

フラクショナルネガティブ法によるD値の算出

出典：ISO 11138-7:2019(E)
ISO 11138-7

	HSK法 (Holcomb-Spearman-Karber)	LHSK法 (Limited-Holcomb-Spearman-Karber)	SMC法 (Stumbo-Murphy-Cochran)
暴露する試料数 n	試験試料総数： 100以上 各暴露において最低20の反復実験 同一でない	試験試料総数： 100以上 各暴露において最低20の反復実験 同数	サバイバル／キルウィンドウ内(フ で50以上の反復実験、それらの 少なくとも3回の平均
暴露間隔	同一でない	同数	
暴露条件	最低5つの暴露条件 ①全て生残 1組 ②一部生残 2組 ③全て死滅 2組	最低5つの暴露条件 ①全て生残 1組 ②一部生残 2組 ③全て死滅 2組	サバイバル／キルウィンドウ 内の暴露条件
その他条件			$r/n < 0.9$ r : 死滅のユニット数 n : 反復実験回数

HSK法(Holcomb-Spearman-Karber)

必要条件

- ①試験試料総数： 100以上
- ②各暴露において最低20の反復実験
- ③最低5つの暴露条件

滅菌剤への暴露時間t [分]	暴露された試験試料数n	死滅した試験試料数r
$t_1(U_1)$	n_1	$r_1(r = 0)$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5(U_{k-1})$	n_5	r_5
$t_6(U_k)$	n_6	$r_6(r = n)$
t_7	n_7	$r_7(r = n)$

←全て生残 1組

←一部生残 2組

←全て死滅 2組

$$\chi_i = \frac{t_i + t_{i+1}}{2} \quad \gamma_i = \frac{r_{i+1}}{n_{i+1}} \cdot \frac{r_i}{n_1} \quad \longrightarrow \quad U_i = \chi_i \gamma_i$$

無菌までの平均時間 $U_{HSK} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i$

平均時間のD値 $\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$

平均時間 $\bar{D}$ の95%信頼区間 $D_{calc} = \bar{D} \pm 2SD$

分散 $V = a \left(\frac{2.3026}{\ln N_0 + 0.5772} \right)^2$
 $= a \left(\frac{\ln 10}{\ln N_0 + 0.5772} \right)^2 = a \left(\frac{1}{\frac{\ln N_0}{\ln 10} + \frac{0.5722}{\ln 10}} \right)^2$
 $= a \left(\frac{1}{\log N_0 + 0.2507} \right)^2$

D下限信頼限界

$$\frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \leq \bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \leq \frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$$

N_0 : インジケータ当たりの平均生菌数

U_i : i 番目の処理時間

U_k : 全て死滅の最初の暴露時間

d : 暴露と暴露間の時間

n : 各暴露の反復実験試料数(例えば20)

$\sum_{i=1}^{k-1} r_i$: U_2 から U_{k-1} までのネガティブの総和

0.2507 : オイラー定数

標準偏差 σ $SD = \sqrt{V}$

$$a = \sum_{i=2}^{k-1} \left[\frac{t_{i+1} - t_{i-1}}{2} \right]^2 \left[r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_i - 1)} \right]$$

$$= 0.25 \sum_{i=2}^{k-1} [t_{i+1} - t_{i-1}]^2 \left[r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_i - 1)} \right]$$

暴露試料の死滅確率 $p = \frac{r}{n}$ とすると、

確率の分散は $\frac{p(1-p)}{n-1} = \frac{r}{n} \frac{1}{(n-1)} \left(1 - \frac{r}{n} \right) = \frac{r(n-r)}{n^2(n-1)}$

