

Loratadine Oral Solution	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i> TAMC.100 cfu/mL mold & yeasts 50cfu/mL	p-1274
Magaldrate	absence <i>Escherichia coli</i>	p-1287
Magaldrate Oral Suspension	TAMC. 100 cfu/mL absence <i>Escherichia coli</i>	p-1288
Magaldrate Tablets	absence <i>Escherichia coli</i>	p-1289
Magaldrate and Simethicone Oral Suspension	TAMC. 100 cfu/mL absence <i>Escherichia coli</i>	p-1290
Magaldrate and Simethicone Tablets	absence <i>Escherichia coli</i>	p-1290
Milk of Magnesia	TAMC. 100 cfu/mL absence <i>Escherichia coli</i>	p-1291
Magnesium Carbonate	absence <i>Escherichia coli</i>	p-1292
Magnesium Carbonate and Citric Acid for oral Solution	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-1293
Magnesium Citrate for Oral Solution	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-1296
Magnesium Hydroxide	absence <i>Escherichia coli</i>	p-1298
Magnesium Hydroxide Paste	TAMC. 400 cfu/mL absence <i>Escherichia coli</i>	p-1298
Magnesium Phosphate	absence <i>Escherichia coli</i>	p-1300
Mangafodipir Trisodium	TAMC. 500 cfu/g	p-1306
Methylcellulose Oral Solution	TAMC. 100 cfu/mL absence <i>Escherichia coli</i>	p-1395
Miconazole Nitrate Topical Powder	Total count 100 cfu/g negative <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1436
Mometasone Furoate Cream	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-1450
Mometasone Furoate Ointment	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-1451

Mometasone Furoate Topical Solution	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-1451
Naftifine Hydrochloride Cream	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1472
Naftifine Hydrochloride Gel	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1472
Neomycin Sulfate and Flurandrenolide Lotion	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1496
Ondansetron Oral Solution	absence <i>Escherichia coli</i> TAMC. 100 cfu/g mold & yeasts 50 cfu/g <i>Enterobacteriaceae</i> count 10 cfu/g	p-1585
Oxytocin	total b.c 200 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1623
Paclitaxel	TAMC. 100 cfu/g absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-1625
Pancreatin	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1629
Pancreatin Tablet	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1631
Pancrelipase	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1631
Pancrelipase Capsules	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1633
Pancrelipase Delayed-Release Capsules	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1633
Pancrelipase Tablets	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1633
Papain Tablets for Topical Solution	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1635
Pectin	absence <i>Salmonella</i> species	p-1647
Polymixin B Sulfate and Bacitracine Zinc	special method; not more than 20	p-1752

Topical Aerosol	colonies/ 2 specimens absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Polymixin B Sulfate and Bacitracine Zinc Topical Powder	special method; not more than 20 colonies/ 2 specimens absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1752
Pramoxine Hydrochloride Cream	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1782
Pramoxine Hydrochloride Jelly	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-1782
Pseudoephedrine Hydrochloride, Carbinoxamine Maleate, and Dextromethorphan Hydrobromide Oral Solution	TAMC. 100 cfu/g mold & yeasts 10 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1860
Psyllium Hemicellulose	TAMC. 1000 cfu/g mold & yeasts 100 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1861
Psyllium Husk	mold & yeasts 1000 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1863
Psyllium Hydrophilic Mucilloid for Oral Suspension	absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1864
Ranitidine Oral Solution	TAMC. 100 cfu/mL absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i>	p-1892
Rauwolfia Serpentina	absence <i>Salmonella</i> species	p-1895
Powdered Rauwolfia Serpentina	absence <i>Salmonella</i> species	p-1896
Rauwolfia Serpentina Tablets	absence <i>Salmonella</i> species	p-1896
Sargramostim	TAMC. 1 cfu/mL	p-1947
Simethicone Emulsion	TAMC. 100 cfu/g	p-1963
Sodium Polystyrene Sulfonate Suspension	TAMC. 100 cfu/mL	p-1990

	molds and yeasts 100 cfu/mL absence <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Somatropin	TAMC. 300 cfu/g for about 0.2 to 0.3g	p-1994
Topical Starch	TAMC. 500 cfu/g mold & yeasts 50 cfu/g	p-2005
Sufacetamide Sodium Topical Suspension	TAMC. 100 cfu/mL molds and yeasts 50 cfu/mL meets the requirement of the test for <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2021
Silver Sulfadiazine Cream	total count 23 cfu/g molds and yeasts 10 cfu/g absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-2027
Sumatriptan Nasal Spray	TAMC. 100 cfu/mL absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2048
Talc	Topical administration: TAMC. 100 cfu/g molds and yeasts 50 cfu/g oral administration: aerobic m c 1000 cfu/g mold and yeasts 100 cfu/g	p-2055
Tetracaine Ointment	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2092
Tetracaine Hydrochloride Cream	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2094
Tetrahydrozoline Hydrochloride Nasal Solution	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2106
Thalidomide		p-2107
Theophylline Oral Solution	TAMC. 100 cfu/mL molds and yeasts 50 cfu/mL absence <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i>	p-2114
Thyroid	absence <i>Salmonella</i>	p-2139

