

# 微生物および微生物試験 の基礎

株式会社 コーガアイソトープ  
滅菌研究センター  
越川 富比古

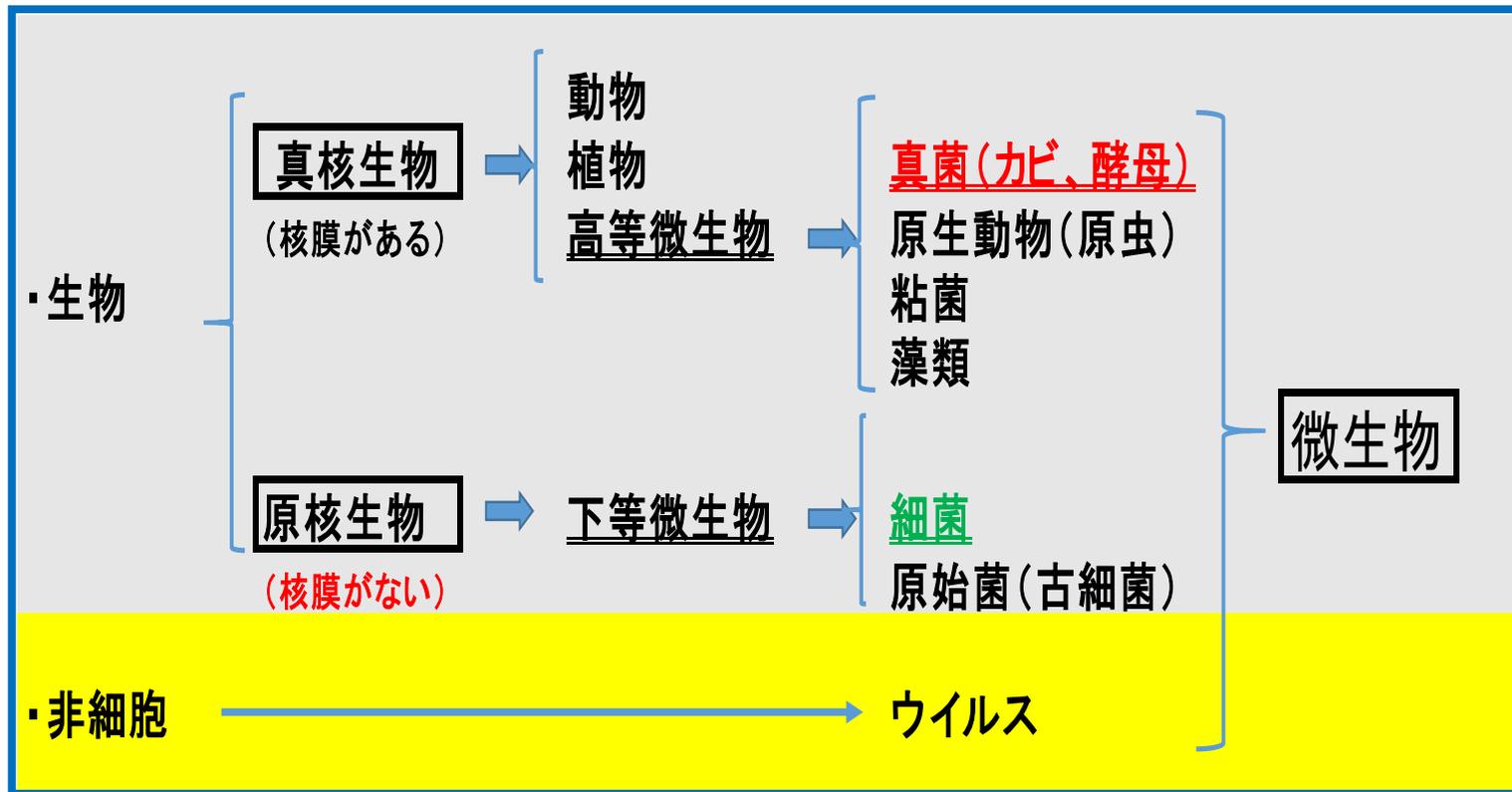


# 本日の内容

- 1) 微生物とは
- 2) 微生物試験の基礎
  - \* バイオバーデン試験
  - \* 無菌性の試験

# 微生物とは

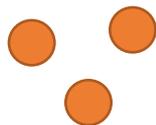
# 生物の分類での微生物の位置付け



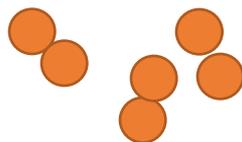
# 微生物の大きさの比較

分解能	大きさ	具体例
人の肉眼  70 $\mu\text{m}$	1mm (1000 $\mu\text{m}$ )  100 $\mu\text{m}$	← カエルの卵 2~3mm ← ゴーリムシ (200~300 $\mu\text{m}$ ) ← ヒトの卵 (140 $\mu\text{m}$ )
光学顕微鏡  100nm	10 $\mu\text{m}$ 1 $\mu\text{m}$ (1000nm) 100nm	← 酵母 (10 $\mu\text{m}$ ) ← 大腸菌 (1.5 $\times$ 3 $\mu\text{m}$ ) ← ブドウ球菌 (1 $\mu\text{m}$ ) ← エイズウイルス (100nm)
電子顕微鏡  0.2nm	10nm 1nm 0.1nm	← DNA分子の太さ (2nm) ← 糖・アミノ酸分子 (0.5~1nm)

