

図6 バイオプロラとブリード法による生乳中の計数比較

矢印：ブリード法計数での細菌数上限基準値

高い相関性が示された。

ブリード法による汚染乳の判断基準は、 10^6 個/ml以上かどうかであるが、本結果からバイオプロラを用いることで安定して、簡便に実施することが可能となることが示された³⁰⁾。

4. 非培養法の今後

微生物検出には、さまざまな手法や試薬が挙げられるが、それぞれ検出指標が異なる。例えば、培養法は、培養条件が一致した状態での微生物増殖能力を検出指標としている手法であり、死菌を含む培養条件が一致していない微生物を培養法で検出することはできない。一方、非培養法は試薬により、表1に示すようにさまざまな指標を検出することができる。つまり、培養法と非培養法とは指標が異なるため、必ずしも数値が一致する訳ではない。微生物検査には、それぞれの特徴を生かし、検体や現場、技量に合わせた手法を選択

する必要がある。また、非培養法を実使用するためには、非培養法検査で得られた微生物の個数に対し、どのようなリスクが発生するかを検討し、基準値を設定して行く必要がある。

非培養法は、培養法のように微生物の増殖に伴うコロニーの変化など、物理的变化を追うのではなく、微生物の構造や生理現象を直接可視化する手法であるため、微生物以外の生体由来物質など計測を妨害する物質の除去が正確な計測に求められる。つまり、非培養法と前処理技術はセット技術として検討する必要がある。前処理法の一例として生乳で挙げたような化学的薬剤処理が有効であったが、本手法は微生物活性に影響を与える。今後、密度勾配遠心分離法など、微生物の活性を維持したまま分離可能な手段により、分離後、非培養法検査を実施し、さらに細菌の特定を行なうなど、生きたまま回収することで得られる情報も重要になると考えられる。

バイオプロラ法では、計測の妨害となる食材

成分を効率的に除去することができ、その結果、培養法と良い相関を示す結果を得ることができた。しかし、食品中の微生物の計測の場合はもちろん、上記の微生物のみの試料の場合も、公認法として利用されるためにはバリデーションが不可欠である。非培養法についてのバリデーションは、培養法を基準としているため、非常に厄介であるが、それをブレイクスルーするための準備が、わが国においても着実に進められている。

参考文献

- 1) LeChevallier MW, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (5): 922-30 (1980)
- 2) Gilchrist JE, et al.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60 (4): 807-12 (1977)
- 3) Fagerlund A, et al.: *BMC Microbiol.* 21; 7: 43 (2007)
- 4) Gibbs RA, et al.: *Letters in Appl. Microbiol.* 6 (2): 19-21 (1988)
- 5) Reasoner DJ, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1): 1-7 (1985)
- 6) Besnard V, et al.: *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (1): 77-81 (2000)
- 7) Ordax M, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (5): 3482-8 (2006)
- 8) Wong HC, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 233 (2): 269-75 (2004)
- 9) Ikeda T, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (5): 2793-5 (2005)
- 10) Satoh T, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (6): 1216-20 (2004)
- 11) Rapposch S, et al.: *J. Dairy Sci.* 83 (12): 2753-8 (2000)
- 12) Nishimura M, et al.: *Fisheries Science.* 74: 405-410 (2008)
- 13) Alam M, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 6; 104 (45): 17801-6 (2007)
- 14) Shimakita T, et al.: *J. Food Prot.* 69 (1): 170-6 (2006)
- 15) Nishimura M, et al.: *Fisheries Science.* 72: 723-727 (2006)
- 16) Shimakita T, et al.: *Ther. Aphe. Dialysis.* 11 (5): 363-369 (2007)
- 17) Wen K, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (7): 3862-7 (2004)
- 18) Giglio S, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (12): 8944-8 (2005)
- 19) Paulsen P, et al.: *J. Food Prot.* 71 (2): 376-9 (2008)
- 20) Pan Y, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (24): 8028-31 (2007)
- 21) Moussa M, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (20): 6508-18 (2007)
- 22) Franklin DJ, et al.: *Proc. Biol. Sci.* 271 (1553): 2099-107 (2004)
- 23) Korepanov AP, et al.: *J. Mol. Biol.* 2; 366 (4): 1199-208 (2007)
- 24) Fuller ME, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (3): 1680-7 (2004)
- 25) Yoshioka K, et al.: *Biochim. Biophys. Acta.* 9; 1289 (1): 5-9 (1996)
- 26) Yoshioka K, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (11): 1899-901 (1996)
- 27) Matsuoka H, et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (11): 2459-62 (2003)
- 28) Yamada K, et al.: *Nat. Prot.* 2 (3), 753-762 (2007)
- 29) Breed RS, et al.: *Am J Public Health Nations Health.* 33 (5): 580. (1943)
- 30) Arai I, et al.: *Milk Science.* 55 (1): 31-36 (2006)

食肉・食品・調理機器のことなら

アイディー技研へ

<http://www.idey-giken.co.jp>
E-mail: info@idey-giken.co.jp



アイディー技研株式会社

〒661-0961 兵庫県尼崎市戸ノ内町6-6-17
TEL.06(6498)0018 FAX.06(6498)0089

食品産業戦略研究所主催セミナー

微生物試験法の妥当性確認の進め方
～ 食品検査担当者の悩みに応える ～

微生物試験法の妥当性確認と不確かさの推定

2011年3月10日

松岡 英明

東京農工大学 大学院工学研究院
生命機能科学部門

1

妥当性確認とは？

- ・「科学的な精確さ」を追究することが目的ではない。
- ・関係者が合意した方法に基づく手続き。
- ・関係者の承認を得るための手続き。
- ・利用者が利用者自身のために創案し、また改変すべきもの。
- ・「標準」法、「参照法」として何を基準にするか、が大問題！

2

バリデーションされた方法とは

国内では...

- ・厚生省からの通知文書
検査の現場では「公定法」あるいは「標準法」と理解
- ・食品衛生検査指針(微生物編)
(厚生労働省 監修、日本食品衛生協会、(2004))
バリデーションされた方法も掲載されているが、参考書

海外では...

- 米 国 : FDA BAM (Food & Drug Administration Bacteriological Analytical Manual) Methods
- フランス: AFNOR (Association Française de Normalisation)
- カナダ: Health Canada
- スウェーデン: NORDVAL (Nordic System of Validation of Alternative Microbiological Methods)
- 英 国 : EMMAS (European Microbiological Methods Assessment Scheme)
- 国際的 : AOAC, ISO, CODEX

3

AOACのバリデーション

- (1) Official Methods of Analysis (OMA)
 - ・最高の信頼性、最低12ヶ月
 - ・ラボ実施試験所の数
(定量試験法では8以上、定性試験法では10以上)
 - ・ラボ実施費用が高額
- (2) Performance Tested Methods (PTM)
 - ・迅速なバリデーション(6ヶ月以内)、信頼性のグレードはOMAより低い
 - ・特定企業の占有の試験法(Proprietary methods)にも適用
 - ・AOAC Research Instituteが業務を実施
 - ・試験法をチェックする提案者以外の独立したラボの数 1
 - ・申し込み費用(Application fee) 21,000 \$

4

ISO16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs
— Protocol for the validation of alternative methods.

(食品及び飼料中の微生物一代替法の妥当性確認のプロトコル)

【定性試験】

- 【SLV】
- 1. 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)
- 2. 相対精確さ(Relative accuracy; AC)、相対特異性(Relative specificity; SP)、相対感度(Relative sensitivity; SE)
- 3. 相対検出レベル(Relative detection level)
- 4. 包含性(Inclusivity)と排他性(Exclusivity)

【CS】

- 1. 10ラボ、
- 2. 食品1種と標的菌1種の組み合わせ
- 3. 菌濃度は3(2レベル(L1, L2) + ブランク(L0))であり、各レベルで繰り返し数は8
- 4. 相対精確さ、相対特異性、相対感度

5

ISO16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs
— Protocol for the validation of alternative methods.

