

201033010A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡 英明

平成 23 (2011) 年 6 月

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松岡 英明

平成23 (2011) 年 6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
【添付資料1】	
微生物試験法における測定不確かさ推定に関する課題と展望	8
【添付資料2】	
「測定不確かさ」関連論文リスト	27
松岡英明	
2. 理化学的試験法の不確かさの推定	29
松田りえ子	
3. 生化学的試験法の不確かさの推定	43
渡邊敬浩	
4. 微生物学的試験法の不確かさの推定	71
工藤由起子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	99

平成 22 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

国際的に、食品分析における不確かさ推定が要請されている。本研究は、この要請に応えるために、理化学、生化学、微生物学の各分野における具体的な試験法に即して、不確かさの推定法に関する実験研究、及び調査研究を目的として実施された。理化学では、吸光度法によるシアン化合物、鉛の分析などにおいて、検量線の存在範囲の正しい予想、その検量線による濃度逆推定に伴う不確かさを推定した。生化学では、アレルギー誘発物質の定量分析における抽出時間の違い、使用するキットの種類の違い、を比較するなど、不確かさの要因を比較分析した。微生物では、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、2009～2010 年度に発表された関連論文の解析と共に、実験研究と調査研究の成果を融合するためのシンポジウム等を行った。その結果、食品分析分野と統計学分野との連携を深め、混沌としていた不確かさ推定の問題を整理した。以上により、将来ガイドライン等を提示するための基礎資料を多数蓄積した。

A. 研究目的

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、生化学、微生物学の各分野における具体的な試験法に即して、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基礎資料を作成する。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

理化学では、全ての理化学分析の共通ステップである、検量線による濃度推定に伴う不確かさの評価を取り上げ、全体の不確かさへの寄与、検量線に伴う不確かさの軽減について考察した。吸光度法によるシアン化合物の分析、ICP-MS 法による鉛の分析、などにおいて得られた検量線範囲を、各濃度において推定された分散から信頼区間を求める方法で推定した 95%信頼区間幅と比較した。

生化学では、ELISA 法（2つの異なるキット A と B を比較）によるアレルギー誘発物質の定量分析における不確かさの推定と寄与要因の検討を行った。

①畜肉ソーセージ(卵、牛乳由来のタンパク質を一定量添加したモデル加工食品)、②認証値付き標準試料(パスタ基材に卵および牛乳を含む)、③検量線作成用標準タンパク質溶液(キットA、及びキットB付属標準溶液)を、分析対象として、抽出時間を変化させた場合の、検量線のRSD%を求め比較した。

微生物では、昨年度同様、「単一試験所の繰返し試験データに基づく不確かさの推定」手法を用いて、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。一日2名が同一資料について試験し、これを10日間実施した。

調査研究では、2009～2010年度に発表された関連論文の解析と共に、実験研究と調査研究の成果を融合するためのシンポジウム等を行った。

C. 研究結果の総括

理化学では、シアン分析を、大豆、小豆、エンドウ、ソラマメ、落花生について1日2併行分析で5日間実施した結果、不確かさは1.7～6.0RSD(%)の範囲であり、検量線による不確かさは1RSD%程度であった。この検量線範囲は、推定された95%信頼区間幅とほぼ一致した。

生化学では、初めに試料③を用いてキットA、BそれぞれのRSD%を求めたところ、キットAでは2.3～3.3、キットBでは3.1～8.0であった。次に試料①、②を用いて、抽出時間を5h、15h、25hと変えた場合、例えば、キットAの牛乳用では、①4.3～5.4%、②7.8%、卵用では①14.2～19.7%、②2.9%、であ

った。キットBでは、いずれの場合もキットAの値より大きかった。すなわち、キットによって不確かさが大きく異なることが示された。

微生物では、一般細菌数の測定の不確かさはH21年度の推定結果とほぼ同等の数値であった。混釈平板培養法による大腸菌群数の測定の不確かさは一般細菌数の不確かさの約3倍の大きさ、最確数(MNP)法では約4倍の大きさであった。

調査研究では、MNP法における不確かさ推定するためのExcel計算表(2010)、養鶏廃棄物洗浄水中の微生物汚染測定における不確かさ(2010)、プレートカウントにおいてコロニー30以下は除外するという経験則の妥当性の実験的確認(2009)などの論文内容を分析した。また、その結果を踏まえて、コロニーの定義、サンプリング、生菌標準物質、などを重要課題として専門調査委員、アドバイザー等で重点的に討論した。さらに、AOACI日本セクションシンポジウム(2010「食品分析における不確かさの統計学」、2010「食品分析におけるサンプリングとリスク評価の諸問題」)、統計関連連合大会での連携シンポジウム「食品の安全性」、などによって食品分析分野と統計学分野との連携を深めた。以上により、混沌としていた不確かさ推定の問題の見通しが良くなった。

D. 結論

不確かさ推定に関しては、オールマイティのプロトコールはない。分析法の種類に応じて合理的な推定法を考えることが必

要である。したがって、学術論文等で発表された事例研究を継続調査することが重要である。一方、国際的関連機関との継続的情報交換が戦略的に重要である。また、不確かさの要因分析が基本となるので、これに基づく研究課題の提言、企画、実施が必要である。さらに、その成果を国際会議や国際的学術誌で発信していくことも不可欠である。本研究では以上の観点から多くの具体的成果を挙げた。