	species , <i>Escherichia coli</i>	
Thyroid Tablets	absence <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i>	p-2140
Triamcinolone Acetonide Topical Aerosol	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2184
Triamcinolone Acetonide Cream	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2185
Triamcinolone Acetonide Lotion	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2185
Triamcinolone Acetonide Ointment	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2186
Triamcinolone Acetonide Dental Paste	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-2186
Crystallized Trypsin	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> species	p-2223
Vasopressin	Total b.c. 200 cfu/g For animal origin: absence <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i>	p-2242
Verteporfin	arebic m.c 100 cfu/g	p-2250
Water for Hemodialysis	total viable count 100 cfu/ml	p-2266
Wheat Bran	TAMC. 1000 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-2266
Zidovudine Oral Solution	absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-2283
NF 23		
Acacia	absence <i>Salmonella</i> species	p-3263
Acacia Syrup	absence <i>Salmonella</i> species	p-3263
Agar	absence <i>Salmonella</i> species	p-3267
Alfadex	Total aerobic bacterial count 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Salmonella</i>	p-3268

	species , <i>Escherichia coli</i>	
Alginic Acid	total b.c. 200 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i>	p-3269
Ammonium Sulfate	TAMC. 1000 cfu/g mold & yeasts 1000 cfu/g	p-3273
Asparagine	TAMC. 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g	p-3276
Bentonite	absence <i>Escherichia coli</i>	p-3279
Purified Bentonite	TAMC. 1000 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i>	p-3279
Bentonite Magma	absence <i>Escherichia coli</i>	p-3281
Benzalkonium Chloride Solution	absence <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-3282
Betadex	total b.c.1000 cfu/g negative <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i>	p-3284
Caramel	absence <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i>	p-3292
Carragenan	total b.c. 200 cfu/g negative <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i>	p-3304
Microcrystalline Cellulose	TAMC. 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-3307
Powdered Cellulose	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species , <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-3308
Cetrimonium Bromide	TAMC. 1000 cfu/g mold & yeasts 10 cfu/g	p-3310
Chocolate	total b.c. 5000 cfu/g	p-3314

	absence <i>Escherichia coli</i>	
Croscarmellose Sodium	TAMC. 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i>	p-3319
Galactose	TAMC. 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Salmonella</i> species, <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-3336
Galageenan	TAMC. 200 cfu/g molds and yeasts 20 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3337
Gelatine	total b.c. 1000 cfu/g negative <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3338
ellan GumG	TAMC. 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3338
Purified Honey	total b.c. 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g	p-3346
Lactose Monohydrate	TAMC.100 cfu/g molds and yeasts 50 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i>	p-3358
Magnesium Aluminum Silicate	TAMC.1000 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i>	p-3363
Maltodextrin	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3368
Magnesium Stearate	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 500 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3365
Maltitol Solution	TAMC.1000 cfu/mL molds and yeasts 100 cfu/mL	p-3367

Phenolsulfonphthalein	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g	p-3389
Propylene Carbonate	total b.c. 200 cfu/g negative <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3411
Sodium Alginate	total b.c. 200 cfu/g negative <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3420
Sodium Starch Glycolate	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3426
Sorbitol Sorbitan Solution	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g	p-3433
Solbitol	Total aerobic count 1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g	p-3432
Noncrystallizing Sorbitol Solution	TAMC.1000 cfu/mL molds and yeasts 100 cfu/mL	p-3434
Modified Starch	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g	p-3435
Pregelatinized Starch	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3436
Corn Starch	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i> for absorbable Dusting powder: absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p-3437
Potato Starch	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i>	p-3438
Tapioca Starch	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i>	p-3438

Wheat Starch	TAMC.1000 cfu/g molds and yeasts 100 cfu/g absence <i>Escherichia coli</i>	p-3439
Compressible Sugar	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3444
Confectioner's Sugar	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3445
Sugar Spheres	TAMC.100 cfu/g absence <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3445
Tragacanth	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3450
Xanthan Gum	absence <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3459
Zein	total b.c. 1000 cfu/g negative <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> species	p-3461

表 2 USP における否定すべき微生物 (2006 年)

否定すべき微生物	USP29	NF23	USP29 +NF23
細菌・真菌・否定微生物	1 9	1 5	3 4
細菌・否定微生物	3 1	1 1	4 2
真菌・否定微生物	1	0	1
細菌・真菌	8	9	1 7
細菌	1 1	0	1 1
否定微生物	1 1 0	1 3	1 2 3
不明	2	0	2

