

微生物技能試験のzスコア計算方法による結果の差異

誌名	日本食品科学工学会誌
ISSN	1341027X
巻/号	6111
掲載ページ	p. 548-551
発行年月	2014年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



研究ノート

微生物技能試験の z スコア計算方法による結果の差異

塚 越 芳 樹*

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Calculation of Dispersion and z-scores for Microbiology Proficiency Testing Based on Results of a Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries Project

Yoshiki Tsukakoshi*

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

We analyzed data from microbiology proficiency tests obtained from research laboratories participating in a research project administered by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. The data obtained from most of the participating laboratories was satisfactory. However, the results from some laboratories did not meet the minimum requirements, even laboratories that had reported satisfactory scores in previous years. The results also showed that, although the standard deviation calculated based on normalized inter-quartile ranges of coliform counts was close to 0.25, the standard deviation obtained for aerobic bacterial counts differed significantly from 0.25, which is the empirical σ_p used by the FEPAS proficiency testing scheme.

(Received Feb. 20, 2013; Accepted Aug. 11, 2014)

Keywords : microbiology, proficiency testing

キーワード : 微生物, 技能試験

我が国においては、「農畜水産物の安全を確保するためには、危害要因に関する科学的なデータ整備・解析等のための技術・手法を開発するとともに、病原微生物を対象に、現場で実施可能な確なりリスク低減技術の開発を行う必要がある」と考えられるようになった¹⁾。そこで、「農畜水産物の生産から流通・加工工程において重要度が高い危害要因について、生産・流通・加工工程における動態の解明や簡易で迅速な検出技術の開発を行い、それらをもとに危害要因ごとに、現場で実施可能な確なりリスク低減技術を開発することが必要」であるとの認識の元に¹⁾ 研究プロジェクト「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」(以下生産工程プロ)が平成20年から平成24年の5年間行われていた。

そのなかに、病原微生物チーム(リーダー:川本伸一 食品総合研究所食品安全領域長)がある。病原微生物の研究においては、その過程で病原微生物の検査を行うが、農林水産省の委託プロジェクトではこれまで、細菌検査の技能精度が適切であるかを定期的に確認し、試験結果の信頼性を確保することは行われていなかった。微生物試験には限らないが、試験結果は常に一致するわけではなく²⁾³⁾ その結果が一定の範囲に入っていることを評価するため、試験室に対する技能試験が世界各国で行われている^{4)~7)}。技能

試験への参加は、試験検査の質評価において重要なステップである⁸⁾。さらに、技能試験の結果から検査法の不確かさを推定する試みもなされている^{9)~11)}。

そこで、本報告では、生産工程プロ参加試験室について、平成23年度は財団法人日本冷凍食品検査協会(冷凍食品検査協会)により微生物測定技能試験を実施した結果を報告する。また、二通りの計算法でzスコアを算出し、結果を得たので、そのことによる影響について議論する。生産工程プロの技能試験については、平成20年度年度の報告があるが¹²⁾、その後も毎年行っているため、継続的に試験成績が得られており、それらについても平成23年度との比較報告を行う。

1. 実験方法

(1) 試料調製

各試験室に配付する試料は、牛乳の粘性を高めた基材に、(2)の標準菌株を添加し均質化した後に約50gずつ小分けして凍結した。

(2) 添加した標準菌株の種類

試料には、以下の菌種を加えた。細菌数として、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、大腸菌群数(非大腸菌)として、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 12658である。

(3) 試料の均質性試験結果

試料の均質性を確認するため、小分けした試料から無作為に 30 検体抽出し、参加者に配付する前に冷凍食品検査協会にて細菌数、大腸菌群数の試験を行った。細菌数は標準寒天培地を用いた混釈法により、35 度で 48 時間培養により試験を行った。大腸菌群数はデソキシコーレイト寒天培地を用いて、35 度 20 時間の培養により試験を行った。均質性試験での各試験項目の平均値、標準偏差は、細菌数で平均 5.2 log/g で標準偏差 0.028 log/g、大腸菌群数で 4.8 log/g で標準偏差 0.055 log/g という結果であった。本結果にはサンプル間差^{13)~15)}は十分小さかった。元が液体であることで均一性が高いことがその理由として考えられた。

