



平板当り30集落以下のときの 少数個の生菌数測定法

米 虫 節 夫*

1. はじめに

第1次石油ショック以後、各種資材を劣化させたり腐敗させたりすることを防止することが省資材・省エネルギーに連なることが再認識され、特に従来あまり注目していなかった微生物をはじめとする各種生物による資材劣化や腐敗対策が多くの分野で検討され始めた。どのような工業資材がどのような微生物により劣化・腐敗させられるかは、既にわかっている分野も多いので、そのような分野では、注意せねばならない微生物がどれ程生存しているかの測定が重要になる。微生物の増殖は条件さえ良ければ10~15分で2倍になるので、数時間で大変な数となる。その為たとえ少しの微生物でも見のがせない場合が多い。

微生物量の定量的把握法は、菌数測定法ともいわれ、

1. 生菌数測定法（生きている菌数のみの測定）
2. 総菌数測定法（生菌と死菌の区別をしないでその合計数を求める）

に2大別される。どのような目的で菌数を測定するかにより、使用する測定法は異なるが、多くの場合は、生菌数を測定している。

生菌数測定法は、与えられた環境条件下において子孫を生み増殖する能力を持つ個体を「生」、その能力のないものを「死」と判断し、「生」と判定されたものの数（生菌数）がどれ程かを推定する方法である。測定法には平板（ペトリ皿、シャーレ）を用い、そこに形成された集落数を測定する平板培養法と、希釈法（Most Probable Number 法）とがある。

平板培養法は、生菌数測定法の中で最も広く

かつ多く使われている菌数測定法であり、多くの公定書や実験書に測定手順や生菌数推定方法が記されている。それらは、すべて同じ原理によって記されている。

2. 平板培養法による集落数計数限界

「衛生試験法」（1980）では、一般試験法の中の微生物試験法において、1, 4, 1, 1一般細菌、(4)細菌（生菌）数の項に「標準平板菌数」の算定法を次のように記している。「集落数の算定は、拡散集落がなく（全面の $\frac{1}{2}$ 以下ならばさしつかえない）、一平板に30~300個の集落がみられる平板を選んで行なうのを原則とする。従って、試料の希釈に際しては、このことを考慮に入れ、なるべく広い希釈段階について培養を行なうべきである。（中略）希釈液1mlを培養に用いた場合には、一平板の集落または2枚以上の平均に、希釈倍数を乗じた値が、試料1ml（または1g）中の生菌数を示す。この際、数字は高位から3けた目を四捨五入して、有効数字を2けたにとどめ、以下0をつける。」この項に対する日本薬学会編「衛生試験法・注解（1980）」では、「もしすべての平板に30個以下の集落しか得られなかった場合は、（中略）最も希釈倍数の低いものを計測して何個以下というように報告する。たとえば、1:100の希釈では、標準法1ml中の細菌数3000以下（>3000）というようにする。」と記されている。

上に示した標準平板数に関する考え方は、その記述内容より判断し、平板当りの集落数の分布として「正規分布」を仮定していると考えられる。集落数の実測値は0, 1, 2, ……なる非負の整数であるため、正規分布仮定の下では、平板当りの集落数が少なくなると理論と現実との一致性が悪くなると判断し、集落数算定下限として30集落が提出されているのではなかろうか。JIS K 0101および JIS K 0102や Stand-

*米虫節夫 (Sadao KOMÉ MUSHI), 大阪大学, 薬学部, 薬品製造工学講座, 助手, 工学博士, 殺菌工学

ard Methods for the Examination of Water and Waste water なども同様である。この考え方では、平板培養により30 cells/ml 以下の微生物汚染度はまず測定できないし、一部では30以下だから測定しなくて良いとか、30以下はすべて同じと見なす等の誤りまで存在する。

しかしながら、たとえ平板当りの集落数が30以下であっても、その実測値は試料溶液中の真の菌数すなわち母平均値 (λ cells/ml) を反映しているはずである。問題はその時の誤差が、どれ位の大きさであるかである。そこで、少数(平板当り30以下)集落数の分布として、常法どおり「ポアソン分布」を仮定し、母平均 λ を推定する方法を検討した。

