

	1st		2nd		3rd	
	A	B	A	B	A	B
Ave.	0.25	0.18	0.24	0.20	0.24	0.21
SD	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
RSD%	3.2	8.0	2.7	5.9	3.0	6.2
Ave.	0.45	0.36	0.43	0.39	0.44	0.40
SD	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01
RSD%	2.9	6.2	3.3	7.6	2.3	3.1

表3 標準タンパク質を用いたELISA法により得られる吸光度のばらつきの評価

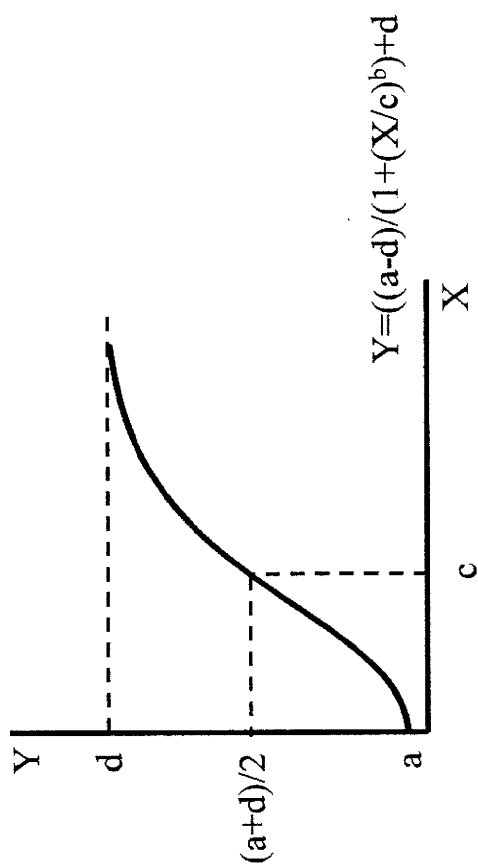
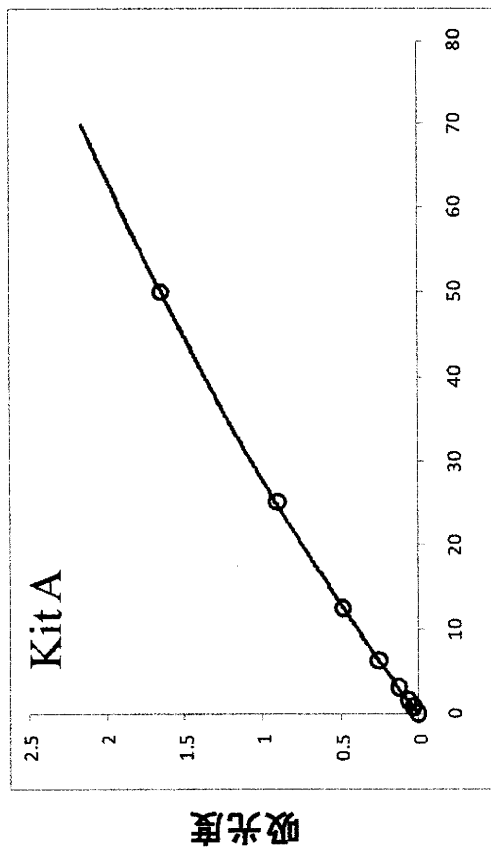
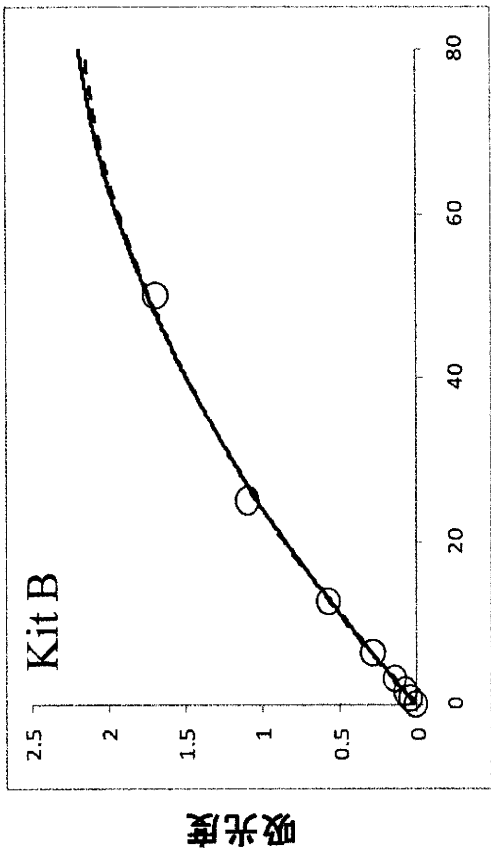


図14係数ロジスティック曲線



標準タンパク質濃度 (ng/mL)



標準タンパク質濃度 (ng/mL)

図2 4係数ロジスティック曲線にフィッティングして得られる回帰曲線の適正

		牛乳							卵						
	ng/mL	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7
		0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50
Blank-Std7	max	-26	-7	3	11	15	10	-2	17	6	3	2	1	0	1
	mini	-126	-46	-9	6	6	3	-7	-10	-2	0	-2	-3	-2	0
	median	-90	-36	-6	8	10	7	-3	10	4	1	0	-1	-1	0
Kit A	max	-18	-4	3	10	13	9		6	2	1	1	1	1	1
	mini	-116	-44	-6	4	2	-2		-6	-1	-1	-2	-2	-1	-1
	median	-24	-9	2	5	4	-1		1	0	0	0	0	0	0
Blank-Std 6 (Exp. Std 1)	max	3	3	7	11	9	3		9	9	7	9	8	8	8
	mini	-24	-24	-6	1	2	-2		-9	-9	-7	-8	-10	-10	-10
	median	-9	-9	1	5	4	-1		-1	-1	-1	0	0	0	0
Blank-Std7	max	-14	-9	-4	12	26	34	-2	-31	-5	4	8	13	8	-1
	mini	-227	-93	-23	-5	1	-2	-24	-96	-37	-7	1	6	-1	-8
	median	-158	-62	-17	5	13	18	-6	-66	-24	-5	5	8	5	-2
Kit B	max	-5	5	6	7	10	34		-13	-3	4	7	9	5	5
	mini	-181	-82	-21	-6	-1	-2		-68	-26	-4	0	2	-2	-2
	median	-10	-5	0	1	3	-1		-23	-8	0	4	5	-1	-1
Blank-Std 6 (Exp. Std 1)	max	36	36	42	38	41	34		5	11	11	13	14	8	8
	mini	-31	-31	-27	-21	-23	-21		-16	-16	-7	-5	-6	-13	-13
	median	-4	-4	1	2	2	0		-9	-9	0	3	5	-1	-1

