

分析法の妥当性確認に関するガイドライン

令和元年 10 月

農林水産省

はじめに

我が国で取得した食品中の化学物質等の分析データが、国際的（Codex 委員会等）に活用されるためには、科学的かつ客観的に信頼できるデータであることを証明する必要がある。このためには、「妥当性確認された分析法」を用い、「分析結果の品質を保証できる分析機関で測定」することが必須である。

本ガイドラインは、食品安全に関するリスク管理を担当する行政官が、食品等の分析データを用いて、施策を検討・企画立案していく前提として、「分析法の妥当性確認」に関して理解しておくべき基礎的事項をまとめている。

- まず「3.1 分析法が満たすべき性能規準」を理解しなければ、科学的に信頼できるデータを取得することは不可能である。

本項の 3.1.1 の内容は、国際ガイドライン（Codex ガイドライン）と整合しており、基準値への適合性評価に用いる分析法に必要とされる「性能規準」をまとめている。これは、分析法を用いて得られたデータの信頼性を科学的かつ客観的に証明するデータの重要な要素となる。

食品等の基準値の検討や基準値への適合性に関して、Codex 関連部会の出席者や政府間交渉の相手は、実際に分析データの取扱をしている者であることが多い。本内容について理解しなければ、データを解析・提出し、その内容を科学的に適切に説明することは不可能である。

- 3.1 に記載の性能規準を達成できるか検討するために行う必要があるのが「3.2 単一試験室による妥当性確認」や「3.3 室間共同試験による妥当性確認」である。また、「3.4 妥当性確認データの活用」に得られたデータの活用例を示している。
- 「4.その他」では、分析結果の品質を保証するために、分析機関に求めるべき要件の概要を示している。

目次

序文	1
1	ガイドラインの適用範囲及び原則..... 2
2	用語の定義と解説..... 4
3	化学物質の分析法の妥当性確認..... 18
3.1	分析法が満たすべき性能規準..... 18
3.2	単一試験室による妥当性確認..... 21
3.3	室間共同試験による妥当性確認..... 36
3.4	妥当性確認データの利用..... 50
4	その他..... 55
5	参考文献..... 57

序文

食品の安全を確保し安全性を向上させるためには、生産段階から消費段階にわたるフードチェーンにおいて、科学的な原則に基づいて安全性向上の取組を進めることが重要である。このことは、国際的な共通認識となっており、農林水産省は、科学的な原則に基づき、一貫した考え方でリスク管理を行うため、2005年8月に「農林水産省及び厚生労働省における食品の安全性に関するリスク管理の標準手順書」を策定した。

科学に基づいた施策・措置を決定するためには、農林水産物・食品、飼料又は肥料（以下「食品等」という。）に有害化学物質がどの程度の濃度で含まれているかや、有害微生物にどの程度汚染されているか等の実態を調査・把握することが必要不可欠である。

分析機関において目的とする食品等に含まれる有害化学物質・有害微生物の分析・検査をした結果（分析結果）は、含有実態の把握や経口摂取量評価のためのデータとなる他、基準値への適合性評価にも使われるため、得られた分析結果が科学的に信頼できるものである必要がある。

このことは、行政機関内に設置された試験室で分析する場合でも、民間の分析機関に委託して分析する場合でも同じである。食品の国際規格を策定するCodex委員会において基準値設定に我が国の実態を反映させるためには、WHOの地球環境モニタリングシステム／食品汚染モニタリングプログラム（GEMS/Food）のデータベースに、実態調査のデータをアップロードすることが求められる。その場合、国際的に通用する信頼性を確保した分析結果であることが証明できる必要がある。「妥当性確認された分析法を用い、分析結果の品質を保証できる分析機関で測定する必要がある」というのが、世界の共通認識となっている。

本ガイドラインは、日本政府のリスク管理部局において、食品安全に関するリスク管理を行う者（食品安全に関係する飼料、肥料のリスク管理を行う者を含む。以下、同じ。）が、実態調査や検査等に利用することを予定している分析法の妥当性確認を行う際に従うべき原則を示している。

食品安全に関するリスク管理を担当する行政官は、

- ① 信頼できる分析機関に分析を発注する
- ② 分析機関から報告された結果（分析結果）が信頼できるかどうか判断する

ための基礎知識を備えることが必須である。そして、もし分析結果や分析機関に不備がある場合には、指導し、改善させることができる能力を持つ必要がある。

分析対象とする化学物質の種類によっては、本ガイドラインに書く原則が直接的に適用できない場合もあり得る。その場合には、どのような考えに基づいて原則を設定しているかを理解し、何をすべきかケースバイケースで検討することが重要である。

本ガイドラインの内容は、科学の進歩や国際的なガイドラインとの整合のため、必要に応じ見直す。

1 ガイドラインの適用範囲及び原則

1.1 目的

本ガイドラインは、サーベイランス・モニタリングや経口摂取量推定、検査に用いる分析法の妥当性確認に関する原則を示す。

1.2 対象とする品目・分析対象

農林水産物・食品、飼料又は肥料（以下「食品等」という。）に含まれる化学物質の分析法を対象とする。ただし、以下に用いる分析法は対象としない。

- ・生産資材（例：農薬、動物用医薬品）の品質の確認
- ・残留農薬及び残留動物用医薬品の一斉分析
- ・農林水産物・食品の真性の判定（例：表示の検証や、原料原産地判別、遺伝子組換えの検査等）

1.3 その他

分析法の妥当性確認は、①分析機関で分析法を開発する段階、②開発された分析法の使用を決定する段階、それぞれの段階で適切に行われる必要がある。分析法の妥当性確認において得たデータは、いつでも参照できるように文書化しておかなければならない。

サーベイランス・モニタリングの計画・実施にあたっては、本ガイドラインのほか、「サーベイランス・モニタリングの計画・実施及び結果の評価・公表に関するガイドライン」に則って行う必要があり、分析報告書様式が示されている。

このほか、目的に応じ、「トータルダイエツトスタディに関するガイドライン」や「化学物質の経口摂取量推定に関するガイドライン」を参照する。

なお、機器分析の場合、「分析法の妥当性確認」は、広義には以下の①及び②の概念を含む。本ガイドラインにおける「分析法の妥当性確認」は、以下の①や②が適切に行われていることを前提として「分析法自体に要求される性能の規準を満たしているかどうか確認・検証する作業」を指す。

① 分析機器のバリデーション

分析機器の機能及び性能の仕様が適格であることの検証や、設置した装置又はシステムが予期した条件で意図したように作動することを確認する作業。キャリブレーションも含む。

<例>

HPLC のポンプの流量再現性やグラジェントの正確さの検証。オートサンプラの注入量再現性、注入量直線性、キャリーオーバー等の検証。検出器のベースラインノイズ、ドリフトレベル、波長正確さ等の検証。分析機器のキャリブレーションやメンテナンスに係る作業を含む。

② コンピュータシステムのバリデーション

分析に用いるコンピュータの各種のデータ処理機能、例えば装置の制御、データ採取、ピーク認識、面積計算、検量線作成が適切に作動しているかどうか検証する作業等。ソフトウェアやハードウェアのアップデートに係る作業を含む。

2 用語の定義と解説

このガイドラインにおける用語の定義と解説を以下に示す。解説中、本ガイドラインに定義している語には下線を付している。

2.1 分析法や分析結果に関する用語

分析法 (Analytical method)

試料中に特定の元素・化学物質・微生物が含まれているかどうかの確認（定性分析）や、試料中に存在する化学物質濃度・微生物濃度を決定する（定量分析）ために必要とされる一連の手順を明確に文書化したもの。

適用可能な食品等の種類、分析対象物質、定義、測定の原理、必要な化学反応、使用する試薬、器具、操作、測定結果から分析値を得るための計算方法等が示されている必要がある。

具体的には、分析結果を得るために、測定用試料の準備から結果を報告するまでの一連の過程において正確に従わなければならない事項を定めた詳細な指示書（分析標準手順書や規格）として示される。ISO 規格など、規格化されているものもある。

分析法という用語は、定性分析法及び定量分析法一般を指す用語として用いられる場合がある。また分析の科学技術的な原理（例えば原子吸光分析、LC-MS 等）の観点から用いられる場合がある。

基準値は、基準値への適合性を評価するために用いる分析法さらにはサンプリングプランとセットで決定されなければならない。基準値を見直す場合、分析法も見直す必要がある。分析法を見直す場合、必要に応じ基準値も見直す必要がある。

分析標準手順書 (分析法 SOP: Standard operating procedure)

分析の原理、必要な試薬・器具、試料の処理や試薬の扱いなど一連の作業・操作手順、測定機器の設定、結果を得るための計算方法、チャートの見方、留意事項等が詳細に記された文書。

分析法プロトコルと呼ばれることもある。通常、分析法は、一定の専門知識・技術を持った者であれば誰でも分析・測定を行えるように、詳細に文書化されなければならない。ISO 規格など、分析標準手順書の中に室間共同試験のデータを含む場合もあり、報告された値を自らの分析によって達成される分析値の精確さの指標とすることができる。

検査 (Testing)

個々の食品等又はロットに、良・不良又は合格・不合格の判定を下す目的のため、化学物質又は微生物について、ある規格又は判定基準と比較して調べる操作。（すなわち分析結果を得ること及び規格又は判定基準への適合性評価を含む。）

測定 (Measurement)

ある量に合理的に帰属することが可能な一つ以上の量の値を、実験的に得る過程。

測定量 (Measurand)

測定対象となる量。

少なくとも、数値、分析対象物質及び関連するマトリックスの記述が必要である。記載例は以下のとおり。

(例) 動物飼料中のジメトリダゾールの濃度 (mg/kg)

血清中のナトリウムのモル濃度 (mol/L)

測定量の詳細を示すには、量の種類に関する知識、当該量を保持する物質の状態に関する記述（関連の成分、含まれる化学物質など）が必要である。化学の分野では、「分析対象物質」又は「物質や化合物の名称」が測定量を表すのに用いられることがあるが、これらの用語は量について述べているわけではないため、この用法は誤りである。

測定結果 (Measurement result)

規定された測定の実施によって得られる特性の値。

分析標準手順書に、何個の測定値を取るのか、及びそれらの平均、又は複数個の測定値の適切な関数（例えば、中央値や標準偏差など）のいずれを測定結果とするのかを規定するのがよい。また気体体積の標準状態への換算のような、補正が規定されることがある。したがって、複数の測定値から計算された結果が一個の測定結果になり得る。単純な場合には、単一の測定値そのものが測定結果となる。

分析値 (Analytical value)

分析対象（化学物質・微生物等）を分析した結果として分析機関から報告される値（通常、一つの測定値そのもの又は測定値（単一又は複数）からの計算により一つの値が得られる。）。

一般に分析値は、1つの測定値と測定の不確かさで表される。測定の不確かさが無視できる場合には測定値のみとして示される。検出下限や定量下限を考慮して補正されている場合や、回収率で補正されている場合がある。

分析結果 (Analytical result)

分析値として分析機関から報告される数値と、それ以外に入手できたあらゆる関連情報。

試料又は分析対象物質が複数ある場合は、分析結果は複数の分析値からなる。関連情報として、回収率、検出下限、定量下限の値及びそれらに関連した補正の有無の情報、測定の不確かさに関連する情報、毒性等価係数 (TEF) による補正の有無等、報告された分析値に直接関係するあらゆる情報を含む。

外れ値 (Outlier)

同一条件下で得た一組の値の中で、同一母集団に属するものではないと統計学による検定の結果として判定された飛び離れた値。

外れ値検定には、Cochran 検定や Grubbs 検定等が利用できる。外れ値検定は、例えば、室間共同試験において、①配付する試料の均質性を確認する際や、②分析機関から報告された値を評価・解析する際に使用する。

外れ値であるかどうかは、統計学による検定の結果から判定する（検定等の客観的な方法によらず、恣意的に外れ値と判定し除外してはならない。）。また、分析手順に問題がないか野帳で確認する必要がある場合もある。

異常値 (Abnormal value)

分析標準手順書から逸脱した操作で得られた分析値や調子の悪い分析機器による測定値のような技術的に誤りがあることが判明した分析値など、客観的理由で他のデータとは異質と考えられ、修正又は削除すべきと判断された値。

単なる計算ミスや書き写しミスの場合は、検証・修正を行った結果を利用する。

2.2 分析試料や試薬に関する用語

分析対象物質 (Analyte)

検出又は測定の対象である食品等の試料中の化学物質。

分子生物学的分析法や微生物を対象とした分析法の場合、「分析法が測定又は検出の対象とする微生物又は微生物に関連する生化学物質（例えば DNA、タンパク質、リポ多糖等）」と定義される。

マトリックス (Matrix)

試料中の分析目的とする成分以外の主要共存成分（一般に、試料とする食品、飲料、その他環境試料の品目・種類そのもののこと。）。

標準試薬 (Standard reagent)

試薬のうち、純度が高く、ある特定の化学物質等の含有濃度が求められており、定量分析において定量の基準とすることのできるもの。

例えば、分析対象とする物質そのもの（又は類縁体、安定同位体）が高純度で含まれ濃度が値付けされている試薬、誘導体化試薬、抗体などが標準試薬として用いられる。

標準物質（Reference material）

規定された1つ又は複数の特性に関して十分な均質性と安定性を有する試料で、測定プロセスにおいて、又は公称特性（nominal properties）の検査において、その用途に適合していることが実証されているもの。参照試料。

付与された値の有無にかかわらず、標準物質は測定精度の対照に用いることができるが、校正及び測定真度の対照に用いることができるのは、付与された値のある標準物質のみである。

技能試験の残り試料などは、付与値のある標準物質として使用することができる。

標準物質は、大きく純物質系標準物質と組成標準物質に分けられる。純物質系標準物質は、単一の純物質又は複数の純物質の混合物であり、標準試薬として利用される。組成標準物質は、マトリックス中のある化学物質又は微生物の組成値を、定められた精度（不確かさ）によって確定・付与したものである。マトリックスとして食品等以外にも、土壌、水などがある。

認証標準物質（CRM: Certified reference material）

認定機関の発行する証拠資料が添付された標準物質で、妥当な手続きを用いて規定され一つ又は複数の特性値と、それに伴う不確かさ及びトレーサビリティが示されているもの。

トレーサビリティには、値の計量学的トレーサビリティと公称特性値に関するトレーサビリティが含まれる。

試験室試料（Laboratory sample）

試料調製後、分析機関（分析試験室）へ送付された試料。

分析機関・分析試験室へ送付する前の段階で、ロットから代表的試料（representative sample）を得るために行われるのが「サンプリング」である。均質化されていない状態の試験室試料の一部を抜き取って分析用試料又は分析試料として使用することは、試験室試料が持つロットの代表性を失うことになるため、特別な指示が無い限り行ってはならない。

分析用試料（Test sample）

測定を行うため、試験室試料について何らかの処理を行った試料。

処理としては、微粉碎、乾燥等がある。

分析試料（Test portion）

分析用試料又は試験室試料からとり分けた、一回の測定のために用いられる試料。

2.3 分析法の性能や精確さに関する用語

目的適合性 (Fitness for Purpose)

ある分析法によって得られたデータが、所定の目的のために技術的・管理的に正しい判断を下すうえで、どの程度有用かを示す度合い。

分析法の目的適合性は、所定の目的に照らして検出下限、定量下限、精度が十分か、測定の不確かさの大きさは適切か等、妥当性確認データを利用して評価する。所定の目的によっては、分析法の頑健性に関するデータ等も利用する。

参考：Eurachem guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods Second Edition 2014

適用可能性 (Applicability)

分析法が十分に活用できる分析対象物質、マトリックス、濃度。

分析値に影響する各要因について十分に性能を発揮できる範囲を明示する以外に、他の分析対象物質を含む化学物質等による妨害があると知られている場合、一部のマトリックスや状況に適合不可能である場合は、その旨を明示する必要がある。