D上限信頼限界

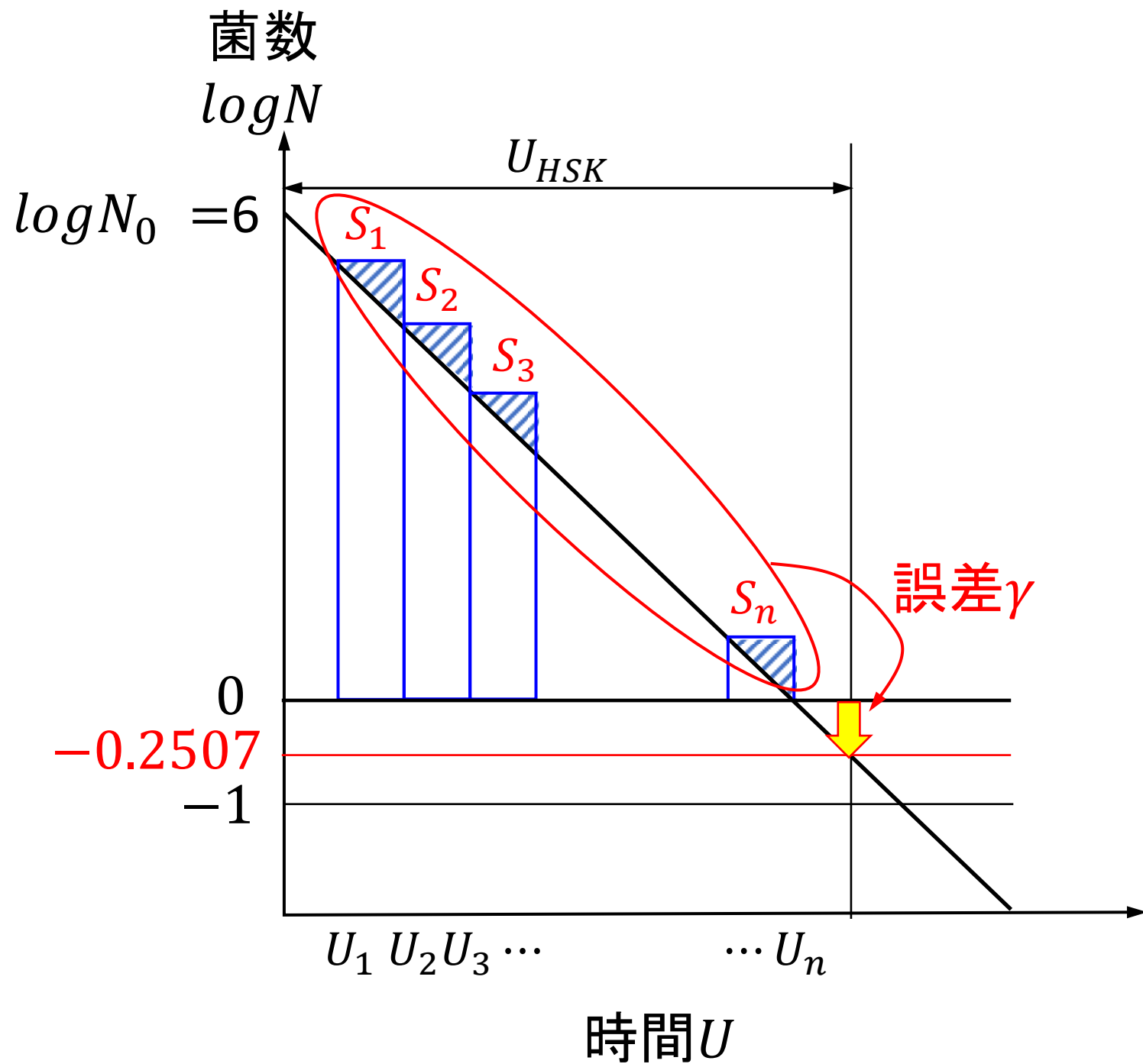
無菌までの平均時間

$$\begin{aligned} U_{HSK} &= \sum_{i=1}^{k-1} U_i \\ &= D(\log N_0 - \log N) \\ &= D(\log N_0 + \gamma) \end{aligned}$$

フラクショナルネガティブ法はある時間毎にサンプリングした計測値なので、短冊の代表値である。実際には連続したlogの直線上の値をとるはずである。したがって、短冊の面積の合計と直線下方の面積の間には誤差(斜線部)が生じる。

