

から最小二乗法で得られた直線の式は $y=0.862+0.582x$ となったが、各測定点が、この直線からどの程度離れて分布しているかを見積もるために、次の残余標準偏差は $S_{y:x}$ を求めた。

$$S_{y:x} = \left[\frac{\sum_{k=1}^N (y_k - Y_k)^2}{N-2} \right]^{1/2}$$

ここで、 y_k は各測定点の y 座標、 Y_k は $x = x_k$ の時の上の直線上の y 座標。計算の結果 $S_{y:x} = 0.345$ となった。この値を用いて、 a および b の標準偏差は、それぞれ次式で与えられる。

$$S_a = S_{y:x} \left[\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{(N-1)V_x} \right]^{1/2}$$

$$S_b = S_{y:x} \left[\frac{1}{(N-1)V_x} \right]^{1/2}$$

ここで、 \bar{x} は x の平均値、 V_x は x の分散で、それぞれ $\bar{x} = 3.58$ 、 $V_x = 0.924$ であった。 $N = 54$ を代入すると、 $S_a = 0.182$ 、 $S_b = 0.049$ となった。

拡張不確かさとして、しばしば $2S$ が採用されているが、ここでは、 t 分布表で両側 5% の t 値を用いることとした。自由度は $N-2=52$ であるから、 t 分布表より $t=2.007$ である。結果的に 2.0 に近い値となる。これから、 $a = 0.862 \pm 2.007 \times 0.182$ 、 $b = 0.582 \pm 2.007 \times 0.049$ となる。範囲で示せば、 $a = 0.497 \sim 1.227$ 、 $b = 0.484 \sim 0.680$ となる。以上の結果は、 $a=0$ 、 $b=1$ の何れも 95% の範囲外にあることを示している。すなわち、95% を基準にすると、この場合の迅速法と培養法は同等とはみなされない、という結論になる。

同様に、図 (添 2-1)-2.B,C 場合について計算した結果、

$$S. \text{ enteritidis: } a=0.386, b=0.879, S_a = 0.212, S_b = 0.056$$

$$t(\text{自由度 } 35)5\% = 2.030, a = -0.038 \sim 0.810, b = 0.767 \sim 0.991$$

$$S. \text{ aureus: } a=0.328, b=0.914, S_a = 0.013, S_b = 0.003$$

$$t(\text{自由度 } 28)5\% = 2.048, a = -0.302 \sim 0.354, b = 0.906 \sim 0.920$$

となった。相関係数だけから判断すれば、何れの場合も十分相関があると判断されてきたが、95% 以内で同時に $a=0$ 、 $b=1$ を満たすことはなかった。代替法のバリデーションについて規定した ISO 16140²¹⁾ では、参照法と代替法(ここでは迅速法)が同等であることの定義を $a=0$ 及び $b=1$ としているので、ここでも、それに倣って同等性の評価を試みたが、意外にその条件を満たすことは難しいようだ。

7. 標準物質の利用

測定不確かさに基づいて合否判定しなければならない場合には、最終的には標準物質を用いて、あるいは標準法との比較試験で、トップダウン法で結論を出さなければならない場合が多い。本節では最近の論文からその具体例を紹介する。

7. 1. ドーピング検査のための血液成分およびヒト成長ホルモン分析における標準物質

ここに紹介する論文は、蛍光フローサイトメトリー、免疫分析法における測定不確かさを扱っている⁵⁾。スポーツにおけるドーピングの問題に関して、血液成分やヒト成長ホルモンの分析における測

定不確かさの推定である。クロマトグラフィに基づく分析法に対しては既に測定不確かさの推定法が確立しているが、本論文では初めて非クロマトグラフィ法に対する方法論を示している。具体的には、トップダウン法による血液学的分析結果における測定不確かさの推定である。用いられた標準物質は e-Check と呼ばれる品質保証試料 (Quality control sample) 3 種類 (濃度の違うものを 3 種類) である。2006.5-2009.1 の期間に機器の使用前に 2 回、電源を落とす前に 1 回 e-Check での分析を行った。また、それと並行して、WHO 認定の Centre Suisse de Controle de Qualite の技量認定テスト用試料を毎月分析した。

e-Check は、インビトロ診断用医療器具 (IVD) に関する欧州指示文書 (IVD-directive 98/79EC) には適合するが、許容値の範囲が度量衡学的にトレーサブルではない。生物試料では、同じ成分濃度の試料を繰り返し用意することができないので、期待値がバッチごとに多少異なるからである。したがって、キャリブレーションのための試薬としては EN ISO 17511:2000 には適合しない。それでも、試験法の性能の検証に対してならば適合しているといえる。したがって、長期間バラツキの評価には利用できるが、長期間バイアス (long-term bias) の評価には利用できない。真値 True value が提示されるわけではないからである。

e-Check は 3 種の濃度レベルで提供されているので、それぞれのレベルでの変動係数 CV (相対標準偏差) を求めた。その結果に基づき、各レベル間での違いの有無を F 検定で調べたところ、95% の確率で有意差がなかった。そこで、3 レベルのデータを一緒にした CV 値を求めた。その値が表 (添 2-1)-4.1 に示された $CV_{\text{precision}}(\%)$ である。一方、長期間バイアスについては、十分な数の ($n>30$) Proficiency test の結果 (PT-results)、一致した値が得られたならば、それを近似的に真値とみなすことができる、としている。そこで、WHO が認証している CSCQ (Quality Control Center Switzerland) 提供の試料を用いた PT を毎月 1 回実施した結果に基づいて、バイアスに対する変動係数を求めた。それが、表 (添 2-1)-4.1 に示されている $CV_{\text{bias}}(\%)$ である。このバイアスの変動係数には試料中の不純物の混入に基づく変動も含まれていることになる。したがって、全体の測定不確かさは次式であらわされることになる。

$$u = \sqrt{(CV_{\text{precision}})^2 + (CV_{\text{bias}})^2}$$

一方、ヒト成長ホルモンの分析法に関しては、遺伝子組み換えヒト成長ホルモン (rec hGH) を注射した前後で、下垂体由来のヒト成長ホルモンアイソフォーム (pit hGH) および rec hGH を分析し、その相対濃度 $[\text{rec hGH}]/[\text{pit hGH}]$ を求める方法である。原理は化学発光免疫分析であり、市販の分析キット 2 種 (以下、単に Kit1、Kit2 と表記) を用いた。今のところこの試験法が、唯一、World Anti-Doping Agency (WADA) International Standard for Laboratories (ISL) 2009, version 6.0 で認められている。すなわち、すでにバリデーションが済んでいる、との理解である。rec hGH 検出部には、22kDa の rec hGH に対するモノクローナル抗体が固定されており、pit hGH 検出部には、下垂体由来の様々なアイソフォームを認識するポリクローナル抗体が固定化されている、と推定される。各キットには校正用の 2 種の QC サンプル (QC1, QC2; 凍結乾燥品) が入っている。これによって、バッチの違いの影響を除くようにしている。

本試験法の測定不確かさ推定は、QC1、QC2 を長期間、繰り返し測定した結果 ($n>30$) に基づいて行った。測定すべき値は濃度比 (ratio) $[\text{rec hGH}]/[\text{pit hGH}]$ であるが、その変動係数 CV_{ratio} は、それぞれ

の CV に依存するので、次式で見積もり、それを $CV_{\text{precision}}$ とすることとした。すなわち、

$$CV_{\text{precision}} = CV_{\text{ratio}} = \sqrt{(CV_{\text{pit}})^2 + (CV_{\text{rec}})^2}$$

