

## 2020年度における参照法の精度並びに妥当性の評価（第3報）

### 1. 目的

生乳の検査機関では、乳成分のルーティン測定法として光学式乳成分測定機が広く採用されている。これらの測定機の各測定項目は、国際標準あるいは国内標準などで定められた参照法とよばれる化学分析などを行って、基準成分率が設定された標準試料乳を用いて定期的に校正する必要がある。国内において、標準試料乳の配布を行っている機関は、全国的には公益財団法人日本乳業技術協会が、北海道内においては本会が行っている。

本会が道内の各検査機関に配布している主要乳成分（脂肪、蛋白質、乳糖、全固形分）の標準試料乳は、月間1回、成分値が異なる3種類の試料を調製し、参照法分析を実施し、基準値を設定している。参照法の精度確認については、平成21年度及び平成25年度事業成績書において、報告している。現行の精度管理基準は平成27年度の測定値から併行精度並びに再現精度を算出し、過去の精度管理基準と比較評価し、設定している経緯にある。

参照法の精度管理基準はその妥当性保証のために、定期的な再評価がなされるべきである。そのため、この度は2020年度までに蓄積された測定値について、併行精度並びに再現精度を算出し、再度、精度確認を行った。また、参照法の精度を補完する目的で実施している補助的な参照法についても、妥当性の再確認を行ったので報告する。

### 2. 方法

本会において標準試料乳の基準値設定のために採用している参照法について表1に示した。ここで示した1次参照法とは、従来から基準値設定のために行っている主要分析法として位置付けているものであり、2次参照法とは、1次参照法の短所（測定時間、精度など）を補完する目的で実施しているものである。

2020年4月から2021年3月にかけて実施した1次及び2次参照法の測定値を用い、JIS Z8402-1,1999に従い統計処理を行い、併行精度（ $S_r$ ）、併行許容差（ $r$ ）、再現精度（ $S_R$ ）及び再現許容差（ $R$ ）を求めた。これらの算出値を現行の精度管理基準並びに2010年度から2019年度までの算出値との比較検証を行った。尚、各参照法の測定条件は表2に示す通りであり、再現精度については、いずれも同一試験室内で実施したもので室内再現精度の扱いとなる。

また、2次参照法の妥当性の確認として、同一試料を用いて両参照法間で測定した結果について回帰分析を行い、現行の精度管理基準並びに2010年度から2019年度算出値との比較検証を行った。

表 1 本会で採用している参照法について

対象成分	1次参照法		2次参照法	
	方法	出典元	方法	出典元
乳脂肪	バブコック法	乳製品試験法・注解(改訂第2版,日本薬学会編)	レーゼ・ゴットリーブ法	ISO1211
乳蛋白質	セミマイクロケルダール法	IDF 20A 準用	ケルテック法	ISO8968-3(IDF20-3)
乳糖	レイン・エイノン法	乳等省令	HPLC法	ISO22662 (IDF198)
全固形	常圧乾燥法	厚生省通知衛新第13号		

表2 参照法の測定条件

参照法	総分析回数	分析者	反復回数	測定日	装置	器具	調製試薬
バブコック法	232	2	4	D	S	D	S
レーゼ・ゴットリーブ法	24	2	2	S	S	S	S
ケルダール法	140	2	2	分解	D	D	S
				蒸留	D	D	D
ケルテック法	144	2	2	分解	D	D	S
				蒸留	D	S	D
レイン・エイノン法	216	2	3	D	S	D	S
HPLC法	24	2	2	D	S	D	D
常圧乾燥法	288	2	4	D	D	D	-

マイクロ波固形分計

表中の記号は、S: 同一条件 D: 異なる条件 D・S: 条件混在 -: 未使用

### 3. 結果と考察

#### 1) 1次参照法の併行精度並びに再現精度

2020年度における1次参照法の併行精度並びに再現精度について、表3に示す。併行精度及び再現精度は、記載のないレイン・エイノン法を除きAOACで示されている値よりも良好な結果であった。