表 3 USP における細菌計測法の呼称

- Total aerobic microbial count : 7 0
- Total aerobic bacterial count : 1

- Total aerobic count : 1
- Total bacterial count : 2 4
- Total microbial count : 2
- Total count : 3
- Colonies : 2
- Total viable count : 1
- 呼称がまだ統一されていない（国際調和テキストでは、total aerobic microbial count を用いている）

表 4 USP における否定すべき特定微生物収載モノグラフ数

- *Salmonella* sp., *E. coli*: 5 4
- *S. aureus*, *P. aeruginosa*: 7 5
- *E. coli*, *P. aeruginosa*: 2
- *Salmonella* sp., *S. aureus*, *P. aeruginosa*: 3
- *Salmonella* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*: 2 1
- *E. coli*: 3 4
- *Salmonella* sp.: 1 2
- *P. aeruginosa*: 3
- *Salmonella* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* family and *Pseudomonadaceae* family: 1

表 5 ベトナム薬局方収載生物試験法と日本の基準（日局、生物学的製剤基準）に収載されている試験法の比較

VP/Biological Tests, Appendix 10	JP	生物基
Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests	×	×
Test for Histamine	×	×
Test for Bacterial Endotoxins	○	○
Test for Depressor Substances	×	×
Test for Pyrogens	○	○
Test for Abnormal Toxicity	×	○
Microbial Limit Tests	○	×
Test for Sterility	○	○

Efficacy of Antimicrobial Preservation	○	×
Microbiological assay of Antibiotics	○	×

生物基：日本の生物学的製剤基準

表6 JP/EP/USP と VP での否定すべき特定微生物種の比較

Test for Specified Microorganisms	JP/EP/USP	VP
Bile-tolerant Gram-negative bacteria	○	×
<i>Enterobacteria</i>	×	○
<i>Escherichia coli</i>	○	○
<i>Salmonella</i>	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	○	○
<i>Staphylococcus aureus</i>	○	○
<i>Clostridia</i>	○	○
<i>Candida albicans</i>	○	×

表7 微生物試験法収載菌株（JP, EP, USP）

- *Staphylococcus aureus* such as ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 or NBRC 13276,
- *Pseudomonas aeruginosa* such as ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 or NBRC 13275,
- *Escherichia coli* such as ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 or NBRC 3972,
- *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serotype typhimurium such as ATCC 14028 or, as an alternative,
- *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serotype abony such as NCTC 6017 or CIP 80.39,
- *Candida albicans* such as ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 or NBRC 1594.
- *Clostridium sporogenes* such as ATCC 11437 or ATCC 19404 (NCTC 532 or CIP 79.03) or NBRC 14293.

表8 微生物試験法収載菌株（VP）

- *Clostridium sporogenes* such as ATCC 19404 or NCTC 532.
- *Clostridium perfringens* such as ATCC 13124 or NCTC 8237

表 9 無菌試験法収載菌株 (JP, EP, USP)

- Aerobic bacteria
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276
 - *Bacillus subtilis* ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
- Anaerobic bacterium
 - *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 or ATCC 11437, NBRC 14293
- Fungi
 - *Candida albicans* ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594
 - *Aspergillus niger* ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455

表 10 無菌試験法収載菌株 (VP)

- Aerobic bacteria
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 12228
 - *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- Anaerobic bacterium
 - *Clostridium sporogenes* ATCC 11437
- Fungi
 - *Candida albicans* ATCC 10231

表 11 日本の菌株センター (NBRC) からベトナムの菌株センター (VTCC) に分譲する菌株リスト

Name	Code	Code for NBRC
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	NBRC 9455
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	NBRC 3836
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 14884	NBRC 3813
<i>Bacillus pumilus</i>	NCTC 8241	NBRC 3813
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953	NBRC 13737
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	NBRC 3134
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	NBRC 1594
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404	NBRC 14293
<i>Clostridium sporogenes</i>	NCTC 8594	NBRC 16411
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	NBRC 13534

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	NBRC 13951
<i>Lactobacillus leichmanii</i>	ATCC 7830	NBRC 3376
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240	NBRC 13867
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	NBRC 12708
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	NBRC 12689
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	NBRC 14462
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	NBRC 13276
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	NBRC 12993

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合事業）
分担研究報告書

細菌迅速試験法における誤差の推定

分担研究者 那須正夫 大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）
協力研究者 高木達也 大阪大学大学院薬学研究科（微生物動態学）
岡本晃典 大阪大学大学院薬学研究科（微生物動態学）
山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）

研究要旨：細菌迅速試験法である蛍光活性染色法やマイクロコロニー法を用いて、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定するにあたっては、計数に用いた視野数の不足により生じる誤差を考慮する必要がある。そこで、平板培養法と直接計数法による細菌計数における誤差を、統計学的手法を用いて推定した。その結果、両手法ともに理想的な条件下でも測定結果に 10%程度の誤差が含まれること、直接計数法においては 15 視野以上について測定すればよいことがわかった。

