

201033010B

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20年度～22年度 総合研究報告書

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20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 松岡 英明

平成23 (2011) 年 6月

## 目次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
III. 研究成果の刊行物・別刷	14

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）  
総合研究報告書

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

研究代表者 松岡英明 東京農工大学大学院工学研究院 教授

**研究要旨**

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。

理化学分析では、能試験結果に基づく、食品中の農薬、重金属、食品添加物の分析結果に伴う不確かさの推定、食品添加物の室内妥当性評価結果の基づく、各分析値の不確かさの推定、食品中のシアン化合物、鉛、硝酸塩の分析結果の不確かさへの検量線の影響の評価を行った。

生化学分析では、共同試験による、リアルタイム PCR 法における使用機種の違いによる不確かさの推定、遺伝子組換え大豆の認証標準試料を使用したリアルタイム PCR における DNA 抽出法の違いによる不確かさの推定、特定原材料(アレルギー誘発物質)の ELISA 法による定量における不確かさの推定と寄与要因の検討を行った。

微生物分析では、一般細菌数の目視及び装置による計測の技能試験結果の解析、食品中あるいは食品表面の汚染菌数（一般細菌）の測定試験、単一試験所における繰返し試験データに基づく、大腸菌群数測定の不確かさの推定を行った。

一方、調査研究では、統計学の専門家を含む 10 名の専門調査委員等の協力要請、2007～2010 に発表された関連研究論文の内容分析、関連国際規格の調査、重要課題の抽出と重点的議論、国内外の関連機関との情報交換、関連学会のシンポジウム等による公開討論を行った。

以上により、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。

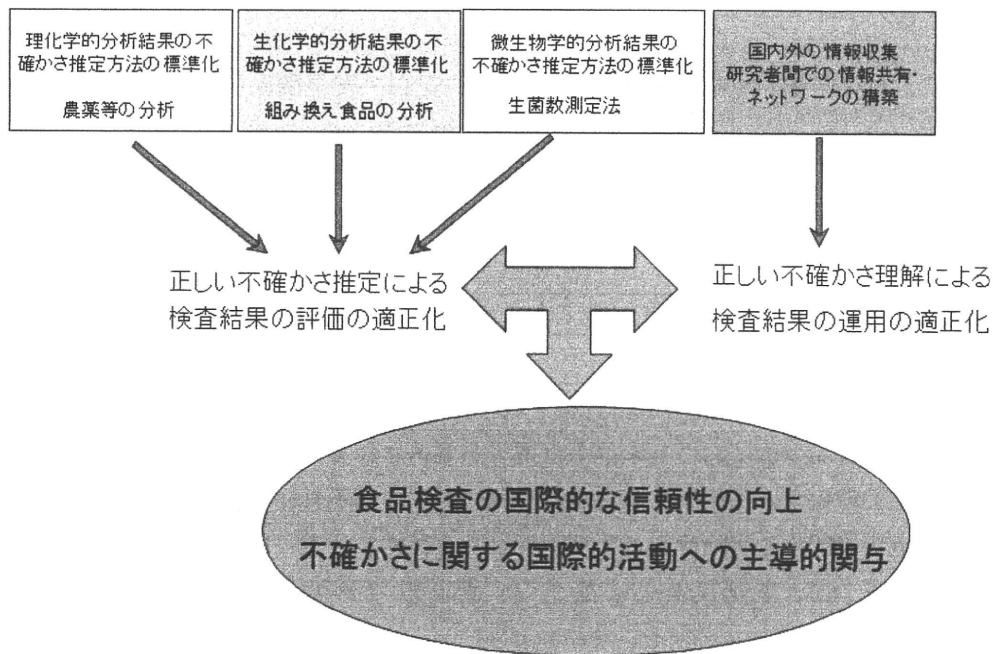


図 1-1 研究の構成と目標

**【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

**A. 研究目的**

国際的に測定値の不確かさの推定が要請されている。しかしその具体的推定法は分析法によって全く異なる。食品分析においては、食品マトリクスや分析対象物の多様性により、一般的な方法を提示することは難しいので、具体的な分析事例に対応して個別にプロトコールを考えなければならない。測定不確かさの概念の表現は明確でも、それを個々の具体的な事例に即して解釈する段階で、否応なく任意性が出てくる。そして、それが、困惑と混乱を生み出すことになる。

こうした状況に対処するために、本研究では、具合的な食品分析事例に即して、実際に測定不確かさを推定する実験研究を実施し、その経験に基づいて、できるだけ一般的議論ができるような基礎データを蓄積することを第一の目標とした。それを実施するために、理化学、生化学、微生物学の各分野における実験研究をそれぞれ担当する分担研究者3名を配した。

一方、測定不確かさの問題は、試験法の妥当性確認や試験所認定に関わっている国際機関にとっても重要であり、その具体的対応のために、緊密な連携の下、情報交換や技術協力をしているはずである。そうした動向を良く理解するとともに、自らも積極的にパートナーシップを発揮していくことが重要と思われる。そこで、本研究では、測定不確かさの問題に高い関心をお持ちの産官学の専門家のご協力を得て、測定不確かさの推定に関わる研究動向の調査を第二の目標とした。

以上により、測定不確かさに関する国際的活動に主導的に関与し、食品検査の国際的な信頼性を確保することを目指した。

**B1. 実験研究の方法と成果の概要**

**(1) 理化学分析における不確かさ**

初年度は、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。アナライズ毎に、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。表2

ー1に一例を示す。この値から推定した拡張不確かさは、分析法を特定し、また技能試験で満足できる成績を得た機関の分析に適用可能であると結論された。

平成21年度は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を推定を試みた。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（表2-2）。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。

平成22年度は、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（表2-3）、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（図2-1）。

## (2) 生化学分析における不確かさ

初年度は、生化学的分析法の一例として組換えDNA技術応用食品を対象としたリアルタイムPCR法を取り上げ、1)検量線の繰り返し測定、2)規定濃度の組換えDNA配列を含む溶液の多重測定を、全国25機関の地方衛生研究所等の協力の下、複数種のリアルタイムPCR機器を用いた共同試験として実施した。共同試験の結果は、リアルタイムPCRデータ（第一義的な測定量として得られる蛍光データ）として回収し、本データを高い自由度をもって解析することを目的に開発したアプリケーション（*GiMet*）により種々の条件下で解析した。その結果、人的要因とは別に、リアルタイムPCR機器の性能や、検量線のデザインが測定値の偏りやばらつきに影響を与える主要因の一つ

となっていることが明らかになった。また、その大きさはリアルタイムPCR機器によって異なっており、機器を個別に考えた場合には推定される不確かさもまた異なると予測された（図3-1）。