表3 1次参照法の併行精度ならびに再現精度(2020.4~2021.3)

参照法	平均値%	Sr %	SR %	RSDr %	RSDR %	r %	R %	AOAC※			
								Sr %	SR %	RSDr %	RSDR %
バブコック法	3.816	0.010	0.015	0.264	0.399	0.036	0.043	0.037	0.047	0.901	1.147
ケルダール法	3.371	0.007	0.010	0.213	0.288	0.020	0.027	0.014	0.017	0.385	0.504
レイン・エイノン法	4.441	0.009	0.010	0.198	0.232	0.029	0.029				
常圧乾燥法	12.663	0.007	0.013	0.052	0.106	0.018	0.038	0.017	0.047	0.136	0.370

※ Official Methods of Analysis of AOAC international, 18th edition, 2005に記載されている並行精度および室間再現精度を参考までに併記した。

2010年度から2020年度までの1次参照法の併行精度並びに再現精度について、表4に示す。また、併行許容差(r)及び再現許容差(R)の変動について図1に示す。各項目において、大きな変動は見られない。

表4 1次参照法の併行精度並びに再現精度（2010～2020）

年度		2010	2013	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
1次参照法	バブコック法	$S_r$	0.018	0.015	0.014	0.014	0.015	0.012	0.011	0.010
		$S_R$	0.029	0.019	0.017	0.017	0.020	0.017	0.015	0.015
		$RED_r$	0.457	0.400	0.370	0.363	0.378	0.305	0.291	0.264
		$RSD_R$	0.740	0.509	0.446	0.444	0.517	0.447	0.402	0.399
		$r$	0.064	0.055	0.052	0.051	0.053	0.043	0.040	0.036
		$R$	0.080	0.054	0.049	0.049	0.056	0.048	0.043	0.043
	ケルダール法	$S_r$	0.010	0.009	0.007	0.010	0.006	0.008	0.007	0.007
		$S_R$	0.017	0.015	0.010	0.011	0.010	0.011	0.009	0.010
		$RED_r$	0.313	0.269	0.226	0.291	0.186	0.247	0.207	0.213
		$RSD_R$	0.517	0.441	0.287	0.320	0.289	0.332	0.270	0.288
		$r$	0.029	0.025	0.021	0.027	0.017	0.023	0.019	0.020
		$R$	0.048	0.041	0.027	0.030	0.027	0.031	0.025	0.027
	レイン・エイノン法	$S_r$	0.014	0.012	0.012	0.013	0.010	0.011	0.010	0.009
		$S_R$	0.022	0.021	0.018	0.018	0.011	0.008	0.009	0.010
		$RED_r$	0.307	0.259	0.275	0.292	0.222	0.256	0.226	0.198
		$RSD_R$	0.504	0.471	0.416	0.415	0.238	0.187	0.211	0.232
		$r$	0.045	0.038	0.040	0.043	0.033	0.038	0.033	0.029
		$R$	0.063	0.059	0.052	0.052	0.030	0.023	0.026	0.029
	常圧乾燥法	$S_r$	0.009	0.010	0.007	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007
		$S_R$	0.016	0.016	0.013	0.012	0.012	0.011	0.012	0.013
		$RED_r$	0.075	0.077	0.056	0.051	0.050	0.054	0.051	0.052
		$RSD_R$	0.129	0.124	0.107	0.095	0.096	0.085	0.096	0.106
		$r$	0.026	0.027	0.020	0.018	0.018	0.019	0.018	0.018
		$R$	0.046	0.044	0.038	0.034	0.034	0.030	0.034	0.038