A. 研究目的

環境微生物学分野における多くの研究により、自然環境中の微生物の大部分は通常の方法では培養困難であることが、明らかとなってきた。これにともない、微生物を培養することなく、迅速・簡便、さらには高精度に定量するための手法が検討されている¹⁻⁸⁾。中でも蛍光試薬を用いて微生物を染色し蛍光顕微鏡下で検出・計数する直接計数法は、環境微生物学分野を中心に広く用いられてきている。

これらの手法を微生物検査に用いるにあたり、測定値と真の細菌数との誤差がどの程度ありえるのかを評価し、それを知ること、その手法を使用する際に重要な意味を持つ。例えば、誤差は大きいが簡便な手法と、操作が複雑ではあるが誤差の小さな

手法との使い分けが可能となる。

細菌数測定では、試料調製時や計数時に、実験者の技量や経験が結果に影響を及ぼす。また、これらの人為的な誤差の要因とは別に、その手法が最低限として持ちえる誤差があり、それを人為的な要因とは分けて評価しておくことが必要である。

そこで今回、乱数シミュレーションであるモンテカルロ法⁹⁻¹¹⁾を用いて、平板培養法および直接計数法が手法として必然的に持ちえる誤差を、統計学的に算出した。

B. 研究方法

1) 使用したハードウェア

計算には、CPU に AMD Athlon 64X2を用

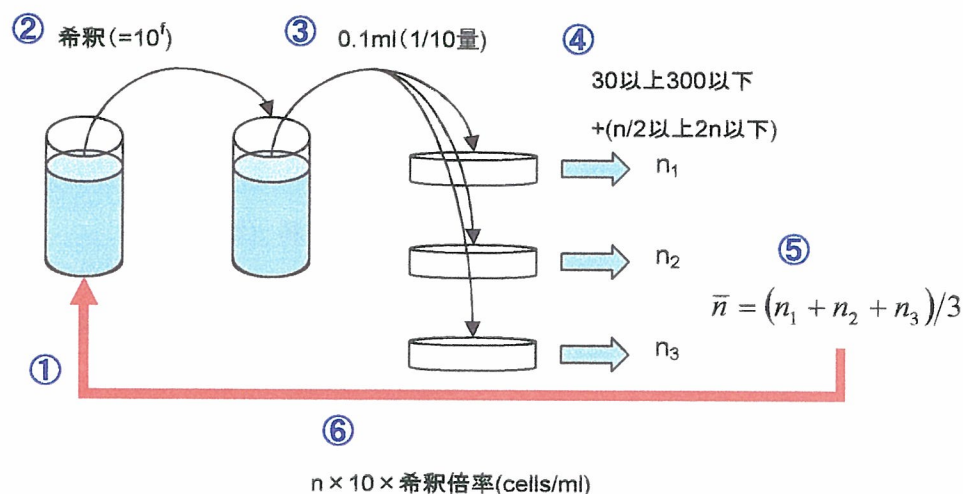


図 1. 培養法におけるモンテカルロ法を利用した誤差評価法の概略図

いた WindowsXP Home Edition マシン、ならびに CPU に Intel Xeon を用いた Linux マシンを使用した。

2) 使用したソフトウェア

プログラムは、Fortran 言語によりプログラムを作成し、Fujitsu Fortran&C package に収録されている Fortran90 のコンパイラを使用し、計算を行った。その結果は MS Excel 2003 for Windows でグラフ化した。

3) アルゴリズム

3-1) 平板培養法における誤差評価法

まず平板培養法において設定した条件をあげる：

条件 1. 標本からの 1/10 量の抽出の際には、実験誤差を含まずに 1/10 量を抽出するものとする。

条件 2. 菌は標本中で全くランダムに分散しているものとする。

条件 3. 培養は 3 つの培養皿で行い、それぞれで細菌を計数する。その結果の平均値 $\bar{n}$ を求め、それをもとに標本中の細菌数

の推定を行うものとする。

条件 4. それぞれの培養皿からのカウント数は 30 以上 300 以下、かつ $\bar{n}/2$ 以上 $2\bar{n}$ 以下となるような希釈倍率を使用することとする。

条件 5. 希釈倍率は 10 倍、100 倍、1000 倍を使用する。また希釈時、および培養皿へ撒く際には、その時点の標本から 1/10 量を取り出し、10 倍するものとする。