[rec hGH]/[pit hGH]の長期間バイアスに関わる成分については、製造者によって提示された値を真値とみなして、実測値との差をバイアスとみなし、 CV_{bias} を求めた。もし十分なデータがあるならば、PTの結果に基づいて決めた真値に対して CV_{bias} を求めることもできる。以上の結果より、測定不確かさは上の場合と同様、次式で与えられる（表 (添 2-1)-4.2)。

$$u = \sqrt{(CV_{\text{precision}})^2 + (CV_{\text{bias}})^2}$$

この結果に基づき QC 1 と QC2 で得られた値の平均値を各キットの測定不確かさとする。すなわち

$$u_{\text{Kit}} = \frac{u_{\text{QC1}} + u_{\text{QC2}}}{2}$$

となり、Kit1 の場合は、 $(12.72+19.11)/2=15.92$ 、Kit2 の場合は $(15.87+12.33)/2=14.10$ となった。総合評価としては、Kit2 の方が若干、測定不確かさが小さいとの結論になる。

この場合は、キット自体は予めバリデーションを行っているはずで、そのために、WADA で認証されていると思われる。しかし、それでも分析結果のバラツキの大きさが重大な結果に直結する場合は、本論文のように、日常的に行われる分析における分析値のバラツキを、絶えずチェックしておくことが重要に違いない。測定不確かさは、一旦、推定しても、機器の経年変化や分析技術者の技量の変化によっても影響を受けるので、絶えずチェックしては更新すべきものであるが、本論文の内容はそれを具体的に実践している事例である。

7. 2. 生菌標準物質の要請

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²²⁾²³⁾。しかし、現在までに開発されたものは 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、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方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 個ずつ分配する方法が検討された。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 CFDA で染色し、単一細胞ずつ 96 ウェルの各ウェルに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(表 (添 2-1)-5.1)。しかし、他の菌では、単一生菌分注率は低かったため、その原因を検討した結果、Tryptic Soy Broth による前培養条件等改変した結果、表 (添 2-1)-5.2 に示すように、上記 5 株すべてについて 97%以上の成績が得られた。なお、この実験では、微生物試験で通常用いられている直径 86 mm のプレートを用いて、寒天培地は仕切りのない状態で作製し、滴下する場所を一定の間隔 ($10 \times 10 = 100$) で行

うようにした。

まだ、基礎データを取得しつつある段階ではあるが、実用的に有望であるだけでなく、微生物が生きていることの意味を根本的に問い直す契機になるかも知れず、今後の微生物試験を考えるうえで極めて重要な示唆を与えるものと考えられる。

8. おわりに

測定不確かさに関する文献情報の調査、シンポジウム等での討論、などを経て、漸く次のような結論らしきことがまとめられるようになった。

- 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。

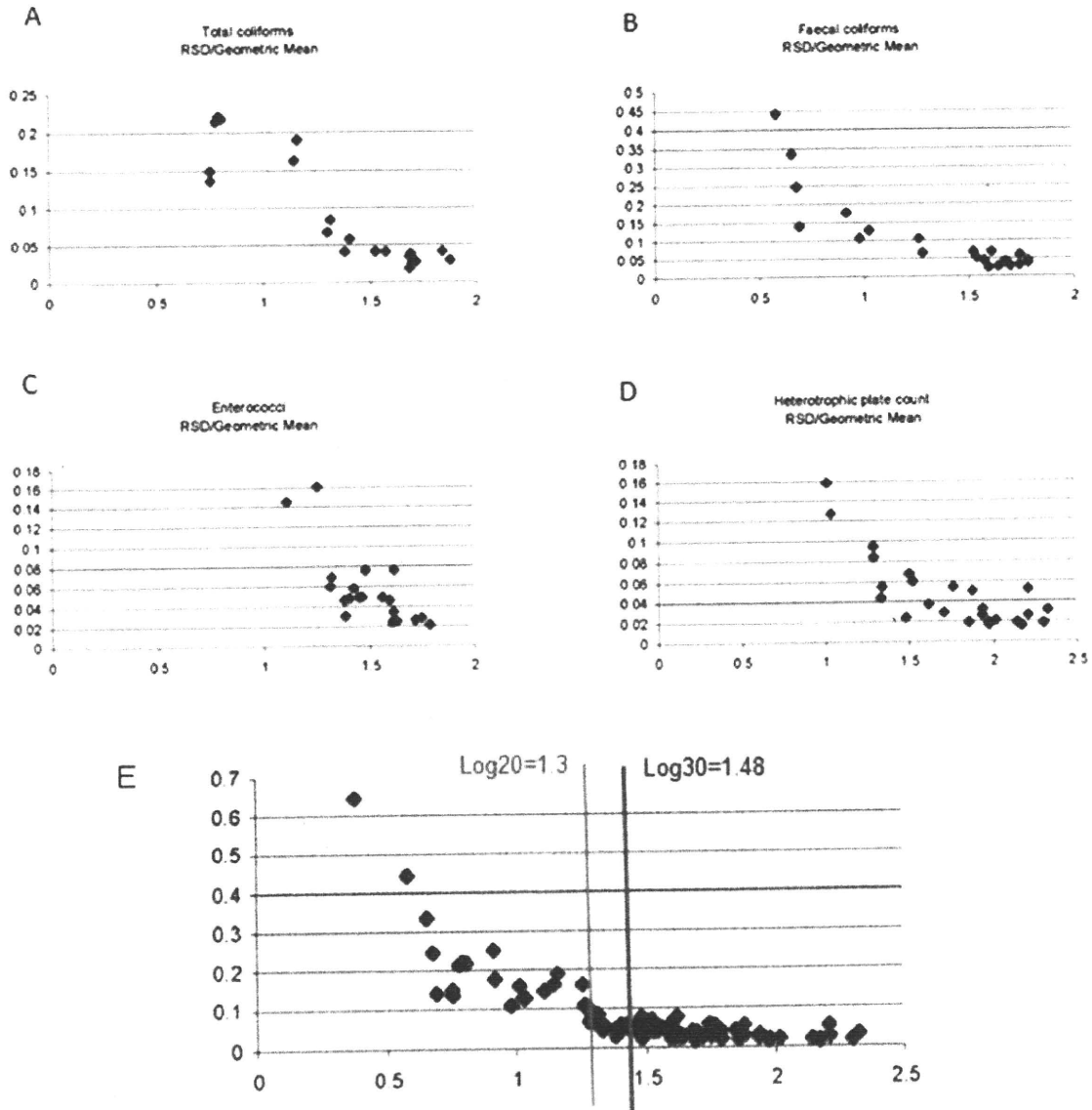
以上の項目の中で、例えば④に関連して、試験法の中には、まだ、測定不確かさを議論する段階に達していないものも少なくない。微生物試験法、特に迅速法と呼ばれているものの多くがそれに該当するように思われる。そして、そうした「未熟な」試験法を成熟させるためには、言うまでもなく⑤の充実が不可欠である。国際的な合意は、必ずしも技術的あるいは学術的な議論だけで達成されるわけではないが、少なくとも⑤に関しては、技術的課題の克服が直ちに国際的合意を先導すると考えられる。

