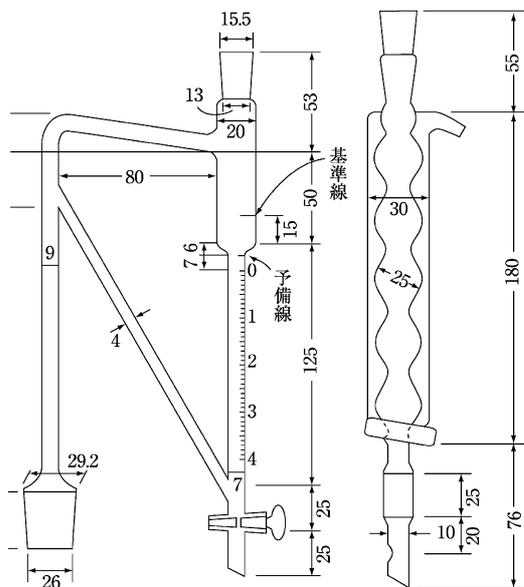


う。ろ液 50 mL を水浴上で蒸発乾固し、デシケーター（シリカゲル）で 24 時間乾燥し、その質量を精密に量り、2 を乗じてエーテルエキスの量とし、エキス含量（%）を算出する。

精油含量

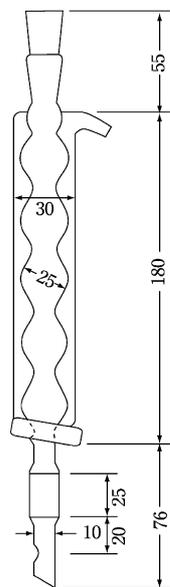
精油含量の試験は次の精油定量法により行う。

精油定量法 医薬品各条に規定する量の分析用試料を、1 L の共通すり合わせ硬質ガラスフラスコに入れ、5 ～ 10 倍量の水を加えた後、精油定量器（図 28-1）を装置し、定量器の上端に還流冷却器（図 28-2）を付け、油浴中で注意して 130 ～ 150 °C で加熱し、沸騰させる。定量器の目盛り管には、あらかじめ水を基準線まで入れ、更にキシレン 2.0 mL を加えておく。別に規定するもののほか、5 時間沸騰を続けた後、加熱をやめ、しばらく放置した後、定量器の活栓を開き、水を徐々に流出させ、油層の上端を目盛り管の予備線にほぼ一致させ、常温で 1 時間以上放置する。次に油層の上面を目盛り管のゼロ線まで低下させ、常温で油量（mL）を量り、キシレンの量を減じて生薬中の精油量とする。



数字はmmを示す

図 28-1



数字はmmを示す

図 28-2

鏡 検

(1) 装置

光学顕微鏡を使用する。対物レンズは 10 倍及び 40 倍を、接眼レンズは 10 倍を用いる。

(2) 鏡検用プレパラートの作成

(i) 切片 切片をスライドガラス上にとり、封入剤 1 ～ 2 滴を滴加した後、気泡が封入されないように注意してカバーガラスで覆う。観察に用いる切片の厚さは、通例、10 ～ 20 μm とする。

(ii) 粉末 粉末の試料約 0.1 g を膨潤剤 2 ～ 3 滴を滴加した時計皿にとり、気泡が入らないように小ガラス棒の先でよくかき混ぜた後、10 分間以上放置して試料を膨潤させる。膨潤した試料の少量をガラス棒の先でスライドガラスに塗抹し、その上に封入剤 1 滴を滴加した後、組織片が重ならないようにほぼ均等に広がり、また気泡が封入されない

ように注意してカバーガラスで覆う。

封入剤及び膨潤剤は、別に規定するもののほか、水/グリセリン混液（1：1）を用いる。

(3) 性状の項の各要素の観察

切片は、通例、外側から内側に向かい、次いで細胞内容物の順に医薬品各条に記載されており、この順に観察する。粉末は、特徴的なもの又は多量に出現するもの、まれに現れるもの、次いで細胞内容物の順に医薬品各条に記載されており、この順に観察する。