平成21年度は、遺伝子組換え大豆認証標準試料（認証値は重量比として2%）を単一試験室内で繰り返し分析することにより得られた測定値に基づき、分析の全工程を通じて得られる測定値の不確かさの推定方法について検討した。検討に当たっては、DNA抽出に複数の方法を採用し、これらを同一の試験計画中で実行する事により、抽出法ごとの不確かさの推定を試みた。その結果、1)DNAの測定値に2種の測定方法間での有意差が認められること、2)DNA抽出法間でDNAの収量に差が認められること、3)リアルタイムPCR法により得られる測定値であるコピー数の変動は、併行抽出間に比べ測定間の効果を含む抽出日間で大きい事、4)コピー数に基づき算出される混入率の変動は4種のDNA抽出法の間で12.2~27.3%(RSD%)と推定され、これを真値の存在範囲ととらえれば不確かさとなる（図3-2）。

平成22年度は、規格への適合判定に使用される生化学分析法のもう一つの例として、特定原材料（アレルギー誘発物質）の定量を目的としたELISA法を取り上げ、同様に不確かさの推定と寄与要因の検討を試みた。試料には、一定量の卵ならびに牛乳およびそれら由来のタンパク質を添加し、均質性を考慮して調製したモデル加工食品（畜肉ソーセージ）を用いた。調製した試料を規定した計画に従い単一試験室内で繰り返し分析し、得られた測定値に基づき、分析の全工程を通じて得られる測定値の不確かさを推定した。その結果、キットと分析対象タンパク質との全組み合わせを通じ、得られた測定値のばらつきは、室内精度(RSD%)として5.5~19.8%と推定された（表3-1）。これを真値の存在範囲ととらえれば、標準不確かさとなる。

## (3) 微生物分析における不確かさ

初年度は、トップダウン方式の一つである「技能試験のデータに基づく不確かさの推定」手法を用いて、一般細菌数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた。平成17~19年度に実施された食品衛生外部精度管理調査の一般細菌数測定データに基づいて不確かさを推定した結果、拡張不確かさは0.24~0.26(log<sub>10</sub>)とほぼ一定の値であった（表4-1）。

平成21年度は、トップダウン方式の1つであり、試験所単独で実施が可能な「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、一般細菌数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた。複数の試料について不確かさを推定した結果、得られた拡張不確かさ(log<sub>10</sub>)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(図4-1)。

平成22年度は、「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、大腸菌群数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた(表4-2)。デソキシコーレイト寒天培地を用いた混積培養法により不確かさを推定した結果、大腸菌を単一に含む液体試料においては、同時に推定した一般細菌数の拡張不確かさと同等の値であったが、鶏挽き肉(不特定多数の細菌を含む試料)について推定した拡張不確かさは、同時に推定した一般細菌数の拡張不確かさの約3.4～4倍大きな値となった。また、デソキシコーレイト寒天培地上に生育しているすべての集落(定型及び非定型集落)の総数について、不確かさを推定した結果、一般細菌数の不確かさと同等の値であったことから、定型集落の鑑別技能は大腸菌群数の測定の不確かさに大きく関与する要因であることが確認された。

## B2. 調査研究の方法と成果の概要

初年度は、理化学的分析や生化学的分析と比較して、測定不確かさの要因分析や推定理論などに関して遅れている微生物学分析・試験に焦点を絞って、最新の文献情報に基づく動向調査を行った。3名の統計学の専門家を委員あるいはオブザーバーとして含む専門調査委員会を設置し、調査、情報分析、重点課題についての専門的議論等を行った。同委員会には、平成22年度から2名の委員が加わった(表5-1)。

平成21年度は、研究論文および関連規格を調査し、離散量(菌数)の扱い、外れ値検定、ロバスト法、生菌標準物質などを重要課題として抽出し、議論を深めた。

平成22年度も引き続き、最新の研究論文、関連規格等について調査し、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議論を深めた。その結果、図5-1の結論を得た。図5-2および図5-3に、それぞれ平成21、22年度に調査した主要な研究論文、および関連規格を示す。また、図5-1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」(AOACIJS 2010 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」(AOACIJS 2011 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。以上の調査研究の結果は「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」と題し、平成22年度総括・分担研究報告書の添付資料1としてまとめられた(内容の項目を図5-4に示す)。

## C. 結論

以上の実験研究、調査研究によって、結論として、次のような認識を得た。

- ①全ての分析法・試験法に適用できるような、いわゆるオールマイティの「測定不確かさ推定プロトコール」を作成することはほとんど不可能
- ②個々の分析法の内容に応じて合理的な測定推定法を考えることが必要
- ③学術論文等で発表される事例研究の継続調査が重要
- ④国際会議、あるいは国際的学術誌での発表を通して、国際関連機関との継続的情報交換が戦略的に重要
- ⑤測定不確かさの要因分析が基本で、これに基づく科学的研究課題(基礎科学、応用科学、あるいは行政科学)の提言、企画、実施が必要
- ⑥個別の分析法・試験法での事例研究は不可欠ではあるが、科学的方法論に立脚した理念の構築はさらに重要
- ⑦文化、歴史の異なる国際社会で先導あるいは協調するためには、科学的方法論に立脚した理念が不可欠

## D. 研究を終えるにあたって

専門調査委員としてご協力頂いていました統計数理研究所の藤田利治教授が2011年2月15日にご病気のため急逝されました。誠実なお人柄で、食品分析分野と統計学の連携を強力に進めるために注いで頂いた情熱に、どれほど勇気づけられたことかわかりません。亡くられる直前まで必死に責務を果たそうと苦闘されていたことを、後で知りました。道半ばで他界されること、さぞご無念であったろうとお察しし胸が痛みます。心からご冥福をお祈りいたします。合掌。

本研究に対してご支援頂きました厚労科研に対し心より感謝申し上げます。分担研究者、専門調査委員、アドバイザーは言うまでもなく、それ以外にも、多くの方々にご教授、ご助力頂きました。ここに感謝の意を表します。厚労科研の趣旨に沿った成果として、十分であったか不安が残りますが、ひとえに研究代表者の力量不足の故と反省しております。

表2-1 技能試験結果から推定した不確かさ

分析対象物	分析法		マトリクス	平均値 μg/g	室間精度 RSD%	室間精度 予測値 RSD%	HorRat	拡張不確かさ ±%
	前処理	定量						
サッカリンナトリウム	直接測定	HPLC	しょう油	469	5.5	6.3	0.87	11.1
			シロップ	151	3.3	7.5	0.44	6.6
			ジャム	60.0	4.2	8.6	0.49	8.5
	溶媒抽出	HPLC	しょう油	451	9.2	6.4	1.44	18.3
			シロップ	142	6.2	7.6	0.82	12.4
			ジャム	57.4	6.1	8.7	0.70	12.2
	透析	HPLC	しょう油	470	4.7	6.4	0.73	9.3
			シロップ	149	6.2	7.5	0.83	12.4
			ジャム	60.9	5.4	8.6	0.63	10.8
パラオキシ安息香酸 ブチル	水蒸気蒸留	HPLC	清涼飲料水	18.1	7.7	10.3	0.74	15.4
	直接		清涼飲料水	19.5	4.7	10.2	0.46	9.3
	溶媒抽出		清涼飲料水	19.8	5.4	10.2	0.53	10.9
	透析		清涼飲料水	19.1	6.1	10.3	0.59	12.2
	水蒸気蒸留		清涼飲料水	176	3.2	7.3	0.43	6.3
安息香酸	直接	HPLC	清涼飲料水	181	2.2	7.3	0.30	4.4
	溶媒抽出		清涼飲料水	174	5.8	7.4	0.78	11.5
	透析		清涼飲料水	180	3.1	7.3	0.43	6.3