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。

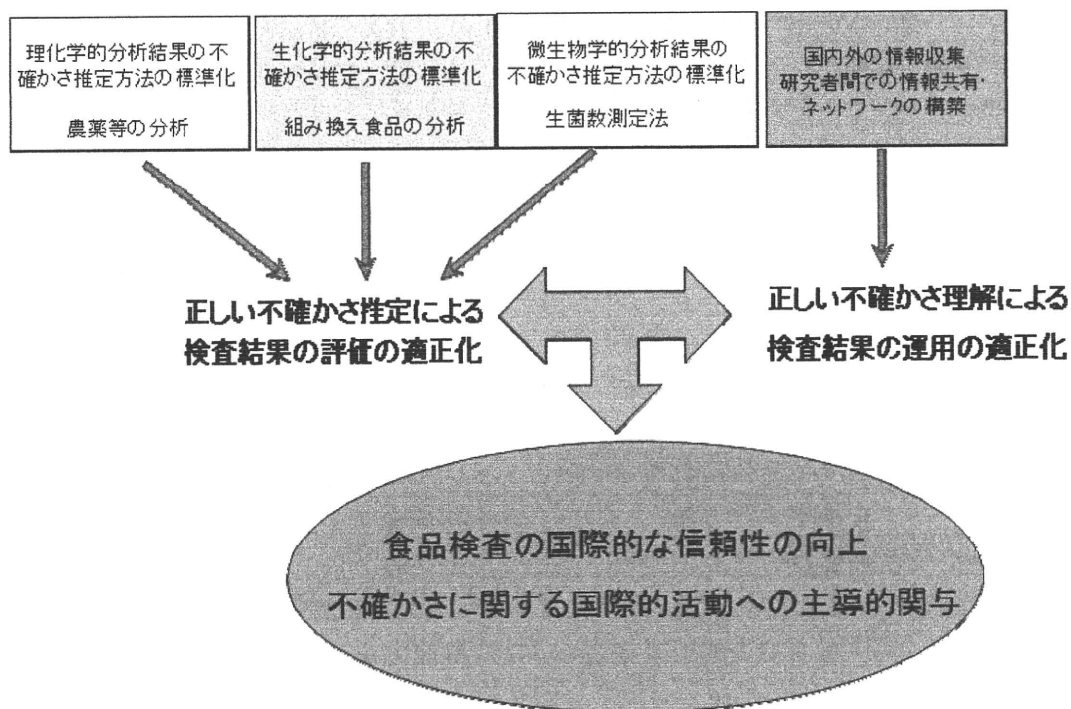


図 1-1 研究の構成と目標

平成 22 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

分担研究者 松岡英明 東京農工大学 大学院工学研究院 教授

研究要旨

統計学の専門家 3 名を加えた専門調査委員会によって、食品分析法における測定不確かさの推定に関する最新の論文内容、およびメソッドバリデーションを実施する国際機関の動向について調査した。特に、微生物試験の場合の事例に焦点を絞った。その結果、コロニーの定義、サンプリング、生菌標準物質、などが最重要課題であると結論された。これらの課題を中心として、「食品分析における不確かさの統計学」（AOACIJS2010 シンポジウム）、「食品の安全性」（統計関連連合大会 2010）、「食品分析におけるサンプリングとリスク評価の諸問題」（AOACIJS2011 シンポジウム）等、食品分析分野と統計学分野との連携シンポジウムを実施した。その結果、微生物試験における測定不確かさの推定に関する諸課題が整理された。これは、今後ガイドラインを作成していくための有用な基礎資料となる。

A. 研究目的

食品分析においては、国際的に、「測定不確かさ」の推定が要請されている。しかし食品分析はその分析対象によってプロトコールが全く異なるため、具体的数値として「測定不確かさ」を推定する方法について、関係者の間でも理解が一致していない。特に、微生物試験についての議論が遅れていると判断された。そこで、調査研究の重点を微生物試験における不確かさの推定におくこととした。

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、平成 20-21 年度に文献調査、関連国際組織（AOAC、ISO、Codex、JIS など）の活動状況調査を実施した。その結果、離散量（菌数）の扱い、外れ値検定、ロバスト法、生菌標準物質などが重点項目

として抽出された。本年度は、引き続き文献調査、関連国際組織の動向調査を実施するとともに、食品分野と統計学分野との連携シンポジウムを実施することとした。

本研究は、以上により、今後ガイドラインを作成していくための基礎資料を得ることを目的として実施された。

B. 研究方法

1. 専門調査委員会(表 2-1)による討論

平成 21 年度後半から平成 22 年度に新たに発表された文献について調査研究を継続した。年度途中から、新たに 2 名の委員に専門調査委員としてご参加いただいた。食品分野と統計分野との連携シンポジウムを経て、平成 22 年 10 月 12 日の委員会で総合討論し、その後はメール会議にて研究成果を集約した。

表 2-1. 専門調査委員・アドバイザー

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
後藤哲夫	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	日本製薬	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
荒木恵美子	東海大学	AOAC、ISO・理化学分析
森 暲子	日本適合性認定書協会	AOAC、ISO・微生物分析
橋 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

2. 調査した主要論文

今年度、新たに調査した、測定不確かさに関する研究論文 15 件のリストを【添付資料 2】に示す。2010-2009 年の論文 9 件、2008-2007 の論文 6 件である。以下は 2010-2009 年の論文の中の主要なものについての内容に関するメモである。より詳しい説明は【添付資料 1】を参照されたい。

- ① P. Van Eenoo, et al.: Estimating measurement uncertainty in quantitative methods not based on chromatography for doping control purposes. *Drug Test Anal.* 2:19-23 (2010).
(ドーピングの問題に関わる、血液成分やヒト成長ホルモンの分析で、標準物質を用いた測定不確かさの推定事例。分析法は蛍光フローサイトメトリー、免疫分析法で、化学分析の範疇の内容。)
- ② B. Jarvis, et al.: Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1660-1667 (2010).
(ISO の方針に従って MPN 法における測定不確かさを推定するための便利な Excel 計算表を提示)
- ③ M.S. Williams, et al.: Estimating removal rates of bacteria from poultry carcasses

using two whole-carcass rinse volumes. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 140-146 (2010).

(養鶏廃棄物の洗浄水中の微生物汚染レベルを測定する際に、洗浄液の量を変えた場合の測定不確かさの比較)

- ④ V.R. Dereani, et al.: Validation of measurement uncertainty estimation in food microbiology: Differences between quantitative and qualitative methods. *Mljekarstvo* 60, 207-213 (2010)

(クロアチアにおける食品微生物試験所の認定と品質保証、微生物分析法(定性分析、定量分析)のバリデーションにおける測定不確かさの推定)

- ⑤ A. K. Guber, et al.: Uncertainty evaluation of coliform bacteria removal from vegetated filter strip under overland flow condition. *J. Environ. Qual.* 38, 1636-1644 (2009)..

(大腸菌群除菌効果の評価における不確かさ)

- ⑥ L.I. Forster: Conclusions on measurement uncertainty in microbiology. *J. AOAC Int.* 92, 312-319 (2009).