(4) 実施要領

実施は、試料配布月日が平成 23 年 9 月 6 日、試験結果回収月日が平成 23 年 9 月 27 日であり、プロジェクト参加者数は 55 名であった。検査法は参加者が通常採用している方法を用いるように指示した。

(5) 試験結果の評価方法 (z スコア) について

技能試験の結果を数値で表わす試験項目の評価方法は、一般的に z スコアを用いる¹⁶⁾。z スコアは以下の用に計算した。

$$z = (X - M) / \sigma_p$$

ここで、X は各参加者の報告値、M は代表値、 σ_p はずれを規格化する数値である。いくつかの方法があるが、ここでは、M はプロジェクト参加者の中央値、 σ_p は 0.25 log/g とし計算を行った。ただし、冷凍食品検査協会の通常の試験では NIQR 法¹⁷⁾に基づいた方法を行っているため、そのことによる結果の違いについて比較を行った。

z スコアは全参加者の試験結果に対して、各参加者の試験結果がそれぞれの位置にあるかを示したものであり、技能試験の国際規格では z スコアの絶対値が 2 以下であれば「満足」、2 を超えて 3 以下の場合は「疑わしい」、3 を超える場合には「不満足」という評価がされた。

2. 実験結果および考察

(1) 試験結果の収集状況

配布した 55 試験室の内、54 試験室から結果を回収した。回答があったのは、細菌数については、54 試験室、大腸菌群数に関しては、53 試験室であった (表 1)。指示された試験結果回収月日は平成 23 年 9 月 27 日であったが、一部事情により提出が遅れる試験室があったが 10 月 11 日までは試験結果が到着している。

(2) 細菌数の検査結果 z スコアについて

細菌数に関しては、約 80% の試験室が標準寒天培地培養法を用いていた。ほかにはトリプチケースソイ寒天培地なども用いられていた。54 試験室中 53 試験室が z スコアの絶対値が以下に入っていた。これまでの 4 年間の検査結果では、z スコアを、 σ_p を 0.25 log/g で計算すると (z スコ

表 1 2011 年度、生産工程プロジェクト参加者の技能試験結果

試験項目名	z スコアが 2 以下の報告値数	報告値総数	z スコアが 2 以下の割合 (%)
細菌数	54	55	98%
大腸菌群数	51	53	96%

アの絶対値が 2 以下の試験室数)/(参加試験室数)が 48/48, 55/57, 56/60 となっており、4 年間を通してさほど大きな変化はなく、安定して高水準で推移している。また、2 年連続して結果の z スコアが疑わしいまたは不満足試験室は多くない

i) z スコアの計算方法の影響について

z スコアは、想定されるバラツキの σ_p を元に計算されるが、この σ の計算方法にはいくつかのやり方がある。これまでの結果は、英国環境食料農村地域省 (Department for Environment, Food and Rural Affairs, 略称 DEFRA) 傘下の独立行政法人である英国食料環境研究庁 (The Food and Environment Research Agency, 略称 Fera) が実施しており、世界最大と考えられる¹⁸⁾、FEPAS を元にした、当プロジェクトのこれまでの 3 年間と同様の、標準偏差を 0.25 と固定した場合である。この根拠は、Fera がこれまで実施してきた技能試験の結果から得られた経験則により、微生物試験の場合は σ_p を 0.25 log/g に固定することとしている。これとは別に、これまでの冷凍食品検査協会が通常実施している際に用いている NIQR 法がある。これは ISO に記述のあるロバスト統計量に基づいた手法である。この手法は実際のデータのバラツキを解析した方法となっており、前出の Fera の手法とは異なる推定量である。さて、実際にこの手法で算出すると標準偏差が 0.123 と大幅に小さくなっている。このように、小さな標準偏差を用いて計算を行うと z スコアの絶対値が 2 を超える試験室が増加し、実際に結果が異なる場合があった。z スコアを、NIQR 法で計算すると、(z スコアの絶対値が 2 以下の試験室数)/(参加試験室数) 50/54 となり、あらたに 3 試験室が「疑わしい」という結果になった。また、前々パラグラフで述べたこれまでのプロジェクトで採用している z スコアで外れた試験室では、z スコアの絶対値が 3 を超え、不満足というカテゴリに入った。z スコアの絶対値が 2 以下になるのは約 93% であった。全体的に見ると、生産工程プロ以外の参加者を含めた場合は z スコアの絶対値が 2 以下になるのは 89% であった。本プロジェクト参加者の技能 (93%) が低いということではなかった。