選択性 (Selectivity)

ある分析法によって、混合物又はマトリックス中の特定の分析対象物質を、類似の挙動を示す他の成分由来の妨害がなく、測定できる程度。

「選択性」は、化学分析において、他の成分が存在する中で、目的とする物質を測定できる特定の方法であるかどうかの程度を表すための推奨用語である。選択性は段階的に分類することができる。同じ概念に対して「特異性 (Specificity)」という用語を使用することは、混乱を招くので推奨されない。

頑健性 (Robustness)

分析条件に小さい変化があっても、分析値がその影響を受けないでいられる分析法の性能。通常の使用時における信頼性の指標となる。

規制に用いる分析法の場合、頑健性は重要な要因の一つである。

感度 (Sensitivity)

ある測定システムの表示 (指示値) の変化と、それに対応する被測定量の値の変化の比。通常、検量線の傾きとして表現される。

感度は、測定量に依存する可能性がある。検討される測定量変化は測定器の分解能よりも大きくなければならない。

精確さ (Accuracy)

分析値又は測定結果と参照値との一致の近さ。

分析値又は測定結果について「精確さ」という用語を用いる場合、偶然誤差と系統誤差の両者を含む概念である。真度と精度を合わせた総合的な良さを指す。(系統誤差：測定誤差の成分であり、繰り返し測定で一定あるいは予測可能な形で変化する。偶然誤差：測定誤差の成分であり、ランダムに変化する。)

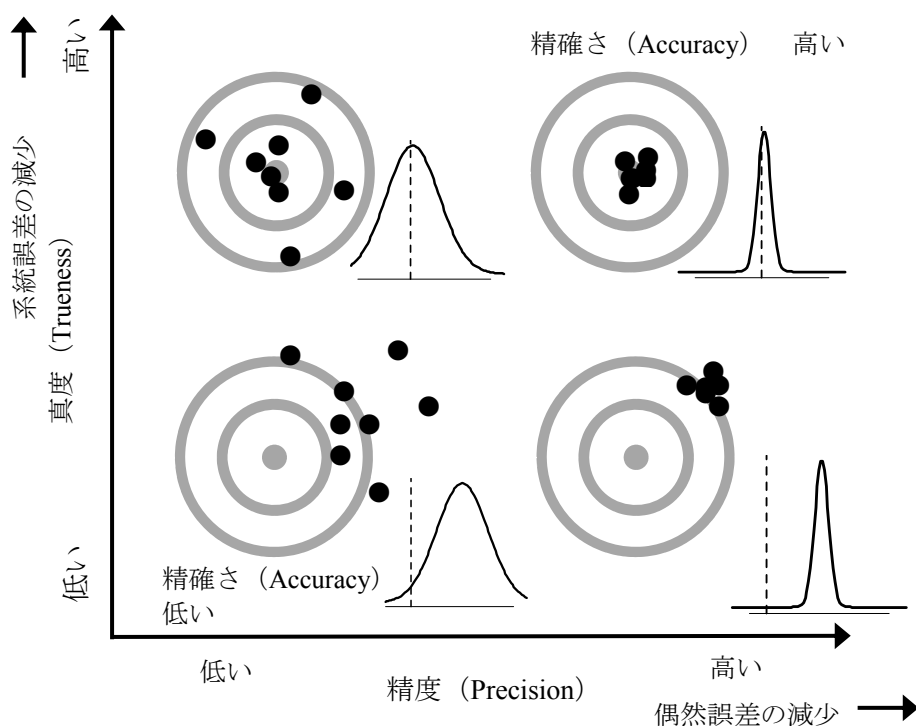


図 1 分析値の分布と、精確さ、真度、精度の関係

真度 (Trueness)

無限数の反復測定によって得られる量的値の平均値と参照とされる量的値との一致の程度。

測定の真度は量ではないため単位を伴う数値で示すことができない。しかし、ISO 5725 に一致の程度の評価法が示されている。

真度は測定¹⁾の系統誤差に反比例するが、偶然誤差との間に関係はない。

「精確さ」と「真度」を同義的に用いてはならない。

真の値 (True value)

ある量の定義と一致する量的値。

誤差の観点から測定を記述するアプローチでは、真の量的値はただ一つであり、実際には知りえない値であると考ええる。

測定の不確かさの観点からのアプローチでは、量の定義は本来的に詳細が不十分であるため、真の量的値は一つではなく、むしろ量の定義と一致する一群の量的値が存在すると考える。ただし、この一群の値は原則として、また実際にも、知ることは出来ない。

測定量に付随する定義上の不確かさが、測定の不確かさの他の成分に比べて無視できる程度である場合は、測定量は基本的に「ただ一つの」真の値を持つとみなしうる。

バイアス (Bias)

分析値又は測定結果の期待値と真値との差。

バイアスは、系統誤差の総体である。測定結果の期待値としては、長期間測定した測定値の平均値等を用いることができる。真の値の代わりに、取り決められた値(付与した値等)を用いることができる。

誤差 (Error)

分析値又は測定結果と基準となる量的値(参照値)との差。

以下の両方の場合に測定「誤差」という概念が適用可能である。

①参照すべき1つの基準値が存在する場合(これには、以下の2つの場合があり、後者の場合測定誤差は不明である。)

ア)測定標準によって校正が行われ測定の不確かさが無視できる場合

イ)取り決めによる値が与えられている場合

②測定量が唯一の真の値又は無視できる程度の範囲の真の値の候補となる一群の値によって表されると想定される場合(この場合、測定誤差は不明である。)

精度 (Precision)

規定された条件下で得られた複数の独立した分析値・測定結果間の一致の程度。

精度は、偶然誤差の分布のみに依存し、真の値又は参照値とは関連しない。精度の程度は不確かさによって表され、測定結果の標準偏差として計算される。精度が低いほど標準偏差は大きくなる。精度の量的な程度は、規定された条件に大きく依存する。併行精度と再現精度の条件は、特定の両極端な条件である。

分析機関での1つ又は複数の要因(例えば、分析者、使用機器、使用機器の校正、環境、試薬のバッチ、測定間の経過時間)の変動が許容され、それが特定の状況下で有用な場合、併行条件と再現条件の中間的な条件も考えられる。

検出下限 (LOD: Limit of detection)

ある分析法で合理的な確かさをもって検出可能な最小量又は最小濃度。検出限界ともいう。

分析機器の検出下限（装置検出限界：IDL）と分析法の検出下限（方法検出限界：MDL）がある。

検出下限は、分析試料中の分析対象物質の濃度又は量が $1-\beta$ （検出力： β は偽陰性の確率）の確率でブランク試料（分析対象物質を含まない分析試料）よりも大きいという結論が導かれる（分析試料中の分析成分の）真の正味濃度又は量である。検出下限は以下によって推定される。

$$\text{LOD} \approx 2 \times t_{1-\alpha, \nu} \sigma_0 \quad [\text{ただし } \alpha = \beta]$$

ここで、LODは検出下限、 $t_{1-\alpha, \nu}$ は $1-\alpha$ の片側信頼区間の自由度 ν におけるStudentの t 値である。 σ_0 は真の値（期待値）の標準偏差である。

ブランク試料の中央値（期待値）における不確かさが無視でき、 α （偽陽性の確率）= β （偽陰性の確率）= 0.05 で、真の値が正規分布をする場合には、 $\text{LOD} = 3.29\sigma_0$ となる。検出下限を正しく評価するためには、 α 及び β 、分析成分の濃度やマトリックス効果が検出下限付近の測定値の分布に及ぼす影響を考慮する。

一般に、「シグナルノイズ比（S/N）が3以上となる濃度」又は「バックグラウンドの標準偏差の3倍」を検出下限として算出することが多い。しかし、上記のように、検出下限は、純粋溶液のバックグラウンドの標準偏差×固定値（例えば3や6）として単純に定義されていないことに留意が必要である。

ある分析法を使用した際に、任意の過誤確率 α （疑陽性の確率）で濃度ゼロでないとい有意にいえる最小濃度のことを臨界値（Critical Value）と呼び、検出下限と区別する必要がある。

臨界値（Lc）は、以下によって推定される。

$$\text{Lc} \approx t_{1-\alpha, \nu} S_0$$

ここで、 $t_{1-\alpha, \nu}$ は $1-\alpha$ の片側信頼区間の自由度 ν におけるStudentの t 値である。 S_0 はサンプルの標準偏差である。

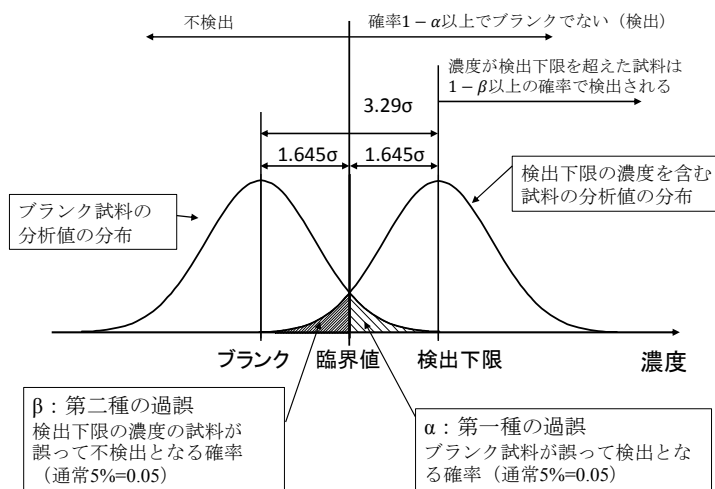


図 2 検出下限と臨界値の関係

定量下限 (LOQ: Limit of quantification)

ある分析法で分析対象物質を分析した場合に、適切な精確さをもって定量できる濃度の限界値。

英語では *limit of quantitation* という用語が用いられることもある。また、古い文献では *limit of determination* あるいは *determination limit* という用語が用いられている場合がある。

日本語では、定量限界ともいう。定量限界という場合、ある分析法で定量できる最低濃度 (定量下限) と最高濃度 (定量上限) の両方の意味がある。

一般に特定の相対標準偏差 (一般的に 10% 又は 6%) となる濃度の推定値として得られる。定量下限は以下の式で推定される。

$$LOQ = K_Q \sigma_Q, K_Q = 1/RSD_Q$$

ここで、LOQ は定量下限、 σ_Q はその点における標準偏差、 K_Q は乗数 (その逆数は選択した相対標準偏差 (RSD) に等しい) である。

もし、 σ が一定の場合 (推定された標準偏差が濃度に依存しない場合) には、 $\sigma_Q = \sigma_0$ (濃度に依存しないのでブランク試料における標準偏差と一致) である。 K_Q に 10% を代入すると、

$$LOQ = (10 \times \sigma_Q) = 10\sigma_0$$

この場合、定量下限における分析値が正規分布し、 $\alpha = \beta = 0.05$ であるとする、

$$LOQ = 3.04 \times LOD$$

となる。このことから、一般に、定量下限を「シグナルノイズ比 (S/N) が 10 以上となる濃度」又は「定量下限付近と想定される濃度の試料を繰返し分析した測定値の標準偏差の 10 倍」として算出することが多い。

定量下限は、分析機関によって大幅に異なる場合があるため、長期間に渡るルーチン分析において実用に耐えうるものとして、 α (偽陽性の確率) = 0.01 として分析法の検出下限 (方法検出限界: MDL) を求め、その 5~10 倍の値を「実用的定量下限 (Practical quantitation limit)」とすることがある。

回収率 (Recovery)

分析用試料中に存在するもしくは添加された、またはその両方である分析対象物質の量のうち、測定された量の割合。

HorRat

実際の相対標準偏差と Horwitz 式を用いて計算した予想される相対標準偏差の比。Horwitz Ratio の略語。

HorRat(R) は、実際の室間再現相対偏差 RSD_R と Horwitz 式を用いて計算した予測される室間再現相対標準偏差 ($PRSD_R$) の比である。

$$HorRat(R) = \text{室間相対標準偏差 } RSD_R / \text{予測室間相対標準偏差 } (PRSD_R)$$

ここで、予測室間相対標準偏差は以下に示す Horwitz 式で計算する。C は濃度の質量分率（分子と分母が同じ単位）である。濃度が 0.12 mg/kg 未満の場合は Thompson の修正式を用い、相対標準偏差として 22%を用いる。HorRat(R) の正常値は 0.5~2 である。

$$\hat{\sigma}_R = \begin{cases} 0.22 \times C & (C < 1.2 \times 10^{-7}) \\ 0.02 \times C^{0.8495} & (1.2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0.138) \\ 0.01 \times C^{0.5} & (0.138 < C) \end{cases}$$

$$PRSD_R(\%) = \begin{cases} 22 & (C < 1.2 \times 10^{-7}) \\ 2 \times C^{-0.1505} & (1.2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0.138) \\ C^{-0.5} & (0.138 < C) \end{cases}$$

試験室内の再現性について適用する場合、以下の式で計算される。HorRat(r)は、併行精度 RSD_r と Horwitz 式を用いて計算した予測される室間再現相対標準偏差 ($PRSD_R$) の比である。

$$\text{HorRat}(r) = \text{併行相対標準偏差 } RSD_r / \text{予測併行相対標準偏差 } (PRSD_R)$$

HorRat(r) の正常範囲は 0.3~1.3 である。

HorRat(R) 及び HorRat(r) の正常範囲が示されているということは、過去の化学分析値の経験則から求めた $PRSD_R$ (Horwitz 式から計算した値) と比べて、実際に得られた $RSD_R \cdot RSD_r$ が小さすぎても大きすぎても、分析の過程に何か問題がなかったかを疑い検討する方が良いことを意味している。

HorRat は、物理特性値（粘度、屈折率、密度、pH、吸光度等）の測定、食物繊維、酵素、水分等の経験的分析法（empirical methods）、固形物重量（Drained weight）のような品質測定には適用できない。生物学的測定法、微生物測定法などに HorRat の使用はなじまない。

2.4 繰返し分析・妥当性確認に関する用語

併行条件（Repeatability condition）

同一と見なされる試料の分析において、短時間（通常 1 日以内）に、同じ分析者が、同じ試験室で同じ機器を用いて、同一の試験・測定項目について同じ分析法を用いて、独立した分析値・測定結果を得る観測条件。

併行条件の分析の繰返し（併行分析、繰返し分析）とは、例えば HPLC 等の機器に同じ試料液を繰返しインジェクトして得られる値ではない。試料の秤量、溶解、抽出等、分析法の全ての操作を繰り返す必要がある。

併行条件の下での各種の要因を示す場合、「r」を下付けする（例： RSD_r ）。

併行精度 (Repeatability)

併行条件で得られた分析値・測定結果の精度。

併行条件で得られた分析値又は測定結果の標準偏差（併行標準偏差： S_r ）を平均値で除した値「併行相対標準偏差（ RSD_r ）」を併行精度の評価指標として用いる。

再現条件 (Reproducibility condition)

同一と見なされる試料の分析において、異なる分析者が、異なる試験室で異なる機器を用いて、同一の試験・測定項目について同じ分析法を用いて、独立した分析値・測定結果を得る観測条件。

再現条件の下での各種の要因を示す場合、「R」を下付けする（例： RSD_R ）。

空間再現精度 (Reproducibility)

再現条件で得られた分析値・測定結果の精度。

再現条件で得られた分析値又は測定結果の標準偏差（空間再現標準偏差： S_R ）を平均値で除した値「空間再現相対標準偏差（ RSD_R ）」を、空間再現精度の評価指標として用いる。

中間条件 (Intermediate precision condition)

同一と見なされる試料の分析において、同じ試験室で、同一の試験・測定項目について、同じ分析法を用いて、独立した分析値又は測定結果を得る観測条件。

併行条件との違いは、測定日時、分析者、使用機器、使用した校正、使用した試薬バッチなどについて、一部が異なっている点である。再現条件では、全部が異なっている。中間条件は、併行条件と再現条件の中間的な条件である。

