

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

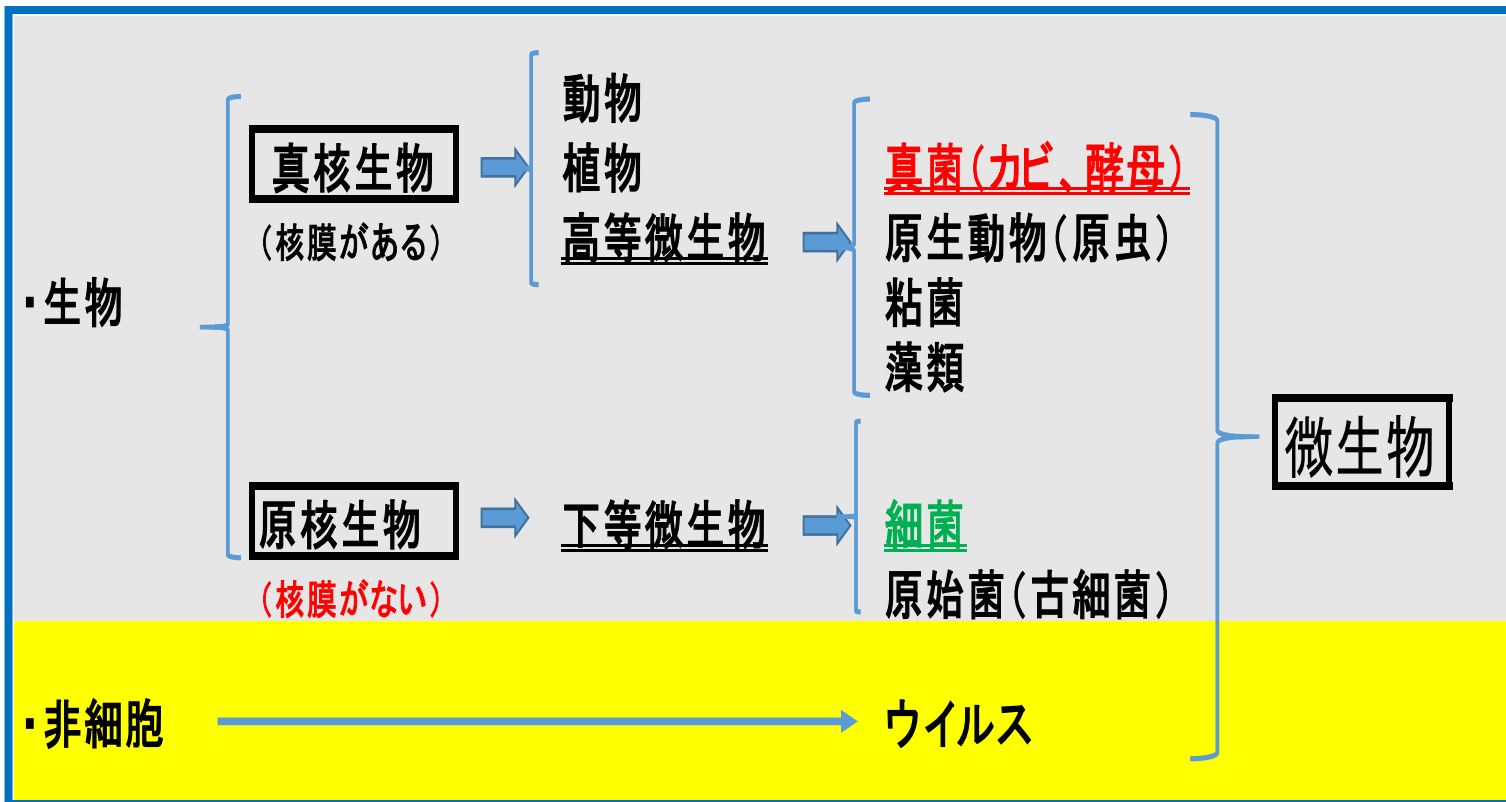


本日の内容

- 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

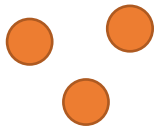
生物の分類での微生物の位置付け



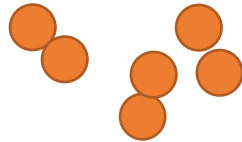
微生物の大きさの比較

分解能	大きさ	具 体 例
人の肉眼  70 μm	1mm (1000 μm) 100 μm	← カエルの卵 2～3mm ← ゴーリムシ (200～300 μm) ← ヒトの卵 (140 μm)
光学顕微鏡  100nm	10 μm 1 μm (1000nm) 100nm	← 酵母 (10 μm) ← 大腸菌 (1.5 × 3 μm) ← ブドウ球菌 (1 μm) ← 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)