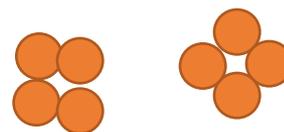
# 細菌の形態（球菌）



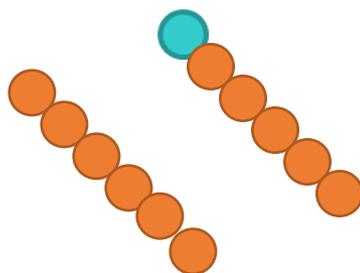
単球菌



双球菌



四連球菌

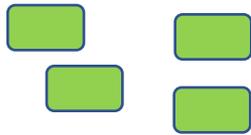


連鎖球菌

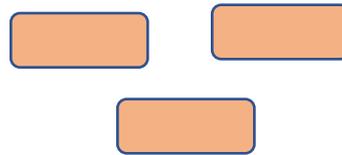


ブドウ球菌

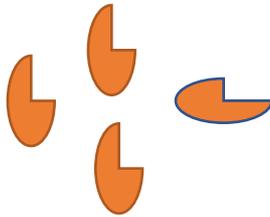
# 細菌の形態（桿菌）



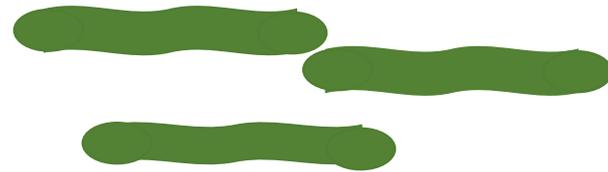
短桿菌



桿菌

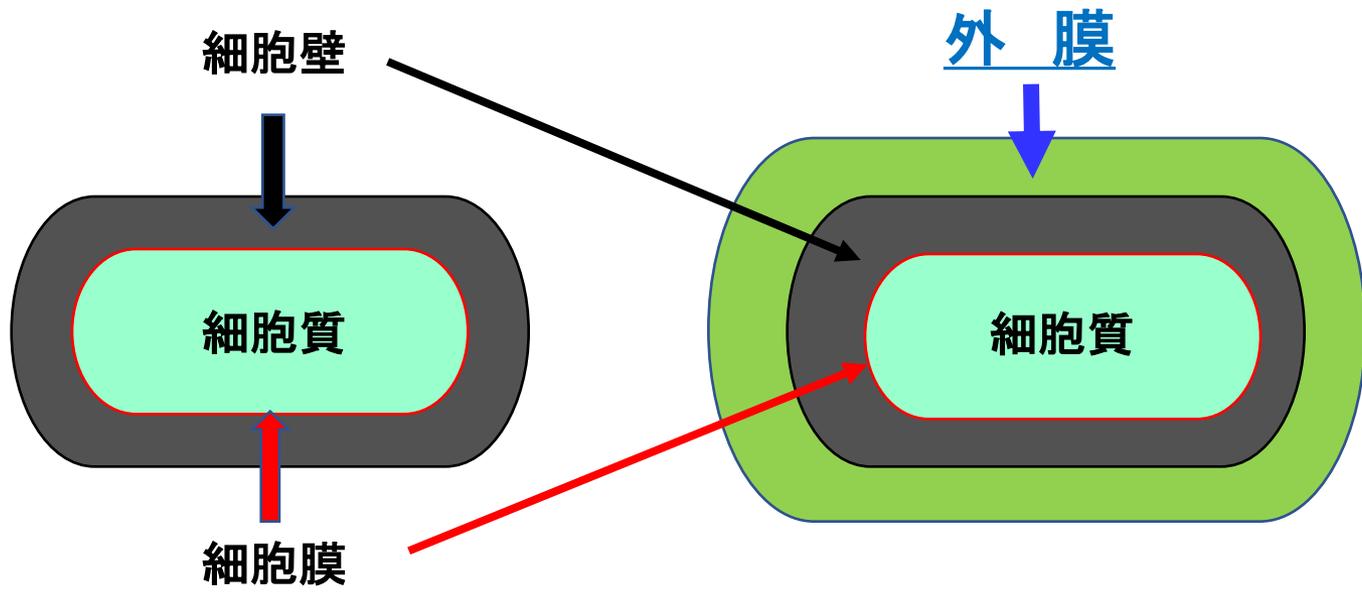


ラセン菌（ビブリオ）



ラセン菌（スピリウム）

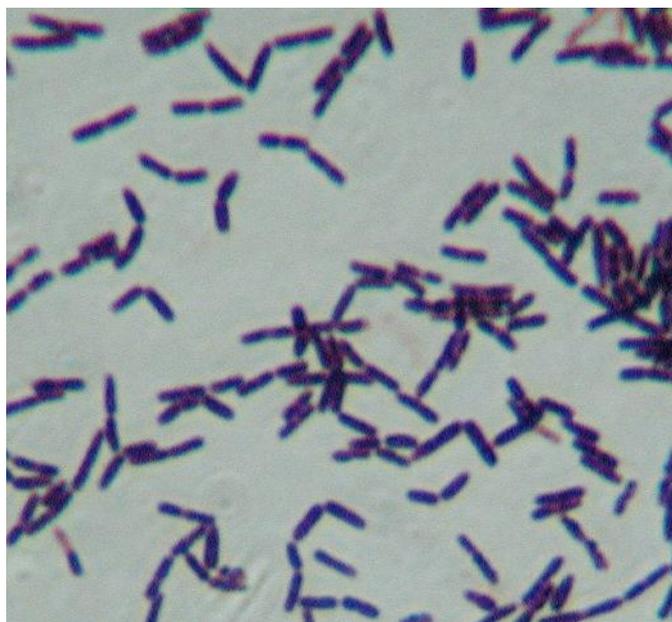
# 細胞の構造



グラム陽性菌

グラム陰性菌  
(外膜が発熱性物質)

# グラム染色の例

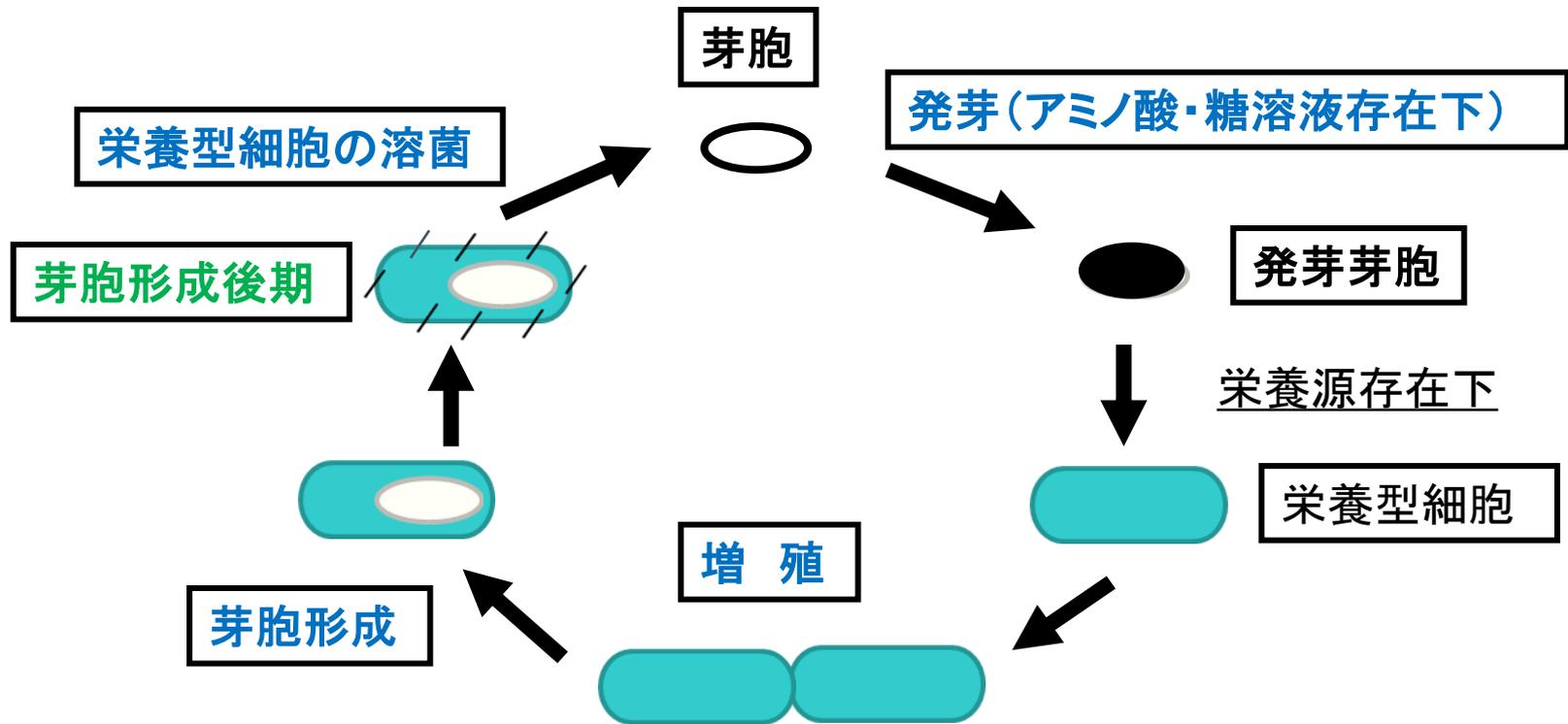


グラム陽性菌(桿菌)