表2-2 室内妥当性評価結果から推定した不確かさ

安息香酸					
食品	マーガリン	清涼飲料水	シロップ	リキュール	ジャム
添加濃度 mg/g	1	0.6	0.6	0.005	0.005
不確かさ %	1.9	2.0	1.4	3.3	5.2
拡張不確かさ %	3.9	4.0	2.9	6.7	10.4

ソルビン酸						
食品	ケチャップ	シロップ	練り製品	清涼飲料水	しょう油	チョコレート
添加濃度 mg/g	0.5	1	2	0.005	0.005	0.005
不確かさ %	1.2	0.9	2.6	2.2	7.4	11.3
拡張不確かさ %	2.4	1.7	5.2	4.4	14.7	22.7

サッカリンナトリウム						
食品	しょう油	清涼飲料水	シロップ	ソース	果実酒	乾燥梅
添加濃度 mg/g	0.5	0.3	0.3	0.3	0.01	0.01
不確かさ %	2.6	2.5	2.1	2.9	7.8	6.1
拡張不確かさ %	5.2	5.0	4.3	5.8	15.5	12.2

表2-3 測定値の不確かさへの検量線の寄与

シアン濃度 μg/mL	大豆	小豆	エンドウ	ソラマメ	ラッカセイ	検量線
5	3.1	6.0	2.4	4.1	3.6	0.9
10	3.3	5.1	2.4	1.7	3.9	1.1

シアン分析:2併行分析/d×5d  
 不確かさは、1.7~6.0RSD%の範囲  
 検量線による不確かさは1RSD%程度



図2-1 検量線の信頼区間推定 (理化学分析H22成果の例)

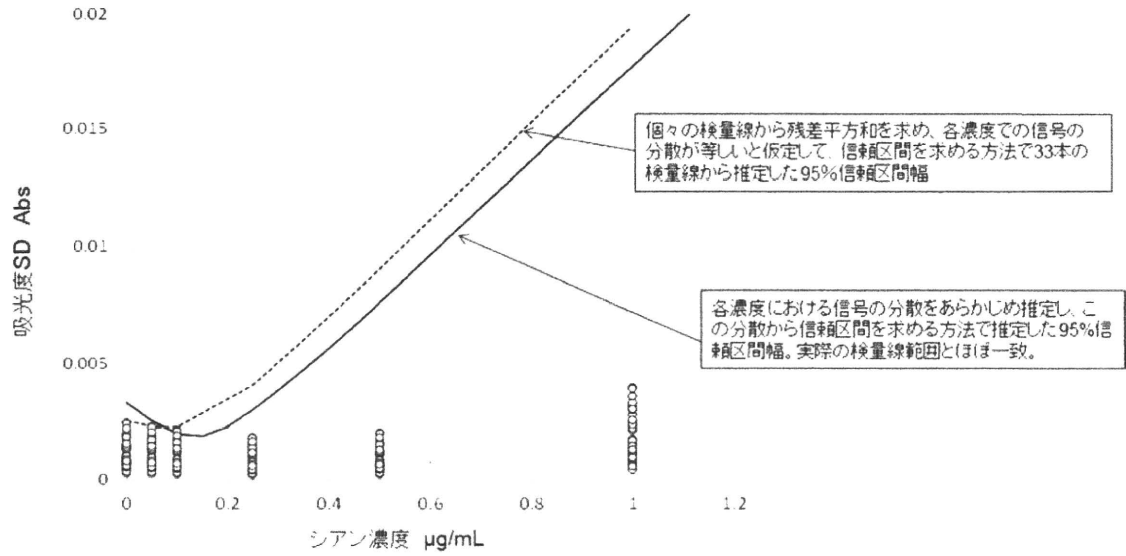


図3-1 リアルタイムPCR機器の機種による計測値(コピー数)のバラツキ

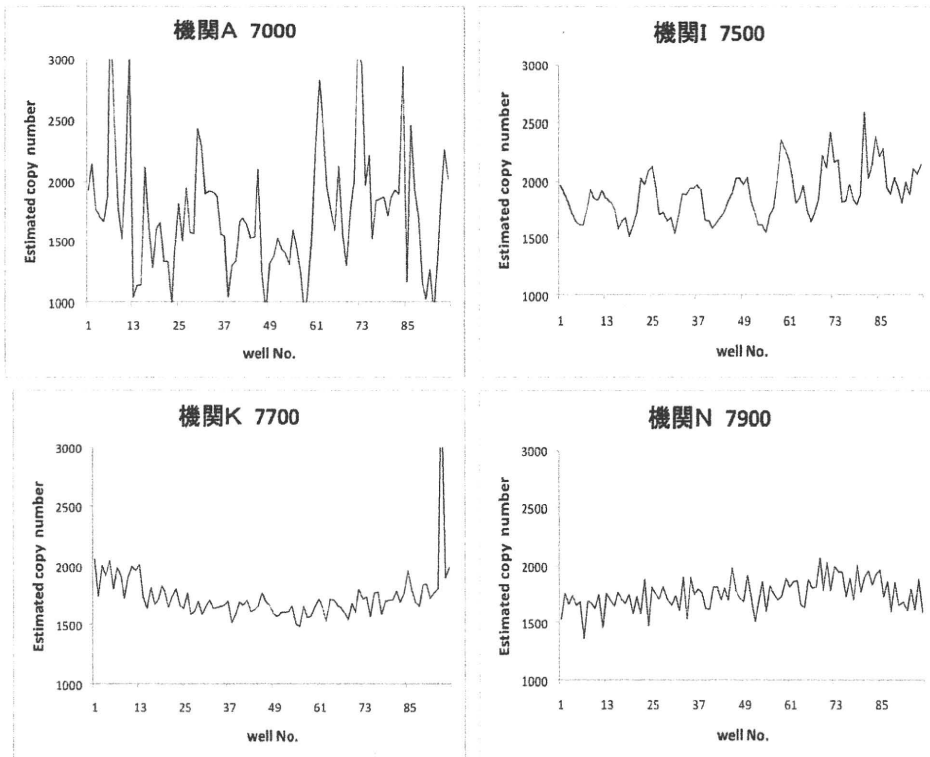


図3-2 定量PCR法により得られる測定値の不確かさ 推定方法の検討

DNA抽出法に依存した混入率の測定における標準不確かさ (RSD%)