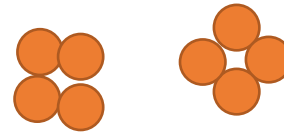
細菌の形態（球菌）



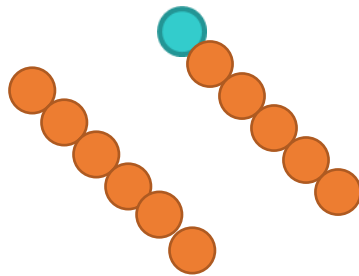
単球菌



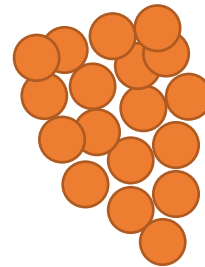
双球菌



四連球菌

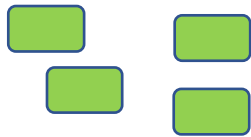


連鎖球菌

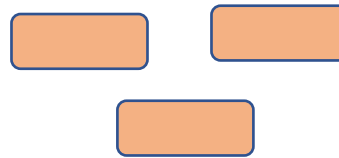


ブドウ球菌

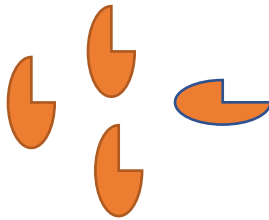
細菌の形態（桿菌）



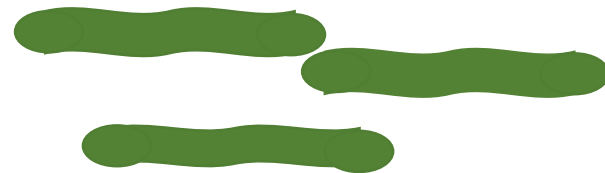
短桿菌



桿菌

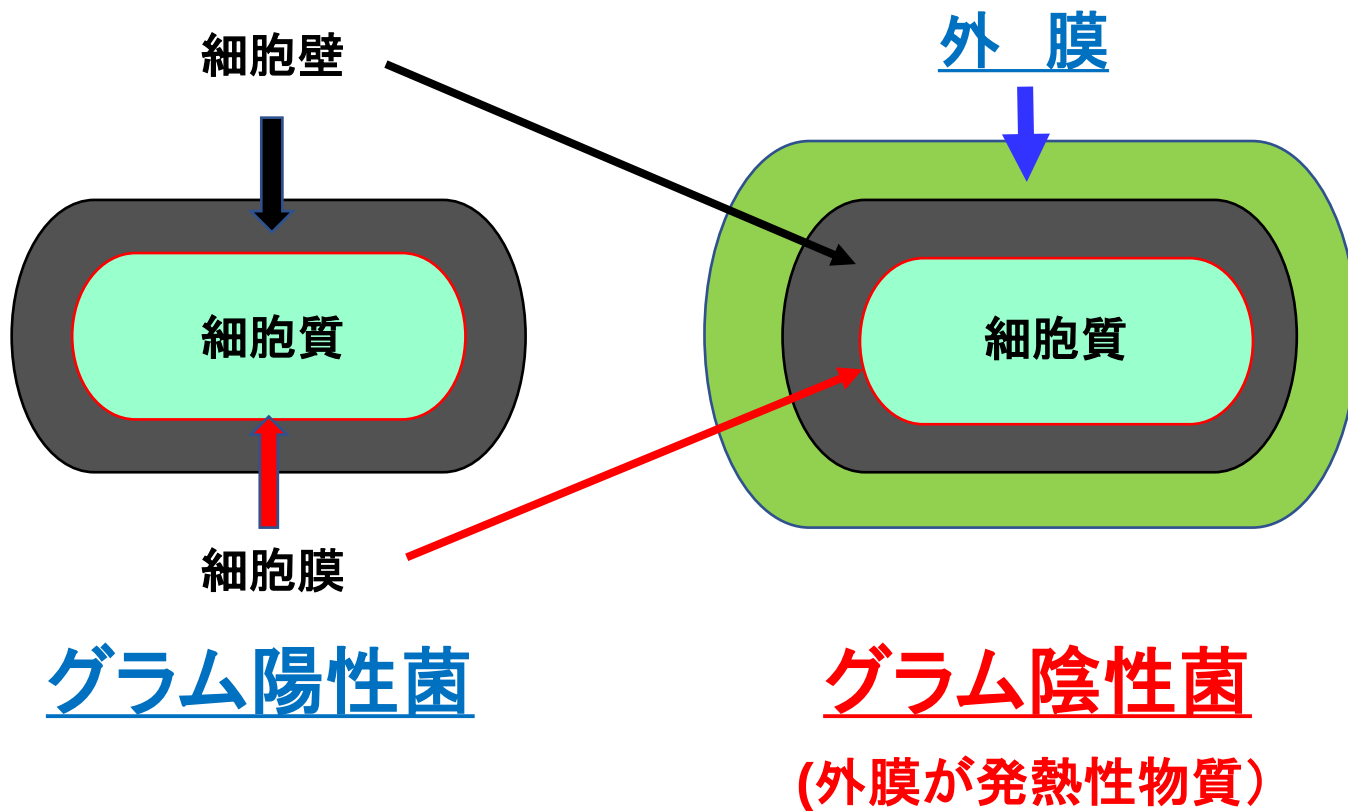


ラセン菌（ビブリオ）



ラセン菌（スピリウム）

細胞の構造



グラム染色の例

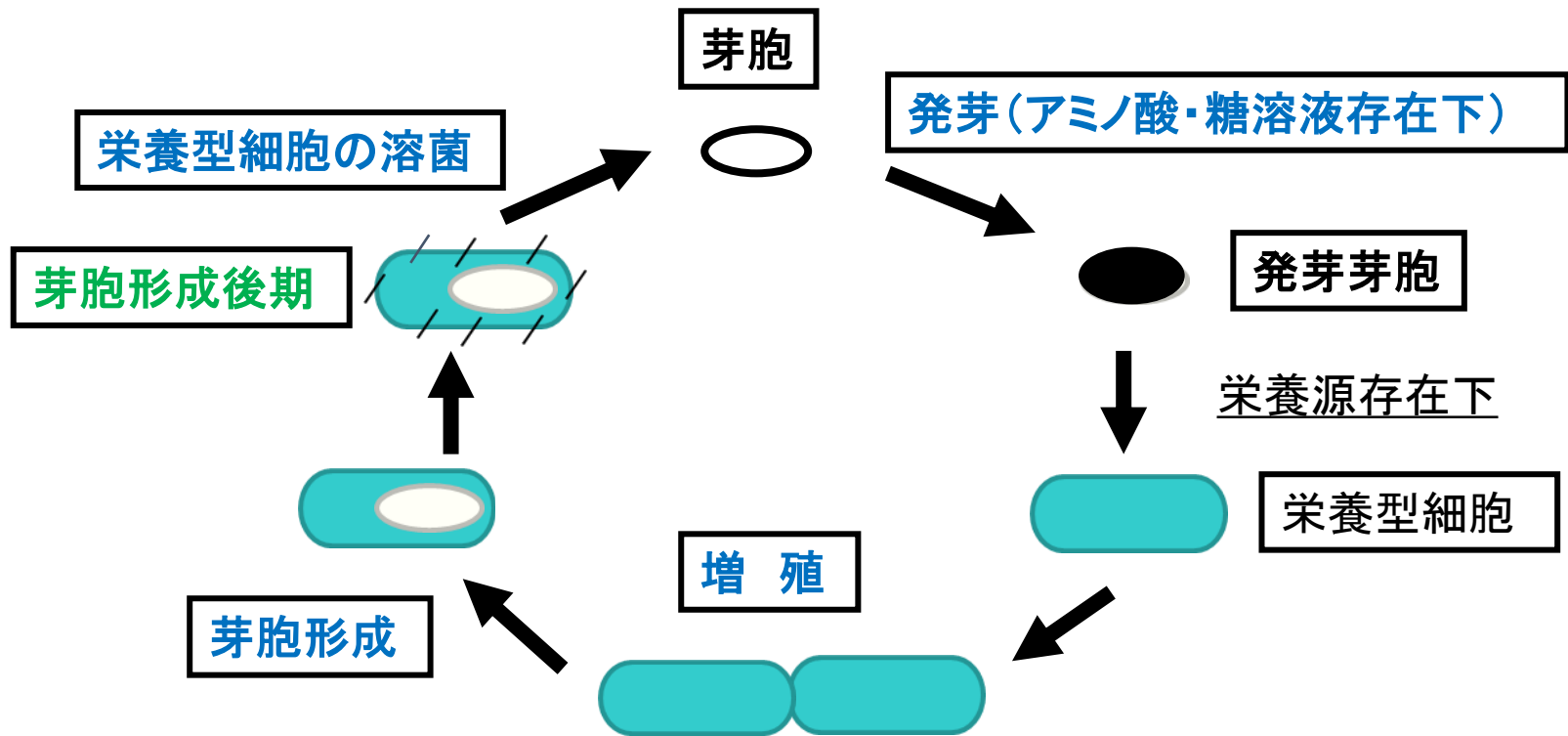


グラム陽性菌(桿菌)