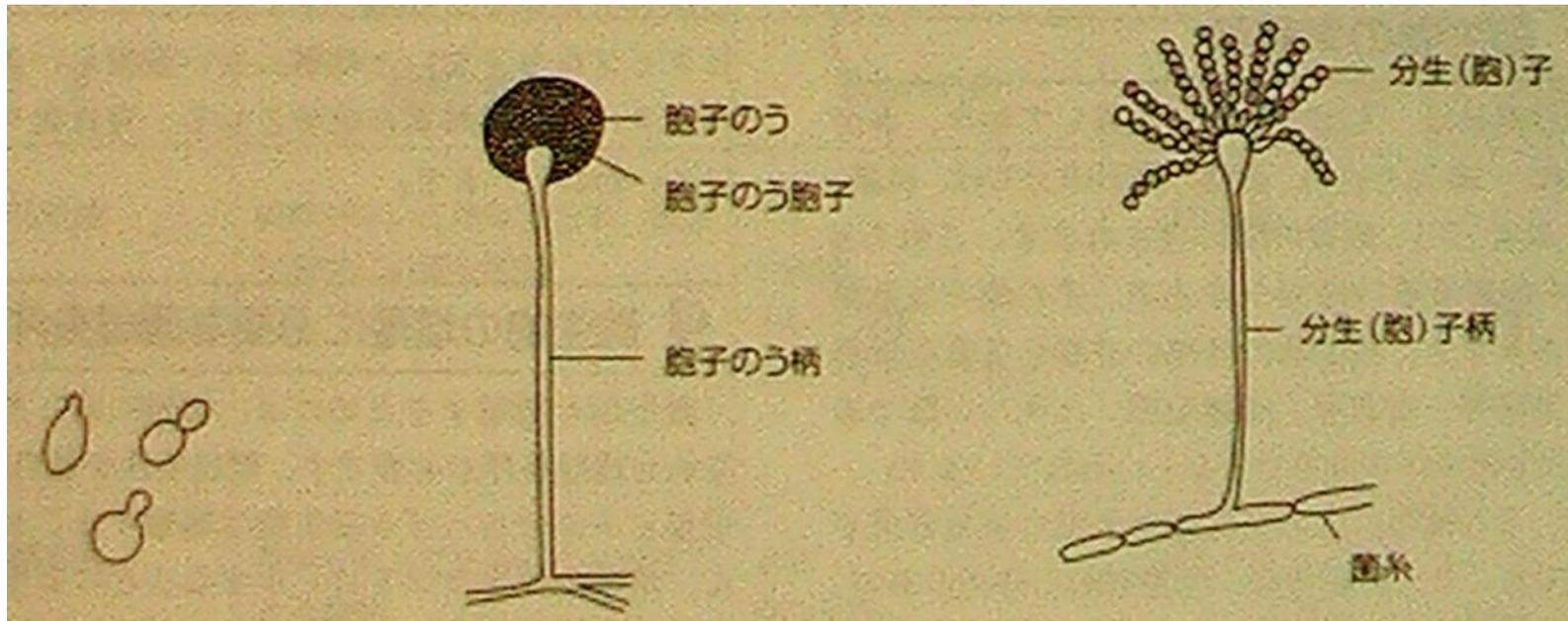
グラム陰性菌(桿菌)

# 芽胞形成菌の生活環



芽胞は熱、化学薬品(ガスも含む)、紫外線、放射線に対して抵抗性を示す

# 真菌の形態



酵母

ケカビ(ムコール)

コウジカビ(アスペルギルス)

# 微生物の増殖に必要な環境条件

- 1) 温度
- 2) 酸素
- 3) pH
- 4) 浸透圧・食塩濃度
- 5) 湿度・水分
- 6) 酸化還元電位 (Eh)



1から6の環境条件が変化



菌の増殖に影響する



菌が増殖できないことがある

# 微生物の栄養素

- 1) 水 ⇒ 細胞質の維持
- 2) 炭素源 ⇒ エルネギー源と細胞成分の素材  
に利用
- 3) チツ素源 ⇒ たんぱく質、核酸、補酵素の合成  
に必要
- 4) 無機塩類 ⇒ 細胞の浸透圧やpHの調整、酵素  
の構成成分、酵素活性化因子  
として必要
- 5) ビタミン類 ⇒ 補酵素の成分として利用

# 微生物の増殖温度

分類	増殖可能温度	至適温度	微生物の例
低温菌	0~30°C	20~25°C	シュートモナス菌、ヒブリオ
中温菌	5~55°C	25~40°C	多くの腐敗菌と病原菌
高温菌	30~90°C	55~70°C	ジオバチラス属の菌

# 微生物の培養での酸素要求性 による分類

菌の分類	酸素の有無での増殖		培養環境	微生物の例
	有	無		
偏性好気性菌	増殖	×	好気培養	シュドモナス菌, 枯草菌, <b>カビ</b>
通性嫌気性菌	増殖	増殖	好気培養	<b>酵母菌</b> , 腸内細菌, 大部分の食中毒菌
偏性嫌気性菌	×	増殖	<b>嫌気培養</b>	ボツリヌス菌, ウエルシュ菌, ビフィズス菌

×: 増殖できない

# バイオバーデンで検出される菌

# バイオバーデンとは

- バイオとは生きたという意味で、バーデンとは異物という意味で、微生物を意味している
- 滅菌前の製品に付着している生きた微生物群を言う

# 特 徴

- 栄養源のない環境で生存できる微生物である
- 乾燥状態でも生存できる微生物である
- グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌で芽胞形成菌（芽胞の状態）、真菌（カビ）等である
- 水分を含む製品や洗浄処理が行われる製品の場合、グラム陰性菌も検出される  
例として、メチロバクテリウム属、アシネトバクター属の菌  
（放射線抵抗性も強く、乾燥状態にも強い）