中間精度 (Intermediate precision)

中間条件で得られた分析値又は測定結果の精度。

室内再現精度ともいう。中間条件で得られた分析値又は測定結果の標準偏差（ S_I ）を平均値で除した相対標準偏差を、中間精度の評価指標として用いる。併行精度と空間再現精度は、精度の大きさの観点から両極にあり、併行精度は最小、空間再現精度は最大である。中間精度はこの間に位置する。

測定の不確かさ (Measurement uncertainty)

測定量に帰属する量の値のばらつきの特徴を示した負の値をとらないパラメータ。

測定の不確かさは、分析値又は測定結果の“確かさ”を示す指標である。

測定の不確かさは、「標準不確かさ」と呼ばれる標準偏差（又はその任意の倍数）を用いる等、明示された包含確率を有する範囲で表される。

測定の不確かさは、①偶然による影響（測定を繰り返すとランダムに異なった結果が生じる）と②系統的影響（同じ要因が個々の繰り返し測定に影響）を受ける。系統的影響には、補正に伴う成分や測定標準の付与された値などに由来する成分、定義上の不確かさが含まれる。

測定の不確かさを推定する方法には「ボトムアップアプローチ」と「トップダウンアプローチ」の二つのアプローチがある。二つのアプローチに優劣はない。それぞれのアプローチに則した推定方法については JCGM 100: 2008, GUM 1995 with minor corrections Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement (ISO/IEC guide 98-3:2008) や EURACHEM / CITAC Guide CG 4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement が参照できる。

分析者のミスが測定の不確かさの要因に数えられることはない。手順をチェックすることでミスを回避しなければならない。

ISO/IEC 17025 は、分析機関における測定の不確かさの評価を義務としている。EU は、汚染物質等の食品規制に係る分析に関し、分析値に測定の不確かさを付して報告することを要求しており、測定の不確かさを考慮して適合・不適合の判定をしている（COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006、COMMISSION REGULATION (EC) No 333/2007 等を参照）。

分析法の妥当性確認 (Method validation)

使用する分析法が、意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされている（期待される性能を発揮できる）ことを調査によって確認・検証し、客観的な証拠を用意すること。

分析法の妥当性確認は、分析対象物質、マトリックス、分析法の三者一体のものとして、目的とする組み合わせで行う必要がある。妥当性確認には、単一の試験室で行う妥当性確認と複数の試験室で行う妥当性確認（室間共同試験）がある。

ISO/IEC 17025 は、ISO 規格等で規格化されていない分析法、分析機関で独自に開発した分析法、規格化された分析法であっても目的外の食品等に使用する場合や改変を加える場合に、妥当性確認を義務付けている。

分析法の検証 (Verification)

妥当性確認された分析法について、その妥当性確認がされている範囲内で、実際の分析者がその実現性を検証すること。

適用可能な場合は、報告された値を自らの分析によって達成される分析値の精確さの指標とするなど、不確かさを考慮に入れるべきである。検証すべき項目には、測定手順、物質、化合物、測定システムなどがある。分析キットなど、製造業者の仕様を満たしていることを検証すればよい場合もある。

検証は妥当性確認ではない。「検証」は分析法の開発要素を含まない。あくまでも既に妥当性確認等で既に示されている性能をきちんと再現できるか検証することである。

単一試験室による妥当性確認 (Single-laboratory validation)

一分析機関内で行う妥当性確認。

室間共同試験により妥当性確認された分析法が存在する場合、その使用を優先する。単一試験室でしか妥当性確認されていない分析法で得たデータが国際的に通用するのは以下の条件を満たす場合だけである。

- ① 国際的に認められたプロトコルである IUPAC の単一試験室による妥当性確認ガイドラインに従って分析法が妥当性確認されていること。
- ② ISO/IEC 17025 に適合した品質管理のもとで使用すること。

残留農薬分析法の妥当性確認は、国際的に単一試験室による添加回収試験で良いとされる。一方、汚染物質など毒性が高い物質の国際基準値とセットで検討される分析法は、室間共同試験により妥当性確認が行われていなければならない。

室間共同試験 (Inter-laboratory study, Collaborative study)

複数の分析機関が、均質性が確認され安定な同一の分析用試料から小分けされた試料を、文書化された同一の分析法を用いて 1 回又は複数回定量し、その分析値から分析法の性能を評価する試験。

室間共同試験の主な目的は、開発された分析法の規定された手順書に沿って、条件の異なる分析機関による分析が実施可能かを検証すること、分析法の性能の一つである室間再現精度が目的とする水準にあるかどうかを検証すること等である。参加する分析機関の数が多ければ多いほど、統計的なパラメータの推定結果は、より信頼性の高いものとなる。IUPAC1995 プロトコルでは少なくとも 8 試験室を要件としている。

2.5 その他の用語

内部品質管理 (IQC: Internal quality control)

十分に信頼することのできる分析結果を報告する能力を分析機関が持つかどうかを判断する目的で、日々の分析機関内での一連の操作や分析値が正常に保たれているかどうかを確認し、異常や疑わしい点があれば適宜改善を行い一定の品質を維持すること。

外部品質評価 (EQA: External quality assessment)

独立した分析機関間におけるクロスチェック、第三者機関が実施する技能試験への参加等、外部機関との比較や外部機関が提供する試験などに参加すること等により、分析結果が正常に保たれているかどうかを確認し、異常や疑わしい点があれば適宜改善を行い一定の品質を維持すること。

技能試験 (Proficiency testing)

技能試験提供者 (技能試験スキームの開発及び運用に関する全ての業務に責任を負う組織) から配付された均質な試料を、複数の分析機関が分析し、その結果をもとに分析機関間の能力が比較される。

技能試験に関する規格として、ISO/IEC 17043 : 2010 Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing (適合性評価-技能試験に対する一般要求事項) や ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison (試験所間比較による技能試験のための統計的方法) がある。

分析者個人の能力を検査・試験するものではない。

均質性 (Homogeneity)

ある食品等又は試料のある特性又は組成成分について、どの部分をとってもむらがなく全体に分布しており、性質・状態が同じである程度。

分析対象物質が、ある1つの特性の分布について均質であったとしても、他の特性については不均質な場合がある。

均質性試験 (Homogeneity test)

室間共同試験や技能試験において配付する試料の均質性を、配付前に確認するための試験。

均質性試験のプロトコルとして以下を参考にできる。

The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories 2006 IUPAC, *Pure and Applied Chemistry* 78, 145–196

3 化学物質の分析法の妥当性確認

3.1 分析法が満たすべき性能規準

3.1.1 基準値への適合性評価に用いる分析法

基準値への適合性評価（検査）に用いる分析法に関し、Codex 委員会では以下の性能規準に対するガイドライン値が合意されている。以下の表では、基準値や品質に関する特定のレベルを ML と記述し、ML のレベルに応じて適切な性能規準とそのガイドライン値を示している。

表 1 化学物質の定量分析法が満たすべき性能規準とガイドライン値

項目	規準			
適用可能性 (Applicability)	特定の食品等及び商品、特定の濃度レベル（最大又は最小）に対し適用できる分析法であること。 分析法の最小適用範囲は測定したい濃度によって異なり、室間再現標準偏差（S _R ）又は LOQ、LOD で表される。			
最小適用範囲 (Minimum applicable range)	ML ≥ 0.1 mg/kg : ML-3S _R ~ML+3S _R ML < 0.1 mg/kg : ML-2S _R ~ML+2S _R ※ S _R : 室間再現精度の標準偏差、Horwitz/Thompson 式から計算する。			
検出下限 (LOD)	ML ≥ 0.1 mg/kg : LOD ≤ ML×1/10 ML < 0.1 mg/kg : LOD ≤ ML×1/5			
定量下限 (LOQ)	ML ≥ 0.1 mg/kg : LOQ ≤ ML×1/5 ML < 0.1 mg/kg : LOQ ≤ ML×2/5			
精度 (Precision)	ML ≥ 0.1 mg/kg : HorRat 値 ≤ 2 ML < 0.1 mg/kg : RSD _R （室間再現相対標準偏差） < 44% ※ HorRat 値 = RSD _R /PRSD _R （PRSD _R : 予想される RSD _R ）			
回収率 (Recovery) 室間再現相対標準偏差 (RSD _R)	比率	濃度	回収率 (%)	RSD _R (%)
	1	100% (100g/100g)	98~102	≤ 4
	10 ⁻¹	≥ 10% (10 g/100g)	98~102	≤ 6
	10 ⁻²	≥ 1% (1 g/100g)	97~103	≤ 8
	10 ⁻³	≥ 0.1% (1 mg/g)	95~105	≤ 12
	10 ⁻⁴	≥ 100 mg/kg	90~107	≤ 16
	10 ⁻⁵	≥ 10 mg/kg	80~110	≤ 22
	10 ⁻⁶	≥ 1 mg/kg	80~110	≤ 32
	10 ⁻⁷	≥ 0.1 mg/kg	80~110	< 44
	10 ⁻⁸	≥ 0.01 mg/kg	60~115	< 44
10 ⁻⁹	≥ 0.001 mg/kg	40~120	< 44	
真度 (Trueness)	真度を評価する場合には、利用可能であれば認証標準物質を使用することが望ましい。			

また、併行精度について、以下の表の数値を満たしていることが望ましい。

表 2 併行精度のガイドライン値

比率	濃度	RSD _r (%)
1	100% (100g/100g)	≦1.3
10 ⁻¹	≧10% (10 g/100g)	≦1.9
10 ⁻²	≧1% (1 g/100g)	≦2.7
10 ⁻³	≧0.1% (1 mg/g)	≦3.7
10 ⁻⁴	≧100 mg/kg	≦5.3
10 ⁻⁵	≧10 mg/kg	≦7.3
10 ⁻⁶	≧1 mg/kg	≦11
10 ⁻⁷	≧0.1 mg/kg	≦15
10 ⁻⁸	≧0.01 mg/kg	≦15
10 ⁻⁹	≧0.001 mg/kg	≦15

上記の「表 1 化学物質の定量分析法が満たすべき性能規準とガイドライン値」及び「表 2 併行精度のガイドライン値」は一つの物質のみを分析対象とする分析法の性能規準であることに留意する。分析対象物質が複数存在し、その適合性評価に用いる場合は、Codex 委員会の情報提供文書「Criteria Approaches for Methods which Use a ‘Sum of Components’ (<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/resources/inf-doc/en/>)」を参考にして、個別に検討する。

全ての分析法が上記の性能規準を満たすことが出来るとは限らない。使用したい分析法が上記の性能規準を満たしていなかったとしても、代替法がない場合には、暫定的にその分析法を使用する。性能規準を満たす分析法が開発された段階で、暫定的に使用していた分析法を見直す。

特定 DNA 配列又は特定タンパク質の検出、同定、定量を目的とする分析法に求められる性能規準は「表 3 特定 DNA 配列又は特定タンパク質の分析法に求められる性能規準とそのガイドライン値」のとおりである。真度は、適切な値が保証された標準物質を使用して確認する。

表 3 特定 DNA 配列又は特定タンパク質の分析法に求められる性能規準とそのガイドライン値

	DNA の分析法		タンパク質の分析法	
偽陰性率	5% (99%信頼水準)			
RSD _R (≦%)	標的濃度	適用範囲の大 半	標的濃度	適用範囲の大 半
	35	50	35	50
RSD _r (≦%)	全適用範囲 (全ダイナミックレンジ)			
	25			
真度 (%比)	70~120			

3.1.2 実態調査に用いる分析法

実態調査に使用する分析法に要求される性能は、調査目的によって異なる。調べたい食品等の種類及び濃度範囲をまず検討し、その目的で使用する分析法に必要な性能（最小適用範囲、検出下限、定量下限）を個別に検討する。例を「表 4 実態調査に用いる分析法の性能規準の例」に記す。適用可能性、回収率及び真度は 3.1.1 と同様である。

表 4 実態調査に用いる分析法の性能規準の例

最小適用範囲 (Minimum applicable range)	以下の範囲を定量できること 低濃度側： 調査目的とする最低濃度 (C) 高濃度側： 過去の実態調査や文献情報における 99 パーセントアイル値×1.5
検出下限 (LOD)	信頼できる定量をしたい最低濃度 (C) $C \geq 0.1 \text{ mg/kg} : \text{LOD} \leq C \times 1/5$ $C < 0.1 \text{ mg/kg} : \text{LOD} \leq C \times 2/5$
定量下限 (LOQ)	信頼できる定量をしたい最低濃度 (C) $\text{LOQ} \leq C$ C 近辺の濃度分布を検討する必要がある場合 $C \geq 0.1 \text{ mg/kg} : \text{LOQ} \leq C \times 1/5$ $C < 0.1 \text{ mg/kg} : \text{LOQ} \leq C \times 2/5$
精度 (Precision)	$C \geq 0.1 \text{ mg/kg} : \text{HorRat 値} \leq 2$ $C < 0.1 \text{ mg/kg} : \text{RSD}_R$ (室間再現相対標準偏差) < 44% ※ $\text{HorRat 値} = \text{RSD}_R / \text{PRSD}_R$ (予想される RSD_R) ※ $\text{RSD}_R < 2 \times \text{PRSD}_R$

3.2 単一試験室による妥当性確認

妥当性確認がされていない分析法を使用する場合、室間共同試験による妥当性確認の事前の確認として又は妥当性確認に協力する分析機関が無ければ、単一試験室による妥当性確認を行う必要がある。ISO 規格や AOAC 法など国際的なガイドラインに従って室間共同試験による妥当性確認された分析法がある場合にはそれを優先して選択し、分析機関は適切に運用可能であることを検証した上で使用する。

単一試験室で分析法の妥当性確認試験を行う場合、単一試験室の分析法妥当性確認に関する IUPAC の国際ハーモナイズドガイドライン (Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis) に従って実施する。

単一試験室による妥当性確認は、妥当性確認をしようとする分析法と類似の分析原理・分析対象物質の分析について ISO/IEC 17025 に適合している分析機関で実施することが望ましい。可能であれば、妥当性が確認された他の分析法を用いて分析結果を相互確認することで補完する。

3.2.1 妥当性確認の試験計画

3.2.1.1 目的

単一試験室による分析法の妥当性確認の目的は、その分析法を使って得られた分析結果が信頼できるかどうか調べることである。代表的な場合として、以下の3つがある。

① 分析法を新たに開発した時や、既存分析法についての性能確認

(注) 既に妥当性確認されている分析法について、分析法が期待される性能を発揮できるかどうか確認することは「分析法の検証」という。分析機関が分析ごとに実施する内部品質管理は、単一試験室による妥当性確認とは異なる。

妥当性確認は、分析法開発時や、妥当性確認されていない分析法をルーチン分析に使用できるかどうか検討する段階で実施し、その後は、分析法が使われなくなるまでの間に、分析法修正等の必要に応じ行われる。

規格化されている分析法 (例えば ISO 規格など) については、個々の分析機関において妥当性確認を行う必要はない。しかし、個々の分析機関におけるルーチン分析に利用する前に、期待される性能を発揮できているかどうか、分析法の検証を行う必要がある。

内部品質管理は、妥当性確認された分析法の使用により統計学的に予測されるばらつきの範囲で分析値が得られていることを経時的に確認し、分析値の品質を維持し、必要に応じて改善措置等を講じることで管理する目的で行われる。

② 室間共同試験で妥当性確認試験を行う事前段階としての試験

③ 室間共同試験で妥当性確認試験を実施することが現実的に難しい場合に、分析法が信頼できるか判断するための根拠データの取得

3.2.1.2 分析法の選択

特殊な機器・特殊な試薬を使用する分析法や知的所有権を有する分析法は極力避け、汎用性が高く、国内外の分析機関で実施できる分析法を優先する。

候補となる分析法が複数ある場合、より汎用性が高い（または今後高くなる）と考えられる分析法を選択する。分析機器を保有し、能力がある分析機関が最低1以上存在することを確認する。