mini 法 27.3%  
 resin法 23.9%  
 quicker法 12.2%  
 maxi法 13.1%

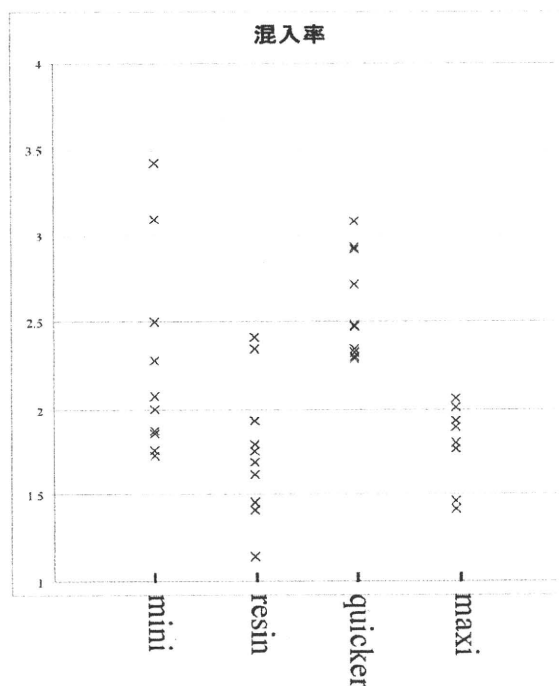


表3-1 分散分析結果

A. 牛乳

	ELISA kit A								ELISA kit B							
	25 H		15 H		5 H		CRM		25 H		15 H		5 H		CRM	
	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)
Between repeated analysis	0.32	2.7	0.43	3.7	0.22	1.9	0.13	6.9	0.27	3.4	0.23	3.0	0.45	6.5	0.18	8.4
Between day	0.41	3.5	0.48	4.1	0.49	4.2	0.07	3.8	0.89	11.5	0.78	10.4	0.61	8.8	0.09	4.2
Total	0.52	4.4	0.65	5.5	0.53	4.6	0.15	7.8	0.93	12.0	0.81	10.8	0.75	11.0	0.21	9.4

B. 卵

	ELISA kit A								ELISA kit B							
	25 H		15 H		5 H		CRM		25 H		15 H		5 H		CRM	
	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)	SD (μg/g)	RSD (%)
Between repeated analysis	0.13	2.7	0.13	3.0	0.11	3.5	0.03	1.3	0.17	3.1	0.24	4.8	0.16	4.2	0.03	1.6
Between day	0.68	14.3	0.63	15.0	0.61	19.9	0.05	2.7	1.16	21.0	0.94	19.2	0.83	22.2	0.12	6.7
Total	0.70	14.5	0.65	15.3	0.62	20.2	0.06	3.0	1.17	21.2	0.96	19.8	0.85	22.6	0.12	6.9

表4-1 技能試験のデータに基づく不確かさの推定

年度	集落計数法	データ数	平均 (log <sub>10</sub> )	標準偏差 (log <sub>10</sub> )	拡張不確かさ*1 (log <sub>10</sub> )
平成 17 年度	目視	215	3.718	0.13	0.26
	装置	30	3.686	0.12	0.24
	その他	6	3.677	0.06	0.12
平成 18 年度*2	目視	213	4.791	0.12	0.24
	装置	25	4.805	0.15	0.30
	その他	4	4.797	0.18	0.36
平成 19 年度	目視	240	5.057	0.12	0.24
	装置	26	5.049	0.13	0.26
	その他	4	4.926	0.23	0.46

図4-1 鶏挽き肉の一般細菌数測定における拡張不確かさ

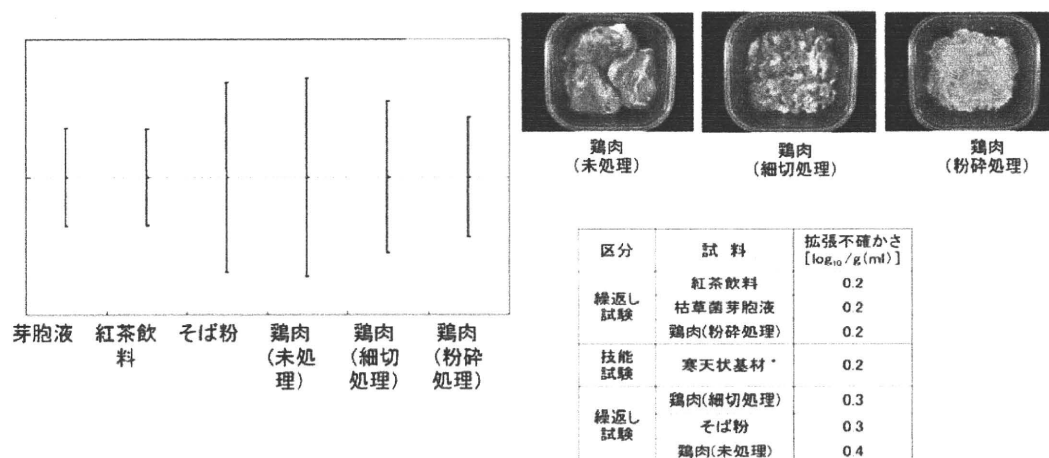


表4-2 大腸菌群数測定における不確かさの推定結果\*

試料	測定対象		標準不確かさ(s <sub>R</sub> )*2 [log <sub>10</sub> /g(ml)]	拡張不確かさ(2×s <sub>R</sub> ) [log <sub>10</sub> /g(ml)]	生菌数(対数)			
					4	5	6	
コーンスープ (大腸菌接種)	一般細菌数		0.07	0.14	-----			
	大腸菌群数(混積培養法)		0.07	0.14	-----			
	大腸菌群数(最確数(MPN)法)		0.36	0.73	-----			
鶏挽き肉	一般細菌数		0.09	0.18	-----			
	大腸菌群数 (混積培養法)	培地 注加量 10 ml	推定大腸菌群数	0.36	0.72	-----		
			確定大腸菌群数	0.26	0.52	-----		
			総生菌数	0.07	0.14	-----		
	大腸菌群数 (混積培養法)	培地 注加量 15 ml	推定大腸菌群数	0.36	0.72	-----		
			確定大腸菌群数	0.34	0.69	-----		
			総生菌数	0.09	0.17	-----		
	大腸菌群数 (混積培養法)	培地 注加量 20 ml	推定大腸菌群数	0.31	0.62	-----		
			確定大腸菌群数	0.28	0.55	-----		
総生菌数			0.08	0.17	-----			

表5-1 専門調査委員会

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	日水製菓	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
杉本敬明	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 曜子	日本適合性認定協会	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
逸見昌之	統計数理研究所	統計理論