# 代表的なバイオバーデン検出菌

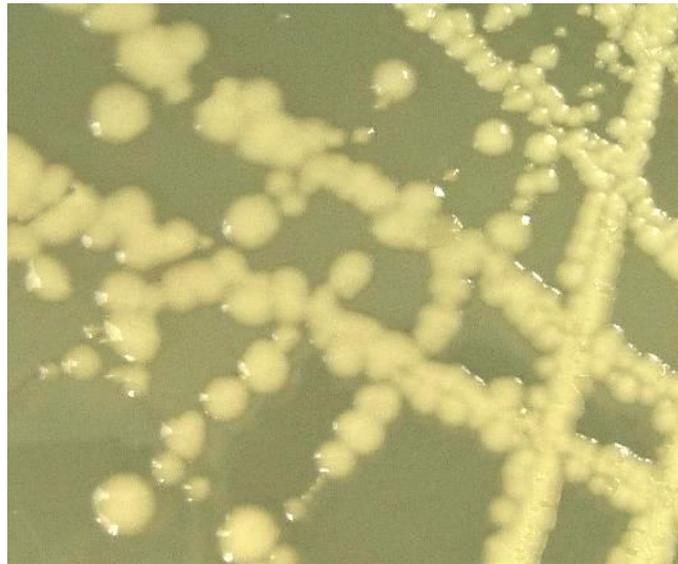
(グラム陽性菌)

# *Bacillus*属（芽胞形成菌）

菌名：*Bacillus megaterium*

栄養型細胞

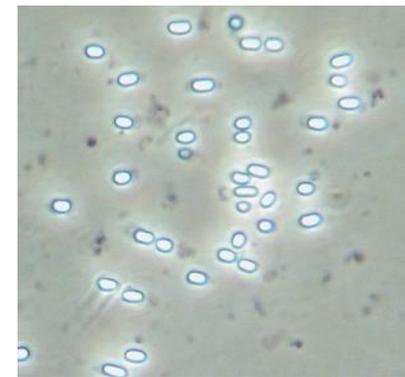
芽胞形成期細胞



SCDAでのコロニー



芽胞

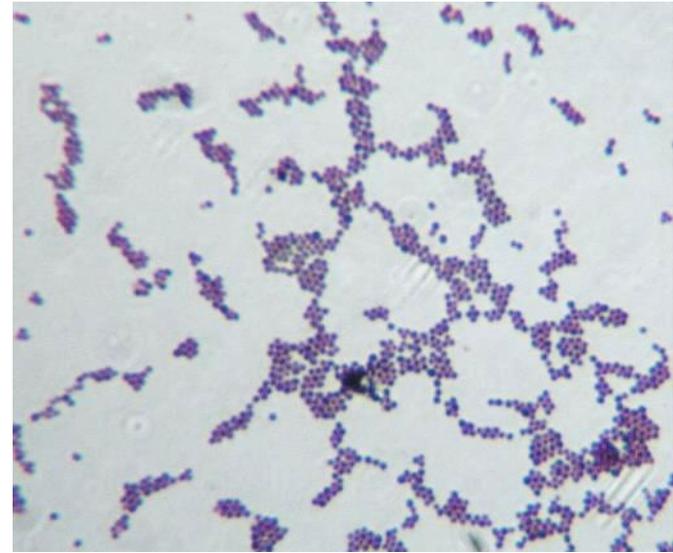


# スタヒロコツカス属(ブドウ球菌)

菌名 : *Staphylococcus aureus*  
(黄色ブドウ球菌)



SCDAでのコロニー



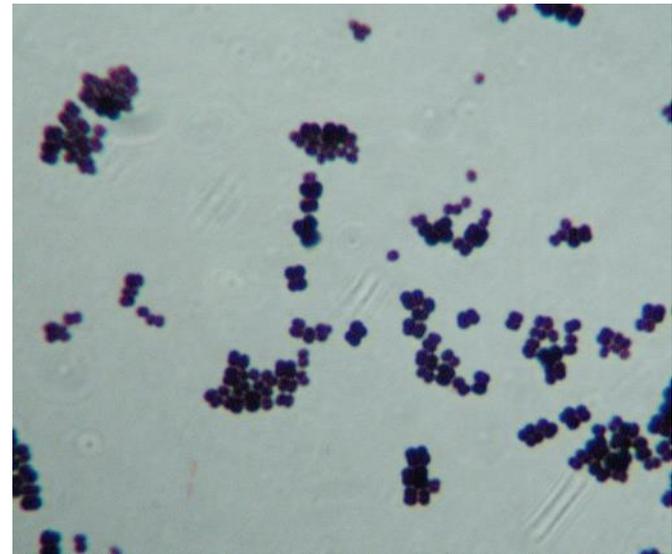
グラム染色(陽性球菌)

