

[原 著]

ヒト皮膚常在細菌の細菌数測定法に関する臨床研究

蓮沼智子・中谷比呂志・高附真樹子・多賀政晴・茂貫洋子・青木綾子・金 徹雄・飯島 肇
北里大学臨床薬理研究所 バイオイアトリックセンター

(平成24年1月13日受付, 平成24年5月18日受理)

米国食品医薬品局 (FDA: Food and Drug Administration) によって開発されたスパイラル・プレーティング法は, 食品分野で広く用いられている方法であるものの, 医薬品分野では十分に活用されていない。また, スパイラル・プレーティング法では試料1 ml当たり約500 CFU以下の細菌数を測定することは困難であり, 幅広い細菌数の測定範囲が必要な生体消毒薬の有効性評価等の用途では, 一部寒天平板表面塗抹法もしくは寒天平板混積法との併用が必要である。そこで今回, スパイラルプレーターを用いる寒天平板表面塗抹法に, 細菌数が少ない場合でも測定が可能となるようコンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法を併用する方法 (方法1) と, 従来法である寒天平板混積法 (方法2) により, 日本人の鼠径部から採取した細菌サンプルを培養し, 方法1で細菌数を測定することが可能かどうか確認した (目的1の試験)。さらに, 方法1と方法2の操作に要する時間を比較することにより, 方法1の利便性を確認した (目的2の試験)。その結果, 方法1は方法2と同様に, サンプル中の細菌数を精度良く測定できる可能性が示された。また, 方法1は方法2の作業を簡易化, 迅速化および省力化することが可能であった。

Key words: 皮膚常在細菌, 細菌数測定, スパイラルプレーター

序 文

食品や医薬品分野で行われる微生物検査のうち, 細菌数の測定には寒天平板混積法や寒天平板表面塗抹法が従来から用いられてきた。しかし, これらの方法は, 多数の希釈菌液の調製を要するなど作業が煩雑であるため, 作業を簡易化, 迅速化および省力化することを目的として, スパイラルプレーターを用いてシステム化された細菌数測定法 (スパイラル・プレーティング法) が米国食品医薬品局 (FDA: Food and Drug Administration) によって開発された¹⁾。このスパイラル・プレーティング法は, 本邦では, 食品衛生検査指針に収載されており²⁾, 食品分野で広く用いられている方法であるものの, 医薬品分野では十分に活用されていない。また, スパイラル・プレーティング法で

は試料1 ml当たり約500 CFU以下の細菌数を測定することは困難²⁾であり, 幅広い細菌数の測定範囲が必要な生体消毒薬の有効性評価等の用途では, 一部寒天平板表面塗抹法もしくは寒天平板混積法との併用が必要である。米国では, コンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法およびスパイラルプレーターを用いる寒天平板表面塗抹法を併用して, ヒトの手指から採取した細菌サンプルを培養し, サンプル中の細菌数を測定した報告がある³⁾。

そこで今回, スパイラルプレーターを用いる寒天平板表面塗抹法に, 細菌数が少ない場合でも測定が可能となるようコンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法を併用する方法 (方法1) と, 従来法である寒天平板混積法 (方法2) により, 日本人の鼠径部 (被験部位) から採取した細菌サンプルを培養し, 方法1で細菌数を測定することが可能かどうか確認した (目的1の試験)。さらに, 方法1と方法2の操作に要する時間を比較することにより, 方法1の利便性を確認した (目的2の試験)。

著者連絡先: (〒108-8642) 東京都港区白金5-9-1
北里大学臨床薬理研究所 バイオイアトリックセンター
飯島 肇
TEL: 03-5791-6347
FAX: 03-3440-5469
E-mail: iijima-h@insti.kitasato-u.ac.jp

材料と方法

1. 目的1の試験

本研究は、オープン試験（介入を伴う研究）として、当施設において2011年7月～8月に実施した。実施に先立って、北里大学白金治験審査委員会の承認を得るとともに、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日付厚生労働省告示第415号）、関係法令および臨床研究実施計画書を遵守して実施した。

