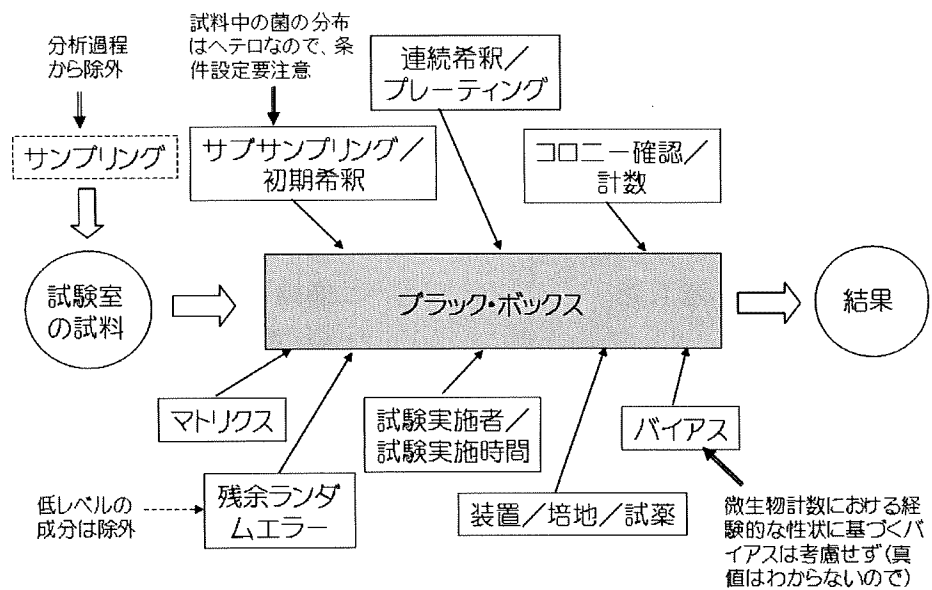


図 2. 不確かさの主要因チャート

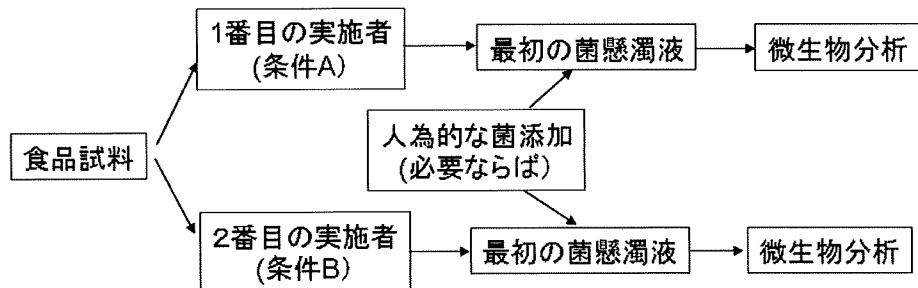


図 3. 室内再現精度の測定における要点

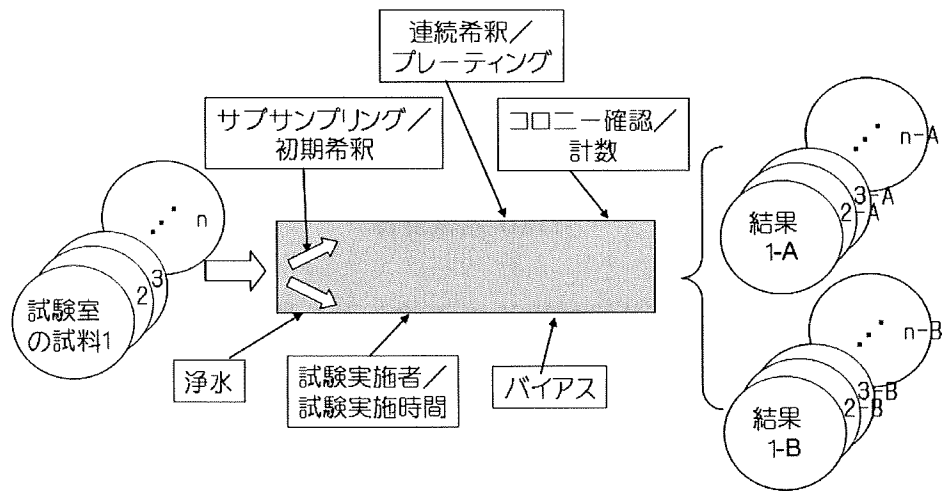


図4. 浄水中の汚染菌数の定量試験における不確かさの推定例

No.	Result 1	Result 2	Log R ₁	Log R ₂	LogR ₁ - LogR ₂	(LogR ₁ - LogR ₂) ²
1	112	127	2.0492	2.1038	0.0546	0.002981
2	37	39	1.5682	1.5911	0.0229	0.000524
3	26	23	1.4150	1.3617	0.0533	0.002841
4	35	37	1.5441	1.5682	0.0241	0.000581
5	75	59	1.8751	1.7709	0.1043	0.010878
6	21	23	1.3222	1.3617	0.0395	0.001560
7	229	220	2.3598	2.3424	0.0174	0.000303
8	161	147	2.2068	2.1673	0.0395	0.001560
9	102	89	2.0086	1.9494	0.0592	0.003505
10	98	107	1.9912	2.0294	0.0382	0.001459
11	53	49	1.7243	1.6902	0.0341	0.001163
12	217	223	2.3365	2.3483	0.0119	0.000142
13	72	48	1.8573	1.6812	0.1761	0.031011
14	30	27	1.4771	1.4314	0.0457	0.002088
15	217	199	2.3365	2.2989	0.0376	0.001414
16	130	210	2.1139	2.3222	0.2083	0.043389
Sum						0.105400

図5. 浄水中の汚染菌数の定量試験における計数值 (1)

No.	LogR ₁	LogR ₂	LogR ₃	LogR ₄	Mean	Variance S ²
1	2.2967	2.3674	2.3384	2.4048	2.3518	0.002089309
2	2.1903	2.1614	2.1761	2.1173	2.1613	0.000998682
3	1.7634	1.7243	1.8062	1.8195	1.7784	0.001871283
4	1.5682	1.6232	1.5798	1.4914	1.5657	0.003010597
5	2.0934	2.0253	1.9638	2.0682	2.0377	0.003215903
6	1.4472	1.2304	1.0414	1.3010	1.2550	0.028428987