(プレートカウントにおいて、30 以下は除外する、という経験則の妥当性を実験的に確認)

- ⑦ S.E. Robinson, et al.: Quantifying within- and between-animal variation and uncertainty associated with counts of *Escherichia coli* O157 occurring in naturally infected cattle faeces. *J. R. Soc. Interface* 6, 169-177 (2009).

(ウシの便中の大腸菌 O157 の個体内、および個体間変動の定量化と測定不確かさの推定)

3. 国内外関連研究グループとの連携

シンポジウムの企画に際して、AOAC インターナショナル日本セクション、統計関連学会と連携した。また、ISO TC69 (統計学的方法の適用)/SC6 (測定方法と測定値) 国内委員会に、本研究グループがオブザーバーとして参加した。

C. 研究結果及び考察

1. 文献調査結果

別途まとめ、【添付資料1】とした。

2. 国内外関連研究グループとの連携企画シンポジウム

(1) 「食品分析における不確かさの統計学」、AOACI 日本セクション 2010 シンポジウム、東京 (2010/6/5)

食品分析の不確かさの推定を始め、分析結果の評価に関わる過程で、様々の統計解析の方法論に遭遇する。しかし、その理論的背景やパラメータの根拠などについての理解が十分ではないために、実際の利用に際して戸惑うことが多い。そこで、そうした問題点に対する率直な議論を継続的に行うためには、食品分析の専門家と統計学の専門家との緊密な連携を構築することが重要と考えられる。本シンポジウムに企画はそのキックオフである。依頼講演によるキーノートスピーチの他、公募による、化学分析、生化学分析、機器分析、微生物分析などのケーススタディに関するショートプレゼンテーションのセッションも設けた。その結果、食品分析における統計学の問題の具体的な討論がなされた。特に測定不確かさの概念についての共通認識が再確認されたことは大きな成果である。

(2) 「食品分析におけるサンプリングとリスク評価の諸問題」 AOACI 日本セクション 2011 シンポジウム、東京 (2011/6/4)

不確かさの推定においては、分析・測定のプロセスのステップごとに不確かさを推定し、それを積み上げていく方法が基本で、ボトムアップ法という。サンプリングは、不確かさの要因の大きなステップの一つで、必ずリストアップされる。しかし、そのステップの不確かさを具体的に推定することは難しく、例えば ISO 方式では、分析法全体の不確かさ推定に際しては考慮しないとする。そこで、サンプリングにおける、試料の採取法とその統計的評価について、テーマの一つに取り上げた。その結果、サンプリングプランの具体的方法とその統計的評価法に関する問題点が整理された。

D. 結論

【添付資料1】で詳しく論述した結果、次のような結論を得た。

- ① 「測定不確かさ」と表記されても、それが意味する内容は同じとは限らない。
- ② 「測定不確かさ」はその推定の目的によって、具体的な方法が異なる。
- ③ 「測定不確かさ」は、その具体的な値を必要とする状況の緊急度に応じて、その趣旨に合った推定法で実施することが必要である。
- ④ 「測定不確かさ」を議論する対象となる分析法や試験法は、バリデーションされていること、あるいはバリデーションするに足る方法であることを前提としている。
- ⑤ 多くの場合、トップダウン法に頼らざるを得ないので、そのために必要となる標準物質、あるいは標準法は不可欠である。

この中で、⑤に関する技術的課題の克服

が今後の最重要事項である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

○著書・総説等

- ・後藤哲久、安井明美、五十君静信、松岡英明：妥当性確認の要求事項，“最新版—食品分析法の妥当性確認ハンドブック”（安井明美、五十君静信、後藤哲久、丹野憲二、湯川剛一郎、編）第2章1-I節、サイエンスフォーラム（2010）pp10-27.
- ・松岡英明：微生物試験法の妥当性確認と不確かさの推定。同上、第7章1節、サイエンスフォーラム（2010）pp223-231.

○シンポジウム等での講演

- ・松岡英明“微生物試験の妥当性確認の進め方と不確かさの推定”、食品産業戦略

研究所主催セミナー、東京、（2011年3月10日）

- ・松岡英明“食品微生物試験法のバリデーションの国際動向”、第77回化学センサ研究会、東京、（2011年1月21日）
- ・松岡英明“微生物試験法における培養法と非培養法の相互補間”、日本防菌防黴学会学術講演会2010、西宮（2010年5月26日）
- シンポジウム企画
 - ・「食品分析における不確かさの統計学」、AOACI日本セクション2010シンポジウム、東京（2010/6/5）
 - ・「食品の安全性」、統計関連連合大会、東京（2010/9/7）
 - ・「食品分析におけるサンプリングとリスク評価の諸問題」AOACI日本セクション2011シンポジウム、東京（2011/6/4）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【添付資料1】微生物試験法における測定不確かさ推定に関する課題と展望

1. はじめに

測定不確かさの表現についての国際的合意を目指し、国際度量衡局をはじめとする7機関の共同編集による国際文書 GUM¹⁾が発行されたのは1993年である。それに伴い、食品分析においても分析結果には測定不確かさを付記することが要請されるようになった。GUMはその後、改訂を経て2008年 ISO/IEC Guide 98-3の発行に至っている²⁾。この間、ISO以外の国際機関でも測定不確かさについて様々な対応がなされてきたが、それについては次節にまとめた。結論から言えば、ISOの考え方が基本になっている。基本的な概念は、①測定・分析における「真値」概念を排除し、そこから派生する「かたより（バイアス）」という概念を全て測定不確かさという分散成分に置き換える、②その測定不確かさを評価するために、測定・分析のプロセスを明示することを要求する、③統計的実験に基づかない、「エキスパート・オピニオン」による主観的評価を導入する、などである。しかし、②にしたがって分析の各段階での測定不確かさを推定し、それを積み上げても、全体の測定不確かさになるとは限らず、また、測定不確かさを見積もることが難しい段階があれば、積み上げること自体が不可能である。このように理論的には判断できない要素があることを前提としており、そのためにエキスパート・オピニオンを導入する発想は、理解はできるが実務的には極めて厄介なことである。すなわち、分析者が分析結果に対して、自らの判断で「適切に」測定不確かさを推定しなくてはならない場合があるからである。分析結果が基準値に対する合否判定に直結し、それが裁判、医学、安全、交易上の問題に直接影響を及ぼす場合は、その「適切さ」の如何が問われることになる。やはり、実用的には一定程度のガイドラインが必要であると考えられる。本研究は、以上のような背景の下に、特に、複雑な要因を抱える微生物試験について、適切な推定法のガイドライン作成のための基礎資料を得ることを目的として実施された。

