

＝技 術＝

最確数(MPN)の計算方法およびその推定プログラムの開発

藤川 浩

(東京農工大学農学部)

(受付: 平成28年11月30日)

(受理: 平成29年1月31日)

Calculation of MPN and the Development of a Computer Program for MPN Enumeration

Hiroshi FUJIKAWA

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183-8509)

1. 緒 言

最確数法 (Most probable number method: MPN法) は食品、飲料水などの試料に含まれる対象微生物が低濃度に存在する場合に用いられる、確率論に基づいた微生物濃度の推定方法である。MPN法では寒天培地を用いた通常のコロニー計数法よりも低濃度の微生物が測定できる。最近では、自動化されたMPN法による微生物濃度測定装置も開発されている⁴⁾。

一般にMPN法では試料 (食品乳剤または液状食品) を3段階またはそれ以上にわたって連続希釈し、例えば原液で10, 1, 0.1 ml/ずつ選択培地の入った複数の試験管に接種する。固形食品を10%乳剤として接種した場合、乳剤10 mlは食品1 gに相当する。接種する試験管数は各段階で通常3本または5本である。培養後、生きた対象微生物が各試験管中に存在するかを微生物学的に調べる。そのために通常は選択平板培地を用いて分離するが、PCR法などの遺伝子学的手法もある⁵⁾。

微生物試験の結果、低希釈倍率から高希釈倍率の試料について陽性試験管数が順に3, 2, 0のように得られる。この陽性試験管数の組み合わせからMPN表を用いてMPNを求めることができる。MPNは試料単位量 (1 mlまたは1 g) 当たりの推定数として表される。

しかし、MPNはどのように推定されているのか、その原理は何かを多くのユーザーは知らずに使っていると考えられる。また、4本など通常のMPN表にない試験管本数で測定した場合は値が得られない。したがって、ここではMPN法の原理を解説するとともに、実際の計算例を示す。さらに、MPNを推定するコンピューター

プログラムを開発したので、その概要を示す。このプログラムは質問形式で操作も簡単であり、通常のMPN表にない試験管本数にも適用できる。なお、今回、計算およびプログラム開発には表計算ソフトウェアExcel 2010を用いた。

2. MPN法の原理

MPNは確率論に基づいて計算される。いくつかの計算方法があるが、ここではde Man¹⁾によって解説された方法を使う。この方法は複数あるMPNの解析法の中で確率論に基づいた最も基本となる方法である。すなわち、試料中に低濃度の対象微生物が存在する場合、その濃度はポアソン分布に従うと考えられる。そこで、濃度 (ポアソン分布の平均) を μ (cell/gまたはcell/ml) とし、 a をその試験管に入れた試料量 (gまたはml) とすると、その試料に対象微生物が r 個の細胞が存在する確率 $f(r)$ は式(1)で表される。

$$f(r) = \frac{(\mu \times a)^r}{r!} \exp(-\mu \times a) \quad (1)$$

ここで $\exp$ は指数関数を、 $!$ は階乗を示す。そこで、ある試験管に対象微生物が存在しない確率は、式(1)に $r=0$ を代入して、 $\exp(-\mu a)$ となる。したがって、その試験管に対象微生物が1個以上存在する確率は、1から存在しない確率を引いて $1 - \exp(-\mu a)$ となる。対象微生物が1個以上存在する試験管はMPN法で陽性となると考えられるので、希釈段階 i である試験管が陽性となる確率 p_i は式(2)で表される。

$$p_i = 1 - \exp(-\mu \times a_i) \quad (2)$$

次に、希釈段階 i で総試験管数 n_i の中で陽性試験管数

が x_i となるできごと（事象）は2項分布に従うため、その確率 p_i は式(3)で表される。

$$p_i = n_i C_{x_i} [(1 - \exp(-\mu \times a_i))^{x_i} [\exp(-\mu \times a_i)]^{n_i - x_i} \quad (3)$$

Cは組合せCombinationを示す。 n_i は通常3あるいは5（本）である。

さらに全希釈段階で、ある陽性試験管数の組み合わせとなる確率は各希釈段階での確率 p_i の積であるから、式(4)のように表される。

$$p = \prod_{i=1}^m n_i C_{x_i} [(1 - \exp(-\mu \times a_i))^{x_i} [\exp(-\mu \times a_i)]^{n_i - x_i} \quad (4)$$

ここで Π は総乗（すべての積）を示す。 m は連続した希釈段階の数を表し、通常3である。

式(4)で示される確率 p は n と m が通常決まるため、各希釈段階 i での陽性試験管数 x_i およびその試料の微生物濃度 μ の関数と考えられる。そこで、得られた陽性試験管数から最も高い確率 p を与える濃度 μ が求めるMPNとなる。この方法を最尤法と呼ぶ。

例として3段階希釈-5本法でMPNを考えてみる。各試験管に10%乳剤試料を1 ml (0.1 g), 0.1 ml (0.01 g)および0.01 ml (0.001 g)接種したとする。陽性試験管数の結果が低希釈倍率の試験管から順に5-2-0となったとしよう。この場合の各濃度 μ に対する確率を表すとFig. 1のような曲線が表される。これを確率密度曲線という。