図5-1 微生物分析における「測定不確かさ」に関する重点課題

1. 「室内試験データ数と室間試験における試験室数とのバランス」(ISO 5725-1)に関しては、推定された標準偏差(s)と真の標準偏差( $\sigma$ )の乖離の程度を表わす式に基づき十分に理解した。
2. 「低濃度における菌計数の場合の不確かさについて」(ISO/TS 19036 Amendment 2009)に関しては、使い方は理解できたが、統計学的な妥当性は検討の余地ありと、結論。
3. 「外れ値検定と他のロバスト法 (ISO 5725-5:1998、及びISO 16140) の理論的背景や具体的利用方法を理解した。特にISO16140の第6.3.4.2節に示された係数の根拠については、徹底的に究明中。
4. トップダウンでの評価に際して、最終的には、微生物標準物質が極めて重要であるとの共通認識を得た。
5. 離散量としての不確かさの推定に関して、その基本的な方向性の作成は、本来、統計学会等がやるべきこと。本研究としては、当面は不確かさ概念に関しては室間再現性で考えるということを基本とし、最終的に「ばらつき」と「バイアス」をきちんと切り分けておくことが肝要、という基本的スタンスを確認。
6. 不確かさの基準として、標準偏差(SD)を用いる場合と相対標準偏差(RSD)を用いる場合がある。例えば、ISO/TS 19036ではSDを用いており、A2LA (The American Association for Laboratory Accreditation)ではRSDを用いている。したがって、ヨーロッパではSDが、アメリカではRSDが主流との見方もある。しかし、統計的にどちらがより妥当であるとの議論はなく、厳密な使い分けは無い。
7. 従来、プレートカウントでは、30cfu以下の計数値は経験的に除外されてきたが、その根拠を示す実験結果がForsterによって報告された (J. AOAC Int., 2009)。
8. コロニー計数の基本である「コロニーの定義」、すなわち形状、色、光沢などに関しては、結論には至らなかったが、不確かさの大きな要因の一つであることは、認識された。
9. コロニー数のように計数型の場合はポアソン分布を仮定するが多いが、ポアソン分布では平均値が決まると自動的に分散が決まってしまう問題がある。そこで、平均値とは独立に分散を規定できる分布モデル、例えばネガティブ・バイノミアル (Negative binomial) 分布、あるいはポアソン分布の正規分布近似などの方が好ましい、と考えられる。
10. サンプルングから消費までの間に菌が減少するような条件であれば、サンプル量は125g (25g×5サンプル)、変化しない条件では250g (25g×10サンプル)、菌が増加するような条件では500g (25g×20サンプル) となっている例がある。このような条件の差をつけることの妥当性は理解できるが、具体的な数値、125、250、500などの厳密な科学的根拠はない。こうした経験値で決められた規格や基準に対して、合理的な対応することが極めて重要である。
11. 微生物試験における不確かさの推定は、トップダウン方式によらざるを得ない。しかしその前提として生菌標準物質が不可欠。そのため、標準生菌オンサイト調製法の開発が強く望まれる。

図5-2 微生物試験法の「測定不確かさ」に関する主要研究論文

- 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).  
(MPN法における不確かさ推定するための便利なExcel計算表を提示)
- 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と不確かさ推定)
- 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、定性試験のための不確かさ推定、定量試験における不確かさ推定)
- A.K. Guber, et al.: Uncertainty evaluation of coliform bacteria removal from vegetated filter strip under overlaid 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)
- 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)
- 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不確かさ)
- J.E.L. Corry, et al.: A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food Microb.* 24, 230-253 (2007).  
(不確かさ要因分析の詳細なレビュー)
- 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 委員長で、昨秋、来日し個人的に討論した)
- L.I. Forster: Measurement uncertainty in microbiology. *J. AOAC INTERN.* 86, 1089-1094 (2003).  
(ISO法に従って、浄水中菌数測定し、不確かさを推定)
- Executive summary, Statistics Working Group: AOAC INTERNATIONAL presidential task force on best practices for microbiological methodology. Appendix G-STWG ES 7-16-06, pp1-5..

図5-3 「測定不確かさ」に関連して調査した規格等(1/2)

- Official Methods of Analysis of AOAC International 18th Edition.
- ISO: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) (1993)
- ISO/IEC Guide 98-3: Uncertainty of measurement -- Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM: 1995)
- ISO16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods
- ISO 4832:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique.
- ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.
- 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)
- ISO/TR 13843: 2000 Water quality — Guidance on validation of microbiological methods
- 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  
  - JIS Z 8402-1 (ISO 5725-1)第1部: 一般的な原理及び定義
  - JIS Z 8402-2 (ISO 5725-2)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方法
  - JIS Z 8402-3 (ISO 5725-3)第3部: 標準測定方法の中間精度
  - JIS Z 8402-4 (ISO 5725-4)第4部: 標準測定方法の真度を求めるための基本的方法
  - JIS Z 8402-5 (ISO 5725-5)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)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

図5-3 「測定不確かさ」に関連して調査した規格等(2/2)

- APLAC TC 005 (No.1): Interpretation and Guidance on the Estimation of Uncertainty of Measurement in Testing (No.1, 03/2003) (No.4, 09/2010)
- APLAC TC 010 (No.2): GENERAL INFORMATION ON UNCERTAINTY OF MEASUREMENT (09/2010)
- MicroVal Rules and Certification Scheme. (Version 6) (06/2010)
- NMKL Procedure No. 8, Version 4: Measurement of uncertainty in quantitative microbiological examination of foods. (09/2008)
- EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (2nd ed.). A. Williams, S. L. R. Ellison, M. Roesslein (eds.) (2000)
- EURACHEM/EUROLAB/CITAC/NORDTEST Guide: Estimation of Measurement Uncertainty arising from Sampling. (2007)
- EURACHEM/CITAC Guide: Use of Uncertainty Information in Compliance Assessment (1st ed.). S. L. R. Ellison, A. Williams (eds.) (2007)
- CAEAL: Policy on the estimation of uncertainty measurement in environmental testing (2003), [http://www.caeal.ca/P19\\_CAEAL\\_Unce\\_Pol.pdf](http://www.caeal.ca/P19_CAEAL_Unce_Pol.pdf).
- G108- Guidelines for estimating uncertainty for microbiological counting methods. *A2LA Guidance Document* (2007).
- CCPR (Codex Committee on Pesticide Residues) Specific Guidelines for Pesticide Residue Analysis

図5-4 平成22年度総括・分担研究報告書の添付資料1としてまとめた「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」の内容

1. はじめに
2. 関連国際機関の対応
  - (1) APLAC
  - (2) EURACHEM/CITAC
  - (3) NMKL/NordVal
  - (4) CEN/MicroValとAFNOR
  - (5) AOAC INTERNATIONAL
  - (6) Codex
  - (7) ISO TC 69「統計的方法の適用」SC6
3. 測定不確かさの意味
4. 微生物試験の目的と測定不確かさの推定
  - (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
  - (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
  - (3) 試験法の測定不確かさを推定する場合
  - (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
5. 測定不確かさの要因に関する研究動向
  - 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
  - 5.2. コロニー計数
    - (1) コロニーの定義
    - (2) コロニーの計数値の上限と下限
  - 5.3. 標準偏差 (SD) と相対標準偏差 (変動係数) (RSD)
  - 5.4. 最確数(MPN)法
  - 5.5. 定性試験における測定不確かさ
6. 迅速法に関わる試験法における測定不確かさ推定
7. 標準物質の利用
  - 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
  - 7.1. 生菌標準物質の要請
8. おわりに