《参考文献》

- 1) ISO: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) (1993)
- 2) ISO/IEC Guide 98-3: Uncertainty of measurement -- Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM: 1995)
- 3) B. Lombard: Estimation of measurement uncertainty in food microbiology: The ISO approach. *Accred. Qual. Assur.* **17**, 94–100 (2006).
- 4) ISO/TS 19036: Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. (First edition: 2006), (Amendment 1: 2009)
- 5) P. Van Eenoo, P. Van Renterghem, C.H. Dimopoulou, F.T. Delbeke, C.G. Georgakopoulos: Estimating measurement uncertainty in quantitative methods not based on chromatography for doping control purposes. *Drug Test Anal.* **2**, 19-23 (2010).
- 6) L.I. Forster: Measurement uncertainty in microbiology. *J. AOAC. Int.* **86**, 1089-1094 (2003).
- 7) 松岡英明：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、厚労科研、食品の安心・安全確保推進研究事業（課題番号）H20—食品—一般—011 平成21年度 総括・分担研究報告書。
- 8) J.E.L. Corry, B. Jarvis, S. Passmore, A. Hedges: A critical review of measurement uncertainty in the

- enumeration of food micro-organisms. *Food Microb.* **24**, 230-253 (2007).
- 9) 松岡英明：微生物試験法の妥当性確認と不確かさの推定 “最新版—食品分析法の妥当性確認ハンドブック”(安井、五十君、後藤、丹野、湯川、編)第7章1節、サイエンスフォーラム (2010) pp223-231.
 - 10) M.S. Williams, E.D. Ebel, N.J. Golden, M.E. Berrang, J.S. Bailey, E. Hartnett: Estimating removal rates of bacteria from poultry carcasses using two whole-carcass rinse volumes. *Int. J. Food Microbiol.* **139**, 140-146 (2010).
 - 11) ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.
 - 12) Official Methods of Analysis of AOAC International 18th Edition.
 - 13) ISO 4832:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.
 - 14) L.I. Forster: Conclusions on measurement uncertainty in microbiology. *J. AOAC Int.* **92**, 312-319 (2009).
 - 15) D. Mettler, D. Tholen: G108- Guidelines for estimating uncertainty for microbiological counting methods. *A2LA (The American Association for Laboratory Accreditation) Guidance Document* (2007).
 - 16) B. Jarvis, C. Wilrich, P.T. Wilrich: Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1660-1667 (2010).
 - 17) R.J. Blodgett: Judging a model of an experiment. *A Paper Presented to the Joint Statistical Meetings of the American Statistical Association*, Denver, 14 August 2008.
 - 18) V.R. Dereani, M.M. Sarić: Validation of measurement uncertainty estimation in food microbiology: Differences between quantitative and qualitative methods. *Mjekarstvo* **60**, 207-213 (2010).
 - 19) CAEAL: Policy on the estimation of uncertainty measurement in environmental testing (2003), http://www.caeal.ca/P19_CAEAL_Unce_Pol.pdf.
 - 20) T. Shimakita, Y. Tashiro, A. Katsuya, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid separation and count of viable microbial cells in foods by non-culture method with a bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit. *J. Food Protection* **69**, 145-151 (2006).
 - 21) ISO16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods
 - 22) C.A. Morgan, P. Bigeni, N. Herman, M. Gauci, P.A. White, G. Vesey: Production of precise microbiology standards using flow cytometry and freeze drying. *Cytometry Prat A* **62A**, 162-168 (2004).
 - 23) G. ベセイ, M. ガウチ: 一定量の生体粒子を含む製品およびその製造方法. 特許第4414220号 (2009.11.27登録)

図(添2-1)-1. コロニー計数において経験則として、N<30を除外することの妥当性. y軸はRSD(%)



表(添2-1)-1. 定性試験における評価指標

検体		陽性(標準法)	陰性(標準法)	合計
代替法の結果	陽性	PA	PD	
	陰性	ND	NA	
合計		N_p	N_N	N

PA: 陽性正解数

PD: 擬陽性数

NA: 陰性正解数

ND: 擬陰性数

N: 検体総数 = PA + PD + ND + NA

N_p : 標準法で陽性と判定した総数

N_N : 標準法で陰性と判定した総数

精確さ(Accuracy) $AC = (PA + NA) / N \times 100\%$

特異性(Specificity) $SP = NA / N_N \times 100\%$

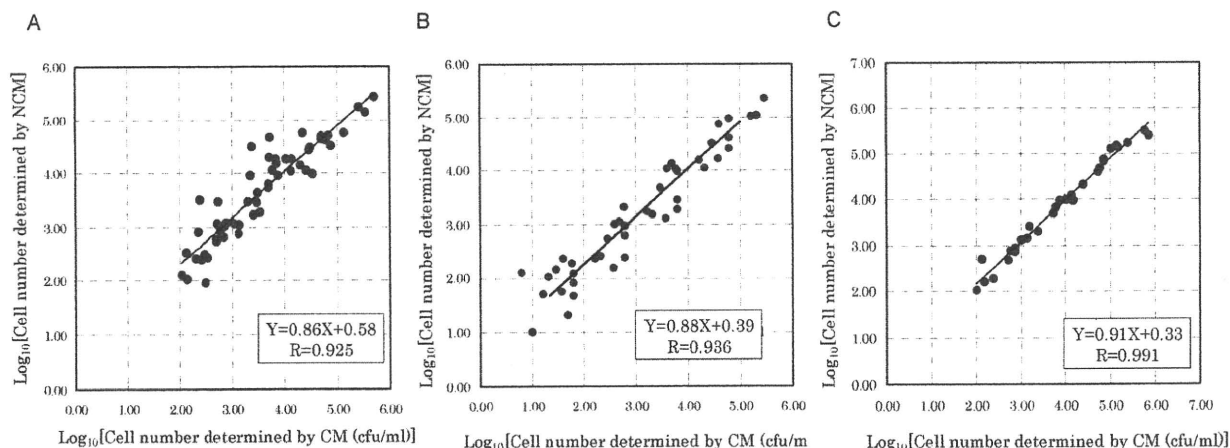
感度(Sensitivity) $SE = PA / N_p \times 100\%$

表(添2-1)-2. 生菌検出法

	培養・非培養の別	原理・指標	検出・計測法
通常培養法	培養法	細胞分裂、増殖を繰り返し肉眼で検知できる大きさのコロニー形成を待ち、これを計数	寒天培地コロニー計数法 フィルム、不織布などのシート状培地でのコロニー計数法
		細胞分裂、増殖した菌体量を濁度、あるいは重量で計測	液体培地培養法
迅速法	マイクロコロニー法(培養法)	細胞分裂、増殖を繰り返すが、通常のコロニーよりはるかに小さなコロニーの状態、これを計数	蛍光染色法
	細胞成長顕微解析法(培養法)	細胞成長に伴う形状変化を直接顕微解析	菌糸伸長速度計測法 酵母出芽形状解析法
	非培養法	色素分子に対する細胞膜透過性の有無によって生死判別。生細胞では透過性無。色素分子の受動的取込。	蛍光染色法(PI, DAPI, など)
			レドックス色素を利用した電気化学測定法
		細胞内エステラーゼ活性。生細胞で活性。	エステル型蛍光色素(FDA, CFDAなど)を細胞内導入
		栄養基質取込活性。生細胞は能動的取込。	蛍光基質法(2NBDG, NBD-Glyなど)
		生細胞が持つ還元力を直接、あるいは適当なメディエーターを介して計測。	蛍光色素法
			NAD法(テトラブリウム塩の利用など) 電気化学的方法
		呼吸活性。分子状酸素を電子受容体とした還元力。	酸素電極法、走査型電気化学顕微鏡
		生細胞では高エネルギー分子の生成。	ATP法(ルシフェリン・ルシフェラーゼ系)
生細胞では生体高分子(DNA, RNA, タンパク、etc.)合成。	タンパク質定量法		
生細胞では遺伝子発現。	GFPなどのレポーター遺伝子を利用して遺伝子発現を可視化		