以上の条件に従う手順の概略図を図 1 に示す。以下は実際のアルゴリズムである。

- ① 標本中の細菌数を乱数を用いて決定する。
- ② 希釈倍率に従い、10 倍希釈の処理を繰り返す。
- ③ 培地に撒くための抽出を行う。
- ④ その時点での細菌数をカウントする。
この際、カウント数が 30 未満、あるいは 300 より大きい場合、手順②へ戻る。
- ⑤ 手順②から④を三回繰り返し、その平均値 $\bar{n}$ を算出する。その平均値 $\bar{n}$ を基に三回のカウント数の内、一つ

でも $\bar{n}/2$ 未満、あるいは $2\bar{n}$ を超える場合は手順①へ戻る。

- ⑥ 平均値 $\bar{n}$ から元の標本中の細菌数を推定し、手順①で決定された細菌数とのズレを算出する。
- ⑦ 手順①から⑥を十分な回数、繰り返す。

このアルゴリズム中の手順②および③でその時点の標本から 1/10 量を抽出する操作が必要であり、その操作を乱数を用いシミュレートした。その際、標本ならびに抽出部位は立方体状と設定した。図 2 は抽出手順の概略図を示している。図のように標本の形状を設定し、各軸の座標として 0 から $\sqrt[3]{V}$ の一様乱数を用いることで、標本中の細菌の位置座標を決定する。これを標本中の全細菌で行い、標本中の細菌の分布をシミュレートした。図中の赤線の立方体は 1/10 量の抽出部位を示している。こちらも一様乱数にて標本よりはみ出さない位置に決定し、その内部に入る細菌数を計測する。

以上の手順で、標本中からの 1/10 量の抽出によりとられる細菌数をシミュレートした。

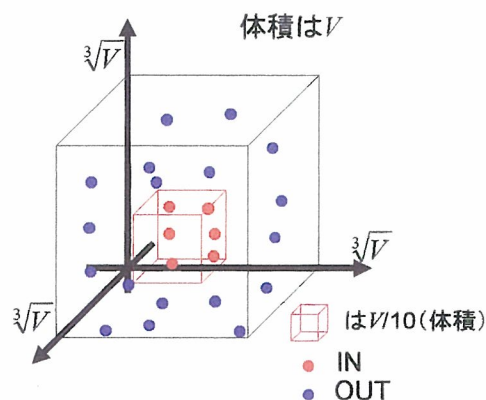


図 2. 標本からの細菌抽出のシミュレーションの概略図

3-2) 直接計数法における誤差評価法

直接計数法において設定した条件は、以下の通りである：

条件 1. メンブレンフィルタを通す標

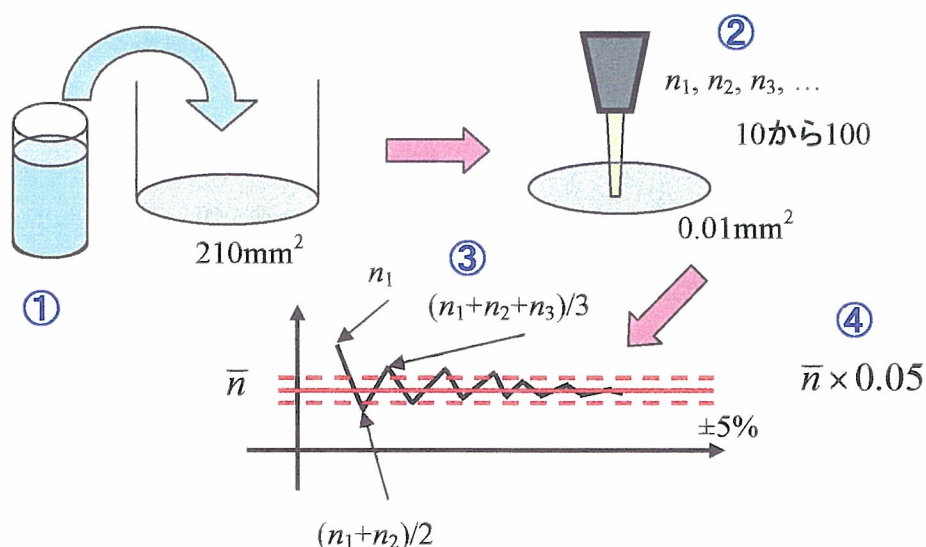


図 3. 直接計数法におけるモンテカルロ法を利用した誤差評価法の概略図

本の量や、細菌数の計数などにおける実験的な誤差を含まないものとする。

条件 2. 細菌はメンブレンフィルタ上に全くランダムに分散するものとする。

条件 3. フィルタ面積は 210mm^2 、計数時の視野面積は 0.01mm^2 とする。

条件 4. 視野中の細菌の計数において 10 以上 100 以下におさまるように、フィルタへの流量を決めるものとする。

条件 5. 視野中の細菌を計数するとにそれまでの計数結果の平均値 $\bar{n}$ を算出し、その平均値 $\bar{n}$ の $\pm 5\%$ 内に直近の 5 回の計数結果が全て含まれていれば、フィルタ上の細菌計数を終了する。