# マイクロコッカス属

菌名：*Micrococcus luteus* (球菌)



SCDAでのコロニー



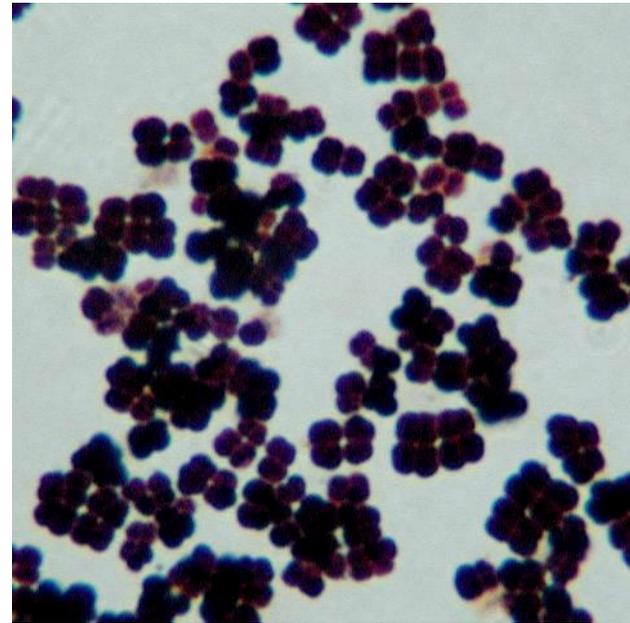
グラム染色(陽性球菌)

# ダイノコッカス属

菌名: *Deinococcus radiodurans* (球菌)



SCDAでのコロニー



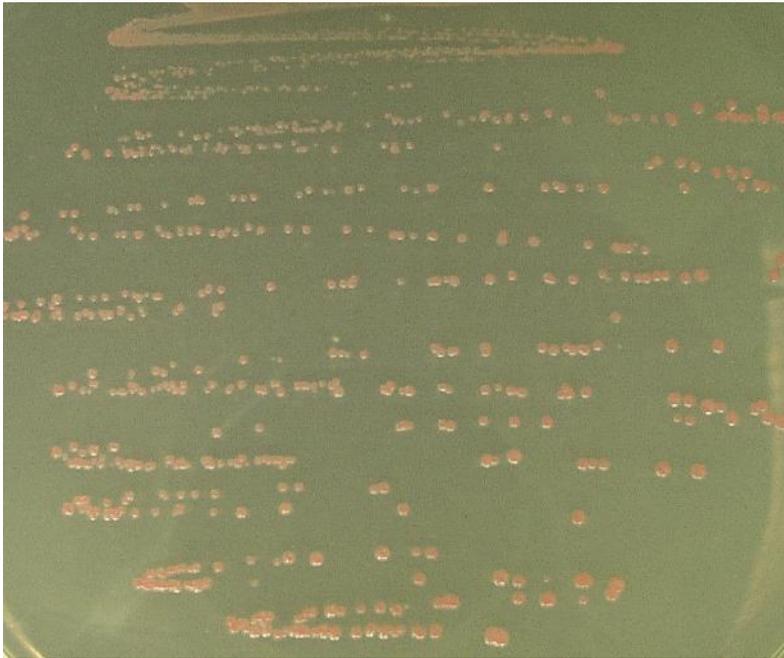
グラム染色(陽性球菌)

# グラム陰性菌の例

- 水系の環境に由来する菌
- 一般にグラム陰性菌は乾燥状態にすると死滅するが、乾燥状態でも生存する菌も存在する
- 一般にグラム陰性菌は放射線に対して感受性であるが、抵抗性の強い菌種も存在する

# メチロバクテリウム属

菌名 : *Methylobacterium radiotolerans*



SCDAでのコロニー



位相差顕微鏡の写真

# Roseomonas 属

菌名 : *Roseomonas mucosa*



SCDAでのコロニー



位相差顕微鏡の写真

# 菌の放射線抵抗性値

菌名	抵抗性値(D <sub>10</sub> )	菌の状態	照射時の状態
	(kGy)		
<i>Bacillus megaterium</i>	4.2	芽胞	乾燥系(SCDB)
<i>Bacillus cereus</i>	3.9		
<i>Bacillus pumilus</i>	3.5		
<i>Bacillus subtilis</i>	3		
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	1.19	栄養型細胞	乾燥系(SCDB)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.56		
<i>Micrococcus luteus</i>	1.98		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.15	栄養型細胞	乾燥系(SCDB)
<i>Acinetobacter radiotolerans</i>	2.56		
<i>Roseomonas mucosa</i>	2.57		
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	2.79		
<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	10	栄養型細胞	水溶液(緩衝液)
<i>Deinococcus radiodurans</i>	1.9~2.2		

放射線抵抗性菌は芽胞形成菌以外にも存在する

**〔微生物は肉眼では見えない〕**

**私たちの身の回りには微生物が  
常に存在する**

空気中、水の中、壁、床、動物と人  
(皮膚の表面、口腔から大腸まで)

# 微生物試験の基礎〔1〕

## バイオバーデン測定

滅菌前の製品に付着している菌数を測定する方法

- ① 芽胞接種法による回収率測定
- ② 寒天重層法(培地浸漬法)