表4 ELISA法により得られる検量線データを用いて作成した一次回帰曲線の適正

表中の数値はバイアス%=(戻し値-既定値)/既定値*100

戻し値は、回帰曲線によりその作成に使用した吸光度を検量して得られる測定溶液中の標準タンパク濃度

Kit A							Kit B							
Std.	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Between repeated analysis	4.4	3.5	3.1	2.3	3.0	3.9	2.5	9.2	7.1	4.7	3.7	6.4	5.1	2.9
Between day	5.7	4.8	3.2	3.0	2.5	0.7	2.4	46.3	17.4	16.3	11.0	14.0	12.4	5.3
Total	7.2	6.0	4.4	3.8	4.0	3.9	3.5	47.2	18.8	16.9	11.6	15.4	13.4	6.1

表5-1 検量線データとして得られた吸光度の分散分析結果(牛乳を対象とするキット。表記はRSD%)

Kit A							Kit B							
Std.	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Between repeated analysis	5.6	3.2	2.4	2.1	3.3	2.3	2.0	8.1	4.3	2.8	4.1	2.8	2.1	2.9
Between day	4.9	5.4	4.9	5.4	4.5	5.6	6.1	5.0	5.1	5.1	3.9	5.6	5.9	5.2
Total	7.4	6.3	5.5	5.8	5.6	6.0	6.4	8.1	6.6	5.8	5.7	6.2	6.3	6.0

表5-2 検量線データとして得られた吸光度の分散分析結果(卵を対象とするキット。表記はRSD%)

		Kit A										Kit B					
		25 H		15 H		5 H		CRM		25 H		15 H		5 H		CRM	
Test portion		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Days	1st	11.96	12.02	12.11	11.80	11.66	11.76	1.73	1.70	8.60	8.57	8.22	7.77	7.32	7.64	2.22	2.21
	2nd	11.72	11.60	11.39	11.52	11.09	11.50	1.82	1.95	8.12	8.49	7.92	7.79	6.83	7.12	2.32	2.01
	3rd	11.83	11.87	11.30	11.25	11.02	10.80	2.23	1.87	7.96	8.00	7.65	7.17	6.69	6.88	1.72	2.12
	4th	12.12	11.95	11.94	12.03	12.19	12.03	1.66	1.93	7.49	7.77	6.73	7.32	6.49	6.50	2.25	1.97
	5th	12.75	12.87	12.80	12.59	12.56	12.63	2.10	2.05	6.49	6.67	6.54	6.73	5.72	6.64	2.19	2.15
	6th	12.90	12.58	12.51	12.59	12.25	12.09	1.94	1.82	5.79	6.04	5.89	5.86	5.25	6.07	2.54	2.02
	7th	12.15	11.53	12.24	11.39	11.53	11.53	1.86	1.89	8.69	9.00	8.60	8.47	7.71	7.56	2.34	2.11
	8th	11.73	10.71	11.60	9.93	11.45	10.79	1.67	1.83	7.90	7.05	7.67	7.76	5.68	7.03	2.24	2.17
	9th	12.18	11.51	12.11	11.85	11.71	11.86	1.82	1.89	8.24	7.91	8.03	8.18	7.78	7.52	2.48	2.62
	10th	12.05	11.90	11.70	11.59	11.39	11.86	1.79	2.04	8.45	8.04	8.18	7.78	7.11	7.70	2.12	2.07
	Average	12.00	11.81	11.81	11.68	11.68	11.68	1.88	1.88	7.76	7.76	7.51	7.51	6.86	6.86	2.19	2.19
	SD	0.51	0.64	0.64	0.52	0.52	0.52	0.15	0.15	0.91	0.91	0.79	0.79	0.74	0.74	0.20	0.20
	RSD%	4.3	5.4	5.4	4.5	4.5	4.5	7.8	7.8	11.7	11.7	10.6	10.6	10.8	10.8	9.3	9.3

表 6-1 4係数ロジスティック曲線による検量により得られた測定値(牛乳)