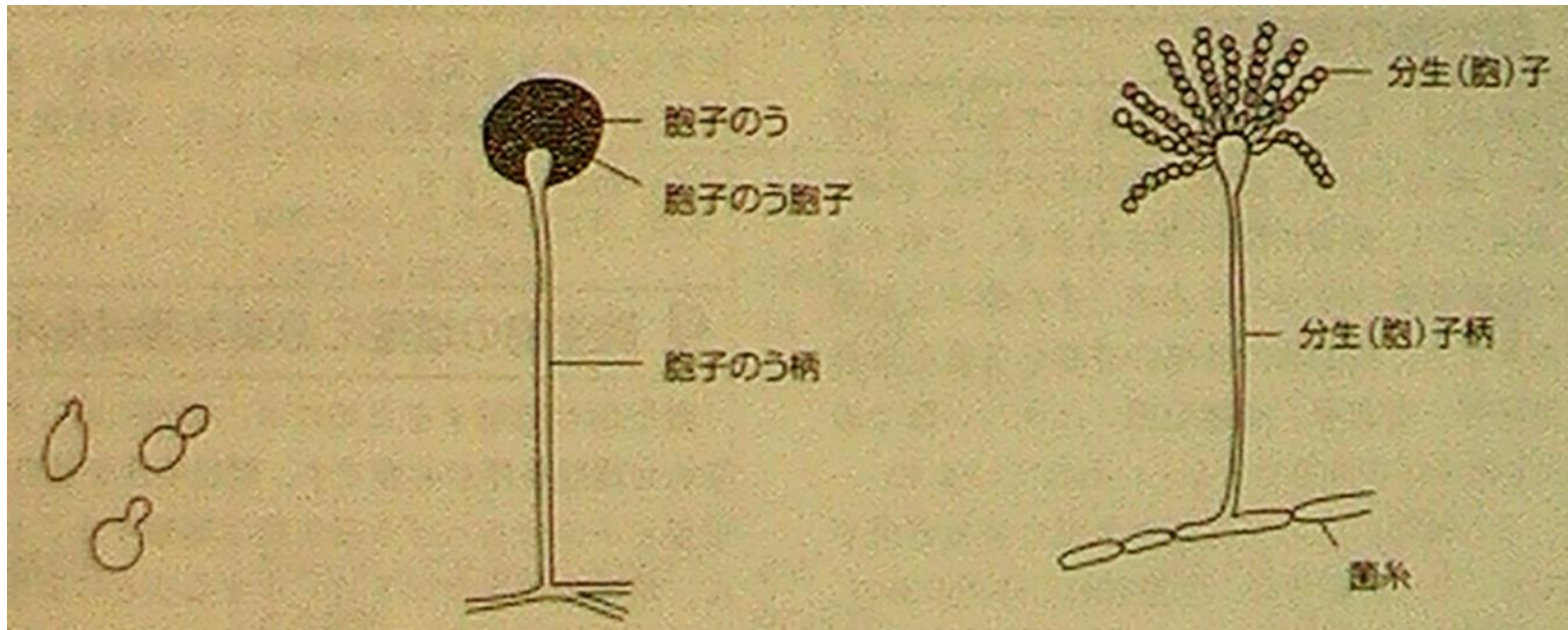
グラム陰性菌(桿菌)

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) チッ素源 ⇒ 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℃	20～25℃	シュートモナス菌、ヒブリオ
中温菌	5～55℃	25～40℃	多くの腐敗菌と病原菌
高温菌	30～90℃	55～70℃	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	シュートモナス菌, 枯草菌、カビ
通性嫌気性菌	増殖	増殖	好気培養	酵母菌, 腸内細菌, 大部分の食中毒菌
偏性嫌気性菌	×	増殖	嫌気培養	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

