報 文 ヒト皮膚常在菌の凍結保存方法に関する研究

伊藤芳和 内田美栄 三村邦雄 西島 靖

A study on the freezing storage of micro-organisms on human skin

Yoshikazu Itou, Mie Uchida, Kunio Mimura, Yasushi Nishizima

In order to conduct a precise study on skinflora, a freezing procedure of micro-organisms obtained by scrubbing from human skin surface was investigated.

The optimum conditions for the preservation and culture were determined by using standard strains of *S. epidermidis* and *P. acnes* which are typical skin micro-flora.

Then the procedure was applied to evaluate actual human skin micro-organisms and counted the viable micro-organisms.

The results showed; the viable counts and the ratio of the constituent species did not change during the freezing of one month.

The scrubbing technic has a problem that we can not isolate micro-flora samples from a large number of persons within a short period of time, because of the viable counts of micro-organisms in each sample solution change as time goes on.

The procedure we presented here is useful to get precise data on the skin micro-bacteriological study.

1. 緒 言

ヒトの皮膚上には、多数の微生物が生息して一つの菌叢を形成している事が今までの研究で明らかにされている。

主なヒト皮膚常在菌としては、共にグラム陽性菌である *Staphylococci* と *Propionibacteria* である事が知られている^{1,2)}。

これらヒトの皮膚上に生息する微生物の種類や菌数に関する評価方法の確立は、この分野の研究を行う上で非常に重要な点であるが、サンプリング方法については、Punch biopsy 法、切り取った皮膚片をホモジネートする方法、スタンプ法、スクラブ法及びそれらの改良法等種々提案されている³⁻⁷⁾。これらの方法はそれぞれ長所短所を伴うが、皮膚上の菌数や菌種の評価という面では一定面積中に生息する微生物を搔取るスクラブ法が簡便法として優れている。

一方、皮膚上に生息する微生物の状態は温度・湿度等

の環境因子に影響されるため⁸⁾ その評価にあたっては、同一時期にサンプリングしたデーターを用いて解析する必要がある。また、健康人を対象とした常在菌の研究に於いては個体差や部位による変動が大きいため、多数のパネラー及び個々のパネラーのいくつかの部位から採取した検体を評価し、その結果得られた実験データーを解析して、初めて健康人の皮膚と常在菌の関係について種々の考察が可能となると考えられる。

したがって、一回の実験での検体処理量は膨大な量になるが、スクラブ法では常在菌をサンプリングした後、皮膚から分離液に移行した微生物を培養する操作に要する時間を、検体毎に一定にすることは非常に難しく、サンプリング後に菌数・菌種の変動を生じる可能性があるという問題点を含んでいる。

我々の実験ではスクラブ法により採取した皮膚常在菌数は、氷水で保管した分離液中に於いても徐々に低下することが認められている (Table-1)。

従来のスクラブ法を用いたヒト皮膚常在菌に関する研究報告では、このような試料採取後操作上の問題点を明確にした研究例は見当たらない。

このため我々は健康人の皮膚常在菌の研究を行うにあ

鐘紡化粧化粧品研究所：小田原市寿町5丁目3番28号
Kanebo LTD. Cosmetic Laboratory：3-28, 5-chome, Kotobuki-cho, Odawara-shi, JAPAN

Table-1 Decrease in viable counts of skin micro-organisms in the scrubbed soln.

Incubating condition	Viable counts per cm ² of cheek after storage at 0°C (hr.)				
	0	2	4	8	24
Aerobes	4090	2790	2620	2500	1330
Anaerobes ¹⁾	1290	1240	945	958	448

¹⁾ The data were presented by 1/100.

Scrubbed soln. was stored in the ice bath during the evaluation.

たり、一定時間内にサンプリングした多数の検体中に含まれる常在菌の菌種・菌数を変化させることなく、任意の時期に測定を可能とする方法の確立を目的として、採取した常在菌を含む検体を凍結して保存する方法の導入を試みた。