条件 6. フィルタ上の細菌計数中に視野はかぶらないものとする。

図 3 は手順の概略図を示している。以下、計算のアルゴリズムを示す。

- ① フィルタ上の細菌数を乱数により決定する。
- ② 一視野内の細菌を計数する。
- ③ 計数結果の平均値 $\bar{n}$ を算出する。
- ④ 直近の 5 回の計数結果が平均値 $\bar{n}$ の $\pm 5\%$ 内であれば、そのときの平均値と手順①で決定された細菌数とのズレを算出する。
- ⑤ 手順①から④を十分回、繰り返す。

このアルゴリズム中の手順②において行われる、フィルタ上の細菌を計数する操作を乱数を用いてシミュレートした。その手順の概略図を図 4 に示す。

図 4 のようにフィルタを、原点を中心とした半径 R ($\pi R^2=210$ を満たす) の円とする。上記の条件 2 を満たすために、0 から R^2 までの一様乱数 γ と 0 から 2π までの一様

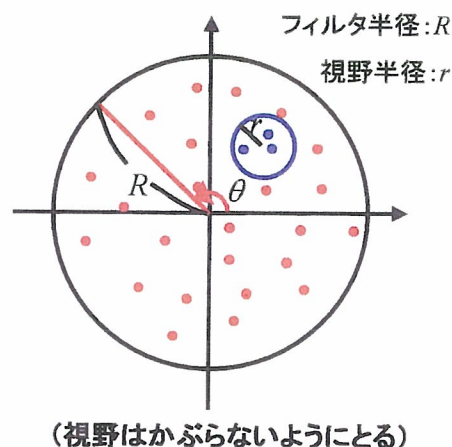


図 4. フィルタ上の細菌計数のシミュレーションの概略図

乱数 θ を発生させ、座標 $(\sqrt{\gamma} \cos \theta, \sqrt{\gamma} \sin \theta)$ に細菌を配置する。これを標本中の全細菌に関して行い、細菌のフィルタ上の分布をシミュレートした。今度は、0 から $(R - r)^2$ までの一様乱数 η と 0 から 2π までの一様乱数 ϕ を発生させ、座標 $(\sqrt{\eta} \cos \phi, \sqrt{\eta} \sin \phi)$ に視野をとる。但しこの際に、今までにとった視野とかぶる際には再度とり直す。その視野の中の細菌を計数することで、フィルタ上の細菌を計数する操作をシミュレートした。

今回は 3-1), 2) の両アルゴリズムにおいて、十分な繰り返し回数として 49,999 回を用いた。また元の標本の細菌数を、下限から上限間の一様乱数として決定した場合と、それぞれの対数値間を一様乱数として決定した場合の二通りを行った。