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

《原著論文》

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
田中廣行、土屋禎、大島赴夫、鈴木達也、 <u>工藤由起子</u>	技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定	日本食品微生物学会雑誌	27	158-162	2010
荒木恵美子、重富智也、 <u>斉藤美佳子</u> 、 <u>松岡英明</u>	Percoll 密度勾配遠心分離法による難濾過性食品からの生菌分離における定量性	日本防菌防黴学会誌	38	21-27	2010
E. Araki, T. Matsuzaki, T. Sekita, M. Saito, H. <u>Matsuoka</u>	Development of a Density Slicer for the Simple Collection of Respective Density Layers after Stepwise Density Gradient Centrifugation	Biocontrol Sci.	15	39-43	2010
<u>渡邊敬浩</u> 、 <u>米谷民雄</u> 、 <u>松田りえ子</u>	リアルタイム PCR 法における検量線に基づき推定されるコピー数の変動要因	食品衛生学雑誌	50(1)	1-5	2009
<u>渡邊敬浩</u> 、 <u>松田りえ子</u>	TaqMan Chemistry に基づくリアルタイム PCR により得られるデータの新規解析ソフトウェア( <i>GiMlet</i> )の開発とそれを用いた Ct 値変動要因の検討	食品衛生学雑誌	50 (5)	208-215	2009

《著書、解説等》

著者	タイトル	書籍名 (編者)	出版社	ページ	出版年
後藤哲久、 <u>安井明美</u> 、五十君静信、 <u>松岡英明</u>	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、他、編)	サイエンスフォーラム	第 2 章 1 -I 節 pp10-27	2010
<u>松岡英明</u>	微生物試験法の妥当性確認と不確かさの推定	同上	同上	第 7 章 1 節 pp223-231	2010
<u>斉藤美佳子</u> 、 <u>松岡英明</u>	微生物の迅速検出法	日本防菌防黴学会誌	36	99-105	2008
島北寛仁、 <u>斉藤美佳子</u> 、 <u>松岡英明</u>	微生物迅速検査装置「バイオプロラ」	食品工業	51(16)	34-42	2008

《学会、シンポジウム等発表》

発表者	タイトル	学会名	開催地	年月日
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	平成 23 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	平成 23 年 1 月 21 日
諸藤 圭、土屋 禎、田中廣行、 <u>工藤由起子</u>	試験室内における繰返し試験データに基づく生菌数の不確かさの推定	第 31 回日本食品微生物学会学術総会	滋賀	平成 22 年 11 月
松田りえ子	食品分析において統計学はどこまで適用できるか	AOAC インターナショナル日本セクション 第 13 回総会・2010 シンポジウム	東京	平成 22 年 6 月 5 日
渡邊敬浩	生化学分析法により得られる測定値の特性とそれに応じた統計解析手法の検討	AOAC インターナショナル日本セクション 第 13 回総会・2010 シンポジウム	東京	平成 22 年 6 月 5 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	平成 22 年 5 月 26 日
渡邊敬浩、白政優子、 <u>松田りえ子</u>	リアルタイム PCR 法により得られる測定値の不確かさの推定	第 99 回 日本食品衛生学会学術講演会	東京	平成 22 年 5 月 13 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	平成 21 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	平成 21 年 9 月 4 日
土屋 禎、田中廣行、鈴木達也、大島赴夫、 <u>渡邊敬浩</u> 、 <u>松田りえ子</u> 、 <u>松岡英明</u> 、 <u>工藤由起子</u>	技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定	第 30 回日本食品微生物学会学術総会	東京	平成 21 年 10 月
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	平成 21 年 5 月 15 日
渡邊敬浩、大森清美、 <u>峯岸恭孝</u> 、 <u>松田りえ子</u>	リアルタイム PCR により得られる測定値の変動要因	第 97 回 日本食品衛生学会学術講演会	東京	平成 21 年 5 月 14 日



= 調 査 =

## 技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定

田中 廣行<sup>\*1,†</sup>・土屋 禎<sup>\*1</sup>・大島 赴夫<sup>\*2</sup>  
鈴木 達也<sup>\*2</sup>・工藤 由起子<sup>\*3</sup>(\*<sup>1</sup>財団法人日本食品分析センター, \*<sup>2</sup>財団法人食品薬品安全センター, \*<sup>3</sup>国立医薬品食品衛生研究所)  
(受付 平成 22 年 6 月 24 日)  
(受理 平成 22 年 7 月 23 日)Estimation of Measurement Uncertainty for Aerobic Plate Counts  
from Proficiency Testing DataHiroyuki TANAKA<sup>\*1,†</sup>, Tadashi TSUCHIYA<sup>\*1</sup>, Yukio OHSHIMA<sup>\*2</sup>,  
Tatsuya SUZUKI<sup>\*2</sup> and Yukiko HARA-KUDO<sup>\*3</sup>(\*<sup>1</sup>Japan Food Research Laboratories, Motoyoyogi-cho, Shibuya-ku, Tokyo 151-0062;  
† Corresponding author)(\*<sup>2</sup>Food and Drug Safty Center, Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257-8523)(\*<sup>3</sup>National Institute of Health Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

## 緒 言

近年、食品にかかわる試験分野においても試験結果に伴う測定の不確かさを評価し、提示することが国際的に求められてきている。試験所の能力に関する一般的な要求事項を定めた国際規格 ISO/IEC 17025: 2005<sup>2)</sup>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」を求めている。また、食品衛生検査施設および登録検査機関が行う食品衛生法に基づく製品検査の業務などを対象とした業務管理要領<sup>4,5)</sup>では「精度管理及び外部精度管理等の結果に基づいた測定の不確かさの評価の検討に努めること」を求めている。このように、試験結果に伴う測定の不確かさを推定することは、試験結果の信頼性を確保するうえで重要な活動であり、食品にかかわる微生物学的試験においても例外ではない。

測定の不確かさを推定する方法は、不確かさに関与する要因(試験工程)ごとに不確かさを見積もり、すべての不確かさを積み上げるボトムアップ方式と、一連の試験工程を経て得られる試験データに基づき試験法の精度を求めるトップダウン方式に大別される<sup>3)</sup>。ただし、食品にかかわる微生物学的試験の場合は、①試験対象が微生物(生物)であること、②指定された測定条件(培地、