		Kit A										Kit B									
		25 H		15 H		5 H		CRM		25 H		15 H		5 H		CRM					
Test portion		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2				
Days	1st	3.62	3.77	3.48	3.22	2.11	2.05	1.85	1.83	6.91	6.52	5.93	5.43	4.22	4.32	1.80	1.76				
	2nd	3.79	3.60	3.34	3.08	2.01	1.99	1.91	1.91	6.67	6.68	5.83	5.28	4.06	4.25	1.68	1.70				
	3rd	5.21	5.32	4.63	4.52	3.43	3.50	1.98	1.96	4.39	4.46	4.81	4.20	3.02	3.28	1.69	1.74				
	4th	5.21	5.21	4.58	4.63	3.44	3.50	1.97	1.93	4.69	4.56	4.38	4.26	3.13	3.19	1.77	1.76				
	5th	4.30	4.27	3.77	3.61	2.83	2.74	1.88	1.81	6.31	6.35	5.86	5.66	4.84	4.76	1.89	1.95				
	6th	4.43	4.68	3.96	3.66	2.83	2.87	1.95	1.95	6.40	6.47	5.72	5.55	4.74	4.31	1.88	1.93				
	7th	5.37	5.33	4.85	4.75	3.64	3.51	1.99	1.97	3.86	3.86	3.44	3.26	2.89	2.58	1.64	1.69				
	8th	5.59	5.22	4.75	4.89	3.59	3.42	1.93	1.90	3.93	3.96	3.36	3.26	2.39	2.44	1.55	1.51				
	9th	5.25	5.07	4.55	4.36	3.26	3.28	1.87	1.81	6.50	6.09	5.16	5.25	4.68	4.43	1.86	1.91				
	10th	5.49	5.28	4.85	4.89	3.88	3.47	1.95	1.92	6.12	5.64	5.34	5.57	3.74	3.55	1.77	1.77				
	Average	4.80		4.22		3.07		1.91		5.52		4.88		3.74		1.76					
	SD	0.68		0.63		0.60		0.06		1.14		0.94		0.82		0.12					
	RSD%	14.1		14.9		19.7		2.9		20.7		19.3		22.0		6.8					

表 6-2 4係数ロジスティック曲線による検量により得られた測定値(卵)

		Kit A										Kit B					
Days	Test portion	25 H		15 H		5 H		CRM		25 H		15 H		5 H		CRM	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1st		12.25	12.31	12.39	12.10	11.95	12.05	1.77	1.74	8.95	8.92	8.53	8.02	7.52	7.88	2.15	2.14
2nd		12.47	12.35	12.13	12.27	11.82	12.25	1.92	2.06	8.32	8.72	8.09	7.96	6.90	7.22	2.24	1.92
3rd		12.50	12.54	11.96	11.90	11.67	11.45	2.34	1.94	8.00	8.04	7.67	7.16	6.65	6.85	1.62	2.03
4th		12.67	12.51	12.50	12.59	12.74	12.59	1.79	2.09	7.87	8.17	7.08	7.69	6.82	6.83	2.35	2.03
5th		12.57	12.69	12.62	12.42	12.39	12.47	2.07	2.02	7.36	7.63	7.29	7.17	6.52	6.38	1.93	1.73
6th		12.84	12.55	12.48	12.56	12.24	12.09	2.01	1.89	6.74	7.04	6.86	6.82	6.10	7.08	2.94	2.33
7th		12.76	12.15	12.84	12.02	12.15	12.15	2.02	2.06	9.64	7.71	9.04	8.86	6.91	7.93	2.90	2.19
8th		12.53	11.54	12.41	10.77	12.26	11.61	1.87	2.05	10.04	8.92	9.74	9.86	7.11	8.89	2.76	2.67
9th		12.71	12.05	12.64	12.39	12.25	12.40	1.91	1.98	8.08	7.74	7.86	8.02	7.60	7.33	2.32	2.47
10th		12.57	12.42	12.22	12.12	11.92	12.39	1.90	2.18	8.44	7.99	8.14	7.71	6.99	7.63	1.96	1.91
Average		12.45		12.27		12.14		1.98		8.22		7.98		7.16		2.23	
SD		0.29		0.43		0.33		0.14		0.81		0.87		0.63		0.37	
RSD%		2.4		3.5		2.7		7.2		9.9		10.9		8.8		16.6	

表7-1 一次回帰曲線による検量により得られた測定値(牛乳、参考)

		Kit A										Kit B									
Test portion	Days	25 H		15 H		5 H		CRM		25 H		15 H		5 H		CRM					
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2				
1st		3.56	3.71	3.42	3.17	2.07	2.02	1.82	1.80	7.17	6.77	6.16	5.65	4.39	4.49	1.87	1.82				
2nd		3.78	3.60	3.33	3.08	2.02	2.00	1.92	1.92	7.06	7.07	6.19	5.61	4.31	4.51	1.78	1.80				
3rd		4.80	4.90	4.26	4.15	3.15	3.22	1.82	1.81	4.83	4.92	5.31	4.62	3.27	3.56	1.84	1.90				
4th		4.93	4.93	4.33	4.37	3.24	3.30	1.86	1.82	5.29	5.14	4.93	4.78	3.44	3.52	1.97	1.95				
5th		4.35	4.32	3.81	3.64	2.85	2.75	1.88	1.82	6.64	6.68	6.16	5.93	5.04	4.95	1.94	2.00				
6th		4.07	4.30	3.64	3.37	2.61	2.65	1.80	1.81	6.45	6.52	5.76	5.59	4.76	4.31	1.87	1.92				
7th		4.76	4.73	4.30	4.21	3.22	3.10	1.76	1.74	4.27	4.28	3.79	3.58	3.15	2.79	1.81	1.86				
8th		5.36	5.01	4.55	4.68	3.43	3.28	1.85	1.82	4.54	4.58	3.87	3.74	2.68	2.75	1.77	1.73				
9th		5.08	4.91	4.40	4.22	3.15	3.17	1.82	1.77	7.52	7.03	5.92	6.01	5.33	5.04	2.08	2.15				
10th		5.00	4.81	4.43	4.46	3.55	3.18	1.81	1.78	6.56	6.04	5.72	5.97	3.98	3.76	1.87	1.87				
Average		4.55		3.99		2.90		1.82		5.97		5.27		4.00		1.89					
SD		0.55		0.51		0.51		0.05		1.10		0.90		0.83		0.10					
RSD%		12.0		12.7		17.4		2.6		18.5		17.0		20.7		5.5					

表7-2 一次回帰曲線による検量により得られた測定値(卵、参考)

Incubation time (h)	牛乳						卵					
	25		15		5		25		15		5	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
kit	12.00	7.76	11.81	7.51	11.68	6.86	4.80	5.52	4.22	4.88	3.07	1.76
Ave.	0.51	0.91	0.64	0.79	0.52	0.74	0.68	1.14	0.63	0.94	0.60	0.12
SD	4.3	11.7	5.4	10.6	4.5	10.8	14.1	20.7	14.9	19.3	19.7	6.8
RSD(%)	P < 0.01		< 0.01		< 0.01		< 0.05		< 0.05		< 0.01	
t	18.2		18.9		23.8		-2.4		-2.6		-3.0	