本報告ではその結果得られた知見について報告する。

2. 実験方法

2.1 標準菌株を用いた凍結保存法の検討

ヒト皮膚常在菌の凍結保存法のモデルとして代表的な常在菌の標準菌株を用い、種々の実験条件の検討を行った。

2.1.1 使用標準菌株

標準菌株として次の2菌種を用いた。

S. taphylococcus epidermidis IAM 1296

P. propionibacterium acnes RIMD 1640001

2.1.2 標準菌株の培養及び凍結方法

当研究所に保存している上記2株をBHI液体培地(Difco)で*S. epidermidis*は37°C 24時間、*P. acnes*は37°C 48時間静置培養し、増殖した菌体を遠心分離により集菌し(10,000rpm 10分 4°C)、滅菌済み75mM、pH 7.0 リン酸ナトリウム緩衝液で2回洗浄した後の菌体を、0.1% ポリエチレングリコールソルビタンモノオレート(トウエー80/以下T-80と略)を加えた滅菌済み75mM pH7.0 リン酸ナトリウム緩衝液に懸濁した。更に必要に応じて懸濁液を同緩衝液で希釈し生菌数(CFUと略)を測定後、少量ずつ滅菌済み6ml容量のマイクロチューブ(Falcon®)に分注して-80°Cディープフリーザー(大西熱学(株)製)内で急速に凍結し、そのまま保存した。その後、適宜凍結菌体懸濁液を氷水中で融解し、生菌数の変化の有無を評価した。

なお、菌体懸濁用緩衝液は特に断らないかぎり0.1%

T-80を加えた滅菌済み75mM pH7.0 リン酸ナトリウム緩衝液を用い、必要に応じ適宜pH等を変化させ実験に供した。

2.2 生菌数測定方法

標準菌株及びヒト皮膚常在菌の生菌数の測定用の培地として、*S. epidermidis* 及び好気性ヒト皮膚常在菌の検出にはBHI寒天培地(Difco)を、*P. acnes* 及び嫌気性ヒト皮膚常在菌の検出にはABCM寒天培地(栄研)を用いた。検体及びその希釈液の0.1mlを寒天培地上に滴下し、コーンラージ棒を用いて均一に拡げる寒天平板塗抹法により評価した。好気培養は32°C、3日間、嫌気培養はガスバックジャー(BBL)内で37°C、5日間培養し、生じたコロニー数を測定し生菌数とした。

標準菌株に関する結果はCFU/mlで、ヒト皮膚常在菌に関する結果はCFU/cm²でそれぞれ示した。

2.3 ヒト皮膚常在菌の分離と同定

当社研究所に勤務する健康な成人男女(年齢21~39歳)数名ずつを被験者とした。常在菌の分離には標準株の項で述べた0.1% T-80を加えた滅菌済み75mM pH7.0 リン酸ナトリウム緩衝液を分離液として用いた。

通常石鹸で洗顔120分後の顔面(頬・額)に円筒型カップ(直径32mm(約8cm²), 高さ25mm)を密着させ、その中に1mlの分離液を入れ、先端を丸くしたテフロン製スパチュラ(搔取り部位の長さ10mm)で40回皮膚表面を搔取り、その後6ml容量のマイクロチューブにピペットを用い分離液を回収した。更にもう2回同じ操作を行い併せて得られた3mlの回収液をヒト皮膚常在菌の検体とした。

この検体液の内の0.5mlをサンプリング直後の生菌数測定に用い、残りは手早く0.5mlずつ2ml容量のマイクロチューブに分注し、直ちに-80°Cディープフリーザー内に入れ凍結しそのまま保存した。

なお、サンプリングに用いた器具類は全て滅菌処理済みの物を用いた。

3. 結果

3.1 標準菌株を用いた凍結保存法の確立

3.1.1 低い菌数レベルにおける凍結保存の検討

微生物を超低温化で急速に凍結して保存する方法は古くより知られているが、この方法は一般に10⁸~10¹⁰CFU/mlというような高い菌数の状態に対して菌数の維持とは関係なく、その微生物の長期的な保存を目的として用いられる方法であり、通常スクラブ法で得られる皮膚常在菌の10³~10⁶ CFU/mlというような低い生菌数レ

ベルの維持保存が凍結法により可能かどうかについて検討を行った。

Fig.-1 に *S.epidermidis*, Fig.-2 に *P.acnes* の凍結前後の寒天培地上に形成したコロニー数を比較して示したが、2つの菌種は共に少なくとも凍結後4週間は $10^3 \sim 10^4$ という低い菌数でも凍結前の生菌数が保持されており、代表的な皮膚常在菌についてはサンプリング後の凍結保存が可能な事を示した。

3.1.2 分離液中の界面活性剤の影響

ヒトの皮膚表面は皮脂に覆われており水には馴染みにくい性質を有する。そのためスクラブ法に於ける皮膚常在菌の分離液には、低濃度の界面活性剤が配合されている。この界面活性剤の種類としては、Kligman 等の報告⁹⁾ に準じポリエチレングリコールモノ-*p*-イソオクチルフェニルエーテル (トリトン X-100[®] 以下 TX-100) を用いた研究報告が多い。一方、岸下等が報告^{9),10)} しているように、TX-100を含む緩衝液中では氷水中でも *P.acnes* の生菌数が経時的に減少するという結果もある。

