

Table 1. Parameters of the calibration curves used for conversion of the Ct values into copy numbers

	Lel						RRS					
	7500		7700		7900		7500		7700		7900	
	Baseline correction		Baseline correction		Baseline correction		Baseline correction		Baseline correction		Baseline correction	
	Fixed	Variable	Fixed	Variable	Fixed	Variable	Fixed	Variable	Fixed	Variable	Fixed	Variable
Slope	-3.499	-3.474	-3.560	-3.517	-3.340	-3.317	-3.461	-3.443	-3.452	-3.435	-3.479	-3.454
Intercept	39.944	39.805	40.454	40.235	39.180	39.080	39.374	39.284	39.680	39.597	39.597	39.466
Correlation	-0.999	-0.999	-0.998	-0.998	-0.998	-0.998	-0.998	-0.998	-0.999	-0.999	-0.998	-0.998

The data for 5 calibration curves were analyzed while keeping the threshold line at 0.128 for each calibration curve.

Fixed: The baseline was fixed as PCR cycles 3 to 15 for all wells containing different numbers of target DNA sequence.

Variable: To best fit the baseline in each well containing different numbers of target DNA sequences, the number of PCR cycles was varied for each well in accordance with the new algorithm incorporated in *GiMlet*.

PCR 効率の算出, ④Th. line の自動変更 (最適 Th. line 決定支援), ⑤検量線から求められる PCR 効率およびその率の変動量の算出が可能となるようにした. 上記 *GiMlet* の有する機能のうち, 各種リアルタイム PCR 機器に付属のソフトウェアにより実施可能な解析に関しては, *GiMlet* ならびに対応する付属ソフトウェアの両方を用いて, 同一のデータを同一の条件で解析した場合に一致した結果が得られることでその正当性を確認した. なお, 検証に用いた付属ソフトウェアは, ABI PRISM 7500 について 7500 System Software SDS ver. 1.3, ABI PRISM 7700 について Sequence Detection System 1.7a, ABI PRISM 7900HT について SDS 2.2 ならびに 2.3 である.

#### 測定値の変動要因を検討するための試験計画

溶液中に含まれる DNA 配列の初期コピー数の分布の測定値への影響が無視できるほどに小さく, かつ測定値の変動を観察するための一定の濃度として, GM ダイズプラスミドセット-ColE1/TE に含まれる 1,500 コピー検量点に相当する濃度になるよう溶液を調製し, これを全ウェル検液とした. 全ウェル検液を, プレート上の 96 ウェルすべてに分注し測定を行うことにより multi component data を得た. 測定値に対する手技による影響を軽減させるため, 試験溶液は 1 プレート分を一括して調製し, 8 連のマルチチャンネルピペッターを用いて分注した. 3 機種種のリアルタイム PCR 機器のそれぞれについて測定を 4 回繰り返した. リアルタイム PCR に供した試験溶液の組成ならびに PCR 条件はすべての実験を通じて食安発第 0629002 号に準拠した.

得られた multi component data を *GiMlet* により種々の条件下で解析し, Ct 値ならびに PCR 効率を求めた. また, Ct 値をコピー数に変換する際には, 以下の方法に従って作成した検量線を用いた.

#### Ct 値を変換するための多測定検量線の作成

Ct 値をコピー数に変換するための検量線は, これを作成するために使用するデータの偏りを少なくするため以下の計画に従い繰り返し測定を行い, 得られた全データに基づく多測定検量線として作成した. 多測定検量線は, 各種

リアルタイム PCR 機器および測定系ごとに作成した.

食安発第 0629002 号に準拠し, 1 本の検量線作成のための検量点は GM ダイズプラスミドセット-ColE1/TE に含まれる 6 点とし, 計測数は各検量点につき 3 ウェルとした. プレート 1 枚当たり, 5 本の検量線を作成するための測定を行った. その後, 検量点濃度に関係なく, PCR の 3~15 サイクルまでをベースラインとして固定した条件 (Fixed), および新機能として *GiMlet* に搭載した蛍光値に基づきウェルごとに任意の PCR サイクルをベースラインとする条件 (Variable) によりベースライン補正を行った. 5 本分の検量線すべてを同様に解析した後, 検量点ごとの平均値を算出し, この平均値から多測定検量線を作成した. 作成された多測定検量線の基本パラメータを Table 1 に示す.

#### 結果および考察

##### Ct 値ならびに PCR 効率を指標としたリアルタイム PCR 機器の精度

機種として異なるリアルタイム PCR 機器が複数存在するが, これらの間で得られる測定値の差について明確に示した報告はない. そこで, 定量 PCR 法の適用可能機種として示されている, ABI PRISM 7500, 7700, 7900HT を用い, 多量に一括調製した同一の試験溶液を PCR プレート上の全ウェルに分注したうえで測定を行い, 得られた multi component data をウェル間での測定値のばらつきに着目して解析・比較した. ベースライン補正は, 食安発第 0629002 号に従い, 全データを通じて共通の設定 (全ウェルを 3 から 15 サイクルの  $R_n$  値により補正) とした. また Th. line は 0.128 に固定し, ウェルごとに Ct 値および amplification plot curve の傾きから算出した PCR 効率 ( $m$ ) を求めた. さらに, 機種ごとに別途作成した多測定検量線 (Table 1) に内挿することで Ct 値を変換してコピー数を求めた.

Lel および RRS 各測定系で得られた Ct 値ならびに PCR 効率 ( $m$ ) を Fig. 1 および Fig. 2 に示す.

ABI PRISM 7500 では, Lel ならびに RRS 特異的

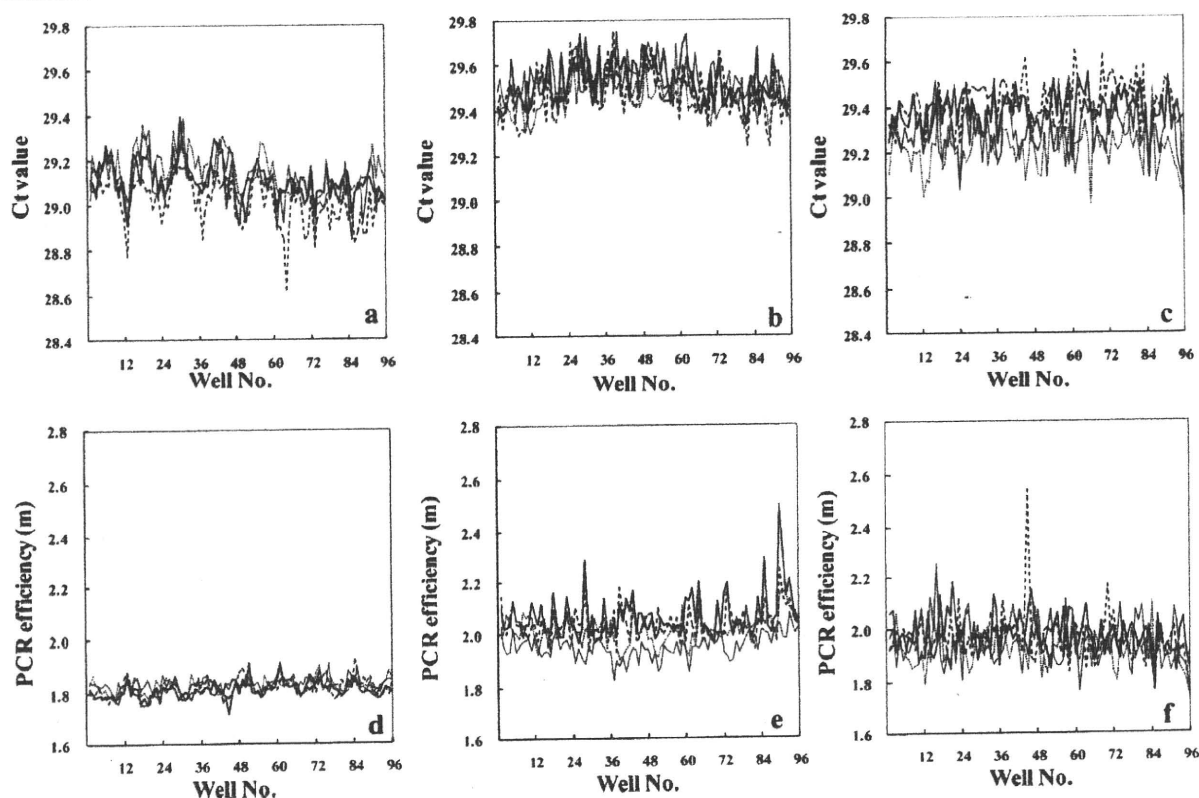


Fig. 1. Variations of the Ct value (upper) and PCR efficiency (lower) for *Lel1* among the wells

The four lines correspond to four repeated analyses.

PCR equipment: ABI PRISM 7500 (left; a and d), ABI PRISM 7700 (center; b and e), and PRISM 7900HT (right; c and f).

