

SporeNews

MesaLabs

biological indicators newsletter

Volume 10, No. 2



菌数測定法について by Robert Bradley

菌数測定法（菌数の確認試験）は、バイオリジカルインジケータユーザーが行う一般的な検査です。この試験は、ユーザーが受け取った製品の品質を保証するためのものになります。『どういった手順で準備をすればよいでしょうか？』といった質問を受けることがあります。その答えは期待するほど単純なものではないかもしれません。様々な製品が一つの方法で行えるわけではありません。米国薬局方（USP）と国際標準化機構（ISO）は、菌数を測定するのに異なる方法を記載しており、殆どのバイオリジカルインジケータのメーカーは、製品ごとにそれぞれの手順を独自に開発しています。それでは正解は何になるでしょうか？標準的な USP や ISO と、メーカーの手順を比べてみましょう。

USP<55>は2つの基本手順を示しています。1つ目に最低3つの試験サンプルが必要になります。2つ目に、3種類の製品ごと（担体ごと）について説明があります。①紙 ②紙でないもの ③懸濁液の3つです。これらは、試験サンプルから微生物を剥がす（取り出す）ステップに違いがあります。以下は、担体が『紙』についての説明です。

1. 試験サンプルから微生物を溶出させる。3つの試験サンプル（試験紙）を100mlの冷却した滅菌精製水を滅菌した250mlカップに入れて、適切な混合機（ミキサー）で十分な時間混ぜることで懸濁液を均一にして分散させます。
2. 10mlずつ滅菌済スクリーキャップ付チューブ（16x125mm）へ移します。
3. チューブを適切な温度でヒートショックする（thermophiles: 95-100℃ 15分間、mesophiles : 80-85℃ 10分間）。
4. ヒートショックを止めて氷上（0-4℃）で急速に冷却する。
5. 2つのチューブに1mlずつ移して移動して、精製水で段階希釈を行います。希釈液は30-300CFUを選択し、最低でもプレート上の数は6枚以上でなければなりません。
6. 希釈液1mlを2つのペトリディッシュに接種します。
7. 20分以内に20mlの寒天培地を添加して、40-50℃で溶解して冷却し固めます。
8. プレートを逆さにして適切な温度で48時間培養します。

ISO11138-1 は USP, ISO よりも曖昧な表記となっています。製品の基本的な概要が示されています。ISO には最低 4 つの試験サンプルが必要です。試験サンプルは適切な懸濁培地に入れて、テストする微生物が検証された手順で溶出されるべきであると表記されています。微生物を担体から溶出させたら、段階希釈して Tryptic soy 寒天培地プレートに接種します。コロニー数は 30-300CFU が適切だと考えられます。ISO は、バイオロジカルインジケータのメーカーに、様々な種類のバイオロジカルインジケータごとに適切な手順を提供するように言っています。USP に手順があるにも関わらず、バイオロジカルインジケータメーカーは USP に記載されている基本手順を変更して検証を行っています。通常これは、効率と精度を上げるために行われています。Mesa Labs 社の Bozeman 工場と Omaha 工場はそれぞれ USP 手順のバリデーションの検証を行っています。

Bozeman 工場の製品（担体：紙）の手順は、下記の 1 つの例外をのぞいては USP に厳密に従っています。

- ミキサーではなく、ガラスビーズを使用して微生物を溶出しています。ミキサーの代わりに Bozeman 工場では、ガラスビーズとボルテックスを使用して、ペーパーストリップを細かくしています。

Omaha 工場では、USP の手順に従い様々な検証を行っています。

- 試験サンプルが 3 個ではなく、10 個にしています。これには 2 つの理由があります。一つは使いやすさと正確さのためです。10 サンプルにすることで希釈率が容易になります。また 10 サンプルにすることで平均値がより正確になります。
- 48 時間ではなく 24 時間の培養時間になっています。Omaha 工場では、菌数測定手順を使って、精製水、tryptic soy 寒天培地、および厳密に制御されたインキュベータを使用しており、24 時間または 48 時間で同等の結果が得られることを見いだしています。
- 30-300CFU ではなく 10-300CFU でカウントしています。Omaha 工場では、2 つの希釈をプレートしています。1 つはコロニーが 100-300CFU を検出するため、もう一つは 10-30CFU を検出するための希釈液です。最小カウントを 10CFU まで落とすことによって、2 つの希釈液の結果を平均して結果の精度を高める事ができます。Omaha 工場では、最低 10CFU の検出となっており、USP と ISO の基準（30CFU）の以下になりますが、USP の最低 6 個のコロニーという部分では上回っています。

上記の変更は、採用している特定のメーカーではうまく機能していますが、全てのメーカーの全てのバイオロジカルインジケータに使用されるべきではありません。メーカーは、異なる方法を用いて微生物やバイオロジカルインジケータを生産しています。これらの方法は、別のメーカーによって、バイオロジカルインジケータの微生物を検証した場合、異なる結果になる場合があります。一例として、Bozeman 工場で使用しているガラスビーズによる微生物の溶出は、Bozeman 工場で製造された製品については非常にうまく機能します。しかしながら、Omaha 工場で製造された製品でこの方法を利用した場合、うまく機能しない場合があります。なぜなら、この工場ではより厚い紙を利用しており、ガラスビーズを用いて同様に溶出することが

できません。

それで答えは何でしょうか？どの手順に従うべきでしょうか？理想的にはメーカーと同じ手順を使用すべきです。あなたはメーカーの結果と同じように出したいはずですが。そのためには同じ製品で同じ方法に従うことです。ほとんどのメーカーは、総生存孢子数を確認するための標準的な方法を喜んで提出するはずですが。

Spore News を翻訳しております。原文は下記リンクでご確認できます。

<http://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2014/04/Spore-News-Vol-10-No-2.pdf>

ご不明点、ご質問、製品のお問い合わせに関してはレーベン・ジャパン株式会社までお気軽にお問い合わせ下さい。

レーベン・ジャパン株式会社 埼玉県越谷市川柳町 3-110-8

TEL : 048-961-1781 FAX : 048-961-1782

メールでのお問い合わせ : info@raven-japan.jp