この誤差 $\gamma = 0.2507$ を菌数に加算する

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$$



参考1

オイラー一定数 γ

$$\gamma = \lim_{n \rightarrow \infty} \left\{ 1 + \frac{1}{2} + \frac{1}{3} + \cdots + \frac{1}{n} - \log n \right\}$$

$$= \sum_{k=1}^{n-1} \left\{ \frac{1}{k} - \log \left(1 + \frac{1}{k} \right) \right\} + \frac{1}{n}$$

$$= \sum_{k=1}^{n-1} \left[\frac{1}{k} - \{ \log(k+1) - \log k \} \right] + \frac{1}{n}$$

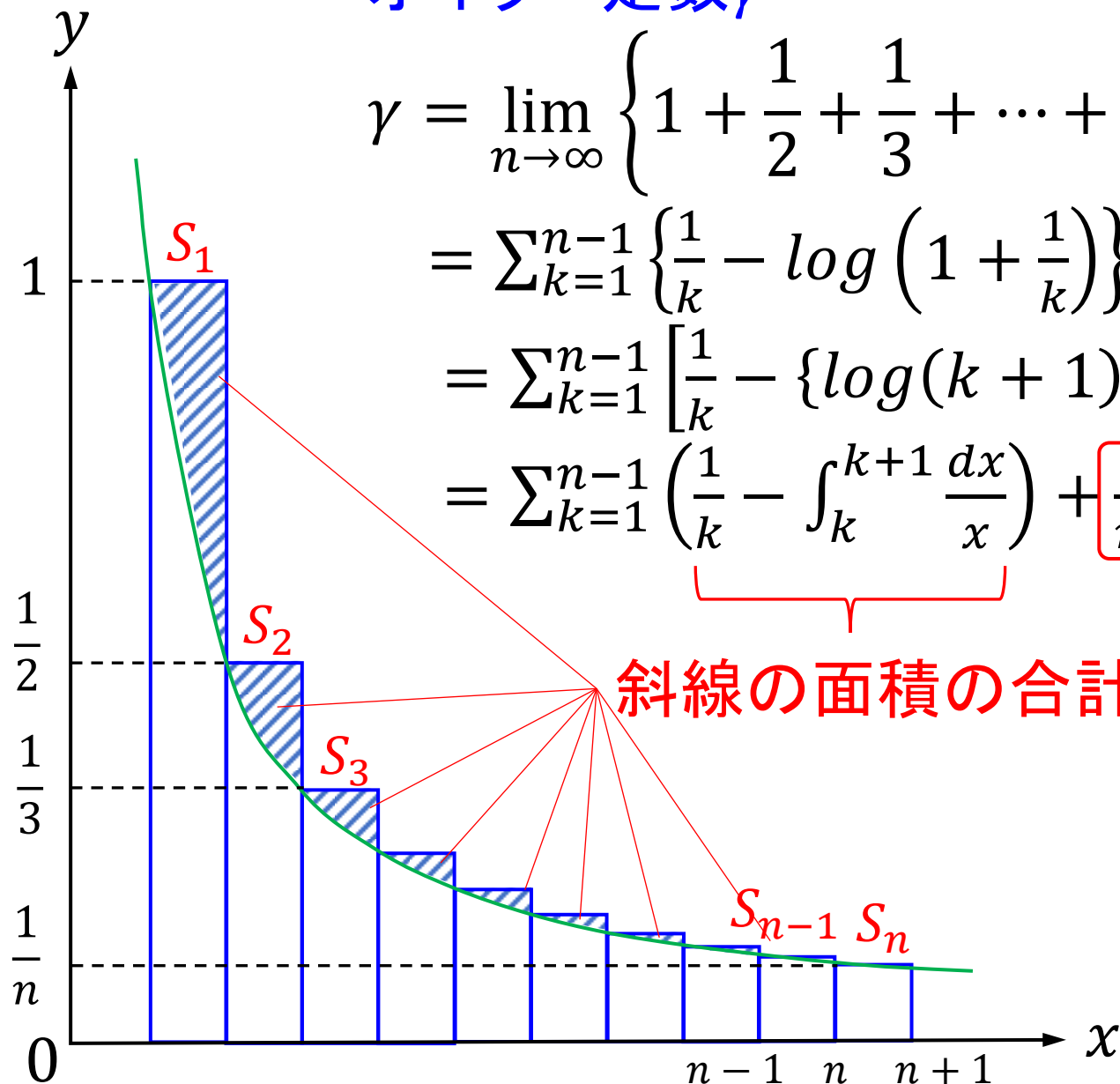
$$= \sum_{k=1}^{n-1} \left(\frac{1}{k} - \int_k^{k+1} \frac{dx}{x} \right) + \frac{1}{n} = 0.2507$$