3. 3つの仮定

理論的検討のため、以下の3仮定を置いた。

1) 個々の菌は、試料懸垂液中にランダムに存在し、ピペットに吸われサンプルとして使われる機会は等しい(独立の仮定)。

2) 1個の生菌は、1個の集落を形成する。また1個の集落は、ただ1個の生菌より形成されたものとする(生菌と集落の1対1対応の仮定)。

3) 一定量のサンプルから形成した平板当りの集落数の分布は「ポアソン分布」に従う(ポアソン分布仮定)。

これら3仮定のうち、独立の仮定と生菌と集落の1対1対応の仮定は、標準平板菌数の測定において多くの研究者が暗黙の了解として設定しているものである。ポアソン分布仮定の妥当性は、実験的にも数理的にも説明可能であり、実験的検討により妥当性を確認した。

4. 同一希釈段階でm枚の平板を用いた時の母平均 λ の推定法

母平均 λ cells/ml (λ :未知) のサンプル 1.0mlずつを用いたm枚の平板から得られる集落数のデータを n_1, n_2, \dots, n_m とする。このとき、 n_1, n_2, \dots, n_m が得られた条件下での母平均 λ の尤度Lは、個々のnがポアソン分布に従っているので、

$$\begin{aligned} L(\lambda|n_1, n_2, \dots, n_m) &= (\lambda^{n_1} e^{-\lambda}/n_1!) \times \dots \times (\lambda^{n_m} e^{-\lambda}/n_m!) \\ &= C \cdot \lambda^{\sum n_i} e^{-m\lambda} \end{aligned}$$

$$= C \cdot \lambda^N e^{-m\lambda}$$

となる。ここで、母平均 λ についての事前確率を定義域 ($0 \leq \lambda < \infty$) において一様(対数的一様)と仮定すると、 λ の事後確率は、

$$P(\lambda|m, N) = C \cdot \lambda^{N-1} e^{-m\lambda}$$

となり、これはガンマ分布に従うことがわかる。各パラメータの定義域は

$$0 \leq \lambda < \infty, 0 < N, 0 < m$$

であり、また

$$\text{期待値 } E(\lambda) = N/m$$

$$\text{分散 } V(\lambda) = N/m^2$$

$$\text{最確値 } \text{mode}(\lambda) = \begin{cases} (N-1)/m & \text{for } 1 < N \\ 0 & \text{for } 0 < N \leq 1 \end{cases}$$

である。

すなわち、使用した平均数mと、その時の集落数の和Nが得られると、単純平均のかたちで平板当りの言いかえると試料1ml当りの平均生菌数が $E(\lambda) = N/m$ として、その標準偏差が、 $D(\lambda) = \sqrt{N}/m$ として求まる。また、最近急速に進歩したマイコンやプログラム付電卓を用いて、生菌数 λ の 100(1- α)%信頼区間も簡単に求めることができる(Table 1参照)。

5. 本方法の特徴

ここで述べた方法は、少数個の生菌数を対象にしてその分布にポアソン分布を用いている。ポアソン分布の定義域は $0 \leq x < \infty$ であるため、母数 λ の小なる時には歪んだ分布になるが、 λ の値が5以上ならば左右対称の正規分布に近い形になり、母平均 λ 、母標準偏差 $\sqrt{\lambda}$ の正規分布に近似できる。この理由により多くの研究者は、本来は「ポアソン分布」で解析せねばならない平板当りの集落数データを平板当り30~300集落という条件下では、 $\lambda > 5$ の条件が十分満足されているので「正規分布」として解析してきたのであろう。

ガンマ分布についても、ポアソン分布と同様に、平均 λ が大きいとき同じ平均と分散をもつ正規分布に近似できる。

平板当り30以下の少数個の集落という条件下で求めた生菌数の推定方法であるが、使用した分布の性質から考え、そのような制約条件なしにより一般的に用いられる方法であり、衛生試