【定量試験】

- 【CLV】
- 1. 菌濃度は5レベル、繰返し数は各レベルで2以上5~10推奨
- 2. 直線性(Linearity) → 併行標準偏差
- 3. 検出限界(Detection limit; LOD)と定量限界(Quantification limit; LOQ)
- 4. 特異性(specificity)、包含性、排他性

【CS】

- 1. 8ラボ、食品1種と標的菌1種の組み合わせ
- 2. 菌濃度は3レベル(低、中間、高)以上 + ネガコン。繰返し4(ただし参照法と新規試験法とで2倍ずつ測定)
- 3. 併行標準偏差、空間再現標準偏差、相対空間再現標準偏差

6

不確かさ(Uncertainty)とは？

一つの分析法に対して、

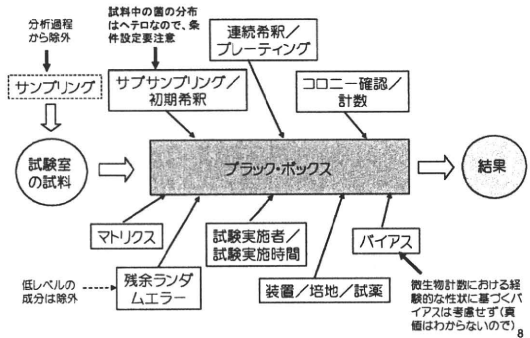
- よくバリデーションされた手順で
- よく訓練された試験者によって
- よく整備された試験所で

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

その分析法の固有の特性の一つで、新しい分析法に対して、求めるべき値であり、既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。

7

ISO の取り組み-ISO/TS 19036 不確かさの主要因チャート



8

「標準不確かさ」と「合成不確かさ」

1. 不確かさの要因は複数ある
2. 個々の要因について不確かさを推定(標準不確かさ)←その要因についての標準偏差、信頼性区間
3. 不確かさの合成(合成不確かさ)←標準偏差を合成し、空間再現精度に対する標準偏差として算出

合成の例:

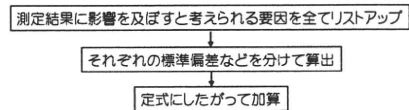
$$s_R = \sqrt{\frac{s_r^2}{n_r} + \frac{s_a^2}{n_a} + \frac{s_l^2}{n_l}}$$

- n_r : 試料数、 n_a : 試験実施者数、 n_l : 試験室数
- s_r : 試料を変化させて得た結果の標準偏差
- s_a : 試験実施者を変化させて得た結果の標準偏差
- s_l : 試験室を変化させて得た結果の標準偏差

9

ボトムアップとトップダウン

ボトムアップ



トップダウン

バリデーションされた試験法と管理試料による分析値の標準偏差

10

室内試験データ数と空間試験における 試験室数とのバランス(ISO 5725-1)(1/2)

推定された標準偏差(s)と真の標準偏差(σ)の乖離の程度:
 $P[-A < (s - \sigma) / \sigma < +A] = P$
 すなわち、(s-σ)/σが±A(%)以内にある確率がP。

P=95%となるようなAの値は、併行精度に対しては

$$A = A_r = 1.96 \sqrt{\frac{1}{2p(n-1)}}$$

空間再現精度に対しては

$$A = A_R = 1.96 \sqrt{\frac{p[1+n(\gamma^2-1)]^2+(n-1)(p-1)}{2\gamma^2 n^2 (p-1) p}}$$

A_r の式は試験室数(p)と1試験室1測定水準あたりの測定値の数(n)の関数。
 A_R では、p、nのほか、 $\sigma_R/\sigma = \gamma$ の関数。 σ_R 、 σ_L はそれぞれ空間再現標準偏差、併行標準偏差。 γ は未知数であるが、別途推定された値が付表に載っていて、これを利用する。

11

室内試験データ数と空間試験における 試験室数とのバランス(ISO 5725-1)(2/2)

例えば p=10、n=2、 $\gamma=1$ のときは $A_r=44\%$ 、 $A_R=32\%$ 。
 p=4、n=2、 $\gamma=1$ ならば、 $A_r=69\%$ 、 $A_R=53\%$

試験室数を減らせば、誤差の幅を大きくする。後者では空間再現標準偏差、併行標準偏差が、それらの真の値から50%以上逸脱していることがあり得る。

実際に共同試験を設計する場合に、試験室数をいくつにするかは、利用可能な人的、財政的、時間的などの資源と、不確かさのレベルを満足できる水準にまで下げたいという願望の間の妥協となる。

p>20であれば、試験室数が2、3増加しても、これらの推定値の不確かさは僅かしか減少しない。その結果、p=8-15の範囲で選択することが普通。

コラボの場合の試験室数は、根拠があるが、科学的には、例えば「10でなければならぬ」、ということはない。しかし、一旦規格で「10」と決めれば、実施に際しては「10」でなければならない。

12

外れ値検定と外れ値検定を行わないロバスト法

外れ値の検出と処理については、ISO TC69/WG3で議論されてきた。まだドラフトの段階であるが、ISO 16269 Statistical interpretation of data—Part 4: Detection and treatment of outliers. として出版予定。その中にも明記されているが、
 「外れ値が検出された場合、それが測定上のエラーによるものであれば修正するか、あるいは実際の値が分からなければ削除する。しかし、もし外れ値となった理由が説明できなければ、それは削除してはならず、有効なデータとして扱わなければならない。その後の解析は、外れ値の影響を余り強く受けないロバスト法によって行うこと」としている。
 そして、外れ値を除かずに解析するロバスト法、および外れ値を除くロバスト法について記載している。

13

Robustな解析法の例: ISO 16140:2003-6.3.4. Annex Q

1. バイアス推定のための、全体の中心値(global center):
 メジアン MED(平均値Mではなくて)
2. 反復試料の測定値の平均値のばらつきを推定値(空間再現性を含む): 帰納的メジアン(recursive median S_n)
 に基づく推定値 $s_R = \text{Robust } s_R = k_1 \times S_n$
 (S_n は次表より求められる)
3. 2反復試料の測定値の差の標準偏差から導かれる、併行再現精度の標準偏差: $k_2 \text{ MED}[s_{ij}]$. この値は、古典的な標準偏差ではなく、分散平均から求められる。

ここで、 $k_1=1.1926$ 、 $k_2=1.4826$ である。

標準物質

1. FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) for chemical and FEPAS (Food Examination Performance Assessment Scheme for Microbiological Proficiency Assessment) for microbiological
 - ・1990 英国農業水産食糧省 (Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food:MAFF)が開発し、中央科学研究所 (Central Science Laboratory: CSL) が運営
 - ・FAPASの典型例はオイル中の殺虫剤
 - ・65カ国の940試験所が参加。最大の国際的分析技量認定の仕組み。
2. 標準参照試料 (Standard Reference Materials)
 - ・米国のNational Institute of Standards and Technology (NIST)によって開発
 - ・ヒト血清、尿、食品マトリクス、動物組織、汚泥、植物マトリクス、大気中の微粒子、など自然のマトリクスに含まれる微量の無機、有機成分の濃度検定のため。
 - ・ベビーフード、機能性食品など人工的に調合したマトリクスの場合も何例は用意。
 - ・微生物を含む試料はない。

不確かさ推定の実際

- ・よくバリデーションされた手順で
- ・よく訓練された試験者によって
- ・よく整備された試験所で

この条件を可能な限り満たしても、変動をゼロにすることは難しい。例えば
 ・手順書で100%手順を規定することは難しい。例えば、試験者の手の動かし方や、間の取り方など。
 ・試験者の技量は一定のレベル以上ではあっても、同一とは言えない。
 ・試験所によって、設備の具体的機種や整備状況は同一とは言えない。
 これらの変動要因を勘案して上で、分析結果が、最大、どの程度変動するか？を推定する必要がある。

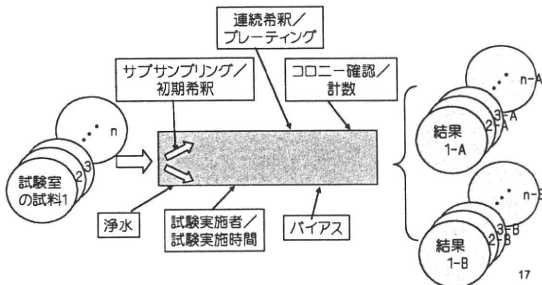
共同試験による評価がベスト。したがって、空間再現標準偏差 s_R を基準として、不確かさの推定値とするようになった。

しかし、ISOでは、単一試験室内で行う中間精度 (Intermediate Precision) の標準偏差の使用を第一優先としている (ISO/TS 19036)。恐らく、空間共同試験の実施を前提とする場合に比べ、試験条件の設計・実施がはるかに容易になるからであろう。

16

浄水中の汚染菌数の定量試験における不確かさの推定例1(1/4)

L.I. Forster: Measurement uncertainty in microbiology. J. AOAC INTERN. 86. 1089-1094 (2003).