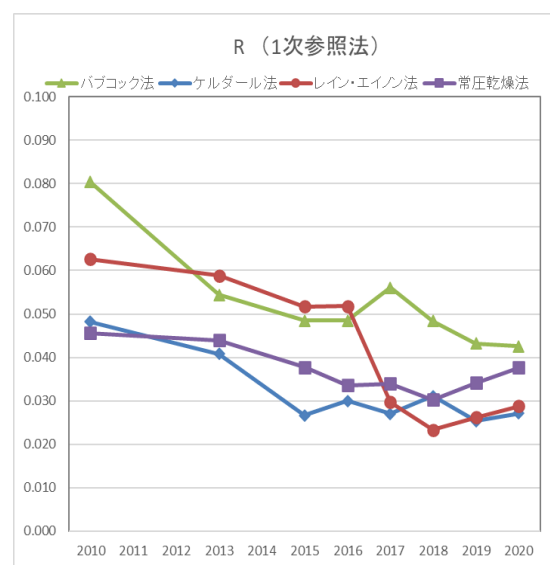
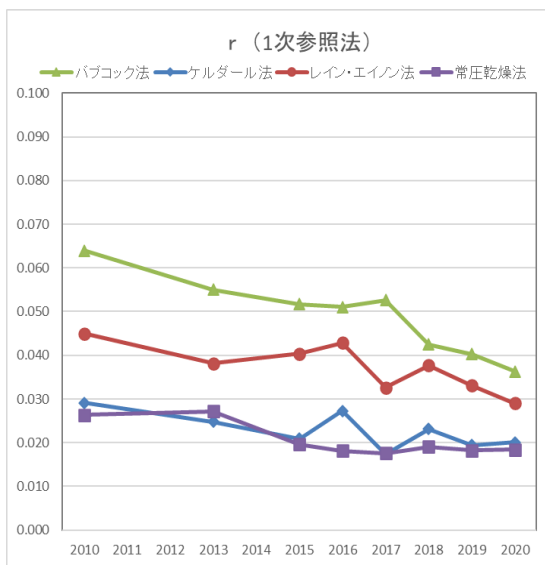


図1 1次参照法における併行許容差 (r) 及び再現許容差 (R) の変動 (2010～2020)

2) 2次参照法の測定精度並びに妥当性の再確認

2020年度における2次参照法の併行精度並びに再現精度について、表5に示す。併行精度及び再現精度は、AOACで示されている値よりも良好な結果であった。

表5 2次参照法の併行精度ならびに再現精度(2020.4~2021.3)

参照法	平均値 %	Sr %	SR %	RSDr %	RSDR %	r %	R %	ISO or AOAC			
								Sr %	SR %	RSDr %	RSDR %
レーゼ・ゴットリーブ法※	3.878	0.007	0.007	0.175	0.176	0.019	0.019	0.015	0.020	0.396	0.512
ケルテック法	3.374	0.007	0.008	0.197	0.233	0.019	0.022	0.013	0.016	0.385	0.504
HPLC法(IDF 198)※	4.465	0.005	0.014	0.102	0.323	0.013	0.040	0.022	0.046	0.474	1.010

i) レーゼ・ゴットリーブ法ならびにHPLC法は、Official Methods of Analysis of AOAC international, 18th edition, 2005に記載されている  
 並行精度および室内再現精度を参考までに併記した。

ii) ケルテック法は、ISO8968-3/IDF20-3, First edition, 2004-09-01に記載されている併行精度および再現精度を参考までに併記した。

2010年度から2020年度までの2次参照法の併行精度並びに再現精度について、表6に示す。また、併行許容差(r)及び再現許容差(R)の変動について図2に示す。各項目において、2019年11月に使用停止したマイクロ波以外に大きな変動は見られない。したがって、2次参照法は1次参照法と比較して遜色のない十分な精度を有することが確認できた。引き続き、2次参照法を有効に利用することで、1次参照法の短所を補完し、変動の適切な管理及び異常値の早期発見に有効であると考えられる。