C. 研究結果および考察

- 1) 平板培養法におけるモンテカルロ法を利用した誤差評価法

図5は、求められた細菌数の推定結果と初期設定値の細菌数間のズレをヒストグラム化したものである。ヒストグラムの形状は正規分布に非常に良く従っていた。表1

は結果を数値としてまとめたものである。三列目に示されているズレの平均値が全て正の値となった。これはズレの計算が初期設定値から推定値を引くものであること、

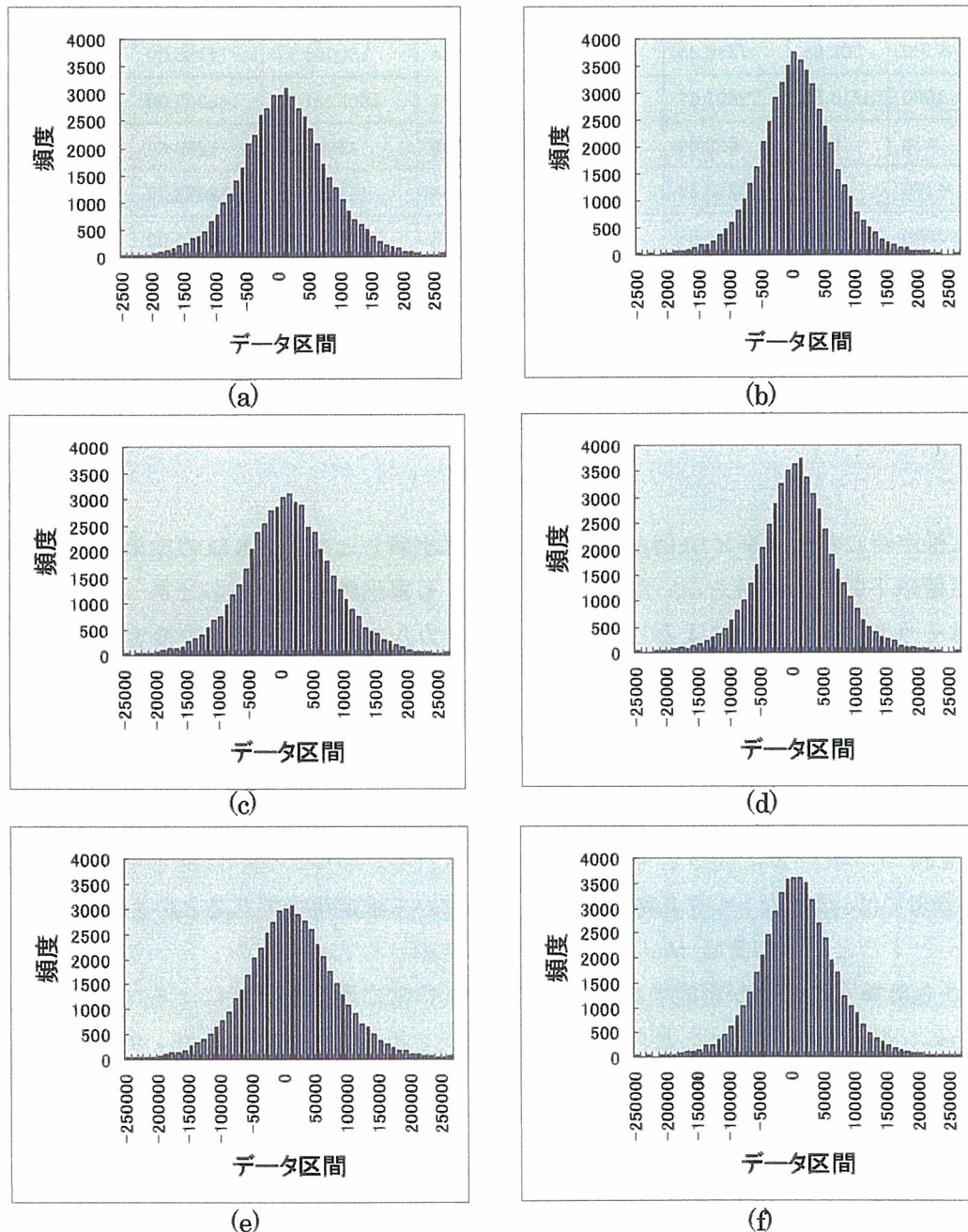


図5. 手法3-1)により発生したズレのヒストグラム

(a),(b)は希釈倍率 10 倍、(c),(d)は 100 倍、(e),(f)は 1000 倍である。また、(a),(c),(e)は元の標本の細菌数を下限から上限間を一様乱数として決定した場合、(b),(d),(f)は対数値間を一様乱数として決定した場合である。

表 1. 平板培養法におけるモンテカルロ法を利用した誤差評価の結果

乱数	希釈率	平均値	S.D.	S.D. (理論値)	S.D. (算出値)	初期設定値の 平均値	95% C. I. 下限	95% C. I. 上限
一様	×10	25.68	723.10	737.90	726.45	15991.92	-1426.00	1505.33
	×100	302.68	7258.35	7412.49	7314.54	160668.17	-14188.00	15241.67
	×1000	3218.82	72897.67	74158.28	73156.71	1605731.61	-143237.00	152929.00
対数	×10	2.58	623.86	559.52	626.85	11907.44	-1250.67	1293.67
	×100	44.90	6275.38	5620.60	6308.65	119516.62	-12574.33	13082.67
	×1000	268.02	62698.03	56231.32	62997.73	1190733.23	-125665.00	129912.33

S.D.は Standard Deviance 標準偏差、C.I.は Confidence Interval 信頼区間である。

一列目：“一様”は、細菌数を下限から上限間を一様乱数として決定した場合、“対数”は下限と上限の対数値間を一様乱数として決定した場合を指す

五列目：“S.D.（理論値）”はズレが理論通り二項分布に従うとして求められる S.D.

六列目：“S.D.（算出値）”は七列目の“平均値”を用い、二項分布から求められる S.D.

七列目：“初期設定値の平均値”は細菌数の初期設定値の平均値

推定値は推定時に希釈倍率×10 倍されるため、一定値以下の端数を持たないが、初期設定値はそうではないことによると考えられる。

元の標本中の各細菌は $1/(10 \times \text{希釈倍率})$ の確率で培地に撒かれることになる。したがって、培地上の細菌数は、確率 $1/(10 \times \text{希釈倍率})$ を持つ二項分布に従うと考えられる。二項分布では、試行のトータル数を M 、確率を p とすると、平均値は Mp 、分散は $Mp(1-p)$ から計算することが可能である。今回はさらに、試行を 3 回行ったときの平均値であるため、S.D. の実際の計算は次のようになる。

$$S.D. = \sqrt{Mp(1-p)/3} \times (\text{希釈倍率}) \times 10$$

S.D.（理論値）はそのように考え、計算した値を示している。そしてアルゴリズムの各試行で決定された初期設定値の平均値を求め、それを M として計算した S.D. が S.D.

