

分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン

CAC/GL 59-2006



**Food and Agriculture Organization of the
United Nations**

Published by arrangement with the
Food and Agriculture Organization of United Nations
by the
Ministry of Health, Labour and Welfare

本文書は、当初、国際連合食糧農業機関（FAO）及び世界保健機関（WHO）により、「「分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン(CAC/GL 59-2006)」」として出版されたものである。日本語への翻訳は、日本政府の厚生労働省によってなされた。

本文書において使用する呼称及び資料の表示は、いかなる国、領土、都市あるいは地域、若しくはその当局の法律上の地位に関する、又はその国境あるいは境界の設定に関する、FAOあるいはWHOのいかなる見解の表明を意味するものではない。また、個別の企業あるいは製品への言及は、それらが特許を受けているか否かにかかわらず、言及されていない同様の性質を持つ他者に優先して、FAOあるいはWHOが承認あるいは推薦していることを意味するものではない。本文書において表明された見解は、筆者の見解であり、必ずしもFAOあるいはWHOの見解を示すものではない。

分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン

CAC/GL 59-2006

1. はじめに

ISO/IEC 17025 では、分析結果に伴う不確かさを試験所が算定し、提供することが要件として定められている。そのためには、「残留農薬分析における適正試験所規範ガイドライン」(CAC/GL 40-1993) に従い食品検査を行う試験所は、その試験所で特に日常的に用いる分析法について、不確かさの推定に使用可能な分析法の妥当性確認/検証、試験室間試験、および内部精度管理により得られた十分なデータを活用すべきであり、これらはその試験所で特に日常的に用いる分析法の不確かさの推定に適用できる。本ガイドラインは、コーデックス分析・サンプリング法部会 (CCMAS) の一般的提言を考慮に入れて作成された。

1.1 不確かさの概念とその成分

測定の不確かさとは、測定プロセスにより得られたデータに伴う「不確かさ」をいう。分析化学では一般に検査プロセスに伴う不確かさを指すが、サンプリングに伴う不確かさの成分も含まれることがある。

したがって、不確かさの「推定値」は、報告結果または実験結果を中心として、真の値が一定の確率で存在すると期待できる範囲を示したものである。これは、個々の結果と真の値との差として定義される測定誤差とは異なる概念である。不確かさを報告する目的は、報告結果の妥当性の信頼度を高めることにある。

データの不確かさの要因はさまざまである。表 1 および表 2 にその詳細を示す。不確かさの評価に当たっては、測定プロセスに含まれる個々の作業に関する不確かさの要因を理解し、推定することが必要である。

2. 不確かさの要因の特定

一般に、測定値の不確かさは、試料に関わる種々の作業に起因するさまざまな成分によって構成される。分析結果の不確かさは、以下に示す測定の主要な 3 段階の影響を受ける。

- ▶ 外部作業：試料のサンプリング (S_s)、梱包、出荷、および保管¹

¹ 試料の梱包、出荷、保管、および試験所での調製は、検出される残留物に大きく影響する可能性があるが、それらが不確かさにどのように寄与しているかを現在の情報に基づいて定量化することは不可能な場合が多い。こうした誤差の例としては、サンプリング場所の選択、サンプリング時期、誤った表示、分析対象成分の分解、試料の汚染などがある。

- 分析試料の準備：サブサンプリング、試料調製、および試料処理 (S_{Sp})
- 分析 (S_A)：抽出、洗浄、蒸発、誘導体化、機器による測定²

誤差伝播の法則により、合成標準不確かさ (S_{Res}) および相対不確かさ (CV_{Res}) は以下のように算出することができる。

$$S_{Res} = \sqrt{S_S^2 + (S_{Sp}^2 + S_A^2)} ; S_{Res} = \sqrt{S_S^2 + S_L^2} \quad (1)$$

試料全体を分析した場合の平均残留量は変わらず、その式は以下のように表すことができる。

$$CV_{Res} = \sqrt{CV_S^2 + CV_L^2} \quad \text{および} \quad CV_L = \sqrt{CV_{Sp}^2 + CV_A^2} \quad (2)$$

ここで、 CV_L は試験所での測定段階の相対不確かさを表しており、サブサンプリング、試料調製、試料処理、分析手順などに起因するものである。

ただし、1 つの試験所が推定しなければならない不確かさは、通常その試験所が管理するプロセスに伴う不確かさのみに限られている。つまり、サンプリングの責任を試験所の職員が負わない場合は、その試験所で行われるプロセスに伴う不確かさのみを推定すればよいということである。

2.1 分析測定誤差

測定誤差はほとんどの場合、大誤差、偶然誤差、系統誤差の 3 種類に区別することができる。

大誤差 (gross error) とは、分析結果を得る過程で生じる意図しない／予測不可能な誤差をいう。この種の誤差があると、その測定値は無効になる。大誤差は、試験所の品質保証手順によって最小限に抑える必要がある。大誤差を統計的に評価し、不確かさの推定に加えることは不可能であり、また望ましいことではない。本文書では、大誤差についてこれ以上論じる必要はない。

偶然誤差 (random error) はあらゆる測定値に含まれており、試験を繰り返すと、その結果が平均値の上下に分布するのはこの誤差のためである。1 つの測定値の偶然誤差を補正することはできないが、観察の回数を増やし、分析者が訓練を積むことでその影響を低減することは可能である。

