

2.3 装置及び材料

1) DNA 自動解析装置

ゲル板法やキャピラリー法など、種々の機種が汎用されている。身近に装置が無い場合には、装置所有者や受託業者に PCR 産物の解析を依頼することもできる。

2) 核酸増幅装置

被検菌の標的 DNA の増幅 (PCR) 及び PCR 産物をシーケンス試薬で蛍光標識するための装置。

3) 比色計

260 nm 波長で PCR 産物の DNA 量を測定する。アガロースゲル電気泳動で増幅 DNA 量を推定できる場合は不要。

4) アガロースゲル電気泳動装置

PCR 産物の確認に使用。

5) マルチヒーター

1.5 mL の遠心チューブを 100°C で加熱できるもの。

2.4 試液、器具

1) TE 緩衝液

1mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 1.0 mL、0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム溶液 0.2 mL に滅菌水を 99 mL 加える

2) 被検菌処理液

Triton X-100 を 1vol% 含む TE 緩衝液を小分けし、使用時まで凍結保存。

3) 核酸増幅 (PCR) 反応液

4) シーケンス試薬

シーケンス方式には、プライマーを標識するダイプライマー (dye-primer) 法、ddNTP ターミネーターを標識するダイターミネーター (dye-terminator) 法など、種々の方法がある。DNA 自動解析装置やプログラムに合った適切な試薬キットを購入する。

5) TAE 緩衝液 (50 倍濃縮液)

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 242 g、酢酸 57.1 mL、0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 100 mL に水を加え、全量を 1,000 mL とする。

6) アガロースゲル (PCR 産物の確認に使用)

アガロース 1.5 g に TAE 緩衝液 (50 倍濃縮液) 2 mL、エチジウムブロマイド (10 mg/mL) 10 μ L、水 100 mL を加えて電子レンジなどで溶解する。溶解後、60°C 位に冷やしてからゲル板を作製する。

7) ローディング緩衝液 (6 倍濃縮液)

ブロムフェノールブルー 0.25g、キシレンシアノール 0.25g、グリセロール 30 mL、エ

チレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム 1.63 g に水を加え、全量を 100 mL とする。

8) PCR 産物の精製チューブ

未反応のプライマーやヌクレオチドを除くために用いる。DNA 回収用フィルター付遠心チューブやその他、適当なものを用いる。

3. 操作法

- 1) 同定対象とする細菌又は真菌は純培養されていることが重要である。被検菌が集落の場合は、1.5 mL 遠心チューブに被検菌処理液を約 0.3 mL 入れ、これに滅菌竹串などで集落の一部（カビの場合は、孢子塊又は菌糸の先端部分を極少量）をとり懸濁させる。被検菌が液体培養物の場合は、1.5 mL 遠心チューブに培養物を約 0.5 mL とり、 $10,000 \text{ min}^{-1}$ で 10 分間遠心後、上清を除去し、沈渣に被検菌処理液を約 0.3 mL 入れる。マルチヒーターを用い、 100°C で 10 分間加熱する。
- 2) 核酸増幅反応液に加熱処理した菌液の上清を $2 \mu\text{L}$ 加え、細菌の場合は 10F/800R プライマーセット、真菌の場合は ITS1F/ITS1R プライマーセットを用いて PCR を行う (94°C で 30 秒、 55°C で 60 秒、 72°C で 60 秒を 30 サイクル)。細菌、酵母類は一般に、加熱処理物でも PCR はかかるが、カビは加熱処理後、ボルテックスや超音波処理で菌体を破壊した上で DNA 抽出を行った方が良い。
- 3) PCR 産物の $5 \mu\text{L}$ を $1 \mu\text{L}$ のローディング緩衝液と混合し、 $1.5\text{w/v}\%$ アガロースゲルに添加し、TAE 緩衝液（1 倍濃度）を用いて電気泳動する。泳動後、紫外線照射下で観察し、鮮明な 1 本のバンドが得られていることを確認する。複数のバンドが確認された場合には、主要バンドを切り出し、適当な市販 DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出が必要である。
- 4) PCR 産物から未反応物（dNTP やプライマーなど）を除去する。PCR 産物に TE 緩衝液を加え、全量を約 $350 \mu\text{L}$ にする。これを DNA 回収用フィルター付遠心チューブに入れ、規定の回転数で所定時間遠心する。ろ液を除いた後、フィルターカップに TE 緩衝液を約 $350 \mu\text{L}$ 入れ、再度同一条件で遠心する。本操作を更に 1~2 回繰り返す。フィルター膜を $20 \mu\text{L}$ の滅菌蒸留水でよく洗い、PCR 産物を回収する。また、他の適当な方法で未反応物を取り除くこともできる。
- 5) 精製 DNA 量を比色計で測定する場合には、 $10D_{260 \text{ nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$ で計算する。アガロースゲル電気泳動のバンド濃度からも DNA 量を推測できる。
- 6) DNA 解析装置又はそのプログラムに合った蛍光標識シーケンス試薬を購入し、使用説明書に基づいて PCR 産物を標識する。その一例を示す。