7	2.2227	2.3766	2.3284	2.3139	2.3104	0.004136660
8	1.0000	1.0792	1.1139	0.9031	1.0241	0.008773950
9	1.8195	1.9243	1.9731	1.8512	1.8920	0.004847129
10	0.9031	1.1139	0.8451	0.6990	0.8903	0.029599843
11	2.3096	2.2695	2.3522	2.3344	2.3164	0.001283829
12	2.2095	2.1492	2.2201	2.2988	2.2194	0.003776967
Total					1.8169	0.092033138

図6. 浄水中の汚染菌数の定量試験における計数值 (2)

1 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究
分担研究報告書

理化学的試験法の不確かさの推定

研究代表者 松岡英明 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻教授
研究分担者 松田りえ子 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

研究要旨

検査頻度の高い食品添加物である保存剤（安息香酸，パラオキシ安息香酸エステル類，ソルビン酸），甘味料（サッカリンナトリウム）及び発色剤（亜硝酸ナトリウム）の分析結果の不確かさ推定を試みた。これらの分析対象物を，食品に添加して分析して室内性能評価試験を実施し，その結果から得た室内精度から不確かさを推定した。分析対象物を添加する食品は，当該食品添加物の使用基準がある物と無い物から選択し，使用基準値がある場合にはその基準値濃度を，使用基準がない場合には検出限界相当濃度を添加した。得られた室内精度から推定した拡張不確かさは，安息香酸，ソルビン酸，サッカリンナトリウム，亜硝酸ナトリウムを使用基準にしたがって使用した食品では分析値±10%，パラオキシ安息香酸エステル類では分析値±20%と推定された。使用基準が無い食品においては，真度が 100%から離れており補正が必要な場合，室内精度の値が大きく非常に大きな拡張不確かさとなる場合も見られた。また，同一の分析対象物でも添加する食品により真度及び精度が変動するため，不確かさの一般的な値を求めることは困難であった。

研究協力者 井上 誠 財団法人 日本冷凍食品検査協会

A. 研究目的

1993 年，ISO は他の 6 国際機関と共同して「計測における不確かさの表現のガイド(GUM)」¹⁾を発行した。計測の不確かさは，元来物理量について考えられていたが，今日では，化学分析値を含めた多くの分野で，その結果の不確かさを評価する方向にあり，ISO/IEC 17025²⁾の 5.4.6 測定の不確かさの推定では，「試験所は，測定の不確かさを推定する手順を持ち適用する。」ことが求められている。