系統誤差 (systematic error) はほとんどの実験で生じるが、その影響はそれぞれ大き

² 回収率について結果の補正が行われた場合は、この補正に伴う不確かさを含めるものとする。

く異なっている。ある実験に含まれる全ての系統誤差の総和はバイアスと呼ばれる。測定数を増やしても系統誤差の総和はゼロにはならないため、分析を反復することによって個々の系統誤差を直接検出することは不可能である。系統誤差に関する問題は、事前に適切な注意を払わなければ誤差が検出されない可能性があるという点である。実際に、ある分析の系統誤差を明らかにするには、その分析法を標準物質に適用するか、別の分析者にできれば別の試験所で試料を分析してもらうか、または別の分析法によって試料を再度分析する以外に方法はない。しかし、分析対象成分、マトリックス、濃度に関して標準物質が完全に一致する場合に限っては、その分析法のバイアスを明らかにする理想的な条件を満たしていることになる。さらに、分析法のバイアスは回収率試験によって調べることができる。ただし、回収率試験では分析の影響 (S_A) しか評価されず、自然に生じた試料や、分析段階以前に生じたバイアスの成分に適用できるとは限らない。農薬分析では通常、回収率による結果の補正は行わないが、平均回収率が 100%から大幅に外れる場合には補正が必要である。回収率によって結果を補正した場合は、回収率に伴う不確かさを測定の不確かさの推定に含めるべきである。

誤差の要因の例を表 1 および表 2 に示す。ただし、不確かさの推定では、ここに挙げた全ての要因を評価する必要はない。全体的な不確かさにすでに含まれている要因もあれば、影響が無視できるため除外してよい要因もあるからである。ただし、除外する前にあらゆる要因を確認し、評価することが重要である。詳細については、すでに発表されている文書を参照するとよい^{3,4}。

³ EURACHEM Guide to Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, 2nd ed. 1999 [分析測定値の不確かさの定量化に関する EURACHEM ガイド 第 2 版], <http://www.measurementuncertainty.org>

⁴ Ambrus A. Reliability of residue data [残留データの信頼性], *Accred. Qual. Assur.* 9, pp. 288-304. 2004.

表 1. 分析試料の準備段階における誤差の要因

	系統誤差の要因	偶然誤差の要因
試料調製	分析対象となる試料（分析試料）の選択が不適切	分析試料が他の試料に接触し、汚染される
		洗浄やブラッシングが一様に行われていない、茎や石の除去方法に違いがある
試料処理 (S _{Sp})	試料処理中の分析対象成分の分解、試料の交差汚染	分析試料 1 単位ごとに含まれる分析対象成分が均一でない
		粉碎／細断した分析試料に含まれる分析対象成分が均一でない
		均質化処理中の温度の変動
		均質化処理の効率に影響を及ぼす植物材料の組織（成熟度）

表 2. 分析段階 (S_A) における誤差の要因：

	系統誤差の要因	偶然誤差の要因
抽出／洗浄	分析対象成分の回収率が不十分	食品から採取した試料材料の組成（水分、脂肪分、糖度など）にばらつきがある
	共に抽出される物質による干渉（吸着剤の負荷）	試料／溶媒マトリックスの温度および組成
定量的測定	共に抽出される化合物による干渉	機器の名目容積の許容区間内でのばらつき
	分析標準物質の純度が不適切	秤の精度および直線性
	重量／体積測定値のバイアス	不十分でばらつきがある誘導体化反応
	アナログ機器・装置を読み取る操作者側のバイアス	分析中に生じた試験室の環境条件の変化
	試料に由来しない物質の測定（梱包材料による汚染など）	注入、クロマトグラフィー、および検出条件の変化（マトリックス効果、システムの不活化、検出器の反応、SN 比の変動など）
	残留物の定義と異なる物質の測定	操作者の影響（注意不足）
	較正のバイアス	較正

3. 測定の不確かさの推定方法

試験所における測定の不確かさの推定方法にはさまざまな選択肢が存在するが、最も一般的に用いられているのは、「ボトムアップ」アプローチと「トップダウン」アプローチ¹と呼ばれる2つの方法である。

ボトムアップ法：

ボトムアップアプローチまたは成分ごとのアプローチは作業ベースのプロセスを採り入れたものであり、分析者が全ての分析操作を基本的な作業に分解する。その上で、これらの基本的作業を共通の作業としてまとめ、あるいはグループ化し、そのそれぞれが測定プロセスの合成不確かさの値にどの程度寄与しているかを推定する。ボトムアップアプローチは多大な労力を要する場合があります、また分析プロセス全体に関する詳細な知識が必要である。分析者にとってのメリットは、測定の不確かさに強く関与している分析作業について明確な理解が得られることと、そのことによって、将来その分析法を適用する際に、測定の不確かさを低減・管理するための重要管理点を特定できることである。

トップダウン法：

トップダウンアプローチは、試験所の対照試料、技能試験の結果、公表文献のデータ、試験室間共同試験から得られた分析法の妥当性評価データおよび長期的な精度のデータに基づいている。試験室間試験に基づく不確かさの推定では、試験所間のデータのばらつきも考慮に入れることができるため、分析法の性能およびその適用に伴う不確かさについて信頼できる推定値が得られる。ただし、共同試験は特定の分析法と参加試験所の性能を評価するために設計されるものである点を認識することが大切である。試料については一般に十分な均質化が行われることが多いため、共同試験では試料の調製や処理による精度不良の評価は行わないのが普通である。

残留農薬分析を行う試験所では通常数多くの食品中の200種類以上の残留物質の検査を行っており、その組み合わせは事実上無限である。したがって、複数の残留物に関する手順に伴う不確かさを推定するためには、分析法／分析対象成分／マトリックスの各組み合わせに関する不確かさを明確化するのではなく、残留農薬分析における適正試験所規範ガイドラインの該当箇所に従って、物理化学的特性および組成に関して分析対象となる残留物質や食品を代表する適切に選択された一連の分析対象成分および試料マトリックスを用いることが推奨される。不確かさの推定のために一連の代表的な分析対象成分およびマトリックスを選択する際には、そのマトリックス／分析対象成分の組み合わせに関する妥当性確認データや研究による裏づけが必要である。

以上を要約すると、試験所が不確かさに関するデータを構築および精緻化するには、試験所内の長期的な精度のデータを用いるか、または作業ベースの方法（成分ごとの算定）

を用いる必要がある。

さらに状況によっては、試料のばらつきが不確かさにどの程度寄与しているかを推定することが適切である。そのためには、試料ロット内の分析対象成分のばらつきを把握する必要があるが、試験所や分析者がこうしたデータを入手することは容易ではない。8500種類以上の残留データの統計解析から得られた値（表 4）は、現時点における最良の推定値である⁵。これらの推定値は、合成不確かさの値に採り入れることができる。