表 8-1 測定値の平均値の差の検定(畜肉ソーセージ キット間)

Sample	牛乳			卵		
	CRM		CRM	CRM		CRM
	kit	A	B	A	B	B
Ave.	1.88	2.19	2.19	1.91	1.76	1.76
SD	0.15	0.20	0.20	0.06	0.12	0.12
RSD(%)	7.8	9.3	9.3	2.9	6.8	6.8
P	< 0.01		< 0.01		< 0.01	
t	-6.2		-6.2		5.1	

表 8-2 測定値の平均値の差の検定(CRM キット間)

		牛乳						卵					
Incubation time (h)	kit	25 to 15		25 to 5		15 to 5		25 to 15		25 to 5		15 to 5	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
P	0.320	0.357	0.065	<0.01	0.494	0.011	0.01	0.06	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
t	1.01	0.93	1.90	3.44	0.69	2.68	2.81	1.93	8.53	-4.82	5.90	4.07	4.07

表 8-3 測定値の平均値の差の検定(同一キット、畜肉ソーセージ、抽出時間間)

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

表 9-1 分散分析結果(牛乳)

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

表 9-2 分散分析結果(卵)

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業
食品の規格基準に係る測定値に伴う不確かさに関する研究
分担研究報告書

微生物学的試験法の不確かさの推定

分担研究者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長

研究要旨

試験結果の信頼性を表現する指標として「不確かさ」が国際的に広く用いられており、試験結果を解釈する上で不可欠な情報になってきている。試験所の能力に関する一般的な要求事項を規定した ISO/IEC 17025:2005 では、5.4.6.2 項において「試験所は測定の不確かさを推定する手順を持ち、適用すること」が求められている。また、登録検査機関が行う食品衛生法に基づく製品検査の業務等を対象とした業務管理要領では「精度管理及び外部精度管理等の結果に基づいた測定の不確かさの評価の検討に努めること」が求められている。

測定の不確かさを推定する方法は、不確かさに関与する要因(試験工程)ごとに不確かさを見積もり、すべての不確かさを積み上げるボトムアップ方式と、一連の試験工程を経て得られる試験データに基づき試験法の「精度」を求めるトップダウン方式に大別される。

一昨年度の本研究では、トップダウン方式の1つである「技能試験データに基づく不確かさの推定」手法を用いて、一般細菌数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた。また、昨年度の本研究では、トップダウン方式の1つであり、試験所単独で実施が可能な「単一試験所の繰返し試験データに基づく不確かさの推定」手法を用いて、一般細菌数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた。複数の試料について不確かさを推定した結果、マトリックス(食品の種類・成分)や試料調製の方法によって異なる値であったことから、マトリックスや試料調製は一般細菌数の測定の不確かさに大きく関与する要因であることが確認された。

今年度の本研究では、昨年度と同様に、「単一試験所の繰返し試験データに基づく不確かさの推定」手法を用いて、大腸菌群数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた。デソキシコーレイト寒天培地を用いた混釈培養法により不確かさを推定した結果、大腸菌を単一に含む液体試料においては、同時に推定した一般細菌数の拡張不確かさと同等の値であったが、鶏挽き肉(不特定多数の細菌を含む試料)について推定した拡張不確かさは、同時に推定した一般細菌数の拡張不確かさの約 3.4~4 倍大きな値となった。また、デソキシコーレイト寒天培地上に生育しているすべての集落(定型及び非定型集落)の総数について、不確かさを推定した結果、一般細菌数の不確かさと同等の値であったことから、定型集落の鑑別技能は大腸菌群数の測定の不確かさに大きく関与する要因であることが確認された。

協力研究者 田中廣行, 諸藤 圭 財団法人日本食品分析センター 微生物部

A. 研究目的

近年、食品に係わる試験分野においても試験結果に伴う測定の不確かさを評価し、提示することが国際的に求められてきている。ISO/IEC 17025:2005の5.4.6.2項では「試験所は測定の不確かさを推定する手順を持ち、適用すること」が求められている。また、登録検査機関が行う食品衛生法に基づく製品検査の業務等を対象とした業務管理要領では「精度管理及び外部精度管理等の結果に基づいた測定の不確かさの評価の検討に努めること」が求められている。一方、測定の不確かさを推定する方法は不確かさに関与する要因(試験工程)ごとに不確かさを見積もり、すべての不確かさを積み上げるボトムアップ方式と、一連の試験工程を経て得られる試験データに基づき試験法の「精度」を求めるトップダウン方式に大別される。ただし、食品の微生物学的試験の場合は①試験対象が微生物(生き物)であること、②指定された測定条件(培地、培養温度及び時間など)により実施される条件試験(測定結果が測定条件に依存する試験)であること、③複雑なマトリックス(食品の種類・成分)の中から、複数の工程を経て特定の微生物を検出・計数する試験であることなどから、不確かさを推定する方法としてボトムアップ方式を適用することは困難である。したがって、食品の微生物学的試験に係わる適切な不確かさの推定方法を検討・確立することが重要な課題となっている。

一昨年度の本研究では、トップダウン方式の1つである「技能試験データに基づく不確かさの推定」手法を用いて、一般細菌数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた。平成17～19年度に実施された食品衛生外部精度管理調査の一般細菌数測定データに基づき不確かさを推定した結果、拡張不確かさ