17

まとめに代えて

1. 分析結果に「不確かさ」の推定値を付記することが要求されるようになったが、標準物質がない微生物試験では難しい。
2. 微生物試験では、不確かさの要因分析とその低減を図ることが、具体的目標。
3. 要因ごとに不確かさを求める試みがなされているが、例えばコロニーの定義が曖昧であるなど、得られた不確かさ推定値には、大きな不確かさが内在していて、一般性をいうことが難しい。
4. 具体的な数値としては、標準偏差 s_R 、あるいは相対標準偏差 s_R/mean などであるので、それを求める手順は妥当性確認と似ている。したがって確定したプロトコール、試験者の技量、試験室の設備の要件が満たされていることが前提。
5. 妥当性確認の場合と異なり、予想されるパラッキの要因が最大限考慮されるように、試験条件を振る。例えば、試験者や装置を変えるなど。
6. 拡張不確かさの値は、その試験法、あるいは要素技術の「ばらつき」の目安ではあるが、それによって「合否判定」が決まるわけではない。
7. 不確かさの要因の低減に向けた、科学的な考察、技術的改良は、継続して行っていることが重要。

18

第 77 回化学センサー研究会

(東京、2011 年 1 月 21 日)

食品微生物試験法のバリデーシヨンの国際動向

東京農工大学 大学院工学研究院 生命機能科学部門

松岡英明

事の発端は、微生物の迅速測定法の開発にあった。抗微生物活性を迅速に測定することが必要だ、との要請で菌糸先端が伸長していく速度を顕微鏡で自動測定するシステムの開発に取り組んだ。伸長する菌糸に薬剤を添加すると伸長が止まる。この速度変化を指標にすれば、抗微生物活性が 1-2 時間以内に定量的に評価できる。肉眼でコロニーを観察する従来法が何日もかかることを考えれば、素晴らしく迅速に結果が得られるわけで、直ちに実用化されるかも知れないと期待した。ところが、医薬メーカーや検査機関などで利用されることは全くなかった。その理由は、試験法のバリデーシオンがなされていなかったからであった。その問題に直面して、具体的な試験法のバリデーシオンに取り掛かる前に、バリデーシオンを実施している国際機関の活動に関わることとなった。その代表的な機関が AOAC である。1998 年の AOAC 日本セクション設立以来、そのバリデーシオンプログラムの理解と啓蒙の活動を続けている。本講演では、AOAC のバリデーシオンプログラムに代表される、国際的に認知されたバリデーシオンプログラムの具体的内容について概説する。

試験室内における繰返し試験データに基づく生菌数の不確かさの推定

○諸藤 圭¹⁾, 土屋 禎¹⁾, 田中廣行¹⁾, 工藤由起子²⁾

1) (財)日本食品分析センター, 2) 国立医薬品食品衛生研究所

【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。測定の不確かさを推定する手順としては, いくつかの方法が知られているが, 本研究ではトップダウン方式の一つである「試験室内における繰返し試験データに基づく不確かさの推定」により一般細菌数の不確かさを推定した。また, 一般細菌数の不確かさに係わる要因のうち, 「試料調製」及び「マトリックス(食品種)」が, 不確かさに及ぼす影響について考察した。

【方法】単独の試験室内において, 一般細菌数の繰返し試験(2回測定)を1品目ごとに, 実施日, 実施者, 使用機器, 使用培地のバッチなどを変動させて10回実施し, 得られた20データからISO/TS 19036:2006「Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations」を参考として不確かさを推定した。

また, 「試料調製」及び「マトリックス」に焦点を当てて不確かさを比較した。すなわち, 3方法で調製した固体試料について繰返し試験を実施し, 試料調製法ごとに推定された不確かさを比較した。次に, マトリックスが異なる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された不確かさを比較した。

【結果】一般細菌数の繰返し試験の結果に基づき, 包含係数を2として算出した拡張不確

かさ $[\log_{10}/g(ml)]$ は次の通りであった。

区分 (マトリックス)	品目	試料調製	拡張不確かさ $[\log_{10}/g(ml)]$
液体試料	紅茶飲料	—	0.17
	枯草菌芽胞液	—	0.18
粉体試料	そば粉	—	0.34
		粉碎処理	0.22
固体試料	鶏肉	細切処理	0.27
		未処理	0.36

【考察】

(1) 試料調製に係わる不確かさの比較

固体試料(鶏肉)を均質化するほど拡張不確かさは小さくなる傾向が確認され, 「未処理」と「粉碎処理」とでは約1.7倍異なっていた。このことから, 試料調製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。

(2) マトリックスに係わる不確かさの比較

液体試料の拡張不確かさが最も小さく, 同一マトリックスである液体試料2品目(紅茶飲料及び枯草菌芽胞液)の拡張不確かさは, ほぼ同様の値であった。

粉体試料(そば粉)の拡張不確かさは, 液体試料のほぼ2倍の値であり, 固体試料(鶏肉)は液体試料の1.2~2倍の値であった。このことから, 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。

現在, デソキシコーレイト寒天培地を用いた混釈平板培養法による大腸菌群数の測定について, 同様の推定方法により不確かさの推定を行っている。

食品分析において統計学はどこまで適用できるか

国立医薬品食品衛生研究所食品部 松田りえ子

分析法の評価あるいはサンプリングで使用される統計は、得られた数値は正規分布する母集団からランダムに採られたサンプルであることが、前提となっている。食品分析を含めて、現実に分析値を扱う場合には、この前提が成立しているのか不明な事も多いので、食品分析で遭遇する色々な量の分布について検証した。

分析値は正規分布するか？

同一と見なせる試料をくり返し分析して得た分析値の分布を考える。このような分析値は、分析法バリデーションあるいは内部精度管理で得られる。このような分析値は正規分布するという前提の基に、バリデーションおよび内部精度管理スキームは作られている。

正規性を検定する方法はいくつかあるが、バリデーションで得られるデータは10個程度であるので、少数データにも適用できるコルモゴロフ-スミルノフ検定を用いた。対象としたデータは、有機リン系農薬グループ分析法の妥当性評価結果である。有機リン系農薬10種類を5作物に添加し、1日2回併行を5日くり返し、10個のデータが得られた¹⁾。Fig.1は検定方法を図示している。曲線は標準正規分布の累積度数、●は10測定値を正規化した累積密度である。測定値が正規分布していれば、●は曲線の近くに位置する。●と曲線の距離の最大値が臨界値を超えた場合には、正規分布していないと見なされる。Fig.1の左側はエチオンの結果で正規分布と考えられたが、右のパラチオンは大きく外れた点があり正規分布とは認められなかった。

Table 1には10農薬の結果を示した。50セットのデータ中6セットが正規分布ではないとされた。HPLCを用いた食品添加物分析結果でも同程度の頻度で、正規分布ではないという検定結果が得られている。

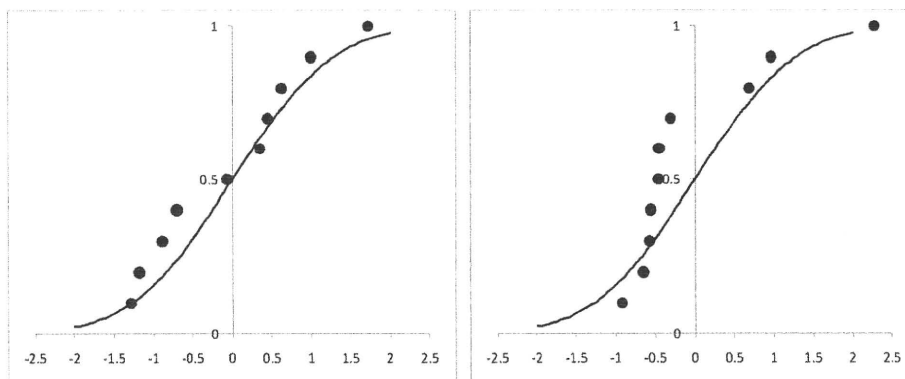


Fig.1 くり返し分析値の正規性検定

左 エチオン
右 パラチオン

	大豆	バレイショ	ホウレンソウ	キャベツ	リンゴ
エチオン	○	○	○	●	○
エトリンホス	○	○	○	○	○
クロルピリホス	○	○	○	○	○
クロルピリホスメチル	○	○	○	○	○
ダイアジノン	○	○	○	○	○
パラチオン	○	○	○	○	○
パラチオンメチル	○	○	●	○	●
フェントロチオン	○	○	●	○	○
フェンチオン	○	○	○	●	○
プロチオホス	○	○	○	●	○