同様に、試料の保管・処理中の分析対象成分の安定性によって分析者や試験所の間で分析対象成分にばらつきが生じる可能性が高い場合は、こうした安定性を考慮に入れる必要がある。

3.1 複数成分の分析を含む結果の不確かさの推定

構造異性体や光学異性体、代謝産物その他の分解産物など、技術的混合物の適用によって生じた複数成分からなる残留物の分析結果の不確かさを推定する場合、特に残留物成分全体またはその一部の総和に関して MRL が設定されている場合には、別のアプローチが必要と考えられる。複数ピークの測定に基づく結果の偶然誤差および系統誤差の評価については、最近発表された文献に詳しく説明されている⁶。

4. 不確かさの許容範囲の指針値

単一の試験所で実施された一連の試験の標準偏差を標準不確かさの測定指標として設定するには、結果の大規模データセットが必要であるが、それが常に入手できるとは限らない。しかし、以下の方法を用いれば、少量のデータに関して真の標準偏差を推定することが可能である。

真の標準偏差 (σ)、算出した標準偏差 (S)、および 95%の確率で期待できる平均値の範囲 (\bar{x}) の関係を、観察数 (n) 別に表 3 に例示した。倍率 f は、推定値と真の値の関係を測定数の関数として示したものである。

⁵ Ambrus A and Soboleva E. Contribution of sampling to the variability of residue data [残留データのばらつきに対するサンプリングの影響], JAOAC. 87, 1368-1379, 2004.

⁶ Soboleva E., Ambrus A., Jarju O., Estimation of uncertainty of analytical results based on multiple peaks [複数ピークに基づく分析結果の不確かさの推定], J. Chromatogr. A. 1029. 2004, 161-166

表 3. 標準偏差および平均値の期待範囲を算定するための f 値

N	$S_{\min} = f_1 \sigma$	$S_{\max} = f_2 \sigma$	$\bar{x} = \pm f_3 S$
	f_1	f_2	f_3
5	0.35	1.67	1.24
7	0.45	1.55	0.92
15	0.63	1.37	0.55
31	0.75	1.25	0.37
61	0.82	1.18	0.26
121	0.87	1.13	0.18

例：残留物を含む均質化された試料から得た 5 つの分析試料から、試験室での作業の併行精度 CV_L を算出した。検出された残留物の平均値は 0.75 mg/kg、標準偏差は 0.2 mg/kg であった。したがって、処理試料の真の残留量は $0.75 \pm 1.24 * 0.2 = 0.75 \pm 0.248$ mg/kg と予測でき、測定結果の真の不確かさは 95% の確率で 0.0696 ($0.2 * 0.35$) ~ 0.334 ($0.2 * 1.67$) mg/kg であると推定される。

表 4 に示した標準不確かさの指針値は多くのデータに基づいており、1 つの試験所における不確かさの推定値の現実性評価に用いることで、非合理的な高い値や低い値を避けることができる。

表 4. 残留農薬のサンプリングと分析の主な手順に関する不確かさの標準的な期待値

手順	相対不確かさ	備考
植物由来食品のサンプリング 任意のロットから無作為に採取した複合試料における平均残留量の変動を反映。事後手順の誤差は含まない。	中型および小型の食品 (サンプル数：10 以上) ^a ： 26~30% ^b	MRL がバルク試料における平均残留量を示すことから、MRL 適合性検査ではサンプリングの不確かさを 0 とする。
	大型の食品 (サンプル数：5 以上) ^a ：36 ~40% ^b	
動物由来食品のサンプリング	規定の違反率 (β_p) 検出用に採取すべきサンプル数 (n) と任意の確率 (β_t) との関係は、以下のように表される ^a ： $1 - \beta_t = (1 - \beta_p)^n$	一次試料はロット全体から無作為に選択しなければならない。

試料処理 分析試料を均質化するための物理的操作およびサブサンプリングは含めるが、分析対象成分の分解および蒸発は含まない。	試料マトリックスや機器によって大きく異なる。標準値を示すことはできない。分析者は値を 8~10%以下に保つよう努力すべきである ^c 。	試料を細断／均質化するための機器や試料マトリックスの影響を受けることがあるが、分析対象成分とは無関係である。
分析 分析試料のスパイク時点以降の全ての手順を含む。	試験室内再現精度：濃度 1 μ g/kg~1 mg/kg の場合、16~53% ^c 0.001~10 mg/kg 以内の場合の平均試験室間再現精度：25% ^d	農薬と食品のさまざまな組み合わせを用い、その分析法の使用期間に日を変えて実施した回収率試験から、標準 CV _A を便宜的に測定することができる。

注：

- (a) Recommended Method of Sampling for the Determination of Pesticide Residues for Compliance with MRLs [残留農薬の MRL 適合性判定のための推奨サンプリング法] , (CAC/GL 38-1999).
- (b) Ambrus A. Soboleva E. Contribution of sampling to the variability of residue data [残留データのばらつきに対するサンプリングの影響] , JAOAC, 87, 1368-1379, 2004;
- (c) Guidelines on Good Laboratory Practice in Residue Analysis [残留物分析における適正試験所規範ガイドライン] (CAC/GL 40-1993)
- (d) Alder L., Korth W., Patey A., van der Schee and Schoeneweis S., Estimation of Measurement Uncertainty in Pesticide Residue Analysis [残留農薬分析における測定の不確かさの推定] , J. AOAC International, 84, 1569-1578, 2001

個々の試験所で推定した不確かさに加え、規制当局その他のリスク管理者が測定の拡張不確かさの規定値を決定することがある。これは、試験室間再現精度に基づく MRL の適合性判定（セクション 5 を参照）に用いることができる。例えば、CV_L の 50% 拡張不確かさは妥当な規定値とみなされている。

5. 不確かさに関する情報の利用

分析結果は必要に応じて、以下に示す拡張不確かさ (U) と共に報告しなければならない。

結果 = $x \pm U$ (単位)