図(添2-1)-2. 培養法と顕微蛍光解析法の生菌計数結果の相関。

(A) *Escherichia coli* (B) *Salmonella enteritidis* (C) *Staphylococcus aureus*



表(添2-1)-3. E. coli (図(添2-1)-2.A)の場合の直線の傾きとy切片の標準偏差の計算例

測定点 i	x _i の対数 log(x _i)	y _i の対数 log(y _i)	log(x _i)の分散 V _x	log(y _i)の分散 V _y	共分散 V _{xy}	残差 (y _k -Y _k) ²
1	2.03	2.10	2.411	2.453	2.432	0.051
2	2.12	2.52	2.130	1.329	1.682	0.011
3	2.14	2.02	2.083	2.719	2.380	0.162
4	2.30	2.41	1.636	1.596	1.616	0.025
5	2.34	2.91	1.532	0.581	0.943	0.094
6	2.38	3.49	1.439	0.033	0.218	0.731
7	2.41	2.39	1.361	1.627	1.488	0.072
8	2.47	2.50	1.237	1.373	1.303	0.044
9	2.48	1.95	1.201	2.960	1.885	0.599
10	2.54	2.43	1.086	1.538	1.293	0.116
11	2.69	2.76	0.784	0.831	0.807	0.021
12	2.70	2.73	0.780	0.888	0.832	0.032
13	2.71	3.05	0.754	0.380	0.535	0.018
14	2.73	3.47	0.718	0.041	0.171	0.281
15	2.77	2.92	0.649	0.559	0.602	0.003
16	2.84	2.82	0.554	0.724	0.633	0.043
17	2.85	3.02	0.536	0.426	0.478	0.000
18	2.88	3.07	0.488	0.365	0.422	0.000
19	3.03	3.06	0.305	0.373	0.338	0.018
20	3.12	2.87	0.211	0.633	0.365	0.158
21	3.14	3.04	0.196	0.393	0.278	0.059
22	3.30	3.46	0.078	0.042	0.057	0.001
23	3.34	3.95	0.056	0.079	-0.067	0.239
24	3.38	4.49	0.040	0.680	-0.165	0.997
25	3.41	3.22	0.028	0.204	0.075	0.093
26	3.47	3.44	0.013	0.052	0.026	0.016
27	3.48	3.63	0.009	0.002	0.004	0.002
28	3.54	3.26	0.002	0.165	0.017	0.135
29	3.69	3.72	0.013	0.003	0.006	0.002
30	3.70	3.79	0.014	0.013	0.013	0.000
31	3.71	4.29	0.017	0.385	0.082	0.259
32	3.73	4.68	0.023	1.023	0.154	0.778
33	3.77	4.05	0.038	0.144	0.074	0.046
34	3.84	4.26	0.065	0.347	0.151	0.138
35	3.85	4.17	0.072	0.250	0.134	0.074
36	3.88	3.94	0.091	0.072	0.081	0.000
37	4.03	4.26	0.200	0.347	0.264	0.042
38	4.12	4.03	0.292	0.131	0.195	0.010
39	4.14	4.26	0.310	0.344	0.327	0.012
40	4.30	4.13	0.520	0.214	0.334	0.024
41	4.34	4.76	0.581	1.189	0.831	0.190
42	4.41	4.04	0.694	0.139	0.310	0.118
43	4.47	4.44	0.788	0.591	0.682	0.000
44	4.48	4.48	0.818	0.651	0.729	0.001
45	4.54	3.98	0.917	0.094	0.294	0.266
46	4.69	4.70	1.242	1.052	1.143	0.004
47	4.70	4.63	1.247	0.929	1.076	0.000
48	4.77	4.62	1.427	0.904	1.136	0.006
49	4.84	4.71	1.577	1.078	1.304	0.002
50	4.88	4.52	1.694	0.714	1.100	0.075
51	5.12	4.76	2.373	1.183	1.676	0.057
52	5.41	5.24	3.361	2.452	2.871	0.000
53	5.54	5.15	3.833	2.190	2.897	0.042
54	5.69	5.43	4.472	3.086	3.715	0.004
合計(1~54)			48.997	42.573	42.231	6.174
平均	3.58	3.67				
分散(自由度53)			0.924	0.803	0.797	
最小二乗法による直線の式: y=a+bx			b=V _{xy} /V _x =		0.862	
			a=mean(y) - b*mean(x)=		0.582	
残差標準偏差: S _y :x	[(残余の和)/(自由度52)] ^{1/2}					0.345
aの標準偏差: S _a =S _y :x*[1/N + {mean(x)} ² /(N-1)/V _x] ^{1/2}						0.182
bの標準偏差: S _b =S _y :x*[1/(N-1)/V _x] ^{1/2}						0.049
相関係数: r=V _{xy} /[V _x *V _y] ^{1/2}						0.925
t分布表で自由度52, 両側5%のt値						2.007

表(添2-1)-4.1 PTから求めた長期間バイアスとe-Check測定から求めた長期間バラツキ

Parameter	CV _{bias} (%)	CV _{precision} (%)	u (%)
WBC(白血球)	1.8	2.9	3.41
RBC(赤血球)	0.77	0.98	1.25
HGB(ヘモグロビン)	0.52	1.05	1.17
HCT(ヘマトクリット)	1.2	1.21	1.70
MCV(平均微粒子容積)	0.86	0.7	1.11
MCH(平均赤血球色素量)	0.88	1.1	1.41
MCHC(平均赤血球色素濃度)	1.38	1.1	1.76
PLT(血小板)	2.2	4.12	4.67
RET%(網赤血球)	14.69	7.73	16.60

表(添2-1)-4.2 製造者から提示された真値を基に求めた長期間バイアスと較正用のキット付属サンプルで求めたバラツキ

		QC1			QC2		
		rec hGH	pit hGH	ratio	rec hGH	pit hGH	ratio
Kit1	CV _{precision} (%)	0.06	0.07	0.09	13.19	8.67	15.78
	CV _{bias} (%)	12.72			-10.77		
	u (%)	12.72			19.11		
Kit2	CV _{precision} (%)	9.05	8.89	12.69	6.57	5.60	8.63
	CV _{bias} (%)	9.53			-8.80		
	u (%)	15.87			12.33		

表(添2-1)-5.1 FACSによる微生物生菌の単一細胞ソーティング結果

			2-NBDG				CFDA			
			n1	n2	n3	平均(%)	n1	n2	n3	平均(%)
NBRC 3009	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草菌	76	78	75	80	72	82	75	80
NBRC 3301	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	95	93	91	97	92	93	92	96
NBRC 12689	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	緑膿菌	5	8	9	8	14	12	9	12
NBRC 102135	<i>Staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ球菌	57	39	42	48	81	72	77	80
ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	50	56	53	55	91	87	88	92

表(添2-1)-5.2 培地条件改変後の単一細胞ソーティング結果

			n1	n2	n3	平均(%)
NBRC 3009	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草菌	99	99	98	99
NBRC 3301	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	100	96	96	97
NBRC 12689	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	緑膿菌	99	98	100	99
NBRC 102135	<i>Staphylococcus aureus</i>	黄色ブドウ球菌	99	99	98	99
ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	100	100	98	99