Table 1 正規性検定結果

検定結果

○ 正規分布

● 正規分布ではない

GC や HPLC といった機器分析とは異なる原理に基づいて得られる測定値として, real-time PCR で得られる値の分布を調べた²⁾. real-time PCR では, DNA の増幅に伴って増加する蛍光強度がある値に達するまでのサイクル数である Ct 値が最初に得られる測定値である. さらに, 試料中のコピー数 (対数) と Ct 値の線型関係を利用した検量線を用いて, コピー数が算出される. さらに, 遺伝子組換え食品の検査では, 2つの遺伝子のコピー数の比から計算される混入率が最終的な定量結果である. このプロセスには, 蛍光強度の対数変換, 片対数検量線による変換, 分布する2つの量の割算, といった多くの変換が含まれている. これらの値はどのような分布を持つだろうか. 標準物質を試料とした15回のくり返し測定から得られた Ct 値の検定結果は80セット中7セットが正規分布ではなかった. Ct 値を変換したコピー数の分布は, 全て正規分布であった. さらに2つのコピー数の比である混入率の分布は, 40セット中35セットが正規分布とはならなかった. 一般に, 正規分布する確率変数の比は正規とはならないので, 最後の結果は予想されたが, 対数変換を含むコピー数は正規分布に近いという結果は興味深い.

PCR 法は原理的には対象となる DNA が1分子あれば測定可能である. 事実, 組換え食品の検査法で用いられる検量線の最下点は20コピーのプラスミド溶液である. 分析の対象となる分子の数が小さくなると, 別の要因で正規分布からの逸脱が起こる. PCR 装置のウェルに試料溶液を分注するときに, 1ウェルに入る DNA 分子数が3個である場合を考える. このような時, ウェルに入る分子数の平均は3の Poisson 分布となる. Fig.2 に示すように, この分布は非対称であり正規分布ではない.

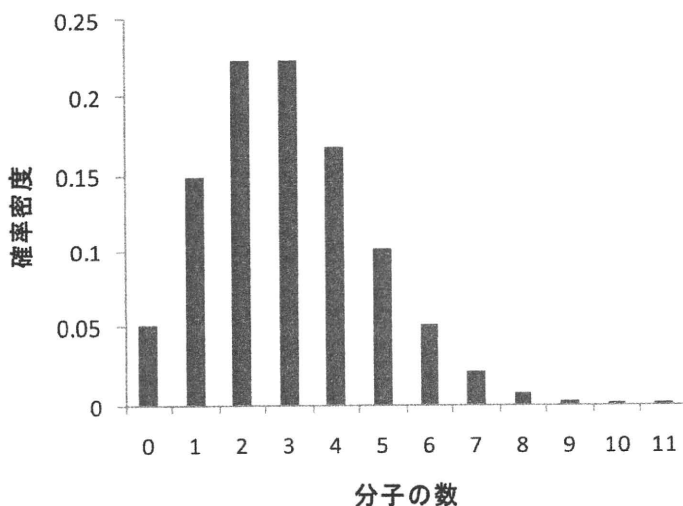


Fig.2 平均が3の poisson 分布

ロット内の分析対象濃度は正規分布するか?

この疑問はサンプリング計画につながる. 食品の規格適合判定のための検査では, ロットの平均値を規格値と比較する. ロットを代表するサンプルを採取し, 分析結果の期待値がロット平均となるようなサンプリング計画が求められる. Fig.3 は, 比較的狭い圃場から採取した白菜16個中に残留するエトフェンプロックス濃度の分布を示している. 極端に非対称であり, 検定するまでもなく正規分布ではない. このデータを収集した際には, 他の農薬と作物の組み合わせ3種も分析しているが, いずれも正規分布とはならず, また分布範囲も広い結果であった³⁾.

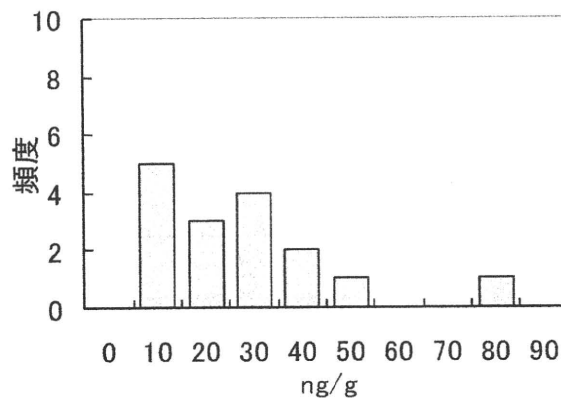


Fig.3 白菜中エトフェンプロックスの濃度分布

これらの例は正規分布ではないとはいえ、単一の分布であると思われ、多数のサンプルをランダムに採れば、その平均値の分布はサンプル数の増加に従い、徐々に正規分布に近づくと期待される。しかし、実際に流通する生鮮野菜では複数の圃場からの作物を集めて1つのロットとする可能性がある。このような場合、ロット内の場所により分析対象が異なる分布をすることになる。このようなロットからのサンプル平均値はどのように分布するだろうか。

Fig.4 はロット内に2つの正規分布がある場合で、分布 A の平均値は 0.5、分布 B の平均値は 2 とし、標準偏差はいずれの分布も 0.1 とした。左は 2 つの分布の割合が 5:5、右は 9:1 である。このようなロットから 5 個のサンプルを抜き取った時の平均値の分布が下段である。平均値は、複数の極大を持つ分布を示した。

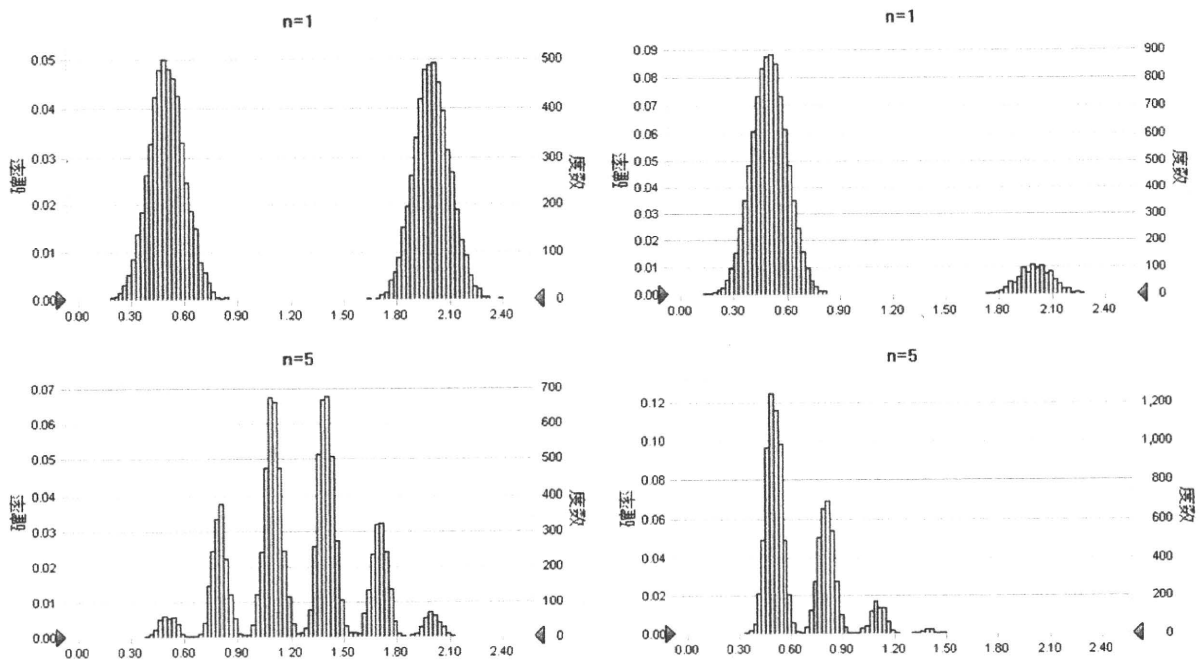


Fig.4 不均一分布からのサンプリング

検出限界ーブランク測定値は正規分布するか？

検出限界は、ブランク測定値の標準偏差の 3 倍と定義される。「分析対象がない」状態、つまりブランクから得られる確率が低い値がえられた状態が「検出した」とであるとされている。ブランク測定値が正規分布していることを前提として、平均値よりもブランク標準偏差の 3 倍大きい値が得られる確率はとても小さい (0.13%) から、このような値が得られたらブランクであることを否定し「検出した」とする定義である。ISO 11843 Capability of detection の定義では、さらに分析対象がある時にブランクと誤る確率も考慮しているが、いずれにしろ、ブランク測定値の標準偏差を用いている。

