

検量線に関わる理論と評価方法について

北村 恭朗

独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

我々が業務で行っている農薬の定量分析（製剤中の有効成分含有量，作物や環境試料中の残留農薬量等の測定）には，通常検量線の利用が不可欠である．現在では，GCやHPLC等の測定機器を制御するワークステーションが検量線の作成も半自動的に行ってくれるため，我々分析技術者が，検量線を電卓で計算するような機会はない．しかし，検量線を用いる「相対定量法」には，しっかりとした理論の裏付けが有り，それらの理論を理解せずにワークステーションが算出する検量線を闇雲に信じたり，Excel等のソフトで自己流の計算を行うと，思わぬ大失敗に繋がる可能性がある（間違った計算方法で求めた検量線を用いて，定量値を求めその値を外部に報告してしまうと取り返しがつかない）．検量線に関わる理論は分析技術者にとっては，基礎中の基礎であるが，近年，しっかりと教わる機会が少なくなっていることを反映して，理解不足の分析技術者も少なくない．

本稿では，検量線を間違いなく使うための理論と知識の獲得を目的とした解説と，さらに深く理解するために必要な項目の紹介を行った．

Keywords：定量分析，検量線，最小自乗法，独立変数，従属変数

緒 言

定量分析には，「絶対定量法」と「相対定量法」の2つがある．絶対定量法は，検量線も比較標準も必要としない精確で絶対的な定量法であり，重量分析や容量分析が代表的なものである．相対定量法は，一般的に標準試料を用いて検量線を作成し，得られた検量線から逆推定といわれる手法を使って，未知試料中の測定対象物質の濃度を推定する定量法を指す．GCやHPLC等を用いた機器分析は，基本的に相対定量法に基づいており，農薬の残留分析も，ほとんどのものが相対定量法に依っている．残留農薬分析化学者にとって，検量線は日々当たり前のように取り扱っているツールであることから，特に復習するの必要性を感じていないかもしれない．しかし，検量線は，相対定量法の理論的支柱であり，正しく使うために知っておくべき基礎理論は少なくない．本稿は，検量線に関わる基本的な理論と評価法を確認することを目的としている．

1. 検量線とは

検量線とは，簡単に言えば“物質の量，濃度等と光学的・電気的信号等の測定値との関係を表した線”のことである．英語では，一般的に”

Calibration curve”あるいは，“Standard curve”と呼ばれる．この言葉から分かるように，検量線の”線”は直線のみではなく”Curve”との認識を持つておく必要がある．また，“Dose response curve”あるいは，“Dose response relationship”という表現も使われる．これらの表現は，検量線の性格を的確に表している．やや詳しく表現すれば，検量線とは，“検出器へ導入する測定対象物質の用量とその量に応じて出力されるセンサーの信号量（吸光度やピーク面積等）の関係を連続的に結びつけたもの（いわゆる応答関数）”と言える．定量結果の精度と正確さの観点から，検量線は直線であることが好ましい．なぜならば検量線が直線ではない（曲線あるいは途中で傾きが変わる）ということは，検量線のレンジにより誤差の伝搬度合いが異なってしまうことを意味し，一連の定量分析でこのようなことが生ずることはできるならば避けるべきであるからである．さらに，直線は数学的に取り扱い易いという大きな利点を持っている．この利点は非常に重要であり，定量計算を行う際の大きなアドバンテージとなる．しかし，理論的に応答関数が曲線となる検出器やELISA等抗原抗体反応を利用する測定系の場合には必然的に検量線は曲線となる．この場合，定量値の精度は測定濃度域により大きく変化することになる．検量線の形状によりなぜ，定量値の

精度が変化してしまうのか、検量線の評価には、どのような方法が有り、どのように使用するか、そもそも x 軸と y 軸の取り方は等々、検量線を使用する際には、その基礎理論の理解が欠かせない。

2. 検量線に関する知識の確認

以下に検量線に関する基礎理論を理解する上で重要な用語を選抜して列記した。これらの用語のうち良く理解しているものはどのくらいあるか。また、良く知らないあるいは聞いたことがないというものはどのくらいあるか。まずは、確認して頂きたい。