表6 2次参照法の併行精度並びに再現精度（2010～2020）

年度			2010	2013	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
2次参照法	RG(LL)	$S_r$	0.013	0.011	0.005	0.003	0.003	0.003	0.006	0.007	
		$S_R$	0.014	0.016	0.005	0.007	0.007	0.004	0.012	0.007	
		$RED_r$	0.350	0.300	0.124	0.076	0.086	0.089	0.159	0.175	
		$RSD_R$		0.384	0.136	0.183	0.178	0.091	0.302	0.176	
		$r$	0.037	0.032	0.013	0.008	0.009	0.010	0.017	0.019	
		$R$	0.038	0.040	0.015	0.020	0.019	0.010	0.033	0.019	
	ケルテック法	$S_r$	0.011	0.009	0.008	0.009	0.009	0.007	0.007	0.007	
		$S_R$	0.012	0.011	0.008	0.009	0.012	0.011	0.008	0.008	
		$RED_r$	0.317	0.260	0.252	0.271	0.258	0.211	0.219	0.197	
		$RSD_R$	0.359	0.333	0.232	0.270	0.361	0.343	0.233	0.233	
		$r$	0.029	0.024	0.023	0.025	0.024	0.020	0.021	0.019	
		$R$	0.033	0.031	0.021	0.025	0.034	0.032	0.022	0.022	
	HPLC法	$S_r$	0.009	0.004	0.005	0.007	0.011	0.010	0.010	0.005	
		$S_R$	0.023	0.021	0.014	0.014	0.016	0.018	0.023	0.014	
		$RED_r$	0.202	0.092	0.101	0.162	0.237	0.215	0.232	0.102	
		$RSD_R$	0.531	0.473	0.305	0.319	0.366	0.404	0.514	0.323	
		$r$	0.025	0.012	0.013	0.020	0.030	0.027	0.029	0.013	
		$R$	0.065	0.060	0.038	0.040	0.046	0.050	0.064	0.040	
	マイクロ波	$S_r$	0.014	0.014	0.012	0.011	0.011	0.013	マイクロ波2019.11～ 使用停止		
		$S_R$	0.022	0.017	0.025	0.033	0.015	0.025			
		$RED_r$	0.116	0.110	0.096	0.088	0.087	0.105			
		$RSD_R$	0.185	0.133	0.194	0.262	0.117	0.195			
		$r$	0.039	0.039	0.034	0.031	0.031	0.037			
		$R$	0.063	0.046	0.069	0.092	0.041	0.069			

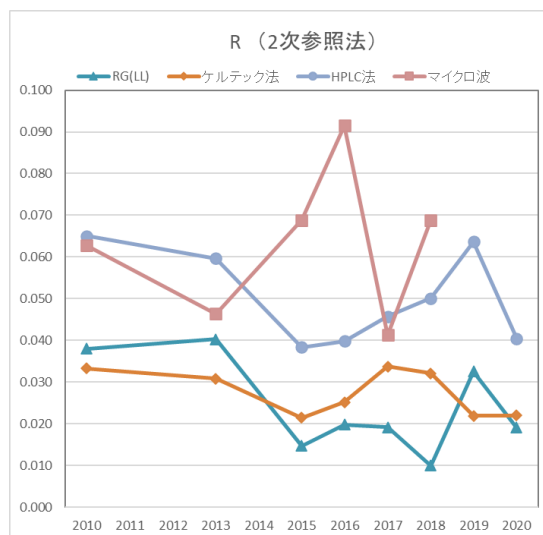


図2 2次参照法における併行許容差 (r) 及び再現許容差 (R) の変動 (2010～2020)

### 3) 1次及び2次参照法の比較について

2010年度から2020年度までの1次及び2次参照法の比較について、表7に示す。また、2020年度における1次参照法と2次参照法との関係性について、図3に示す。

2020年度の1次及び2次参照法の平均測定値を比較すると、乳脂率については、バブコック法がレーゼ・ゴットリーブ法より0.066%高い値であり、乳蛋白質率については、ケルダール法がケルテック法より0.003%低い値、乳糖率については、レイン・エイノン法がHPLC法より0.154%低い値であった。

平均測定値の差について検定（t-検定）を行ったところ、乳脂率、乳蛋白質率、乳糖率、いずれも1次及び2次参照法間で有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。