水	$9 \mu\text{L}$
蛍光標識シーケンス試薬	$8 \mu\text{L}$
プライマー*1	$1 \mu\text{L}$
精製 PCR 産物 (DNA 量 : $30\text{--}90 \text{ ng}/2 \mu\text{L}$)	$2 \mu\text{L}$

- PCRに用いたプライマーのうち、通常はセンスプライマー (F) を使い、5' →3' の方向に蛍光標識する。別途、アンチセンスプライマー (R) も使い、3' ←5' の方向に蛍光標識することもできるが、データベースに照合する場合には、配列を逆転する必要がある。

7) 核酸増幅装置を用いて蛍光標識シーケンス反応を行う。その一例を示す。

96℃ 10 秒

50℃ 5 秒

60℃ 4 分

25 サイクル

- 8) 1.5 mL 遠心チューブに 70%エタノールを 75 μL 入れ、反応終了物を移す。氷中に 20 分間放置後、15,000 min⁻¹ で 20 分間遠心する。遠心終了後、上清を除去し、再度、70%エタノールを 250 μL 加え、15,000 min⁻¹ で 5 分間遠心する。上清を除去し、遠心濃縮器で乾燥させる。遠心濃縮器がない場合には、自然乾燥でもよい。
- 9) DNA 解析装置やシーケンス試薬に合った方法で処理した試料を DNA 解析装置にセットし、塩基配列を読み取る。読み取った塩基配列の一部をインターネット (例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で BLAST データベースに照合する。

4. 解析結果

参加企業 11 社中、10 社から解析結果が寄せられた (表 2)。

表 2. 各社の同定結果

企業	細菌					真菌				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	1*	2	2	1	<3 (1)	<3 (1)	1	<3	1	1
2	2	1	4	1	1	3	1	2	1	1
3	1	1	3	1	1	1	1	2	1	1
4	1	2	<3	2	1	2	1	—	1	1
5	1	1	3	2	1	1	1	—	2	1
6	1	1	1	1	1	2	1	<3	1	1
7	1	1	3	1	1	2	1	—	1	1
8	1	1	1	1	1	<3 (1)	1	2	1	1
9	1	1	1	1	1	2	1	—	—	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* : 種名のランクされた順位 (カッコ内は属名でのランク)

細菌 : 1 ; *Staphylococcus aureus*, 2 ; *Serratia marcescens*, 3 ; *Micrococcus luteus*, 4 ;

Staphylococcus epidermidis, 5 ; *Bacillus subtilis*

真菌 : 1 ; *Penicillium italicum*, 2 ; *Syncephalastrum racemosum*, 3 ; *Aspergillus niger*,
4 ; *Candida krusei*, 5 ; *Saccharomyces cerevisiae*

5. アンケート結果

評価研究参加者に、解析結果の提出と同時に以下のアンケートに答えていただいた。その結果を示す。

1. 一般質問

1) 貴社で、過去3年以内に細菌の同定を行ったことがありましたか？

- | | |
|-------------------------------|-----|
| <input type="checkbox"/> あった | 1 1 |
| <input type="checkbox"/> なかった | 0 |

2) 細菌の同定を行う必要があった企業にお聞きします。どこで同定を行いましたか？

- | | |
|----------------------------------|-----|
| <input type="checkbox"/> 自社内で行った | 1 1 |
| <input type="checkbox"/> 外部に委託した | 2 |

3) 自社で同定を行った企業にお聞きします。同定結果に自信はありましたか？

- | | |
|---------------------------------|-----|
| <input type="checkbox"/> 自信あった | 1 1 |
| <input type="checkbox"/> 自信なかった | 2 |