拡張不確かさ (U) は合成標準不確かさ (S_{Res}) に基づき、EURACHEM の推奨する包含係数 2 を用いるか、または必要な信頼水準 (通常は 95%) に関する Student の t 値 (有効自由度は 20 未満) を用いて算出することができる。それぞれの拡張不確かさの算出方法は以下の通りである。

$$U = 2S_{Res} \text{ または } U = t_{\nu, 0.95} S_{Res} \quad (3)$$

報告する分析結果の数値は、最後の桁は不確定でもよいという一般原則に従うものとする。計算の初期段階で丸めを行うと、算出した値に不必要なバイアスが生じる可能性があるため、丸めは最終結果についてのみ行うべきである。

解析の目的としては、一試料に関して残留物含有量の最良推定値が報告されるものと想定される。結果をどのように解釈するかは検査目的によって異なる。一般的な理由としては、国の定める MRL に適合しているかを確認する検査、輸出食品がコーデックスの MRL に適合していることの認証などが挙げられる。

5.1 MRL 適合性検査

図 1 は、残留物の測定値、それに対応する不確かさの区間、および MRL に関して、検査結果がどのように表示されるかを示したものである。

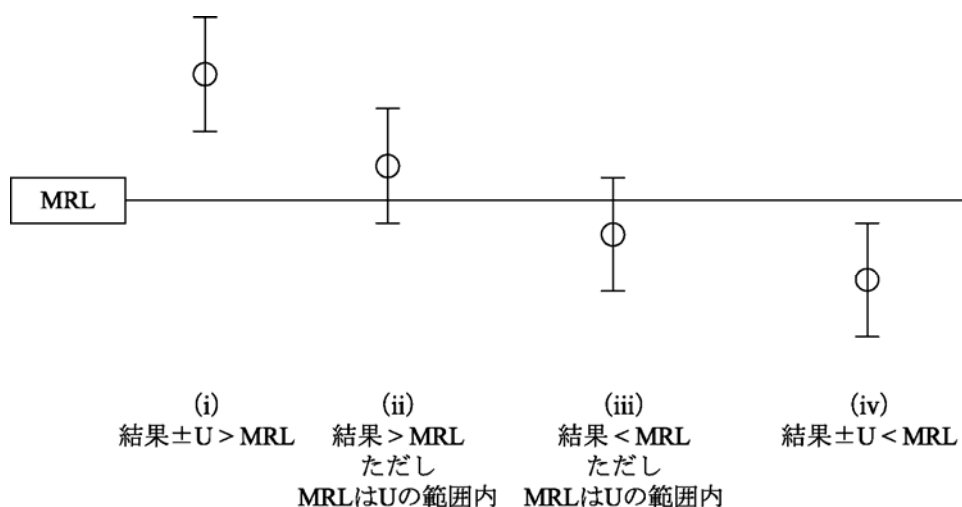


図 1. 測定値の不確かさの期待値と MRL の関係の例

状況 (i) 測定の不確かさの区間に挟まれた分析結果が MRL よりも大きい。その結果は、サンプリングロットに含まれる残留量が MRL を超えていることを示す。

状況 (ii)

分析結果の値が MRL よりも大きく、測定の不確かさの下限値が MRL よりも下にある。

状況 (iii)

分析結果の値が MRL より小さく、測定の不確かさの上限値が MRL よりも上にある。

状況 (iv)

測定の拡張不確かさの区間に挟まれた分析結果が MRL よりも小さい。

5.2 判定の環境

図 1 に例示した各状況は、植物由来食品に関するものである。動物由来食品の残留量が MRL に適合するかについては、「残留農薬の MRL 適合性判定のための推奨サンプリング法」(CAC/GL 33-1999) に関する文書に記載された分布によらない統計手法と例に基づくサンプリング計画に従って判定する必要がある。

コーデックスサンプリング手順に定める最小サンプル数および最小試料量で測定された各試料の残留量は、MRL に適合していなければならない。したがって、拡張不確かさは式 $1 : U = kS_L$ ($S_L = CV_L * \text{残留量}$) の S_L を用いて算出すべきである。

状況 (i) における判定は明瞭である。地域で生産または輸入された食品が国の定める MRL に適合しているかを調べる検査に関して、分析法の性能を含む不確かさについての冗長な説明を避けるため、試験所はその試料の分析結果を「 $\bar{x} - U$ 」以上の残留物」が含まれていると報告できる。これは、「測定の不確かさに起因するあらゆる合理的疑いの余地なく MRL を上回っていた」という要件を満たしている。

状況 (iv) では、その試料が MRL に適合していることは明らかである。

状況 (ii) および (iii) では、合理的疑いの余地なく MRL を上回っている、あるいは MRL に適合していると結論づけることはできない。以下に論じるように、政策決定者による措置についてさらに検討する必要があると考えられる。

状況 (ii) および (iii) の影響は国の規範によって異なり、貿易される貨物の受け入れを大きく左右する可能性がある。状況 (ii) や (iii) に示したような検査結果が得られた場合、国内市場や国際貿易における製品の流通には慎重を期すべきである。例えば製品の輸出を認可する場合、状況 (ii) や (iii) のような残留結果が得られた製品については、貨物の輸出は推奨できない。状況 (ii) のような残留量の食品が輸入された場合、輸入国

では MRL に対する適合性を許容範囲内の信頼度で検証することが困難な場合もある。状況 (iii) の場合には、一般に輸入する側が措置をとることはないと考えられる。