1.1 対象

同意取得時の年齢が20歳以上の健康成人で、被験部位が本研究に適した正常な皮膚の状態にある者を対象とした。ただし、細菌サンプル採取日から2週間前までにプールに入浴または公衆浴場に入浴した者、細菌サンプル採取日の前日に入浴（シャワーも含む）した者、細菌サンプル採取日から1週間前までに抗菌剤および抗生物質、ステロイド剤、または被験部位の皮膚常在細菌叢に影響を及ぼす薬剤（一般用医薬品を含む）を使用した者、その他研究責任医師または研究分担医師が不適格と判断した者は対象から除外した。

目標被験者数は5名とした。

1.2 同意取得

研究責任医師または研究分担医師は、対象となる被

験者に対して十分に研究内容を説明し、研究への参加について、被験者本人の自由意思による同意を文書にて取得した。

1.3 研究スケジュール

本研究のスケジュールをTable 1に示した。被験者の同意取得後、研究責任医師または研究分担医師による診察で問題ないと判断した被験者について、被験部位にテンプレートおよびサージカルマーカーを用いて細菌サンプル採取区画をマーキングした。1被験者当たりの細菌サンプル採取区画は、右鼠径部のNo. 1～5（合計5区画）とし、1区画当たりの大きさは2.5 cm × 2.5 cmとした。細菌サンプルは、これら5区画のそれぞれから採取した。被験部位および細菌サンプル採取区画のマーキングの位置をFig. 1に示した。

被験部位のマーキングが終了した被験者はいったん帰宅させ、試験日前日の入浴（シャワーを含む）を禁止したうえで来所させた。その後、選択基準を満たし、かつ除外基準に抵触していないことを確認したうえで本研究に登録した。

登録した被験者に対して診察を行い、研究責任医師または研究分担医師が問題ないと判断した被験者から細菌サンプルを採取し、計数培地で培養後、細菌数〔皮膚1 cm²当たりの菌数 (Log₁₀ CFU/cm²)〕を算出

Table 1. Outline of the study schedule

	Informed consent day					Sampling day				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Institution visit	●					●				
Explanation and obtaining the written informed consent		●								
Confirmation of subject characteristics		●								
Confirmation of inclusion and exclusion criteria							●			
Subject registration								●		
Marking the sampling sites				●						
Sampling									●	
Washing the test site										●
Leaving the institution					●					●
Evaluation of symptoms and signs			●				●	●	●	
Evaluation of skin findings (test site)			●				●	●	●	
Identification of adverse events							●	—	●	



Fig. 1. Test site and sampling areas

Test site was located in the right groin. Five sampling areas (Nos. 1 to 5) were marked on the test site of each subject with a template and surgical marker. Bacterial samples were collected from each of the sampling areas. This figure was derived from the figure in the ASTM International's official compendium (E1173-01).⁶⁾

した。細菌サンプル採取後、再度診察を行い、問題がないことを確認して試験を終了した。

1.4 細菌サンプル採取方法

FDAのOver-the-Counter局所ヘルスケア消毒薬製品の暫定的最終モノグラフ (TFM: Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Tentative Final Monograph for Health-Care Antiseptic Drug Products, 21 CFR Part 333)⁴⁾を参考にしたカップスクラブ法⁵⁾により細菌サンプルを採取した。内径の直径が2.1 cm, 高さが4.5 cmの滅菌スクラブカップをサンプル採取区画の皮膚にしっかりと押しつけて固定し, TFMおよび米国材料試験協会 (ASTM International) の公定書⁶⁾に準拠して無菌調製したサンプリング液 (組成は以下のとおり) 2.5 mlをスクラブカップ内に注入した。その後, 滅菌ラバーポリスマンを用いて, スクラブカップ内の皮膚を適度な圧力をかけながら1分間擦った。滅菌スポイトでスクラブカップ内のサンプリング液を回収し, 再度スクラブカップ内へのサンプリング液の注入から回収までの手順を行い, 先に回収したサンプリング液と混合して細