(\log_{10})は0.24～0.26とほぼ一定の値であった。

昨年度の本研究では、トップダウン方式の1つであり、試験所単独で実施が可能な「単一試験所の繰返し試験データに基づく不確かさの推定」手法を用いて、一般細菌数の測定値に伴う不確かさの推定を試みた。一般細菌数の測定に係わる主な不確かさの要因(試験工程)のうち「試料調製」及び「マトリックス」に焦点を当てて不確かさを推定し、比較した。すなわち、固体試料に関して3方法の試料調製を実施して、試料調製の方法ごとに推定した不確かさを比較した。また、マトリックスが異なる4品目について繰返し試験を実施し、マトリックスごとに推定した不確かさを比較した。その結果、得られた拡張不確かさ(\log_{10})は0.17～0.36の範囲であり、試料調製の方法やマトリックスによって異なる値であったことから、試料調製及びマトリックスは不確かさに関与する主要な要因であることが確認された。

今年度の本研究では、昨年度と同様に「単一試験所の繰返し試験データに基づく不確かさの推定」手法を用いて、大腸菌群数の測定値に伴う不確かさの推定を試みることを目的とする。

B. 研究方法

1. 研究概要

単一試験所において、大腸菌群数の繰返し試験(2回測定)を10試料ずつ実施した。得られた20データを解析し、不確かさの推定を試みた。大腸菌群数の測定は、デソキシコレイト寒天培地を用いた混釈培養法及びBGLB培地を用いた最確数(MPN)法により実施した。また、対照として昨年度と同様に一般細菌数の測定値に伴う不確かさの推定を大腸菌群数と並行して実施し、昨年度の結果と比較した。

なお、当該試験は財団法人 日本食品分析センター 東京本部にて実施した。また、一般細菌数(混釈培養法)及び大腸菌群数(混釈培養法及び最確数(MPN)法)の測定に係わる主な不確かさの要因(試験工程)をそれぞれ図1~3に示した。

今年度の本研究においては、まず、大腸菌群数の測定における試験方法(混釈培養法及び最確数(MPN)法)の選択による不確かさへの関与について確認した。すなわち、同一試料について2方法でそれぞれ繰り返し試験を実施し、推定した不確かさを比較した。

次に、混釈培養法による大腸菌群数の測定に関わる主な不確かさの要因のうち、「大腸菌群以外の細菌」、「寒天培地の注加量」、「定型集落の鑑別技能」及び「確認試験」に焦点を当てて不確かさの比較を行った。まず、「大腸菌群以外の細菌」においては、大腸菌を単一に含む試料及び不特定多数の細菌を含む試料についてそれぞれ繰り返し試験を実施し、推定した不確かさを比較した。

また、「寒天培地の注加量」においては、3段階の注加量(10, 15 又は 20 ml)それぞれについて繰り返し試験を実施し、推定した不確かさを比較した。

さらに、「定型集落の鑑別技能」においては、デソキシコーレイト寒天培地に生育した集落のうち、定型集落として計数した値から算定した大腸菌群数及び全集落数から算定した総生菌数について、それぞれ不確かさを推定し、比較した。

最後に、「確認試験」については、定型集落の確認試験結果から算定した確認試験後の大腸菌群数(確定大腸菌群数)から不確かさを推定し、確認試験前の大腸菌群数(推定大腸菌群数)から推定した不確かさと比較した。

2. 繰り返し試験手順

1) 試料の種類

以下に示す2品目について10試料ずつを試験に供した。

① 鶏挽き肉(自然汚染された固体試料)

市販の鶏挽き肉(モモ肉)を購入して供試した。

② 大腸菌接種コーンスープ(人為的に汚染させた液体試料)

市販のコーンスープ(常温保存可能品)を購入し、大腸菌(*Escherichia coli* NBRC15034)を接種して供試した。

2) 試料の調製方法

① 鶏挽き肉(固体試料)

試料をよく混合した後、試料を採取(計量)した。

② 大腸菌接種コーンスープ(液体試料)

試料が入った容器を手でよく振った後、試料を採取(計量)した。

3) 試料液の調製方法

① 試料原液の調製

試料 10 g に滅菌リン酸緩衝生理食塩水 90 ml を加え、攪拌・混合したものを試料原液とした。

② 段階希釈液の調製

試料原液 1 ml を滅菌リン酸緩衝生理食塩水 9 ml に加えて攪拌し、試料原液の10倍希釈液を調製した。この操作を順次繰返して試料原液の10倍段階希釈液を調製した。

4) 測定手順(試験方法)

① 大腸菌群数[混釈培養法]

a) 寒天培地の混釈・培養

調製した試料原液及びその段階希釈液を1 ml ずつ滅菌ペトリ皿に分注した後、デソキシコーレイト寒天培地を 12~16 ml(寒天培地の注加量を固定する測定においては、その

所定量 10, 15 又は 20 ml)ずつ注ぎ、試料液と混和(混釈)した。固化後、寒天培地表面に同培地 3~4 ml を重層し、 35 ± 1 °C で 20 ± 2 時間培養した。

b) 集落の計数

培養後の寒天平板培地に形成された定型集落及び非定型集落をそれぞれ計数した。

c) 推定大腸菌群数及び総生菌数の算定

30~300 の範囲にある定型集落数に希釈倍数を乗じて試料 1 g 当たりの推定大腸菌群数(確認試験前の大腸菌群数)を算定した。また、同様に定型集落数及び非定型集落数の合計数から試料 1 g 当たりの総生菌数を算定した。

d) 確認試験

寒天平板培地に形成された定型集落から、任意の 5 集落を釣菌し、EMB 寒天平板培地に画線分離した。 35 ± 1 °C で 24 ± 2 時間培養後、生育集落を乳糖ブイヨン培地にそれぞれ移植した。 35 ± 1 °C で 48 ± 3 時間培養後、ガス産生を確認し、ガス産生が認められたものを陽性とした。

e) 確定大腸菌群数の算定

c) で算定した推定大腸菌群数に確認試験における陽性率(陽性株数/5 株)を乗じて試料 1 g 当たりの確定大腸菌群数(確認試験後の大腸菌群数)を算定した。

② 大腸菌群数[最確数(MPN)法]