【添付資料 2】「測定不確かさ」関連論文リスト

- (1) P. Van Eenoo, P. Van Renterghem, C.H. Dimopoulou, F.T. Delbeke, C.G. Georgakopoulos
Estimating measurement uncertainty in quantitative methods not based on chromatography for doping control purposes. *Drug Test Anal.* **2**(1), 19-23 (2010)
- (2) B. Jarvis, C. Wilrich, P.T. Wilrich
Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1660-1667 (2010).
- (3) R.L. Whitman, Z. Ge, M.B. Nevers, A.B. Boehm, E.C. Chern, R.A. Haugland, A.M. Lukasik, M. Molina, K. Przybyla-Kelly, D.A. Shively, E.M. White, R.G. Zepp, M.N. Byappanahalli
Relationship and variation of qPCR and culturable Enterococci estimates in ambient surface waters are predictable. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 5049-5054 (2010).
- (4) M.S. Williams, E.D. Ebel, N.J. Golden, M.E. Berrang, J.S. Bailey, E. Hartnett.
Estimating removal rates of bacteria from poultry carcasses using two whole-carcass rinse volumes. *Int. J. Food Microbiol.* **139**, 140-146 (2010).
- (5) V.R. Dereani, M.M. Sarić
Validation of measurement uncertainty estimation in food microbiology: differences between quantitative and qualitative methods. *Mljekarstvo* **60**, 207-213 (2010)
- 《2009》
- (6) N. Goris, F. Vandebussche, C. Herr, J. Villers, Y. Van der Stede, K. De Clercq.
Validation of two real-time RT-PCR methods for foot-and-mouth disease diagnosis: RNA-extraction, matrix effect, uncertainty of measurement and precision. *J. Virol. Methods* **160** (1-2), 157-162 (2009).
- (7) A.K. Guber, A.M. Yakirevich, A.M. Sadeghi, Y.A. Pachepsky, D.R. Shelton.
Uncertainty evaluation of coliform bacteria removal from vegetated filter strip under overland flow condition. *J. Environ. Qual.* **38**(4), 1636-1644 (2009).
- (8) L.I. Forster
Conclusions on measurement uncertainty in microbiology. *J. AOAC Int.* **92**(1), 312-319 (2009)
- (9) S.E. Robinson, P.E. Brown, E.J. Wright, C.A. Hart, N.P. French
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**(31), 169-177 (2009)..

«2007, 2008»

- (10) I. Habib, I. Sampers, M. Uyttendaele, D. Berkvens, L. De Zutter
Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. *Food Microbiol.* **25**(1), 65-74 (2008).
- (11) B. Jarvis, J.E. Corry, A.J. Hedges
Estimates of measurement uncertainty from proficiency testing schemes, internal laboratory quality monitoring and during routine enforcement examination of foods. *J. Appl. Microbiol.* **103**(2), 462-467 (2007).
- (12) K.G. Martino, B.P. Marks
Comparing uncertainty resulting from two-step and global regression procedures applied to microbial growth models. *J. Food Prot.* **70**(12), 2811-2818 (2007).
- (13) A.S. Vicari AS, A. Mokhtari, R.A. Morales, L.A. Jaykus, H.C. Frey, B.D. Slenning, P. Cowen
Second-order modeling of variability and uncertainty in microbial hazard characterization. *J. Food Prot.* **70**(2), 363-372 (2007).
- (14) J.E. Corry, A.J. Hedges, B. Jarvis
Measurement uncertainty of the EU methods for microbiological examination of red meat. *Food Microbiol.* **24**(6), 652-657 (2007).
- (15) B. Jarvis B, A.J. Hedges, J.E. Corry
Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. *Int. J. Food Microbiol.* **116**(1), 44-51 (2007).

平成 22 年度厚生労働科学研究補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業
食品の規格基準に係わる測定値に伴う不確かさに関する研究
研究分担報告書

理化学的試験法の不確かさの推定

分担研究者 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

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、HPLC による硝酸塩の分析において、検量線の存在範囲を正しく予想することが可能であり、これから検量線による濃度逆推定に伴う不確かさを推定した。検量線に起因する不確かさが、分析全体の不確かさの 30%程度の大きさとなる場合も見られた。また、検量線溶液の濃度設定と得られる検量線による不確かさの関係も考察した。

A. 研究目的

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)」¹⁾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。

本研究では理化学分析における分析値の不確かさの推定方法を検討した。本研究に先立つ、平成 17-19 年に実施された厚生労働科学研究補助金食品の安心・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か要素に

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ことを踏まえ、初年度(平成 20 年度)には技能試験データからの不確かさの推定を試みた。この研究では平成 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、室間精度から不確かさを推定した。

平成 21 年度は、一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。加工食品中の食品添加物について分析法の室内性能評価を実施し、得られた室内精度から不確かさを推定した。

最終年度である本年度は、不確かさ推定のもう一つの手法であるボトムアップアプローチの、食品分析への適用を検討した。

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。検討の対象として、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、HPLC による硝酸塩の分析における検量線作成を取り上げた。

B. 実験

シアン化合物検量線作成

シアン標準溶液(1 µg/mL)を水で希釈し、0.05, 0.1, 0.25, 0.5 および 1 µg/mL の 5 点の濃度の溶液を調製した。これらの溶液および水 (0 µg/mL) を 10 mL 採取し、リン酸緩衝液(0.05 mol/L)10 mL 及びクロラミン T 溶液 1 mL を加え、密栓して混合した後、室温で 5 分間静置した。静置後の溶液に 4-ピリジジカルボン酸-ピラゾロン溶液 10 mL を加え、水を加えて正確に 50 mL としたのち密栓して直ちに混和した後、室温で 50 分間静置した。この溶液について、水を対照として 638 nm 付近の吸光度を測定し、濃度に対する吸光度の回帰直線を計算し、検量線関数とした。

鉛検量線作成

鉛標準液を水で希釈し、0, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000 pg/mL 濃度の溶液を調製した。各溶液には内部標準のタリウムを 2 ng/mL の濃度となるように加えた。これらの溶液を ICP-MS で測定し、濃度に対するイオンカウント比(鉛イオンカウント/タリウムイオンカウント)の回帰直線を計算し、検量線関数とした。

ICP-MS 測定条件

装置 : XSERIES(Thermo Scientific)
RF 出力 : 1420 W
ネブライザーガス流量 : 0.91 L/min

補助ガス流量 : 0.8 L/min

冷却ガス流量 : 13 L/min

m/z : 鉛 208, タリウム 203

硝酸塩検量線作成

硝酸塩標準溶液を水で希釈して、0.5, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL の濃度の溶液を調製した。これらの溶液を HPLC で測定し、濃度に対するピーク面積の回帰直線を計算し、検量線関数とした。

HPLC 条件

カラム : Shodex Asahipak NH2P-50 4E,
4.6 mm×25 cm+4.6 mm×1 cm (ガードカラム)
カラム温度 : 50°C
移動相 : 0.1 mol/L 過塩素酸ナトリウムを含む 10 mmol/L リン酸塩緩衝液
流量 : 1.0 mL/min
測定波長 : 210 nm

C. 結果及び考察

濃度逆推定に伴う不確かさ

検量線を用いた分析では、まず既知の濃度のアナライトを含む検量線用溶液を作成し、それぞれの濃度の検量線用溶液を測定して信号を得る。この信号を濃度に対して回帰し、検量線の関数を求める。ほとんどの理化学分析において、この関数として一次関数が使われるので、本研究では一次関数の場合のみを扱う。