4) 外部に同定依頼した企業にお聞きします。同定結果は信用できましたか？

- | | |
|--------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> 信用できた | 1 |
| <input type="checkbox"/> 信用せざるをえなかった | 0 |
| <input type="checkbox"/> 信用できなかった | 2 |

5) 自社で細菌同定を行っている企業にお聞きします。結果を出すまで、通常、どの位の期間が必要ですか？

- | | |
|--------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> 1週間以内 | 3 |
| <input type="checkbox"/> 1～2週間 | 9 |
| <input type="checkbox"/> 2～4週間 | 1 |
| <input type="checkbox"/> 1ヶ月以上 | |

6) グレードAのクリーンルームや無菌試験、培地充填試験等で検出された汚染菌についてはどの程度まで同定又は性状検査を行っていますか？

- | | |
|------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> 種レベルまで調べる | 6 |
| <input type="checkbox"/> 属レベルまで調べる | 4 |

- 近縁属が含まれるグループまで調べる 2
- グラム染色、コロニー形態、簡単な生化学試験程度 2
- その他 () 1

7) 汚染菌の同定、性状検査に係わっている担当者数についてお聞きします。

- 1～2人 8
- 3～4人 2
- 5人以上 1

2. 遺伝子解析法について

1) 貴社で、細菌の同定に遺伝子解析法を適用したことはありますか？

- ある 5
- ない 6

2) 微生物検査部門の方にとって PCR は馴染みのある装置でしたか？

- 馴染みのある装置であった 6
- 馴染みのない装置であった 5

3) 今回、微生物遺伝子に対して、PCR はどこで行いましたか？

- 品質管理部門 5
- 他部門（研究所等） 6
- 外部に委託 ()

4) PCR 操作では、どのような感想をお持ちですか？（複数回答可）

- 細菌に関しては、Triton X-100 含 TE 緩衝液での加熱処理で十分であった 10
- 真菌に関しては、Triton X-100 含 TE 緩衝液での加熱処理で十分であった 3
- 細菌に関しては、更に DNA 抽出操作が必要であった 1
- 真菌に関しては、更に DNA 抽出操作が必要であった 9

5) PCR 産物の確認後、PCR 産物を精製し、DNA 量を測定しましたか？

- OD260 の紫外波長で DNA 量を測定してからシーケンス反応を行った 3
- 経験的に DNA 量を推定できたので、測定せずシーケンス反応を行った 8

6) シーケンス反応及びシーケンスはどこで行いましたか？

- 品質管理部門 3
- 他の部門（研究部門等） 7
- 外部に委託（ 2 ）

1 社、品質管理部門と他の部門の両方で実施

7) シークエンスデータからの菌種推定をどこで行いましたか？

- 品質管理部門 4
- 他の部門（研究部門等） 6
- 外部に委託（ 1 ）

8) 遺伝子解析による微生物同定法についてどのような感想をお持ちですか？（複数回答可）

- 操作が煩雑でついていけない 0
- データの信頼性に欠ける 0
- これまでの方法に比べ、1 検体当たりの価格が高すぎて導入が難しい 1
- 操作に慣れれば簡単な方法である 9
- これまでの方法に比べ、データの信頼性が高い 10
- 短時間に結果が出るので魅力のある方法である 7
- これまでの方法に比べ、1 検体当たりの価格は安いかも知れない 5

1 0) 貴社では、本法を微生物の同定法として導入したいと思いますか？

- 導入したい 11
- 導入したいとは思わない 0

1 1) 日本薬局方参考情報への本法の導入についてお聞きします。

- 導入に賛成 10
- 導入に反対 0
- 分からない 1

6. 問題点

本研究に参加した企業から最も多くいただいた意見は、カビ（とりわけ、*Aspergillus niger*）に対して PCR がかかりにくいことだった。寄せられたコメントを表 3 に示す。