この図に示すように微生物濃度 μ が49 cell/gのときが最大の確率を示すため、この濃度がMPNとなる。このようにして、試験管陽性数の組み合わせに対してMPNが決まる。

式(4)で示される確率 p は各希釈倍率での陽性試験管数によって大きく変動する。その例をFig. 2に示す。ここではFig. 1と同じ条件での三つの結果を示す。図中の数字は各希釈での陽性数を示す。なお、5-2-0はFig. 1の再掲である。Fig. 2に示した3-2-0および5-4-2のような非常に低いピークであっても、その位置からMPNは求められる。

このようにして各希釈倍率での陽性試験管数におけるMPNをまとめた表がMPN表である。ここで求めたMPNをアメリカFDAのBacteriological Analytical Manual (BAM) (Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. <http://www.fda.gov/Food/Food-ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>)で公表されている値と比較すると、Table 1に示すように一致している。この表でde Manの列は今回計算した値を示す。なお、上記の方法では微生物数を整数1, 2, 3, …として計算しているが、BAMでは1.8のように小数点以下第1位までとしている。

3. 信頼区間

信頼区間はde Man¹⁾の方法では次のようにして求められる。例えば95%信頼区間の場合、確率密度曲線において微生物濃度が0および $+\infty$ の両側から確率を積算していき、その和がそれぞれ2.5%となる濃度が信頼区間に相当する。Fig. 1の例で95%信頼区間は2本の白抜きの矢印の間の区間、すなわち22と172の区間となる。また、Fig. 2の5-4-2のように非常になだらかなピークの確率曲線もある。この場合は当然95%信頼区間も96から351と広い。

信頼区間の求め方にはいくつか方法があり、どれが最も良いかは議論されている。de Manはその後、各種の特殊な陽性試験管数の組み合わせにも対応するため、信頼区間に修正を加えている^{2,3)}。

ここでは基本となるde Man¹⁾の方法で求めた信頼区間をde ManとしてTable 1に示す。参考としてBAMの示す信頼区間もTable 1に示す。このBAMの信頼区間はde Man³⁾の数値を用いている。de Man¹⁾とBAMの数値に上限と下限で差が多少認められる(Table 1)。

一方、MPNの計算方法はほかにもあり、BAMではMPNとその信頼区間を求める推定プログラムを公表している。このプログラムでFig. 1の5-2-0の例を解析すると、MPNは今回計算した値と同じ49となる(Fig. 3)。一方、その95%信頼区間は15から158の区間となる。

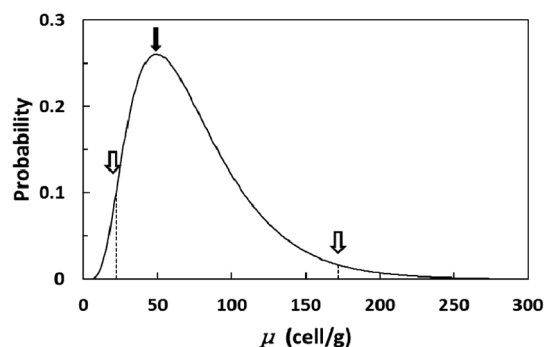


Fig. 1. MPN法における確率密度曲線
矢印（黒色）は確率が最大の値を示す。矢印（白色）は確率の和がそれぞれ片側2.5%の位置を示す。

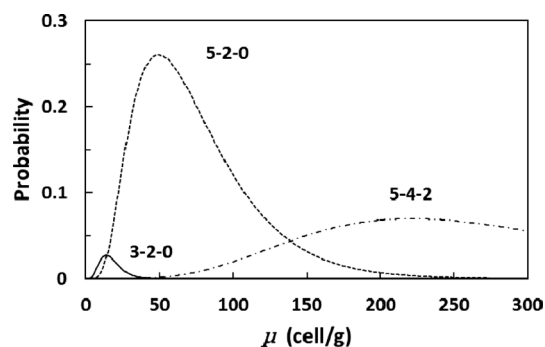


Fig. 2. 各種の陽性試験管数による確率密度曲線

Table 1. MPN表 (5本法, 一部)