他所での技能試験では¹¹⁾、生菌数で対数標準偏差が 0.07 log/g から 0.15 log/g になっている。また、別の報告では¹⁹⁾、細菌数の外部精度管理結果が示されている。ただし、対数標準偏差ではなく変動係数での報告である。そこで変動係数より対数標準偏差に換算すると、平成 12 年度に対数平均 4.7 log/g 時に対数標準偏差が 2σ 処理後 0.3 log/g (変動

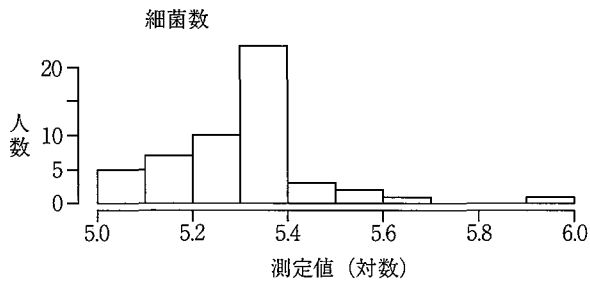


図1 2011年度、生産工程プロジェクト参加者の技能試験結果—細菌数ヒストグラム

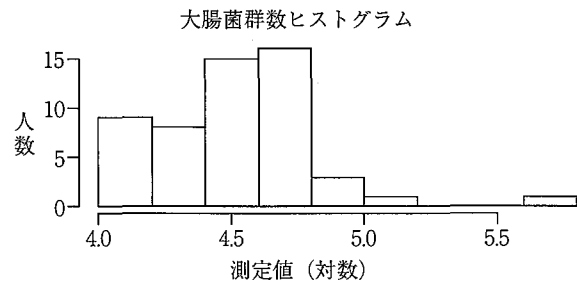


図2 2011年度、生産工程プロジェクト参加者の技能試験結果—大腸菌群数ヒストグラム

係数より換算)であったが、平成14年度には平均3.7log/g時に対数標準偏差が 2σ 処理後0.25、平成15年度には、平均4.0log/g時に対数標準偏差が 2σ 処理後で0.17log/gとなっていた。以上より、ロバスト処理を行うと、ある程度技能試験に習熟した後では、細菌数の場合 σ が0.25log/gより小さくなっていることが他でも示唆される。また他の結果²⁰⁾においても、細菌数は、大腸菌群数および黄色ブドウ球菌数の半分程度の標準偏差となっており、本研究結果はこれと合致する。その他²¹⁾、平均で0.17log/gという結果がある。また、本試験においては試料の保管方法について指定をしていないため、実施日や試料のずさんな取り扱いによる変動が含まれているため、理論的には、比較した研究による測定条件に保管状況のバラツキによる変動が追加されている。

それらを踏まえると、どちらの標準偏差を技能試験に用いるべきかの判断は難しく⁹⁾、どちらが試験技能を確認する上で良いかという観点からなされるべきである。今後の試験結果を見て、たとえば、0.12log/gを用いて試験した場合の結果の z スコアが疑わしいまたは不満足な場合引き続き、翌年度も試験結果の z スコアが疑わしいまたは不満足なことが多いようであるなら0.12log/gなどNIQR法の結果を用いることも考えられるが、その解明には今後の試験結果を追跡する必要がある。