培養温度・時間など)により実施される「条件試験(測定結果が測定条件に依存する試験)」であること、③複雑な食品マトリックス(種類・成分)の中から、複数の工程を経て特定の微生物を検出・計数する試験であることなどから、ボトムアップ方式を適用することは困難である。したがって、食品にかかわる微生物学的試験において適切な不確かさの推定方法を検討・確立することが重要な課題となっている。

筆者らはトップダウン方式の一手法として、技能試験データに基づき細菌数の不確かさの推定を試みるとともに、技能試験における各試験所の試験実施条件に関する情報の解析を行ったので報告する。

## 材料および方法

## 1. 食品衛生外部精度管理調査

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所により実施されている食品衛生外部精度管理調査のうち、2005～2007年度の細菌数測定データ(各試験所3回測定)を対象とした。当該調査では、調査試料として寒天状基材中に *Bacillus subtilis* 芽胞液を均一に分散させて調製した模擬食材が用いられていた。また、主催者により測定された調査試料の平均値(/g)および標準偏差(/g)は、2005年度が  $4.58 \times 10^3$  および  $9.77 \times 10^2$ 、2006年度が  $4.52 \times 10^4$  および  $1.01 \times 10^4$ 、2007年度が  $1.20 \times 10^5$  および  $1.59 \times 10^4$  であった。

なお、食品衛生外部精度管理調査は食品衛生検査施設

† 連絡先

\*<sup>1</sup> ☎151-0062 東京都渋谷区元代々木町 52-1\*<sup>2</sup> ☎257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5\*<sup>3</sup> ☎158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

表1. 食品衛生外部精度管理調査データに基づく細菌数の不確かさの推定結果

	2005年度	2006年度	2007年度
解析データ数	251	243	270
平均値 (log/g)	3.71	4.79	5.05
真数に変換した平均値 (/g)	$5.2 \times 10^3$	$6.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$
標準偏差 (log/g)	0.13	0.13	0.12
拡張不確かさ (log/g)* <sup>1</sup>	0.26	0.26	0.24
不確かさの表示 (log/g)* <sup>2</sup>	$3.71 \pm 0.26$	$4.79 \pm 0.26$	$5.05 \pm 0.24$
真数に変換した不確かさの表示 (/g)			
平均値 - 拡張不確かさ	$2.8 \times 10^3$	$3.4 \times 10^4$	$6.5 \times 10^4$
平均値 + 拡張不確かさ	$9.4 \times 10^3$	$1.1 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$

\*<sup>1</sup> 標準偏差 (log) × 2 (包含係数)\*<sup>2</sup> 平均値 ± 拡張不確かさ

表2. 試験実施者の実務年数に関する情報の解析結果

年度	年数区分	データ数	平均値 (log/g)	標準偏差 (log/g)	拡張不確かさ* (log/g)
2005	0	18	3.72	0.10	0.20
	1	28	3.67	0.14	0.28
	2	23	3.72	0.12	0.24
	3	25	3.71	0.15	0.30
	4	24	3.68	0.15	0.29
	5	21	3.67	0.12	0.25
	6~7	28	3.73	0.12	0.24
	8~10	28	3.73	0.14	0.28
	11~16	27	3.74	0.11	0.23
17~	29	3.75	0.12	0.25	
2006	0	21	4.76	0.15	0.31
	1	27	4.84	0.11	0.22
	2	33	4.77	0.12	0.23
	3	21	4.74	0.16	0.32
	4	20	4.81	0.10	0.20
	5~6	36	4.78	0.14	0.28
	7~9	33	4.79	0.12	0.24
	10~14	26	4.82	0.07	0.14
	15~	26	4.82	0.15	0.29
2007	0	25	5.08	0.10	0.20
	1	36	5.04	0.13	0.25
	2	25	5.05	0.15	0.30
	3	31	5.02	0.12	0.24
	4~5	36	5.05	0.12	0.24
	6~8	34	5.05	0.12	0.24
	9~11	32	5.07	0.11	0.22
	12~17	26	5.06	0.13	0.26
	18~	25	5.08	0.09	0.18

\* 標準偏差 (log) × 2 (包含係数)

(国, 都道府県等が設置した検査施設) および登録検査機関を対象とした技能試験プログラムであり, 食品衛生法施行規則により本調査への定期的な参加が義務づけられている。

## 2. 細菌数の不確かさの推定

各試験所の細菌数測定データのうち, 「食品, 添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号) の第1食品D各条〇冷凍食品」における細菌数 (生菌数) の測定法 (試料採取量 25 g; 標準寒天培地, 35 ± 1 °C, 24 ± 2 時間培養) により測定されたデータを抽出した。

抽出した各試験所の測定データを常用対数に変換した後, 試験所ごとに3回の測定データの平均値を算出した。次に, スミルノフ・グラブス検定 (有意水準 5%) により各平均値の外れ値の有無を確認し, 確認された外れ値を除外して解析データとした。解析データから平均値および標準偏差を算出し, 拡張不確かさを求めた。

## 3. 試験実施条件に関する情報の解析

食品衛生外部精度管理調査における各試験所の試験実施条件に関する情報の解析を行った。なお, 解析の対象とした情報は, ①試験実施者の実務年数, ②試料調製時

表3. フィルター処理の有無に関する情報の解析結果

年度	フィルター処理	データ数	平均値 (log/g)	標準偏差 (log/g)	拡張不確かさ* (log/g)
2005	あり	235	3.70	0.13	0.26
	なし	16	3.85	0.05	0.11
2006	あり	227	4.79	0.13	0.26
	なし	16	4.86	0.07	0.13
2007	あり	248	5.05	0.12	0.24
	なし	22	5.11	0.09	0.18

\* 標準偏差 (log)×2 (包含係数)

表4. 試料調製時間に関する情報の解析結果

年度	試料調製時間*1	データ数	平均値 (log/g)	標準偏差 (log/g)	拡張不確かさ*2 (log/g)
2005	1分間	193	3.71	0.13	0.26
	2分間	33	3.77	0.10	0.20
	3分間	7	3.77	0.13	0.26
	その他	18	3.61	0.15	0.30
2006	1分間	199	4.79	0.12	0.25
	2分間	21	4.82	0.13	0.25
	3分間	9	4.88	0.05	0.10
	その他	14	4.72	0.19	0.39
2007	1分間	221	5.05	0.12	0.24
	2分間	25	5.08	0.08	0.16
	3分間	7	5.06	0.14	0.27
	その他	17	5.04	0.13	0.27

\*1 その他: 30秒間, 5分間など

\*2 標準偏差 (log)×2 (包含係数)

表5. 集落計数法に関する情報の解析結果

年度	集落計数法*1	データ数	平均値 (log/g)	標準偏差 (log/g)	拡張不確かさ*2 (log/g)
2005	目視	215	3.72	0.13	0.27
	計数装置	30	3.69	0.12	0.24
	その他	6	3.68	0.06	0.11
2006*3	目視	213	4.79	0.12	0.25
	計数装置	25	4.80	0.15	0.31
	その他	4	4.80	0.18	0.37
2007	目視	240	5.06	0.12	0.23
	計数装置	26	5.05	0.13	0.27
	その他	4	4.93	0.23	0.46