菌サンプルの原液とした。

〈サンプリング液の組成〉

- ポリソルベート 80 (松本油脂製薬) : 100.0 g
 - チオ硫酸ナトリウム水和物 (和光純薬工業) : 5.00 g
 - リン酸二水素カリウム (和光純薬工業) : 0.4000 g
 - Triton X-100 (和光純薬工業) : 1.00 g
 - 無水リン酸一水素ナトリウム (和光純薬工業) : 10.1 g
 - 大豆レシチン (日清オイリオグループ) : 20.0 g
 - Polyoxyethylene (20) cetyl ether (日本ケミカルズ) : 50.0 g
 - 0.1 N水酸化ナトリウム (和光純薬工業の水酸化ナトリウムから調製) : 適量 (pH 7.8~7.9に調整)
- 大塚蒸留水 (大塚製薬工場) にて全量1,000 mlに調製

1.5 細菌サンプルの処理および培養方法

(1) 希釈菌液の調製

細菌サンプルの原液に, TFMおよびASTM Internationalの公定書に準拠して無菌調製した希釈液 (組成は以下のとおり) を加えて2倍希釈菌液を調製し, さらに方法1で用いる100倍希釈菌液および方法2で用いる20~200,000倍までの10倍希釈菌液を調製した。

〈希釈液の組成〉

- ポリソルベート 80 : 100.0 g
 - チオ硫酸ナトリウム水和物 : 5.00 g
 - リン酸緩衝液ストック溶液 (pH 7.2) [リン酸二水素カリウム : 34.0 g, 1 N水酸化ナトリウム溶液 (和光純薬工業の水酸化ナトリウムから調製) : 適量, 大塚蒸留水にて全量1,000 mlに調製] : 1.25 ml
 - 大豆レシチン : 20.0 g
 - Polyoxyethylene (20) cetyl ether : 50.0 g
- 大塚蒸留水にて全量1,000 mlに調製

(2) 計数培地の調製

直径90および150 mmのシャーレに, TFMおよびASTM Internationalの公定書に準拠して調製したトリプティックソイ寒天培地 (組成は以下のとおり) を加熱溶解して流し込み, 冷却固化させたものを方法1で用いる計数培地とした。また, 加熱溶解したトリプティックソイ寒天培地を固化しないよう保温したものを方法2で用いる計数培地とした。

〈トリプティックソイ寒天培地の組成〉

- Tryptic soy agar (日本ベクトン・ディッキンソン) : 40.0 g
- 不活化剤 [ポリソルベート 80 : 100.0 g, 大豆レシチン : 11.67 g, チオ硫酸ナトリウム水和物 : 5.00

g, Tamol NN8906 (BASF ジャパン) : 10.0 g, 大塚
蒸留水: 全量 1,000 ml に調製] : 100 ml

–大塚蒸留水: 900 ml

(3) 細菌サンプルの塗抹および培養 (方法1)

ディスポコンラージ棒 (株式会社アテクト) を用いて、計数培地 (直径 150 mm のシャーレ) 2 枚に細菌サンプルの 2 倍希釈菌液 1 ml ずつを、およそ 15~30 秒間かけて計数培地全面にまんべんなく塗抹した。

スパイラルプレーター [EDDY JET (IUL, S.A.)] を用いて、計数培地 (直径 90 mm のシャーレ) 2 枚に細菌サンプルの 2 倍希釈菌液を 50 μ l ずつ塗抹した。同様に、新たな計数培地 (直径 90 mm のシャーレ) 2 枚に 100 倍希釈菌液を 50 μ l ずつ塗抹した。

細菌サンプルを塗抹した計数培地は、35°C で 2 日間培養した。

(4) 細菌サンプルの播種および培養 (方法2)

細菌サンプルの 2~200,000 倍希釈菌液を直径 90 mm のシャーレ 2 枚にそれぞれ 1 ml ずつ分注した後、恒温槽で保温したトリプティックソイ寒天培地を 15 ml ずつ速やかに分注し混和した。

細菌サンプルを播種した計数培地は、室温で固化させた後、35°C で 2 日間培養した。

1.6 コロニー数の計数および細菌数の算出方法

方法1および方法2により培養した計数培地を測定検体として用いた。各希釈倍率から 2 検体ずつ発生する測定検体のコロニー数を目視またはコロニーカウンター [ProtoCOL2 (IUL, S.A.)] で計数し、2 検体の平均コロニー数が 30.0~300.0 となる希釈倍率の測定検体を優先的に採用して生菌数 (CFU/ml) を求めた。さらに次式から細菌数 [皮膚 1 cm² 当たりの菌数 (Log₁₀ CFU/cm²)] を算出した。