表 3. 細菌及び真菌に対する PCR

- 1) 細菌、酵母類は一般に、加熱処理物でも PCR はかかるが、カビは加熱処理後、ボルテックスや超音波処理で菌体を破壊した上で DNA 抽出を行った方が良い。親和性を高めるため、アニーリングの温度を下げて有効な場合も有る。
- 2) 滅菌竹串などでコロニーの一部（カビの場合は、極少量）→滅菌竹串などでコロニーの一部（カビの場合は、孢子塊又は菌糸の先端部分を極少量）処理するのが効率が良いと考えます。菌糸の先端を培地のコンタミ無しに採るために、スラントに水を入れてその上にコロニーを伸ばす手法も有ると聞いています。
- 3) 細菌のDNA増幅は非常に簡便ですが、真菌（特にカビ）では増幅効率がやや低い感じを受けました。細胞壁の影響だと思いますが、特に同定できなかった1菌種についてはDNA抽出が困難でした。よって、参考情報への収載が進むようであれば、カビからのDNA抽出について、何種類かの方法を例示することで、より正確な結果が得られると考えます。
- 4) 細菌に関しては順調に進めることができましたが、真菌に関しては DNA の抽出及び PCR で苦勞しました。他社の評価研究参加者の方も同様に苦勞されているようなので、真菌の DNA 抽出及び PCR がより簡単に行なえるようになれば、使い勝手のよい方法になると思います。
- 5) 細菌に関しては手法も確立されていますし、データベースもしっかりしているので有用と考えます。一方、真菌については、既知種の多さに比べデータベースが不十分で、未だ開発途上の感がします。また、本手法の最終目的が、同定でなく医薬品の製造管理にあることから、酵母は別にしても、特にカビに関しては、病原性が危惧される場合以外は無理矢理に同定を進める必要性は低いと考えます。つまり、カビ孢子の特徴(形状、粘性か乾性か、形成方法、他)を確認することで、発生箇所、消毒剤への耐性が推定出来る場合があります。
- 6) 細菌に関しては、核酸抽出が比較的スムーズに進みましたが、真菌に関しては少々てこずりました。菌種によって核酸抽出のしやすさに差があるように感じられました。これは、当方が PCR 試験で実施しているウイルスについても同様の事を経験しています。

細菌の場合は、TE 緩衝液に披検菌を懸濁させたものを 100℃で加熱処理しただけで PCR はかかったが、カビの場合、出来るだけ少量の菌糸を試料とし、抽出段階で物理的に菌体を破壊させ、DNA 抽出を行う必要があった。評価研究参加企業が、細菌及び真菌からの DNA 抽出条件を検討したデータを示す（表 4）。

表 4. 細菌及び真菌からの DNA 抽出条件検討

	菌種	Triton X + TE	スマイテスト*1	PrepMan*2 + ガラスビーズ*3	Triton X + TE + ガラスビーズ + スマイテスト
細菌	1	○	◎		
	2	◎	◎		
	3	○	◎		
	4	◎	◎		
	5	◎	◎		
真菌	1	—	△	◎	
	2	—	△	◎	
	3	—	—	—	△
	4	—	△	◎	
	5	△	◎	◎	

菌種名は、表 2 と同じ。

*1: 核酸抽出試薬 スマイテスト Ex R&D

*2: 核酸抽出試薬 Prep Man Ultra Regent

*3: ガラスビーズを加え、激しく混和

◎: 明瞭なバンド、○: 薄いバンド、△: かすかなバンド、—: バンドを認めない

7. 結 論

アンケート結果及び以下のコメントから、本法を日局参考情報として提示していくことは有意義なものと思われる。本評価研究成果より得られた情報を参考に「遺伝子解析による微生物の同定法」ドラフトを見直し、可能なら第 1 4 改正日本薬局方第二追補導入の方向で、検討したい。

1) 本法は迅速、簡便かつ客観性もあり、以前から興味をもっておりました。今回の評価研究に参加できたことで、それらを実感することができ、あらためて本法の有用性の高さを感じました。業務の効率化という点でも、大きな影響があると感じています。

2) 本法は従来の発色基質を用いる同定法と比較して、低コストで、得られるデータの信頼性の高さや利用のしやすさからデータベースの構築に特に適していると感じました。今後は本法を微生物限度試験やバイオバーデンの評価に利用したいと考えています。

8. 参考資料

1. Sasaki T., Nishiyama T., Shintani M. and Kenri T. Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. PDA J. Pharm. Sci. & Tech. 51: 242-247, 1997.

2. Narutaki S., Takatori K., Nishimura H., Terashima H., and Sasaki T. Identification of Fungi Based on the Nucleotide Sequence Homology of Their Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) Region. PDA J. Pharm. Sci. & Tech. 56: 90-98, 2002.
3. 佐々木次雄：遺伝子解析による細菌の同定法、川村邦夫、佐々木次雄、棚元憲一編「新訂版 GMP 微生物試験法」、講談社サイエンティフィク、p.148-165, 2000.