濃度 X_1, X_2, \dots, X_n

信号 Y_1, Y_2, \dots, Y_n

とするとき、濃度に対する信号の回帰直線は $Y = aX + b$ で表される。 a は傾き、 b は y 切片である。分析用試料から信号 Y が得られたときには、回帰直線の係数 a と b を用いて $X = \frac{Y - b}{a}$ を求め、濃度の推定値とする。

a と b は濃度と信号から一意に定まるた

め、測定値 Y から濃度 X を逆推定する操作には変動が伴っていない。測定値 Y には分析の前処理あるいは測定に起因する不確かさが伴っているが、これは検量線による濃度推定とは独立して扱うべき不確かさである。では、検量線による濃度推定に伴う不確かさとして何を考えるべきだろうか。

検量線用溶液の濃度 X は一定であっても、信号 Y は常に誤差を伴う測定から得られるため、検量線の作成を繰り返せば、その度に少しずつ異なる検量線が得られる。ある一定の大きさの信号から、少しずつ異なる検量線を用いて濃度を推定すれば、推定濃度もそれぞれ異なる。このような、検量線により推定された濃度の変動範囲を検量線による濃度推定に伴う不確かさと考えることができる。従って、検量線による濃度推定に伴う不確かさは、その測定系で作成される検量線の分布、つまり検量線の存在する範囲から推定することが可能である。Fig.1 に検量線による濃度推定に起因する不確かさの概念図を示した。

検量線の存在範囲推定方法

検量線の存在範囲を推定するためには、2つの方法がある。

1つめの方法（推定方法1）は、回帰直線の信頼区間を計算する方法である。

濃度 X_1, X_2, \dots, X_n 平均 \bar{X}

信号 Y_1, Y_2, \dots, Y_n 平均 \bar{Y}

から推定した直線回帰式の係数 a, b はそれぞれ

$$a = \frac{S_{XY}}{S_{XX}} \quad \text{Eq.1}$$

$$b = \bar{Y} - a\bar{X}$$

となる。 S_{XX} は X の偏差平方和、 S_{XY} は X と Y の偏差積和である。

この回帰式の濃度 X_0 における 95%信頼

区間の幅は

$$t_{n-1,0.05} \times \sqrt{V_e \left\{ \frac{1}{n} + \frac{(X_0 - \bar{X})^2}{S_{XX}} \right\}} \quad \text{Eq.2}$$

の2倍となる。 V_e はこの回帰式の残差の分散である。

2つ目の方法（推定方法2）は、信号 Y の変動から検量線の存在範囲を推定する方法である²⁾。この方法では、濃度 X_0 における検量線の存在範囲の分散は

$$\tilde{Y}^2 = A_x^2 (X_0 - B_x)^2 + C_x^2 \quad \text{Eq.3}$$

で表され、係数 A_x, B_x, C_x はそれぞれ

$$A_x = \tilde{a} \quad \text{Eq.4}$$

$$\tilde{a}^2 = \frac{1}{S_{XX}^2} \left\{ \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 \tilde{e}_i^2 \right\} \quad \text{Eq.5}$$

$$B_x = -\frac{\text{Cov}(a, b)}{\tilde{a}^2} \quad \text{Eq.6}$$

$$\text{Cov}(a, b) = \sum_{i=1}^N \left[\left\{ \frac{(X_i - \bar{X})}{NS_{XX}} - \frac{\bar{X}}{S_{XX}^2} (X_i - \bar{X}) \right\} \tilde{e}_i^2 \right] \quad \text{Eq.7}$$

$$C_x = \tilde{b} \left[1 - \frac{\text{Cov}(a, b)^2}{\tilde{a}^2 \tilde{b}^2} \right]^{1/2} \quad \text{Eq.8}$$

$$\tilde{b}^2 = \sum_{i=1}^N \left[\left\{ \frac{1}{N} - \frac{\bar{X}}{S_{XX}} (X_i - \bar{X}) \right\}^2 \tilde{e}_i^2 \right] \quad \text{Eq.9}$$

である。 \tilde{e}_i は各測定値 Y_i の標準偏差である。

2つの推定方法の大きな違いは、回帰直線の信頼区間推定（推定方法1）では、濃度 X_0 の値によらず、同じ分散 V_e を用いて計算するのに対し、推定方法2では各濃度で異なる分散 \tilde{e}_i^2 を用いていることである。

シアン化合物分析のために作成された検量線 33 セットのデータ，鉛分析検量線 10 セットのデータ，硝酸塩分析 6 セットのデータから，実際の測定値の分散（あるいは標準偏差）と濃度の関係を検証した。Fig.2 はそれぞれの検量線データとした信号の SD を濃度に対するプロットである。いずれの場合も，信号の SD は濃度と直線的な関係がみられ，濃度の増加共に信号の SD が増加している。信号の SD を濃度に対し一次回帰した直線を，図中に示した。33 測定から得られたシアン化合物の吸光度は，濃度と直線関係が見られている。数の少ない，硝酸塩測定結果でも直線関係の存在が考えられる。

以上のように，信号の標準偏差は濃度と比例的な関係があり，このような系では推定方法 1 の回帰直線の信頼区間計算の前提である，信号の標準偏差(分散)が等しいという仮定は成立していない。

Fig.3 にはそれぞれの分析系で得られた信号の濃度に対するプロット（左）と，回帰直線（右）を示した。信号の測定値の SD が高濃度で増加しており，これに伴ってどの回帰直線も高濃度側で存在範囲が広がっている。検量線による濃度推定に起因する不確かさを推定するためには，このような実際の検量線の存在範囲を正しく予測できる手法が必要である。

Fig.4 の左側は，2 セットのシアン化合物検量線データのプロットである。右側はこれらのデータから，推定方法 1 で計算された回帰直線の信頼区間を示している。信頼区間の形状が分かるように，検量線からの幅として表示した。○及び△は，計算に使用した信号と回帰直線の差（残差）を示している。実線は○のデータから計算した信頼区間，一点鎖線は三角のデータから計算した信頼区間である。2 つのセットでは残

差が大きく異なっている。○のデータでは残差の絶対値の最大が 0.00461 であるが，△のデータから計算した回帰曲線の残差の絶対値の最大は 0.0007 であった。2 つの回帰直線の残差の SD は 0.002833 と 0.000488 となり，5 倍以上異なっている。これに伴って，計算された信頼区間も大きく異なっている。しかし，全体の形はよく似ており，0.3 $\mu\text{g/mL}$ 付近で最も幅が狭く，両端で広がっている。Fig.3 に示した実際の回帰直線の存在範囲の幅が最も狭いところは，0.1-0.2 $\mu\text{g/mL}$ 付近にあること，濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ と 1.0 $\mu\text{g/mL}$ での幅を比較すると，高濃度側の幅が数倍以上広いことが，Fig.4 の信頼区間と異なっている。

Fig.5 は，信号 Y の変動を用いた推定方法（推定方法 2）で推定した検量線の 95% 存在範囲である。各濃度における \hat{e}_i^2 は，吸光度の SD を濃度に直線回帰して得られた関係式から求めた。検量線存在範囲の最も幅の狭い部分が 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 付近にあり，濃度 0 $\mu\text{g/mL}$ と 1.0 $\mu\text{g/mL}$ での幅を比較すると，高濃度側が 5 倍程度広がっている。これは，実際の検量線の存在範囲とよく似た形状である。

Fig.6 の左図は，33 本の回帰直線と，推定方法 2 で推定された検量線の 95% 存在範囲を重ねてプロットしたものである。右側は検量線の存在する幅を点線で，95% 存在範囲を実線で示している。95% 範囲は，実際の検量線の範囲よりはやや狭くなっているが，全体的には一致した形となった。