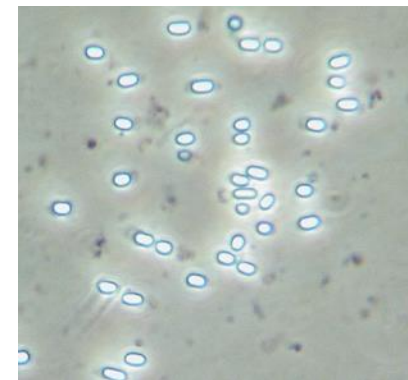
芽胞形成期細胞



SCDAでのコロニー

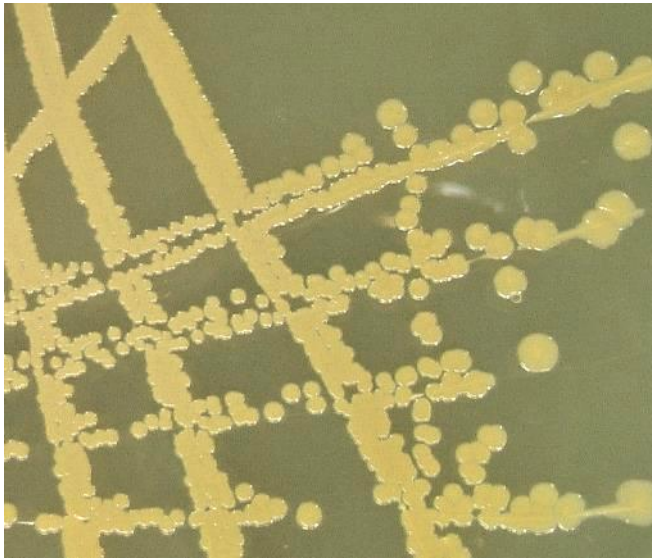


芽胞

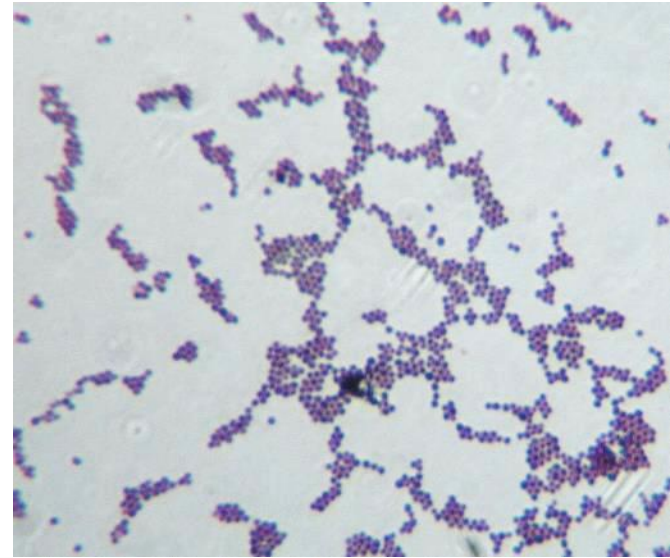


スタヒロコツカス属(ブドウ球菌)

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



SCDAでのコロニー



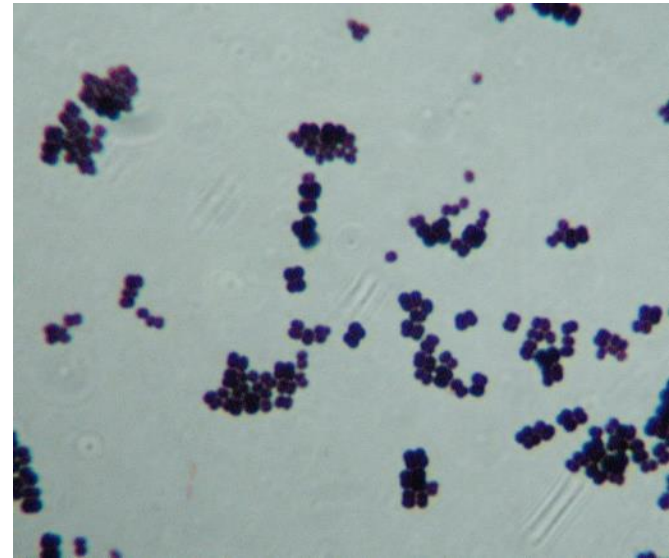
グラム染色(陽性球菌)

マイクロコッカス属

菌名 : *Micrococcus luteus* (球菌)



SCDAでのコロニー



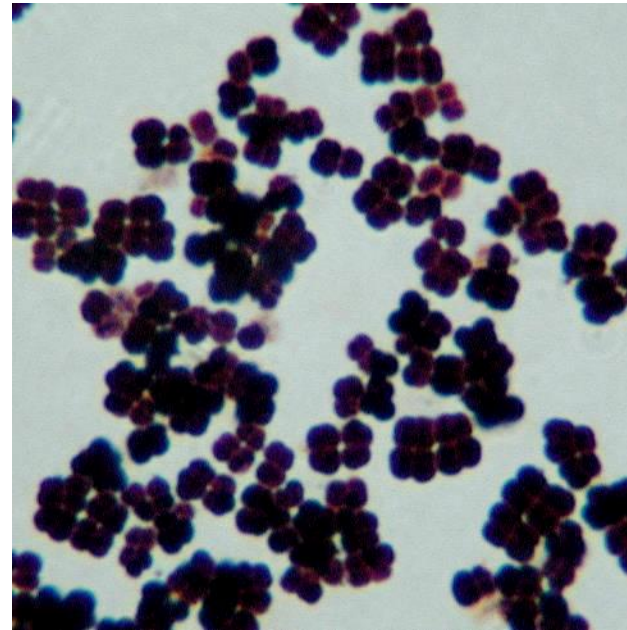
グラム染色(陽性球菌)

ダイノコツカス属

菌名: *Deinococcus radiodurans* (球菌)