新たに開発された分析法など、未だいずれの分析機関でも妥当性確認されていない分析法については、必ず単一試験室で妥当性確認を行う。

3.2.1.3 分析機関の選択

単一試験室で分析法の妥当性確認を行う場合、信頼できる分析機関で実施しなければならない。可能な限り、以下の①～③の要件に合致する分析機関で実施すべきである。

- ① IUPAC、ISO、AOAC インターナショナルによる内部品質管理に関する国際ハーモナイズドガイドラインに沿った内部品質管理が行われている
- ② 同一の原理の分析法や、化学的な性質が類似した物質を対象とする分析について、定期的に技能試験へ参加している。
- ③ 同一の原理の分析法や、化学的な性質が類似した物質の分析について、ISO/IEC 17025 の認定を取得している。

3.2.1.4 評価項目

単一試験室による妥当性確認で、評価する性能の項目は以下のとおり。

評価項目	定性分析	定量分析
選択性	○	○
検出下限、定量下限	—	○
適用範囲	—	○
真度 バイアス、回収率	—	○
精度 併行精度、中間精度	—	○
頑健性	○	○

3.2.1.5 マトリックスの選択

分析用試料あるいは分析試料に添加した化学物質と、農作物の生育過程で環境から吸収等された結果として、いわば天然に食品等のマトリックス含まれることにな

った化学物質は、分析操作における挙動が同じとは限らない（実際に調査や検査において分析される試料中の分析対象物質は、天然に食品等に含まれることになった化学物質である。この分析対象物質はマトリックスと物理的又は化学的に結合している場合がある。）。このため、妥当性確認は実際の調査や検査により分析される試料と同様に、天然に分析対象物質を含む試料を用いて実施すべきである。やむをえず化学物質を添加した試料を用いて妥当性確認をする場合、可能な限り実際の試料と同じマトリックスに添加すべきである。粉碎や混合後の食品等や一次抽出物に添加することを避ける。

分析法の妥当性確認では、分析法の性能のみを適切に評価する必要があるので、性能の影響のみが分析値に現れるように、使用する試料の均質性が疑われる場合には、予め均質性試験を行う。均質性試験の方法については、3.3.1.4を参照する。

一般に同一の分類とみなされる食品等であっても、実際には様々な品種や、成分組成が異なる様々な製品が存在する場合が想定される。この場合、代表性を考慮して、妥当性確認を行うマトリックスを決定する必要がある。

既に特定の種類の食品について妥当性確認されている分析法について、食品の種類が少しだけ変わった場合に、個別に妥当性確認を改めて行うかどうかは、分析法の適用範囲にその食品を加えるかどうかや、食品中のタンパク質、脂質等の成分割合が大きく変わるかどうかという観点から検討する。新たな食品への適用を検討した結果として、妥当性確認時の性能が発揮されないことが明らかとなった場合には、その食品を対象とする分析法への改良を検討し、分析標準手順書を策定後、別途妥当性確認を行う必要がある。

3.2.1.6 検量線

以下を満たすように検量線を作成すること。

- ・ 5 濃度以上の検量点から設計し、それらの測定結果から作成する。
- ・ 測定に必要な濃度範囲全体にわたり等間隔になるよう検量点を設計する。
- ・ 濃度範囲は食品等に含有が想定される濃度の 0~150%又は 50~150%の濃度範囲を含むように設定する。
- ・ 検量線作成用の標準溶液は、少なくとも 2 反復、可能であれば 3 反復以上をランダムな順番で測定する。
- ・ 検量線の作成に使用した回帰の方法等、測定結果の解析方法について明記する。

3.2.2 留意点

単一試験室による妥当性確認では、選択性、検量線及び直線性、真度、精度、回収率、適用可能範囲、検出下限、定量下限、感度、頑健性、目的適合性、マトリックスの影響、測定の不確かさを評価する。

分析標準手順書に記されているとおりに操作を行い、使用する試料量、試薬濃度、器具、分析機器の条件、手順等を勝手に変更してはならない。例えば、使用す

るガラス器具の容量が記されている場合、異なる大きさの器具を使ってはならない。

繰り返し分析（併行分析）は、例えば HPLC で同じ試料液を繰り返し注入して分析値を得ることではない。試料の秤量、溶解、抽出等、分析法の全ての操作を繰り返す必要がある。

3.2.2.1 選択性

分析法の原理に照らして、妨害となりうる化学物質がないかどうか、分析対象物質を含まないマトリックス（マトリックスブランク）を用いて検討する。

分析対象物質を含むマトリックスの分析を行い、マトリックスによる妨害が、固相抽出やクロマトグラフィー等の分離手順によって十分取り除かれていることを確認する。また、分析法の原理に照らして、共存する可能性のある構造的に類似した化合物どうしを識別でき、分析対象物質を間違いなく同定できるかどうか確認する。

カラムクロマトグラフィーを原理とする分析法の場合、開発検討時のカラムで良好な分離を示したとしても、実際の現場では、カラムの劣化やカラムのロット間差によって必要な分離能が維持されていない場合もあるので、十分な分離能を有するカラム又は分離条件を分析法の開発時に検討しておくべきである。

表 5 選択性の検討

実施する事項	データから検討する事項	備考
試料及び標準物質を、候補分析法及び他の分析法で分析。	分析法が分析対象物質を他の妨害物質から分離・同定する能力を評価。	十分に分離・同定できていると評価するために、どの程度のデータ量が必要か検討する。 クロマトグラムでは、分離度 1.5 以上の場合、完全分離とする。
分析対象物質のほか、多様な妨害物質を含む試料を分析。	妨害物質による影響を検証する。妨害物質が、分析対象物質の検出や定量を阻害するかどうかを検討。	妨害物質により、検出や定量が阻害されるならば、分析法の改良が必要。

3.2.2.2 検出下限

分析機器の検出下限（装置検出限界：IDL）と、分析法の検出下限（方法検出限界：MDL）は異なる概念であり、区別する必要がある。分析機関から報告させるのは、分析法の検出下限である。

（1）分析機器の検出下限

分析機器の検出下限は、通常、標準試薬そのもの（マトリックスが存在しない）を分析機器に供するか、クロマトグラム等のベースラインのシグナルノイズ比から計算される。通常、シグナルノイズ比 3 であれば、分析機器の検出下限の推定に適切である。ノイズの幅は、分析対象物質のシグナルの半値幅の 20 倍以上の領域から求める。

（2）分析法の検出下限

分析法の検出下限は、食品等の実際の試料を用いて、全ての分析操作を含めて計算されなければならない。検出下限を推定するために適切な試料は、①マトリックスブランク（分析対象物質を含まないマトリックス試料）、又は②分析対象物質の濃度が予想される検出下限に近い又は予想される検出下限以下と推定されるマトリックス試料である。

分析法の検出下限の計算に必要な標準偏差を求めるためには、最低でも 6 回以上の繰返し分析（全ての分析操作を繰り返すこと）が必要であり、通常 10~20 回の繰返し分析が推奨される。

一般には、簡便のため、以下の式で検出下限を求める。

$$\text{LOD} = \text{マトリックスブランクの分析値} + 3.29 \times S_0$$

S_0 は、低濃度（濃度が検出下限付近）の試料について、 n 回の繰返し分析の不偏標準偏差。

と定義する。マトリックスブランクの分析値がゼロであるならば、以下で計算してよい。

$$\text{LOD} = 3.29 \times S_0$$

厳密に検討が必要な場合、以下の式で計算する。

① 併行精度を用いる場合

i) マトリックスブランクを用いていない場合、

$$S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$$

ii) マトリックスブランクを用いている場合、

$$S'_0 = S_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$$

S_0 は、低濃度（濃度が検出下限付近）の試料について、 n 回の繰返し分析の不偏標準偏差。

S'_0 は、検出下限の計算に用いる補正された標準偏差。

n は、低濃度（濃度が検出下限付近）の試料の繰返し分析の回数。

n_b は、マトリックスブランクを用いた分析の回数。

上記 i)又は ii)から計算した S'_0 を用い

$$\text{LOD} = 2 \times t_{1-\alpha, \nu} S'_0$$

ここで、 $t_{1-\alpha, \nu}$ は $1-\alpha$ の片側信頼区間の自由度 ν におけるt分布のt値である。 α は、「本当は検出下限以下の濃度であるが、誤って検出下限以上としてしまう確率（第一種の過誤）」であり、通常0.05を使用する。

② 中間精度を用いる場合

検出下限の計算のための標準偏差は、併行精度よりも中間精度から計算することが望ましい。中間精度を用いる場合、上記①の i)又は ii)の補正はしない。中間精度から計算する場合、1日当たり最低6回以上について最低3日間の繰返し分析を行う。例えば、20回の分析値を確保するため、1日7回×3日間の繰返し分析を行う。

$$\text{LOD} = 2 \times t_{1-\alpha, \nu} S_0$$

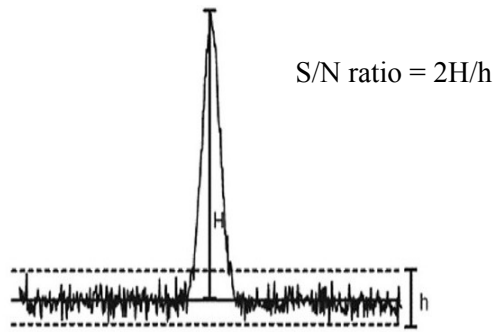
S_0 は、低濃度（濃度が検出下限付近）の試料の中間精度。

ここで、 $t_{1-\alpha, \nu}$ は $1-\alpha$ の片側信頼区間の自由度 ν におけるt分布のt値である。 α は、本当は検出下限以下の濃度であるが、誤って検出下限以上としてしまう確率（第一種の過誤）であり、通常0.05を使用する。

③ シグナルノイズ比から求める方法

食品等のマトリックスに分析対象物質を検出下限付近の低濃度で含む試料を用い、クロマトグラム等のベースラインのシグナルノイズ比から計算する。通常、シグナルノイズ比3となる濃度を検出下限とする。ノイズの幅は、分析対象物質のシグナルの半値幅の20倍以上の領域から求める。

シグナルノイズ比から検出下限の推定を行う場合、その濃度の試料を検出できるようにピーク感度を上げるようなことはせずに、限界値を高め設定し、実際に使える分析条件を維持する。推定された検出下限の濃度の試料を5回分析して、連続していずれも検出できる。又は、20回分析して検出しないのは1回程度であることを確認する。



図：Shrivastava A, Gupta VB. Chron Young Sci 2011;2:21-5. より

④ その他の方法

検量線を利用して求める場合、検量線が直線の場合は ISO 11843-2 を、検量線が非線形の場合は ISO 11843-5 を利用する。

3.2.2.3 定量下限

(1) 分析機器の定量下限

分析機器の定量下限は、通常、標準試薬そのもの（マトリックスが存在しない）を分析機器に供するか、クロマトグラム等のベースラインのシグナルノイズ比から計算される。通常、シグナルノイズ比 10 であれば、分析機器の検出下限の推定に適切である。ノイズの幅は、分析対象物質のシグナルの半値幅の 20 倍以上の領域から求める。

(2) 分析法の定量下限

① 検出下限から求める方法

検出下限で算出した S_0 、 S_i 又は S'_0 を用い、以下のとおり計算する。

$$LOQ = k_Q \times S \quad (S \text{ は } S_0、S_i \text{ 又は } S'_0)$$

ここで、 k_Q は通常 10 を用いる。これは、低濃度において標準偏差が一定であると仮定すると、相対標準偏差が 10% であることに相当する。

分析の目的によっては、 k_Q として、5 又は 6 を使用しても良い。 $k_Q=5$ の場合、相対標準偏差が 20% であることに相当する。 $k_Q=6$ の場合、相対標準偏差が 17% であることに相当する。

② シグナルノイズ比から求める方法

食品等のマトリックスに分析対象物質を定量下限付近の低濃度で含む試料を用い、クロマトグラム等のベースラインのシグナルノイズ比から計算する。通常、シ

ゲナルノイズ比 10 となる濃度を定量下限とする。ノイズの幅は、分析対象物質のシグナルの半値幅の 20 倍以上の領域から求める。

シグナルノイズ比から定量下限の推定を行う場合、その濃度の試料を検出できるようにピーク感度を上げるようなことはせずに、限界値を高め設定し、実際に使える分析条件を維持する。推定された定量下限の濃度の試料を 5 回分析して、連続していずれも検出できる。又は、20 回分析して検出しないのは 1 回程度であることを確認する。

3.2.2.4 適用範囲

適用範囲は、分析法が妥当性確認されたとみなせる分析対象物質の濃度範囲のことである。適用範囲は必ずしも検量線の範囲と同一である必要はない。検量線が広範囲に設定されていたとしても、実際に食品等中に想定される濃度範囲はもっと狭いかもれない。実際にあり得る濃度範囲で妥当性確認されていれば良い。

(1) 分析機器の適用範囲

分析機器の適用範囲は、標準試薬の濃度と分析機器の応答の関係をプロットすることで検討される。

- ① 検量線用の試薬又は校正用標準試薬を、想定される濃度範囲の±10%又は±20%の範囲で、濃度間隔が等間隔になるように 6~10 段階の試料を調製し、ランダムな順番で分析し、濃度 (x 軸) と分析結果 (y 軸) をプロットする。目視で、直線範囲と高濃度側、低濃度側の境界を確認する。
- ② 上記①での直線範囲について、濃度間隔が等間隔になるように 6~10 段階の濃度の試料を調製し、各濃度について 2~3 回の分析値を得るよう、ランダムな順番で分析を行い、濃度 (x 軸) と分析結果 (y 軸) をプロットする。

回帰分析を行い、各濃度における残差をプロットする。残差がゼロ付近にランダムに分布する場合、直線性が確認される。残差に一定の傾向がある場合、直線性がないか、濃度によって分析値の標準偏差が異なる可能性を示唆する。濃度によって分析値の標準偏差が異なる場合は、重み付き回帰分析を行う。

(2) 分析法の適用範囲

分析法の適用範囲を評価するためには、分析対象物質の濃度が既知であるマトリックス試料と、マトリックスブランクを用い、分析標準手順書に忠実に分析する必要がある。食品等中に想定される濃度の 0~150%又は 50~150%の濃度を範囲として含むように、等間隔に 6~10 の濃度段階をマトリックス試料における濃度として設定する必要がある。事前に、分析機器を適切に校正しておく。

各試料を最低 2 反復、可能であれば 3 反復となるようランダムな順番で分析し、設定濃度に対し分析値をプロットする。目視及び回帰分析により相関が適切であることを確認する。分析機器がマトリックスの妨害により非直線的な応答を示す可能

性や、マトリックスの種類が抽出効率や回収率に異なる影響を与える可能性があるため、分析法の適用範囲は、マトリックスごとに検討しなければならない。

中間精度の検討データが、目的とする濃度範囲を含んでいるのであれば、本項目を個別に検討する必要はない。

3.2.2.5 真度

定量分析においては、妥当性確認する分析法による分析値の平均値と適切な参照値との差、すなわちバイアスを評価する。バイアスが小さいほど真度が高い。バイアスの評価には主に以下の3種類の方法を使用する。

(1) 認証標準物質との比較

入手可能であるならば、認証標準物質を用いて分析値と認証値の不確かさの差を比較する。可能であれば、様々なマトリックス・濃度の認証標準物質で検証する。

(参考) 認証値と分析値を比較する方法は以下の資料を参照

ERM-Application Note 1: Comparison of a measurement result with the certified value
<https://crm.jrc.ec.europa.eu/e/132/User-support-Application-Notes>

(2) 標準物質との比較

試験室で調製した組成標準物質を使い10回以上の繰り返し分析を行う。同じ試料を複数の目的に使用してはならない点に留意する。例えば、検量線作成や校正に使用した標準試薬を、バイアスの評価のために使用してはならない。