本書における用語の定義^a

ブランク (blank) (試料、試薬)	(i) 検出可能な量の分析対象成分が含まれていないことが分かっている材料 (試料、または試料の一部もしくは抽出物)。「マトリックスブランク」とも呼ばれる。 (ii) 試料を一切加えず、溶媒と試薬のみを用いて行われる完全な分析 (分析に現実性を持たせるため、試料の代わりに水を加える場合もある)。「試薬ブランク」または「手順ブランク」と呼ばれることもある。
合成標準不確かさ (combined standard uncertainty)	ある測定結果 (y) の全体的な不確かさ ($u_c(y)$) は、不確かさ伝播の法則 (誤差伝播の法則) により全ての不確かさの成分を合成して得られる全分散の正の平方根に等しい推定標準偏差である。
汚染 (contamination)	サンプリングまたは分析中の何らかの段階で、何らかの経路により、試料、抽出物、内部標準溶液などに分析対象成分が意図せず混入すること。
残留物の定義 (residue definition)	残留物とは、MRL の適用対象となる、あるいは食事からの曝露の評価に用いられる、農薬とその代謝産物、誘導体、および関連化合物が組み合わさったものと定義される。
測定システム (determination system)	分析対象成分の濃度や量を検出および測定するために用いられるあらゆるシステム。例えば、GC-FPD、LC-MS/MS、ポストカラム誘導体化法を用いた LC、ELISA、デンシトメトリーを用いた TLC、バイオアッセイなど。
濃度、量 (level)	本書では濃度 (mg/kg、 μ g/ml など) または量 (ng、pg など) を指す。
ロット (lot)	一度に配送される一定量の食品材料を指し、その由来、生産者、種類、梱包業者、荷姿、表示、荷主などの特性が同一であるとサンプリング担当者が認識または想定しているもの。
マトリックス効果 (matrix effect)	試料に含まれる 1 種類以上の未検出成分が、分析対象成分の濃度または量の測定に及ぼす影響。試料から共に抽出される物質 (マトリックス) の存在が、特定の分析対象成分に対する測定システム (GC、LC-MS、ELISA など) の反応に影響を及ぼすこともある。

手順ブランク (procedural blank)	「ブランク」の項を参照。
試薬ブランク (reagent blank)	「ブランク」の項を参照。
反応 (response)	分析対象成分が存在した場合に検出器が出力する絶対信号または相対信号。
スパイク (spike or spiking)	回収率測定または標準添加を目的として分析対象成分を添加すること。
標準不確かさ (standard uncertainty)	不確かさの成分の標準偏差として表される。
単位 (試料の一部として) (unit)	単一の果物、野菜、動物、穀物、缶など。例えば、リンゴ 1 個、T ボーンステーキ 1 枚、小麦 1 粒、トマトスープ 1 缶など。
違反残留物 (violative residue)	MRL を超えている、またはその他何らかの理由により法に違反している残留物。

注 (a) 上記の定義は、脚注に示した参考文献に基づいている^{7,8,9,10}。その他の定義は、「残留農薬分析における適正試験所規範ガイドライン」に記載されている。

⁷ EURACHEM (2000) EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements 2nd ed. [分析測定値の不確かさの定量化に関する EURACHEM/CITAC ガイドライン 第 2 版] <http://www.measurementuncertainty.org>

⁸ Recommended method of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs [残留農薬の MRL 適合性判定のための推奨サンプリング法]

⁹ Willetts P, Wood R (1998) Accred Qual Assur 3: 231-236

¹⁰ International Vocabulary of basic and general terms in Metrology [国際計量基本用語集], Geneva 1993

付属文書

緒言

ガイドライン文書CAC/GL 59-2006に記載の通り、分析データに付随する測定の不確かさ（MU）の推定は、ISO/IEC 17025に基づき認定された試験所への要求事項であり、適正試験所規範（GLP）に従い残留農薬分析を行っているすべての試験所に期待される。国内・国際規格に関係なく、化学残留物及び汚染物質に対する食品の適合性の判定は、特定のロット又は貨物の分析に関して試験所が報告する試験結果に伴う不確かさを考慮して行う必要がある。

試験所が分析に使用する試験方法は極めて類似しているという事実にも関わらず、技能試験（PT）で報告されるMUの推定値が大幅に異なることは珍しくない。この証拠が示唆しているのは、MUの推定が多くの食品試験所にとってまだ発展途上の科学のように見えることである。本付属文書の目的は、試験所が測定の不確かさの推定に使用できるいくつかの選択肢、特に複数残留農薬分析法に関する試験所内における分析法の妥当性評価、精度管理、及び長期的精度データの使用について説明することである。また、残留農薬結果に伴うMUの推定に対するアプローチの調和をより図ることで、MRLに近い残留レベルの適合性判定に議論が生じる可能性を最小限に抑えられるものと期待される。

MUの決定に一般的に使用されるアプローチは大きく二つに分類される。すなわち、いわゆるGUM（「測定における不確かさの表現のガイド」）、つまり「ボトムアップ」のアプローチと、分析精度及びバイアスの適用に基づく「トップダウン」の手順である。

GUMアプローチは、分析プロセスの個々のあらゆる要素の厳密な分析と、これらの手順に帰する偶然及び系統誤差の推定に基づいている。このプロセスは、当初は極めて労力を要するものであるが、分析者にプロセス上の分析手順への詳細な理解を持つこと、又は深めること、及びその方法の重要管理点を特定することを要求する。プロセスにおいてあらゆる手順を考慮しなければ、MUが過小評価される可能性がある。一方では、何らかの操作上の誤差は相殺される可能性があり、それが無視されると不確かさの過大評価を招きかねない。ボトムアップアプローチは一般に、分析化学活動、特により複雑な複数残留農薬分析法よりも物理的計量に適していることが認められている。

トップダウンアプローチの支持者は、MUに関するより確実な情報は内部妥当性評価、長期的精度、及び分析精度管理（QC）から収集された試験データによって得られる可能性が高い、と指摘する。利用可能な場合には、PTデータもMUの推定に使用でき、推定の唯一の根拠とされる場合もあるが、内部データと併せて使用される場合が多い。また試験室間の再現性に関するPT試験からのデータによって、単一試験所の推定に有用な「ベンチマーク」が得られることもある。