2. 関連国際機関の対応

(1) APLAC

APLAC (Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation) は試験所認定に関する国際機関で、技術文書 APLAC TC (Technical Committee)を発行している。APLAC TC 005 (No.1): Interpretation and Guidance on the Estimation of Uncertainty of Measurement in Testing (03/2003)で測定不確かさを扱っている。元来、試験所は ISO/IEC 17025 の要求事項を満足しなければならないので、測定不確かさに関しては、ISO/IEC 17025 内の該当する 5.4.6 節、および 5.10.3.1 c)節の実行が要求される。本文書は、そのための解説と手引きである。対象は、物理・機械試験、建築材料試験、電気試験、化学試験、そして微生物試験となっている。測定不確かさの評価結果は信頼水準 95% で報告すべきであるとしているが、包含係数 2 を無差別に使うことは推奨されない、としている。この、包含係数をいくりにするかについては、他機関でも同様に議論されており、特別のことではない。むしろ、注目すべきことは、微生物試験の項で、

7.10 At present, microbiological laboratories often do not have to report uncertainty unless required by customers or unless the interpretation of results may be compromised without it. When reporting uncertainty, a description of the procedure used to estimate the uncertainty should also be included

because of the various methods used around the world that give different results.

と明記されていることである。微生物試験ではいろいろな試験法が実施されていて、それらの不確かさを明示することは（難しいので）、依頼者から特別の要求がなければ、報告しなくてもよい、という内容である。実際には、特別の要求が無いわけではないと思うので、担当者は、具体的に対応しなければならないと思われるが、この手引書には、そのような場合に参考すべき具体的な手順は記されていない。なお、これは2003年に発行されたNo.1の記述であるが、この項も含めて、微生物試験の項は、2010年9月発行のNo.4でも同じままである。微生物試験における測定不確かさの扱いが厄介であることを如実に物語っている。

(2) EURACHEM/CITAC

EURACHEM は1989年に設立された機関で、欧州における分析化学に関する技術情報や政策課題などについて協議している。一方、CITAC (Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry) は1993年に設立された機関で、世界規模の化学分析におけるトレーサビリティの改善を目的としており、EURACHEMと共同で、トレーサビリティ、不確かさ、品質保証等に関して、ガイドや学術論文を作成している。測定不確かさに関しては次のようなガイドを発行している。

- 1) EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (2nd ed.). A. Williams, S. L. R. Ellison, M. Roesslein (eds.) (2000)
- 2) EURACHEM/EUROLAB/CITAC/NORDTEST Guide: Estimation of Measurement Uncertainty arising from Sampling. (2007)
- 3) EURACHEM/CITAC Guide: Use of Uncertainty Information in Compliance Assessment (1st ed.). S. L. R. Ellison, A. Williams (eds.) (2007)

これらの文書の中で注目すべき内容は、例えば、分析結果で合否判定をする際に、基準値よりも高めでも、「基準値+監視帯(guard band)」を超えていなければ合格とする、という考え方が示されている点である。そして、この場合の「監視帯」として、測定不確かさを基準にした考え方が複数提示されている。ただし、基準とすべき測定不確かさが推定できることが前提になっていて、その何倍を「監視帯」にするか、という議論であるので、測定不確かさ自体の求め方に苦慮する試験法の場合は、その先の議論が難しい。因みに、この機関は化学分野を対象としているので、微生物試験についての言及はない。

(3) NMKL/NordVal

NMKL (Nordic Committee on Food Analysis) は北欧諸国（デンマーク、フィンランド、アイスランド、ノルウェー、スウェーデン）の食品分析の専門家からなる共同機構で1947年に設立された。北欧諸国における公共および民間の食品管理試験所で使用される方法と手順を調和させることを目標としている。食品のサンプリング、検査、分析法のバリデーション、などに関する事項を扱っている。情報交換と分析法の承認に関して AOAC INTERNATIONAL および IDF と協力協定を結んでいる。また NordVal (Nordic System for Validation of Alternative Microbiological Methods) とも協力協定を結んでいる。その NordVal とは、微生物試験法の代替法のバリデーションを実施する組織である。不確かさの推定に関しては、NMKL Procedure No. 8, Version 4: Measurement of uncertainty in quantitative

microbiological examination of foods. (09/2008) に示されているが、ISO の場合と同じように、室内再現精度によって求めた標準偏差を不確かさ U の基準にすること、また、拡張不確かさとして 2U を採用することとしている。

(4) CEN/MicroVal と AFNOR

CEN (European Committee for Standardization) の下に組織された、微生物試験法の代替法のバリデーションを実施する組織が MicroVal であり、当初は食品と飲料を対象としていた。2010 に、MicroVal Rules and Certification Scheme. (Version 6) (06/2010) を発行しているが、ISO 16140 に準拠した内容になっている。

一方、AFNOR (Association Francaise de Normalisation) はフランスに拠点を置く、多くの分野の標準化に関する事業を行っている機関で、食品分析はその一分野。微生物試験法の代替法のバリデーションは ISO 16140 に準拠した内容となっている。MicroVal も AFNOR も単独では測定不確かさに関する文書を出してはいないようである。

(5) AOAC INTERNATIONAL

AOAC INTERNATIONAL には全ての試験法に対して共通に関係する統計委員会があつて、そのキーメンバーである McClure らによって、測定不確かさに関する論文が J. AOAC Int. 91, 660-670, 2008. に発表された。その内容は、微生物試験を対象にした内容というわけではないが、AOAC としての独自の考え方が主張されているかと推察し、統計学の専門家である椿広計氏 (専門調査委員会のアドバイザー) に解釈を依頼した。その結果、併行標準偏差、再現標準偏差を併行不確かさ、再現不確かさと呼び、その期待値、分散を標準的な一元配置変量モデルの下で評価し、不偏推定量などを導いたものであるが、それらの性質は概ね既往の知見であり、その性質を特定の分野において再確認したものに過ぎない。したがって、統計的観点での新規性のあるものではない、との判断であった。AOAC としては、その後も、特に測定不確かさに関して単独で先導的な文書を発表するには至っていない。