このような定義は統計的に非常に明快である。しかし、ブランク測定値は正規分布するだろうか。ISO 11843 Capability of detection の Part 1 では、ブランク (基底) 状態の応答変数 (信号) が分布している図が示されているが、実際にブランク試料を分析した場合には、例えばクロマトグラフィであればピークが認められず、得られる応答変数 (ピーク面積) は常に 0 となり分布しない。従ってブランク標準偏差も 0 であり、定義に従えば、検出限界もまた 0 となってしまう。これはあまりにも現実的ではない。

不確かさ

測定結果の不確かさは、ある確率以上で真値の存在する範囲の幅として表されている。しかし、測定値と真値の差である誤差、測定値の変動である分析精度、不確かさを混同して議論している場合も多く見られる。Fig.5 は精度と不確かさを概念的に示している。X 軸は分析対象の量、Y 軸は分析によって得られる定量値である。種々の濃度を含む試料をくり返し分析し、定量値の平均値と標準偏差を求める。濃度に対して、平均値±標準偏差をプロットすれば左の図が得られる。標準偏差は分析精度として評価される。

このようにして、性能が評価されていて定量値が分布する範囲が分かっている分析法を用いて、1つの定量値が得られたとする。定量値は分析対象量の推定値であるが、分析法による分布を持っている。従って、得られた定量値は真値ではない。真値は定量値の近傍にあり、その存在範囲は右の図の←→で示される。真値は実際にある1つの値であり、分布を持たない。不確かさで示されているのは、存在する確率である。

不確かさは真値の存在範囲の95%を含む拡張不確かさとして表されることが多く、標準不確かさの2倍とされている。これも、真値の存在する確率密度関数が正規であることを前提としている。しかし、不確かさの根拠となっている分析値の変動が正規分布に従っていない場合が多いとすれば、包含係数を2とするべきかは疑問である。

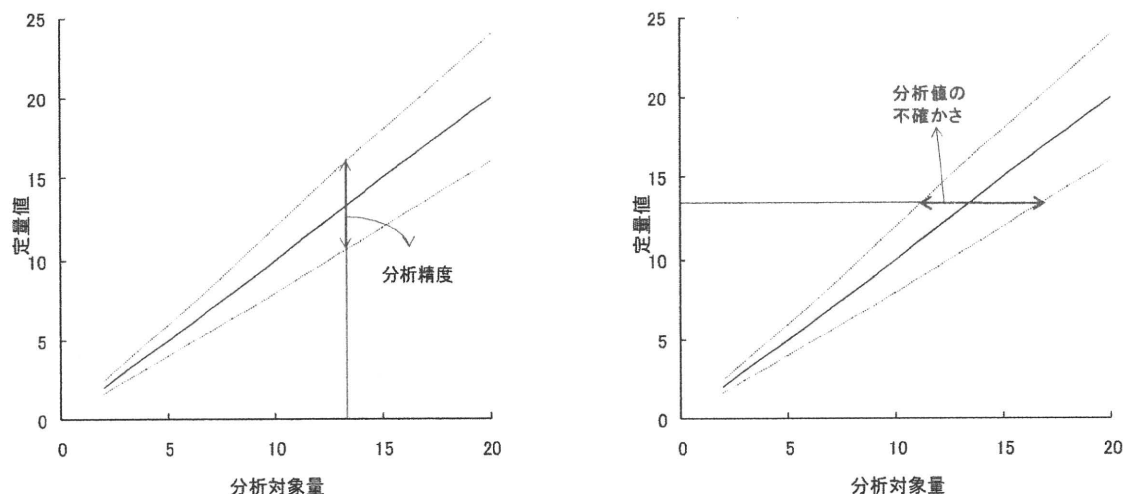


Fig. 5 分析精度と測定値の不確かさ

以上、身近に得られる分析結果の正規性を評価してみた。多くが正規分布ではない分布を示している。このようなデータでも、正規分布を前提とした統計手法を適用せざるをえないが、現実には理想の正規分布とは異なっていることを、念頭に置いて結果を解釈する必要があるだろう。

データ出典等

- 1) 厚生労働科学研究費補助金「食品中に残留する農薬等の規格基準に係わる分析法における不確実要素に関する調査研究」(主任研究者：松岡英明)，平成 19 年報告書
- 2) 厚生労働科学研究費補助金「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」(主任研究者：松岡英明)，平成 21 年報告書
- 3) 厚生労働科学研究費補助金「検査におけるサンプリング計画並びに手順のハーモナイゼーションに関する研究」(主任研究者：渡邊敬浩)，平成 21 年報告書

生化学分析法により得られる測定値の特性とそれに応じた統計解析手法の検討

渡邊敬浩

(国立医薬品食品衛生研究所)

【目的】適合判定を目的とした測定値を得るための方法として、理化学的分析法がよく知られ、不確かさの推定を含む種々の検討が進められている。一方、生化学分析法も同じ目的から使用される場合があるが、測定値の特性となる偏りやばらつきの要因が明らかにされておらず、適切な統計解析手法にも検討の余地が多い。本研究では、生化学分析法の一例として組換えDNA技術応用食品を対象としたリアルタイムPCR法(r-PCR法)を取り上げ、不確かさ推定を通じて、測定値の特性を明らかにし適切に統計解析するための手法について種々の検討を行った。

【方法】試料：IRMMから入手した認証標準試料(ERM-BF410e)を用いた。分析方法の全般：分析は、公定法に収載の方法に準拠し行った。DNA抽出法：公定法に収載される抽出法のうち、4種の方法を用いた。DNA測定法：溶液中のDNA濃度を260 nmの吸光度に基づき算出する吸光度法及び、二本鎖DNAに特異的なインターカレーター由来の蛍光強度に基づき算出する蛍光光度法を用いた。実験計画：1日2併行、5日間実施により抽出したDNAを、1DNA溶液あたり15 well 併行で測定することを基本とした。統計解析と不確かさの推定：明示的な要因と非明示的な要因の詳細を検討するため、複数の仮定に基づくデータセットを準備し、二元配置もしくは一元配置の分散分析により解析した。算出された個々の分散に基づく変動の大きさを、標準偏差

及び相対標準偏差として推定した。さらに実際の検査に鑑み、最も現実的な不確かさの推定方法について検討を進め、DNA抽出法の種類による不確かさの差についても比較した。

【結果及び考察】本研究により、1)DNAの濃度に測定法間で有意差が認められること、2)抽出法間でDNA収量に差が認められること、3)コピー数の変動は、併行抽出間に比べ測定間の効果を含む抽出日間で大きいことが明らかとなった。コピー数の変動について得られた結果は、本分析法の標準物質に相当する標準plasmidの繰り返し測定結果からも支持され、r-PCR法により得られる測定値の変動の支配的要因であることが強く示唆される。また、抽出法ごとに推定された混入率の室内精度は12.2～27.3%(RSD%)であった。これらの結果から、採用する抽出法により得られる混入率の不確かさが異なることも強く示唆された。さらに認証値(2.0±0.26%; w/w)に対し、混入率の平均は抽出法ごとに1.75～2.59%であり、有意差も認められた。本研究で推定された不確かさは、規定した実験計画に従い単一試験室内で得られたデータに基づき推定された大きさであるため、異なる実験計画及び他の試験室での推定結果と異なることが容易に予想され、それは自明である。ただし、r-PCR法による測定値の特性の一端を明らかにし、何を目的にどのようにして不確かさを推定すべきか、その方法の一例が示されたものと考えられる。