DNA 配列の測定に共通して、Ct 値に 12 ウェルを 1 サイクルとした周期性が認められた。この周期性はウェル番号の小さい側で特に顕著であった (Fig. 1a, Fig. 2a)。変動周期が 96 ウェルプレート長辺のウェル数 (12) に一致しており、ABI PRISM 7500 では各ウェルからの蛍光を非駆動型の CCD カメラによりプレート全体を一括して検出することから、この Ct 値の変動は蛍光検出に関する機器の仕様を反映していると考えられた。4 回の繰り返し測定間の Ct 値の変動は、ウェル間の変動よりも小さかった。

ABI PRISM 7700 により *Lel1* を測定した場合には、ウェル番号の始まりと終わり付近から得られる Ct 値が小さく、中央部分で大きくなる (グラフとしてはウェル番号 45 付近を頂点とした上向きの弓状となる) 傾向が認められた (Fig. 1b)。ABI PRISM 7700 は、各ウェルにファイバーを伸ばし、これを通じて蛍光を検出する仕様となっているため、蛍光検出が Ct 値変動の原因にはなりにくいと考えられる。一方で、PCR の温度制御を行うサーマルサイクラーにはクーラントが使用されており、また温度制御機構は、設定温度と実測温度との間に一定の幅を持たせた仕様となっている。このため、サーマルサイクラーの温度制御の特性を反映し Ct 値が変動したものと考えられた。ABI PRISM 7700 により RRS を測定した場合は、全

ウェルにわたって Ct 値の変動が大きく、*Lel1* 計測時に観察された傾向は認められなかった (Fig. 2b)。また、4 回の繰り返し測定で得られた Ct 値は、他の機器を含めた比較を通じて大きく変動している。この結果は、同一機器を使用した場合にも、測定系が異なることにより、得られる測定値の精度が異なる可能性を示唆している。

ABI PRISM 7900 では、*Lel1*, RRS 共にウェルの位置と得られる Ct 値の間に明確な関係は認められず、また、繰り返し測定間の違いも認められなかった (Fig. 1c, Fig. 2c)。

ABI PRISM 7500 を用いて *Lel1* を測定した場合の PCR 効率は、全ウェルならびに繰り返し測定を通じて約 1.8 となり、今回測定した中では最小であった (Fig. 1d)。一方、RRS 測定時の PCR 効率は 2.0 付近の値となった (Fig. 2d)。Ct 値と同じく PCR 効率にもウェルの位置による周期性が認められ、4 回繰り返し間の変動はわずかであった。

ABI PRISM 7700 を用いて *Lel1* を測定した場合の PCR 効率は、全データの平均値としてはほぼ 2.0 であり理論的な値に近かったが、ウェルの位置および繰り返し測定の間での変動が大きかった (Fig. 1e)。またグラフは、Ct 値と対照的にウェル番号 45 付近を頂点とした下向きの弓状と

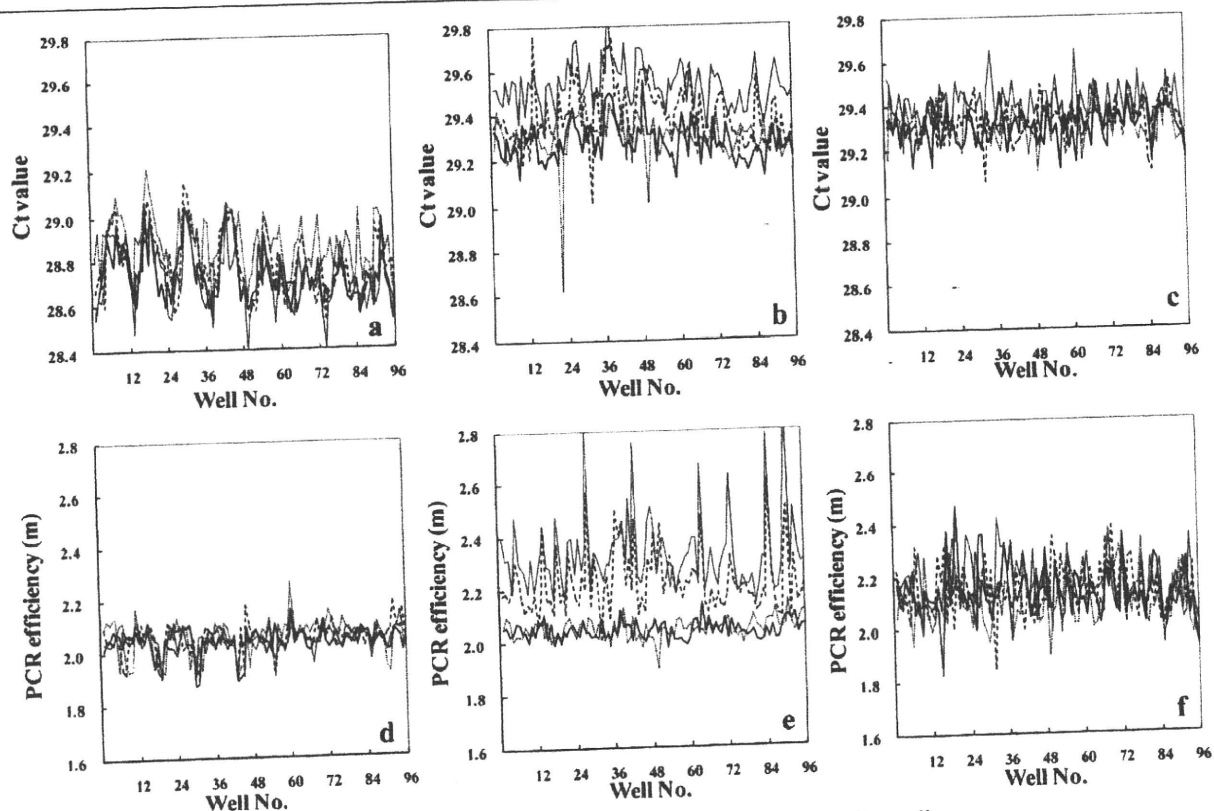


Fig. 2. Variations of the Ct value (upper) and PCR efficiency (lower) for RRS among the wells.

The four lines correspond to four repeated analyses.

PCR equipment: ABI PRISM 7500 (left; a and d), ABI PRISM 7700 (center; b and e), and PRISM 7900HT (right; c and f).

なり、Ct 値の大きさが PCR 効率と相関することが示された。ウェルの位置および繰り返し測定の間で PCR 効率が大きく変動する傾向は、RRS 測定系を用いた場合により顕著であった。RRS を測定した場合には、ウェル間での PCR 効率の変動幅が繰り返し測定間で大きく異なっており、特にその幅が大きかった測定回の PCR 効率は、全ウェル平均値としても 2.2 付近となり、理論上得られる最高値である 2.0 を超えていた (Fig. 2e)。

ABI PRISM 7900 では、非常に大きな PCR 効率を与えるウェル (1st 測定時のウェル番号 45) が見られ、これは測定の異常と考えられた (Fig. 1f)。このウェルを除くと、PCR 効率の平均は約 2.0 であり、測定を繰り返しても変化は見られなかった (Fig. 1f, Fig. 2f)。

GiMlet では、PCR という反応を記述する理論式へのフィッティングに基づき PCR 効率を算出させており、これを用いた解析結果が 2.0 を中心としたばらつきを持った値であったことは、組み込んだウェルごとの PCR 効率算出アルゴリズムが正しく機能していることを示唆している。すべてのウェルで PCR 効率が 2.0 を明らかに下回っている場合、増幅反応の不良が疑われ、反応系を改良する必要も考えられる。一方で 2.0 を大きく超える PCR 効率が算出される場合は、特定 DNA 配列の増幅によらない蛍

光が生じている、あるいは蛍光の検出に異常があることや後述するベースライン補正が不適切であることなどが推測される。また、特定のウェルのみから高頻度で理論値と大きく異なる PCR 効率が見られる場合には、機器に含まれるサーマルサイクラーや蛍光検出部の異常が疑われる。以上のように、ウェルごとに Ct 値あるいは PCR 効率を評価することにより、反応系および機器の基本的な性能評価が可能と考えられる。その際には、ウェル間、繰り返し測定 (Run) 間、測定系間のいずれの変動に着目して解析するかにより、改善に資する対処方針も変わるものと思われる。

#### コピー数を指標としたリアルタイム PCR 機器の精度

本研究の実験計画にその一部を使用した組換え食品定量 PCR 法における最終的な分析値 (定量値) は、Ct 値を検量線に内挿することで得られる特定 DNA 配列のコピー数を規定の算術式により計算して求められる。そこで、上記の実験で得た Ct 値を各種リアルタイム PCR 機器および測定系別に作成した多測定検量線 (Table 1) によりコピー数に変換した。その結果を Fig. 3 に示す。