(6) Codex

Codex (Codex Alimentarius) はサンプリングから出発して食品分析全般に関わる事項を扱っている。測定不確かさに関しては、CAC/GL 54-2004: 測定の不確かさに関するガイドライン、を作成した。特に CCPR (Codex Committee on Pesticide Residues) は、農薬分析に関するガイド Specific Guidelines for Pesticide Residue Analysis を作成した。基本的考え方は ISO に準拠しており、トップダウン法で標準偏差を求める手順となっている。

(7) ISO TC 69 「統計的方法の適用」 SC6

上述の他の機関の動向から、ISO の活動が中心的役割をしているとの印象を受ける。ISO 文書の種類は多いが、ここでは、特に統計的方法について ISO TC64 SC6 によってまとめられ、それらの全てが対応する JIS となっている一連の規格を示しておく。これらは、分野を問わず広く利用されている。この中で、JIS Z 8402-1~6; 1999~2002 (ISO 5725-1~6; 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 は、次

の6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、菌計数におけるポアソン分布あるいは逆二項分布、などに関する記述がある。

JIS Z 8402-1 (ISO 5725-1)「測定方法及び・・・」—第1部：一般的な原理及び定義

JIS Z 8402-2 (ISO 5725-2)「測定方法及び・・・」—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

JIS Z 8402-3 (ISO 5725-3)「測定方法及び・・・」—第3部：標準測定方法の中間精度

JIS Z 8402-4 (ISO 5725-4)「測定方法及び・・・」—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

JIS Z 8402-5 (ISO 5725-5)「測定方法及び・・・」—第5部：標準測定法の精度を求めるための代替法

JIS Z 8402-6 (ISO 5725-6)「測定方法及び・・・」—第6部：精確さに関する値の実用的な使い方

JIS Z 8404-1 (ISO/TS 21748:2004)「測定の不確かさ」—第1部：測定の不確かさの推定における併行精度、再現精度及び真度の推定値の利用の指針

JIS Z 8404-2 (ISO/TS 21749:2004)「測定の不確かさ」—第2部：測定の不確かさの評価における繰返し測定及び枝分かれ実験の利用の指針

3. 測定不確かさの意味

測定不確かさは、その趣旨を考えれば、「分析法自体の性能の一つ」とみるべきであるが、「分析結果に付随したバラツキを特徴づけるパラメータ」という元々のGUMの表現からは、その本質が伝わってこない。むしろ、分析結果に対して、例えばその標準偏差を基準とする測定不確かさが示された場合、その個別的分析結果が、それだけバラツキてしまった、という意味か、その分析法を採用した場合は、何時でもこのくらいはバラツキてしまう、という意味かで全くニュアンスが異なる。言うまでもなく、後者が本来の趣旨であるが、前者のように理解され、それが実務上の混乱の一因になっているのではないかと考えられる。「分析法の性能の一つ」という理解にたてば、その測定不確かさを推定する方針は極めて明確である。具体的には、分析の各段階での条件を意識的に変えた場合に、最大どの程度結果がバラツクか、という観点で性能を調べることになる。ISOが、測定不確かさの推定値として、分析条件を意識的に変えることが容易な単一試験室内試験で、室内再現精度 (Intermediate Precision) を求め、その標準偏差をもって、測定不確かさの第一優先としている (ISO/TS 19036)^{3), 4)} ことは、そのような考え方であることを裏付ける。

分析結果のバラツキの最大振れ幅を見積もっておくことは、その分析法の堅牢性を評価する上で重要であるが、逆に、その分析法を出来るだけ注意深く実施した場合は、どのくらいバラツキを小さくできるかを確認しておくことも、実用上重要である。その場合は、実質的に「試験法のバリデーション (妥当性確認)」と考え方も、実際の評価手順も同じである。具体例を挙げる。分析対象は微生物ではなく、ドーピング検査の対象となる血液試料の多成分である⁵⁾ (以下の第7.1節で、改めて解説する)。ドーピング検査において被験者のサンプルを分析した結果、違反の有無を判定しなければならない場合の例である。この場合の測定不確かさとして、その場で多くの被験者集団を分析した結果に基づいて算出した標準偏差を基準にするわけにはいかない。そうではなく、標準物質の分析を日常的に実施し、その蓄積されたデータに基づいて得られた変動幅を、この分析法自体の性能の一つとし

て、適用する。実際、その基になるデータは3年間で蓄積した約3300データを基にしていた。さらに、その値は装置性能の経年変化や分析者の技量の変動などにもよるので、絶えず更新すべきものとされている。

一方、微生物試験では標準物質が得難いので、通常は標準法、あるいは参照法に対して比較試験を行うが、その結果得られた相関係数などから、試験法の性能を議論することになる。その場合も、例えば直線回帰であれば直線の傾きや切片の値の標準偏差を算出することができて、それを測定不確かさの推定値とすることができる。そして、この場合も、分析値の変動幅が最大でもどの程度に収まるか、という立場と、最適条件を厳密に規定すればどの程度小さく抑えることができるか、という立場があって、測定不確かさの推定法としては何れの場合もある。しかし、妥当性確認が目的であれば、言うまでもなく後者の立場になる。

4. 微生物試験の目的と測定不確かさの推定

微生物試験は目的が異なれば実施条件も要求される結果の内容も異なる。したがって、測定不確かさの推定といっても、試験の目的によって考慮しなければならない内容や境界条件が異なる。例えば次のようなケースが考えられる。

(1) 複数のロットの製品で、各ロットの中に、標的菌が基準値以上いるかいないかを試験して合否を判定しなければならない場合

大きな量のロットから、通常25g程度の単位の試験試料(test portions)を調製しなければならない。試験試料は、次の段階では、基準値(m)以下かどうか、という観点での試験を行う。基準値が0の場合は菌が検出されるか否か、という定性試験になるが、基準値として幅をもたせる判定基準(サンプリングプランにおける3階級法のように、m以上であってもM以下であれば許容する場合がある)の場合であれば、定量試験になる。この場合の測定不確かさは、次のように考えることができる。