日本防菌防黴学会学術講演会2010

(西宮、2010年5月26日)

微生物試験法における培養法と非培養法の相互補間

東京農工大学 (院) 工学研究院 生命機能科学部門 松岡英明

微生物迅速試験法について、多くの原理や方法が提案され、装置が開発され、データが示されてきた。それらの迅速法の多くは非培養法である。培養法とは測定指標が異なるので、結果が異なって当然ではあるが、実用的には、ひたすら培養法と同じ結果がでるようにすることが要請されている。そこで、両者の違いの中味を詳しく解析することによって、培養法に匹敵する、あるいはそれ以上に信頼性の高い迅速法を目指す考え方、具体的な試みについて紹介する。

第一は生菌分離である。前処理として、生菌のみを分離すれば、多くのノイズを劇的に減少させることができる。膜分離、遠心分離、あるいは密度勾配遠心分離によって、生乳、魚肉、ハチミツ、塩辛、などの食品マトリクスから添加生菌の70-80%を分離することによって、非培養法と培養法との良い相関が得られることが示されている。

第二はトレーサブル測定法である。複雑な食品マトリクスの性状を考えれば、生菌を完全に純粋な画分として分離することは難しい。実用的には許容できる程度にノイズが抑えられるようになった、ということではしかない。そこで、さらに信頼性を高めるために、トレーサブル計測法が改めて注目されている。すなわち、マイクロコロニーの形成をもって生菌と判断する方法である。生菌1個から分裂増殖する過程を、生菌1個ごとに追跡していく考え方である。培地と菌との多様な組み合わせについて、解像度の高い解析結果が得られるようになれば、培養法でありかつ迅速法となりうる。

生菌を1個ずつ追跡する考え方は、生菌の標準物質の調製技術にもつながる。技術的には、まだ実用段階とはいえないが、関連技術の開発状況を一覧すれば、非常に有望である。食品成分、培地、そして菌種の組み合わせに毎に、標準物質が簡単に調製できれば、実用的には言うまでもなく、細胞生理学の観点からも大きな意義があると考えられる。

リアルタイム PCR 法により得られる測定値の不確かさの推定

○渡邊敬浩、白政優子、松田りえ子
(国立医薬品食品衛生研究所)

【目的】規格基準適合判定を目的とした測定値を得るための方法として、理化学的分析法等がよく知られ、不確かさの推定を含む種々の検討が進められている。一方、生化学的分析法も同じ目的から使用される場合があるが、偏りやばらつきに影響を与える因子についても未だ明確にされてはおらず、不確かさの推定を試みた報告はない。本研究では、生化学的分析法の一例として組換えDNA技術応用食品を対象としたリアルタイムPCR法を取り上げ、分析の全工程を通じて得られる測定値の不確かさの推定方法の検討を目的とした。

【方法】試料：IRMMから入手した認証標準試料(ERM-BF410e)を用いた。分析方法の全般：分析は、厚生労働省の示す通知(食安発第0629002号)及びJAS分析ハンドブック(第二版)に記載の方法に準拠し行った。**DNA抽出法**：上記通知等に記載される抽出法のうち、規定した実験計画に要する量のDNAが抽出可能であった、maxi法、mini法、quicker法及び、resin法の計4種を用いた。**DNA測定法**：溶液中のDNA濃度を260 nmの吸光度に基づき算出する吸光度法及び、二本鎖DNAに特異的なインターカラー由来の蛍光強度に基づき算出する蛍光光度法を用いた。**実験計画**：1日2併行、5日間実施により抽出したDNAを、1DNA溶液あたり15 well 併行で測定することを基本とした。統計解析と不確かさの推定：明示的な要因

と、1つの水準に複合して現れる非明示的な要因とを詳細に検討するため、複数の仮定に基づくデータセットを準備し、二元配置もしくは一元配置の分散分析により解析した。算出された個々の分散に基づく変動の大きさを、標準偏差及び相対標準偏差として推定した。さらに実際の検査に鑑み、最も現実的な不確かさの推定方法について検討を進め、DNA抽出法の種類による不確かさの差についても比較した。

【結果及び考察】本研究により、1)DNAの濃度に測定法間で有意差が認められること、2)抽出法間でDNA収量に差が認められること、3)コピー数の変動は、併行抽出間に比べ測定間の効果を含む抽出日間で大きいことが明らかとなった。また、抽出法ごとに推定された混入率の室内精度は12.2～27.3%(RSD%)であった。これらの結果から、採用する抽出法により得られる混入率の不確かさが異なることが強く示唆された。また認証値(2.0±0.26%; w/w)に対し、混入率の平均は抽出法ごとに1.75～2.59%であり、有意差も認められた。本研究で推定された不確かさは、あくまで規定した実験計画に従い単一試験室内で得られたデータに基づき推定された大きさであるため、異なる実験計画及び他の試験室での推定結果と異なることが容易に予想され、それは自明である。ただし、何を目的にどのようなして不確かさを推定すべきか、その方法の一例が示されたものとする。

微生物検査・測定法とその適用の基本的考え方

まつおかひであき
松岡英明（東京農工大学・院・工学府生命工学専攻）

〔生菌検出と特定菌検出〕

日常的に滅菌処理状況を監視するためには迅速な微生物生菌検出が必要である。この場合は菌の種類によらない検出法が好ましい。一方、生菌を含んでいる食品では、特定の汚染指標菌のみが選択的に検出できる検査法でなければならない。大腸菌は生乳や生肉など多くの食品に対する汚染指標菌となっている。考慮すべき汚染指標菌と食品の組み合わせ、およびその検出感度は、人に実害をもたらした汚染事故例に基づいて規定される。例えば、サルモネラは液卵からは検出されてはならない、と規定されている。検出法としては選択的かつ高感度が要請される代表的な場合である。サルモネラは H_2S を産生する性質があるので、この性質を利用した選択培地が実用されている。ところが、事例は少ないながら、 H_2S 非産生のサルモネラの汚染事故が問題になると、これも検査法の対象として考慮しなければならない。また、 H_2S 産生・非産生の性質だけでなく、血清型別試験や生化学的性状試験も要請される。日常の管理では簡略な検査で十分な場合もあるが、「検査法」としては、一旦事が起こったときに対する信頼すべきハウツーをできる限り緻密に整備しておくことが重要である。

〔信頼すべき試験法〕

生菌検出でも特定菌検出でも、その基本が培養法であることは過去も現在も変わらない。公定法となっているものは全て培養法である。一方、非培養の迅速法が種々開発されているが、これらも培養法と「同じ結果」を出す限りにおいて妥当な試験法であると認められる。しかし、試験法の妥当性を確認すること（メソッド・バリデーション）は簡単ではない。趣旨は「いつ、どこで、誰が実施しても同じ結果」ということであるが、具体的な実証方法を科学的議論だけで一意に決めることは難しい。多くの議論と試行によって実現可能な手順と条件（プロトコール）を決めざるを得ない。そうした議論の場として、AOAC や ISO などの国際組織が知られている。新たな食中毒事故やその可能性の指摘、あるいはバイオテロなどの問題が発生するたびに、絶えず改訂や新設の可能性があって、その動向を常に注視して行くことは、厄介ではあるが主体的に関わっていく意義は大きい。そして、その前提として、わが国自身の公定法の考え方を整備しておくことが極めて肝要であると考えられる。

〔試験法のバリデーションと不確かさ〕

試験法のバリデーションはプロトコールの確定から始まる。検体の種類と数量、培地の種類、培養条件、コロニー判定条件など、各項目ごとに厳密に規定する必要がある。例えば、培養温度を $35 \pm 1^\circ C$ とするか $35 \sim 37^\circ C$ とするかで議論する。一旦規定したら、それを実現する試験設備の性能も保証しなければならない。寒天培地上への播種・展開は基本操作ではあるが、試験者の技術はそれが確実にできる一定レベル以上であることを前提としている。このように、プロトコール、試験所の設備、試験者の技量がそろって、初めてバリデーションが有効になる。それでも、微生物試験法では、化学分析に比べはるかに多種多様な不確かさの要因があって、それが微生物試験法を難しくしている。そのことは、すでに標準法とされている方法でも例外ではない。近年、利用され始めた微生物生菌の標準品は、今のところ一部の菌株でしか利用できないが、そうした問題を解決する可能性を秘めている。どの菌種でも標準生菌が利用できるようになることが極めて強く望まれる所以である。