PDG, 微生物専門家会議報告

生物試験法委員会

佐々木次雄

2003.03.14

PDG, 微生物専門家会議

- 2003年1月14~15日
- EP主催/Strasbourg
- 参加者:EP:5人、USP:4人、JP:3人
- 座長:Prof. Dr. H.G.Kristensen
- 会議目的:Stage 3からStage 4に格上げするために、3薬局方での意見調整

日局参加者:

- 棚元憲一、佐々木次雄、関口道子

試験の適用除外

- 日局: 抗菌活性を有する非無菌医薬品には、通例、生菌数試験及び特定微生物試験を適用しないが、適応菌種以外の微生物については試験を行う。生菌を有効成分とする非無菌医薬品には、通例、生菌数試験を適用しない。
- 調和案: 抗菌活性を有する非無菌医薬品には試験を適用する。生菌を有効成分とする非無菌医薬品には、生菌数試験を適用しない。

試験菌の調製

- *Aspergillus niger*の懸濁液に polysorbate 80を0.05% 加えてもよい。
- 調製菌液は、2時間以内、又は2~8°Cに保存した場合には24時間以内に使用。
- スポア形成菌(*A. niger*、*B. subtilis*)は、2~8°C保存でバリデートした期間、使用可

培地性能試験

- SCD液体培地：*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* (30-35°C、≦3日間)
- SCD寒天培地：*A. niger*, *C. albicans* (?)
- サブロ・デキストロース寒天培地：*A. niger*, *C. albicans* (20-25°C、≦5日間)
- 培地性能試験頻度：USP/JPはスキップテストを認める。

試料調製

- 緩衝液：
 - リン酸緩衝液、pH 7.2
 - ペプトン食塩緩衝液、pH 7.0
 - SCD液体培地
- 試料は、通例、緩衝液で1/10に希釈し、必要に応じてpHを6~8に調整する。

生菌数試験法

- 最確数法(MPN)は、一般に精度の悪い微生物計測法ではあるが、~~メンブランフィルター法を適用できない~~非常に低いバイオバーデンの製品グループには、最も適切な方法である。
- メンブランフィルター法適用可能な低バイオバーデン製品にも適用可能な表現にした。

生菌数試験法

供試量

- 別に規定しない限り、10 g又は10 mL.
- エアゾール(液剤、粉末): 10容器.
- 経皮剤: 10パッチ.
- 錠剤、カプセル1 g当中の有効成分量が1 mg以下の場合は、10服用量又は10 g 又は10 mL相当量以上.
- バッチサイズが1000 mL又は1000 g以下の少ないバルクは、その1%.
- 治験薬のようにバッチサイズが200個未満の場合には2個、100個未満の場合には1個.

生菌数試験法 培地性能

- 寒天平板培地:性能は、前回使用バッチに比べて、2倍(又は1/2)以上変わらないこと。
- 液体培地:性能は、前回使用バッチに比べて、同じ程度の明らかな増殖を示すこと。
- 接種菌数:100個未満

生菌数試験法 計測用培地

- TAMC:Total Aerobic Microbial Count
- カビが検出されたらTAMC数に加える。
- 使用培地:SCD 寒天培地
- 培養期間:30~35°Cで3~5日間

生菌数試験法 計測用培地

- TYMC: Total Combined Yeasts/Moulds Count
- 細菌が検出されたらTYMC数に加える。
- 使用培地: サブロー・デキストロース寒天培地
(日局は、抗生物質添加培地を使用しており、
USP/EP並みに抗生物質無添加培地を用いるの
かどうか国内意見を取りまとめる必要あり)
- 培養期間: 20～25℃で5～7日間

生菌数試験法 計測法

- メンブランフィルター法
- 寒天平板法
 - 寒天平板混釈法
 - 寒天平板表面塗抹法
- 液体培地段階希釈法(最確数法)

生菌数試験法 指標菌の培養

- 指標菌：マスターシードロットから取り出した後の継代数は5代まで。
- *Aspergillus niger*の培養には、サブロー・デキストロース寒天培地の他、ポテト・デキストロース寒天培地の使用も可。
- 日局指定菌(NBRC株)のEP収載。
 - 日局は、ATCC株とNBRC株収載予定

特定微生物試験法 選択培地

- 選択培地の要件：増殖能と選択性に分けて指標菌を提示。
- 例：大腸菌否定試験用培地
- *MacConkey*液体培地：
 - 増殖能：*Escherichia coli*
 - 選択性：*Staphylococcus aureus*