食品に関わる分析分野においても，その結果に不確かさを付与することが求められており，Codex 委員会分析サンプリ

ング部会(CCMAS)においては，分析法の不確かさに関するガイドラインが審議され，2004 年には「測定の不確かさに関するガイドライン(CAC/GL 54-2004)」³⁾が作成されて，食品規格に関わる全ての分析結果について不確かさを推定し，分析値の使用者の求めに応じて，不確かさを提供できるようにすることが，勧告された。また，ヨーロッパでは不確かさを考慮した基準値への適合判定が議論されている。

このような背景から，平成 17-19 年度の厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業「食品中に残留する農薬等の規格基準に係る分析法に

おける不確実要素に関する調査研究」の分担研究課題「農薬等の分析値の不確かさ推定法に係わる手法の調査研究」において、食品中の残留農薬等の不確かさ推定方法に関する調査研究が実施された。この研究では、Codex 及び諸外国の取り組み状況を調査した結果、食品中の農薬等に関わる分析値の不確かさ推定には、いわゆるトップダウンアプローチが適切であることが明かとなった。

続いて本研究の初年度（平成 20 年度）には、平成 15-19 年の 5 年間に実施された、食品中の食品添加物、重金属、農薬、動物用医薬品を対象とした技能試験結果を解析し、平均、併行精度、室間精度を求めた。また、これらのパラメータから分析方法間で、分析結果あるいは不確かさに差があるかについて検討した。分析法毎に差がみられる場合もあったが、それぞれの方法について得られた室間精度の HorRat 値は、ほとんどが 1 以下であり妥当な精度と考えられた。アナライト毎に、代表的な分析法別に解析を行い、それぞれの室間精度から不確かさを推定した。

本年度は、特定の機関での室内バリデーション結果からの不確かさ推定を検討した。平成 19 年度に通知された、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン（平成 19 年 11 月 15 日食安発第 1115001 号）⁴⁾に示された妥当性評価実験計画を加工食品中の食品添加物分析の室内性能評価に適用し、えられた室内精度から不確かさを推定した

B. 実験

室内性能評価実験

分析対象として、検査頻度の高い保存

剤、甘味料及び発色剤から、安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル類、ソルビン酸、サッカリンナトリウム、及び亜硝酸ナトリウムを選択した。これらの分析対象物を、食品に添加して分析し真度、精度を評価した。

当該食品添加物の使用基準がある食品と無い食品から、添加する食品を選択した。使用基準が有る場合にはその基準値濃度を添加し、使用基準がない場合には検出限界値相当濃度を添加した。添加回収する食品は、予め分析対象である食品添加物を含まないことを確認したのを用いた。Table 1 に分析対象とした添加物と、食品の組み合わせを示す。

添加回収実験は分析者 2 名（異なる施設職員）がそれぞれ 1 日 2 併行の分析を 3 日くり返す枝分かれ実験として行った（Fig.1 参照）。

分析法は、厚生省生活衛生局食品化学課長通知「食品中の食品添加物分析法について」（衛化第 15 号、平成 12 年 3 月 30 日付け）の別添「第 2 版 食品中の食品添加物分析法」に記載されている方法を使用した。分析法の概要を Table 2 に示す。

解 析

1 つの分析対象食品添加物と食品の組み合わせから得られる 12 データを解析対象とした。データは人（施設）と日の 2 元であるが、人と日は室内での変動要因として同等に割り付けて一元配置として解析し、真度、室内精度、併行精度を推定した。

C. 結果

安息香酸

使用基準のある食品としてマーガリン、

清涼飲料水，シロップを，ない食品としてリキュールとジャムを選択した．室内性能評価結果を Table 3 に示す．真度は添加量に対する定量結果の比(%)として，精度は標準偏差及び相対標準偏差(%)として記述した．

パラオキシ安息香酸エステル類

使用基準のある食品としてしょうゆ，清涼飲料水，シロップを，ない食品としてクッキーと海草含有健康食品を選択した．結果を Table 4 に示す．

ソルビン酸

使用基準のある食品として練り製品，シロップ，ケチャップを，ない食品として清涼飲料水，しょうゆ，チョコレートを選択した．結果を Table 5 に示す．

サッカリンナトリウム

使用基準のある食品として清涼飲料水，シロップ，ソースを，ない食品としてワイン及び乾燥梅を選択した．結果を Table 6 に示す．

亜硝酸ナトリウム

使用基準のある食品としてソーセージ，筋子を，ない食品として乾燥マグロを選択した．結果を Table 7 に示す．

D. 考察

安息香酸

安息香酸使用基準のあるマーガリン，清涼飲料水，シロップでは，真度 95.2%-98.0%，併行精度は RSD として 0.8-1.9%，室内精度は 1.4-2.0%であり，きわめて良好な結果が得られた．使用基準のないリキュール及びジャムでは添加濃度を 0.005 g/kg とした．これは，使用基準のある食品の 1/100 の濃度である．リキュールにおける真度が 111.5 %となり，他の食品よりやや高い値となった．