JAIMAコンファレンス

セミナー:分析法の妥当性確認(Method Validation)の方法と実際

微生物試験における不確かさ

2009年9月4日

松岡 英明

AOAC INTERNATIONAL 日本セクション 次期会長
東京農工大学 大学院工学府 生命工学専攻

試験法の信頼性確保の要件

1. 試験法の妥当性確認 (Method Validation)
2. 試験者技量認定 (Proficiency Testing)
3. 試験所認定 (Laboratory Accreditation)
4. 標準試料 (Standard Material)

試験法の信頼性確保の要件

1. 試験法の妥当性確認 (Method Validation)

- ① プロトコルの設計
- ② 単一試験所でのバリデーション (Single Laboratory Validation)
- ③ 複数試験所でのコラボスタディ (Collaborative Study)
- ④ 試験成績の報告 ... 「不確かさ」の推定値の記載が要請
- ⑤ 試験成績の評価

不確かさ (Uncertainty) とは？

「不確かさ」の概念は、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)によって、国際的に合意。

「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、バラツキを特徴付けるパラメータ」
(A parameter associated with the result of a measurement, that characterizes the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand)

不確かさ (Uncertainty) とは？

もう少しわかりやすく言えば、測定結果に影響を及ぼすと考えられる要因を全てリストアップした上で、それらを

- ・「観測値の統計的解析結果、たとえば標準偏差、信頼性区間」
- ・「標準偏差で表現される点は同様であるが、以前の測定データや較正成績書のデータなどに基づいて仮定された確率分布に基づく数値」

に分けてそれぞれ算出した後、

- ・「定式に従ってそれらを加算して得られる数値」

である。

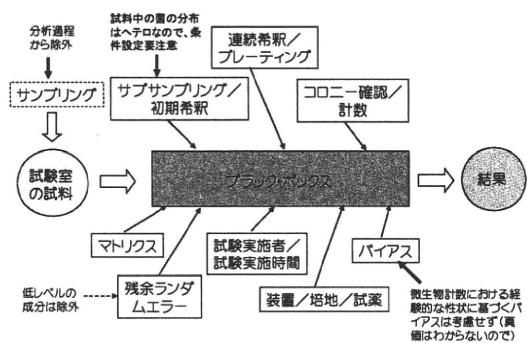
ISO の取り組み—ISO/TS 19036*1

文献:

B. Lombard: Estimation of measurement of uncertainty on food microbiology: The ISO approach. Accred. Qual. Assur. 17, 94-100 (2006).

*1) 文献中で紹介されている ISO Technical Specification (ISO/TS 19036). Microbiology of Foods and Animal Feeding Stuffs—Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Draft ISO TS 19036. International (2003, 1st version, 2005 2nd version)。

ISO の取り組み—ISO/TS 19036
不確かさの主要因チャート

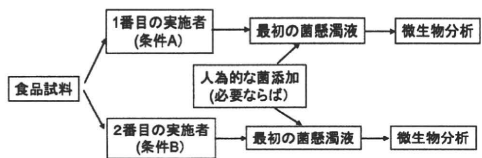


ISO の取り組み—ISO/TS 19036
定量試験

- ① 一つの試験法(菌種、マトリクス、生理学的条件、試験法の種類、ごとに規定)に対して、 s_0 (Reproducibility Standard Deviation)を求める。
- ② s_0 は、本来、空間共同試験(コラポスタディ)によって求める空間再現精度(Reproducibility)の標準偏差であるが、ISO/TS 19036では、むしろ、単一試験室内で行う室内再現精度(Intermediate Precision)の標準偏差の使用を第一優先としている。恐らく、空間共同試験の実施を前提とする場合に比べ、試験条件の設計・実施がはるかに容易になるからであろう。
- ③ s_0 を求める方法の優先順位は次のとおり
1. 室内再現精度の標準偏差
2. メソッドバリデーションのために実施する空間共同試験で求めた空間再現精度の標準偏差
3. 投量測定試験のために実施する空間共同試験で求めた空間精度の標準偏差
- ④ 標準偏差に包含計数(k : Coverage Factor)をかけた値 ks を、「拡張不確かさ(Expanded uncertainty)」と定義。
- ⑤ 正規分布を仮定すれば、観測値が95%、99%の信頼性でとりうる値は、各々、平均値 $\pm 2s$ 、平均値 $\pm 3s$ 、である。

ISO の取り組み—ISO/TS 19036
室内再現精度の測定における要点

- ① 同一試料で、できるだけ異なる2条件(条件A, B: 試験実施者、実施日時、使用する装置類などを要する)で実施。不確かさが大きくなってしまふ原因を種々想定し、これらが生じた場合でも包含できるように。
- ② 標的菌種とマトリクスの組み合わせごとに、10個以上の試料で反復
- ③ 食品試料中の菌の分布はきわめて偏在。サブサンプリングは要注意。2個のサブサンプルの同等性の確保が重要。

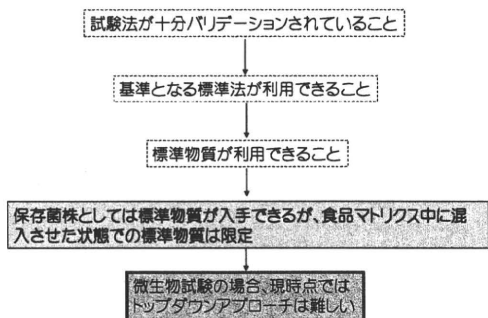


トップダウン方式の推奨例—残留農薬分析

「測定の不確かさ推定及び結果の確認(Estimation of Uncertainty of Measurements and Confirmation of Results)」(残留農薬に関するコーデックス委員会(CODEX Committee on Pesticide Residues; CCPR)作成、2004年)

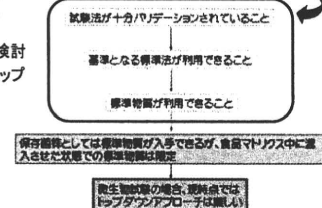
- 測定の不確かさ推定には、要素毎の解析[ボトムアップ]と分析法の精度[トップダウン]の2つの基本的方法論があることを認識し、実際の理由から、残留農薬分析にはトップダウンアプローチを推奨する。
- トップダウンアプローチを適用する際の基礎として、
 - ・分析法バリデーション
 - ・試験室の管理試料から得られた長期間にわたる精度
 - ・公表された文献データ
 - ・空間共同試験
 等が挙げられている。

トップダウンアプローチを適用するための前提



今後の課題

1. 不確かさの各要因に関して、要因分析精度の向上を図り、不確かさを減少させる方法を開発する。
2. 複数の要因間の相関解析により、合成不確かさの算出法を改良する
3. トップダウン・アプローチを可能ならしめるための技術を開発する。
すなわち、標準物質と標準試験法。
4. 統計的評価法の再検討
5. 国際動向キャッチアップ



技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定

○土屋 禎¹⁾, 田中廣行¹⁾, 鈴木達也²⁾, 大島赴夫²⁾,
渡邊敬浩³⁾, 松田りえ子³⁾, 松岡英明⁴⁾, 工藤由起子³⁾

1) (財)日本食品分析センター, 2) (財)食品薬品安全センター
3) 国立医薬品食品衛生研究所, 4) 東京農工大学大学院

【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。測定の不確かさを推定する手順としてはいくつかの方式が知られているが、本研究ではトップダウン方式の一つである「技能試験データに基づく不確かさの推定」により細菌数の不確かさを推定したので報告する。

【方法】(財)食品薬品安全センターにより実施されている食品衛生外部精度管理調査のうち、2005～2007年度の細菌数測定データ(各試験所3回測定)を用いて不確かさを推定した。また、調査時に実施されたアンケートの結果をもとに測定データを比較・解析した。