細菌数 [皮膚 1 cm² 当たりの菌数 (Log₁₀ CFU/cm²)] = Log₁₀ [採用した測定検体中の生菌数 (CFU/ml) × 5.0 ml (回収した細菌サンプルの液量) ÷ 細菌サンプル採取面積 (3.46 cm²)]

1.7 評価項目および評価方法

(1) 細菌数測定の可否

評価項目は、方法1および方法2により得られた細菌サンプル中の細菌数とした。細菌サンプル中の細菌数の散布図を作成するとともに、校正直線^{7,8)}を推測し、方法1による細菌数の測定が可能かどうかを評価した。

(2) 安全性

評価項目は、自覚症状・他覚所見、皮膚所見とした。発現した有害事象の内容を踏まえて、医学的見地から安全性を評価することとした。

1.8 統計解析用アプリケーションソフトウェア

統計解析には、以下のアプリケーションソフトウェアを用いた。

–Windows 版 SAS システム リリース 9.2TS レベル 2M3 (SAS Institute Japan 株式会社)

–Microsoft Office Professional Edition 2007 (マイクロソフト株式会社)

2. 目的2の試験

本試験は、当施設において 2011 年 7 月~8 月に実施した。当施設において、臨床検査業務に従事する職員を操作時間の測定対象者 (測定対象者) として 6 名指名した。本試験は、目的1の試験における細菌サンプルの原液を生理食塩液に置き換えて実施し、方法1では生理食塩液の 50 倍希釈液を調製し、方法2では生理食塩液の 10~100,000 倍までの 10 倍希釈液を調製した。その他の材料および方法は目的1の試験と同様とした。

2.1 方法1および方法2の操作時間の測定

(1) 測定対象者は、方法1および方法2における試験液の調製開始から塗抹または播種終了までの操作を、無作為に割付けた割付表に従ってそれぞれ 1 回ずつ実施した。なお、方法1は、コンラージ棒を用いる方法、スパイラルプレーターを用いる方法の順に操作を実施した。

(2) 方法1および方法2について、試験液の調製開始から塗抹または播種終了までの操作時間を測定した。なお、方法1の操作時間は、コンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法とスパイラルプレーターを用いる寒天平板表面塗抹法の各操作時間を合計した時間とした。

2.2 評価項目および評価方法

評価項目は、試験液の調製開始から塗抹または播種終了までの操作時間とした。方法1の利便性は、方法1および方法2の操作時間の平均値を分散分析により比較することで評価した。

結 果

1. 目的1の試験

1.1 解析対象

本研究に登録された被験者は 5 名であった。すべての被験者の細菌サンプル採取区画から合計 25 の細菌サンプルが得られた。被験者背景を Table 2 に示した。

(1) 細菌数測定の可否

細菌サンプル採取区画を解析単位とし、細菌サンプルの採取を行った 5 名の被験者の細菌サンプル採取区

Table 2. Subject demographics

Subject number	Gender	Age (yrs)	Height (cm)	Weight (kg)
K-01	Male	21	168.8	54.8
K-02	Male	21	166.6	58.4
K-03	Male	25	168.5	58.9
K-04	Male	22	171.8	55.3
K-05	Male	36	166.9	71.7

Table 3. Descriptive statistics of bacterial count

Descriptive statistics	Method 1	Method 2
Number of bacterial samples	25	25
Mean	4.411	4.398
Standard deviation	0.988	0.991
Maximum	6.2	6.26
Upper quartile	5.2	4.65
Median	4.34	4.3
Lower quartile	3.67	3.73
Minimum	2.79	2.55

Unit of the calculated values is "Log CFU" except the number of bacterial samples.