ジャムの真度は 102.7%であった．リキュール及びジャムの併行精度は高濃度添加の結果と同等の 2.0-2.1%であったが，室内精度は 3.3-5.2%であり，やや高い結果となった．

農薬分析の妥当性評価ガイドラインでは，真度が 70-120%であり，精度が濃度により定められた値以下であれば，その分析法の使用は妥当と見なされる．また，金属分析の妥当性評価ガイドラインでは農薬よりも高濃度範囲で妥当と見なされる性能が定められている．食品添加物分析にはこのような基準は未だ定められていないが，濃度レベルの近い金属分析法の性能目標値を仮に適用するならば，マーガリン，清涼飲料水，シロップの真度の目標値は 90-110%，併行精度は RSD として 10%以下，室内精度 15%以下である．今回の評価結果は，この基準を満たしていた．

一方，リキュール及びジャムは添加濃度が低いため，真度の目標値は 80-110%，併行精度 10%以下，室内精度 15%以下である．リキュールの真度は目標値の範囲をやや外れていた．精度は併行，室内共に目標値を満たしていた．

平成 20 年度の本研究では，清涼飲料水中の安息香酸の技能試験データから真度，併行精度，室間精度を推定している．試料中の安息香酸濃度は 0.18 g/kg で本年度の室内性能評価の添加濃度よりやや低い．技能試験参加機関中の水蒸気蒸留法により分析を行った 166 機関の結果から求めた真度は 97.8%，併行精度 0.85%，室間精度 3.2%であった．今回の清涼飲料水における室内性能評価で得られた真度は 98.0%で，技能試験結果とほぼ同じ結果となった．一方，室内性能評価から推

定した併行精度は 1.9%で、技能試験結果よりもやや大きく、室内精度は 2.0%で技能試験から得られた室間精度よりも小さい値となった。

パラオキシ安息香酸エステル類

パラオキシ安息香酸のメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルの 6 種類のエステルを対象とした。

使用基準のある清涼飲料水、シロップ、しょう油の添加濃度は 0.02 及び 0.05 g/kg、使用基準のない、海藻含有食品及びクッキーは 0.005 g/kg とした。

使用基準のある 3 食品での室内性能評価から得られた真度は 100-110%の範囲にあるが、シロップで得られた真度が最も 100%に近い値であった。併行精度及び室内精度は RSD として 10%以下であり、シロップが清涼飲料水及びしょう油に比較して小さい値であった。結果として、真度及び精度において、シロップから得られた結果が他の 2 食品よりも良好であった。使用基準のない 2 食品では、真度が 100%より小さく、高濃度添加での真度が 100%以上であることと差が見られる結果となった。精度は使用基準のある食品と同程度であった。また、エステルの種類による真度及び精度の違いは認められなかった。

金属分析法の性能目標値を適用するならば、得られた結果は全て目標値を満足していた。

平成 20 年度の本研究では、清涼飲料水中のパラオキシ安息香酸ブチルの技能試験データから真度、併行精度、室間精度を推定している。添加濃度は 0.02 g/kg で、今年度の室内性能評価結果と同じであった。溶媒抽出法を採用した 35 機関の結果から推定した併行精度は 1.2%で室内性

能評価から推定した併行精度より小さい値となった。室間精度は 5.4%で室内性能評価から推定した値とほぼ同じであった。

ソルビン酸

ソルビン酸使用基準のあるケチャップ、シロップ、練り製品については、添加濃度を 0.5-2 g/kg として、室内性能評価を実施した。この結果から得られた真度は 89.8%-96.2%の範囲であった。併行精度は 0.6-1.3%、室内精度は 0.9-2.6%であった。使用基準の無い清涼飲料水、しょう油、チョコレートでは添加濃度を 0.005 g/kg とし、使用基準のある食品と比較して 1/100 以下であったが、真度 (93.9-101.9%) はほぼ同等であった。室内精度は清涼飲料水は 2.2%で高濃度添加の結果 (0.9-2.6%) と同等であったが、しょう油では 7.4%、チョコレートで 11.3%となり、高濃度添加の結果よりも変動が大きかった。