凍結法により皮膚常在菌をそのままの状態で長期間保存する目的からすると、この界面活性剤の選択は重要な点であるため、常在菌研究の分野においてよく用いられる界面活性剤 T-80 及び TX-100 について、その生菌数への影響を検討した。

液体培養後の菌体を界面活性剤を含まないリン酸ナトリウム緩衝液で洗浄・懸濁し、その 0.1ml を T-80 もしくは TX-100 を 0.1% (wt/v) 含む各々のリン酸ナトリウム緩衝液 10ml に投入し、混合後直ちに凍結した。凍結前の菌数は元の菌体懸濁液から理論値として算出した。

結果を Fig.-3 に示すが、TX-100 についての結果は凍結後一週間目で最初の生菌数に比較して *P.acnes* では 1/1000 程度、*S.epidermidis* では 1/10~1/100 程度に減少する事が認められた。一方、T-80 についての結果は Fig.-2 で示した結果と同様に生菌数は凍結後も安定しており、菌体への影響は生菌数の保存という点では認められなかった。

3.1.3 凍結方法の検討

-80°C デイプフリーザーに於ける凍結保存は代表的な皮膚常在菌に対し可能であるとの知見を得たが、実際に皮膚表面より常在菌を採取する場合、常にデイプフリーザーの側でサンプリングを行なわなければならないという問題点があるため、ドライアイスを入れたアイスボックス内で簡易的に凍結し、全てのサンプリングが

Fig-1 Effect of freezing time in deep freezer on viable counts of *S.epidermidis* IAM 1296.

Grown cells were centrifuged and washed 2 times. 10-fold dilutions were made by 75mM Sodium phosphate buffer (pH 7.0).

Several tubes included 2 ml volume of the appropriate dilution were stored at -80°C until used.

- ; 100-fold dilutions
- ; 10-thousandfold dilutions

Fig.-2 Effect of freezing time in deep freezer on viable counts of *P.acnes* RI-MD 1640001.

The procedure was described in Fig.1.

- ; 10-fold dilutions
- ; thousandfold dilutions

Fig.-3 Effect of surface active detergents on viable counts of *S.epidermidis* and *P.acnes*.

—; Tween 80®
 ---; Triton X100®
 ○; *S. epidermidis*
 ●; *P. acnes*

終了した後ディープフリーザーに移槽する簡便法の検討を行った。その結果を Fig.-4 に示したが生菌数への影響は認められなかった。

今回の実験で菌体懸濁液をいれたストックチューブは -80°C ディープフリーザー内では3分以内に凍結が完了したが、ドライアイスを入れたアイスボックス内では10分程度の時間を要した。従って、代表的な常在菌である *S.epidermidis* 及び *P.acnes* は比較的緩やかな凍結処理でも安定している事が認められた。

3.1.4 分離液の pH

スクラブ法に於ける皮膚常在菌分離液の pH は研究者により種々の値が使われているが、凍結法との関係に於ける pH の菌体への影響について検討を加えた。

75mM のリン酸ナトリウム緩衝液を用いて pH 6~8 になるよう調整し実験を行った。

Table-2 に *P.acnes* に関する結果を示したが、pH 6~8 の範囲で生菌数に関する変化は誤差範囲であった。また、*S.epidermidis* についても同様の結果が認められた。

この結果より、我々は凍結法による皮膚常在菌の評価方法の確立において一貫して pH 7 を採用して実験を行

Fig.-4 Effect of freezing by dry-ice on viable counts of *S.epidermidis* and *P.acnes*.

Cells in tubes were frozen in a dry-ice box instead of the deepfreezer and kept 2 hr.

Then those were transferred from the box to the deepfreezer. Viable counts were evaluated after 3 and 7 days from the transferences.

○; *S. epidermidis*
 ●; *P. acnes*

Table-2 Effect of pH value of the solution on viable counts of *P. acnes*.

		log. CFU/ml				
pH	before freezing	after freezing(day); -80°C				
		3	5	7	14	35
6		4.7	4.8	4.9	4.8	4.7
7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.6	4.8
8		4.6	4.5	4.6	4.6	4.6

った。

3.1.5 凍結菌体の融解

凍結した菌体液の生菌数を測定するためには、凍結状態から液体に融解する必要がある。今までの結果から融解そのものの影響は少ないと考えられるが、融解後どの程度の時間内であれば安定した菌数の検出が可能かについて検討を行った。

Table-3 に *P.acnes* に関する結果を示したが、氷水中で融解しそのまま静置した状態で、少なくとも2時間迄は安定した結果を示すことが認められた。

S.epidermidis についても同様の結果が得られた。

Table-3 Relation between defrosting and viable counts of *P. acnes*.

	log. CFU/ml
before freezing	4.7
after defrosting	
≤ 5 min.	4.6
2 hr.	4.5

P. acnes cells in a suspension were counted and frozen (-80°C). 2 days after freezing, it was defrosted in ice bath.

Viable cells were counted within 5 min. and 2 hr. after defrosting.