(3) 回収率の確認

回収率を求めるには、①分析対象物質の含有濃度が付与されている参照試料を分析して、その分析値と付与値を比較する回収試験と、②試料に一定量の分析対象物質を添加したものと無添加試料を同一の分析法で分析し、それらの分析値から添加回収率を求める添加回収試験、がある。いずれの場合も10回以上の繰り返し分析を行う。

①の回収試験の場合は、以下の式により回収率%を計算し、設定した管理限界内であることを確認する。

$$\text{回収率 \%} = W_1/W_0 \times 100$$

ここで、 W_1 は試料から得られた分析値、 W_0 は分析対象物質の付与値を表す。

②の添加回収試験の場合は、回収率の計算方法が、Marginal recovery と Total recovery の2種類ある。

通常は、以下の式により回収率 (Marginal recovery) %を計算する。

$$\text{回収率(Marginal recovery) \%} = (W_1 - W_2)/W_0 \times 100$$

ここで W_1 は添加試料から得られた分析値、 W_2 は無添加試料から得られた分析値、 W_0 は分析対象物質の添加量を表す。検量線の最大値側を越えないように、検量線の低濃度側から高濃度側を含む最低 3 点の濃度で添加し、各濃度につき 7 回以上の独立した分析を行うことが望ましい。添加用の標準溶液は、定量用（検量線作成用）の標準溶液とは別に調製することが望ましい。そうでないと、定量用標準溶液の調製濃度の異常等は相殺されて検知できないおそれがある。

試料に元々含まれる分析対象物質量が添加量の 10% より少ない場合 ($W_2/W_0 < 0.1$ の場合)、標準添加法で測定し、以下の式により回収率%を計算する。

$$\text{回収率 (Total recovery)\%} = W_1/(W_2 + W_0) \times 100$$

Marginal Recovery と Total Recovery は結果が異なるため、どちらの定義で回収率を計算したか明記する。

3.2.2.6 精度

分析法の併行精度 S_r 及び中間精度 S_I を求める。

併行精度は、一般に、6~15 回の繰返し分析を行い、自由度 6 以上（7 回測定以上）となることが望ましいとされる。

中間精度に影響する要因としては、時間、検量線、分析者、分析機器等がある。これらの要因を個別に検討する必要はない。t 種類の測定グループについて、各 n 回の繰返し分析を行う。t (n-1) が 15 以上になるように設計することが望ましいとされる。詳細は、ISO 5725-3 を参照する。

簡便な方法として、例えば、同一の分析者（分析チーム）により、検量線の中間付近及び定量下限付近で、1 日 7 回×3 日間の繰返し分析を行う。

表 6 精度試験のデータ構造例

繰返回数	測定日 1	測定日 2	測定日 3 . . .	測定日 t
1	x_{11}	x_{21}	x_{31}	x_{t1}
2	x_{12}	x_{22}	x_{32}	x_{t2}
3	x_{13}	x_{23}	x_{33}	x_{t3}
4	x_{14}	x_{24}	x_{34}	x_{t4}
5	x_{15}	x_{25}	x_{35}	x_{t5}
6	x_{16}	x_{26}	x_{36}	x_{t6}
7	x_{17}	x_{27}	x_{37}	x_{t7}
n	x_{1n}	x_{2n}	x_{3n}	x_{tn}
平均	\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{x}_3	\bar{x}_t
総平均	$\bar{\bar{x}} = (\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \dots + \bar{x}_t)/t$			

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}$$

$$S_l = \sqrt{\frac{1}{n} \left(\frac{n \sum_{j=1}^t (\bar{x}_j - \bar{\bar{x}})^2}{t-1} - S_r^2 \right) + S_r^2}$$

t は繰返し分析の日数（上記の回数の場合 3）。 n は併行分析の回数（上記の回数尾場合 7）。 x_{jk} は、 j 日目の k 番目の分析値。 \bar{x}_j は、 j 日目の平均値。 $\bar{\bar{x}}$ は x_{jk} の総平均。

Excel で一元配置の分散分析を利用して併行精度 S_r 及び中間精度 S_l を算出する場合、「グループ間の分散」の自由度は「日数 - 1」、「グループ内の分散」の自由度は「日数 × (併行分析回数 - 1)」になっていることを確認する。

$$S_r = \sqrt{\text{グループ内の分散}}$$

$$S_l = \sqrt{\frac{\text{グループ間の分散} - \text{グループ内の分散}}{n} + \text{グループ内の分散}}$$

により S_r 及び S_l が求められる。

併行条件下で得られた繰返し分析について、分析値の間に許容される差の限界値（併行許容差）は以下のとおり。

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r$$

ここで、 t は自由度 $n-1$ (n は繰返し回数) における Student の t 値である。有意確率両側 0.05 の場合、繰返し回数が多いとき、 $t \approx 2$ (t 分布で自由度が増えると 1.96 に近づく) となり、

$$r = 2.8 \times s_r$$

を用いる。中間精度に関する許容差は、同様に、 $2.8 \times S_l$ を用いる。

3.2.2.7 頑健性

分析法の開発時や新たな分析法（頑健性が確認されていない）を使用する場合、分析の精度を保つために、分析条件をどれだけの許容範囲で調整する必要があるかを確認しておく必要がある。このため、分析条件（変動要因）を意図的に変化させ、どの範囲であれば分析値に影響しないかを検討する。

分析条件の少しの変化が分析値に影響する場合、分析法の手順自体を見直す必要があるかもしれず、それを後から検討することは大変であるため、頑健性は、分析法の開発時に検討しておくことが望ましい。

頑健性の確認は、分析者に対し分析条件の変動を許容することが目的ではない。分析者は、あくまで分析標準手順書に規定された条件で正確に実施するように分析を管理する必要がある。

頑健性を確認する具体的な方法としては、分析値に影響すると想定される個々の変動要因を個別に変化させる方法や Plackett-Burman 計画法がある。ただし、Plackett-Burman 計画法は、各要因が相互作用を及ぼさないという仮定及び分析値への変動の影響が線形であるとの仮定の下での実験設定であることに留意する。

Plackett-Burman 試験計画法の例

8 回の分析によって 7 要因を変動させた場合の頑健性確認

分析	分析条件							分析値
	要因 1	要因 2	要因 3	要因 4	要因 5	要因 6	要因 7	
分析 1	A	B	C	D	E	F	G	X ₁
分析 2	A	B	c	D	e	f	g	X ₂
分析 3	A	b	C	d	E	f	g	X ₃
分析 4	A	b	c	d	e	F	G	X ₄
分析 5	a	B	C	d	e	F	g	X ₅
分析 6	a	B	c	d	E	f	G	X ₆
分析 7	a	b	C	D	e	f	G	X ₇
分析 8	a	b	c	D	E	F	g	X ₈

要因	各要因が分析値に与える影響の計算式
要因 1	$D1 = [(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)/4] - [(X_5 + X_6 + X_7 + X_8)/4]$
要因 2	$D2 = [(X_1 + X_2 + X_5 + X_6)/4] - [(X_3 + X_4 + X_7 + X_8)/4]$
要因 3	$D3 = [(X_1 + X_3 + X_5 + X_7)/4] - [(X_2 + X_4 + X_6 + X_8)/4]$
要因 4	$D4 = [(X_1 + X_2 + X_7 + X_8)/4] - [(X_3 + X_4 + X_5 + X_6)/4]$
要因 5	$D5 = [(X_1 + X_3 + X_6 + X_8)/4] - [(X_2 + X_4 + X_5 + X_7)/4]$
要因 6	$D6 = [(X_1 + X_4 + X_5 + X_8)/4] - [(X_2 + X_3 + X_7 + X_8)/4]$
要因 7	$D7 = [(X_1 + X_4 + X_6 + X_7)/4] - [(X_2 + X_3 + X_5 + X_8)/4]$

変動幅は、分析法として設定される測定条件を中心として、大小 2 条件を設定する。変動幅は、日常の変動範囲をある程度上回る必要がある。変動幅としては、測定条件の±10%、又は器具類の精度や分析者に由来する誤差又は測定の不確かさの 5 倍を目安とする。

頑健性確認試験で評価する要因と変動条件例

要因		通常条件	条件 1	条件 2
要因 1	粉碎時間	10 分	9 分(a)	11 分(A)
要因 2	抽出温度設定	30 度	25 度(b)	35 度(B)
要因 3	抽出時間	30 分	27 分(c)	33 分(C)
要因 4	分離カラムの種類	Y 社製	Y 社製(d)	Z 社製(D)
要因 5	カラム温度	35°C	32.5°C(e)	37.5°C(E)
要因 6	測定機器のメーカー	M 社製	M 社(f)	N 社(F)
要因 7	検出器の測定波長 (nm)	235nm	233nm(g)	237nm(G)

(1) グラフによる評価

各要因が分析値に与える影響（上記例の場合 D1~D7）を用い、正規確率プロット又は半正規確率プロットのグラフを作成する。

半正規確率プロットでは、横軸に半正規分布（half-normal distribution）の累積分布関数からの標本の順序統計量の期待値（rankit 値）を、縦軸に各要因が分析値に与える影響の絶対値（上記例の場合 D1~D7 の絶対値）をプロットする。半正規分布の rankit 値は統計ソフトを用いて計算できる（例えば、統計ソフト R 及び extraDistr パッケージを用いることができる。要因数が k 個の場合、累積確率 1 を k 等分し、累積確率が各区間の中央値となる確率点（パーセント点）を計算する。）。

例えば要因数 7, n=8 の場合、D1~D7 を絶対値が小さい順から並べ、以下の表の rankit 値に対しプロットする。影響が有意な要因は、直線からずれてプロットされる。

表 7 半正規確率プロットにおける rankit 値の例

順位	半正規分布の rankit 値 要因数 7、n=8
1	0.09
2	0.27
3	0.46
4	0.66
5	0.90
6	1.21
7	1.71

(2) 統計学的評価

上記例の場合、頑健性試験で得られた分析値から標準偏差 S_{rob} を求める。

$$S_{rob} = \sqrt{\frac{n}{4} \times \sum_{i=1}^7 \frac{D_i^2}{n-1}}$$

ここで、 D_i は、 D_1 ~ D_7 の値であり、 n は分析数の8である。求めた S_{rob} と中間精度 S_I の分散比を、分子の自由度 $df_1=7$ 、分母の自由度 $df_2=9$ 、有意水準 0.05 の F 検定によって評価する。

$$F = \frac{S_{rob}^2}{S_I^2}$$

統計検定量 F が棄却限界値を下回る場合、条件の設定範囲内では、測定結果に有意な影響が生じていないと判定される。

統計検定量 F が棄却限界値を上回る場合、全ての要因が変動した場合に、測定結果に有意な差があると判定される。この場合、以下の統計検定量を用いて、各個別要因について測定結果に有意な影響があるか t 検定を行う（自由度 $(n-1)$ 及び有意水準 0.05 の両側検定）。

$$t = \frac{\sqrt{n}|D_i|}{2S_{ref}^2}$$

ここで、 D_i は、 D_1 ~ D_7 の値であり、 S_{ref} は以下の式で計算する。

$$S_{ref} = \sqrt{\frac{n \times \sum D_i^2}{4 \times m}}$$

ただし、 n は試験数。 D_i は、 D_1 ~ D_7 の値のうち、

$$|D_i| < 3.75 \times |D_i \text{の内の中央値}|$$

となる D_i であり、その個数が m 、 m 個の D_i の合計値が $\sum D_i^2$ である。

3.2.3 測定の不確かさ

分析機関が独自に不確かさを評価している場合、その値及び算出根拠を報告させる。分析機関が独自に不確かさを評価していない場合、同一試料の繰返し分析（ $n=7$ 以上）を最低2種類の濃度（定量下限及び検量線の間値付近の2種類が望ましい。）で分析日を替えて3回実施し、中間精度を報告させる。

単一試験室の連続した分析値から測定の不確かさを求める場合、真の標準偏差（標準不確かさ）は、併行精度の2~3倍の値となる。分析回数と係数の関係は以下の表のとおり。例えば、単一試験室での10回の併行分析の相対標準偏差（併行精度）が20%であった場合、真の標準不確かさは、33%（ $0.2 \times 1.65=0.33$ ）程度と見積もる。

表 8 分析回数と係数

分析回数 (n)	係数
3	4.42
4	2.92
5	2.37
6	2.09
7	1.92
8	1.80
9	1.71
10	1.65
20	1.37
50	1.20

係数： $\sqrt{(n-1)}$ / (自由度 $n-1$, 左側確率 0.05 に対するカイ二乗値)

3.3 室間共同試験による妥当性確認

国際的に通用する分析値を得るためには、室間共同試験による性能評価の結果、要求される性能を有することが明らかにされ、その結果として妥当性が確認された分析法を用いる必要がある。規制への適合性評価等のために日常的に使用する予定の分析法は、国際的なガイドラインに従った室間共同試験を実施して、目的適合性の観点から、当該分析法の利用の可否を判断する。

ISO 規格や AOAC 法など、室間共同試験を経て規格化されている分析法を、適用可能性が確認されているマトリックス・濃度範囲に適用する場合は、改めて室間共同試験をする必要はない。以下に、室間共同試験を実施する際の主な留意点を記す。

3.3.1 計画

3.3.1.1 対象とする分析法

特殊な分析機器・特殊な試薬を使用する分析法や知的所有権を有する分析法は極力避け、汎用性が高く、国内外の分析機関で実施できる分析法を優先する。

候補となる分析法が複数ある場合、より汎用性が高い（または今後高くなる）と考えられる分析法を選択する。分析機器を保有し、能力があると認められる分析機関が必要数以上存在することを予め確認する。

3.3.1.2 使用するガイドライン

室間共同試験による妥当性確認は、国際的に認知されたガイドライン、すなわち、IUPAC、ISO、AOAC インターナショナルによる国際ハーモナイズドガイドライン（以下「国際ハーモナイズドガイドライン」という。）、ISO 5725-2 又は AOAC ガイドラインのいずれかに基づいて実施する。可能であれば、これら三種のガイドラインを満たす試験計画を設計する。

3.3.1.3 参加分析機関

Codex 規格で使用できる分析法とするためには、室間共同試験により妥当性確認されていることが必要となる。また複数国の分析機関が参加する国際的な室間共同試験として実施されていることが望ましい。このため、海外の分析機関に参加を求めべきである。出来る限り、3.2.1.3 の要件に合致する分析機関で実施する。参加を打診する分析機関には、趣旨、タイムライン、費用負担等を明示した計画を示す。

室間共同試験の対象とする分析法に習熟している分析機関に参加を求める。分析機関の数が確保できない場合など、分析法の使用が初めての分析機関の参加を検討する必要がある場合は、予め練習させ、適正な分析結果が得られない場合は、分析標準手順書の説明の充実など改良の必要性を検討する。分析標準手順書に問題がないにもかかわらず、適正な分析結果が得られない分析機関は、室間共同試験へ参加させてはならない。

定量分析の場合、外れ値を除いた有効な分析値が 8 試験室分以上必要であるため、少なくとも 10~12 機関に参加を打診する。定性分析の場合、外れ値を除いた有効な分析結果が 10 試験室分以上必要であるため、少なくとも 12~15 機関に参加を打診する。例外的に、試験所の能力、使用する分析機器の特殊性、準備可能な配付試料数等を鑑みて参加試験室数を 3~5 に絞った簡易な共同試験が計画される場合もある。

機器分析の場合、使用する分析機器のメーカー・モデル等の要因によって分析法の性能が影響されないかどうか、室間共同試験を行う前に確認しておくことが望ましい。一定以上の性能を有する分析機器の使用が前提となる場合、分析標準手順書中で、分析機器の性能を要件化しておく必要がある。この場合、分析標準手順書の中では、特定メーカー・機種名を指定するのではなく、カタログ値等を参考に求める性能を要件として示すことが望ましい。