Ct 値の結果から予想されるように、ABI PRISM 7500 により得られたコピー数には、12 ウェルを 1 サイクルとした周期性が認められた。同一プレート内で得られたコ

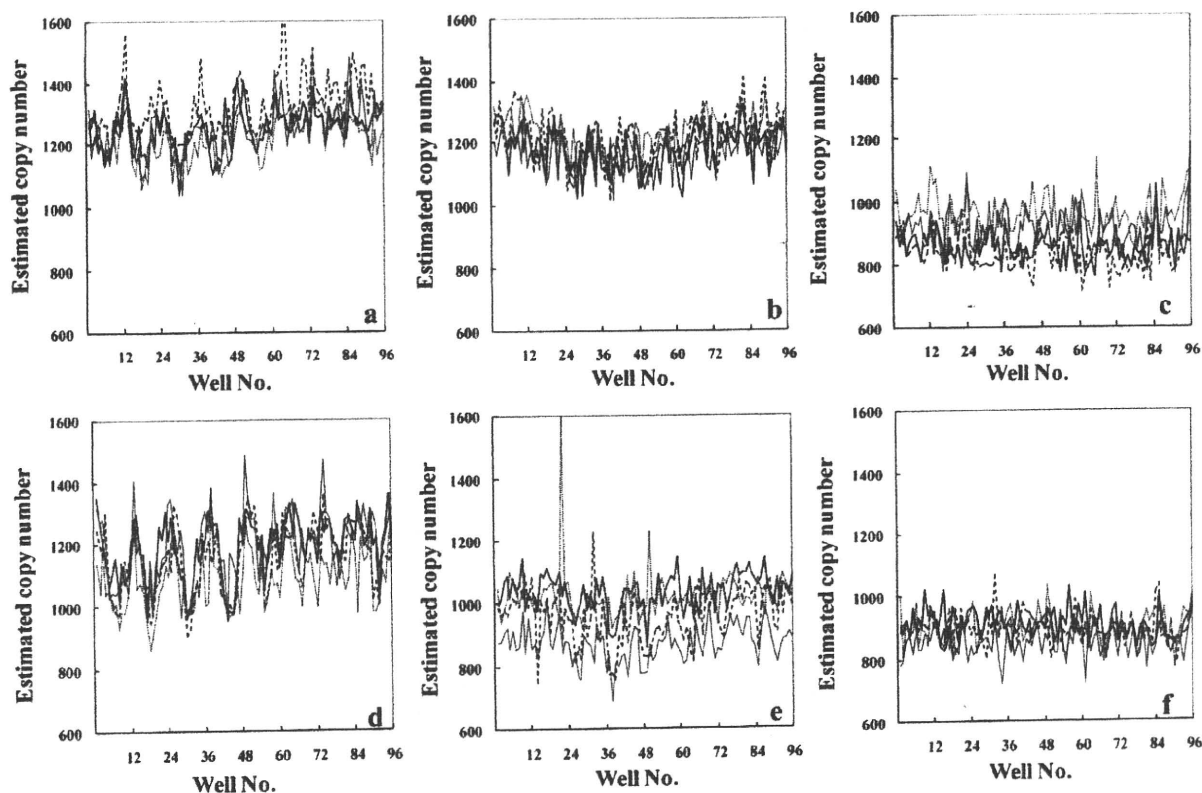


Fig. 3. Variations of the estimated copy number for *Le1* (upper) and RRS (lower) among the wells

The four lines correspond to four repeated analyses.

ABI PRISM 7500 (left; a and d), ABI PRISM 7700 (center; b and e), and PRISM 7900HT (right; c and f).

ピー数の最大値と最小値の差は *Le1* について 380~570 コピー, また RRS について 410~530 コピーであり, 相対標準偏差 (RSD) はそれぞれ 5.7~6.4% および 8.4~9.3% であった (Fig. 3a, Fig. 3d).

ABI PRISM 7700 による *Le1* の測定結果は, Ct 値の傾向から予想されたとおり, プレートの中心部でコピー数が低くなる結果となった (Fig. 3b). また最大値と最小値の差は 300~400 コピー, RSD は 4.8~6.8% であった. RRS の測定結果の変動は繰り返し測定間で大きく異なり, 最大値と最小値の差は 290~690 コピー, RSD は 5.5~8.9% であった (Fig. 3e).

ABI PRISM 7900HT による *Le1* の測定については, 最大値と最小値の差が 260~420 コピー, RSD は 6.6~7.0%, RRS の測定では最大値と最小値の差は 210~270 コピー, RSD は 5.0~5.9% で, 3機種の中では最も精度の良い結果となった (Fig. 3c, Fig. 3f).

本研究では, 全機種, 全測定を通じて検量点の 1,500 コピー濃度相当とすることを意図して大量調製した同一の全ウェル測定用検液 (全ウェル検液) を測定したにもかかわらず, 得られたコピー数の平均値は測定機種により明らかに異なっていた. コピー数への変換は, それぞれの機種ごとに, 繰り返し測定の結果に基づき作成された多測定検量線に内挿することで行っており, 測定位置による偏りや

人的誤差の影響は軽減されていると考えられる. しかし, そのように算出されたコピー数を比較した場合になお機種間で差が認められる今回の結果は, *Le1* 測定用検量線の傾きにも明らかだが (Table 1), 機種ごとの検量線に系統的な違いがあることを示唆している. コピー数に影響を及ぼす検量線の特徴には, 傾きや重心といった一次回帰直線の一般的な特性のほかにも, 検量線のばらつきを示す信頼区間などが考えられ, 今後の検討によりその重要度とともに明らかにすることが必要であると考えられる.

#### ベースライン補正方法の検討

Ct 値を求める過程において,  $R_n$  値をベースライン補正し  $\Delta R_n$  値に変換する. 機器付属のソフトウェアでは, ベースラインとして使用する  $R_n$  値の範囲 (PCR サイクル) は単一の解析条件として設定せざるをえず, これが全ウェルに適用される. しかし, 測定試料あるいは測定対象となる特定の DNA 配列により  $R_n$  値の増加パターンが変わり, これに伴いベースラインとして採用すべき最適な範囲がウェルごとにも異なる可能性が考えられる. そこで,  $R_n$  値の大きさや形状に応じて, ベースライン補正の設定を変更することが, 測定値の変動に与える影響について検討した.

Fig. 4 にベースライン補正に使用する  $R_n$  値の範囲設定の影響を示す. Fig. 4a および b の実線は, ABI PRISM

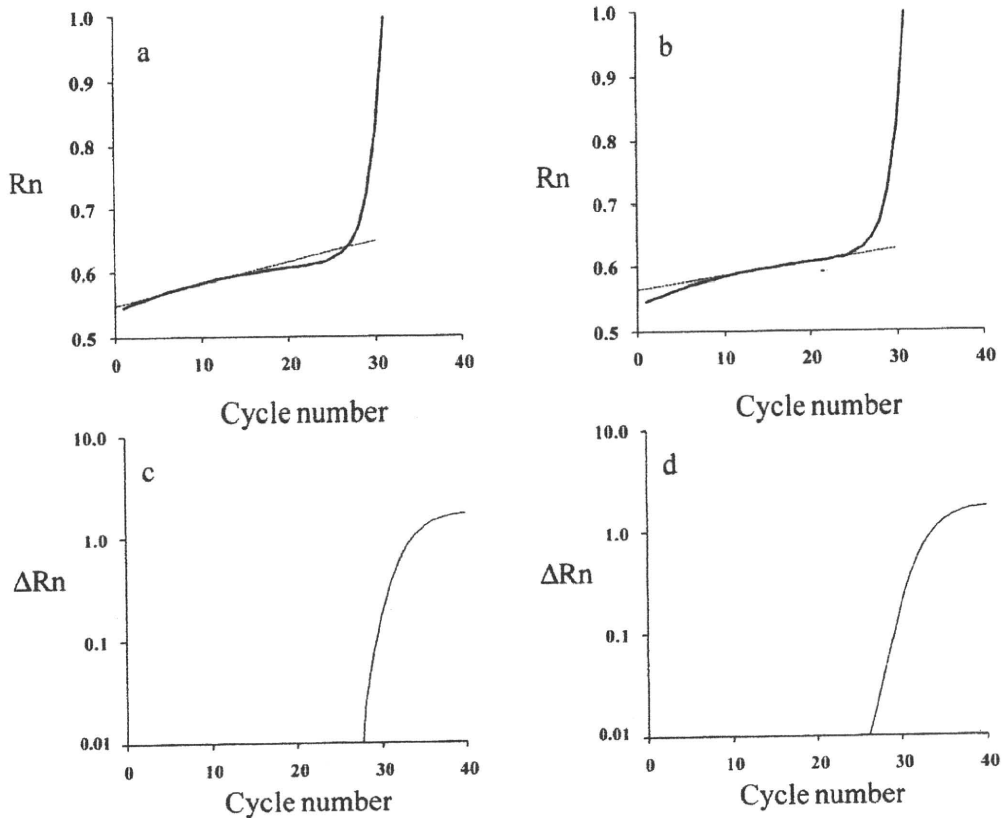


Fig. 4. Baseline correction setting and its effect on the amplification curve

- a:  $Rn$  plot (solid line) and baseline correction line (dotted line) calculated from PCR cycles 3 to 15.  
 b:  $Rn$  plot (solid line) and baseline correction line (dotted line) calculated from PCR cycles 10 to 23.  
 c: Amplification plot curve obtained at the correction setting of (a).  
 d: Amplification plot curve obtained at the correction setting of (b).