【結果及び考察】不確かさの推定：各試験所の細菌数測定データのうち、冷凍食品の測定法(昭和34年厚生省告示第370号)により測定されたデータを抽出後、常用対数に変換し試験所ごとに平均値を算出した。次に、スミルノフ・グラブス検定により外れ値を除外して解析データとした。解析データから平均値及び標準偏差を算出し、拡張不確かさ($k=2$)を推定した結果は以下のとおりであった。

	'05年度	'06年度	'07年度
参加試験所数	417	357	381
解析データ数	251	243	270
平均(log ₁₀)	3.71	4.79	5.05
標準偏差(log ₁₀)	0.13	0.13	0.12
拡張不確かさ(log ₁₀)	0.26	0.26	0.24

推定された拡張不確かさは0.24～0.26(log₁₀)

とほぼ一定の値であった。

アンケート結果の解析：アンケート結果をもとに、解析データを複数のグループに区分した後、グループごとに平均値、標準偏差及び拡張不確かさを算出して比較した。

①試験者の実務年数：9～10のグループに区分した解析データを比較した結果、試験者の実務年数と拡張不確かさとの間に顕著な関連性は認められなかった。

②試料調製時のフィルター処理：2グループ(処理あり、処理なし)に区分した解析データを比較した結果、「処理なし」は平均値が大きく拡張不確かさが小さい傾向が認められた。

③試料調製時間：4グループ(1, 2, 3分間及びその他)に区分した解析データを比較した結果、「その他」の拡張不確かさが大きい傾向にあるものの、試料調製時間と拡張不確かさとの間に顕著な関連性は認められなかった。

④集落計数法：3グループ(目視、装置及びその他)に区分した解析データを比較した結果、集落計数法と拡張不確かさとの間に顕著な関連性は認められなかった。

以上の結果から、試験者の実務年数、試料調製時間及び集落計数法に関しては、測定値に影響を与える明らかな要因ではないと推測された。また、技能試験データに基づいて推定した不確かさを適用する場合、あらかじめ試験所ごとにマトリックス(検体の種類)や試料調製に起因する不確かさを推定・評価しておくことが重要な要件と考えられた。

2009年5月15日
(東京)

迅速微生物検査技術の開発とバリデーション

東京農工大学 工学府生命工学専攻 松岡英明

【緒論】迅速法として様々の非培養法が提案されてきた。しかし、非培養法では微生物細胞以外に食品残滓などが共存し、これが擬陽性や擬陰性の原因になる。そのため、今日に至るまで、公定法あるいは公認法として採用されるには至っていない。一方、培養法でも培養時間の短縮によって迅速化を図る試みがある。本講演では、迅速法の開発とそのバリデーションに関する動向について紹介する。

【培養時間の短縮による迅速化】増殖の遅い、あるいは小さなコロニーを作った後、増殖を停止しているように見える菌に対しては、マイクロコロニーの段階で計数せざるを得ない。これが、マイクロコロニー法であるが、結果的に迅速化が達成される。また、増殖しつつある細胞の形状変化を時々刻々測定することによって増殖速度を測定する装置も報告されている。高価な装置になるが、生菌が迅速に検出できる。フィルム状培地を用いた簡便型培養法は、既に多種類の菌に対する専用キットがAOACのバリデーションを得ており、例えば大腸菌群の場合、24時間以上かかっていたものを10時間程度に迅速化している。この方法では、培地調製時間を省略することも大きなメリットである。増殖速度をさらに高めるために、まだまだ培地を工夫する余地が大きいかも知れない。

【非培養法に必須の生菌分離】非培養法における擬シグナルを無くすためには、食品試料から微生物細胞のみを生きたまま分離するこ

とが不可欠である。生きたまま分離し、生きたまま顕微計測すれば信頼性が向上するが、さらに念を押すために、トレーサブルに培養・計測を行えば確実である。この場合の培養は、マイクロコロニーの段階までで十分であるから、迅速化が可能である。

【非培養法に要請される自動化】非培養法では顕微計測など高価な光学装置を使用する機会が多い。その場合は、例え1検体の計測が迅速にできても、多数検体の計測には長時間と多数の装置が必要になってしまう。そこで、実用的見地からは自動化が要請されるが、そのためには次のような要素技術が必要となる：①食品試料から試験菌液を自動調製する技術、②試験菌液から菌以外の夾雑物を除去する技術、③試験菌液から目的菌を回収濃縮する技術、④菌の可視化技術（生菌、死菌、特定菌）、⑤菌の計数技術、⑥菌の溶解と遺伝子解析技術、⑦菌の免疫分析技術、⑧微小反応液移送技術。

【微生物標準試料】生菌分離および顕微計測技術は、微生物標準試料開発とも密接に関連している。すなわち、上記の⑧の関連技術によってBioBallと称する生菌標準試料が開発され、微生物試験法（非培養法および培養法）のバリデーションに際して重要な役割を果たすと考えられている。今のところ、数種類の菌株のみに適用されているに過ぎないが、今後、さらに多種類の菌株への展開が期待されている。

リアルタイムPCRにより得られる測定値の変動要因

○渡邊敬浩¹、大森清美²、峯岸恭孝³、松田りえ子¹

(¹国立医薬品食品衛生研究所、²神奈川県衛生研究所、³株式会社ニッポンジーン)

【目的】測定値は真値の推定値であるが、分析法の特性や性能に応じた偏り及びばらつきをもつ。これらに基づき「真値の存在する範囲」としての不確かさを推定すること並びに、測定値の信頼性を保証することが求められている。生化学的分析法は、開発及び運用の歴史が浅く、偏りやばらつきに影響を与える因子についても未だ明確にされていない。また、不確かさの推定を試みた報告はない。本研究では生化学的分析法の一例としてリアルタイムPCRを取り上げ、測定値の偏りやばらつきに影響を与える因子を明らかにすること及び不確かさの推定を目的とした。

【方法】食安発第0629002号3.1.2項に記載された検量線用標準プラスミド溶液のセット(ニッポンジーン社製)及び、本セット中に含まれる1,500コピー相当の濃度にバルク調製したプラスミド溶液(全ウェル検液)を試料とした。これら試料を用い、1枚の96ウェルPCRプレート上で5本の検量線を作成するための測定並びに、同プレート全てのウェルでの全ウェル検液測定を試験計画とした。全ての試薬及び手順を詳細に記載した試験プロトコルを配付し、25の地方衛生研究所等の協力の下、共同試験を実施した。各機関からリアルタイムPCR各機種(ABI PRISM 7000、7500、7700、7900HT)により得られた蛍光強度データを回収し、我々が開発したソフトウェア(GiMlet)により解析し、結果を集計した。

【結果及び考察】リアルタイムPCRにより得られる測定値(Ct値)は、PCRプレート上のウェル間でばらつきをもち、その大きさはリアルタイムPCR機器の機種及び各機体によって異なることが明らかとなった。また、ポアソン分布の影響を大きく受ける20コピーを検量点に含めた場合、検量線の信頼区間が広がることにより推定コピー数のばらつきが大きくなった。これはリアルタイムPCRの原理的なばらつき要因であると強く示唆される。これら2つのばらつき要因の影響を軽減させるためには、機器精度の基準を設定し適切な管理を行う事や、20コピーを検量点に含めない検量線をデザインすることが提案される。また、測定対象となるDNAの抽出法や定量値算出法にもばらつきまたは偏りを与える要因が含まれていると考えられ、不確かさを推定するためには、今後これらについても検討を行うことが必要である。

【謝辞】共同試験にご協力いただいた下記研究機関の関係諸氏に深謝いたします。

愛知県衛生研究所、石川県保健環境センター、岩手県環境保健研究センター、大阪府立公衆衛生研究所、岡山県環境保健センター、香川県環境保健研究センター、川崎市衛生研究所、北九州市環境科学研究所、京都府保健環境研究所、高知県衛生研究所、埼玉県衛生研究所、滋賀県衛生科学センター、仙台市衛生研究所、千葉県衛生研究所、東京都健康安全研究センター、鳥取県衛生環境研究所、長野県環境保全研究所、奈良県保健環境研究センター、広島県総合技術研究所・保健環境センター、福井県衛生環境研究センター、福岡市保健環境研究所、宮城県保健環境センター、山口県環境保健センター、横浜市衛生研究所(あいうえお順)。