画（総数25）を主解析対象集団とした。

(2) 安全性

被験者を解析単位とし、細菌サンプルの採取を行った5名の被験者を安全性の解析対象集団とした。

1.2 細菌数の測定結果

細菌数 [皮膚 1 cm²当たりの菌数 (Log₁₀ CFU/cm²)], 図表中では「Log CFU」と表記]の記述統計量をTable 3に示した。方法1および方法2の細菌数の平均値±標準偏差は、それぞれ4.411±0.988, 4.398±0.991であった。

細菌数の散布図, 推測した較正直線および残差プロットをFig. 2に示した。また, 較正式の推定値をTable 4に示した。較正式の切片は-0.029, 傾きは1.004と推定し, これらのノンパラメトリックbootstrapによる95%信頼区間に切片0, 傾き1を含む結果を得た。残差プロットにおいて, 極端な外れ値を認めず, 等分散性および独立性の仮定に問題はなかった。

2. 目的2の試験

2.1 解析対象

方法1および方法2について, 測定対象者6名分の操作時間が得られ解析対象となった。

2.2 操作時間の測定結果

操作時間の記述統計量をTable 5に示した。操作時間(分)の平均値±標準偏差は, 方法1で14.861±

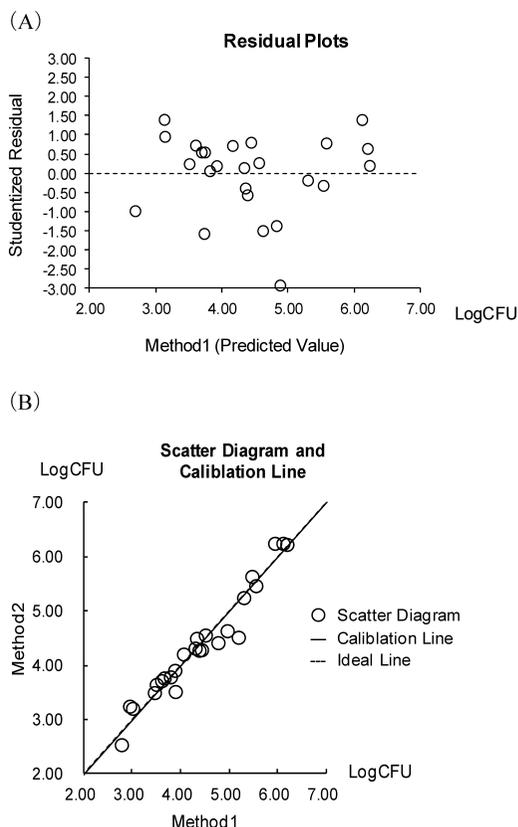


Fig. 2. Scatter diagram of bacterial count, calibration line, and residual plots

Upper figure, (A), shows the residual plots and the lower figure, (B), shows the scatter diagram and calibration line. The method 1 is the combination method of the agar plate method using a bacterial spreader and that using a spiral plater and the method 2 is the pour plate method.

Table 4. Estimates of calibration line

Items		Estimate values
Unbiased variance ratio		0.993
Intercept	Point estimate	-0.029
	95% Upper confidence	0.046
	95% Lower confidence	-0.092
Slope	Point estimate	1.004
	95% Upper confidence	1.012
	95% Lower confidence	0.994

3.068, 方法2で21.051±2.305となった。

操作時間を応答変数, 群(方法1→2の順に操作した群, 方法2→1の順に操作した群)の違い, 時期(1番目の操作, 2番目の操作), 方法(方法1, 方法2)を因子として分散分析を行った。Table 6に示した分散分析の結果, 方法の違いは操作時間に有意な影響を与えていることが示唆された($p=0.004$)。

考 察

日本薬局方の微生物限度試験法⁹⁾では, 生菌数試験の方法の一つとして, 本研究で実施した寒天平板法(寒天平板混釈法, 寒天平板表面塗抹法)が規定されているが, 本試験方法との同等性が示されている場合は, 自動化法を含む別の微生物学的方法を用いてもよいとされており, 日本薬局方解説書¹⁰⁾では, 自動化法の例としてスパイラル・プレーティング法が紹介されている。

コンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法や寒天平板混釈法では, ヒトの皮膚常在細菌数を測定するためかなりの希釈操作が必要である。そのため, これらの方法のみで細菌数を測定しようとする, 測定検体数が多い場合に作業量が膨大となり煩雑であるばかりでなく, 計数培地に菌液を塗抹または播種するまでに

かなりの時間を要することになる。また, 従来法では検査員の個人差による測定値のばらつきがしばしば認められるとの報告¹¹⁾もあり, コンタミネーションや誤操作が生じる可能性も懸念される。