\*1 その他: 拡大鏡, 実体顕微鏡など

\*2 標準偏差 (log)×2 (包含係数)

\*3 集落計数法が不明な1データを除外した。

におけるフィルター処理(ろ過処理)の有無, (3)ホモジナイザーなどによる試料調製時間および④集落の計数方法の4項目とした。

#### 1) 試験実施者の実務年数に関する情報の解析

試験実施者の人数がほぼ同程度となるように解析データを9または10のグループに区分した。次に、グループごとに平均値、標準偏差および拡張不確かさを算出し、グループ間および年度間の比較を行った。

#### 2) 試料調製時におけるフィルター処理の有無に関する情報の解析

解析データを「処理あり」および「処理なし」の二つのグループに区分した。次に、グループごとに平均値、

標準偏差および拡張不確かさを算出し、グループ間および年度間の比較を行った。

#### 3) ホモジナイザーなどによる試料調製時間に関する情報の解析

解析データを試料調製時間「1分間」「2分間」「3分間」および「その他」の四つのグループに区分した。次に、グループごとに平均値、標準偏差および拡張不確かさを算出し、グループ間および年度間の比較を行った。

#### 4) 集落計数法に関する情報の解析

解析データを「目視」「計数装置(コロニーカウンター)」および「その他」の三つのグループに区分した。次に、グループごとに平均値、標準偏差および拡張不確

かさを算出し、グループ間および年度間の比較を行った。

## 結果および考察

### 1. 細菌数の不確かさの推定

2005～2007年度に実施された食品衛生外部精度管理調査において、細菌数の調査に参加した試験所は2005年度が417機関、2006年度が357機関、2007年度が381機関であった。このうち、冷凍食品の試験法により細菌数を測定した試験所を抽出した結果、2005年度は252機関、2006年度は249機関、2007年度は272機関であった。

次に、抽出した各試験所の細菌数測定データを常用対数に変換した後、試験所ごとに平均値を算出した。各平均値についてスミルノフ・グラブス検定（有意水準5%）により外れ値の有無を確認した結果、2005年度は1データ、2006年度は6データ、2007年度は2データが外れ値と判定された。外れ値を除外した解析データから平均値、標準偏差および拡張不確かさを算出した結果を表1に示した。解析データの平均値は年度により異なっており、真数に変換した場合、2005年度が $5.2 \times 10^3$ /g、2006年度が $6.2 \times 10^4$ /g、2007年度が $1.1 \times 10^5$ /gと最大で約20倍の差異が認められた。一方、包含係数を2として算出した拡張不確かさ(log/g)は、2005年度および2006年度が0.26、2007年度が0.24とほぼ一定の値であった。また、「平均値±拡張不確かさ」の値を真数に変換した場合、各年度とも平均値の1/2～2倍の範囲内の値であった。

### 2. 試験実施条件に関する情報の解析

#### 1) 試験実施者の実務年数に関する情報の解析

試験実施者の実務年数に関する情報をもとに、試験実施者（2005年度251人、2006年度243人、2007年度270人）の人数がほぼ同程度となるように解析データを9から10のグループに区分した。グループごとに平均値、標準偏差および拡張不確かさを算出した結果を表2に示した。

各グループの平均値(log/g)は、2005年度が3.67～3.75、2006年度が4.74～4.84、2007年度が5.02～5.08の範囲にあった。真数(/g)に変換した場合、2005年度が $4.7 \times 10^3 \sim 5.6 \times 10^3$ 、2006年度が $5.5 \times 10^4 \sim 6.9 \times 10^4$ 、2007年度が $1.0 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ の範囲にあり、いずれの年度においても、グループ間に顕著な差異は認められなかった。

一方、各グループの拡張不確かさ(log/g)は、2005年度が0.20～0.30、2006年度が0.14～0.32、2007年度が0.18～0.30の範囲にあったが、拡張不確かさと試験実施者の実務年数との間に顕著な相関は認められなかった。

以上の結果から、試験実施者の実務年数は不確かさに関与する主要な要因ではないと推測された。

#### 2) 試料調製時におけるフィルター処理に関する情報の解析

試料調製時におけるフィルター処理に関する情報をもとに、解析データを「処理あり」および「処理なし」の二つのグループに区分した。グループごとに平均値、標準偏差および拡張不確かさを算出した結果を表3に示した。

「処理なし」の平均値(log/g)に対する「処理あり」の平均値(log/g)の割合は、2005年度が0.96、2006年度が0.98、2007年度が0.99であり、いずれの年度においても「処理あり」の平均値は「処理なし」の平均値よりも小さな値であった。一方、「処理なし」の拡張不確かさ(log/g)に対する「処理あり」の拡張不確かさ(log/g)の割合は、2005年度が2.42、2006年度が1.96、2007年度が1.34であり、いずれの年度においても、「処理あり」の拡張不確かさは「処理なし」の拡張不確かさよりも大きな値であった。

以上の結果から、フィルター処理の有無は不確かさに関与する要因である可能性が示唆された。ただし、食品衛生外部精度管理調査では試料が寒天状基材、対象微生物が*Bacillus subtilis*（芽胞）と設定されている。したがって、限定された条件下で測定されたデータの解析結果であるため、今回の解析結果が食品全般を対象とした微生物学的試験に適用されるかは明らかではなく、さらなる検討・解析を要すると考えられた。

#### 3) 試料調製時間に関する情報の解析

試料調製時間に関する情報をもとに、解析データを「1分間」「2分間」「3分間」および「その他」の四つのグループに区分した。グループごとに平均値、標準偏差および拡張不確かさを算出した結果を表4に示した。

各グループの平均値(log/g)は、2005年度が3.61～3.77、2006年度が4.72～4.88、2007年度が5.04～5.08の範囲にあった。また、真数(/g)に変換した場合、2005年度が $4.1 \times 10^3 \sim 5.9 \times 10^3$ 、2006年度が $5.3 \times 10^4 \sim 7.6 \times 10^4$ 、2007年度が $1.1 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ の範囲にあった。いずれの年度においても、「その他」の平均値は最も小さな値であったが、「1分間」「2分間」および「3分間」の平均値においては、顕著な差異は認められなかった。

一方、各グループの拡張不確かさ(log/g)は、2005年度が0.20～0.30、2006年度が0.10～0.39、2007年度が0.16～0.27の範囲にあった。いずれの年度においても、「その他」の拡張不確かさが大きな値である傾向は見られたものの、拡張不確かさと試料調製時間との間に顕著な相関は認められなかった。

以上の結果から、試料調製時間（1～3分間）は不確かさに関与する主要な要因ではないと推測された。

#### 4) 集落計数法に関する情報の解析

集落計数法に関する情報をもとに、解析データを「目視」「計数装置（コロニーカウンター）」および「その他」の三つのグループに区分した。グループごとに平均値、