a) BGLB 培地への接種

調製した試料原液及びその段階希釈液を 1 ml ずつ 3 本の BGLB 培地(10 ml)にそれぞれ接種して混合後、 35 ± 1 °C で 48 ± 3 時間培養した。

b) 陽性管の判定

培養後、BGLB 培地にガス産生を認めたものを陽性とした。

c) 推定大腸菌群数の算定

各段階希釈における陽性管数に応じて、最

確数表により試料 1 g 当たりの推定大腸菌群数を算定した。

③ 一般細菌数[混釈培養法]

a) 寒天培地の混釈・培養

調製した試料原液及びその段階希釈液を 1 ml ずつ滅菌ペトリ皿に分注した後、標準寒天培地を 12~16 ml ずつ注ぎ、試料液と混和(混釈)した。固化後の寒天平板培地を 35 ± 1 °C で 48 ± 3 時間培養した。

b) 集落の計数

培養後の寒天平板培地に形成された集落を計数した。

c) 一般細菌数の算定

30~300 の範囲にある集落数に希釈倍数を乗じて試料 1 g 当たりの一般細菌数を算定した。

4) 繰返し試験

試料の品目ごとに 10 試料について生菌数(一般細菌数又は大腸菌群数)を繰返し 2 回ずつ測定した。なお、1 試料の繰返し試験は同一日に実施し、10 試料についてはそれぞれ異なる日に実施した。また、測定に際しては、試験工程における不確かさの要因(試験担当者、試験操作、使用機器など)を意識的に変更・組合せて 20 回(10 試料×2 回)ずつ実施した(図 4)。

なお、意識的に変更・組合せた不確かさの要因を以下に示した。

要因①：試験担当者

20 回の測定すべてを異なる試験担当者により実施した。なお、20 名の試験担当者の実務年数は 1~22 年の範囲であった。

要因②：培地及び希釈水

培地及び希釈水は試験所で調製し、20 回の測定すべてに異なるバッチのものを使用した。なお、培地及び希釈水の滅菌処理には、

9 台のオートクレーブ(3 機種)を無作為に使用した。

要因③：試料原液の調製方法

3 台のストマッカー(3 機種)を無作為に使用して試料原液を調製した。

要因④：試料液の分注方法

ガラス製メスピペット又は電動式マイクロピペットを用いて試料液を滅菌ペトリ皿に分注した。

要因⑤：寒天培地の混釈方法

大腸菌群数の測定においては、試験担当者による手操作、一般細菌数の測定においては、試験担当者による手操作又は自動培地分注・混釈装置を用いて寒天培地を混釈した。

要因⑥：恒温器

7 台の恒温器(2 機種)を無作為に使用した。

5) 不確かさの推定

国際的なガイドラインである ISO/TS 19036:2006「Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations」を参考として、以下の手順により不確かさの推定を行った。

- ① 1 試料当たり繰返し 2 回試験した大腸菌群数の測定データ(X_{iA} 及び X_{iB})を常用対数に変換した ($Y_{iA} = \log_{10}(X_{iA})$ 及び $Y_{iB} = \log_{10}(X_{iB})$)、
- ② 常用対数に変換した 2 つの測定データから分散($(Y_{iA} - Y_{iB})^2 / 2$)を算出した。
- ③ 10 試料それぞれの分散について平均値を算出した。
- ④ 「分散の平均値」の平方根を求め、標準不確かさ(s_R)とした。
- ⑤ 標準不確かさに包含係数 2 を乗じて拡張不確かさ($2 \times s_R$)とした。

C. 研究結果及び考察

1. 不確かさの推定

コーンスープについての繰返し試験の結果を表 1~3 及び図 5~7 に、鶏挽き肉についての繰返し試験の結果を表 4~13 及び図 8~17 に示した。繰返し試験の結果に基づいて算出した標準不確かさ及び拡張不確かさ(包含係数を 2 とした)及び測定値を $5.00 \log_{10}/g$ と仮定した場合の 95 %信頼区間を表 14 に示した。

2. 一般細菌数の不確かさの比較

昨年度、単一試験所の繰返し試験データに基づき推定した一般細菌数の不確かさと、今年度、同様に推定した一般細菌数の不確かさは以下のとおりとなる。

区分 (マトリックス)	試料	拡張不確かさ [$\log_{10}/g(ml)$]
液体	コーンスープ (大腸菌接種)	0.14
	紅茶飲料	0.17*
	枯草菌芽胞液	0.18*
固体	鶏挽き肉	0.18
	鶏肉(粉碎処理)	0.22*
	鶏肉(細切処理)	0.27*
	鶏肉(未処理)	0.36*
粉体	そば粉	0.36*

* 昨年度の推定結果

今年度の試料であるコーンスープの拡張不確かさは、昨年度の試料のうちマトリックスが近似している紅茶飲料及び枯草菌芽胞液の拡張不確かさとほぼ同等の値であった。また、今年度の試料である鶏挽き肉の拡張不確かさも昨年度の試料のうちマトリックスが近似している鶏肉(粉碎処理)の拡張不確かさとほぼ同等の値であった。したがって、当該試験所における一般細菌数の測定の不確かさに関与する要因は、昨年度と比較して大きく変動していないことが確認された。

3. 大腸菌群数の試験方法の違いによる不確かさへの関与

大腸菌を接種したコーンスープについて、混積培養法による大腸菌群数の不確かさを推定した結果、その拡張不確かさ(\log_{10})は0.14であった。一方、最確数(MPN)法による拡張不確かさ(\log_{10})は0.73であり、混積培養法による大腸菌群数の約5.2倍大きな値となり、顕著な相違が認められた。