# 洗い出しによるバイオバーデン測定法の概要 (芽胞接種法による回収率測定を利用した測定)

## ① 測定試料の選定



## ② 回収液の選定



## ③ 回収方法の選定



## ④ 回収条件を検討して決定



## ⑤ メンブランフィルターによる菌数測定



## ⑥ 培養条件の決定



## ⑦ 培 養



## ⑧ 菌数の計測

上記の手順によりバイオバーデン測定法を構築する



(妥当性のある測定法であることが実証される)

# 回収液の種類と選定

一般には界面活性剤を添加した回収液が使用される

- ① ペプトン（1%）、Tween80(0.1～1%) を含む生理食塩水 (PTS)
- ② Tween80(0.1～1%) を含むペプトン水
- ③ Tween80(0.1～1%) を含む生理食塩水
- ④ Tween80(0.1～1%) を含むリン酸緩衝液
- ⑤ Tween80(0.1～1%) 溶液
- ⑥ ペプトン水（1%）
- ⑦ リン酸緩衝液
- ⑧ 培地（例えば、トリプチケース ソイ ブロス〔TSB：別名SCDB〕）

# 菌の回収方法

以下の方法で菌を試料から回収液中に移行させる

① 超音波処理法

28～50kHzの装置で処理と停止のサイクルで実施

② 振とう法

300～360回往復/分の速度で10～30分間処理

③ ボルテックスミキサー法

ボルテックスミキサーで攪拌(2～5分間)

④ ホモジナイザー法

氷冷下で15,000回転/分の速度で1～3分間処理

⑤ ポンプ循環法

ポンプで回収液を循環しての回収処理

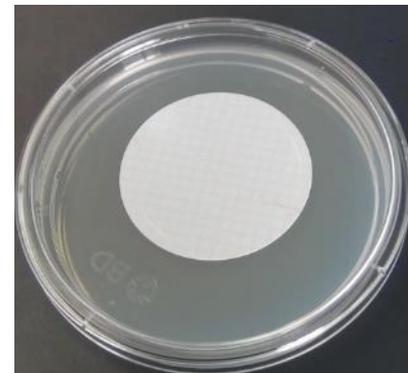
# 回収液中の菌数測定

メンブランフィルタ(MF)で濾過

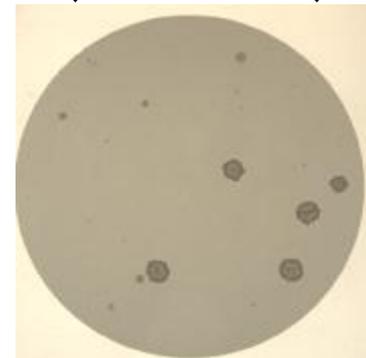


メンブランフィルタの孔径は $0.45\mu\text{m}$

培地表面へのMFの貼付



↓ 培養 ↓



培養後のコロニーを計測

# ① 回収率測定法の概略

## A. 塗布芽胞液について

1-1 塗布芽胞液の芽胞数を測定

1-2 滅菌した製品に芽胞を塗布  
(100cfu以下)し、乾燥

\*\*\*\*\*

## B. 芽胞塗布試料について

1. 選定した回収液に試料を移行
2. 選定した回収方法で経時的  
に処理
3. 処理した回収液の菌数測定  
(メンブランフィルター法)

4. 培養

5. コロニー数を計測

6. 回収率を算出(高い回収率)

回収率(%)