3.3.1.4 配付試料の準備

分析対象物質となる化学物質を含む食品等試料について、実際の食品等中に想定される濃度範囲に含まれ異なる濃度のものを、最低 5 試料準備する。人為的に化学物質を添加した試料より、天然に由来する化学物質を含む試料が望ましい。

定量分析の場合、1 マトリックスにつき最低 5 試験材料（マテリアル）以上を必須とする（単一マトリックスの一濃度のみの分析が目的となる場合（ある濃度について室間再現精度を求める場合）は、例外的に 3 試験材料まで減らすことが可能）。各試験材料について、最低 2 反復以上の分析が可能な量を用意する。低濃度の試料、高濃度の試料、濃度差が 5% 以内の試料ペア（Youden pair）を含める。

（注 1）「分析対象物質／マトリックス／濃度」の組み合わせが違えば異なる「材料（マテリアル）」となる。

（注 2）試験材料中のマトリックス／分析対象物質の濃度範囲は、当該分析法の適用可能性（Applicability）の根拠となる。即ち、妥当性確認された分析法の適用が可能な濃度範囲は、室間共同試験での最低濃度と最高濃度の間となることに留意が必要である。分析法を実態調査に使用することを考えると、実態調査の対象として通常想定される食品等マトリックス種及び通常想定される分析対象物質の濃度範囲の試験材料を用意する。

（注 3）blind duplicate（同一材料に由来する、分析機関にとって濃度が分からないようにした、2 反復分の試験室試料）及び Youden pair（濃度差が 5% 以内の試料）はそれぞれ 1 試料として扱う。試験室内の標準偏差 S_r は、試料 blind duplicate 又は Youden pair で算出方法が異なる。

配付試料を作成する前に、室間共同試験に要する期間（分析機関への試料配付～分析結果の報告期限）を考慮したマトリックス中の分析対象物質の保存安定試験を行う。

配付試料を参加試験室が受領した後の保管方法を明確に指示する必要がある。測定中の試料が経時的に変化するときは、このことを考慮に入れてタイムスケジュールを検討すべきであり、分析日を指定するなどの工夫が必要である。保存中に水分量が増えるようなケースでは、分析法が対象とするアナライト以外に、水分含量の分析を参加機関に求めて分析値を補正させる必要があるかどうか等検討する。

1 試料につき、各試験室へは、定量分析では最低 2 回、定性分析では最低 6 回の併行分析が可能な量を配付する。定性分析の場合、さらに、1 マトリックスにつき 6 点の陰性試料を配付する。1 つの配付試料は 1 回の分析に必要な最低量とし、余分な分量の試料は配付しない。やり直し・再分析等も想定し、適切な量の試料を予備ストックとして確保する。均質性試験は、IUPAC、ISO、AOAC インターナショナルの技能試験に関する国際ハーモナイズドプロトコル 2006 に記載された方法により行う。各材料について 2 回の併行分析を 10 回以上繰り返す。均質性が確認できない場合、混合を繰り返し均質性試験で良好な結果が得られるまで、混合を繰り返すか、粉碎材料を用いることを検討する。

小分け用の容器は、分析対象の化学物質の吸着や交差汚染、光による分解、重合等を防ぐ材質のものを使用する。小分けした配付試料にランダムな試料番号を付与すること等により、どの材料由来の試料なのか、どれが併行分析用のペアなのか、参加分析機関が分からないようにする。配付に際して取り違えることがないように十分注意する。

3.3.1.5 試料等の送付

送付時の温度条件を検討する。温度や保管による安定性を検討しておく。

外国へ送付する場合、食品等試料の輸出入における検疫条件を確認し、必要に応じ動植物検疫証明書等を同封する。海外に分析用試料を送付するためにはインボイス及びパッキングリストが必要である。検疫・通関時にバイアル等に小分けした配付試料が開封され汚染されることがないように工夫が必要（開封されたかどうか判別できる封をしておき、一旦開封された試料は分析しないよう指示をする等）である。外国政府の分析機関等が参加する場合、政府機関を通じてインボイス情報を予め通知することにより、通関時の便宜を図ってもらうことを検討する。

分析に必要な試薬類を同時に送付する場合、国内外の輸送時における毒劇物の取扱条件に注意する必要がある。毒劇物は基本的に航空貨物として輸送できないため、必要であれば、試薬事業者ルート（日本法人の現地代理店等を経由する等）で送付するほうが簡便な場合もある。

3.3.1.6 分析報告書様式

分析機関に報告させるための分析報告書様式を用意する。分析値のみならず、分析値に関連し分析値が妥当かどうか確認・判断するために必要と想定される項目の全てを分析結果として報告させる。例えば以下のような項目が挙げられるが、これ以外にも必要な項目がないか検討する。

- ① 分析機関に関する情報
分析機関名、分析者（責任者名、実際の分析者名）、連絡先
- ② 配付試料に関する情報
受領日、分析開始日、分析終了日、保管条件
- ③ 分析機器・器具に関する情報
分析機器の情報： メーカー、モデル、メンテナンス・校正の方法及び頻度
器具の情報： メーカー、容量、材質（ガラス、PTFE 等）、公差、校正の方法及び頻度
使用した全ての機器・器具それぞれについて報告させる。
- ④ 分析条件
分析標準手順書に指定していない事項について、分析機関側で検討採用した主要な設定条件
分析標準手順書の改変有無・改変した場合その内容詳細
- ⑤ 使用した試薬
実際に使用した各試薬のメーカー、カタログ番号、ロット番号、純度、ストック溶液の調製日等
- ⑥ 検量線
検量線作成日、検量線の設計(検量点の数やその濃度)、各濃度のピーク面積、保持時間、分析終了時点における検量線の変動の程度（配付試料の分析後に検量線作成用の試料を再度分析して分析値を比較等）、回帰分析の方法・結果、決定係数
- ⑦ 分析結果
検出下限及び定量下限及びその算定方法、試料番号、分析日、採取試料量、クロマトグラム（保持時間、ピーク面積）、分析値、回収率（可能な場合）、特記事項（補正の有無及び内容）
参加分析機関には、ブランク試料の分析値を含め、事前説明がない限り、平均をとるなどの加工をしない生データを報告させる。必要に応じ、有効数字何桁で報告させるか検討する。
ブランク試料の分析値が配付試料の値より大きい場合は、ゼロでなく、負の値を報告させる。「トレース (trace)」、「～未満」の表現の可否は、室間共同試験の実施責任者の指示に従うように指示をする。言葉を用いた報告は統計処理で扱えないため避けるべきである。

3.3.2 分析及び報告

それぞれの参加分析機関に1名、分析結果を報告する監督者を決める。監督者は、実施責任者から送付された分析標準手順書に従って分析の実施を組織立て、指示する。監督者自身が分析者として参加してはならない。

全ての分析機関で、正常に分析を行える代表として選ばれた、一人の分析者によって分析が実施されなければならない。分析過程を複数の者で分担して実施する場合、その複数の分析者からなるチームで分析を実施する場合、チーム全体を一つの分析主体とみなし、チーム内の作業役割は変更してはならない。

分析標準手順書に記されているとおりに操作を行い、使用する試料量、試薬濃度、器具、分析機器の条件、手順等を勝手に改変してはならない。例えば、使用するガラス器具の容量が記されている場合、異なる大きさの器具を使ってはならない。

3.3.3 解析

国際ハーモナイズドガイドライン、ISO 5725-2、AOAC ガイドラインでは、外れ値検定における除外可能数、繰返し・有意確率等に差異がある。どのガイドラインに基づいて解析をしたかを明らかにする。可能であれば、国際ハーモナイズドガイドライン、ISO 5725-2 及び AOAC ガイドラインの3種類の解析を行い、各方法で算出された室間再現精度及び HorRat 値の一致の程度を確認する。

3.3.3.1 数値の取扱

報告されたデータ数が分析機関によって異なる場合（例えば、ある分析機関だけが3回の併行分析の結果を報告した場合など）に、データ数をそろえたいときは、乱数を用いてランダムに余分なデータを除く。

精度等を計算する際は、計算の途中では原データの少なくとも2倍の桁数まで計算されなければならない。最後に標準偏差の有効数字を2桁にする。計算結果が正しいか、異なる担当者によりダブルチェックする。

3.3.3.2 異常値、外れ値の除去

分析値及び付随するデータについて、分析標準手順書に従わなかった等理由が明らかな異常値の場合、無効と判断し当該分析値を除いて解析する。検討の結果、計算や転記の誤りと判明した場合は、その外れ値と疑われた結果を正しい値に訂正して解析する。明らかな技術的な誤りであって訂正できない結果は除去する。

室間共同試験では、均質性が確認されている複数の試料を繰返し分析するので、分析値が正規分布すると仮定した統計解析を行う。この点、実態調査のデータ（汚染物質の場合、通常正規分布しない）の解析と、前提が異なる。実態調査のデータ

に異常値・外れ値と思われる分析値が含まれていても、それを統計解析により除外してはならない。再度サンプリング及び分析を行い、試料や分析にそのような分析値となった要因が含まれていないかを確認する必要がある。

室間共同試験のデータから統計解析により外れ値を除外するに当たっては以下に留意する。

- 明らかな異常値を除外した後の有効なデータのみを統計処理に用いる。
- 一元配置分散分析及び外れ値の処理は、分散、併行精度、室間再現精度の推定のため、試験材料毎に行う。
- 初期解析では、外れ値を除外せず、有効なデータのみを用いて、平均値、併行精度、再現精度を算出する。
- 外れ値の処理
 - ・ Cochran 検定（片側検定、有意確率 2.5%）を行い、外れとなる試験室の反復分析値を除く。
 - ・ Grubbs 検定（両側検定、有意確率 2.5%）を行い、外れとなる試験室の反復分析値を除く。
- 外れ値検定は、①Cochran 検定又は Grubbs 検定で除外する試験室がない場合、②除外する試験室数が上限（検定開始時の試験室数の 22.2%以上（2/9））を超える場合、当該外れ値を除外せずに 2/9 を超える前に終了する。

具体的な手順は次のスキームを参照する。

図 室間共同試験における外れ値の除外の手順

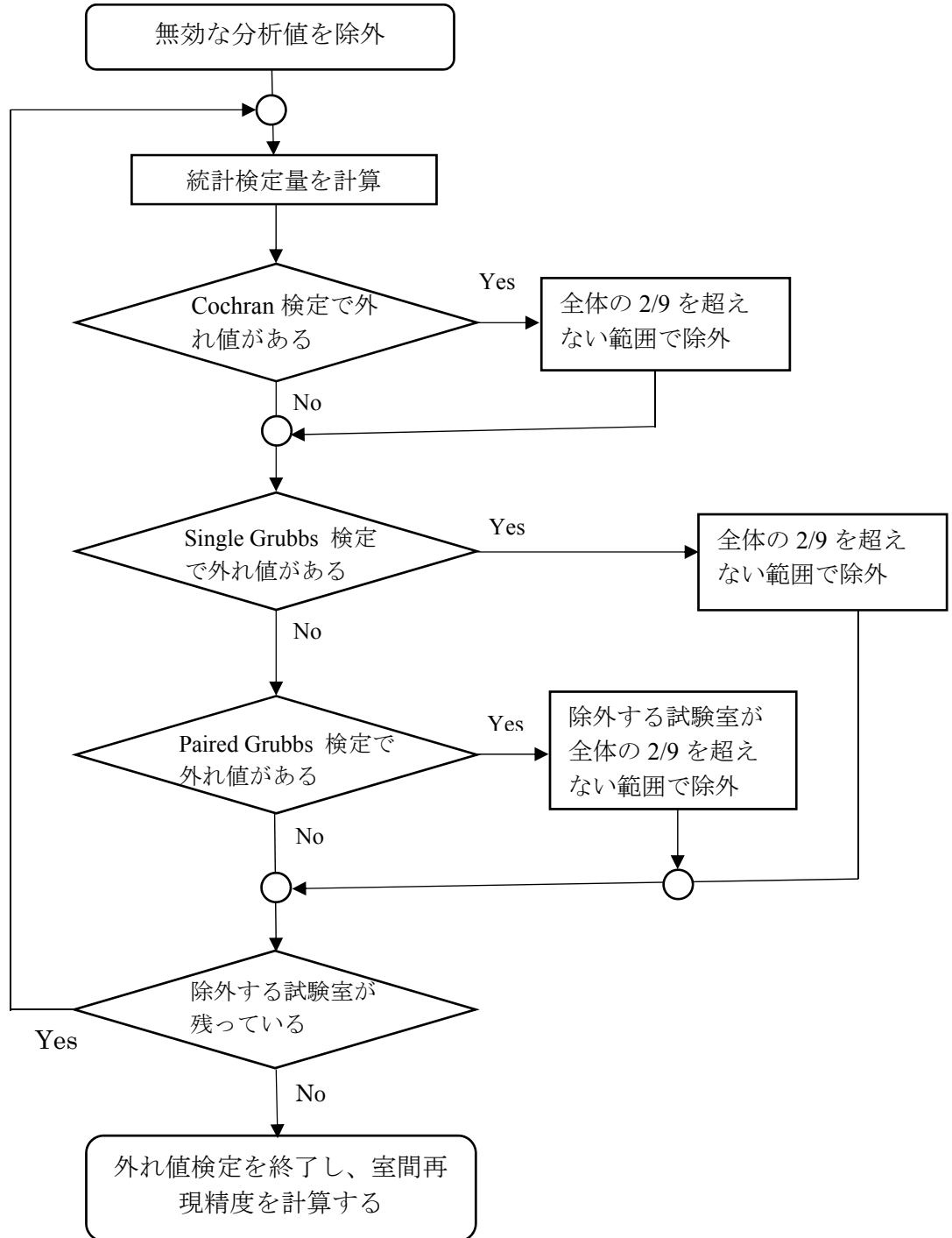


表9 各種ガイドラインにおける外れ値検定の方法の比較

	国際ハーモナイズドプロトコル	AOAC ガイドライン	ISO 5725-2
Cochran 検定	統計検定量： 100×（分析機関内の分散のうちの最大値）/（試験所内分散の合計値）	統計検定量： 100×（分析機関内の分散のうちの最大値）/（試験所内分散の合計値）	統計検定量： （分析機関内の分散のうちの最大値）/（試験所内分散の合計値）
	有意水準上側 2.5%で検定	有意水準上側 2.5%で検定	有意水準上側 5%及び 1%で検定
	外れ値があった場合、Cochran 検定を繰り返す記載なし。	外れ値があった場合、Cochran 検定を繰り返す記載なし。	外れ値があった場合、Cochran 検定を繰り返すことが望ましい。 外れ試験室に属すと説明がつかない場合、5%外れ値は正しいものとして残す。 1%外れ値は除外。
	棄却限界値は共通。以下の Cochran 検定の項目の表を参照。		棄却限界値は規格中の表を確認すること
single Grubbs 検定	統計検定量：100（1 - S_L/S ）と 100（1 - S_H/S ）の大きい方	統計検定量：100（1 - S_L/S ）と 100（1 - S_H/S ）の大きい方	統計検定量： $(x_H - \bar{x})/s$ と $(\bar{x} - x_L)/s$ の大きい方
	有意水準両側 2.5%で検定	有意水準両側 2.5%で検定	有意水準両側 5%及び 1%で検定
	外れ値があれば除外し Cochran 検定に戻る	外れ値があれば除外し Cochran 検定に戻る	外れ値があった場合、反対側に（例えば最大値が外れ値の場合、それを除外し、最小値に対して）single Grubbs 検定を繰り返す。
paired Grubbs 検定	統計検定量 1：100（1 - S_{2L}/S ）と 100（1 - S_{2H}/S ）の大きい方 統計検定量 2： 100（1 - S_{HL}/S ）	統計検定量：100（1 - S_{2L}/S ）と 100（1 - S_{2H}/S ）と 100（1 - S_{HL}/S ）の最も大きい値	統計検定量： $(p-3)/(p-1) \times s_{2H}^2/s^2$ と $(p-3)/(p-1) \times s_{2L}^2/s^2$
	統計検定量 1 は有意水準両側 2.5%で、統計検定量 2 は有意水準片側 1.25%で検定	有意水準両側 2.5%、片側 1.25%で検定	有意水準両側 1%で検定
	統計検定量 1 の検定で外れ値がない場合は、統計検定量 2 の検定に進む。いずれの検定でも外れ値がある場合は除外して Cochran 検定に戻る。	外れ値がある場合は除外して Cochran 検定に戻る。	Single Grubbs 検定で外れ値がある場合は実施しない。外れ値があれば除外する。
Grubbs 検定の棄却限界値	棄却限界値は共通。以下の Grubbs 検定の項目の表を参照。		棄却限界値は規格中の表を確認すること
除外可能数	2/9 まで	2/9 まで	除外過多に注意（注）