1次及び2次参照法の関係について回帰分析を行った結果、2次参照法は1次参照法と強い相関を示し（ $r > 0.84$ ）、残差標準偏差の値も良好な結果であった。回帰式の傾きは、乳糖率を除いては、ほぼ1.0であり残差標準偏差の値も良好であったことから、両方間の測定値の差については、偏りだけで補正が可能であるものと考えられる。尚、乳糖率の基準値については、全固形分率から乳脂率、乳蛋白質率を差し引いたものを、乳糖灰分率基準値としている（ $\alpha$ 値=1.0設定）。また、参考基準として、1次及び2次参照法間の平均値の差±2次参照法 $S_R \times 2$ を参照法間の妥当な範囲とし、参照法結果の妥当性確認に利用している。

表7 1次及び2次参照法の比較(2020)

	n	平均測定値 ± $S_R$ , %					差 (2次参照法 - 1 次参照法) (%)	t-検定 P値	R 一次参照法 (%)	回帰分析			
		2次参照法		1次参照法		残差標準 偏差				回帰係数 (1次 = $a \times$ 2次 + b)			
		(%)	(%)	(%)	(%)					a	b		
乳脂率	36	3.766	± 0.007	3.832	± 0.015	-0.066	1.8217E-27	0.043	0.999	0.012	0.999	0.069	
乳蛋白質率	36	3.375	± 0.008	3.372	± 0.010	0.003	0.01119978	0.027	0.998	0.006	1.004	-0.016	
乳糖率	36	4.595	± 0.014	4.441	± 0.010	0.154	5.5226E-30	0.029	0.842	0.024	0.869	0.447	