7700 を用いた RRS 測定系により 1 つのウェルから得られた  $Rn$  値を一例としてプロットしたものである。Fig. 4a には、定量 PCR 法の規定値である 3 から 15 サイクルの範囲の  $Rn$  値から作成したベースラインを点線で示した。このようにして得られたベースラインを各サイクル数まで延長した値と  $Rn$  値との差が  $\Delta Rn$  値となる。Fig. 4a に示した  $Rn$  値のプロットでは、25 サイクル付近に認められる急激な立ち上がりの直前で  $Rn$  値プロットの傾きが小さくなっており、既定値のベースライン設定で補正した場合には 15~26 サイクルの  $\Delta Rn$  値は負となった。一方 Fig. 4b では、ベースラインの設定範囲を立ち上がりに近い 10 から 23 サイクルに設定しており、その結果、負の  $\Delta Rn$  値は現れない。Fig. 4c および d は、それぞれ Fig. 4a および b に示したベースライン補正の結果得られた  $\Delta Rn$  値の片対数プロットである。PCR が正常に進行すれば、サイクル数に対して  $\Delta Rn$  値が指数的に増加し、直線となる部分が認められる。しかし、Fig. 4c では全体が曲線となり直線部分が認められない。これに対し Fig. 4d では直線部分が認められ、正常な PCR を反映した正しい増幅曲線の形状となっている。これらの解析結果から示唆さ

れるとおり、同一の  $Rn$  値をベースラインの設定方法を変更して解析するだけでも、異なる amplification curve が得られ、ひいては異なった Ct 値、コピー数が得られることになる。以上を考慮して、*GiMlet* には、ベースラインの範囲設定をウェルごとに行い、独立した補正を可能にする機能を組み入れた。

さらに、上記の機能を利用した場合の測定値の変化について検討するため、Fig. 1 および Fig. 2 に示したデータを、ベースライン補正の設定範囲をウェルごとに最適化させて再解析した。ウェル間での Ct 値の周期的変動が顕著であった ABI PRISM 7500 により得られた測定値については、ベースライン補正の設定を最適化しても大きな改善は認められなかった。また、全測定を通じてウェルおよび繰り返し測定間の変動が比較的小さかった ABI PRISM 7900HT により得られた測定値についても、ベースライン補正効果は観察されなかった。一方、既定のベースライン補正設定では、繰り返し測定間で Ct 値および PCR 効率に大きな差が見られた ABI PRISM 7700 により得られた測定値の再解析結果 (Table 2) を見ると、繰り返し測定間の差が認められないほどに小さくなっている。この効果

**Table 2.** Effect of the baseline-correction setting on the results of real-time PCR measurement

Baseline correction setting	Plate No.	<i>Le1</i>						RRS					
		Ct		<i>m</i>		Copy number		Ct		<i>m</i>		Copy number	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Fixed	1	29.525	0.098	2.0629	0.0850	1175.5	73.8	29.277	0.083	2.0422	0.0327	1033.3	56.4
	2	29.536	0.076	1.9522	0.0450	1166.2	56.3	29.532	0.10	1.3335	0.1500	872.1	58.2
	3	29.475	0.106	2.0378	0.0595	1215.1	83.0	29.398	0.135	2.2265	0.1158	955.9	84.7
	4	29.460	0.086	2.0158	0.0522	1225.6	67.7	29.297	0.101	2.0478	0.0362	1020.4	77.6
Variable	1	29.469	0.079	1.9898	0.0316	1153.2	59.3	29.206	0.076	1.9608	0.0207	1060.5	53.1
	2	29.555	0.079	1.9704	0.0401	1090.0	55.2	29.307	0.076	1.9753	0.0793	990.8	49.6
	3	29.438	0.088	1.9925	0.0325	1177.3	67.8	29.227	0.106	1.9787	0.010	1046.6	74.6
	4	29.425	0.081	1.9749	0.0338	1186.9	62.4	29.203	0.100	1.9436	0.0220	1063.9	82.0

All data were obtained from measurements using ABI PRISM 7700 and analyzed while keeping the value of the threshold line at 0.128.

*Le1*: The detection system for *Le1*-targeted DNA sequence, RRS: The detection system for RRS targeted DNA sequences, Ct: Ct value, *m*: PCR efficiency calculated from the slope of the amplification plot curve.

The Ct value was converted into copy number from the standard curve prepared in accordance with the Japanese official standard methods.

Means and SD were calculated from the data of 96 wells for each plated.

は PCR 効率において特に顕著であった。ABI PRISM 7700 を用いて得られた結果については、繰り返し測定ごとに *Rn* 値の増加パターンが他の機種に比較して大きく変動しており、新たなベースライン補正方法を用いて解析することでその変動の影響が解消あるいは軽減されたものと考えられる。また、当然の帰結として、推定コピー数の変動も軽減した。このように、同一の測定系を繰り返し用いた場合であっても、得られる *Rn* 値のパターンは測定ごとに異なっており、蛍光値を正しく解析し分析結果の精度を向上させるためには、ベースラインの補正方法を最適なものにすることが望ましいと考えられた。

## 結 論

TaqMan Chemistry<sup>TM</sup> に基づくリアルタイム PCR により得られる一義的な測定量である蛍光値を、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション (*GiMlet*) を開発した。リアルタイム PCR 法の一例として選択した組換え食品定量 PCR 法に規定される分析手順および試薬の一部を使用し、併行条件下の測定により得られた蛍光値を *GiMlet* により解析した結果、使用するリアルタイム PCR 機器の性能あるいは仕様が原因となり、ウェル間での測定値が変動する可能性が強く示された。また、*GiMlet* に組み込んだベースラインの範囲設定をウェルごとに行い、独立した補正を可能にする機能を用いることで、蛍光値の解析方法も測定値の変動に影響を与える要因となりうることを示唆された。今後、リアルタイム PCR 機器の性能評価基準が明確に示されることによって、分析法運用の可否を判断するために内部精度管理などにおいて役立てられることや、正しい補正方法の適用により分析値の信頼性が向上することが期待される。

## 謝 辞

本研究は、平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金により実施した。

## 文 献

- 1) Vanguilder, H., Vrana, K., Freeman, W. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, **44**, 619-626 (2008).
- 2) McKillip, J. L., Drake, M. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J. Food Prot.*, **67**, 823-832 (2004).
- 3) Ahmed, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol.*, **20**, 215-223 (2002).
- 4) Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL; 17th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 2000, Appendix D, 2-11.
- 5) CODEX guideline CAC/GL 27-1997; Guidelines for the assessment of the competence of testing laboratories involved in the import and export control of food.
- 6) Watanabe, T., Maitani, T., Matsuda, R. Factors affecting the variances of copy numbers as estimated from a calibration curve in real-time PCR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **50**, 1-5 (2009).
- 7) Watanabe, T., Shiramasa, Y., Furui, S., Kitta, K., Minegishi, Y., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of qualitative detection methods for unapproved genetically modified rice (LLRice). *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **48**, 170-178 (2007).
- 8) Watanabe, T., Tokishita, S., Spigelhalter, F., Furui, S., Kitta, K., Hino, A., Matsuda, R., Akiyama, H., Maitani, T. Development and evaluation of event-specific qualitative PCR methods for genetically modified Bt10. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1274-1279 (2007).