本研究で得られた細菌数(Log_{10} CFU/cm²)は, 方法1で最小2.790, 最大6.200, 平均値は4.411であった。ヒトの皮膚常在細菌の細菌数(Log_{10} CFU/cm²)は, 個体により, また身体各所により異なるが, 通常3~4程度で, 多いところで6との報告¹²⁾があり, 本研究の結果はこの報告と一致する。また, コンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法にスパイラルプレーターを用いる寒天平板表面塗抹法を併用した方法1および従来法である寒天平板混釈法の方法2により得られた細菌数から, 切片が-0.029, 傾きが1.004の較正直線を推測した。較正直線の切片および傾きの95%信頼区間には, 理想である切片0, 傾き1が含まれていたことから, ヒトの皮膚から採取した細菌サンプル中の細菌数測定に際し, 方法1は方法2と同様に精度良く測定できる可能性が示された。なお, 本研究では, 細菌数の少ない場合にスパイラル・プレーティング法による測定が困難であることを考慮し, コンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法を併用することで幅広い細菌数の測定が可能となるよう工夫した。結果的に得られた細菌数は最小2.790と比較的多かったが, 細菌数が少ない場合については, コンラージ棒を用いる寒天平板表面塗抹法による測定結果を採用することで方法2と同様に測定可能と考える。

一方, 寒天平板塗抹法にスパイラルプレーターを用いることで, 細菌サンプルの希釈操作を大幅に削減することができ, さらに寒天平板への塗抹操作が自動化されていることにより, 迅速かつ容易に塗抹操作を行うことが可能であった。このような利点は, 正確な細菌数測定だけでなく, シャーレ, 試験管, 計数培地等の使用量の節約やその準備と実施のための時間の短縮

Table 5. Descriptive statistics of measurement time

Descriptive statistics	Method 1	Method 2
Number of subjects	6	6
Mean	14.861	21.051
Standard deviation	3.068	2.305
Maximum	19.6	24.803
Minimum	11.324	17.985

Unit of the calculated values is "minutes" except the number of subjects.

Table 6. Analysis of variance table

Factors		Sum of squares	Degree of freedoms	Mean sum of squares	F Values	P Values
First	Group	21.69	1	21.69	2.28	0.206
	First error	38.11	4	9.53	2.79	0.172
Second	Point	0.17	1	0.17	0.05	0.832
	Method	114.93	1	114.93	33.68	0.004
	Second error	13.65	4	3.41		
Total		188.56	11			

にもつながる。さらにバイオセーフティの観点からは、感染性微生物の培養時における感染リスクの低減につながる可能性もある。なお、スパイラルプレートの経済効果は、わが国でスパイラル・プレティング法を利用している5カ所の企業を対象にした調査において、年間検査費用を108～593万円削減することが可能であったとの報告¹³⁾がある。

皮膚常在細菌の細菌数測定は、新規生体消毒薬の有効性評価の指標としての利用が可能である。現在、米国ではFDAのTFM, ヨーロッパでは欧州標準化委員会 (CEN: European Committee for Standardization) の欧州連合欧州規格 (EU-EN: European Union-European Norm) において、新規生体消毒薬の有効性評価に関する公的かつ標準的な評価方法が策定されており、新規生体消毒薬の製造販売に伴う規制当局の許認可条件となっている。特にTFMでは、手術前における殺菌消毒薬の有効性について、当該消毒薬を健康成人の皮膚に適用した際の皮膚常在細菌の細菌数減少量により判定することとしている。一方、わが国では、新規生体消毒薬の有効性評価に関する公的かつ標準的な評価方法は策定されていないものの、日本環境感染学会から発出された「手指衛生における生体消毒薬の有効性評価指針(案)¹⁴⁾」のように、生体消毒薬の評価方法の標準化に向けた動きがある。指針(案)では、これら標準的試験法に基づく評価資料が、臨床現場での生体消毒薬使用に際しても、信頼性の高い情報として活用され、医療関連感染症の予防ならびに制圧に大いに役立っているとの見解が示されており、わが国においても将来的に生体消毒薬の評価方法が標準化される可能性がある。われわれは、すでにTFMに基づいた術野殺菌消毒薬の有効性評価法を日本人で評価しており、日本人でも皮膚常在細菌の細菌数減少量による評価は可能と考えている¹⁵⁾。このような背景を踏まえると、より簡易化、迅速化および省力化された皮膚常在細菌の細菌数測定法の検討は今後も必要であり、検討した測定法によるデータの蓄積は、新規生体消毒薬の開発において有益なエビデンスの構築につながると考える。