以上の結果より代表的な皮膚常在菌である *S. epidermidis* 及び *P. acnes* を用いたモデル実験では、サンプリングした直後に凍結操作を行うことにより長期間に亘って安定した生菌数の保持が可能であることが示された。

3.2 評価フロー

上記標準菌株で得られた知見を実際のヒト皮膚常在菌の評価に当てはめると次のようなフローが得られる。

即ち、パネラーの皮膚表面よりスクラブ法により常在菌をサンプリングし直ちにドライアイスボックス中で凍結し、ディープフリーザー内に保存する。その後適宜凍結サンプルを水浴中で融解し生菌数の測定を行う。凍結期間としては今回の我々の実験した範囲内においては約1カ月は安定した結果が得られた。また、融解後は氷冷下2時間以内に培地上に塗抹し、一定の培養時間後生じたコロニーをカウントしデーターとする方法である。

Fig.-5 Flow of the procedure.

3.3 ヒト皮膚常在菌の分離への応用

Fig.-5 の標準菌株で得られた評価フローが皮膚上という特異な環境に生息している実際の皮膚常在菌の測定に応用可能かどうかについて凍結前後の菌数及び検出される菌種構成の面から評価した。

10名のパネラーを対象に試験した結果、菌数については **Fig.-6**~**Fig.9** に代表例を示すが、好気培養では 10^2 CFU の低い菌数でも安定した生菌数の保持が可能で

Fig.-6 Application of freezing storage on actual human skin micro-organisms (1).

paneller; female, 24 age, left cheek

- ; anaerobes
- ; aerobes

Fig.-7 Application of freezing storage on actual human skin micro-organisms (2).

paneller; male, 36 age, left cheek

- ; anaerobes
- ; aerobes

Fig.-8 Application of freezing storage on actual human skin micro-organisms (3).

paneller; female, 21 age forehead
● ; anaerobes
○ ; aerobes

Fig.-9 Application of freezing storage on actual human skin micro-organisms (4).

paneller; male, 27 age, forehead
● ; anaerobes
○ ; aerobes

あることが認められた。また、嫌気性菌に対する結果も同様に満足な値を示した。

構成する菌種についてはコロニーの形態や簡易同定キットを用いて同定を行ったが、凍結前後で変化は認められなかった。即ち、凍結前後で10名のパネラーから各10コロニー計200株を選び同定した結果、嫌気培養で得ら

れた菌種は通性嫌気性で嫌氣的生育が可能な *Staphylococci* を除いて全て *P.acnes* であった。

一方、好気培養で得られた菌種は95%が *S.taphylococci* (その内85%が *S.epidermidis* で10%が *S.capitis* その他が5%) であり、凍結前後での構成比率は同じであった。同定できなかった株についても生化学的な性状のよく似たコロニーが凍結前後で検出されており構成菌種の変動は比較的少ないものと推定された。

以上の結果より当初目的とした多数のパネラーから短時間の内に検体を分離し、そして各試料毎のサンプリングから培養までの時間的な影響を一定にし得る方法として凍結法の導入が有用であることが示唆された。

4. 考 察

ヒトの生理的な状態の違いや変化は、皮脂や汗等の分泌物の変化として外界との接点である皮膚表面にも及ぶことが考えられる。この事は皮脂腺開口部や角質上部に生息し皮膚と何らかの相互作用を有していると考えられる皮膚常在菌にも当然影響することが予想され、皮膚常在菌を研究する事は皮膚生理を考える上で重要であると考えられる¹¹⁾。

この皮膚常在菌に関する研究においては、ヒトの皮膚表面から正確に菌体採取しそのままの状態でも菌数や菌種を評価する事が重要である事は言うまでもない。

このため、各種のサンプリング方法が開発されてきたが、現在一般に用いられている方法としてはスタンプアガー法とスクラブ法及びその改良法がある。

これらの方法はいずれも長所欠点を有するが、スタンプアガー法は常在菌採取から培養迄の操作が不要であり一度に多数の検体をサンプリングできるというメリットがある。しかしながらスタンプアガー法は100個程度のコロニー数のカウントは可能であるが、皮膚常在菌のように1cm²当たり数千から数百万個の微生物が存在し、培地上に膨大な数のコロニーを形成するような部位への応用は困難である。すなわち、スタンプアガー法は正確な菌数の把握が出来ない事や菌種同定のための菌株の単離についても問題点が多い事等から、皮膚常在菌研究の方法としては不適当と考えられる。