①大きなロットから、限られた量の試料を、限られた部分からn個分取した場合に、そのn個の分析値が、元のロット全体の代表値としてどの程度妥当か、という観点での測定不確かさ。

②n個の試験試料について、定性試験をした結果の測定不確かさ。

③n個の試験試料について、定量試験をした結果の測定不確かさ。

この中で、①はサンプリング固有の問題であり、②と③は試験法固有の問題である。①については、ロットの中の菌の分布を、例えばポアソン分布と仮定して、n、c(基準値を超えた試料の数)の値から合格確率を見積もる。それによって分析結果に統計的な確率の概念が付与される。一方、②、③については、実際に用いた試験法に対する測定不確かさの推定であり、次の(2)の場合と同様である。

(2) 試験試料を出発点とする定性試験、あるいは定量試験の場合

特定の菌の検出、あるいは菌数の計測を目的として実施される試験で、依頼試験などが該当する。試料の数は決まっているわけではなく、依頼条件によって異なる。したがって、その依頼試験のみから測定不確かさの議論はできない。採用された試験法自体の性能として、別途、測定不確かさを推定しておく必要がある。

(3) 試験法の測定不確かさを推定する場合

通常、測定不確かさの議論をするときは、この場合を想定している。定量試験の場合も定性試験の場合もあるが、定性試験に対する推定法は国際的に合意されるまでには至っていない。試験を構成する手順の各段階、例えば、試料の前処理、培地の調製、コロニー計数、などに対して、測定不確かさの要因分析や測定不確かさの大きさの見積もりがなされている。要因分析の結果、できるだけ測定不確かさを小さくするために試験操作手順が改訂されたりするが、最終的には、標準法、あるいは参照法と比較試験をした結果に基づいて議論される。すなわち、微生物試験では、今のところ標準物質が得難いので、標準法の結果を真値とみなして、測定不確かさの議論をすることになる。

(4) 真値を考慮せずに試験法の測定不確かさを推定する場合

分析をする者にとって、GUMの中で第一に挙げられた「真値の概念を排除」は、全く理解に苦しむ内容であろう。確かに分析対象によっては、真値の基準とも言うべき標準物質が得難い場合もある。しかし、それは技術的問題である。ところが、測定不確かさの推定の事例として報告された論文には、そうした真値の概念を十分考慮していないものもある。例えば、ForsterがJ. AOAC Int. 86, 1089 (2003)⁶⁾に報告した「浄水中の汚染菌数の定量試験」の結果(平成21年度報告書⁷⁾で引用解説)では、測定された16試料×2繰り返しの試験結果から、形式的に標準偏差を求め、それに基づく不確かさを提示している。しかし、真値については議論されていない。恐らく真値を議論するためには、既知の菌数の添加回収試験が必要になる。

5. 測定不確かさの要因に関する研究動向

微生物試験における測定不確かさについての研究論文は、表題や本文中に「測定不確かさ」という言葉があっても、必ずしも、その内容が共通の理解に基づいているとは限らない。その原因はGUMに示された内容が概念的であり、具体的な作業に翻訳する過程で、色々な解釈が入る余地があったからと思われる。本報告書では、この点を明確にすることが必須である、と考え、本研究代表者の独断ではあるが、上記(第4節)のような場合分けをしてみた。

微生物試験における測定不確かさの要因分析については、Coryらの論文⁸⁾が参考になる。その論文で列挙された事項は、本研究代表者によって整理されている⁹⁾。不確かさの要因には、サンプリング、検体の調製、培地の調製、菌の状態、コロニー計数、などの実験的要因と、統計解析モデル、外れ値検定、MNP法、など統計解析的要因がある。この中で、統計的要因である離散数(菌数)の扱い、外れ値検定、ロバスト法、について調査、議論した結果については、既に平成21年度報告書⁷⁾に記載した。本節では、実験的要因として、サンプリング、コロニー計数、統計解析的要因として、標準偏差と相対標準偏差、統計解析モデル、MNP法、定性試験の測定不確かさ、などに関する研究動向について調査した論文について、関連議論を交えて解説する。

なお、研究論文に関しては、最近1, 2年間に発表された研究論文から選んだが、最近になっても依然として、各論文でいう「測定不確かさ」の内容が、上記の場合分けに照らして、必ずしも同じではない状況が続いている。

5. 1. サンプルングにおける測定不確かさの推定—固体表面からのサンプルングの事例

第4節(1)の場合に相当する。出発点のサンプル採取の段階では、全体を代表した適切なサンプルングを行うことが重要であるが、液体や粉体に比べ、固体試料の場合は、その条件を満たすことがはるかに難しい。具体的方法として推奨されているのは、スワブ法、リンス法であるが、従来は、いずれの場合も定量試験としては扱われず、定性試験あるいは半定量試験としてしか適用されていなかった。

スワブ法の具体的方法として、例えば、米国食鳥食肉製品の HACCP 規則では、次のように規定しているという。牛の屠殺体の場合、表面(10×10cm)3か所を25mlの生理食塩水で拭取り(指定のスポンジがある)、25ml/300cm²とし、その1mlを取ってペトリフィルムで大腸菌数を測定する。得られた値は300/25=12cm²から採取された菌数となるので、これを12で割って、1cm²当たりの菌数として報告する。確かに、具体的な数値で規定しているが、実際に採取する場合は、どの部分をその3か所として選ぶかまでは規定していない。試料を前にして「適当」に選ぶしかない。この場合に対しては、測定不確かさの議論は述べられていない。