※最新版食品分析法の妥当性確認ハンドブック 2010年版の74ページ表-1を改変

(注) Cochran 検定で、一つの測定水準だけで、2つまたは3つの分析機関が大きな標準偏差（同一濃度の試料の繰返し分析について）を示す場合には、複数の外れ値を除外してよいか注意して検討することが望ましい。一つの分析機関が複数の測定水準で外れ値を出しているときは、この分析機関の室内分散が異常に大きいことを強く示していると考えてよく、その分析機関のデータ全部を除外することが望ましい。

(記号) p ：分析機関数

S ：併行分析の p 個の平均値の不偏標準偏差

S_L : 参加分析機関内で最小の値となる平均値を除外して計算した $p-1$ 個の平均値の不偏標準偏差。

S_H : 参加機関内で最大の値となる平均値を除外した $p-1$ 個の平均値の不偏標準偏差。

S_{2H} : 最大及び 2 番目に大きい平均値を除外した $p-2$ 個の平均値の不偏標準偏差。

S_{2L} : 最小及び 2 番目に小さい平均値を除外して計算した $p-2$ 個の平均値の不偏標準偏差。

S_{HL} : 最大及び最小の平均値を除外して計算した $p-2$ 個の平均値の不偏標準偏差。

3.3.3.3. Cochran 検定

Cochran 統計量は、同じ分析機関内の繰返し分析値の不偏標準偏差を用い、以下の式で計算される。

$$\text{Cochran 統計量} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{n=1}^p s_i^2} \times 100$$

ここで、 S_{max}^2 は、 p 個の分析機関内の分散のうちの最大値、 $\sum_{n=1}^p s_i^2$ は、 p 個の分析機関内分散の合計値である。

計算した統計量が以下の表の値を超える場合は、外れ値として除外する。

表 10 Cochran 検定における棄却限界値

有意水準 2.5%片側検定

試験所数	各試験所における繰返し分析の回数				
	L	r=2	r=3	r=4	r=5
4	94.3	81.0	72.5	65.4	62.5
5	88.6	72.6	64.6	58.1	53.9
6	83.2	65.8	58.3	52.2	47.3
7	78.2	60.2	52.2	47.3	42.3
8	73.6	55.6	47.4	43.0	38.5
9	69.3	51.8	43.3	39.3	35.3
10	65.5	48.6	39.9	36.2	32.6
11	62.2	45.8	37.2	33.6	30.3
12	59.2	43.1	35.0	31.3	28.3
13	56.4	40.5	33.2	29.2	26.5
14	53.8	38.3	31.5	27.3	25.0
15	51.5	36.4	29.9	25.7	23.7
16	49.5	34.7	28.4	24.4	22.0
17	47.8	33.2	27.1	23.3	21.2
18	46.0	31.8	25.9	22.4	20.4
19	44.3	30.5	24.8	21.5	19.5
20	42.8	29.3	23.8	20.7	18.7
21	41.5	28.2	22.9	19.9	18.0
22	40.3	27.2	22.0	19.2	17.3
23	39.1	26.3	21.2	18.5	16.6
24	37.9	25.5	20.5	17.8	16.0
25	36.7	24.8	19.9	17.2	15.5
26	35.5	24.1	19.3	16.6	15.0
27	34.5	23.4	18.7	16.1	14.5
28	33.7	22.7	18.1	15.7	14.1
29	33.1	22.1	17.5	15.3	13.7
30	32.5	21.6	16.9	14.9	13.3
40	26.0	17.0	13.5	11.6	10.2
50	21.6	14.3	11.4	9.7	8.6

3.3.3.4 Grubbs 検定

統計量を以下の式で計算する。計算した統計量が以下の表の値を超える場合は、外れ値として除外する。

Single Grubbs 検定統計量 (統計量 a) = $100 (1 - S_L/S)$ と $100 (1 - S_H/S)$ の大きい方

- p : 分析機関数
- S : 併行分析の p 個の平均値の不偏標準偏差。
- S_L : 参加分析機関内で最小の値となる平均値を除外して計算した $p-1$ 個の平均値の不偏標準偏差。
- S_H : 参加機関内で最大の値となる平均値を除外した $p-1$ 個の平均値の不偏標準偏差。

Paired Grubbs 検定統計量

統計検定量 1 (統計量 b) : $100 (1 - S_{2L}/S)$ と $100 (1 - S_{2H}/S)$ の大きい方

統計検定量 2 (統計量 c) : $100 (1 - S_{HL}/S)$

- p : 分析機関数
- S : 併行分析の p 個の平均値の不偏標準偏差。
- S_{2H} : 最大及び 2 番目に大きい平均値を除外した $p-2$ 個の平均値の不偏標準偏差。
- S_{2L} : 最小及び 2 番目に小さい平均値を除外して計算した $p-2$ 個の平均値の不偏標準偏差。
- S_{HL} : 最大及び最小の平均値を除外して計算した $p-2$ 個の平均値の不偏標準偏差。

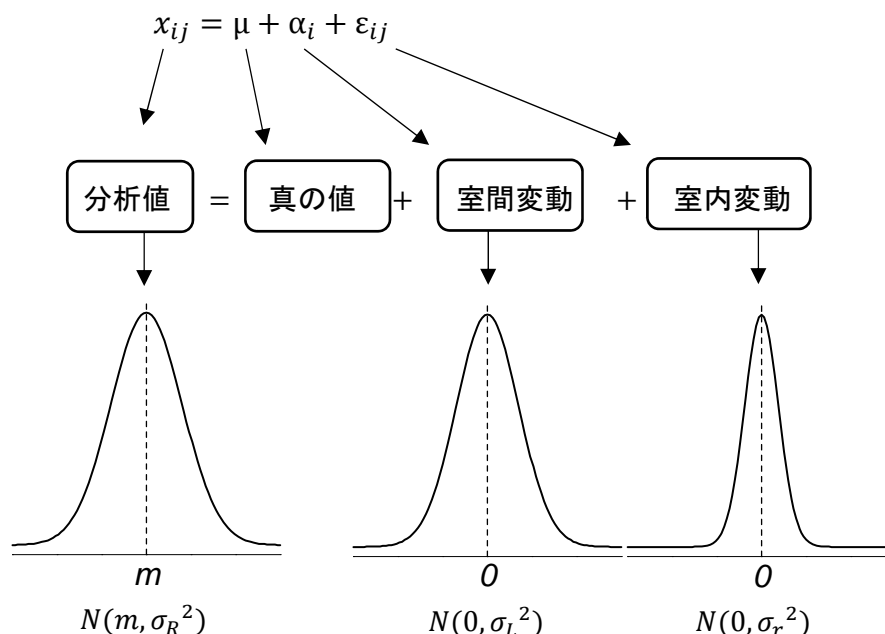
表 11 Grubbs 検定における棄却限界値

有意水準 2.5%両側検定、1.25%片側検定

試験所数 L	One highest or lowest (統計量 a の場合)	Two highest or two lowest (統計量 b の場合)	One highest and one lowest (統計量 c の場合)
4	86.1	98.9	99.1
5	73.5	90.3	92.7
6	64.0	81.3	84.0
7	57.0	73.1	76.2
8	51.4	66.5	69.6
9	46.8	61.0	64.1
10	42.8	56.4	59.5
11	39.3	52.5	55.5
12	36.1	48.5	51.6
13	33.8	46.1	49.1
14	31.7	43.5	46.5
15	29.9	41.2	44.1
16	28.3	39.2	42.0
17	26.9	37.4	40.1
18	25.7	35.9	38.4
19	24.6	34.5	36.9
20	23.6	33.2	35.4
21	22.7	31.9	34.0
22	21.9	30.7	32.8
23	21.2	29.7	31.8
24	20.5	28.8	30.8
25	19.8	28.0	29.8
30	17.1	24.1	26.0
40	13.3	19.1	20.5
50	11.1	16.2	17.3

3.3.3.5 精度の計算

外れ値を除いたデータを用いて計算を行う。室間共同試験によって得られる分析値の変動モデルとして以下を利用する。即ち、



ここで、 x_{ij} は、分析機関 i が j 番目に分析して得られた分析値である。 μ は分析値の真の値であり、データの総平均値を推定値として用いる。 α_i は分析機関が異なることに起因する分析値の変動（室間変動）であり、併行分析による分析値のばらつき（室内変動）とは独立な、平均値 0、分散 σ_L^2 の正規分布 $N(0, \sigma_L^2)$ に従って変動すると仮定する。 ε_{ij} は室内変動であり、各試験室は共通の分散を持ち互いに独立な、平均値 0、分散 σ_r^2 の正規分布 $N(0, \sigma_r^2)$ に従うと仮定する。

σ_L と σ_r の推定値をそれぞれ S_L 及び S_r とし、各濃度段階について、併行標準偏差 S_r 及び室間再現標準偏差 σ_R の推定値 S_R を、以下の式で求める。

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$$

$$S_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_i - 1) S_i^2}{\sum_{i=1}^p (n_i - 1)}$$

ここで、 n は併行分析の回数。 p は分析機関数、 S_i^2 は、分析機関内における併行分析の分散である。

$$S_L^2 = \frac{S_d^2 - S_r^2}{\bar{n}}$$

ここで、 S_d^2 及び \bar{n} は以下の式で求める。

$$S_d^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p n_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$$

$$= \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_i (\bar{x}_i)^2 - (\bar{x})^2 \sum_{i=1}^p n_i \right]$$

$$\bar{n} = \frac{1}{p-1} \left[\sum_{i=1}^p n_i - \frac{\sum_{i=1}^p n_i^2}{\sum_{i=1}^p n_i} \right]$$

\bar{x}_i は、同じ併行分析ペアの平均値。 \bar{x} は分析値の総平均、 n_i は併行分析の回数である。

全ての分析機関で併行分析の回数が2回の場合は、以下の式を用いてよい。

$$S_r^2 = \frac{1}{2p} \sum_{i=1}^p (x_{i1} - x_{i2})^2$$

x_{i1} 、 x_{i2} は、同じ分析機関内の併行分析ペアの各分析値である。

$$S_L = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2 - \frac{S_r^2}{2}$$

表 12 室間共同試験のデータ例

試験所	測定値 1	測定値 2	平均	分散
1	0.54	0.49	0.515	0.00125
2	0.52	0.61	0.565	0.00405
3	0.46	0.37	0.415	0.00405
4	0.46	0.55	0.505	0.00405
5	0.42	0.42	0.42	0
6	0.52	0.56	0.54	0.0008
7	0.54	0.56	0.55	0.0002
8	0.63	0.51	0.57	0.0072
9	0.35	0.37	0.36	0.0002
10	0.64	0.53	0.585	0.00605
総平均			0.5025	

Excel で一元配置の分散分析を利用して求める場合、出力される分散分析表の「グループ内の分散」が S_r^2 、「グループ間の分散」が $S_r^2 + nS_L^2$ に等しい。上記データを使って一元配置分散分析を行った場合、分散分析表として以下の表が得られる。

分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値
グループ間	0.107725	9	0.011969	4.297826	0.016292	3.020383
グループ内	0.02785	10	0.002785			
合計	0.135575	19				

「グループ間の分散」の自由度は「分析機関数－1」、「グループ内の分散」の自由度は「分析機関数×（併行分析回数－1）」になっていることを確認する。

$$S_r = \sqrt{\text{グループ内の分散}}$$

$$S_R = \sqrt{\frac{\text{グループ間の分散} - \text{グループ内の分散}}{n} + \text{グループ内の分散}}$$

により S_r 及び S_R を求める。

「3.2.2.6 精度」と同様に、再現条件下で得られた複数の分析機関での分析値の間に許容される差の限界値（室間再現許容差）は以下の式で計算される。

$$R = \sqrt{2} \times t \times s_R$$

有意確率両側 0.05 の場合、繰返し回数が多いとき、 $t \approx 2$ となり以下のとおり。

$$R = 2.8 \times s_R$$

3.3.3.6 公表

各分析機関における個々の分析値を明らかにする必要はない。また、個々の分析値がどの分析機関によるものか紐付けることができないよう、匿名性を保つよう留意する。室間再現精度、HorRat 値等の精度指標とその値に関する考察とともに、わかりやすく公表する。

報告書に記載する項目は以下のとおり。

項目
材料名 (平均値の低い順)
参加分析機関数
データ解析に有効な分析機関数
外れ値になった分析機関数
各分析機関の併行測定回数
平均値
併行標準偏差 S_r (%)
併行許容差 $2.8 S_r$ (%)
併行相対標準偏差 RSD_r (%)
室間再現標準偏差 S_R (%)
室間再現許容差 $2.8 S_R$ (%)
室間再現相対標準偏差 RSD_R (%)
HorRat

- ① $HorRat \leq 0.5$: 何らかの不適切な処理 (試験の独立性がない、報告されていない分析値の平均化が行われている、分析値について相談して値が調整されていること等) の疑いがある。
- ② $0.5 < HorRat \leq 1.5$: 通常、分析法には再現性があると予想される。
- ③ $1.5 < HorRat \leq 2.0$: 分析法の再現性はあるものの、分析値のばらつきは通常予想されるより大きい。
- ④ $HorRat > 2.0$: 分析法の再現性に問題がある。

HorRat 値が大きいことは、分析法や試験に許容できない弱点を有する可能性があるため、分析法の適切さを否定されうる。

参加分析機関に対しては、論文等での公表とは別に、自機関の分析値と他機関の分析値を実値及び z 値等で比較できるように情報提供する。z 値等の計算は、ISO 13528: 2015 等を参考にする。

3.4 妥当性確認データの利用

3.4.1 分析法の検証における利用

新たに使用する分析法については、通常、定量下限付近及び検量線の間付近の最低2点で、回収率、精度を検証し、妥当性確認データと比較することで、目的の性能で分析できることを確認する。ただし、検量線が広い濃度範囲で設定できる場合は、実際の食品等中の濃度を考慮した特定の濃度範囲で検証を行えばよい。例えば、食品等中の濃度が定量下限より十分高濃度しかとらないことや検量線の高濃度側にならないことが分かっているならば、実際に想定される濃度範囲で検証を行えばよい。

新たに分析法を開発する場合には、少なくとも単一試験室による妥当性確認を含めた性能評価のための実験計画を策定するべきであり、3.1.1に記載した性能規準を達成することを目標として、分析標準手順書を開発する。

3.4.2 分析結果の評価

分析値を解析する際には、分析機関からデータを提出させ、3.1に記載した性能規準に合致しているか確認する。分析機関から分析法の妥当性確認又は検証データを得る主な目的は、発注先の分析機関において、①実態調査等に使用を指定した既存の分析法が予期される性能を再現できているか検証すること、②報告された分析値の不確かさを確認することである。