利益相反

本研究は、株式会社大塚製薬工場からの委託および資金提供を受けて実施した。

引用文献

- 1) J. E. Gilchrist, J. E. Campbell, C. B. Donnelly, et al. Spiral plate method for bacterial determination.

- 2) 小林 修. 1998. スパイラルプレティング法—微生物迅速検査法—. 科学と工業 72: 568-573.
- 3) K. Günter, O. Christiane, H. Peter, et al. 2006. Evaluation of two methods of determining the efficacies of two alcohol-based hand rubs for surgical hand antisepsis. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3856-3861.
- 4) Federal Register. 1994. Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Tentative Final Monograph for Health-Care Antiseptic Drug Products. June 17, 59(116): 31402-31452.
- 5) ASTM International. 2005. E1874-97 Standard Test Method for Evaluation of Antibacterial Washes by Cup Scrub Technique. Annual Book of ASTM Standards. 11.05: 1466-1469.
- 6) ASTM International. 2008. E1173-01 Standard Test Method for Evaluation of Preoperative, Precatheterization, or Preinjection Skin Preparations. Annual Book of ASTM Standards. 11.05: 148-153.
- 7) 大橋靖雄. 1989. 医学統計ソフトを使う前に—ビットホールに陥らないために—第3回 相関と回帰. 医療とコンピュータ 2(1): 78-86.
- 8) 丹後俊郎. 1988. 測定誤差を考慮に入れた線形関係式—測定法の比較のための統計学的方法—. 臨床病理 36: 1101-1108.
- 9) 相見則郎, 青木光夫, 青貫喜一, 他. 2011. 一般試験法 4.05 微生物限度試験法. p. 214-237, 第十六改正日本薬局方 条文と注釈 通則 生薬総則 製剤総則 一般試験法 医薬品各条 (化学医薬品【あ行】～【た行】), 廣川書店, 東京.
- 10) 赤池昭紀, 朝比奈正人, 安達尚美, 他. 2011. B. 一般試験法 4.05 微生物限度試験法. p. B477-B511, 第十六改正日本薬局方解説書 通則 生薬総則 製剤総則 一般試験法 (杉山雄一, 赤池昭紀, 太田明廣, 他編集), 廣川書店, 東京.
- 11) 五十嵐英夫. 1982. スパイラル・プレティング・システムによる細菌数測定について. MEDIA CIRCLE 27(2): 98-111.
- 12) 水口康雄. 2002. II-8 常在微生物叢 A. 常在微生物叢の分布とその影響. p. 174-177, 戸田新細菌学 (吉田真一, 柳 雄介 編, 改訂32版), 南山堂, 東京.
- 13) 阿部吉邦, 島岡 宏, 酒井忠正, 他. 1983. スパイラルシステム導入による経済的効果の実情調査. p. 42, 食品衛生微生物研究会第4回学術講演会講演要旨集.
- 14) 日本環境感染学会 消毒薬抗菌効果測定検討委員会. 2011. 日本環境感染学会 生体消毒薬の有効性評価指針: 手指衛生2011 (案).
- 15) 蓮沼智子, 飯島 肇, 高附真樹子, 他. 2011. 米国における術野消毒薬の有効性評価法の日本人での評価. 環境感染誌 26: 203-209.

A Clinical Research on the Bacterial Count Measurement for the
Resident Bacterial Flora of Human Skin

Tomoko Hasunuma, Hiroshi Nakatani, Makiko Takatsuki, Masaharu Taga,
Yoko Monuki, Ayako Aoki, Tetsuo Kin, Hajime Iijima
Bio-Iatoric Center, Research Center for Clinical Pharmacology, Kitasato University

We confirmed that the resident bacterial count of the human normal skin sample can be measured by a combination method of the agar plate method using a bacterial spreader and that using a spiral plater.