一方、リンス法については、リンス液の量を変えた場合の菌回収率の比較事例が報告されている¹⁰⁾。養鶏屠殺体の微生物汚染を測定するために、100mlあるいは400mlのリンス液によって1分間洗浄した。得られたリンス液を一次サンプルとして、その1mlを分取し、その中の菌数をコロニー計数法で定量した。腸内細菌群、大腸菌群、大腸菌、サルモネラ、カンピロバクターについて、各々計測した。100mlのリンス液×5回で5サンプル(これを1セットとする)、400mlのリンス液で5サンプル(これを1セットとする)、これを1日に10回繰り返して合計100mlと400mlで10セットずつ得た。この操作を3日間行い、総計100ml、400mlで30セット(150サンプル)ずつを得た。各サンプルについて1ml×2プレート、あるいは0.25ml×4プレートによってコロニーを計数した。各菌種について陽性率(コロニーが1個でも検出されたサンプルの割合)を調べたところ、リンス条件によらず、腸内細菌群の場合が最も高く、それぞれ106/150=70.7%(100mlリンス液)、149/150=99.3%(400mlリンス液)であった。次に、この腸内細菌群を指標にして、鶏試料からの菌回収率を推定した。元々の鶏試料に存在していた菌の総量は、実際に回収された菌数からシミュレーション(マルコフ連鎖モンテカルロ法)によって推定された。結論として、1分間洗浄の条件でリンス液が100mlの場合と400mlの場合、除菌率 ρ はそれぞれ $\rho_{100}=7\%$ 、 $\rho_{400}=79\%$ であった。また、測定不確かさの基準となる標準偏差は、それぞれ $\sigma_{100}=1.4\%$ 、 $\sigma_{400}=10\%$ であった。測定不確かさを 2σ とすれば、それぞれの場合の95%信頼区間は4.4~9.8%、59~99%で、両者は有意に異なる結果となっている。定性的には当然予想される結果であるが、定量的にはリンス液量と除菌率の関係は単に液量に比例するというような単純な関係ではなかった。すなわちリンス液量が4倍になっただけで、除菌率は11.3倍にまで増加した($\rho_{400}/\rho_{100}=11.3$)。

リンス液の量と回収率の関係に関する、この結論は、実験結果としては理解できる。しかしその具体的内容は、偶々100mlと400mlの条件で行った今回限りの試験結果から算出した標準偏差にすぎない。したがって、この結果のみから本リンス法の性能の一つとしての回収率の変動幅を主張することは難しい。もっと系統的な試験条件で調べた結果が必要であろう。すなわち、ここで用いられている「測定不確かさ」は、「分析法の性能の一つ」という本来の趣旨を誤解し、「当座の分析結果のバラツキ」で良しとしているのではないか、と思われる。

5. 2. コロニー計数

(1) コロニーの定義

コロニーの定義は微生物試験における最も基本的な事項の一つであるが厳密な定義は難しい。微生物試験の一般的な要求事項とガイダンスをまとめたISO 7218:2007¹¹⁾にも記載はなく、またAOACのOMA (18th)¹²⁾の17章 Microbiological Methodsに収められた各試験法にも記載はない。例外的に、ISO 4832:2006¹³⁾の9.3節に大腸菌群に対して、「直径が少なくとも0.5mmの赤紫色のものを典型的な大腸菌群のコロニーとして、それ以上確認する必要はない」という記述がある。ただこの場合も、そのすぐ後に「非典型コロニー（サイズが小さい等）および乳糖以外の糖類を含む乳製品から得られた全てのコロニーも計数し、確認試験をする」という記述が続く。コロニー選択の判断基準として色の記述は多くみられるが、大きさのみでの判断基準は見当たらない。

実用的には、例えば35℃で24時間培養した後、目視で確認できるものをコロニーとして計数する、と規定されているので、厳密な大きさの定義が無くても計数は可能である。しかし、同じプレートを光学的装置で自動計数する場合には、大きさの閾値が設定できなければ計数できない。そこで、適当な大きさを閾値と設定して自動計数するが、最終的には自動計数された結果と人が数えた計数値とが同じになるように、その大きさの閾値を適当に調節せざるを得ない。

一方、迅速法の中には、迅速に結果を得るために、短い培養時間で、顕微鏡観察で確認できる程度の小さなコロニーを計数する場合がある。その計数値が、最終的に通常の培養時間、例えば24時間後に観察されるコロニー数と同じ数になるならば、迅速法は従来法と同等であると判断される。そうした考え方に基づくると、究極的には、単一の生細胞をトレーサブルに計測し続け、それぞれ単一コロニーになっていく過程を捉えることができれば、培養法に則った迅速法になるはずである。しかし、実際には、小さなコロニーのまま、その後の成長が止まってしまう例が少なくない。したがって、迅速法開発の観点からは、このような小さなコロニーをどう扱うか、という問題は極めて重要である。「目視によるコロニー計数」は国際的にも十分合意された方法ではあるが、もうそろそろ「コロニーの定義」について解像度の高い議論をすべき時期ではないだろうか。

(2) コロニーの計数値の上限と下限

プレートカウントにおいて、従来から、コロニー数が多過ぎる場合や、逆に少なすぎる場合はデータに加えないことが推奨されてきた。例えば、AOACのOMA 18thの17章 Microbiological Methodsに収められた試験法の随所に、適切なコロニー計数値は30~300とする記述がある。特に、17.2.06節の Aerobic plate count—Pectin gel methodでは乳製品の場合は25~250、乳製品以外では30~300と分けて規定している。また、ISO 7218では、10.3.1 Counting of coloniesの項に「300未満のものを計数すること」としている。ISO 16140: 2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methodsの6節の定量試験の項にも、300を超えない数、と規定している。こうすることによって、コロニー計数におけるバラツキが低減できるとの経験に基づいていると思われる。しかし、実際にどの程度バラツキのか、についてはCoryらの論文⁶⁾に引用されているように、例えば、同じプレートを5人が計数したら±18%のバラツキがあった、というような事例があるものの、それに基づき、測定不確かさを推定するには至っていない。

この問題についての定量的実験が Forster によって行われた¹³⁾。すなわち、大腸菌群、糞便系大腸菌群、腸内球菌、従属栄養細菌について、コロニー数 3~158 の範囲で、所定のコロニー数（例えば 3~9、6~30、27~43、51~92、など）になるように調整したプレートを、それぞれ 3 人の試験者が 5 回繰り返し計数し、合計 15 の計数値を得た。その結果から平均値 m と標準偏差 SD を求め、相対標準偏差 ($RSD=SD/m$) を算出した。その結果、 RSD は $\log_2 20$ 以上では $RSD < 10\%$ であったが、それ以下では、顕著に大きくなった。その傾向は菌の種類によらず（図 (添 2-1)-1.A~D)、4 群の菌の結果をまとめると、図 (添 2-1)-1.E のようになった。以上の結果より、コロニー計数値 20 よりも多少安全率をみて、計数値 30 以上の場合のみの採用を推奨していることが妥当であると結論している。しかし、計数値 300 以上の場合を除外する根拠については、ここでは特に議論されていない。