$\ln n$ の場合は $\gamma = 0.5772$
 $0.5772 / \ln 10 = 0.2507$

$n \rightarrow \infty$ のとき $\frac{1}{n} \rightarrow 0$

斜線の面積の合計

短冊面積と $\log n$ の間には
0.2507の誤差がある



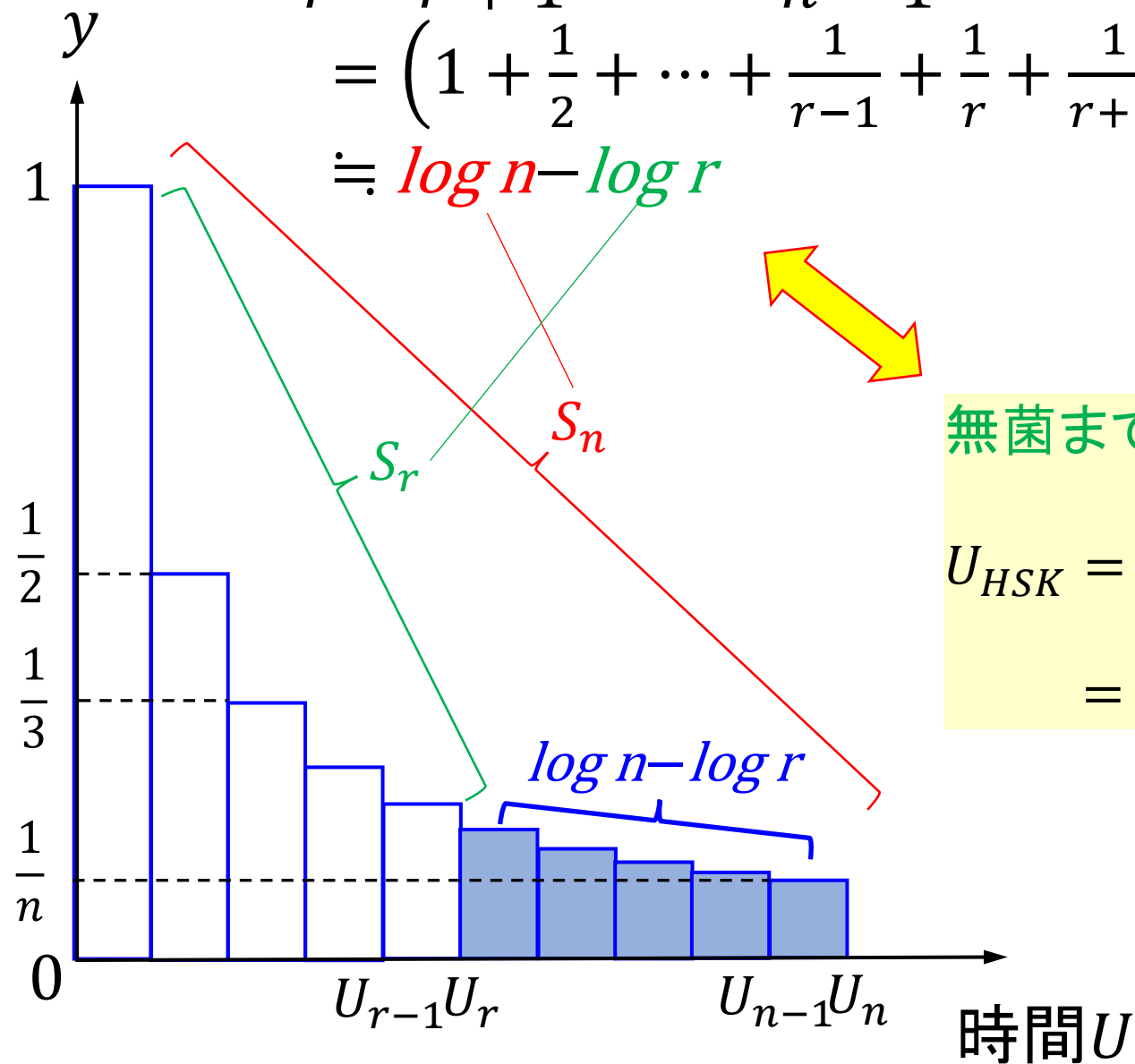
参考2

$$\frac{1}{r} + \frac{1}{r+1} + \dots + \frac{1}{n-1}$$

$$= \left(1 + \frac{1}{2} + \dots + \frac{1}{r-1} + \frac{1}{r} + \frac{1}{r+1} + \dots + \frac{1}{n-1}\right) - \left(1 + \frac{1}{2} + \dots + \frac{1}{r-1}\right)$$

$$\doteq \log n - \log r$$

$$1 + \frac{1}{2} + \dots + \frac{1}{n-1} \doteq \log n$$



無菌までの平均時間

$$U_{HSK} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i$$

$$= D(\log N_0 - \log N)$$

HSK法の計算事例

試料の菌数 $N_0 = 10^5$

滅菌剤への暴露時間t[分]	暴露された試験試料数n	死滅した試験試料数r
$t_1 = 10$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0$
$t_2 = 18$	$n_2 = 19$	$r_2 = 4$
$t_3 = 28$	$n_3 = 21$	$r_3 = 8$
$t_4 = 40$	$n_4 = 20$	$r_4 = 12$
$t_5 = 50$	$n_5 = 20$	$r_5 = 16$
$t_6 = 60$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20$
$t_7 = 70$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20$

χ_i	γ_i	U_i	a
$\chi_1 = \frac{10+18}{2} = 14$	$\gamma_1 = \frac{4}{19} - \frac{0}{20} = 0.21$	$U_1 = 14 \times 0.21 = 2.94$	
$\chi_2 = \frac{18+28}{2} = 23$	$\gamma_2 = \frac{8}{21} - \frac{4}{19} = 0.17$	$U_2 = 23 \times 0.17 = 3.91$	$(28 - 10)^2 \times 4 \left(\frac{19 - 4}{361 \times 18} \right) = 2.9917$