①の目的からは、指定した分析標準手順書を分析機関が勝手に改変することを許してはならない。当初意図した性能が発揮できず、性能規準に合致しない場合、どのような要因によりどの性能を満たせないのか検討する必要がある。やむをえず分析標準手順書の一部改変を要する場合、どこを改変したか詳細を報告させるとともに、分析の実際を踏まえて適切な中間条件における単一試験室妥当性確認を求める。

3.4.3 基準値設定における妥当性確認データの利用

基準値を設定する際は、適合性評価に使用できる妥当性確認された分析法が存在しなければならない。すなわち、対象とするマトリックス及び分析対象物質の組み合わせで定量分析可能な分析法が存在するかどうか、基準値及び国際ガイドラインと照らして検出下限、定量下限、精度等の値が十分か、適切な濃度範囲に適用可能かなど、分析法を検討する必要がある。

Codex 委員会は、特定の1つの分析法を公定法として規定するのではなく、手続きマニュアルで要求される分析法性能規準を満たす分析法であれば自由に選択できるようにするという考え方（クライテリアアプローチ）を推奨しており、分析法性能規準の設定の仕方を例示している。

なお、国際ガイドラインの性能規準を満たした分析法が存在しない場合もあり得る。速やかに基準値を設定する必要がある場合、または既に基準値が設定されている場合には、精度等が国際ガイドラインの規準を下回ったとしても、他に分析法の選択肢がない場合は、当該分析法を暫定的に使用することとし、性能規準を満たす新たな分析法が開発された段階で見直しを行う。

3.4.4 測定の不確かさの推定

ISO/IEC 17025 や Codex 委員会の測定の不確かさに関するガイドライン (CXG54) は、分析値に付随する測定の不確かさを推定することを求めている。測定の不確かさの推定方法には、ボトムアップアプローチとして知られる、原因となる要素毎に不確かさを推定し合成不確かさを求める方法、トップダウンアプローチとして知られる、室間共同試験のデータ、内部品質管理のデータ及び技能試験のデータから推定する方法など、様々な方法がある。

室間共同試験による妥当性確認で得られたデータから測定の不確かさを評価する方法はトップダウンアプローチに類する。評価方法の詳細は、ISO 21748 : 2017 を参照する。単純には、以下の点が確認されれば、室間再現標準偏差（又は室間再現標準偏差を用いて計算した合成標準不確かさ）を不確かさの推定値として使用できる。拡張不確かさは、標準不確かさに包含係数 2 を掛け求める。分析機関にバイアスがないことを、認証標準物質の分析、不確かさが既知の分析法との比較、同じ分析法を使用する他の分析機関との分析値の比較、のいずれかで確認していること

- ① 実際に分析を行う分析機関の併行精度が、室間共同試験で得た併行精度から予測される範囲であること。
- ② 室間共同試験では通常、サブサンプリング等の分析機関内のサンプリング手順を含まない。分析標準手順書に書かれていないサブサンプリングなどの手順を分析機関において実施する場合には、それに伴う不確かさを評価し、合成標準不確かさを求めること。
- ③ 室間共同試験の配付試料は、予め均質化され、場合によってはさらに安定化されている。しかし、実際の分析における試験室試料は通常均質化されていない。このため、分析機関における特定の前処理の影響を評価し、合成標準不確かさを求めること。
- ④ マトリックスの種類が室間共同試験で使用されたものと同じであること。マトリックスが異なる場合は、マトリックスが異なることによる不確かさへの寄与を評価し、合成標準不確かさを求めること。

3.4.5 分析機関の分析結果の比較

年度をまたいで行う実態調査など、異なる分析機関から報告された分析値を解析する場合がある。その場合には、異なる分析機関から報告された分析値を一緒に統計処理しても良いかどうかを検討しなくてはならない。

特に分析機関間で分析値が大きく異なる可能性があるような場合には、使用した分析標準手順書、サンプリングに関する事項（サンプリング方法が同じかどうかなど）のほか、分析機関から報告された単一試験室による妥当性確認（又は検証）のデータがその分析値を使えるかどうかの判断根拠になる。

分析機関から報告された分析値は、仮に期待された数値（実は発注者が勝手に期待していた数値）でなかった場合でも、その根拠なく外れ値として扱ってはならない。仮に分析値に疑義がある場合、同一試料を信頼できる第三者分析機関で分析した結果と比較するなどの方法により、分析値を使用できるか検討しなくてはならない。

妥当性確認した分析法を使用していたとしても、分析機関が異なることに由来するバイアスが、年度間での分析値の相違の原因かもしれない。仮に1年目と2年目で異なる分析機関から報告された分析値に統計学的有意差があったとしても、それが調査対象に本来認められる年間の差なのか分析機関のバイアスなのか慎重に検討する。

「3.2.2.6 精度」で求めた併行許容差及び「3.3.3.5 精度の計算」で求めた室間再現許容差は、複数の分析値の比較・評価に利用できる。以下に代表的な事例を簡単に示す。詳細は、ISO 5725-6を参照する。複数の分析値の差の絶対値が、以下に示す適当な許容差を超えるときは、この差を生じさせている全分析値は疑わしいと考え、さらに検討を加える必要がある。

3.4.5.1 一つの分析機関における2組の分析値の比較

ある一つの分析機関に委託し、異なる時期に実態調査する場合のデータの評価に本方法を利用できる。

予め均質性を確認し値付けした共通試料を、室間共同試験で妥当性確認された同一の分析法を用いて、それぞれの時期に分析させ、分析値が許容差内に収まる場合、同一試料の分析値については不確かさの範囲内で分析値に差はないと考えられる。従って、それぞれの時期の実態調査データに有意差があった場合には、実態調査のサンプルに起因する可能性が高い。

一つの分析機関で、室間共同試験で妥当性確認された同一の分析法を用いて、それぞれ併行条件下となる2組の分析を行い、第1の組で n_1 個の分析値から平均値 \bar{y}_1 を、第2の組で n_2 個の分析値から平均値 \bar{y}_2 を得たとき、 $(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)$ の標準偏差は、

$$S = \sqrt{S_r^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

であり、 $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ に対する許容差 (CD: Critical Difference) は、確率 95% で以下の式となる。

$$CD = 2.8 \times S_r \sqrt{\left(\frac{1}{2n_1} + \frac{1}{2n_2} \right)}$$

$n_1 = n_2 = 1$ の場合、上式は、 $CD = 2.8 \times S_r$ となる。

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > CD$$

の場合、平均値 \bar{y}_1 と平均値 \bar{y}_2 に有意差があると考ええる。

3.4.5.2 二つの分析機関における 2 組の分析値の比較

二つの分析機関を利用して実態調査を行う場合等に、報告された分析値を評価するのに本方法を利用できる。

予め均質性を確認した試料を配付し、室間共同試験で妥当性確認された同一の分析法を用いてそれぞれの分析機関で分析させ、その分析値が許容差内に収まる場合、分析機関が異なっても同一の試料から得られる分析値は不確かさの範囲内にあり、有意差はないと考えられる。従って、実態調査データに有意差があった場合には、実態調査のサンプルに起因する可能性が高い。

室間共同試験で妥当性確認された同一の分析法を用い、第一の分析機関において併行条件下で n_1 個の分析値から平均値 \bar{y}_1 を、第二の分析機関において併行条件下で n_2 個の分析値から平均値 \bar{y}_2 を得たとき、 $(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)$ の標準偏差は、

$$\begin{aligned} S &= \sqrt{S_L^2 + \frac{1}{n_1} S_r^2 + S_L^2 + \frac{1}{n_2} S_r^2} \\ &= \sqrt{2S_L^2 + S_r^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} \\ &= \sqrt{2(S_L^2 + S_r^2) - 2S_r^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2} \right)} \end{aligned}$$

であり、 $|\bar{y}_1 - \bar{y}_2|$ に対する許容差 (CD) は、確率 95% で以下の式となる。

$$CD = \sqrt{(2.8S_R)^2 - (2.8S_r)^2 \left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

$n_1 = n_2 = 1$ の場合、上式は、 $CD = 2.8 \times S_R$ となる。

$$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| > CD$$

の場合、平均値 \bar{y}_1 と平均値 \bar{y}_2 に有意差があると考ええる。

3.4.5.3 一つの分析機関における分析値と参照値との比較

予め値付されている (又は値付けした) 標準物質を分析機関に配付し、その分析機関の分析値を評価することにより、委託可能な分析機関かどうか判断する等の場合、本項目を利用できる。

一つの分析機関において、室間共同試験で妥当性確認された分析法を用いて参照試料の分析を行い、併行条件下で n 個の分析値から平均値 \bar{y} を得たとき、参照値 μ との比較は、その分析機関に由来するバイアスに寄与する情報がないならば、 $|\bar{y} - \mu|$ の標準偏差は、

$$\begin{aligned} S &= \sqrt{S_L^2 + \frac{1}{n} S_r^2} \\ &= \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{2(S_L^2 + S_r^2) - 2S_r^2 \left(\frac{n-1}{n}\right)} \end{aligned}$$

であり、 $|\bar{y} - \mu|$ に対する許容差 (CD) は、確率 95% で以下の式となる。

$$CD = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{(2.8S_R)^2 - (2.8S_r)^2 \left(\frac{n-1}{n}\right)}$$

$$|\bar{y} - \mu| > CD$$

の場合、平均値 \bar{y} と参照値 μ の間に有意差があると考ええる。

4 その他

信頼できる分析値を得るためには、妥当性確認された分析法を使用することに加えて、分析値の品質管理を行っている分析機関で分析することが必要であることに留意する。分析業務の発注に当たって、分析機関に求める要件を適切に定めなければならない。ここでは詳しく示さないが、品質管理の要件の例としては、以下のようなものがある。

(1) 内部品質管理

- ・国際ハーモナイズドガイドライン「Harmonized Guidelines for International Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories (CXG65-1997)」に適合した内部品質管理を実施し、適正に運用されていること。
- ・「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について」（平成9年4月1日付け衛食第117号厚生省生活衛生局食品保健課長通知）の別添「精度管理の一般ガイドライン」に準拠した精度管理を実施し、適正に運用されていること。

(2) 技能試験

発注するマトリックス・分析対象物質の組み合わせについて、国際的に認知されている技能試験に近年（過去2年以内等）参加し、良好な結果（zスコアの絶対値が2以下等）を得ていること。近年に技能試験が実施されているか、当該分析機関が、発注する分析業務で指定する分析法を用いて参加しているか等に注意すること。

発注予定の同じマトリックスでの技能試験が実施されていない場合は、他のマトリックスであっても良い。

(3) ISO/IEC 17025 認定

Codex 規格や海外政府機関では、ISO/IEC 17025 認定を取得した分析機関で分析することが当たり前になっている。マトリックス・分析対象物質・分析法の組み合わせで、ISO/IEC 17025 の認定を取得又は自己適合宣言していることと確認する。

業務の発注後、本分析の開始前に、分析機関から以下について報告させ、求める精度で確実に分析業務が遂行されるか確認すること。

- ① 分析標準手順書及びそのリファレンス
- ② 検出下限・定量下限とその算出方法（3.2.2.2、3.2.2.3 参照）
- ③ 検量線（3.2.1.6 参照）
- ④ 添加回収率（3.2.2.5 参照）
- ⑤ 測定の不確かさ（3.2.3、3.4.4 参照）

上記の分析法の検証の結果には、代表的なスペクトルデータ、クロマトグラム、計算方法、使用したマトリックス及び標準試薬の情報を含む。明らかに分析手順などに間違いがあった場合の分析値（異常値）は除外するが、異常値以外の

データは除外してはならない。異常値以外で、値が著しく異なる分析値があった場合には、外れ値検定の結果も併せて報告させる。

5 参考文献

2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results

Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis, *AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS* (2002)

Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, *AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS* (2012)

Commission Regulation (EC) No 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the control of the levels of trace elements and processing contaminants in foodstuffs

Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs

Criteria Approaches for Methods which Use a ‘Sum of Components’
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/resources/inf-doc/en/> (accessed 20 September 2019)

Design, Analysis and Interpretation of Method Comparison Studies, *AACN Adv Crit Care*. 2008; 19(2): 223-234. doi: 10.1097/01.AACN.0000318125.41512.a3.

Eurachem Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second edition

EURACHEM / CITAC Guide CG 4 Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third Edition

ERM Application Note 1 Comparison of a measurement result with the certified value
<https://crm.jrc.ec.europa.eu/e/132/User-support-Application-Notes> (accessed 20 September 2019)

Guidelines on Analytical Terminology (CXG 72-2009), Codex Alimentarius Commission.
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/> (accessed 20 September 2019)

Guidelines for the Assessment of the Competence of Testing Laboratories Involved in the Import and Export Control of Food (CXG27-1997), Codex Alimentarius Commission.
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/> (accessed 20 September 2019)

Guidelines on Performance Criteria and Validation of Methods for Detection, Identification and Quantification of Specific DNA Sequences and Specific Proteins in Foods (CXG74-2010), Codex Alimentarius Commission. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/> (accessed 20 September 2019)

Guidelines on Performance Criteria for Methods of Analysis for the Determination of Pesticide Residues in Food and Feed (CXG 90-2017), Codex Alimentarius Commission.
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/> (accessed 20 September 2019)

Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories”, *Pure Appl. Chem.*, 67 (1995) 649-666

Harmonized Guidelines for Singlelaboratory Validation of Methods of Analysis, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

Harmonized IUPAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, (CXG 49-2003), Codex Alimentarius Commission. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/> (accessed 20 September 2019)

Heyden, Y., Nijhuis, A. Smeyers-Verbeke, J. Vandeginste, B.G.M., Massart, D. Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24. 723-53. 2001.

Hibbert, D. Brynn Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory, Oxford University Press Inc

ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions

ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method

ISO 5725-4:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method

ISO 5725-5:1998 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method

ISO 5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 6: Use in practice of accuracy values

ISO 11843-2:2000 Capability of detection- Part2: Methodology in the linear calibration case

ISO 11843-5:2008 Capability of detection- Part5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases

ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison

ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment — General requirements for proficiency testing

ISO 21748:2017 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation

IUPAC/ISO/AOAC International/EURACHEM Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 71, pp. 337 – 348, 1999

JCGM 100:2008 GUM 1995 with minor corrections, Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement

JIS Z 8402-1: 1999 測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）-第 1 部：一般的な原理及び定義

JIS Z 8402-2:1999 測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）-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 8402-3:1999 測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）-第 3 部：標準測定方法の中間精度

JIS Z 8404-1 : 2018 測定の不確かさ-第 1 部：測定の不確かさの評価における併行精度、再現精度及び真度の推定値の利用の指針

NATA Technical note 17, 2012, Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, National Association of Testing Authorities, Australia

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods,
<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri598.htm> (accessed 20 September 2019)

Principles for the Establishment of Codex Methods of Analysis, Codex Procedural Manual 26th Ed., Codex Alimentarius Commission. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/I8608EN> (accessed 20 September 2019)

Protocol for The Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 2, pp. 331-343, 1995.

PS15 Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories (ISO 17025), Irish National Accreditation Board, 2019

The International Harmonized Protocol for The Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 78, No. 1, pp. 145-196, 2006.
doi:10.1351/pac200678010145

Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci* 2011;2:21-5.

最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック 2010 (株)サイエンスフォーラム

統計学的アプローチを活用した分析法バリデーションの評価及び妥当性 2018 サイエンス&テクノロジー (株)

分析法の妥当性確認に関するガイダンス (国研) 農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

<http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/datosei/index.html> (accessed 20 September 2019)

村上太郎、山野哲夫 Packett-Burman 試験計画法による分析法の頑健性の確認 生活衛生 Vol.52 No.5, 274-281, 2008

分析法の妥当性確認に関するガイドライン

公表：令和元年 10 月

執筆：農林水産省 顧問（大臣官房参事官）
消費・安全局食品安全政策課

〒100-8950

東京都千代田区霞が関 1-2-1

TEL：03-3502-8111（代表）