**最新版**

# 食品分析法の妥当性確認 ハンドブック

編集委員長 安井 明美  
編集委員 五十君静信 後藤 哲久 丹野 憲二 湯川剛一郎

## 2. 微生物試験法の妥当性確認の要求事項

### 2.1 はじめに

微生物試験においては、食中毒事例の原因を究明する目的で食品から原因と思われる微生物を分離するための試験、食品の微生物の状況を判断するために行う検出を目的とする試験などがあり、どのような目的で試験を行うかによりその試験法は異なってくる。ここでは食品の微生物の状況を判断するために行う主に検出を目的とする試験法の妥当性確認の要求事項につき整理する。食中毒事例の原因究明のための試験法は、病原微生物を確保するための試験法であるためここでは扱わない。

食品の微生物の状況を判断する場合でも、その目的として、食品の汚染実態調査のため、モニタリ



ングのため、微生物基準の可否を判定するためなどがあり、それぞれの目的に応じ、試験法自体、またその性能として要求されるものは異なる。試験法の妥当性確認(method validation)では、試験の目的、試験を行う微生物種、試験対象となる食品種(matrix: マトリックス)、採用する試験法を考慮して行う。

微生物試験において、適用マトリックス範囲(range for matrix)、選択性(selectivity)、特異性(specificity)の確認が必要である。適用マトリックス範囲とは試験が適用できる食品種の範囲で、選択性とは、分析対象に含まれる発育阻害物質やマトリックスなどの共存下で影響を受けないで精確に測定できる能力である。特異性については、微生物試験では、増菌培養及び分離培養時に類似の微生物の混入が常に問題となるため、当該微生物が特異的に得られることを立証する必要がある。試験法で得られた微生物に対し、当該微生物であることの確認試験により試験法の識別性を立証する。確認試験では、試験法により得られた微生物について、その性状から類似した微生物と識別できる方法を採用する。試験法の識別能力は、試験対象の微生物を含む試料を用いて得られた陽性の結果と、当該微生物を含まない試料を用いて得られた陰性の結果を比較することにより確認できる。あるいは、当該微生物に類似する性質の微生物に試験法を適用し、陽性の結果が得られないことを確認する。特異性を検討するときは、微生物試験法を実施するうえで想定される特異性に影響を及ぼすと思われる性質を持つ類似微生物を、科学的な根拠をもって選択する必要がある。測定の不確かさ(uncertainty of measurement)に関しては、サンプリング、試験法などに含まれる多くの要因に起因する値のばらつきを生ずる手技に関する考察を行う。

妥当性確認の方法としては、当該試験室単独で行う単一試験室による妥当性確認と、複数の試験室で行う共同試験による妥当性確認がある。ISO 16140<sup>1)</sup> および AOAC Appendix D<sup>2)</sup> を基に、代替試験法の妥当性確認の要求事項をまとめた。

## 2.2 定性試験

### 2.2.1 単一試験室妥当性確認

妥当性確認の第一段階は、単一試験室バリデーション(single laboratory validation; SLV)で、対象となる食品中に標的となる菌が存在するかないかを調べることが目的である。微生物試験では、培養することによって標的菌の増菌を行い確認するため、化学分析ほど厳密な選択性を期待することはできない。また通常、食品の種類や共存菌(細菌叢)の状況で選択性が変わってくるため、これらの影響に対して満足する結果が得られることが要求される。

#### (1) 相対精確さ、相対特異性、および相対感度

選定した食品に対して標的菌1種を選び、「食品-標的菌」各々の組合せに対して「相対精確さ(relative accuracy; AC)」、「相対特異性(relative specificity; SP)」、「相対感度(relative sensitivity; SE)」の性能指標を調べる(表-1)。「相対」となっているのは「参照法」と比較して得る性能指標であるからである。菌濃度は「陽性率が50%程度になるよう」に規定されているので、あらかじめ適当な濃度を定める試験をしておかなければならないことになる。すなわち、当該試験法についての知識や経験が必要なことを意味している。自然の状態、選定した細菌に汚染された食品(自然汚染試料)が最優先されるが、その入手が困難な場合は、あらかじめ細菌を人為的に添加した試料で試験してもよとする。

#### (2) 適用できる食品の種類

ISO 16140では付録Bで8群(カテゴリーと言う)に分類している。すなわち、①肉製品(Meat products)、②家禽(Poultry)、③魚及びシーフード製品(Fish and seafood products)、④果物及び野菜を主体とした製品(Fruits and vegetable based products)、⑤乳製品(Dairy products)、⑥チョコレート/パン製品(Chocolate/bakery products)、⑦その他の製品(Other products)、⑧飼料(Animal feeds)である。さらに、食品カテゴリーごとに食品タイプが分類されている。例えば肉製品では、生(Raw)、熱処理品(Heat processed)、冷凍品(Frozen)、発酵させたもの(Fermented)、燻製品(Cured)、その他(Others)という6タイプである。代替法を適用する食品が決まっていれば、当然、その食品カテゴリーで試験しておく

表-1 相対精確さ, 相対特異性, 相対感度を評価するための結果のまとめ

検体		陽性(参照法)	陰性(参照法)	合計
代替法の結果	陽性	PA	PD	
	陰性	ND	NA	
合計		$N_p$	$N_s$	N

PA: 陽性正解数, PD: 偽陽性数  
 NA: 陰性正解数, ND: 偽陰性数  
 N: 検体総数 = PA + PD + ND + NA  
 $N_p$ : 参照法で陽性と判定した総数,  $N_s$ : 参照法で陰性と判定した総数  
 相対精確さ (relative accuracy) AC =  $(PA+NA)/N \times 100\%$   
 相対特異性 (relative specificity) SP =  $NA/N_s \times 100\%$   
 相対感度 (relative sensitivity) SE =  $PA/N_p \times 100\%$

必要がある。ところが、全食品に適用できる試験法であることを主張しようと思えば、5種類のカテゴリーの食品について試験しておけばよしとしている。科学的に考えればナンセンスであるが、これも“現実的な解”の一つであろう。

5種類のカテゴリーの食品を選ぶ場合、食品タイプについても3種類以上を選ぶこととしている(表-2)。例えば5種類すべて「生」ばかりではなく「冷凍品」や「熱処理品」も選べ、ということである。試験試料数は、1食品カテゴリー当たり60であり、タイプごとの数の規定はない。

### (3) 相対検出レベル

選定した食品に対して標的菌1種を選び、この組合せに対して「相対検出レベル(Relative detection level)」を調べる。自然汚染食品が最優先されることは、上記の「相対精確さ」等を求める場合と同様である。どの程度の少ない菌まで検出できるかを知ることが目的であるから、菌濃度を5段階(最低でも3段階以上)に変えた試料を用意して調べる(表-3)。5段階の場合は、細菌を含まない試料(ネガティブコントロール)、理論的な検出可能菌数、それよりやや上の菌数、その3倍及び9倍の菌数である。各濃度での繰返し数は6である。

### (4) 包含性と排他性

「包含性(Inclusivity)」は標的微生物を含め、どの範囲の類似の菌種まで検出できるかということであり、逆に「排他性(Exclusivity)」は検出されない類縁菌の範囲を示す。

表-2 食品の種類を選択数と適用範囲及び必要な試験総数

試験法を適用させたい食品の種類	食品カテゴリーの数	食品タイプの数/食品カテゴリー	試験試料数/食品タイプ	試験試料数/食品カテゴリー(N)	同一試料での繰返し試験数		繰返しを考えた試験総数
					参照法	代替法	
すべての食品	5	3	20	60	1	1	600
特定の食品カテゴリーのみ	1	3	20	60	1	1	120

表-3 定性試験における相対検出レベルの試験に必要な試験総数(全食品に適用させる場合)

食品カテゴリーの数	食品タイプ/食品カテゴリー	菌濃度の種類	菌濃度	試験試料総数	同一試料での繰返し試験数		繰返しを考えた試験総数
					参照法	代替法	
5	1(One food product という表記)	5 濃度が望ましいが、最低3以上	L0(ネガコン)	5	6	6	<del>300</del> 60
			L1(検出閾値)	5	6	6	<del>300</del> 60
			L2(検出閾値のすぐ上)	5	6	6	<del>300</del> 60
			L3(L2の3倍以上)	5	6	6	<del>300</del> 60
			L4(L3の3倍以上)	5	6	6	<del>300</del> 60
		4 濃度で実施する場合	L0(ネガコン)	5	6	6	<del>240</del> 60
			L1(検出閾値)	5	6	6	<del>240</del> 60
			L2(検出閾値のすぐ上)	5	6	6	<del>240</del> 60
			L3(L2の3倍以上)	5	6	6	<del>240</del> 60

包含性のためには、定性試験では標的菌を含む 50 種類(サルモネラの場合は 30 種類)の菌株で確かめることを要請している(表-4)。50 菌株は、選び方の指針が示されているだけで、具体的な菌名が指定されているわけではない。実際に使用する菌株の種類を選定するのは実施者であり、適切な種類の菌株を選定するためには、当該の試験法に関する十分な知識や経験が必須となる。このことは、排他性のための非標的菌 30 種類の選定に関しても言えることである。包含性と排他性は、食品マトリックスを含まない、純粋な菌液を用いて行われる試験である。

### 2.2.2 複数の試験室で行う妥当性確認

コラボスタディ(Collaborative study; CS)は、ISO16140 では 10 カ所以上の試験室で行う。食品 1 種と標的菌 1 種の組合せで試験を行う。自然汚染食品を優先する考え方は SLV と同じであるが、CS では細菌を人為的に添加した食品を使うことも可能としている。但し、添加菌が十分均一に分布していることを確認すること、としている。