陽性試験管数			MPN/g		信頼区間			
					下限(2.5%)		上限(97.5%)	
0.1 g	0.01 g	0.001 g	de Man*	BAM**	de Man	BAM	de Man	BAM
0	0	0	0	<1.8	1	—	7	6.8
0	0	1	2	1.8	1	0.09	10	6.8
0	1	0	2	1.8	1	0.09	10	6.9
0	1	1	4	3.6	1	0.7	13	10
0	2	0	4	3.7	1	0.7	13	10
0	2	1	6	5.5	2	1.8	16	15
0	3	0	6	5.6	2	1.8	16	15
1	0	0	2	2	1	0.1	11	10
1	0	1	4	4	1	0.7	15	10
1	0	2	6	6	2	1.8	18	15
1	1	0	4	4	1	0.7	15	12
1	1	1	6	6.1	2	1.8	18	15
1	1	2	8	8.1	3	3.4	21	22
1	2	0	6	6.1	2	1.8	18	15
1	2	1	8	8.2	3	3.4	21	22
1	3	0	8	8.3	3	3.4	21	22
1	3	1	10	10	5	3.5	25	22
1	4	0	11	11	5	3.5	25	22
2	0	0	4	4.5	1	0.79	17	15
2	0	1	7	6.8	2	1.8	20	15
2	0	2	9	9.1	4	3.4	24	22
2	1	0	7	6.8	3	1.8	21	17
2	1	1	9	9.2	4	3.4	24	22
2	1	2	12	12	5	4.1	28	26
2	2	0	9	9.3	4	3.4	25	22
2	2	1	12	12	5	4.1	28	26
2	2	2	14	14	7	5.9	32	36
2	3	0	12	12	5	4.1	29	26
2	3	1	14	14	7	5.9	33	36
2	4	0	15	15	7	5.9	33	36

* de Man¹⁾の方法による値を示す.

**アメリカFDAのBacteriological Analytical Manualに示されている値を示す.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Inoculum	Number	Positive	Most		CONCENTRATION		
2	Per Tube	of Tubes	Tubes	Likely		MPN =	49.322	
3	0.1	5	5	5		LogMPN=	1.693	
4	0.01	5	2	2				
5	0.001	5	0	0		95% CONFIDENCE LIMITS		
6				0			LOW	HIGH
7				0		MPN =	15.456	157.611
8				0		LogMPN=	1.189	2.197

Fig. 3. MPN推定プログラムの解析例 (BAM)

(Fig. 3). なお、このプログラムによる信頼区間はBAMのMPN表とも多少異なることがあとと記されている。

4. MPN法での注意点

実際のMPN法では通常の陽性試験管数の組み合わせでない結果となることがある。また、どの希釈段階の陽性試験管数をMPNに用いるかに迷うこともある。これらについての対応法はBAMに書かれている。例えば、5段階-5本法で4-3-0-1-1となった場合は下線部を4-3-2とし、5-4-3-0となった場合は下線部の5-4-3を選ぶ。これら連続した三つの数値からMPN表あるいは推定プログ

Fig. 4. MPN推定プログラムの質問ユーザーフォーム

[illegible]

Fig. 5. MPN推定プログラムの解析結果

ラムを使って求めることができる。

5. MPN推定プログラムの開発

これまでde Manの方法¹⁾に基づいたMPN推定法を解析してきた。筆者は表計算ソフトウェアExcel 2010を用いてこの方法に基づいたMPN推定プログラムを開発したので、それを紹介したい。このプログラムでは最大接種量および各希釈段階での接種試験管数を自由に選択できる。なお、本プログラムはBAMの推定プログラムと同様、固形食品の10%乳剤を試料として作られている。なお、このプログラムはマイクロソフト社のVisual Basic Application (VBA)を使って作られているので、使用するに当たってはVBAが使えるように設定する必要がある。

本プログラムはStartボタンを押して、解析を始める。このボタンを押すと、質問のユーザーフォームが現れるので、例えばFig. 4のように数値を入力する。この例では10%乳剤の最大接種量を1 ml (0.1 g)とした。したがって接種量は次いで0.1 ml (0.01 g)と0.01 ml (0.001 g)である。接種する試験管本数は各5本で、陽性試験管数は最大接種量の試験管から順に5-3-0とした。入力を間違えた場合はリセットボタンを押す。入力が終わったら最後にOKボタンを押す。

その解析結果は瞬時に画面に現れる。上記の例では Fig. 5 のように MPN は 79 MPN/g, 95% 信頼区間は 33 か

ら245 MPN/gとなる。この信頼区間はこれまで説明してきたde Manの方法¹⁾に基づいて解析しているので、注意していただきたい。なお、試料が10%乳剤ではなく、液体の場合は数値を入力して得られた値を10倍すればよい(単位: MPN/ml)。また、本プログラムでは各微生物濃度に対する確率密度曲線がFig. 1に示したようなグラフとして示される。

以上、MPNの計算方法と推定プログラムについて説明した。このプログラムは無償で配布する予定である。

文 献

- 1) de Man, J. C.: The probability of most probable number. Eur. J. Appl. Microbiol., **1**, 67-78 (1975)
- 2) de Man, J. C.: MPN tables for more than one test. Eur. J. Appl. Microbiol., **4**, 307-316 (1977).
- 3) de Man, J. C.: MPN tables, corrected. Eur. J. Appl. Microbiol., **17**, 301-305 (1983).
- 4) Owen, M., Willis, C. and Lamph, D.: Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. J. Appl. Microbiol., **109**, 1810-1816 (2010).
- 5) Wright, A. C., Garrido, V., Debuex, G., Farrell-Evans, M., Mudbidri, A. A., and Otwell, W. S.: Evaluation of postharvest-processed oysters by using PCR-based most-probable-number enumeration of *Vibrio vulnificus* bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **73**, 7477-7481 (2007).