本研究において、採用した陽性管数の組み合わせから得られた最確数(MPN)とその95%信頼区間を表15に示した。また、95%信頼区間から標準偏差を算出し、さらにその標準偏差から拡張不確かさを算出した結果を同様に表15に示した。95%信頼区間から算出した拡張不確かさ(\log_{10})が0.55~0.66の範囲であったことから、最確数(MPN)法においては、試験方法そのものに起因するばらつきが大きいと、潜在的に不確かさが大きくなると考えられた。

最確数(MPN)は、試料液に含まれる微生物の分布がポアソン分布に基づくことを前提として算定されている。しかし、ポアソン分布における95%信頼区間を最確数(MPN)法による測定結果の不確かさとする場合、このポアソン分布には、試験工程に伴う他の不確かさの要因が考慮されていないため、その不確かさは過小に評価されている可能性がある。APLAC (Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation; アジア太平洋試験所認定協力機構)が作成した“試験における測定の不確かさ評価の解説と手引き”(APLAC TC005)においても同様な指摘が記述されている。実際に本研究において推定した最確数(MPN)法の拡張不確かさ0.73(\log_{10})は、最確数(MPN)の95%信頼区間から算出した拡張不確かさ0.63(\log_{10})よりも大きな値となり、本研究においてもこの傾向が確

認された。

4. 混積培養法による大腸菌群の不確かさ

①大腸菌群以外の細菌

大腸菌を接種したコーンスープにおける一般細菌数及び大腸菌群数の測定の拡張不確かさ(\log_{10})は、いずれも0.14であった。試験に供したコーンスープは、常温保存可能品であり、接種した大腸菌以外の細菌は存在しない試料である。このような単一の細菌のみが存在する試料においては、デソキシコーレイト寒天培地を用いた混積培養法による大腸菌群数の測定の不確かさは、一般細菌数の測定の不確かさと同等の値になることが確認された。

一方、鶏挽き肉における大腸菌群数の測定の拡張不確かさ(\log_{10})は0.62~0.72であり、一般細菌数の測定の拡張不確かさ0.18(\log_{10})よりも約3.4~4倍大きな値となった。鶏挽き肉には、大腸菌群以外の細菌が多く含まれていると考えられ、それらの存在が測定の不確かさに大きく関与している可能性が考えられた。

②デソキシコーレイト寒天培地の注加量

鶏挽き肉のような高栄養の試料においては、試料由来の栄養分が寒天平板培地に混入するため、寒天培地の注加量が一定でない場合、デソキシコーレイト寒天培地の培地性能(発育支持能及び発育阻止能)に影響を与える可能性が考えられた。また、鶏挽き肉のように大腸菌群以外の細菌が多く含まれている試料の場合、培地性能の相違によって非定型集落の生育数、定型集落の生育状況などに影響し、結果的に測定の不確かさに関与する可能性が考えられた。そのため、デソキシコーレイト寒天培地の注加量を10、15又は20 mlとして、それぞれ繰返し試験を実施し、不確

かさを推定した。その結果、次のとおりとなった。

試料	寒天培地の注加量(ml)	拡張不確かさ [log ₁₀ /g(ml)]
鶏挽き肉	10	0.72
	15	0.72
	20	0.62

注加量 20 ml の場合の拡張不確かさは、注加量 10 及び 15 ml と比較してやや小さな値になった。しかし、拡張不確かさの顕著な相違や比例関係は見られず、寒天培地の注加量による不確かさへの関与は認められなかった。

③定型集落の鑑別技能

①で述べたとおり、大腸菌群以外の細菌を多く含む鶏挽き肉において、大腸菌群数及び一般細菌数の測定の不確かさには、明確な相違が認められた。しかし、デソキシコーレイト寒天培地に生育したすべての集落数(総生菌数)に基づいて推定した拡張不確かさ(log₁₀)は、0.14~0.17 であり、一般細菌数の測定の不確かさ 0.18(log₁₀)とほぼ同等の値であった。

寒天平板培地に生育している集落のうち、定型集落のみを対象とした場合に不確かさの値が大きくなることから、定型集落を鑑別・計数し、推定大腸菌群数を算定する試験担当者の技能が、測定の不確かさに大きく関与している可能性が考えられた。すなわち、定型集落と非定型集落が混在している寒天平板培地において、定型・非定型の鑑別の度合いの相違が不確かさに関与していると考えられた。

④確認試験

デソキシコーレイト寒天培地を用いて推定した推定大腸菌群のうち、任意の 5 集落に

ついて、確認試験を行い、その陽性率を乗じて確定大腸菌群数を算定した。その確定大腸菌群数から推定した拡張不確かさは次のとおりであった。

培地注加量 (ml)	拡張不確かさ [log ₁₀ /g(ml)]		減少率 (%)
	確認試験前	確認試験後	
10	0.72	0.52	72
15	0.72	0.69	96
20	0.62	0.56	90

確認試験の前後の拡張不確かさを比較すると、確認試験後は確認試験前の約 0.72 倍~0.96 倍の値になった。定型集落の鑑別に起因して生じたばらつきが、確認試験後、陽性率を乗じることによって、その幅が集約し、確認試験後の不確かさが減少したと考えられた。

D. 結論

単一試験所の繰返し試験データに基づき不確かさの推定を試みた。得られた不確かさを比較した結果、次のことが考えられた。

デソキシコーレイト寒天培地を用いた混釈培養法において、大腸菌のみを含むコーンスープと不特定多数の細菌を含む鶏挽き肉における不確かさに顕著な相違が見られたことから、試料中の大腸菌群以外の細菌の存在が不確かさに大きく関与している可能性が考えられた。また、鶏挽き肉における総生菌数(定型及び非定型集落の合計数)の不確かさは、同一試料について推定した一般細菌数の不確かさと同等の値であった。しかし、大腸菌群数の不確かさは、一般細菌数の約 3.4~4 倍大きな値であったことから、デソキシコーレイト寒天平板培地に生育したすべての集落の中から定型集落を鑑別する技能は、不確かさに大きく関与していることが考え