特定微生物試験法 大腸菌否定試験

- 1. 1/10希釈した1 g又は1 mL相当量以上の被検試料を適量のSCD液体培地に接種し、30～35℃で18～24時間培養。
- 2. 培養液の1 mLを100 mLの*MacConkey*液体培地に接種し、42～44℃で24～48時間培養。
- 3. 培養液を*MacConkey*寒天培地に接種し30～35℃で18～72時間培養。
- 4. コロニーが形成したら大腸菌の可能性あり、適当な方法で大腸菌であるかどうかを確認する。

特定微生物試験法 サルモネラ否定試験

- 1. 1/10希釈した1 g又は1 mL相当量以上の被検試料を適量のSCD液体培地に接種し、30～35℃で18～24時間培養。
- 2. 培養液の1 mLを10 mLのラパポート液体培地に接種し、30～35℃で18～24時間培養。
- 3. 培養液をXLD寒天培地に接種し30～35℃で18～48時間培養。
- 4. 中心部に黒点が現れる場合とそうでない場合があるが、赤色コロニーが形成したらサルモネラの可能性はある。適当な方法でサルモネラであるかどうかを確認する。

特定微生物試験法

緑膿菌否定試験

- 1. 1/10希釈した1 g又は1 mL相当量以上の被検試料を適量のSCD液体培地に接種し、30～35℃で18～24時間培養.
- 2. 培養液をセトリミド寒天培地に接種し、30～35℃で18～72時間培養.
- 3. コロニーが形成したら緑膿菌の可能性あり、適当な方法で緑膿菌であるかどうかを確認する.

特定微生物試験法

黄色ブドウ球菌否定試験

- 1. 1/10希釈した1 g又は1 mL相当量以上の被検試料を適量のSCD液体培地に接種し、30～35℃で18～24時間培養.
- 2. 培養液をマンニット・食塩寒天培地に接種し、30～35℃で18～72時間培養.
- 3. 黄色の帯に囲まれた黄色又は白色のコロニーが形成したら黄色ブドウ球菌の可能性あり、適当な方法で黄色ブドウ球菌であるかどうかを確認する.

特定微生物試験法 クロストリジア否定試験

- 1. 1/10希釈した1 g又は1 mL相当量(10 mL)を2倍量(20 mL)とり、半量は80°Cで10分間加熱する。半量は加熱しない。それぞれを別個に100 mLの強化クロストリジウム培地に接種し、30～35°Cで48時間培養。
- 2. 培養液をコロンビア寒天培地に接種し、嫌気条件下、30～35°Cで48時間培養。
- 3. 嫌気条件下で発育したコロニーがカタラーゼ陰性のグラム陽性桿菌の場合は、クロストリジアの可能性あり。コロンビア寒天培地で発育しなかったり、カタラーゼ陽性の場合は、クロストリジア陰性と判断する。

特定微生物試験法 *C. albicans*否定試験

- 1. 1/10希釈した1 g又は1 mL相当量以上の被検試料を100 mLのサブロー・デキストロース液体培地に接種し、20～25°Cで5～7日間培養。
- 2. 培養液をサブロー・デキストロース寒天培地に接種し、20～25°Cで2日間培養。
- 3. 白色コロニーが形成したら*C. albicans*の可能性あり、適当な方法で*C. albicans*であるかどうかを確認する。スポア形成が無い場合には、本試験に適合と判断する。

特定微生物試験法 削除培地

Fluid Selenite-Cystine Medium

Deoxycholate citrate agar

Pseudomonas isolation agar

Baired-Parcker agar

Cornmeal agar

最終剤形の微生物限度値

投与ルート	TAMC CFU/g or mL	TYMC CFU/g or mL	否定微生物*
経口（固形剤）	10 ³	10 ²	大腸菌
経口（液剤）	10 ²	10 ¹	大腸菌
直腸	10 ³	10 ²	
歯、皮下、 鼻腔、耳	10 ²	10 ¹	黄色ブドウ球菌 緑膿菌
腔腔	10 ²	10 ¹	緑膿菌 黄色ブドウ球菌 <i>C. albicans</i>
経皮吸収 貼付剤	10 ²	10 ¹	黄色ブドウ球菌 緑膿菌
吸入剤	10 ²	10 ¹	黄色ブドウ球菌 緑膿菌、胆汁酸耐 性グラム陰性菌