



Volume 8, No. 3

オートクレーブ処理された液体 BI アンプルのカaramel化（暗色化）現象

By Russ Nyberg

液体または TSB 培地をオートクレーブすると、滅菌された培地は滅菌され、結果として熱に曝されることにより、暗い色になることがあります。この現象は、TSB 培地を含む密封ガラスアンプルタイプのバイオリジカル・インジケータ（BI）で作業する場合に懸念を与えることがあります。ほとんどのアンプルタイプの BI では、孢子および TSB 培地がアンプルに含まれています。アンプル BI を典型的なサイクルでオートクレーブ処理して、培養し、全ての孢子が死んでいるか、または生存しているかどうかについて調べます。この陽性/陰性試験は、アンプル内の TSB の色を確認することによって評価します。アンプルには、TSB に紫色を与える pH 指示薬も含まれています。



培養時に、孢子がサイクルで死滅しなかった場合、それらは発芽し、TSB を代謝し、成長を開始する。TSB 中に存在する糖の代謝の一部として、酸性廃棄物が放出され、pH の低下の結果として、アンプルの色が紫色から黄色に変化します。アンプル BI を使用しているとき、アンプルが高温または高温サイクルにさらされたときに起こる色の通常の暗色化は、サイクルで生き残った可能性がある損傷菌を検出するかどうかに関して問題が生じます。これについては疑問視されます。なぜなら、暗い色のアンプルはカaramel化されており、増殖促進できないために機能しなくなると述べているからです。

図 1. アンプル（左：陰性、右：陽性）

熱性選択培地の他に、製造業者の指示に従って滅菌した場合、ほとんどの他の培地は 121°C で 15 分間滅菌する必要があります。滅菌の時間および温度パラメータは、USP において「媒体の温度における時間」が非常に明確になっています。そのように、121°C で 15 分というのは、培地を 121°C で 15 分間完全に保持することを意味します。培地のフラスコが温度に達するまでの立ち上がり時間が 20 分であることを考慮すると、サイクル全体は 35 分に設定されます。：立ち上がりのための 20 分および 121°C の追加の 15 分という計算になります。

121°C で 15 分以上の高温で運転されるサイクルに伴う長いサイクルは、媒体の自然な黒ずみまたは茶色のカaramel化をある程度引き起こす可能性があります。これは、単に製造業者が指定した以上の延長された暴露時間、またはより高い熱サイクルにより、紫色の pH 指示薬の物理的存在によって媒体が暴露されることによるものです。

カラメル化の間、培地中に存在し得るグルコースおよび他の糖は、わずかに暗くなり、培地の全体的な外観は、より濃い蜂蜜または薄茶色に見えます。媒体自体が暗くなるのに加えて、これらのアンプルに使用される追加の紫色 pH 指示薬の存在により、pH 指示薬を使用しない媒体よりも色がさらに暗く見えることとなります。

カラメル化は、ProSpore Ampoule や MagnaAmp のような自己封入型ガラスアンプル型 BI のほとんどのユーザーにとって大きな懸案事項となります。典型的に、これらの BI が 121℃で 15 分ではなく、より長いサイクルまたはより高い温度にさらされる様々な状況で使用される場合、培地の色は暗くなる傾向があります。これらのタイプの BI の両方とも、糖を含む TSB のアンプルに懸濁した孢子を有しています。アンプルはまた陽性陰性をユーザーが容易に決定するために pH 指示薬を含んでいます。BI が滅菌サイクルで殺されなかった場合、培養の際に生き残った孢子は糖を代謝し、酸性廃棄物を放出し、結果として pH が低下すると、pH 指示薬はアンプルの色を紫色から黄色に変えます。

これらのアンプルをオートクレーブする間に僅かなキャラメル化が起こると、紫色の pH 指示薬の物理的存在と共に糖が存在するため、アンプルは未処理のアンプルと比較して暗く見えます。視覚的に処理されるために、ネガティブコントロールアンプルを使用すべき理由がここにあります。ネガティブコントロールアンプルは、テストアンプルと一緒に作動し、オートクレーブから取り出されたときの通常の「処理された」アンプル色の将来の色基準として使用することができます。

培養すると、増殖を示すアンプルは、色が蜂蜜または黄色にまたはそれに向かってさらに変化し、濁りを示します。この付加的な色の変化は、処理された対照アンプルの色と比較すると容易に確認することができます。潜在的な問題として、サイクルが実行された後、一人がオートクレーブからアンプルを取り出し、アンプルの色が初期の明るい紫色から既に変化していることに気づかずに培養にアンプルを置くと発生する可能性があります。48 時間の培養後、アンプルは、処理されたアンプルの正常な色の変化を知らない他の人によって培養から取り出され、アンプルの色の変化が培養された結果で、色の変化を陽性として記録することが考えられます。これは、処理されたアンプルを通常の色の変化のためのカラーガイドとして、またネガティブコントロールのカラー例として維持することによって避けることができます。

カラメル化はメディアの成長促進能力を損なうでしょうか？

アンプル BI のカラメル化 TSB が細菌を成長促進するかどうかを判断する試みとして、Mesa Labs の Omaha Manufacturing Facility の研究員が 2009 年に研究を行いました。Mesa Labs の一部門であるオマハ・ネブラスカ州のレーベン研究所に、多数の試験アンプルおよび対照アンプルを長時間および高温サイクルでオートクレーブ処理しました。これらのアンプルをオートクレーブ中で 132℃の温度で 2 時間運転しました。取り出すと、アンプルは非常に暗色でした。続いて、滅菌した培地の増殖促進能力を、無菌的にアンプルの上部を開き、各アンプルに *Geobacillus stearothermophilus* 孢子を接種し

試験しました。この孢子は、試験のために BI アンプル中に存在する種であるので選ばれました。次いで、すべてのアンブルを 55～60℃で 48 時間培養しました。生存可能な孢子を接種した滅菌済みアンブルの全 20 個は、培養 48 時間以内に培地色を黄色に変色することによって増殖の徴候を示しました。したがって、曝露中の培地の暗色化またはカラメル化は、増殖を促進し有用な滅菌試験データを提供する能力を持っていることがわかりました。アンブル BI に使用されているもの以外の細菌種を使用している場合には、様々な媒体タイプのカラメル化が他の細菌種で増殖を促進しないことがありますので、ご注意ください。追加の試験は、その培地および/またはそれらの微生物で行う必要があります。しかし、孢子アンブルで使用される BI 指標菌 *Geobacillus stearothermophilus* の場合、培地の暗色化およびカラメル化は、培地の増殖促進能力または BI の機能に影響しません。

培地が非常に暗い場合でも BI は機能しますか？ →はい

培地が非常に暗い時、どのようにして陽性アンブルとして伝えることができますか？ 曝露され培養したテストアンブルを、曝露され培養されたネガティブコントロールアンブルと比較して、色の変化を測定することになります。

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。※日本語訳は原文解釈の参考としてご利用下さい。

https://raven-japan.jp/up_01/src/Number2.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