（算出値）となる。S.D. の結果は、理論値よりも算出値に近いものであった。このモンテカルロ法による誤差の推定において設定された条件付け（先述の条件 3 など）により、実際の計数の平均値は、単純な理論的な平均値とは異なる。したがって算出値の方が推定値により近いものとなったと推測される。多少の違いはあるものの、二項分布から推定可能であるといえる。

結論として、今回のシミュレーションにより非常に理想的な系によるズレの評価が、可能であることがわかった。95% 信頼区間の上限と下限の大きさは S.D. の約 2 倍の値となった。先のヒストグラムの結果と同様このことから、結果が非常によく正規分布を表わしていることがわかる。また今回のアルゴリズムにより理想的な系が構築されていること、95% 信頼区間の上限と下限の大きさが初期設定値の平均値の約一割であることから、元の標本中の細菌数の約

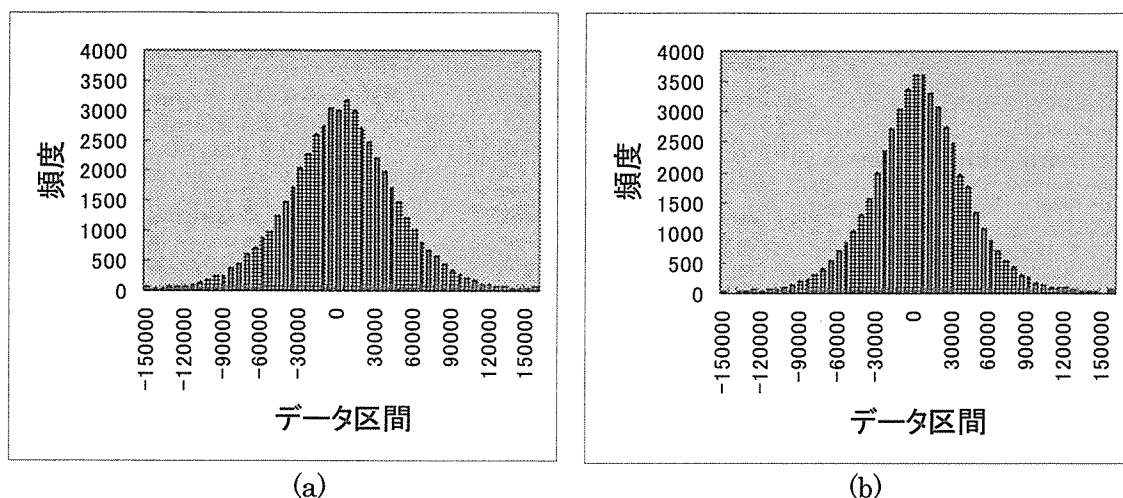


図 6. 手法 3-2) により発生したズレのヒストグラム

(a)は元の標本の細菌数を下限から上限間を一樣乱数として決定した場合、(b)は対数値間を一樣乱数として決定した場合である。

10%の大きさが最低限度の誤差として生じること、平板培養法による計測の際に避けられないものと推測された。

2) 直接計数法におけるモンテカルロ法を利用した誤差評価法

ズレのヒストグラムを図 6 に示す。平板培養法と同様、形状から見て正規分布であることが良くわかる結果が得られた。次に数値としての結果をまとめたものが表 2 である。今回シミュレートした直接計数法の条件では、最終の計数から推定値を出すための倍率が 21000 倍 ($=210/0.01$: 単位は mm^2) であるから、ズレの平均値に見られる値はかなり小さいものといえる。直接計数法に関しても、この手法による標本内の細菌数の推定値は理論的には二項分布に従う。ただし、平板培養法と異なりその理論値は一概には決定されない。試行が終了するまでに計数される視野の数の期待値が必要となるからである。そこで実際にこのモンテカルロ法によるシミュレーションを行

う中で、平均視野数 (表 2 中、7 列目) を求めた。結果、12、3 視野で計数を行えば、条件を満たすことが期待されることがわかった。この結果を基に計算したものが、5 列目の S.D. (算出値) である。実際の計算式は以下の通りである。

$$S.D. = \sqrt{Mp(1-p)} / (\text{平均視野数}) \times 21000$$

この式中の M は平板培養法と同様、シミュレーション中から求められる、初期設定値の細菌数の平均値 (表 2 中、6 列目) を使用した。結果として、その S.D. (算出値) は、実際に計算された S.D. とほぼ同じであった。したがって、今回のシミュレーションにより、理想的な系による計数のズレの評価が行われていることがわかった。平板培養法での結果と同様、95%信頼区間の結果から正規分布によく従っていることもわかった。

95%信頼区間の大きさと、このシミュレーションが理想的な系を実現していることから、平板培養法と同様、元の標本中の細