5. 3. 標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (変動係数) (RSD)

測定不確かさの基準として、ISO/TS 19036⁴⁾ではSDを用いている。一方、A2LA¹⁵⁾ではRSDを用いている。前者は欧州、後者は米国である。しかし、他の事例をも考慮すると、国によってSDとRSDとを使い分けているという傾向も、また統計的にどちらが妥当かという根拠もないようである。

5. 4. 最確数(MPN)法

ISO の動向を踏まえて、新たに、MPN (Most probable number) 値およびそのパラメータを決めるための新しい概念と実践的なエクセル表計算ソフトが紹介されている。MPN 法は、食品や水を含む多くの試料中の微生物数を推定するために広く用いられている。MPN 法の基本的な前提の第一は、「試料中の微生物はランダムに分布している」ということである。これは各希釈段階で完全に混合され、細胞一つ一つが凝集して固まらないこと、又はもし細胞が凝集している場合は希釈段階数を増やしてもその凝集細胞はバラバラにならないということを意味している。第二の前提は、「培地に接種された微生物は、1 細胞でも発育する」ということである。従来、具体的な数値を求める方法が種々提案されてきたが、複数の国際規格が、それぞれ異なる MPN 法や MPN 計算ソフトを参照していること、また、実際には起こりそうもないような異常な値でも、形式的に数値として算出される場合があること、などの問題点が指摘されていた。

そうした背景の下に、ISO TC34/SC9 内の統計ワーキンググループ (SWG) は、国際規格の見直し作業を行った。その結果、MPN 標準試験法の MPN 表と MPN 計算ソフトの両方を含む ISO7218: 2007 や ISO の微生物規格に関連した全てを改定することを提言した。その提言に応えるべく、Jarvis らは、MPN 計算ソフトを評価し修正した¹⁶⁾。また、「実際には起こりそうもないこと」を合理的に評価するために、「最も起こり得る結果」で実際の結果を割ることによって可能性を示す「まれにしか起こらない確率 (rarity)」の概念¹⁷⁾を導入した。そして、MPN 値の対数の標準偏差を提示することによって測定不確かさの計算を可能にした。Excel 形式の計算ソフトは、次のウェブサイトからダウンロードできる。<http://www.wiwiss.fu-berlin.de/institute/iso/mitarbeiter/wilrich/index.html>

5. 5. 定性試験における測定不確かさ

これまで、定性試験における測定不確かさについては、定まったものがないと思っていたが、Dereani

らの論文にその事例が掲載されている¹⁸⁾。すなわち、クロアチアにおける食品微生物試験所の認定と品質保証、微生物分析法（定性分析、定量分析）のバリデーション、定性試験のための測定不確かさ推定、定量試験における測定不確かさ推定、が紹介されている。

定性試験における測定不確かさとして具体的に、擬陽性と擬陰性の比率(false positive and false negative rates)を提示している。定性試験では、表(添2-1)-1にしたがって、精確さ(Accuracy; AC)、特異性(Specificity; AP)、感度(Sensitivity; SE)を評価する。この結果からそれぞれ、擬陽性率100-SP(%), 擬陰性率100-SE(%)を算出する。SPもSEも値が高いほど信頼性は高い(測定不確かさが小さい)、と理解されるパラメータである。したがって(100-SP)も(100-SE)も、値が小さいほど信頼性は高いことになる。定量分析の場合に標準偏差(SD)が小さいほど信頼性が高い、ということに対応している。このように考えると、測定不確かさとしては(100-SP)+(100-SE)とすべきであると考えられる。しかし、本論文では、何故か「擬陽性/擬陰性の比率」となっている。その考え方は、既に2003年に報告されているCAEALの文書¹⁹⁾に基づいているとのことであるが、その趣旨は理解できない。この辺が、未だ国際的な合意に達していない理由なのかもしれない。

6. 迅速法に関わる試験法における測定不確かさ推定

迅速法には、マイクロコロニー法、細胞成長顕微解析法、非培養法、などがある(表(添2-1)-2)。参照法となっているのは全て培養法であるが、それと非培養法を比較した場合、同一試料でも、生菌数が一致するとは限らない。その原理から予想されるように、培養法の方が少なめになる傾向がある。非培養法の多くは蛍光染色した細胞を顕微計測する原理であるが、例えば、カルボキシフルオレッセイン・ジアセテート(CFDA)で染色すると、この色素は細胞内に自然拡散で入る。細胞が生きていれば、細胞内のエステラーゼ活性によって、CFDA(もともと非蛍光で疎水性の分子)が加水分解されて蛍光分子に変わる。同時に親水性の分子になって細胞内に留まる。こうして蛍光を発する細胞のみが生菌として計数される。ところが、傷害菌も含め、生きていても増殖しにくい種類の菌は多い。その場合はCFDA陽性でもコロニー形成をしないので、顕微蛍光法の結果より培養法の結果の方が菌数は少な目になる。しかし、非培養法と培養法での結果が異なる原因は一様ではない。条件によっては、培養法の方が高めになる場合もある。何れにしろ、迅速法の結果は、同一試料を用いた培養法の結果を参照値として評価しなければならない状況が続いている。

DAPIとPIという2種類の蛍光色素で二重染色すると、生菌と死菌を同時計数することができ、この原理に基づく顕微蛍光画像から迅速に結果を算出する装置が開発されている。種々の条件の試料で、この迅速法の結果と培養法の結果を比較したところ、図(添2-1)-2に示すような結果が得られた。これらの結果は既に2006年にJ. Food Prot.に発表された²⁰⁾ものであるが、測定不確かさ推定の観点から、その結果を見直してみた。既に、最小二乗法で求めた直線 $y=a+bx$ の傾き b と y 切片 a の値、さらに相関係数 r が求められているが、測定不確かさの議論のためには、この a と b の値の標準偏差を求める必要がある。*Escherichia coli*の場合(図(添2-1)-2.A)について具体的計算過程を表(添2-1)-3を参照しながら説明する。

測定点: $(x_i, y_i), i=1\sim 54$

x_i : 培養法による計数値の \log_{10} 、

y_i : 迅速法による計数値の \log_{10} 、