(3) 大腸菌群数の検査結果について

大腸菌群数の技能試験については、53報告があった内、 z スコアの絶対値が2以下になったのは51の報告があった。約半数の参加者がデソキシコレート培地培養法を用いていた。他にはクロモカルトコリフォームやXMG培地なども用いられていた。報告のうち一つの値は z スコアの絶対値が3を超えていた。これまでの4年間の検査結果では、(z スコアの絶対値が2以下の試験室数)/(参加試験室数)が39/42、54/57、56/59となり、それ程多くの変化はない。また詳細に見ても、初めて参加する試験者の試験結果の z スコアが疑わしいまたは不満足なが多かったが、それ以外に前年までは試験結果の z スコアが満足だったが不満足な場合もあった。フィッシャーの正確確率およびマクネマー検定を実施したところ、過去4年間での実施回による

z スコアが2以下の試験室の比率の変動は、フィッシャーで $p=0.64$ となり、変動があるとは言えなかった。他の技能試験の結果²²⁾でも、実施回による差は大きくないとしている。しかし、試験結果の z スコアが疑わしいまたは不満足な試験室がある以上、継続して参加することによって、技能を継続的に確認することは重要である。また、一般の参加者との z スコアの絶対値が2以下の試験室の比率の検定の結果も有意ではなく、本プロジェクトの参加者の結果が一般の試験所よりも良いとも悪いとも言えない。

大腸菌群数に関しては、測定結果の報告から求めたNIQR法による標準偏差が0.285log/gと当プロジェクトで採用しているFEPASによる固定値の0.25log/gとほぼ同様であり、標準偏差の計算法は結果に特段の影響は少ないと考えられる。実際には、一研究室で、結果が食い違い、FEPAS法の方が、「疑わしい」場合が多かった。(また、生産工程プロ以外の参加者を含めた場合では z スコアの絶対値が2以下になるのは88%であり、生産工程プロ参加者の結果が満足となる確率が他の参加者に比較して低いことはない。

3. 要約

平成23年度の生産工程プロ参加試験室に対して技能試験を行い、その回答結果を得た。多くの場合は試験結果の z スコアは満足であったが、疑わしいまたは不満足であった試験室もあった。そのような参加者は、初めて参加する試験室にも多かったが、連続して同一の試験室が外す場合や、前年度は満足な結果が得られたにも拘わらず翌年度の結果の z スコアは疑わしいまたは不満足であるなど、その様子は様々であることが明らかになった。また、細菌数と大腸菌群数では報告値の分布が異なっており、 z スコアの算出のものと σ_p として、NIQR法によるロバスト推定量とFEPASが採用している経験則により固定する場合を比較すると、大腸菌群数ではほぼ同様の z スコアになるが、細菌数では大きく異なることが分かった。本技能試験では試料の保存について細かい条件を置かなかったため、安定性を担保している技能試験に比べて σ が大きくなっている可能性があるが、その他の技能試験と比べて結果に大きな差異はなかった。技能試験は、研究成果および試験結果の

信頼性確保のために有用であったことと共に、その継続が必要であることが確認された。

本研究は農林水産省の委託研究プロジェクト「生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」の予算で行われた。また、中央水研里見博士、野菜茶業研究所 木嶋博士、動物衛生研究所内田博士、食品総合研究所 山本博士には、参加者の名簿の纏めでお世話になった。各氏には技能試験参加の 54 試験室と共に感謝の意を表します。特に稲津博士には、本技能試験の開始とデータの解釈等について、いろいろご指導を受けましたことをここに記します。また、3 名の査読者にも感謝致します。