られた。

混釈培養法を用いた大腸菌群数の測定における不確かさは、その試料に含まれる大腸菌群以外の細菌に起因して、一般細菌数の不確かさよりも大きな値となることが確認された。今年度の大腸菌群数の測定における不確かさの推定では、試料を液体試料及び粉砕固体試料を用いることで試料調製及びマトリックスの不確かさへの影響を小さくした。しかし、それらの試料においても、推定した不確かさは大きな値になったことから、固体試料(未処理または細切処理)、粉体試料などの不確かさは、さらに大きな値になることが推測された。

混釈培養法による大腸菌群数の測定における不確かさを小さな値にするためには、試験担当者間の鑑別技能を平準化する必要がある。鑑別技能を平準化するためには、定型集落の鑑別が容易な培地の選択が不可欠である。今回のデソキシコーレイト寒天培地では、定型集落の鑑別が困難であったことが、鑑別技能のばらつきを大きくし、その結果不確かさに大きく関与したと考えられた。より定型集落の鑑別が容易な培地を使用することにより、不確かさは小さくなると予想された。

このように、不確かさを推定することによって、測定結果のばらつきを定量化することができるとともに、さまざまな条件で不確かさを推定・比較することによって、測定結果のばらつきに関与する要因(試験工程)を特定することが可能となる。すなわち、不確かさの推定は、測定結果の信頼性を向上させるために重要視すべき試験工程・手順を抽出するための有効な手段となる。

E. 研究発表

1. 論文発表

田中廣行, 土屋 禎, 大島赴夫, 鈴木達也, 工藤由起子: 技能試験に基づく細菌数の不確かさの推定. Jpn.J.Food Microbiol., 27(3), 158-162, 2010

2. 学会発表

諸藤 圭, 土屋 禎, 田中廣行, 工藤由起子; 第31回日本食品微生物学会学術総会(2010年11月11~12日; 滋賀県)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

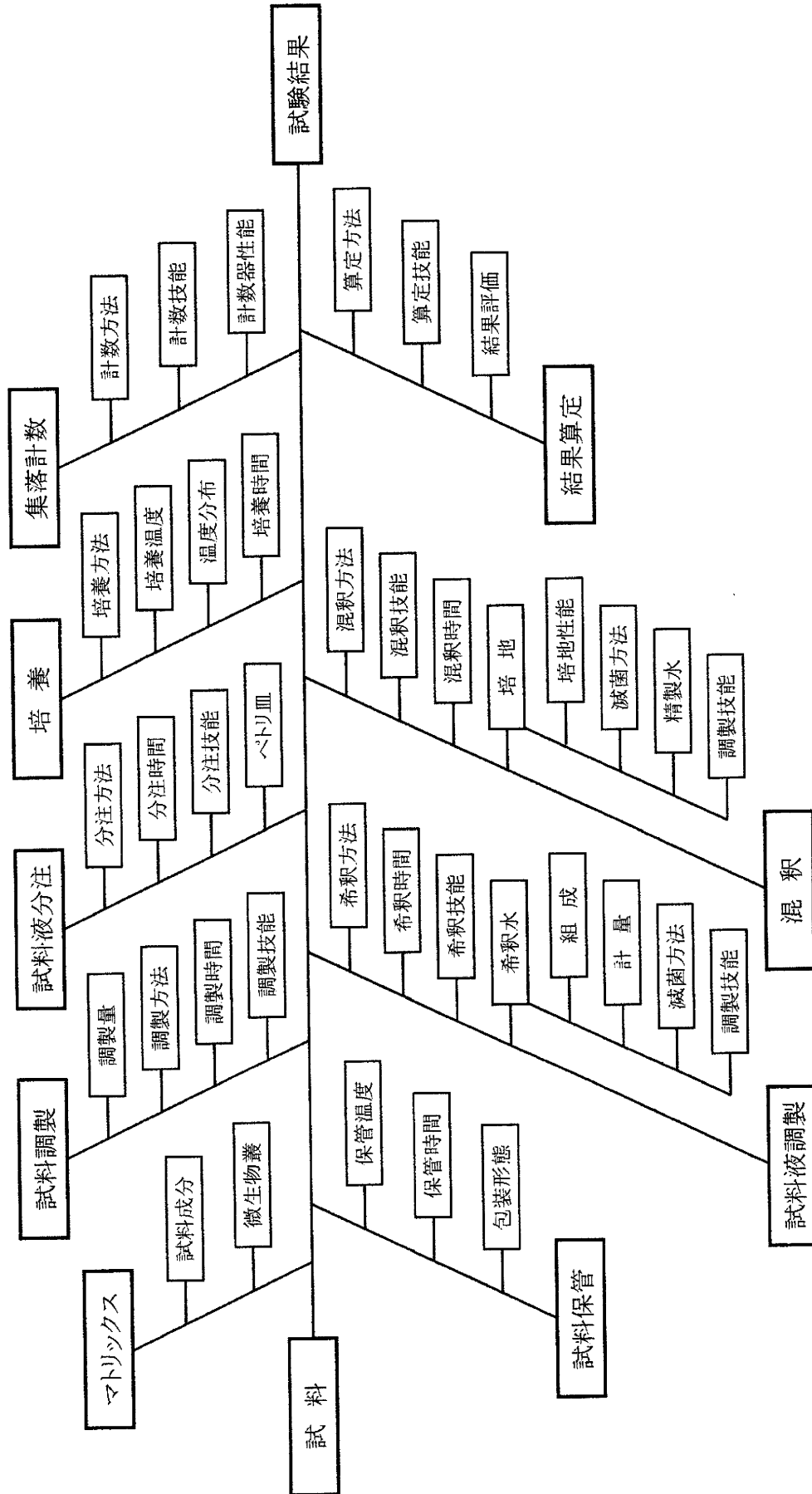


図1 一般細菌数(混釈培養法)の測定に係わる主な不確かさの工程要因図