- ・ 回帰直線とは？
- ・ 最小自乗法（最小二乗法）とは？
- ・ 測定法間比較に用いる回帰直線の主な求め方の種類は？
- ・ 独立変数、従属変数、説明変数、目的変数とは？
- ・ 逆推定とは？
- ・ 相関係数とは？
- ・ 決定係数とは？
- ・ 寄与率とは？
- ・ 残差とは？
- ・ 残差プロットとは？
- ・ x から y への回帰とは？
- ・ y から x への回帰とは？
- ・ 重み付き最小自乗法の「重み」とは？

- ・ 検出限界とは？
- ・ 定量限界とは？
- ・ Precision Profile (P.P.)とは？
- ・ Response Error Relationship (RER)とは？
- ・ 非線形回帰とは？

検量線に関する理論を一通り理解するまで勉強すれば、上述した用語についての知識も自然と身につけているはずである。

3. 検量線と回帰直線

一般的に検量線には、回帰直線が用いられる。測定対象物質の標準液の濃度とセンサーの出力値をプロットすると、たいいていの場合、プロットは直線に乗る。以前は、方眼紙にデータをプロットし、定規を用いて全てのプロットに最もフィットする直線を引き回帰直線とし、この直線を検量線とした。このやり方では、検量線の理論を知らないと理論に従った回帰直線を求めることはできない。その後、電卓が一般的になると最小自乗法を用い、理論に忠実な回帰直線を計算で求めることができるようになった。

ところで、2つの測定値の関係を表す回帰直線を求める方法は、大きく分けて5種類程ある。検量線からは少し脱線する部分もあるが、線形回帰への理解を深め、今後の説明を容易にするため、その特徴を簡単に紹介する（表1）。

表1. 5種類の回帰直線の比較¹⁾

| 方法 | 目的 | 計算基準 |
|-------------|--------------|-----------------------------------|
| ① x → y の回帰 | x → y の関係・予測 | $[\sum \Delta y^2]$ を最小にする |
| ② y → x の回帰 | y → x の関係・予測 | $[\sum \Delta x^2]$ を最小にする |
| ③ 標準主軸回帰 | x と y の関係 | $\sum \Delta x * \Delta y$ を最小にする |
| ④ 主成分回帰 | x と y の関係 | $[\sum \Delta h^2]$ を最小にする |
| ⑤ Deming 回帰 | x と y の関係 | S_d を最小にする |

Δy は、各点から回帰直線までの垂直距離

Δx は、各点から回帰直線までの水平距離

Δh は、各点から回帰直線までの距離（④は直交回帰とも呼ばれる）

S_d は、測定機器等に由来するデータそのもののバラツキを加味して求める指標値

①～⑤は、いずれもデータを回帰式 $y=a+bx$ (②は、 $x=a+by$) に当てはめる。①と②は、その目的が、一方の測定値を他方に関係づける、または

一方の測定値から他方の測定値を予測することにあるが、③～⑤は、両測定値の間の平等な関係を求めることにある。③～⑤は、関数電卓で計算

することも可能ではあるが、コンピューターを用いなければ、実用に用いるのは難しい。パーソナルコンピューターの登場以来、これらの計算は年々簡易に行えるようになってきている状況にあり、既に指導的立場にある残留農薬分析化学者には、目的に応じてこれらを的確に使い分ける力が必要とされる時代である。

さて、本稿のテーマである検量線である。検量線は、測定値（センサーの出力値）である y にはバラツキがあり、標準品の濃度である x にはバラツキがないとして、測定値 y のバラツキが最も小さくなる回帰直線を最小自乗法で求める。これは、本稿の最重要確認事項である。このことを理解するために、 x から y への回帰である①と、 y から x への回帰である②の回帰直線がどのように異なるのか理解することが必須である。①と②の回帰直線をそれぞれ図1と図2に示す。

