

1 微生物試験法に用いる培地及び微生物株の管理

本参考情報は、微生物試験法に用いる培地及び微生物株の試験室での管理における留意事項を示すものである。

なお、機器については、適切に保守・管理及び校正されたものを使用する。

1. 培地の調製及び品質管理

1.1. 培地の調製

培地を調製するときには、実施する微生物試験法に適した培地及び培地成分を選択する。粉末培地には成分組成及び調製指示書が添付されている。培地ごとに、調製の要件(例えば、加熱、添加物、pH調整など)が異なる場合があるため、適正な品質の培地を調製するためには、それらの指示書に従うことが重要である。調製年月日、秤取した粉末培地又は培地成分の名称・ロット番号・質量、使用した水の容量、滅菌条件、滅菌後のpH、使用した機器などを記録しておくこと、問題発生時の原因調査などに役立つ。

粉末培地又は培地成分の秤取は適切に行う。また、調製時の異物の混入を防ぐために、清浄な容器及び器具を使用する。培地の調製に用いる水は、試験を行うのに適した水を使用するが、精製水が最もよく用いられる。

粉末培地は、滅菌する前に水に溶解させるか、又はよく振り混ぜて十分に分散させる。滅菌前に小分けする場合には、完全に水に溶解させる。培地を溶解するために加熱が必要な場合には、培地を熱し過ぎないように注意する。メイラード反応などによる培地の褐色化は、過熱の目安の一つとなる。培地の調製には、加熱、攪拌及び混合に適切な装置及び器具を使用する。加熱できない成分を添加する場合には、滅菌後に適切な温度まで冷却した培地に無菌的に添加し、十分に混合する。

洗浄が十分でない器具などを使用して培地を調製すると、微生物の発育を阻害する物質が培地に混入するおそれがある。阻害物質は、器具などの洗浄後の残留洗剤、その器具などを洗う前に使用した物質あるいは未使用の器具であっても製造時の残留物などに由来する。洗浄工程では、確実に残留物及び異物を除去し、最後に精製水などを用いて洗剤などを完全に洗い落とす。

培地の滅菌は、製造業者から提供されたパラメーター(温度、圧力、保持時間など)又はユーザーによって検証されたパラメーターの範囲内で実施する。熱に対して不安定な培地成分が含まれる場合を除き、高圧蒸気滅菌が望ましい。培地組成によっては、ろ過による滅菌が適切な場合もある。

高圧蒸気滅菌器を使用する場合には、積載物の載荷形態(ローディングパターン: 容器の形状、大きさ、数及び配置並びに被滅菌物の種類及び液量など)に応じて、全ての被滅菌物の品温(培地温度)が指定された温度及び保持時間を満たす滅菌サイクル(被滅菌物の品温が指定温度に上昇するまでの工程及び滅菌終了から被滅菌物を適切に取り出せる温度に下降するまでの工程を含む)で行う。温度の上昇が緩やかとなる滅菌サイクルは培地の過熱を招く場合もある。一般的に被滅菌物の液量が多くなると滅菌サイクルはより長くなるが、総量が同じであっても小分け容器の大きさ及び数にも影響されるので、適切な条件を選択する。滅菌サイクルの完了後は速やかに培地を取り出し、

必要に応じて培地を冷却する。滅菌サイクルの影響を、培地の無菌性(微生物汚染がないこと)の確認と共に培地性能試験(微生物限度試験法(4.05)、無菌試験法(4.06)など参照)によって検証する。

不適切な調製を行うことにより、発育促進特性や選択特性が低下したり、色調、透明度、ゲル強度、pHなどの性状が許容範囲から逸脱する場合があるので留意する。

培地のpHは、滅菌バッチ(一度に滅菌する単位。以下「バッチ」という。)ごとに試験サンプルを無菌的に抜き取り、常温又は別に規定された温度まで冷却した後に確認する。規定された温度で測定できない場合には、規定された温度に補正したpHとする。カンテン培地表面に対しては先端が平らなpH電極が、液体に対しては浸漬型のpH電極が推奨される。培地のpHは、指定された範囲内とする。ただし、培地性能試験や適合性試験(微生物限度試験法(4.05)、無菌試験法(4.06)など参照)により、更に広い範囲が許容されることが確認された場合を除く。

調製した培地(カンテン平板培地や試験管などに分注した培地)は、名称、バッチ番号、調製日などで識別する。また、下記の事項に留意する。

- (i) 容器の破損
- (ii) 容器間の分注量の不均一
- (iii) 培地成分などの付着による容器の汚れ
- (iv) 褐色化又は変色
- (v) 気泡
- (vi) 酸化還元電位指示薬の状態(該当する場合)
- (vii) 溶血(該当する場合)
- (viii) 結晶などの形成
- (ix) 亀裂や窪みを生じるような乾燥
- (x) 微生物による汚染

1.2. 培地の保存

培地及び培地成分を保存する場合には、品質低下を防ぐために、入手するまでの輸送条件も含め、下記の事項に留意する。

- (i) 乾燥、蒸発、吸湿
- (ii) 温度
- (iii) 微生物汚染
- (iv) 異物の混入
- (v) 破損

また、培地又は培地成分には、名称、バッチ又はロット番号、保存条件、使用期限などを表示し、識別する。

調製後の培地の保存条件及び使用期限については、設定した条件で保存した場合に、使用期限の最後まで当該培地の性能が許容基準を満たしていることを、培地性能試験やその他の必要な品質試験により検証し、安定性を確認して設定する。