MUの推定に際してはあらゆる選択肢を考慮すべきである。初期目標は、利用可能な情報を用いて可能な限りの最良推定値を得ることに置かれるべきである。試験所の最初の推定値は、代替的方法、文献報告と照合することや、PT試験と比較することによって検証すべきである。さらに、測定の不確かさを推定及び検証する場合には、専門的判断が重要な役割を果たす。推定値は、例えば分析プログラムの過程で日常的に生み出されるバッチ内QCデータなど、利用可能な精度データの増加に伴い見直すべきである。

本付属文書は、さまざまな情報源から得られるデータに基づくトップダウンアプローチを使用したMUの推定に焦点を当てている。

食品中の残留農薬に関するMUのデフォルト値の適用

EU加盟国は、EUに輸入される食品貨物の残留農薬に関して $\pm 50\%$ を測定の不確かさの「デフォルト」値（以下デフォルトMU）として採用している。このデフォルト値はEUを基盤とした多くのPT試験の統計的結果に基づくもので、これらの試験には果実及び野菜に関する数々の複数残留物試験に参加している適格な残留物試験所が含まれていた。これらの多くの試験によると、相対標準偏差の平均値は20～25%で、測定の不確かさ（MU）はおおよそ50%であった。

その他の統計データが存在しない場合には、EUの農薬MRL規制への適合性に関して食品を検査する試験所は、EU又は同様のPT試験への参加を通してその分析技能を証明できること、及び/又は許容可能な長期的精度とその試験結果に伴うバイアスを明示できることを条件に、50%のデフォルトMUを採用できる。しかし長期的には、試験所は内部精度及びバリデーションデータに基づきMUを独自に推定することにより、自らのデフォルトMUの採用を検証する義務を負うべきである。

Horwitzの関係の使用によって得られる精度データ

特定の方法に関する試験室間試験からのデータが存在しない場合には、室間再現性の標準偏差とMUを、室間再現性の標準偏差と分析対象成分の濃度との相関関係を示すHorwitzの式から決定できる。Horwitzによる変動係数（CV）と分析対象成分の濃度の関係は、文献に報告されている食品ベースの多数の共同試験の結果に基づいている。発表されている試験室間試験から得られる期待値と内部MU推定値を比較する上でも、Horwitzの式は有用なツールである。

試験室間試験（共同試験及びPT試験）から得られる精度データ

試験室間試験の報告結果は、不正確さとバイアス双方の影響を受けている。このような試験に十分な数の試験所が参加し、実際の試験条件（分析対象成分とマトリックスの範囲）に対応すべく設計されている場合には、得られる再現性の標準偏差は実際に生じる可能性が高い典型的な誤差を反映したものとなる。PT試験データはしたがって、測定の不確かさの妥当な推定値を得るために使用できる。

分析法に関する共同試験は一般に分析プロセスに関する詳細な書面の指示で明確に定義され、通常は残留物分析に優れた実績を持つ専門試験所のみが参加する。このような条件下では、分析法を再現性の条件下で適用した場合には、特に均一の試料からの誤差の寄与は無視できる可能性が高いため、分析の分散が得られる可能性が最も高くなる。試験所が特定の共同試験と関連した分析性能を達成する能力を証明できれば、その試験に関して得られた室間再現性の標準偏差は、MUを推定するための優れた根拠となるはずである。しかし法的権限を有する試験所は、試験所内の再現性の条件下で分析法を実施する場合には、試験室間の分析法の精度を上回ること、つまりMUを減少することができるようになるべきである。

共同試験に認証標準物質（CRM）を使用する場合には、試験報告に「認証」値に対する分析法のバイアス推定値を示すべきであり、MUの推定に際してはこれを考慮する必要がある。

PT試験においては、試験所がそれぞれの分析法を用いることが一般的である。それは標準的な方法、標準的な方法の改良版であることもあれば、内部で開発及び妥当性の評価がされた方法であることもある。また一般に、共同試験の場合に比べて参加する試験所の分析能力のばらつきが大きい。これらの要因のために、PT試験で得られる室間再現性の標準偏

差は、同じ分析法に基づく共同試験から予測されるものに比べて大きくなる可能性が高い。このようなデータに基づくMUは、多くの参加試験所が報告する推定値よりも大きい可能性がある。とは言え、幅広い専門知識を持ち、さまざまな分析法を使用している試験所が参加するPT試験に基づくMUの推定値は、国際貿易において残留農薬に関する食品の適合性を判定する上でより実用的かつ有用な場合がある。EU加盟国が適用している50%のデフォルトMUは、さまざまな農薬及び食品マトリックスのPTデータに基づいている。

試験所がMUの推定にPTデータを使用しているか否かを問わず、PT試験からの情報は、内部バリデーション又は精度管理実験などのデータに基づく推定値を比較及び検証する上で有用である。

内部妥当性評価及び精度管理データから得られるMU

化学物質の計量者の間には、分析プロセスに関する不確かさデータの最良の情報源は、試験所内での分析法の妥当性評価、及び/又は検証試験と長期的精度管理データである、とのコンセンサスが存在する。これは、試験所は妥当性評価、及び/又は検証試験を行っており、適切な精度管理（QC）試料、CRM、標準物質（RM）、又はマトリックススパイクに関して長期的バイアス及び再現性データを蓄積する十分な経験がある、との前提に基づいている。

食品マトリックス中の残留農薬に関してCRMの利用可能性が限定されていることから、試験室は内部精度管理のためにスパイクされた、又はその他の方法で適切に特徴付けられた試料に焦点を当てるのが通常求められる。残留物を含ませた試料、PT試験の余剰試料、残留物を含まないスパイクされた試験室試料など、マトリックススペースのQC試料の使用は、バイアスと精度の双方に関する情報を収集しながら、方法（及び分析者）の性能を監視及び管理する能力を試験所に与える。管理チャートは長期的精度を評価し、分析プロセスの統計的管理を監視するための優れたツールである。

MUの推定に際しては、バイアス（有意な場合）及びバイアスの不確かさを考慮すべきである。このことは、セクション5.4で検討する例に説明されている。

バイアスはCRMを使用することで最も正確に決定できる。しかしながら、食品中の農薬に関するCRMが乏しいこと、及び通常は複数残留物のスクリーニングに多数の農薬が組み込まれていることを考えれば、分析法のバイアスに関する情報を得るには一般にスパイクされたマトリックス試料の回収率に頼る必要がある。