以上の結果から，推定方法 2 により，実際の検量線の存在範囲を推定できると結論した。

検量線の不確かさ

推定方法 2 によって得られた検量線の存

在範囲から、検量線による濃度推定の不確かさを求めた。

Fig.7には、シアン化合物、鉛、硝酸塩の検量線の存在範囲のSD及びRSDを示す。存在範囲のRSDは、検量線による濃度推定の標準不確かさをRSDで表した値と同じと考えられる。どの検量線においても、存在範囲のRSDに極小となる濃度があり、それより低濃度側では急速にRSDが増加するが、高濃度側では変化は緩やかであった。

これらの検量線を用いて実施した分析法の妥当性評価から得られた室内精度を、分析値に伴う不確かさとし、検量線による不確かさと比較した結果を、Table 1に示す。検量線による濃度推定の不確かさが最も大きかったシアン化合物の分析では、不確かさへの寄与が30%程度になる場合が見られた。

Eq.7-9には検量線用溶液中のアナライต์濃度 X_i と、その濃度における信号のSDで

ある $\tilde{\sigma}_i$ が含まれている。このことから、検量点の設定が、検量線の不確かさに影響を与えると考えられたため、種々の設定の検量線における不確かさを推定した。結果をFig.8に示す。

Fig.8の左側は、0-1 $\mu\text{g/mL}$ の範囲の検量点の設定による、検量線による濃度推定に伴う不確かさの変化を示している。一番下に、検量点を示した。○は低濃度側に密に点をとり、△は等間隔で点を配置している。●は1 $\mu\text{g/mL}$ から倍々希釈した濃度設定である。上のプロットには、各濃度での不確かさを示している。0.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では、△の等間隔に検量点を配置した場合が、不確かさが小さい結果となった。しかし、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度では、△の不確かさは大きくなり、低濃度側に密に検量点

を配置した時の不確かさが小さくなった。

Fig.8の右側は、検量点の範囲を0-1 $\mu\text{g/mL}$ (○), 0-1.5 $\mu\text{g/mL}$ (▲), 0-0.5 $\mu\text{g/mL}$ (□)に設定した時の不確かさの変化を示している。検量点の配置は、等間隔とした。○と▲を比較すると、高濃度側ではほぼ同じ不確かさとなるが、低濃度範囲では検量範囲の広い▲の不確かさが急速に増大している。

検量線による濃度推定に伴う不確かさは、アナライต์濃度により大きく変動するので、最適な検量点の設定を1つに定めることはできない。定量を行う範囲と、その範囲に必要な最低限の不確かさを設定した上で、検量線を設計することが、分析の不確かさを担保するうえで重要である。

D. 参考文献

- 1) CODEX guideline CAC/GL54-2004; Guidelines on measurement uncertainty
- 2) Hayashi, Y., Matsuda, R., and Poe, R.B., Probabilistic approach to confidence intervals of linear calibration, Analyst, 121, 591-599 (1996)

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

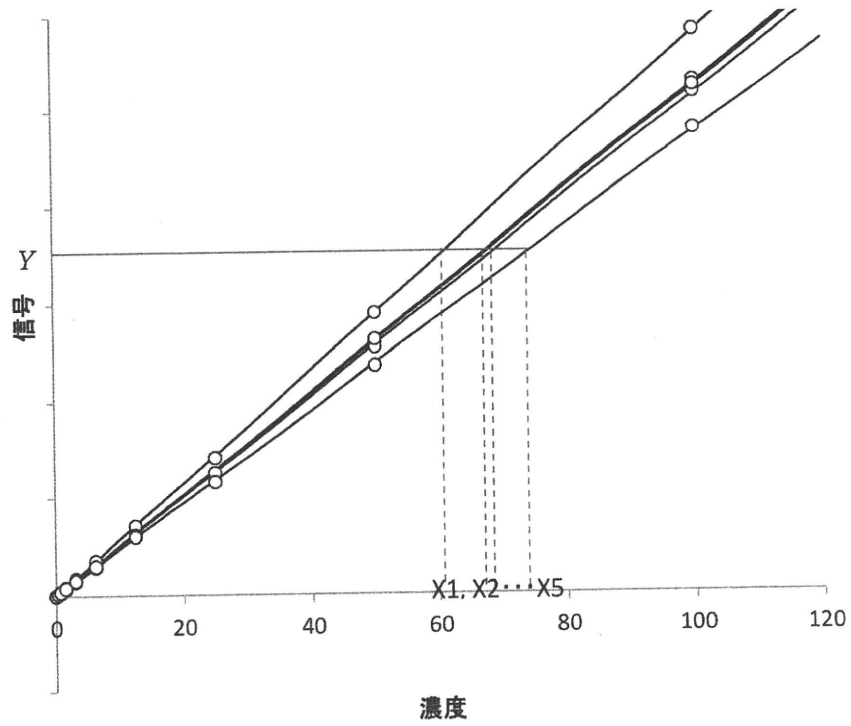


Fig. 1 検量線による濃度推定に起因する不確かさ

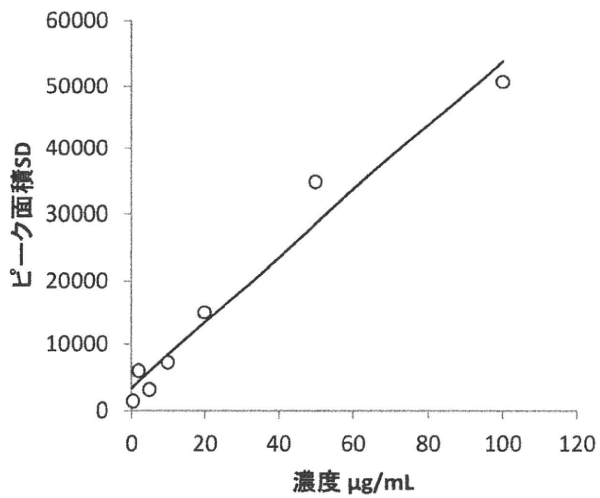
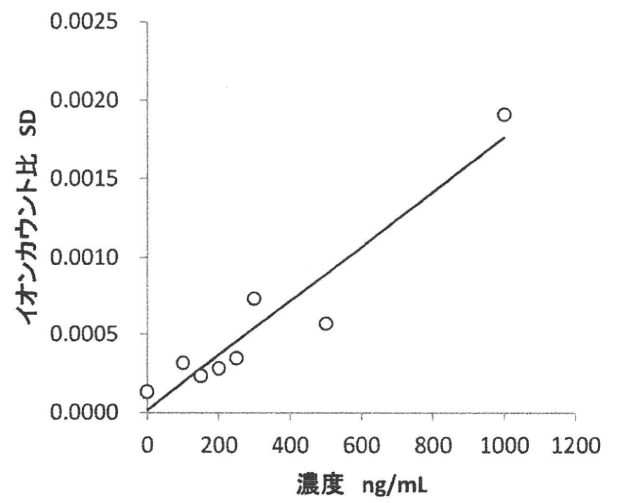
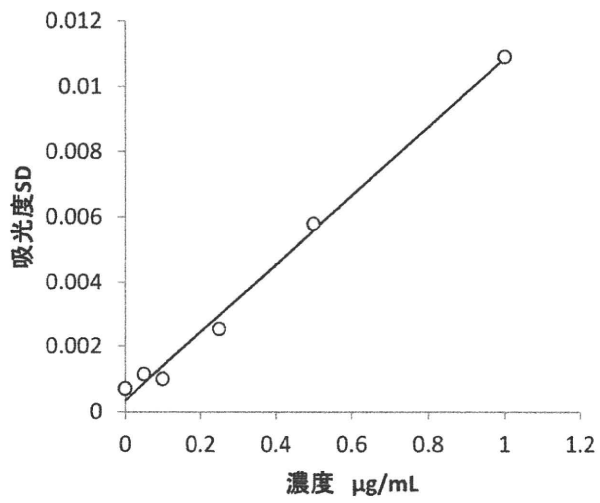