SCDAでのコロニー



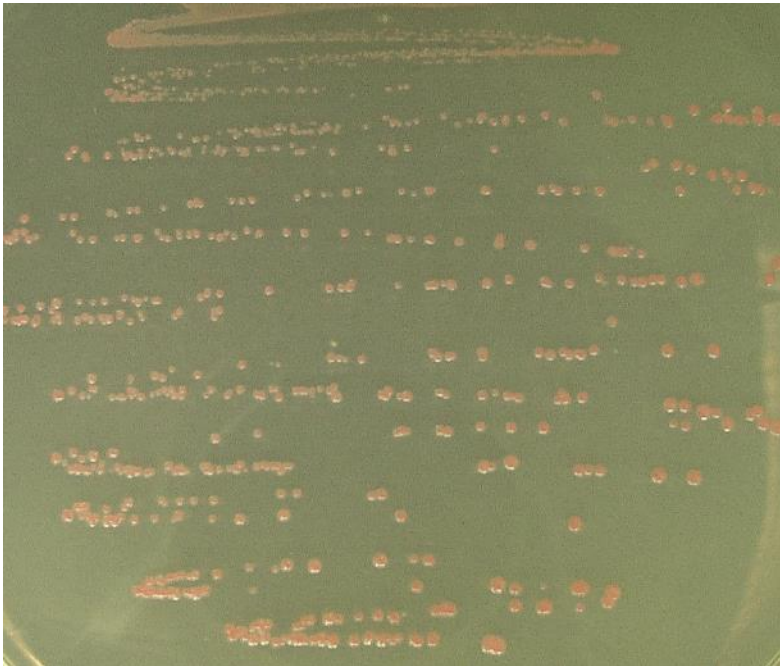
グラム染色(陽性球菌)

グラム陰性菌の例

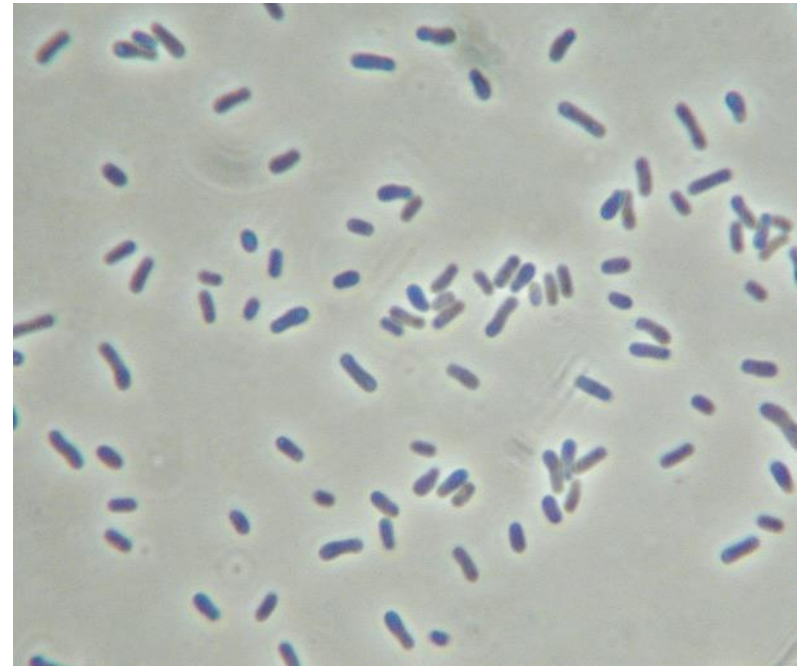
- 水系の環境に由来する菌
- 一般にグラム陰性菌は乾燥状態にすると死滅するが、乾燥状態でも生存する菌も存在する
- 一般にグラム陰性菌は放射線に対して感受性であるが、抵抗性の強い菌種も存在する

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 ₁₀)	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)

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

2. 回収液(洗い出し液)を選定

3. 回収方法を選定と処理時間

4. 回収液の菌数を測定
(メンブランフィルター法)

5. 培養

6. コロニー数を計測

7. 回収率を算出(高い回収率)

1～7の手順により、バイオバ
ーデン測定法が確立される

*滅菌前製品について、2～6の
手順で得られた数値を回収率
で補正すると

↓ ↓

バイオバーデン数となる

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
- 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