験法の内容をも包含する生菌数推定法といえる。故に、本方法により推定するならば、平板当り30集落以下であっても、従来通りの単純平均値で母平均値の点推定ができ、さらにその標準偏差も \sqrt{N}/m で求まり、衛生試験法などの「30以下の取扱い」規程に拘束されることなく標準平板菌数を求めることができる。

6. おわりに

本稿のはじめにおいて微生物による資材劣化の話を書いたが、最近では精密工場や電子機器工場でも無塵室や微生物まで考慮した無菌室が多くなってきた。ICやLSIの配線上に微生物が付着しその機能をダメにすることもある。そのような室の空調は、病院や医薬品工場と同じように考えねばならなくなっている。微生物汚染を制御し、そのレベルを低くおさえているbioclean roomにおいて、壁・床・天井面等への付着細菌数や空中浮遊菌数を調べる時、単位面積当りの菌数が30をこえることはほとんどない。

筆者は、日本防菌防黴学会の1研究会である環境殺菌工学研究会の世話役をしているが、そ

の研究会では、病院や医薬品・食品工場をはじめ精密機器や電子機器工場、さらに文化財などの保存展示場等々の諸環境空間の微生物制御を研究課題としている。微生物制御を行なう前段階としての現状分析と、殺菌・消毒等の処理後や制御効果が出た後の微生物汚染度の測定時には、前述の如き低汚染度に対するデータ処理が必要となる。現在までのところ多くの病院・博物館等で実際に上述の方法を用い良好な結果を得ている。

学問の進歩、技術の進歩、社会の要求等々により、今後ますます微生物による被害を防除する必要性が増加してくるであろう。そのような時に、ここに紹介した少数個の生菌数推定法が大いに役立つのではないかと期待している。

参考文献

- 1) 米虫節夫, 城倉りき子, 中谷武雄, 岩崎日出男, 三浦喜温; 防菌防黴誌, 4, 99 (1976).
- 2) 米虫節夫, 三浦喜温, 岩崎日出男; 防菌防黴誌, 4, 304 (1976).
- 3) 米虫節夫; ファルマシア, 14, 765 (1978).
- 4) 米虫節夫; 薬局, 26, No. 9 (1975)-28, No. 8 (1977).

Table. 1 Confidence limits of λ

m	N	E (λ)	D (λ)	Confidence limits			
				68 %		95 %	
2	3	1.50	0.87	0.7	2.3	0.3	3.6
	5	2.50	1.12	1.4	3.6	0.8	5.1
	10	5.0	1.58	3.4	6.6	2.4	8.5
	20	10.0	2.24	7.8	12.2	6.1	14.8
	40	20.0	3.16	16.8	23.2	14.3	26.7
	60	30.0	3.87	26.1	33.9	22.9	38.1
3	5	1.67	0.75	0.9	2.4	0.5	3.4
	10	3.33	1.05	2.3	4.4	1.6	5.7
	15	5.0	1.29	3.7	6.3	2.8	7.8
	30	10.0	1.83	8.2	11.8	6.8	13.9
	60	20.0	2.58	17.4	22.6	15.3	25.4
	90	30.0	3.16	26.8	33.2	24.2	36.5
4	5	1.25	0.56	0.7	1.8	0.4	2.6
	10	2.50	0.79	1.7	3.3	1.2	4.3
	20	5.0	1.12	3.9	6.1	3.1	7.4
	40	10.0	1.58	8.4	11.6	7.1	13.3
	80	20.0	2.24	17.8	22.2	15.9	24.6
	120	30.0	2.74	27.3	32.7	24.9	35.6
5	5	1.00	0.45	0.6	1.4	0.4	2.1
	10	2.00	0.63	1.4	2.6	1.0	3.4
	20	4.00	0.89	3.1	4.9	2.4	5.9
	50	10.0	1.41	8.7	11.4	7.4	13.0
	100	20.0	2.00	18.0	22.0	16.3	24.1
	150	30.0	2.45	27.5	32.5	25.4	35.0