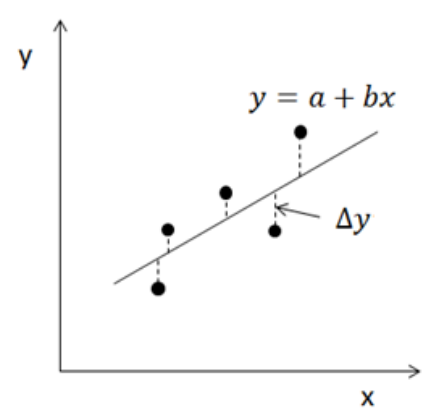


図1. x から y への回帰

Δy は、各点から回帰直線までの垂直距離である。 x から y への回帰では、 $\sum \Delta y^2$ を最小とする a と b を求める。繰り返しになるが、検量線を作成する場合は、個々のデータに関して、 x 軸方向のバラツキはないが、 y 軸方向にはバラツキがある（センサーの出力値にはバラツキがある）と考え、 x 軸は固定し y 軸方向のバラツキを最小とする直線を求める。それが、 x から y への回帰直線である（図1）。

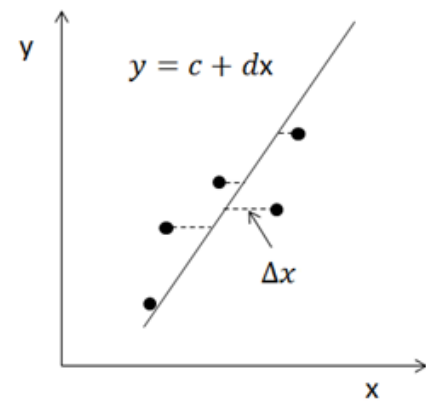


図2. y から x への回帰

一方、図2は y から x への回帰を示しているが、この場合は、各点から回帰直線までの水平距離である Δx に着目し、 $\sum \Delta x^2$ を最小とする c と d を求める。同じデータを用い、最小自乗法という手法を使いバラツキが最小となる回帰直線を求めるのであるから、両者は同じ結果になるはずだと考えるかもしれない。しかし、図1と図2を見れば一目瞭然であるように、 x から y への回帰で求めた回帰直線と y から x への回帰で求めた回帰直線は全く別物である。ちなみに、 Δx や Δy のことを残差と呼ぶ。

4. 独立変数、従属変数、説明変数、目的変数

検量線を作成するということは、 x （濃度）と y （出力値）の因果関係を分析しているということである。因果関係では、原因となるものを「独立変数（説明変数ともいう）」といい、その要因に応じて現れるものを「従属変数（目的変数ともいう）」という。検量線の作成において x がどちらの変数で、 y がどちらの変数であるかについて理解しておく必要がある。

5. 逆推定

「相対定量法」では、すべからく検量線を作成し、その検量線を用いて従属変数 y から独立変数 x を推定し定量値を得る。この、従属変数 y から独立変数 x を推定することを逆推定と呼ぶ。方眼紙に定規を使って検量線を書いていた時代では、目視で数値を読み取るしか無かったが、直線回帰

によって検量線を得ていれば、以下のように一次式を変換するだけで、従属変数 y から独立変数 x を計算することができる。

$$y=a+bx \quad \rightarrow \quad x= (y-a) \div b \quad (1)式$$

(1)式にセンサーの出力値である従属変数 y を代入することにより濃度 x が推定できる。一次式を変換しなければならぬので面倒に思えるかもしれないが、これ以外の方法はない。

マイクロソフト社の Excel という表計算ソフトに” Forecast” という関数がある (対応バージョン: 2007, 2010, 2013)。これは、 y のデータと x のデータから回帰直線を求め、予測に使う x に対応する y の値を求める関数である。この関数を使用すれば、わざわざ一次式を変換し逆推定の計算などしなくて良い (関数のコピーのみで使い回し OK) と考えている方がいるかもしれないが、今までの説明を理解すればわかるように、これは絶対にしてはいけない (本稿で 2 番目に重要な事項)。もし、少しでも疑問が残る場合には、今一度、独立変数と従属変数の意味を考えて頂きたい。

6. 相関係数, 決定係数, 寄与率

回帰直線を計算する際に、相関係数 (一般的に” r ” と表記する) を計算しデータの直線性の目安にする。 r は、 $-1 \leq r \leq 1$ の範囲の数値になり、1 または -1 の場合、全データが直線上に並び (完全一致)、0 ならば全く相関がないことを示す。では、決定係数とはなにか。概念的な説明をすると、「決定係数とは、 x の値で y の値が決定できる割合を示しているもの」といえる。この値は、回帰平方和を全平方和で除すことにより求まる。この数値は、 r の自乗と同じなので r^2 と表記される。また、 r^2 が 0.98 の時、0.98 に 100 を乗ずると%になり、98% という数字が得られ、この場合、寄与率は 98% であるという。この寄与率は、分散分析を勉強されている方にはおなじみのものである。