文 献

- 1) 独立行政法人農業環境技術研究所, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構, 独立行政法人水産総合研究センター, 農林水産省委託プロジェクト研究 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク軽減技術の開発 http://www.niaes.affrc.go.jp/project/seisan_koutei/seisan/leaflet.pdf 取得日 2012/1/30 (2010).
- 2) Corry, J.E.L., Jarvis, B., Passmore, S. and Hedges, A., A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. *Food Microbiol.*, **24**, 230-253 (2007).
- 3) 進藤久美子, 塚越芳樹, 内藤成弘, 稲垣和三, 鎗田 孝, 成川知弘, 千葉光一, 安井明美. 精米粉末中カドミウム及び主要無機質の技能試験, *分析化学*, **57**, 427-437 (2008).
- 4) Peterz, M., Laboratory performance in a food microbiology in a food microbiology proficiency testing scheme. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 201-216 (1992).
- 5) Edson, D.C., Empson, S. and Massey, L.D., Pathogen detection in food microbiology laboratories: An Analysis of qualitative proficiency test data. *J. Food Safety*, **29**, 521-530 (2009).
- 6) Ornemark, U., Fostel, H., Straub, R. and van de Kreeke, J., Policies, requirements and surveys concerning frequency for participation in proficiency testing schemes. *Accred. Qual. Assur.*, **9**, 729-732 (2004).
- 7) Roberts, D., Proficiency testing in the food microbiology laboratory. *Arh. hig. rada. toksikol.*, **50**, 55-65 (1999).
- 8) Bolton, F.J., Quality assurance in food microbiology -- a novel approach. *Int. J. Food Microbiol.*, **45**, 7-11 (1998).
- 9) Jewell, K., Microbiological proficiency testing: a personal perspective. *Accred. Qual. Assur.*, **6**, 154-159 (2001).
- 10) Jarvis, B., Hedges, A.J. and Corry, J.E., Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. *Int. J. Food Microbiol.*, **116**, 44-51 (2007).
- 11) 田中廣行, 土屋 禎, 大島赴夫, 鈴木達也, 工藤由起子, 技能試験データに基づく細菌数の不確かさの推定, *日本食品微生物学会雑誌*, **27**, 158-162 (2010).
- 12) 内藤成弘, 生産工程プロジェクトにおける微生物技能試験への 2008 年度参加結果, *食総研報*, **74**, 15-22 (2010).
- 13) Tsukakoshi, Y. and Yasui, A., The use of summary statistics for sample size allocation for food composition surveys and an application to potato group. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **62**, 671-7 (2011).
- 14) Tsukakoshi, Y., Sampling variability and uncertainty in total diet studies. *Analyst*, **136**, 533-539 (2011).
- 15) Tsukakoshi, Y., Naito, S., Ishida, N. and Yasui, A., Variation in moisture, total sugar, and carotene content of Japanese carrots: Use in sample size determination. *J. Food Compos. Anal.*, **22**, 373-380 (2009).
- 16) 安井明美, 技能試験, *日本食品科学工学会誌*, **58**, 71 (2011).
- 17) International Organization for Standardization, ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment - General requirements for proficiency testing. Geneva (2010).
- 18) 安井明美, 後藤哲久, 技能試験, 最新版 食品分析法の妥当性確認ハンドブック, (サイエンスフォーラム, 東京) pp. 139-143, (2010).
- 19) 大島赴夫, 鈴木達也, 山田健一, 高野恵美, 山本奈々美, 中阪聡亮, 川崎 勝, 松木容彦, (2004), 食品衛生外部精度管理調査の概要 一般細菌数検査にかかわる調査試料と調査成績, *食品衛生研究*, **54**, 7-14 (2004).
- 20) Jarvis, B., Corry, J.E.L. and Hedges, A.J., Estimates of measurement uncertainty from proficiency testing schemes, internal laboratory quality monitoring and during routine enforcement examination of foods. *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 462-467 (2007).
- 21) Augustin, J.C. and Carlier, V., French laboratory proficiency testing program for food microbiology. *J. AOAC Int.*, **85**, 952-959 (2002).
- 22) Augustin, J.C. and Carlier, V., Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: Analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. *Food Microbiol.*, **23**, 1-38 (2006).

(平成 25 年 2 月 20 日受付, 平成 26 年 8 月 11 日受理)