またPT試験における試験所の性能が、合意された値に対する個々の試験所のバイアス、及び場合によってはPT試料のスパイクレベルに関して有益な示唆を与えることもある。しかしながら、バイアスはMUの推定の入力値として使用する前に、多くのPT試験からの結果に基づくべき、又はそれによって確認されるべきである。

計算例

以下の計算例では、内部妥当性評価データ、内部精度データ、及び試験室間データのさまざまな組み合わせに基づきMUを推定するための許容可能な手順を説明している。また、Horwitzの式とPT試験からの結果は内部MU推定値と比較するための有用なベンチマークも提供する。

以下の計算例では、典型的な残留農薬としてクロルピリホスに関する仮想のデータを使用し、主としてテクニカルレポートNo 1/2007及びNordtestレポートTR537に示された例を利用している。

5.1 Horwitzの式を使用したMUの推定

Horwitzの式では、室間再現性の標準偏差を分析対象成分の濃度の関数として表す。

$$u' = 2^{1-0.5 \log c}$$

ここで u' = 室間再現性の相対標準偏差

c = 分析対象成分の濃度 (g/g)

相対拡張MU、 U' (95%の信頼度で) は次により推定できる

$$U' = 2u'$$

Horwitzの式は分析対象成分の濃度の関数であるため、次の表に示された農薬濃度に応じて異なったMU値が得られることになる。

濃度 (mg/kg)	u' (%)	U' (%)
1.0	16	32
0.1	22.6	45
0.01	32	64

例1 :

ある試験所がトマトの試料中に0.40 mg/kgのクロルピリホスを測定する。

Horwitzの式は、濃度0.40 mg/kgでの室間再現性の相対標準偏差を18.4%と予測する。

$$u' = 18.4\%$$

$$U' = 2u' = 37\%$$

試験所はしたがって、結果を0.40 ± 0.15 mg/kgと報告することになる。

試験所の報告には、報告された不確かさは信頼度を約95%にするために包含係数2を用いた拡張不確かさであることを明記すべきである。別段の記載がない限り、これは一般に拡張不確かさを伴って報告された結果とみなされる。

裏付けとなるデータが存在しない場合には、Horwitzの式はある程度慎重かつ、試験結果に伴う推定不確かさを示すに過ぎないものとして使用すべきである。分析手法、特に機器技術の進歩によって、Horwitzの式で予測されるよりもはるかに小さな不確かさで極めて低い定量限界を達成できるようになっている。Thompson及びLowthianは、低い濃度では試験所がHorwitzの関数を超える性能を発揮する傾向があることを報告している。しかしThompsonの概念は、0.1 mg/kg未満の濃度に関する u' の最大値をその濃度とは関わりなく22%に制限していることに注意すべきである。

5.2 EUのデフォルト値である50%を適用したMUの推定

デフォルトMUを適用する前に、試験所はデフォルト値以下の不確かさを日常的に達成できることを保証すべきである。

例2 :

ある試験所がトマトの試料中に0.40 mg/kgのクロルピリホスを測定する。測定結果には±50%の合意されたデフォルト値が適用される。

したがって、試験所は結果を0.40 ± 0.20 mg/kgと報告することになる。

5.3 試験所内QC及びPT試験のデータに基づくMUの推定

5.3.1 PT試験から付与された（又は合意された）値を使用

$$U' = 2u' \quad \text{式1}$$

$$u' = \sqrt{u'(Rw)^2 + u'(bias)^2} \quad \text{式2}$$

ここで U' = 相対拡張不確かさ

u' = 相対合成標準不確かさ

$u'(Rw)$ = 試験所内の不確かさによる相対標準不確かさ（試験所内の再現性の相対標準偏差）

$u'(bias)$ = バイアスによる相対標準不確かさの要素

例3 :

この例では、 $u'(Rw)$ は試験所内のQCデータから得られ、長期的QCデータ及び $u'(bias)$ はPTデータから推定することが望ましい。

トマト中のクロルピリホスに関する試験結果 = 0.40 mg/kg。

0.5 mg/kgのクロルピリホスでスパイクされたトマトのバッチ内QC試料（過去3カ月間にわたり週毎にスパイクされた試料一つ）の分析からの相対標準偏差 = 15%。

試験所は6件のPT試験に参加し、これらの試験ではさまざまな野菜及び果実マトリックス中の分析対象成分にクロルピリホスが含まれていた。これらの試験に関しては、試験所の結果と付与された値の相対的差異は-15%、5%、-2%、7%、-20%、及び-12%であった。各PT試験には平均16の試験所が参加した。6件の試験でクロルピリホスに関して報告された室間再現性の平均相対標準偏差（ S_R ）は25%であった。

$$u'(bias) = \sqrt{RMS'_{bias}{}^2 + u'(C_{ref})^2} \quad \text{式3}$$

ここで RMS'_{bias} = 相対バイアス値の二乗平均平方根

$u'(C_{ref})$ = 6件の試験でクロルピリホスに関して付与された値の平均相対不確かさ

$$\begin{aligned} RMS'_{bias} &= \sqrt{\frac{\sum (bias)^2}{n}} \quad (n = \text{PT試験の数}) \quad \text{式4} \\ &= \sqrt{\frac{(-15)^2 + (5)^2 + (-2)^2 + (7)^2 + (-20)^2 + (-12)^2}{6}} \\ &= 11.9\% \end{aligned}$$

$$u'(C_{\text{ref}}) = \frac{S_R}{\sqrt{m}} \quad \text{式5}$$

ここで $S_R = 6$ 件の試験からのクロルピリホスに関する平均相対標準偏差

$$\begin{aligned} m &= \text{試験当たりの平均参加試験所数} \\ &= \frac{25}{\sqrt{16}} \\ &= 6.3\% \end{aligned}$$