一方、スクラブ法は皮膚という環境に馴染んでいる微生物を一旦緩衝液中に懸濁させるという操作が必要である事やサンプリング後素早く培地上に塗布しなければならない等、一度に多数のパネラーから検体を採取できないのが欠点である。しかしながらこのスクラブ法は分離した微生物が増殖可能であれば、培地の工夫等により正

確な菌数の把握や、生じたコロニーの菌種同定及び特殊な分離選択培地での評価もトータルの生菌数評価と併せて同時に出来るなど、有利な点も多い。今回我々が検討したスクラブ法における凍結法の導入は、これら問題点の解決を試みたもので、前項で述べたようにサンプリング後直ちに凍結保存する事により検体中の代表的な微生物については、長期間そのままの状態での保存可能であることが判明した。

LEYDEN¹²⁾らは年齢や人種等をパラメーターとして342人という多数のパネラーの皮膚常在菌をスクラブ法で測定しているが、サンプリングの期間や時期については明確にしていない。

感染症とその原因菌との関係のように微生物のターゲットが絞られる場合と異なり、健康人を対象とした皮膚常在菌の研究では、多数のパネラーから得たデータに基づき結果を解析する必要がある。その意味でこの報告は貴重なものであるが、先きにも述べたように皮膚常在菌は温度・湿度等季節的な環境因子によっても影響をうけるという点を考慮すると、おそらく長期に亘って採取したと考えられる常在菌のデータを、同一次元で評価していることに関する疑問が生じてくる。

凍結法を用いれば短期間の内に数10名以上のパネラーからの検体採取が可能であり、また、採取後の菌体コロニー形成の為の培養操作についても一定した条件で行うことが可能である事から、こうした疑問の解消に役立つと思われる。腸内常在細菌の中には検体(糞便)採取後、輸送のためにサンプルを凍結すると急激に菌数が減少する菌種もいることが辨野¹³⁾らにより明らかにされているが、皮膚常在菌を対象とした我々の研究では、凍結前後で構成する菌種に大きな変化を認めておらず、主要な常在菌についての影響はないと考えられる。しかしながら検出培地を変えた場合や分離頻度の少ない菌種及び構成する割合の少ない菌種等への影響については、更に今後の検討が必要であると考えられる。

5. 総 括

皮膚常在菌の評価を正確に行うために、スクラブ法で得た検体を凍結して保存することを試みた。

まず、代表的な皮膚常在菌である *S. epidermidis* 及び *P. acnes* の標準菌株を用いて凍結方法に関する実験上の諸条件を検討し、皮膚常在菌の分離液中の活性剤は T-80 が適当であることなどを明らかにした。

標準菌株で得られた結果に基づき、健康な10名のヒトの顔面より検体を採取し凍結前後での比較を行った結果では、菌数・菌種共に変化がなく、実際のヒト皮膚常在菌についても凍結保存することが可能であることを認めた。

スクラブ法ではサンプリング後培地に塗抹するなどの操作が必要なため、一時に多数の検体を採取し評価する点で問題はあがるが、凍結法の導入はこれら問題点の改善に有用であることが明らかになった。

参 考 文 献

- 1) Maibach Hidick, Smith editor, Skin Bacteria and Their Role in Infection. McGraw Hill, New York (1965)
- 2) 朝田康夫, 臨皮, 29(6), 437 (1975)
- 3) J.N. Kearney, J. of General Microbiology, 130, 797 (1984)
- 4) J. Leeming, ibid., 130, 803 (1984)
- 5) Holland, K.T., J. of Applied Bacteriology, 37, 289 (1974)
- 6) Kligman, A.M., J. of Investigative Dermatology, 45, 498 (1965)
- 7) E.M. Staal, J. Soc. Cosmet. Chem. 29, 607 (1978)
- 8) 滝沢清宏, 皮膚臨床, 20, 897 (1978)
- 9) M. Kishishita, Applied and Environmental Microbiology, 40, 1100 (1980)
- 10) 岸下雅通 皮膚科紀要, 73, 1 (1978)
- 11) 桑山三恵子, 粧技誌, 20, 167 (1986)
- 12) James J. Leyden, J. Investigative Dermatology, 65, 397 (1975)
- 13) 辨野義己, 第8回理研腸内シンポジウム 講演要旨集, P. 1 (1987)

(昭和63年4月19日受理)