長期間保存する場合には、水分の蒸発を防ぐことができるような包装材、包装形態、容器及び栓を選択する。また、必要に応じて遮光する。カンテン培地は、凍結によりカンテンのゲル構造が破壊されるため、凍結を避けて保存する。

なお、保存後に再融解したカンテン培地については、性能試験を実施し、適合性を確認した上でであれば、確認された使用期限内で使用することは差し支えない。また、カンテン培地の再融解は、過熱による品質低下や汚染の可能性を避けるため、1回までとするのが望ましい。再融解は、加熱した水浴中又は流通蒸気中で行うことを推奨する。培地の融解に電子レンジや加熱プレートを使用することは、培地全体に均一に熱がかからず

107 過熱による培地の劣化や容器の破損などが発生する可能性があるため、留意する。

109 滅菌直後のカンテン培地又は再融解した培地は、45～50℃
110 又は別に規定された温度で保持するが、品質低下や汚染のリスクを考慮して、長時間の保持は避ける。また、水浴で保持する場合は、ペトリ皿への分注時の水槽水由来の汚染に注意する。

113 使用した培地や期限切れの培地を廃棄する際は、必要に応じて滅菌し、汚染防止に配慮する。

115 1.3. 品質管理試験

116 調製された全ての培地について、バッチ又はロットごとに下記
117 の品質管理試験を行う。調製された培地には、市販培地及び
118 キット化された培地(スワブ、ストリップなどとセットになったもの)も
119 含まれる。

120 (i) 培地性能(発育促進特性、必要に応じて選択特性や鑑別特性)

122 (ii) pH(市販培地は必要に応じて)

123 冷蔵状態で購入又は保存した培地は、常温又は別に規定
124 された温度に戻して確認する。

125 (iii) 無菌性(微生物汚染がないこと)

126 無菌医薬品製造区域のグレードA及びBの環境モニタリング用培地は、
127 多重包装品を使用するか若しくは外装を消毒又は除染し、定められた
128 手順で搬入する。包装後の滅菌処理がされていない培地は、制御
129 された環境への外来汚染及び偽陽性結果を防ぐために、使用する
130 前に全ての培地(全数)を培養することにより、微生物汚染がないことを
131 確認する。

133 なお、市販培地には試験成績書が添付されており、そこには培地
134 性能試験に使用した標準微生物株と共に、保存条件及び使用期限が
135 記載されている。受入時に培地メーカーから試験のデータを入手し、
136 書面又は現地調査などによりそのデータが信頼できるものであり、
137 培地性能試験結果及び使用期限の妥当性について確認できれば、
138 バッチ又はロットごとではなく、定期的に品質管理試験を行うこと
139 によい。

140 培地と同様に品質管理試験が必要なものとして、グラム染色試薬
141 やオキシダーゼ試薬などの微生物同定試験用試薬がある。

142 これらは、受入時又は使用時に、適切な標準微生物株を選定して
143 品質管理試験を行う。

144 2. 微生物株の維持管理

145 微生物試験の精度と結果の再現性を保つ上で、保存微生物株を
146 適切に取り扱うことは非常に重要である。試験室での微生物株の
147 保存及び取扱いは、汚染に注意し、当該微生物の増殖特性の変化を
148 最小とするような方法で行う。公定法で使用する微生物株は、
149 微生物保存機関又は適切な供給業者から、凍結品、凍結乾燥品、
150 斜面培養品又は調製済みの形態で入手できる。入手した微生物株は、
151 品質管理試験に使用する前又は使用時に、選択性のない平板培地に
152 塗抹し、出現コロニーが単一であることなどで他の菌の混入がない
153 ことを確認する。また、必要に応じて、分与された菌種の確認を行う。

155 保存用微生物株は、微生物保存機関などから指定された方法で
156 復元する。微生物株の保存の管理には、シードロット培養管理手法
157 (シードロットシステム)の適用が推奨される。シードロットシステム
158 とは、継代による性状変化を避けるために保存微生物株の継代回数
159 を管理するシステムである。一継代は、新鮮培地への移植として
160 定義する。どのような形態の移植培養でも、

161 継代とみなす。管理に当たっては、少なくとも下記の事項に留意する。

163 (i) 微生物保存機関などから入手した微生物株を復元(継代回数1
164 回目)して得られた培養物を、1世代目として数える。

165 (ii) 継代回数を管理する。

166 (iii) 培地性能試験や適合性試験に用いる微生物株については、
167 継代回数5回を超えて使用しない。

168 微生物株の保存には、凍結保存法、乾燥保存法、継代培養保存法
169 などがあがるが、凍結保存する場合の一例を示す。微生物保存機
170 関などから入手した標準微生物株を適切な培地で復元培養し、
171 生育させる。この培養菌(1世代目)の一部を凍結障害を防ぐ保
172 護剤を含む溶液に懸濁してバイアルなどに移し、菌種に応じて
173 適切な温度で凍結保存する。多くの微生物株は-70℃以下に維持
174 することにより長期間の保存が可能となる。2世代目以降を大量
175 に作製しておけば、標準微生物株の入手及び調製の頻度を下げる
176 ことができる。

177 一度開封した容器は、保存微生物株の生育能力の低下と汚染
178 のリスクを避けるため、再凍結せずに廃棄する。

179 参考資料

180 1) WHO, WHO good practices for pharmaceutical microbiology
181 laboratories(WHO Technical Report Series, No.961, Annex 2, 2011).

182 2) US Pharmacopeia 41 (2018), 〈1117〉 Microbiological Best
183 Laboratory Practices.
184

185