解析の対象が、相関関係の場合には r を、回帰式の適合度の場合には r^2 を使用する。

7. 残差プロット

横軸に濃度、縦軸に残差 (Δy) をプロットしたものが、残差プロットである。検量線の評価に

は必須のものといえる。決定係数で回帰直線の適合性はある程度判断できるが、残差の分布により、データが真に直線性を示しているかどうか、例えば検量線の直線性がある濃度から低下し始めていないか、検量線からずれている特定の濃度領域がないかどうか等を残差プロットで確認する必要がある。残差プロットを見て、残差がプラスとマイナスにランダムに上下していれば、直線による回帰は正当といえる。また、残差をヒストグラムにして観察することも有効である。残差の分布が正規分布を示せば、直線での回帰の適合性を支持している。

8. Precision Profile (P.P.), Response Error Relationship (RER)

測定結果の精度は、濃度によって異なるのが普通である。横軸を濃度、縦軸を測定値の標準偏差 (SD) あるいは変動係数 (CV) とし、データをプロットしたものが、Precision Profile (P.P., 精度プロフィール) である (図 3)。P.P. を作成することにより、全測定濃度領域での定量値の精度を知ることができる。Response Error Relationship (RER) の作成では、横軸に同一試料の測定値 (Response) の平均値を取り、縦軸にその試料の測定値の標準偏差をプロットする (図 4)。当然、同一試料を多重測定していることが前提となる。このプロットを用いて、最小自乗法により原点を通る回帰直線 ($y=mx$) を求める。RER における傾き m が小さい程、この測定における精度が良いことになる。

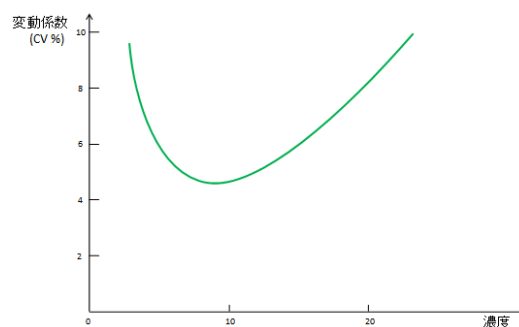


図 3. Precision Profile (P.P.)

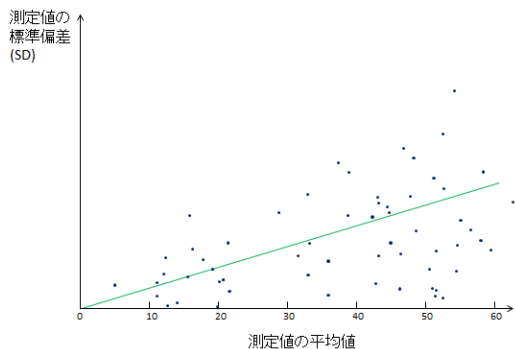


図4. Response Error Relationship (RER)

RER から得られる測定値に対応した SD を、当該測定値における検量線の勾配 (Slope) で除すことにより、定量値の SD を連続的に求めることができる。このようにして得た定量値の SD を利用して P.P.を作成する。

9. 検出限界, 定量限界

検出限界の求め方は、S/N 比を利用する等多くの考え方があるが、検量線から理論的に考えることもできる。ブランク試料における測定値 (Response) は、一般的には電気的なノイズ等が加味され正の値となる。そこから、測定対象物質の濃度を少しずつ増やしていくと、初めのうち検出器は反応しないが、ある濃度から徐々に反応し測定値が上昇していく。つまり、検量線は、ダイナミックレンジを外れた低濃度では勾配が穏やかになり、ブランク付近ではほぼ傾きがゼロになる (図5)。