SLV では菌濃度レベルが 1 種類(陽性率が 50 %程度になるように設定することと規定)であったが、CS では菌濃度は 3 段階(2 レベル(L1, L2)+ブランク(L0))であり、各段階で繰返し数は 8(AOAC では 6)である。したがって、試験総数は、10 ラボの場合、(8 又は 6)×3(レベル)×10(ラボ)×2(参照法と代替法)=480 又は 360 となる。

相対特異性、相対感度については表-5 に従って算出する。一方、相対精確さについては、各レベル、あるいは全レベル合計での結果を表-1 と同様にまとめ、算出する。全レベル合計での相対精確さは次のようになる。

表-4 標的菌と非標的菌の選択基準

評価項目	試験すべき菌の種類の数	検出対象としたい菌のカテゴリーと、その場合の菌種の選び方	食品の種類	菌の濃度	
包含性試験	標的菌 50( <i>Salmonella</i> の場合は 30)	ある科(Family, ex. <i>Enterobacteriaceae</i> )に対する検出法	食品は 含まず	相対検出レベル (最低検出レベル)の 10 ~ 100 倍高い濃度	
		ある属(Genus, ex. <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Listeria</i> )に対する検出法			その科に属する属の範囲から 50 株。代表的な属を含むように。
		ある種(Species, ex. <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> )に対する検出法			その属に属する種の範囲から 50 株。可能なら、その属のすべての種を含むように。
	1(特に記載はないが)	特定の株に対する検出法			その株。
排他性試験	非標的菌 30	ある科(Family, ex. <i>Enterobacteriaceae</i> )に対する検出法	食品は 含まず	予想される最大 汚染レベル	
		ある属(Genus, ex. <i>Salmonella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Listeria</i> )に対する検出法			その科に属する複数の株を含まなければならない。
		ある種(Species, ex. <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> )に対する検出法			その属に似ている属の株を含まなければならない。
		特定の株に対する検出法			同じ属内の他の種の株を含まなければならない。
		特定の株に対する検出法		同じ種の他の株を含まなければならない。	

表-5 CSによる相対特異性, 相対感度の評価式

	L <sub>0</sub> (ネガコン)		L <sub>1</sub> (検出レベルよりわずかに高い濃度)		L <sub>2</sub> (L <sub>1</sub> の約10倍)	
	参照法	代替法	参照法	代替法	参照法	代替法
試験室1						
試験室2			(繰返し数8のうち, 陽性となった回数を記入)			
試験室3						
etc.						
陽性数の合計	FP <sub>R</sub>	FP <sub>A</sub>	TP <sub>1R</sub>	TP <sub>1A</sub>	TP <sub>2R</sub>	TP <sub>2A</sub>
総数	N <sub>0R</sub>	N <sub>0A</sub>	N <sub>1R</sub>	N <sub>1A</sub>	N <sub>2R</sub>	N <sub>2A</sub>

FP<sub>R</sub>, FP<sub>A</sub>は偽陽性の数なので

$$SP_R = (1 - (FP_R / N_{0R})) \times 100 \%, \quad SP_A = (1 - (FP_A / N_{0A})) \times 100 \%$$

TP<sub>1R</sub>, TP<sub>1A</sub>, TP<sub>2R</sub>, TP<sub>2A</sub>は真の陽性数なので, 各レベル, 各試験法の相対感度は

$$SE_{R1} = TP_{1R} / N_{1R} \times 100 \%, \quad SE_{R2} = TP_{2R} / N_{2R} \times 100 \%,$$

$$SE_{A1} = TP_{1A} / N_{1A} \times 100 \%, \quad SE_{A2} = TP_{2A} / N_{2A} \times 100 \%$$

$$AC = (PA + NA) / N \times 100\%$$

但し, PA = L<sub>0</sub>, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>で, 参照法と代替法で同時に陽性となった数  
 NA = L<sub>0</sub>, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>で, 参照法と代替法で同時に陰性となった数  
 PD = L<sub>0</sub>, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>で, 参照法で陰性, 代替法で陽性となった数  
 ND = L<sub>0</sub>, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>で, 参照法で陽性, 代替法で陰性となった数  
 N<sub>-</sub> = PA + ND, N<sub>+</sub> = NA + PD, N = N<sub>-</sub> + N<sub>+</sub>

## 2.3 定量試験

微生物の定量試験では, 平板培地上に形成された集落数を計数する方法と, Most probable number method(MPN法)により菌数を確率的に推定する方法がある。MPN法は, 対象となる食品中に菌数が低い場合に, 確率論的に推定する方法である。平板培地を用いる方法では, 平板当たりの計数する集落は多すぎても少なすぎても信頼性が低い。ISO 16140では, コロニー数300以下のもののみ採用し, これに希釈率をかけて, 元の試料の菌数を算出するように規定している。少ない方の制限はしていないが, ISO 4833:2003のように, 15コロニー以下は採用しないとしている場合もある<sup>3)</sup>。国内の告示法の規定では, コロニー数30~300を計数し, これより少ない場合は“以下”と注釈を付けて計数する。集落数を対数変換して, 統計学的評価を行う。

### 2.3.1 単一試験室妥当性確認

#### (1) 直線性と適用菌数範囲

SLVにおける解析は, 繰返し試験結果から求められる併行精度に基づいて行われる(図-1参照)。標準菌株の希釈した系列を用いて, 直接的に直線性を証明するのが基本である。しかし, 食品成分や他の微生物菌叢が共存すると試験法の直線性が阻害される可能性がある。したがって, 対象となる試料の物理化学的性質に加えて, 微生物学的性質も考慮する必要がある。具体的には, 標的菌1種を選び, これを含む食品を試料とする。自然汚染食品が第一優先であるが, それが入りしがない場合は菌添加食品を用いる。菌濃度は5段階で, 検出限界(Limit of Detection; LOD)を基準として, 最大濃度をLODの3倍, 10倍, あるいは100倍などに設定する。そのうえでブランク(濃度0)と最大濃度の間を等分する。表-6に具体的な濃度設定例を示す。各濃度は2回以上(5~10を推奨)繰返し測定する。

例えば, 5段階の菌濃度(i = 1~q, q = 5)で調製した試験試料から, 各々4個ずつ(j = 1~n, n = 4)のサブ試験試料を調製し, 各サブ試験試料について, 参照法と代替法で測定する。参照法と代替法が同様の10倍希釈系列で測定する場合は, 各希釈試料の段階で参照法用と代替法用に2分割してよい。その希釈試料について参照法及び代替法で各々2個のディッシュで計数値を求める。一連の希釈系列の測定から, 菌数の測定値 y<sub>ij</sub>, x<sub>ij</sub>(i = 1~q, j = 1~n, N = qn = 20組)を得る。但し, 参照法に

表-6 定量分析における濃度レベル

細菌濃度 レベル	具体的な濃度の設定例				サブ検体数 (n)/菌濃 度	サブ検体の 10倍希釈繰 返し数(m)	試験総数・食品 カテゴリー
	狭い濃度範囲で線形目盛			広濃度範囲で対数 目盛			
	最大値2× LODの場合	最大値10× LODの場合	最大値100× LODの場合				
0 (ネガコン)	0	0	0	最大値 500×LOD の場合 2.70 + Log(LOD)	2以上, 5~ 10を推奨	特に規定なし	10以上(25~50 推奨)×m×4デ イッシュ(参照 法2+代替法2)
中間値1	0.5×LOD	2.5×LOD	25×LOD	Log(LOD)			
中央値	1.0×LOD	5×LOD	50×LOD	0.68 + Log(LOD)			
中間値2	1.5×LOD	7.5×LOD	75×LOD	1.35 + Log(LOD)			
最大値	2.0×LOD	10×LOD	100×LOD	2.02 + Log(LOD)			

よる測定結果を  $x_{ij}$ , 代替法による測定結果を  $y_{ij}$  とする。これを  $xy$  平面上にプロットすると、濃度ごとに  $n$  個ずつのデータがかたまっプロットされるはずである。図から直接判断して外れ値を除くように規定しているが、その判断は難しい。外れ値となった原因が分かれば除いてよいが、そうでない場合は除いてはいけない。外れ値検定の後、直線性試験(linearity test)を行い、適用菌数範囲を示す。

直線性試験とは、最小二乗法等により直線近似式  $y = a + bx$  を得た後、「原点を通り傾きが1」が成り立つかどうかを調べることである。その解析過程の概要を図-1に示す。最終的には、直線近似

①菌濃度ごとの平均値:  $\bar{x}_i = (1/n) \sum_{j=1}^n x_{ij}$ ,  $\bar{y}_i = (1/n) \sum_{j=1}^n y_{ij}$

②菌濃度ごとの併行標準偏差:  $s_{x_i} = (V_{x_i})^{1/2}$  但し  $V_{x_i} = (1/(n-1)) \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$   
 $s_{y_i} = (V_{y_i})^{1/2}$  但し  $V_{y_i} = (1/(n-1)) \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$