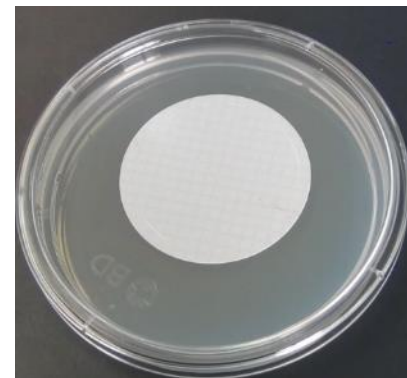
回収液中の菌数測定

メンブランフィルタ(MF)で濾過

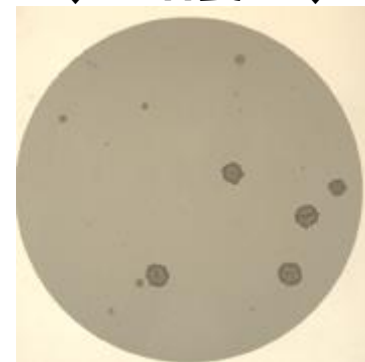


メンブランフィルタの孔径は $0.45\mu\text{m}$

培地表面へのMFの貼付



↓ 培養 ↓



培養後のコロニーを計測

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

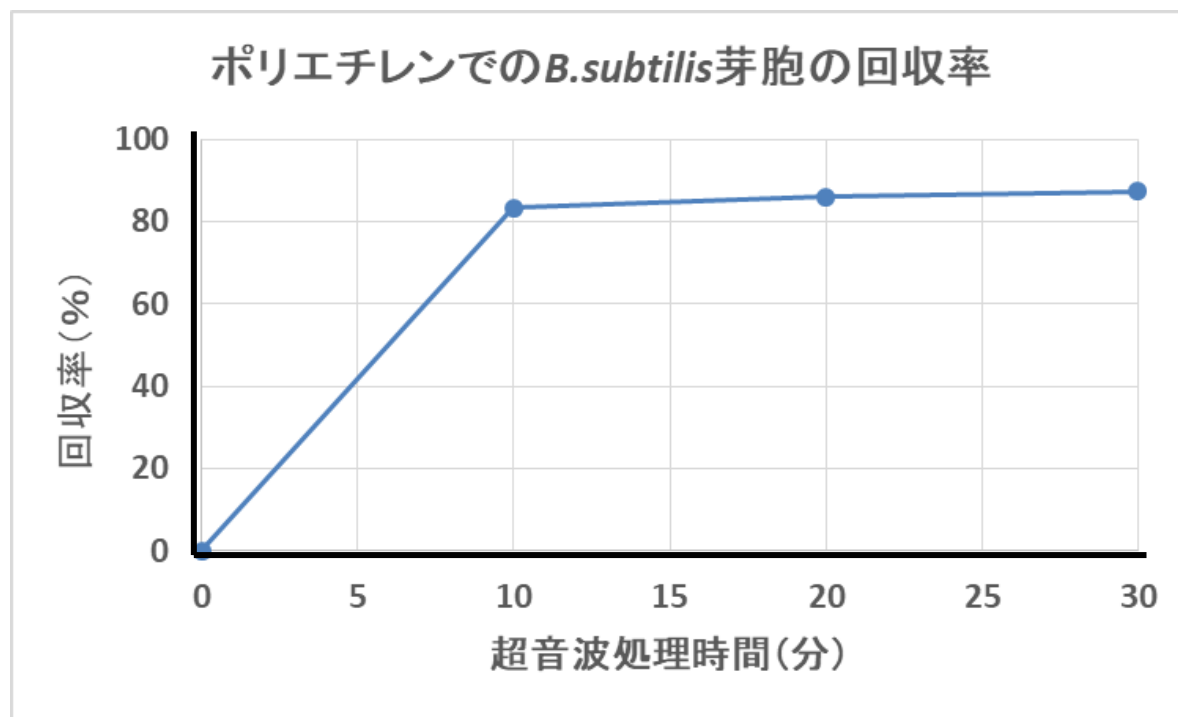
回収方法:超音波処理、処理時間：10分間隔で30分まで

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



測定試料での測定値を回収率の逆数で補正する



バイオバーデン値

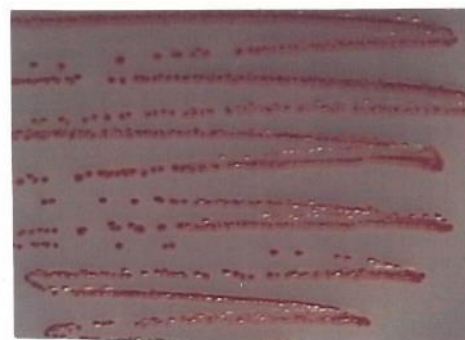
②寒天重層法 (培地浸漬法の原理)