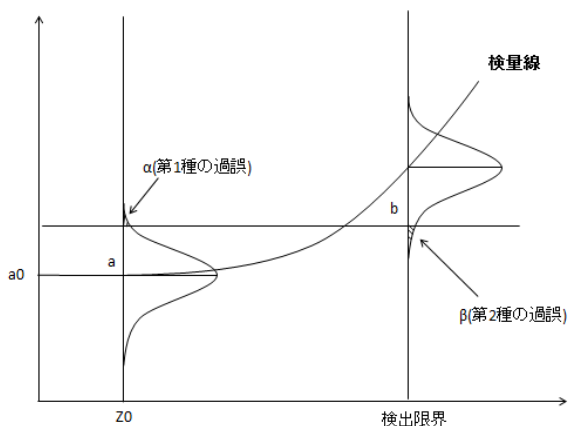


図5. 検量線から理論的に考える検出限界

測定値 (Response) は誤差を持ち、その誤差は正規分布をすると仮定できることから、図5に示すようにブランクなのに検出と過誤 (第1種の過誤) をしてしまうことがない値 (判定限界と呼ぶことがある) と、測定対象物質が含まれているにもかかわらずブランクと判定してしまう過誤 (第2種の過誤) を犯すことがないと判断できる値を統計的に求めることができる。第2種の過誤を犯さない最小値が、理論的な検出限界値である。

定量限界とは、用いる測定方法で測定対象物質の定量が可能な最小量あるいは最小濃度であり、定量結果の信頼性 (通常はバラツキの程度) が証明されていない限り、証明されていない。

10. 重み付き最小自乗法

最小自乗法では回帰式による残差が等分散性 (誤差の母分散は全て等しい) を持つことが前提となっている。等分散性が満たされていない測定系では、データに重みをつけることにより等分散性を確保し、最小自乗法を適用する必要がある。

現在のところ、残留農薬分析の世界では、検量線を作成する際に重み付き最小自乗法を用いている例はほとんど見られないが、LC-MS/MS を利用した場合に、特に低濃度領域での残差の等分散性が満たされていない事例が多く見られるようになってきている。近い将来には、そのような場合の検量線作成には、重み付き最小自乗法の利用が一般的になるとと思われる。誤用しないために、当該理論に関する知識の獲得が必須である。

11. 非線形回帰

競合法に基づいた ELISA 等では、原理的に応答関数は3パラメーターロジスティック曲線や4パラメーターロジスティック曲線になる。また、ガスクロマトグラフの代表的検出器の一つである、炎光光度検出器 (Flame Photometric Detector : FPD) では、硫黄、りん、およびすずを含有する化合物を検出することができるが、硫黄の場合、炎光量は S_2 量に比例するため、検量線は二次曲線となる。このような場合に、曲線にデータ変換を経ずに直接回帰させ、曲線の回帰式を求めることを非線形回帰という。

12. まとめ

本稿では、検量線に関わる基本的な理論と評価法を解説した。検量線は残留農薬分析化学者にとって、日常的に使用しているものであり、また、単に使うだけならば全く難しいものではない。しかし、基本的な理論を知るだけで、同じ検量線を用いても定量結果への理解の仕方が全く異なるものとなる。この機会に、x軸とy軸の取り方、検量線ではxからyへの回帰が絶対であることなどについて、理論に基づき再確認していただければ幸いである。

また、当然のことであるが、「相対定量法」では、検量線が正確でなければ、測定対象物質の正確な定量はできない。正確な定量値を得るためには正確な検量線を作成することが第一歩となる。いうまでもないが、検量線で保証されている絶対量の範囲内で定量を行うことは必ず守るべきルールで、たとえ1%でも検量線の範囲を超えたところで定量してはいけない。

「相対定量法」において必須である検量線に関する理解が本稿で少しでも深まれば幸いである。しかし、本内容はあくまでも基本的な理論にしか触れていない。指導的立場にある残留農薬分析化学者の方々にとって、より正確なデータハンドリングを行うための理論学習のきっかけになることを期待する。

(本稿は、第37回農薬残留分析研究会(平成26年10月16日~10月17日)で筆者が講演した内容に加筆したものである。)

参考文献

- 1) 臨床化学 27:21-49,1998
- 2) ガスクロマトグラフィー通則 日本工業規格 0114:2012
- 3) 統計学集中講座 日本卒後教育センター 1986
- 4) 応用回帰分析 森北出版株式会社 1983
- 5) 現場技術者のためのデータ解析の基礎知識 秋山功 2009