$$= (\text{回収菌数} / \text{塗布菌数}) \times 100$$

\*\*\*\*\*

-----  
バイオバーデン値  
-----

測定して得られた数値に回収率  
の逆数で補正する

# 回収率測定結果の例

## ① 塗布芽胞数 (*B.subtilis*) メンブランフィルタ法での測定結果

試料番号	1	2	3	4	5	平均値
塗布菌数	49	41	36	46	43	43 cfu

## ② 回収条件

回収液：1%ハイパトシ・0.1%Tween 80を含む生理食塩水

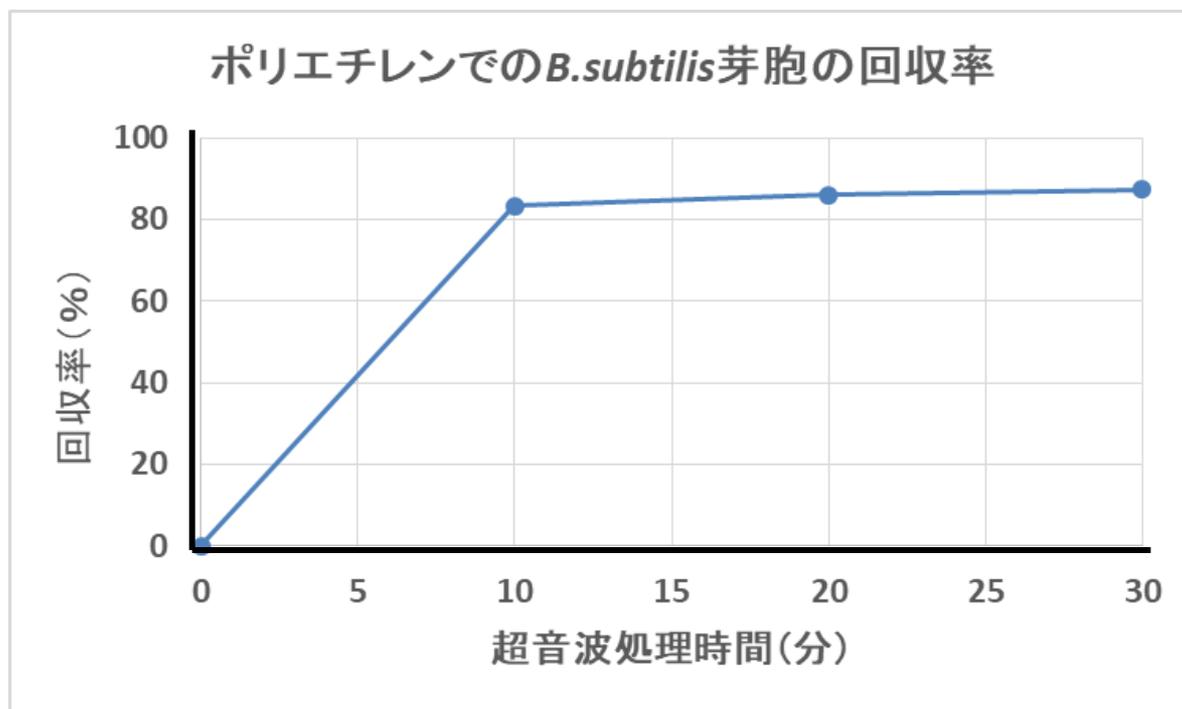
回収方法:超音波処理、処理時間：10分間隔で30分まで

## ③ 回収芽胞数 メンブランフィルタ法での回収菌数測定結果

試料番号	1	2	3	4	5	平均値(cfu)	回収率(%)
10分処理菌数	40	40	35	34	30	35.3	83.3
20分処理菌数	25	34	43	45	38	37	86
30分処理菌数	42	32	40	39	35	37.4	87.4

## ④ 回収率：86% (超音波処理時間20分を採用)

# 回収法によるバイオバーデン測定結果の例



測定試料の測定値を回収率の逆数で補正する



バイオバーデン値

## ②寒天重層法 (培地浸漬法の原理)

- 塩化2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム(TTC)の濃度0.002%添加した培地を使用する
- 菌が増殖するとTTCを還元してトリフェニルホルマザンが形成され、深赤色を呈すので、赤色コロニーを計測する

SCDA



TTC添加SCDA培地



# 寒天重層法を適用する試料

## バイオバーデン測定方法の適合性試験

- 製品を構成する材料について、**菌への生育阻害特性が無いことを実証**する必要がある
- 芽胞ではなく、例えば、黄色ブドウ球菌、緑膿菌の栄養型細胞(菌数100cfu以下)が利用される

チャレンジ微生物の回収率が 70 % 未満の場合



ある程度の阻害が示されている可能性がある

〔不適合〕

# 培地浸漬法での操作手順

## ① 容器への培地の充填



## ② 試料の培地への設置



## ③ 培地への充填



## ④ 培養・コロニーの計測



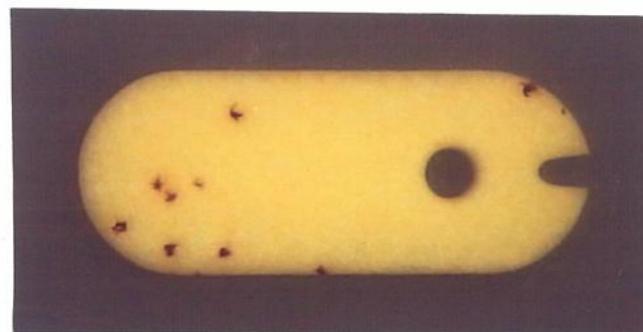
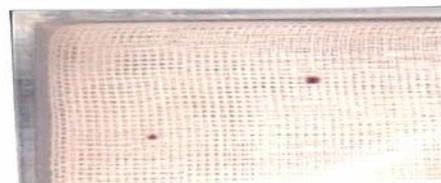
# 培地浸漬法でのバイオバーデン測定結果の例 (バイオバーデンが少ない試料に適用)



ガーゼ



拡大



固定用スポンジ

# 微生物試験の基礎 [2]

## 無菌性の試験

低減されたレベルで滅菌剤に曝露した製品又はその一部に生育可能な微生物の存在の有無を判定するための試験

- ・ 滅菌線量設定、滅菌線量監査試験に利用される

# 無菌性の試験の判定の例

試料を培地の中に入れて培養し、菌の増殖の有無で判定



陰 性

陽 性

微生物が存在すると



培地が濁る(増殖)



陽 性

# 検定線量照射後の無菌性の試験の例 (バイオバーデンの放射線抵抗性の評価に利用)



10試料中の陽性数が1個以下の場合合格

滅菌線量設定のモデルとなる生残曲線よりも製品のバイオバーデンの放射線抵抗性が、より感受性であることを意味している