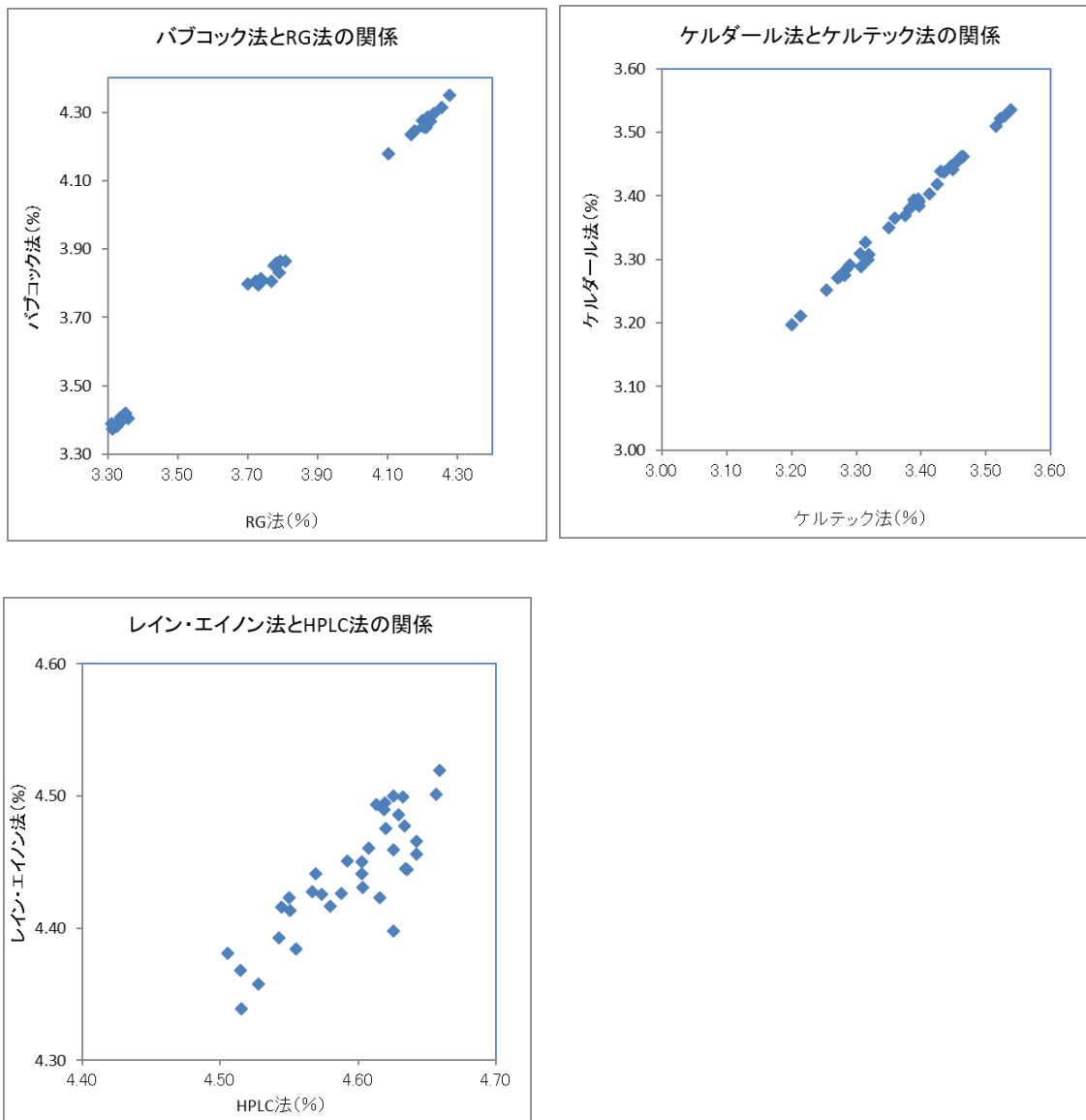


図3 1次参照法と2次参照法との関係性 (2020)

2010年度から2020年度までの回帰分析の結果を表8に、2次参照法と1次参照法との差の推移を図4に、残差標準偏差の推移を図5に示す。

1次参照法と2次参照法との測定値の差について、乳糖率では、年々上昇傾向にあるが、乳脂率及び乳蛋白率においては、ほぼ横ばいであった。残差標準偏差の推移を見ると、乳糖率で2019年度に大きく変動したが、これは人員配置の変更による影響と考えられ、測定手順を見直し、改善を図ったことで2020年度には、ほぼ例年並みになっている。

表8 回帰分析結果の比較（2010～2020）

年度		2010	2013	2015	2016	2017	2018	2019	2020
脂肪	n	15	36	36	36	36	36	36	36
蛋白	n	34	21	36	36	36	36	36	36
乳糖	n	10	36	36	36	36	36	36	36
全固形	n	12	36	36	36	36	36		
脂肪	差(2次参照法 - 1次参照法)	-0.043	-0.056	-0.056	-0.057	-0.055	-0.056	-0.061	-0.066
	r	1.000	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
	残差標準偏差	0.011	0.015	0.019	0.012	0.015	0.012	0.018	0.012
	係数(a)	1.004	0.998	0.977	0.983	0.998	0.984	0.999	0.999
	係数(b)	0.027	0.064	0.145	0.122	0.063	0.118	0.066	0.069
蛋白	差(2次参照法 - 1次参照法)	0.019	0.000	-0.008	-0.012	0.001	-0.003	-0.001	0.003
	r	0.978	0.990	0.995	0.997	0.994	0.996	0.993	0.998
	残差標準偏差	0.012	0.008	0.010	0.007	0.009	0.008	0.009	0.006
	係数(a)	0.905	0.993	1.039	1.031	0.983	0.970	1.004	1.004
	係数(b)	0.299	0.023	-0.122	-0.093	0.056	0.104	-0.012	-0.016
乳糖	差(2次参照法 - 1次参照法)	0.062	0.101	0.120	0.130	0.115	0.124	0.129	0.154
	r	0.997	0.778	0.818	0.849	0.770	0.880	0.597	0.842
	残差標準偏差	0.015	0.013	0.020	0.022	0.027	0.020	0.037	0.024
	係数(a)	1.044	0.744	0.802	0.785	0.709	0.713	0.434	0.869
	係数(b)	-0.253	1.068	0.785	0.855	1.215	1.190	2.462	0.447
全固形	差(2次参照法 - 1次参照法)	-0.011	-0.004	-0.025	-0.040	-0.042	-0.017		
	r	1.000	0.995	0.996	0.997	0.998	0.998		
	残差標準偏差	0.017	0.024	0.030	0.028	0.023	0.023		
	係数(a)	1.005	0.996	1.050	1.025	1.032	1.022		
	係数(b)	-0.051	0.056	-0.608	-0.273	-0.366	-0.258		