③全体での併行標準偏差:  $s_r(x) = (V_{R_x})^{1/2}$  但し  $V_{R_x} = (1/q) \sum_{i=1}^q V_{x_i}$  (濃度内分散)  
 $s_r(y) = (V_{R_y})^{1/2}$  但し  $V_{R_y} = (1/q) \sum_{i=1}^q V_{y_i}$  (濃度内分散)

④全体での平均値:  $\bar{x} = (1/q) \sum_{i=1}^q \bar{x}_i$ ,  $\bar{y} = (1/q) \sum_{i=1}^q \bar{y}_i$

⑤参照法と代替法での併行標準偏差の比較:  $R = s_r(y) / s_r(x)$   
 $R > 2$ ならばそのまま,  $R < 1/2$ ならば  $x$  と  $y$  を入れ換えて同様に最小二乗法による直線近似,  
 $2 > R > 1/2$ ならば, 直交線形回帰法による直線近似を行う。

⑥  $R > 2$ の場合について説明を進める。  
 菌濃度間の標準偏差:  $s_x = (V_x)^{1/2}$  但し  $V_x = (n/(N-1)) \sum_{i=1}^q (\bar{x}_i - \bar{x})^2$   
 $s_y = (V_y)^{1/2}$  但し  $V_y = (1/(N-1)) \sum_{i=1}^q \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y})^2$

⑦  $x$  と  $y$  の相関係数:  $r = V_{xy} / (V_x \cdot V_y)^{1/2}$  但し  $V_{xy} = (1/(N-1)) \sum_{i=1}^q \sum_{j=1}^n (\bar{x}_i - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})$

⑧以上より,  $y = a + bx$  の直線で,  $b = V_{xy} / V_x = r(s_y / s_x)$ ,  $a = \bar{y} - b\bar{x}$

⑨各測定点が、求めた近似直線の周りにどの程度ばらついているか、の指標、残余標準偏差:  
 $s_{y \cdot x} = \left\{ \sum_{k=1}^N (y_k - Y_k)^2 / (N-2) \right\}^{1/2}$ ,  $K = 1 \sim N$  但し、測定点  $(x_k, y_k)$  に対して、 $(x_k, Y_k)$  は近似直線上の点。  
 また、直線を決めるために最低2点は必要なので、この場合の自由度は  $N-2$  となる。

⑩傾き  $b$  と  $y$  切片  $a$  の標準偏差:  $s_a = s_{y \cdot x} \left\{ (1/N) + \bar{x}^2 / ((N-1)V_x) \right\}^{1/2}$ ,  $s_b = s_{y \cdot x} / ((N-1)V_x)^{1/2}$

⑪スチューデントの  $t$  分布表で、自由度  $N-2$ 、両側  $\alpha = 5\%$  の  $t$  値を求める。 $a = 0$ ,  $b = 1$  となる確率が  $95\%$  以内であれば参照法と代替法は同等と判定する。

図-1 直線性解析過程の概要

第1節 妥当性確認の要求事項とその実際

式の周りに各測定点がどの程度ばらついているか、の指標として  $a$  及び  $b$  の標準偏差を求める。その結果、自由度  $N - 2$  で 95 % の確率で  $a = 0$ ,  $b = 1$  となれば、参照法と代替法は同等であると判定される。そのような条件が満たされなかった場合は統計学者の助けを得たほうがよさそうである。

## (2) 検出限界と定量限界

バックグラウンドノイズ、あるいはブランク値は、最低 6 個(推奨 10 個)のブランク試料の測定値から“広がり(spread)”を算出し  $s_0$  と表記する。濃度の特定はできないが、確かに存在すると検出できる最低濃度を臨界値(critical level; LC)と言う。その条件では擬陰性率は 50 % 程度である。しかし、濃度を下げても何も測定されないことがあるので、その場合は、しばしば、直線性試験の過程で求めた  $y$  切片  $a$  の標準偏差、 $s_a$  を用いて、 $1.645s_a$  を LC の第一近似値とする。LC より高濃度で陽性率が 95 % 程度となる濃度が検出限界(detection limit; LOD)である。 $s_0$  が得られている場合は、例えば  $LOD = (\text{ブランク平均値}) + 3.3s_0$  とする。検出できるだけでなく、具体的な濃度が決められる最低濃度を定量限界(quantification limit; LOQ)と言う。AOAC では  $LOQ = 10s_0$  としている。

## (3) 相対感度

定量試験における感度とは、参照法と代替法の値が、著しくは違わないことを確認するための指標であり、その差が 30 % 以内であればよしとする。相対感度(relative sensitivity)は、参照法で測定できる濃度範囲で濃度を変化させたとき、代替法が、その変化をどの程度、感度よく測定できるか、という指標である。

## (4) 特異性、包含性、排他性

特異性(specificity)とは、多成分試料の試験で、測定対象以外の成分から受ける影響に関するもので、具体的には、食品マトリックスなどの影響を受けずに、標的菌を精確に測定できる性能のことである。これに対して選択性(selectivity)とは、非標的菌の影響を受けずに標的菌を精確に測定できる性能と定義されており、これを調べるために行う試験が、包含性試験と排他性試験である。包含性のためには 30 種類以上の菌株、排他性のためには 20 種類以上の菌株で調べるように規定されている。しかし、この場合も、具体的な菌名は指定されていない。なお、特異性と選択性の使い分けは、上の場合と逆の場合もあるようである。

## 2.3.2 複数の試験室で行う妥当性確認

8 カ所以上の試験室で実施するよう規定されている。適当な食品マトリックスを 1 種類選定する。自然汚染食品の使用が推奨されているが、入手が困難な場合は菌添加食品で行ってもよい。菌濃度は、3 段階(低、中間、高)以上と非添加(ネガコン)、同一濃度の試料は各 4 個調製する。CS に参加する試験所数の試料をすべて調製し、各試験室に送る 4 個の試料には、2 個は参照法用、2 個は代替法用と表示しておく。

各試験室の試験結果は、 $(x_{ijk}, y_{ijk})$ ,  $i = 1 \sim n$ ,  $j = 1 \sim q$ ,  $k = 1 \sim L$  として得られる。但し、 $n$ ,  $q$ ,  $L$  は各々、繰返し数、菌濃度の種類、試験室数。これから、例えば菌濃度  $j$  ごとに解析する。外れ値検定の後、参照法及び代替法における併行標準偏差  $s_{R,ref}$ ,  $s_{R,alt}$  を求め、 $F = (s_{R,alt}/s_{R,ref})^2$  の値を求める。一方、95% で両者の併行精度が等しいかどうかの判定をするために、 $F$  分布表から  $F_{0.05;L-1;L-1}$  の値を求める。もし、 $F > F_{0.05;L-1;L-1}$  であれば、両試験法の併行精度は異なると判定される。

室間再現標準偏差に関しては、菌濃度  $j$  に対して、参照法及び代替法における  $s_{R,ref} = (s_{r,ref}^2 + s_{L,ref}^2)^{1/2}$ ,  $s_{R,alt} = (s_{r,alt}^2 + s_{L,alt}^2)^{1/2}$  を求め、 $F = (s_{R,alt}/s_{R,ref})^2$  の値を求める。一方、95% で両者の室間再現性が等しいかどうかの判定をするために、 $F$  分布表から  $F_{0.05;L-1;L-1}$  の値を求める。もし、 $F > F_{0.05;L-1;L-1}$  であれば、両試験法の室間再現性は異なると判定される。

同様にして、他の菌濃度に対する併行標準偏差、室間再現標準偏差についても、参照法との比較をする。なお、ISO 16140 では、外れ値検定を行わないロバスト法を紹介している。具体的には、通常の解析法における平均値に対応する「メジアン」を求め、これを基準とした室間再現標準偏差  $s_R$ , および相対室間再現標準偏差  $RSD_R$  を求める方法が示されている。

## 2.4 おわりに

上述のように、参照法を基準として代替法を評価する場合は、妥当性の判定基準を示すことが可能であるが、適当な参照法が得られないか、新規の参照法を開発した場合のバリデーションでは、最終段階の評価指標が決まっていない。この点が、今後の大きな課題である。

[五十君静信/松岡英明]

### 文 献

- 1) ISO16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods. ISO (2003).
- 2) AOAC INTERNATIONAL, Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. in Official Methods of Analysis, 18th edition (2005).
- 3) BS EN ISO 4833:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Colony-count technique at 30 degrees C. ISO (2003)

**最新版**

# 食品分析法の妥当性確認 ハンドブック

編集委員長 安井 明美  
編集委員 五十君静信 後藤 哲久 丹野 憲二 湯川剛一郎



第 1 節

微生物試験法の妥当性確認と不確かさの推定

## はじめに

微生物試験法は、標的菌の有無を判定するための定性試験と、菌濃度を測定する定量試験に大別される。いずれの試験法でも、新規に提案、開発された場合、それが安心して利用されるためには、十分妥当性確認(バリデーション)がなされていなければならない。バリデーションは次の段階を経て行う。