Fig. 2

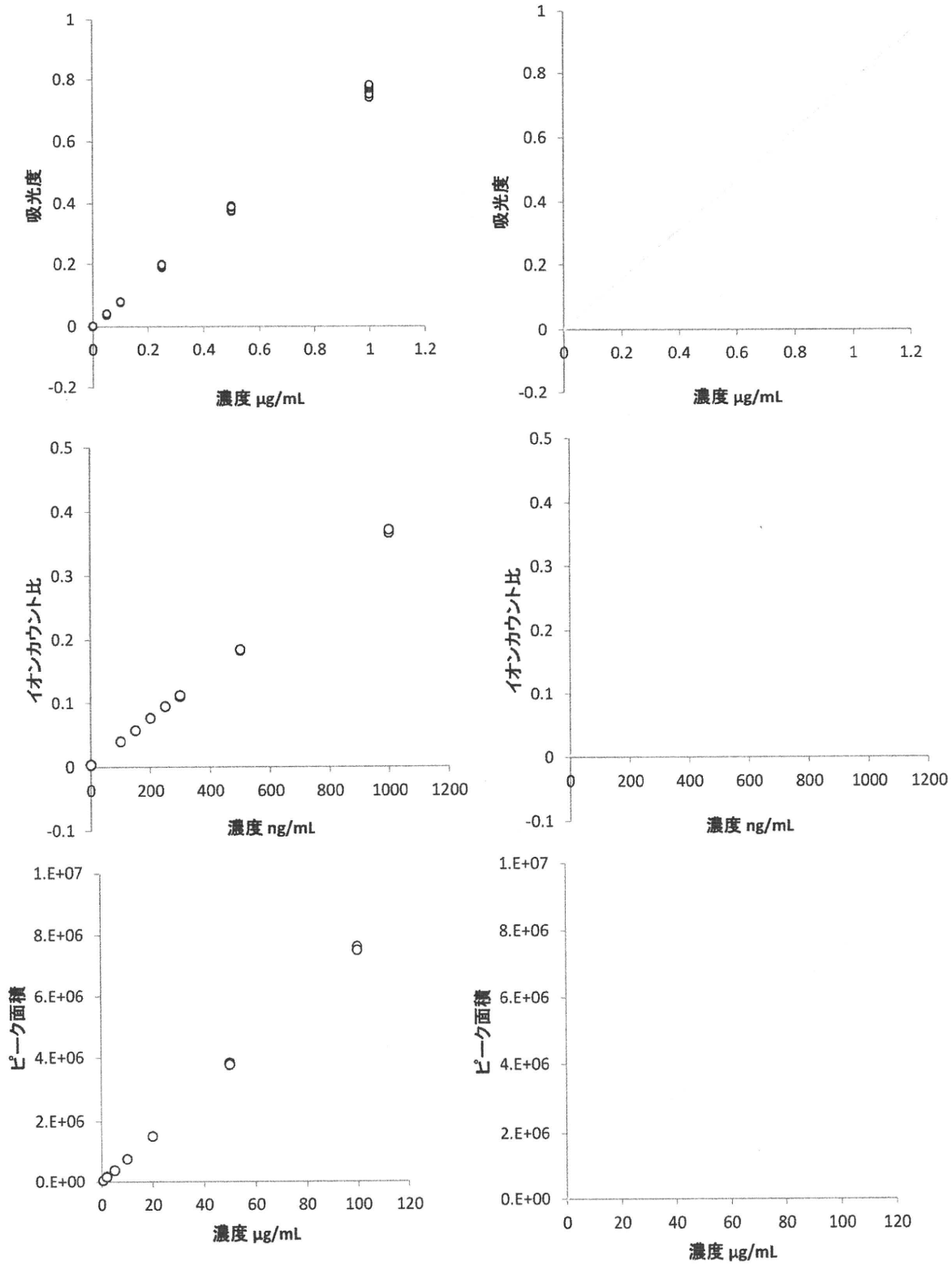


Fig.3

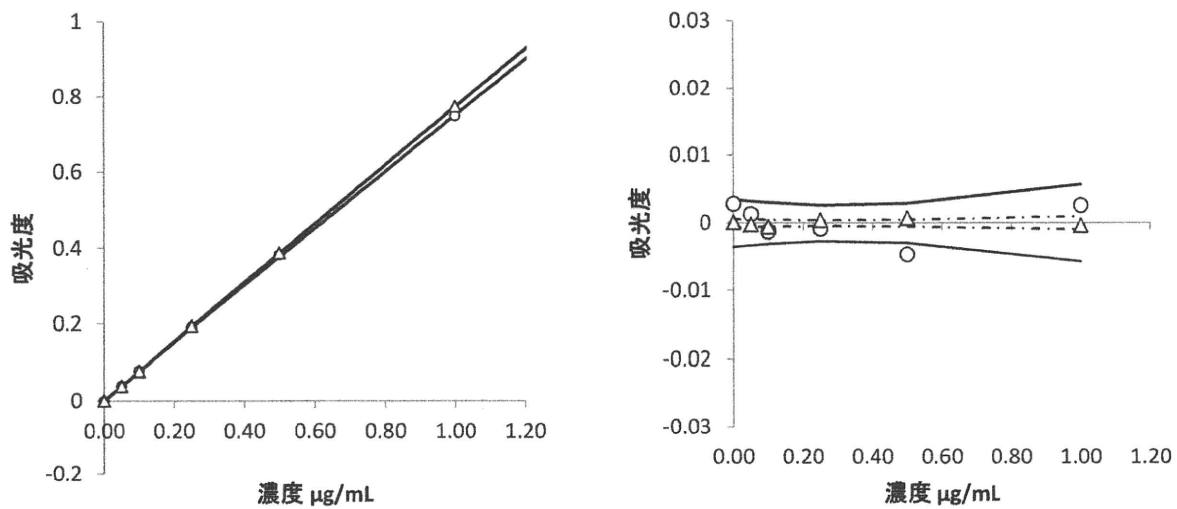


Fig. 4

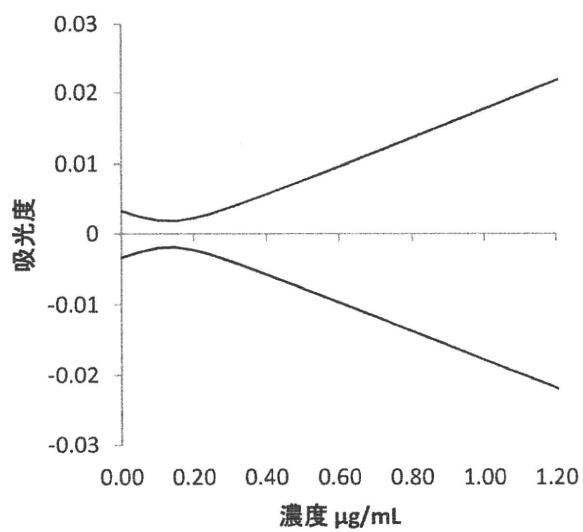


Fig. 5