$\chi_3 = \frac{28+40}{2} = 34$	$\gamma_3 = \frac{12}{20} - \frac{8}{21} = 0.22$	$U_3 = 34 \times 0.22 = 7.48$	$(40 - 18)^2 \times 8 \left(\frac{21 - 8}{441 \times 20} \right) = 5.7070$
$\chi_4 = \frac{40+50}{2} = 45$	$\gamma_4 = \frac{16}{20} - \frac{12}{20} = 0.2$	$U_4 = 45 \times 0.2 = 9.0$	$(50 - 28)^2 \times 12 \left(\frac{20 - 12}{400 \times 19} \right) = 6.1137$
$\chi_5 = \frac{50+60}{2} = 55$	$\gamma_5 = \frac{20}{20} - \frac{16}{20} = 0.2$	$U_5 = 55 \times 0.2 = 11.0$	$(60 - 40)^2 \times 16 \left(\frac{20 - 16}{400 \times 98} \right) = 3.3684$
$\chi_6 = \frac{60+70}{2} = 65$	$\gamma_6 = \frac{20}{20} - \frac{20}{20} = 0$	$U_6 = 65 \times 0 = 0$	$(70 - 50)^2 \times 20 \left(\frac{20 - 20}{400 \times 19} \right) = 0$

無菌までの平均時間 $U_{HSK} = \sum_{i=1}^6 U_i = 2.94 + 3.91 + 7.48 + 9.0 + 11.0 + 0 = 34.33$

平均時間のD値 $\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507} = \frac{34.33}{5 + 0.2507} = 6.54 \text{分}$

分散 $a = 0.25 \sum_{i=2}^{k-1} [t_{i+1} - t_{i-1}]^2 \left[r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 n_{i-1}} \right] = 0.25 \times (2.9917 + 5.7070 + 6.1137 + 3.3684 + 0)$
 $= 4.5452$

$$V = a \left(\frac{2.3026}{\ln N_0 + 0.5772} \right)^2 = 4.5452 \left(\frac{2.3026}{\ln 10^5 + 0.5772} \right)^2 = 0.1649$$