- ・ 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、深赤色を呈するので、赤色コロニーを計測する

SCDA



TTC添加SCDA培地

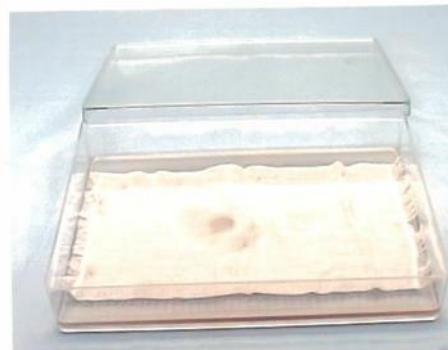


培地浸漬法での操作手順

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



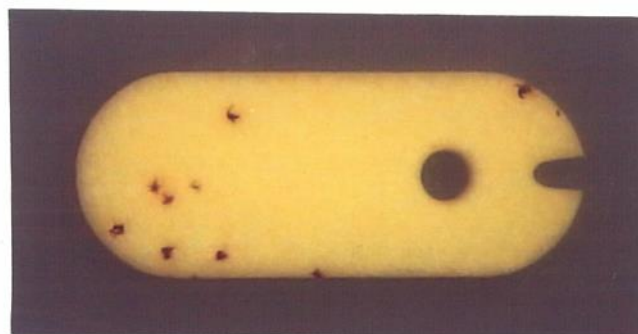
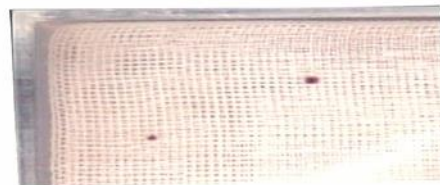
培地浸漬法でのバイオバーデン測定結果の例 (バイオバーデンが少ない試料に適用)



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

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

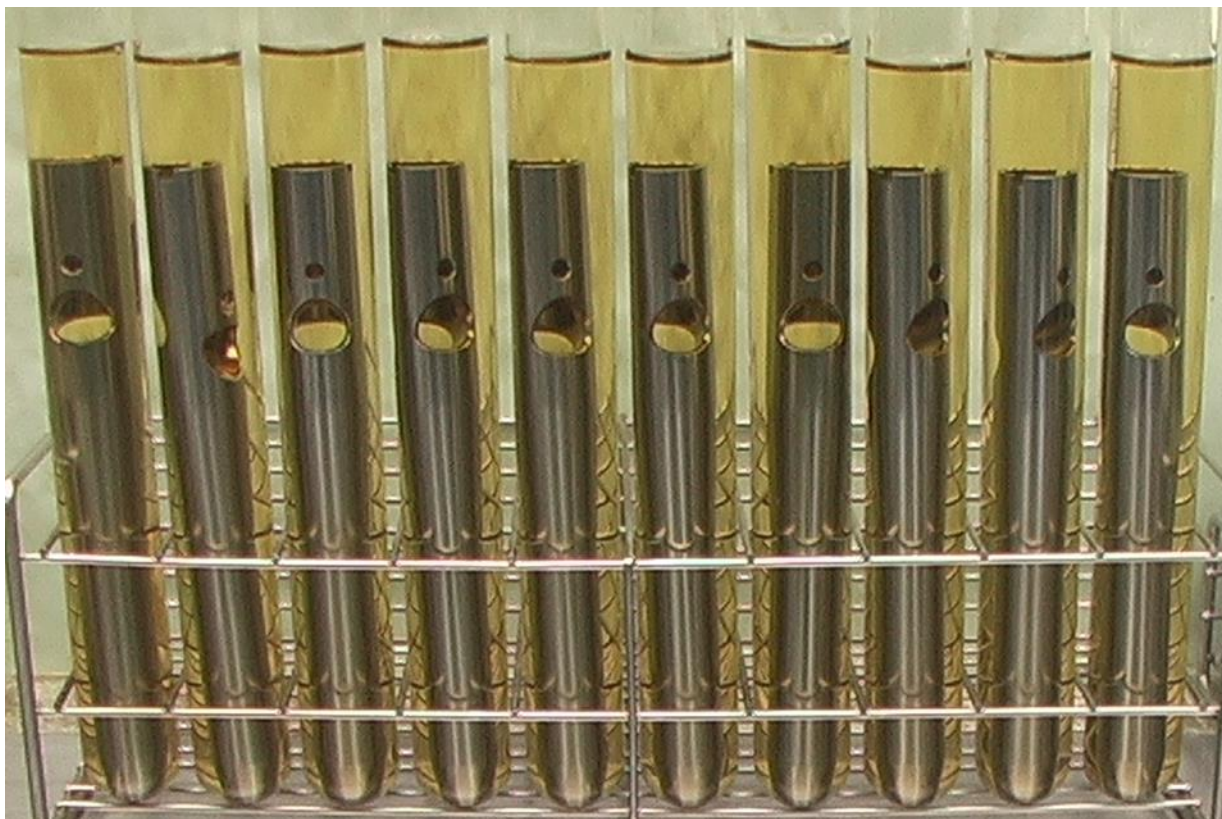


培地が濁る(増殖)



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)



10試料中の陽性数が1個以下の場合は合格