マイクロ波  
2019.11~  
使用停止

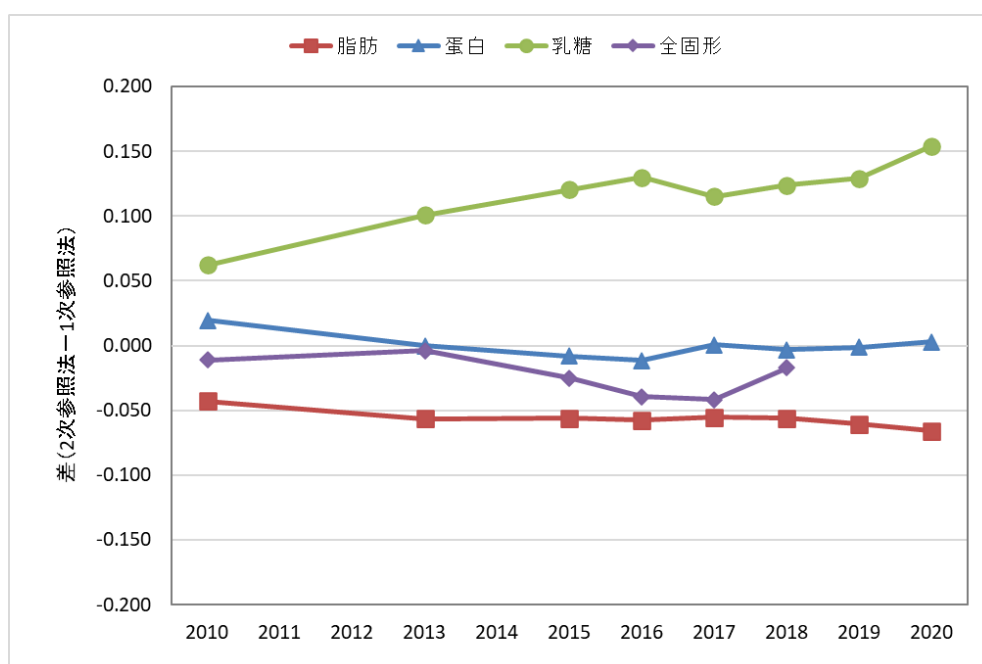


図4 1次参照法と2次参照法との差の推移



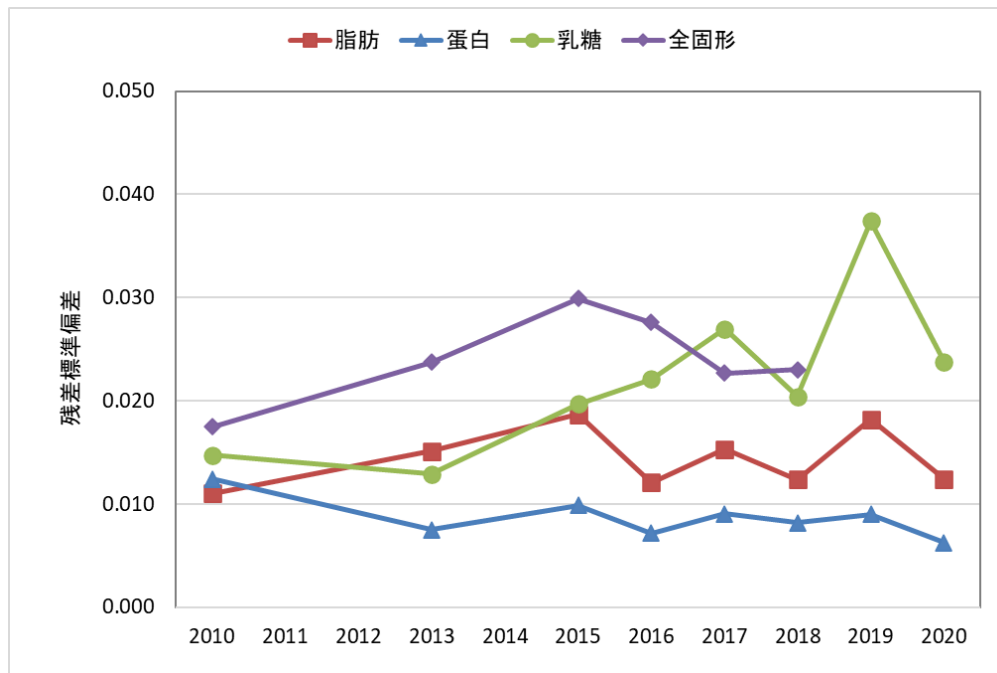


図 5 残差標準偏差の推移

4) 参照法における精度管理基準の現行値並びに 2020 年度算出値の比較

参照法における精度管理基準の現行値とは、定期的に評価した精度管理基準をもとに設定した精度管理基準のことである。精度管理基準の現行値並びに 2020 年度算出値の比較について、表 9 にまとめた。

現在設定値と 2020 年度の結果の比較では、1 次及び 2 次参照法ともに大きな変動は見られなかった。

表9.参照法の精度管理基準の比較(現行値 vs 2020算出値)

i) 1次参照法			ii) 2次参照法				
		現行値	2020年度 算出値				
		(%)	(%)				
バブコック法	$S_r$	0.016	0.010	レーゼ・ゴット リーブ法 (LL)	$S_r$	0.010	0.007
	$S_R$	0.022	0.015		$S_R$	0.012	0.007
	$RED_r$	0.409	0.264		$RED_r$	0.258	0.175
	$RSD_R$	0.565	0.399		$RSD_R$	0.260	0.176
	$r$	0.060	0.036		$r$	0.027	0.019
	$R$	0.061	0.043		$R$	0.031	0.019
ケルダール法	$S_r$	0.009	0.007	ケルテック法	$S_r$	0.009	0.007