- ① プロトコルの作成
- ② 開発者自身による確認試験
- ③ 単一の試験室によるバリデーション(Single Laboratory Validatuon; SLV)
- ④ 複数の試験室によるコラボスタディ(Collaborative Study; CS)
- ⑤ 試験成績の報告

新規試験法の場合は、バリデーションに際して適当な標準法を参照法(Reference method)として比較試験を行う必要がある。国際的に通用するバリデーションのためには、国際的に認知された参照法でなければならない。もし、国内法でそのような参照法があれば好都合であるが、なければ、ISO法あるいはAOAC法など、すでにバリデーションがなされた試験法を選ぶ。参照法に対する比較試験によってバリデーションする方法を規定した規格がISO 16140<sup>1)</sup>である。③及び④に伴う定性試験及び定量試験の具体的方法については、本書第2章第1節I「妥当性確認の要求事項」を参照願いたい。ISO 16140及びCSに関しては、AOACのガイド<sup>2)</sup>に準拠した内容となっている。最後に⑤で妥当性を判断するための具体的数値が示される。

ところで、一見同じような手続きで、同じような数値を扱っているが、不確かさの推定はまったく異なる観点で行われる。妥当性確認では、試験結果のばらつきができるだけ少なくなるように留意して試験が実施されるのに対して、不確かさの推定では、該試験法がどのような要因で、最大どの程度のばらつきを生じるかを見積ることが目的であるから、できるだけばらつきの要因が反映されるように実施される。

化学分析法に比べ、微生物試験法では妥当性の最終判断の基準となる数値が整備されていない。したがって、その数値をめぐる議論も極めて厄介である。そして、その議論を進める際に、現在では不確かさの議論は避けて通れない。そこで以下においては、微生物試験法における不確かさの推定に関する議論の動向について解説する。

## 1. GUMの不確かさの定義

1993年にISOを含む7つの国際機関の名前で出版された「計測における不確かさの表現のガイド」(Guide to the expression of uncertainty in measurement; GUM)は「不確かさ」を次のように定義した<sup>3)</sup>。すなわち「測定の結果に付随した、合理的に測定量に結び付けることができる値の、ばらつきを特徴付けるパラメーター」である。具体的には「標準偏差」あるいは「信頼性区間」などに相当する数値であるが、さらに詳しく言えば、一つの分析法に対して

- ① よくバリデーションされた手順(Protocol)で
- ② よく訓練された(Proficient)試験者によって
- ③ よく整備された(Accredited)試験所で

実施された分析結果が最大どの程度変動するかの推定値を指す。重要なことは、その分析法の固有の特性の一つであり、新しい分析法に対して求めるべき値であり、すでに確立した分析法の適用事例における評価指標ではない、ということである。

しかし、不確かさを推定する具体的方法は、新規の試験法のバリデーションと何ら変わらない。違いは、バリデーションでは、結果の合否判定をしなければならないが、不確かさの推定においては、推定結果が何らかの合否判定に直結しているわけではないということである。

## 2. 統計的方法としての GUM の特徴

2010年6月5日、東京農工大学で行われた AOAC インターナショナル日本セッション 2010 シンポジウムで、統計数理研究所の椿広計教授によって、GUM の成立過程や、その統計的方法としての特徴の解説がなされた。それによると、特徴は3点挙げられると言う。すなわち、①測定・分析における「真値」概念を排除し、そこから派生する「かたより(バイアス)」という概念をすべて不確かさという分散成分に置き換えたこと、②その不確かさを評価するために、分析・測定のプロセスを明示することを要求したこと、③統計的実験に基づかない、エキスパート・オピニオンによる主観的評価を導入したこと、となる。

不確かさの推定に関する文献を読むと、しばしば、フィッシュボーンと通称される「要因分析図」が示されているが、その理由は上記の②によるものである。しかし、すべての要因について不確かさを推定できるとは限らない。それでも、常に試験法全体を俯瞰して、その弱点を理解しながら実際の適用法を考えることは極めて重要である。一方、③のエキスパート・オピニオンは、科学的判断が難しく、定量的評価は不可能である。このような項目が入っていると、たとえ専門家の判断に従えばよいと言っても、試験を実施する際の具体的条件まで答えが得られるとは限らず、その場合、結局は自分自身の裁量で判断しなければならないということになる。その結果、背景や基本的な考え方がよく分からないために判断がつかず、当惑してしまうことになりかねない。

## 3. 微生物試験法における不確かさの要因の分析

近年、微生物試験法に関しても不確かさに関する論文や規格が出されるようになってきた。例えば、イギリス・ブリストル大学の Corry らは 2007 年に、微生物試験法における不確かさの要因について

表-1 微生物試験法における不確かさの要因分析例

作業項目 (大分類)	作業項目 (小分類)	変動の要因、変動の 実績	変動を少なくするために考慮すべき点		
			プロトコルの改良 (Method)	試験者の技量向上 (Proficiency)	装置や設備の改善 (Laboratory)
食品原体 (original material of bulk food) の収集	試験室まで輸 送する方法	保存・輸送温度	基本的には冷蔵である が、水産食品など冷凍 の場合もある。また冷 蔵の場合は温度指定を するかしないか、例え ば 4℃ 以下、あるいは 10℃ 以下と規定		
一次検体の調 製	部位の選択	検査すべき食品原体 から「代表的(repre- sentative)」な部位を 検体(test portion)と して採取する方法	一次検体は 25 g である が、元の食材の異なる 部位から採ったものを 合わせて 25 g と規定		
	ふき取り法	果実、野菜、生肉で、 重量当たりではなく、 表面積当たりの 菌叢の数で結果を示 す場合がある	綿棒でふき取る表面の 部位が偏らないよう に、部位を指定するガ イドラインを示す	ふき取る場所の選定 を試験者に任せる場 合は、その選択セン スに大きく依存	試料の形状データを 入力すれば、最適サ ンプリングポイント を座標として出力す るソフトの開発
	ふき取り条件		綿棒でのふき取り方法 (こする時間と方向、 こするときの圧力な ど)を詳細に規定	ふき取るときの圧力 は試験者の感覚に頼 らざるを得ない	位置決め機能付き自 動ふき取り装置の開 発

作業項目 (大分類)	作業項目 (小分類)	変動の要因, 変動の 実績	変動を少なくするために推奨される方法			
			プロトコルの改良 (Method)	試験者の技量向上 (Proficiency)	装置や設備の改善 (Laboratory)	
一次検体の調製	切り取り法	表面のスライス条件	生肉の場合は例えば深さ1~2mmを切り取る。切り取りの方が綿棒でのふき取りより菌回収率が高い	平滑でない固体試料表面を薄く均一に切り取る技術訓練	表面層を一定厚さで剥離するための道具(皮むき機のようなもの)の開発	
		不均一検体の切り取り条件	サンドイッチやパイに載せる材料などのように複数の成分が不均一に混ざっている食品では、一次検体の採取法が難しい			
サブサンプル (subsample) の調製	菌懸濁液試料 の調製	固体食材試料を希釈液、あるいは液体培地で混合した場合の均一化の程度	ストマッカー処理条件(時間, 強度)の最適化			
		牛乳, 液卵のような液体, 粘性液体を希釈した場合の均一化の程度	「泡立たないように穏やかに、かつ十分に振とうする <sup>*)</sup> 」とあるだけで十分か	技量というより、実験センスに依存するかもしれない	AOAC <sup>*)</sup> のように規定されていれば、それを実現する装置は製作可能	
	希釈系列の調製	オートクレーブ時の培地の水の蒸発 <sup>*)2</sup>	あらかじめ考慮			
		ピペッティングにおいて押し出す液量の誤差 <sup>*)3</sup>	規定することが可能			自動ピペッターの導入。但しピペット取り付け部分の汚染に注意が必要
		希釈段階ごとにピペットやチップを新しいものに交換しないと最大1 Log <sub>10</sub> (cfu/g)の誤差 <sup>*)4</sup>	希釈段階ごとにピペットやチップを新しいものに交換する			
		希釈の各段階での均一化が不十分	「希釈ごとによく攪拌する」というが「よく」だけでは決まらない			段階希釈、あるいは一度で任意の濃度に希釈する装置の開発
	ピペット先端からの吐出方法	チップ先端を容器の内壁に付けるか、あるいは希釈液に直接接触させるかによって結果に影響				
培地の調製		基本操作であるが、初心者と経験者で培地性能が異なる場合がある		培地調製とその希釈操作は「十分訓練された者」が行うべきである。しかし、培地調製のみでの技量認定はない		
		一度に大量の寒天培地を処理しようとして、オートクレーブで加熱しすぎると増殖にくい	寒天培地では200 mL, 液体培地では1,000 mLを上限(推奨) <sup>*)5</sup>			
		培地固有の注意事項を忘れる	例えば Violet red bile agar 培地では、使用直前にしか沸点以上に昇温してはいけない			