したがって、 $u'(\text{bias}) = \sqrt{(11.9)^2 + (6.3)^2} = 13.5\%$

式2より、

$$u' = \sqrt{(15)^2 + (13.5)^2} = 20\%$$

式1より、相対拡張不確かさ (95%信頼) = 40%。

試験所は、結果を $0.40 \pm 0.16 \text{ mg/kg}$ と報告すべきである。

注：

1. RMS'_{bias} の値はバイアス及びバイアスの不確かさの双方から成る。
2. PTデータは異なるマトリックス及び異なるクロルピリホス濃度に関するものであるため、計算されたMUは最良推定値に過ぎない。
3. 可能であれば、MUは例えばコーデックスのMRLなどの最大限界濃度、又はその近くの濃度で得られたデータに基づき計算すべきである。

5.3.2 認証標準物質 (CRM) によるPT試験

PT試験における試料としてクロルピリホスを含む適切なCRMを配布すれば、PTの結果から $u'(C_{\text{ref}})$ を計算する必要がなくなることになる。

この場合、 $u'(C_{\text{ref}})$ は認証濃度に関する所定の不確かさであり、相対標準偏差に変換される。

例えば、CRM中のクロルピリホス認証値の95%信頼範囲が $0.489 \pm 0.031 \text{ mg/kg}$ である場合、

$$u(C_{\text{ref}}) \text{ (標準偏差)} = 0.031/2 = 0.0155 \text{ mg/kg、及び}$$

$$u'(C_{\text{ref}}) \text{ (相対標準偏差)} = 0.0155 \times 100 / 0.489 = 3.17\%$$

可能性は低いが、異なるPT試験でクロルピリホスを含む複数のCRMが配布された場合には、Uは $u(C_{\text{ref}})$ の平均を用いて計算される。

どちらの場合も、 RMS'_{bias} は式4を用いて計算される。

例4：

試験番号	CRM	相対バイアス	$u'(C_{\text{ref}})$
1	A	-12%	2.3%

2	B	-15%	1.7%
3	C	-3%	2.0%
4	C	5%	2.0%
5	C	-20%	2.0%
6	A	0%	2.3%

$$\text{平均}u'(C_{\text{ref}}) = 2.05\%$$

式4より、 $\text{RMS}'_{\text{bias}} = 11.6\%$

式3より、 $u'_{(\text{bias})} = 11.8\%$

注：

4. CRMに伴う相対不確かさは、付与された、又は合意された値に伴う相対不確かさ未満の可能性が高い。

分析法の不正確さによる試験所の相対標準不確かさ $u'(R_w)$ が同じ、すなわち15%のままであれば、式1及び2より、

$$u' = 19\%$$

$$U' = 38\%$$

試験所は、結果を $0.40 \pm 0.15 \text{ mg/kg}$ と報告できる。

5.4 試験所内QCデータを使用したMUの推定

例5：

- トマト中のクロルピリホスに関する試験結果 = 0.40 mg/kg 。
- スパイク溶液の調製に使用されるクロルピリホス校正試料の規定純度 = $95 \pm 2\%$ (分析証明書)。
- 過去3カ月にわたり 0.5 mg/kg のクロルピリホスをスパイクされたバッチ内QC試料に関して記録された14の回収率 (%) は90、100、87、89、91、79、75、65、80、82、115、110、65、73で、平均回収率は86%、相対標準偏差は15%となった。

標準物質に関する所定の不確かさが拡張不確かさ U (95%信頼範囲) であるとすれば、

$$u'(C_{\text{ref}}) = 2/2 = 1\%$$

注：

5. これは、スパイク溶液の作成とトマトのスパイクに伴う不確かさが双方ともに有意でないことを前提としている。その可能性が高いがもしそうでなかったとしても、 $u'(C_{\text{ref}})$ は全体的な不確かさに極めてわずかに寄与するのみとなる。

$$u'(R_w) = 15\% \text{ (試験所内の再現性の相対標準偏差)}$$

式4を用い、バイアスを $100 - \text{回収率} (\%)$ とすると、

$$\text{RMS}'_{\text{bias}} = 20\%$$

式3より、 $u'(\text{bias}) = 20\%$

式2より、 $u' = 25\%$

式1より、 $U' = 50\%$

試験所は、結果を $0.40 \pm 0.20 \text{ mg/kg}$ と報告できる。

注：

6. この不確かさは回収率で補正されていない結果に適用される。分析プログラムの終了時に結果を3カ月の分析期間に得られた平均回収率で補正すると、 $u'(\text{bias})$ には必然的に平均回収率に伴う不確かさのみが反映されることになる。その場合、 $u'(\text{bias})$ はスパイク濃度の相対標準不確かさ $u'(C_{\text{ref}})$ と組み合わせて適用された回収率の相対標準不確かさ（平均回収率の相対不確かさ）として計算できる。

平均回収率の相対標準不確かさは、

$$u' \overline{\text{Rec}} = \frac{u'(R_w)}{\sqrt{n}} \quad \text{式6}$$

ここで

n = 平均回収率の計算に用いた反復数

$$u' \overline{\text{Rec}} = \frac{15}{\sqrt{14}} = 4\%$$

$$u'(\text{bias}) = \sqrt{u'(\overline{\text{Rec}})^2 + u'(C_{\text{ref}})^2} \quad \text{式7}$$

したがって、 $u'(\text{bias}) = \sqrt{(4)^2 + (1)^2} = 4.1\%$

その場合、式2及び1より、先に計算した15%の $u'(R_w)$ 値を用いると、

$$u' = 15.5\%、及び$$

$$U' = 31\%$$

結果を回収率で補正した場合、結果は次のように報告すべきである。

$$0.40 \pm 0.12 \text{ mg/kg}$$

注：

7. この例は、高い確実性で純度が知られている標準物質を用いて、分析プログラムの過程で行われる9回以上の反復回収率実験に基づく平均回収率で結果を補正すれば、試験所内の再現性の標準偏差のみから測定の不確かさの合理的な推定値を計算できることを示している。