D値の95%信頼区間

$$D_{calc} = \bar{D} \pm 2SD = \bar{D} \pm 2\sqrt{V} = 6.53 \pm 2 \times \sqrt{0.1649} = 6.54 \pm 0.8122$$

D下限信頼限界

D上限信頼限界

$$6.53 - 0.8122 \leq D \leq 6.53 + 0.8122$$

$$5.73 \text{分} \leq D \leq 7.35 \text{分}$$

LHSK法(Limited-Holcomb-Spearman-Karber)

- 条件
- ① $n_1 = n_2 = n_2 = \cdots = n_{k+1}$
 - ② $t_2 - t_1 = t_3 - t_2 = t_4 - t_3 = \cdots = t_{k+1} - t_k = d$

滅菌剤への暴露時間t [分]	暴露された試験試料数n	死滅した試験試料数r
$t_1(U_1)$	n_1	$r_1(r = 0)$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5(U_{k-1})$	n_5	r_5
$t_6(U_k)$	n_6	$r_6(r = n)$
t_7	n_7	$r_7(r = n)$

←③全て生残 1組

←④一部生残 2組

←⑤全て死滅 2組

無菌までの平均時間 $U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$

平均時間のD値 $\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$

U_k : 全て死滅の最初の暴露時間
 d : 暴露と暴露間の時間
 n : 各暴露の反復実験試料数(例えば20)
 $\sum_{i=1}^{k-1} r_i$: U_2 から U_{k-1} までのネガティブの総和

暴露試料の死滅確率 $p = \frac{r}{n}$ とすると、

確率の分散は $\frac{p(1-p)}{n-1} = \frac{r}{n} \frac{1}{(n-1)} \left(1 - \frac{r}{n}\right) = \frac{r(n-r)}{n^2(n-1)}$

D値の分散 $V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i)$

標準偏差 σ $SD = \sqrt{V}$

平均時間 $\bar{D}$ の95%信頼区間 $D_{calc} = \bar{D} \pm 2SD$

D下限信頼限界

D上限信頼限界

$$\frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \leq \bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \leq \frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$$

LHSK法の計算事例

試料の菌数 $N_0 = 10^6$

$d=2$ ↑

滅菌剤への暴露時間t[分]	暴露された試験試料数n	死滅した試験試料数r
$t_1 = 20(U_1)$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0(r = 0)$
$t_2 = 22$	$n_2 = 20$	$r_2 = 1$
$t_3 = 24$	$n_3 = 20$	$r_3 = 7$
$t_4 = 26$	$n_4 = 20$	$r_4 = 15$
$t_5 = 28(U_{k-1})$	$n_5 = 20$	$r_5 = 19$
$t_6 = 30(U_k)$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20(r = n)$
$t_7 = 32$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20(r = n)$

無菌までの平均時間

$$U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i = 30 - \frac{2}{2} - \frac{2}{20} \times (0 + 1 + 7 + 15 + 19) = 24.8$$

平均時間のD値

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507} = \frac{24.8}{\log_{10} 10^6 + 0.2507} = \frac{24.8}{6 + 0.2507} = 3.97 \text{分}$$

分散

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum_{i=1}^{k-1} n(n - r_i) = \frac{2^2}{20^2(20-1)} \times \{(1 \times 19) + (7 \times 13) + (15 \times 5) + (19 \times 1)\} = 0.1074$$

標準偏差σ

$$SD = \sqrt{V} = \sqrt{0.1074} = 0.3227$$

D下限信頼限界

$$\frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \leq \bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \leq \frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$$
$$\frac{24.8 - 2 \times 0.3227}{6 + 0.2507} \leq \bar{D} = 3.97 \leq \frac{24.8 + 2 \times 0.3227}{6 + 0.2507}$$

D上限信頼限界

D値の95%信頼区間
 $3.86 \text{分} \leq \bar{D} = 3.97 \text{分} \leq 4.07 \text{分}$