金属分析法の性能目標値を適用するならば、ケチャップ、シロップ、練り製品の真度の目標値は 90-110%、併行精度は 10%以下、室内精度 15%以下である。今回の評価結果は、ほぼこの基準を満たしているが、練り製品で真度が僅かに 90%を下回った。一方、添加濃度を 0.005 g/kg とした 3 食品では、真度の目標値は 80-110%、併行精度 10%以下、室内精度 15%以下である。今回の室内評価結果は目標値を満たしていた。

サッカリンナトリウム

サッカリンナトリウム使用基準のあるしょう油、清涼飲料水、シロップ、ソースについては、添加濃度を 0.3-0.5 g/kg として、室内性能評価を実施した。この結果から得られた真度は 96.6%-100.1%の範囲であった。併行精度は 0.5-2.9%、

室内精度は 2.1-2.9%であった。使用基準の無い果実酒及び乾燥梅では添加濃度を 0.01 g/kg とした。果実酒では真度 94.0%であったが、乾燥梅では 69.3%で、非常に低い真度であった。乾燥梅では食品マトリクス由来の大きなピークの裾にサッカリンのピークが出現するため、正確な定量ができなかった可能性がある。乾燥梅の併行精度は 4.1%で他の食品に比較してやや大きかったが、室内精度は果実酒 7.8%、乾燥梅 6.1%で高濃度添加の結果よりも大きい結果となった。

金属分析法の性能目標値を適用するならば、しょう油、清涼飲料水、シロップ、ソースの真度の目標値は 90-110%、併行精度は 10%以下、室内精度 15%以下である。今回の評価結果は、この基準を満たしていた。果実酒及び乾燥梅の添加濃度での真度の目標値は 80-110%であり、乾燥梅の結果はこれに適合しなかった。

サッカリンナトリウム濃度 0.06-0.5 g/kg の範囲で技能試験が実施されている。これらの結果の併行精度は 0.84-0.87%、室間精度は 3.9-5.4%の範囲であった。室内性能評価結果と比較して、技能試験結果の併行精度がやや小さく、室間精度は室内精度よりやや大きい結果となった。

亜硝酸ナトリウム

亜硝酸ナトリウム使用基準のあるソーセージに 0.05 g/kg を添加し、室内性能評価を実施した。この結果から得られた真度は 94.7%、併行精度及び室内精度はそれぞれ 1.6%及び 4.6%であった。

使用基準の無い筋子及び乾燥マグロでは、添加濃度を 0.002 g/kg として評価したところ吸光度が得られなかったため、添加濃度を 0.005 g/kg とした。筋子では 84.3%の真度が得られたが、乾燥マグロ

では 24.2%であった。乾燥マグロ真度は一方の施設で 32%であったが他方の施設では 16%であり、施設間で大きな差が見られた。筋子の併行精度は 1.1%、室内精度は 6.2%であったが、乾燥マグロでは併行精度 6.7%、室内精度は 38.1%で、非常に大きな室内精度となった。

金属分析法の性能目標値を適用するならば、ソーセージの真度の目標値は 90-110%、併行精度は 10%以下、室内精度 15%以下である。今回の評価結果はこの基準を満たしていた。一方、筋子及び乾燥マグロの添加濃度 0.005 g/kg での真度の目標値は 80-110%であり、筋子では目標値に適合したが乾燥マグロの結果はこれに適合しなかった。また、乾燥マグロの結果は室内精度においても目標値を満たしていなかった。

不確かさの推定

室内精度はその試験室が実施した分析結果の不確かさの指標となる。室内精度から推定した不確かさを Table 8 に示す。今回取り上げた 5 種類の食品添加物では、食品中に使用基準レベルで存在する場合、分析の真度は 90-110%の範囲であったため補正の必要はないと考えられた。安息香酸、ソルビン酸、サッカリンナトリウム、亜硝酸ナトリウムを使用基準で使用した食品の場合、その分析値の拡張不確かさは分析値±10%と推定された。パラオキシ安息香酸ナトリウムでは、しょう油で全てのエステル室内精度が 5%を超え、清涼飲料水でもエステルの種類によって 5%を超える物が認められたので、拡張不確かさは分析値±20%と推定された。食品添加物が使用基準に従って使用されていることを判断するための分析においては、妥当な不確かさのレベルと考