	$S_R$	0.014	0.010		$S_R$	0.010	0.008
	$RED_r$	0.269	0.213		$RED_r$	0.276	0.197
	$RSD_R$	0.415	0.288		$RSD_R$	0.308	0.233
	$r$	0.025	0.020		$r$	0.026	0.019
	$R$	0.039	0.027		$R$	0.029	0.022
レイン・エイノン法	$S_r$	0.012	0.009	HPLC法 (IDF198)	$S_r$	0.009	0.005
	$S_R$	0.021	0.010		$S_R$	0.019	0.014
	$RED_r$	0.281	0.198		$RED_r$	0.202	0.102
	$RSD_R$	0.464	0.232		$RSD_R$	0.436	0.323
	$r$	0.041	0.029		$r$	0.025	0.013
	$R$	0.058	0.029		$R$	0.054	0.040
常圧乾燥法	$S_r$	0.009	0.007				
	$S_R$	0.015	0.013				
	$RED_r$	0.069	0.052				
	$RSD_R$	0.120	0.106				
	$r$	0.024	0.018				
	$R$	0.042	0.038				

1) ~4) より、2010 年度から 2020 年度までの測定値の精度は、維持できていると考えられ、精度管理基準 ( $r$  : 併行許容差、 $R$  : 再現許容差) は現行設定値から変更しないこととする。上昇傾向にある乳糖率の 1 次参照法と 2 次参照法との測定値の差については、注視することとする。

(國川尚子、中野まどか、小坂英次郎)