29. 生薬の微生物限度試験法

生薬の微生物限度試験法は、生薬に存在する増殖能力を有する特定の微生物の定性、定量試験法である。本試験法には生菌数試験（好気性細菌と真菌）及び特定微生物試験（腸内細菌とその他のグラム陰性菌、大腸菌、サルモネラ及び黄色ブドウ球菌）が含まれる。試験を遂行するに当たって、外部からの微生物汚染が起これないように、細心の注意を払う必要がある。また、被検試料が抗菌作用を有する場合又は抗菌作用を持つ物質が混在する場合は、希釈、ろ過、中和又は不活化などの手段によりその影響を除去しなければならない。試料は任意に選択した異なる数箇所（又は部分）から採取したものを混和し用いる。試料を液体培地で希釈する場合は、速やかに試験を行う。また、本試験を行うに当たっては、バイオハザード防止にじゅうぶんに留意する。

1. 生菌数試験

本試験は、好気的条件下において増殖しうる中温性の好気性細菌と真菌（かび及び酵母）を測定する試験である。本試験では低温菌、高温菌、好塩菌、嫌気性菌、特殊な成分を増殖に要する菌などは、大量に存在しても陰性となることがある。本試験法には、カンテン平板混釈法、カンテン平板表面塗抹法、液体培地段階希釈法（最確数法）及びメンブランフィルター法の 4 つの方法がある。試験を行うときは、その目的に応じて適当と思われる方法を採用する。なお、ここに示した方法と同等以上の検出感度と精度を有する場合は、自動化した方法の適用も可能である。好気性細菌と真菌では使用培地及び培養温度が異なる。液体培地段階希釈法（最確数法）は細菌のみに用いる試験法である。

試料の採取と調製

別に規定するもののほか、次の方法によって試料を採取し、測定用の試料を調製する。

- (1) 小形の生薬、切断生薬及び粉末生薬は、よくかき混ぜた後、試料 50 ～ 250 g を採取する。
- (2) 大形の生薬はよくかき混ぜた後、試料 250 ～ 500 g を採取し、切断生薬を調製する。
- (3) 1 個の質量が 100 g 以上の生薬は 5 個以上を採取し、試料とするか、又は生薬を適当な大きさに切断してよくかき混ぜた後、試料 500 g 以上を採取し、必要に応じて切断生薬を調製する。
- (4) 液状の生薬又は製剤は混和したのち採取する。
- (5) 不溶性固形剤は不溶性物質をできるだけ細かく磨砕したのち採取する。

試料溶液の調製

試料の分散又は希釈には、pH 7.2 のリン酸緩衝液、pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液又は使用する液体培地を用いる。別に規定するもののほか、通例、試料 10 g 又は 10 mL を量り、上記の緩衝液又は液体培地 90 mL 中に振り混ぜ分散又は溶解し、分散した試料は、更に、10 分間振り混ぜる。なお、付着菌の回収率の低い生薬については同様の操作を繰り返し、試料溶液とする。ただし、試料の性質によっては、規定された量よりも大量の緩衝液又は液体培地中に分散させるか、異なる量の試料を使用しなければならない場合がある。試料溶液は、pH 6 ~ 8 に調整する。試料溶液は調製後 1 時間以内に使用しなければならない。

液状製剤：10 mL を量り、上記の緩衝液又は液体培地 90 mL 中に振り混ぜ試料溶液とする。ただし、試料の性質によっては、規定された量よりも大量の緩衝液又は液体培地中に分散させるか、異なる量の試料を使用しなければならない場合がある。

不溶性固形剤：10 g を量り、不溶性物質をできるだけ細かく磨砕して、上記の緩衝液又は液体培地 90 mL 中に振り混ぜ試料液とする。ただし、試料の性質によっては、規定された量よりも大量の緩衝液又は液体培地中に分散させるか、異なる量の試料を使用しなければならない場合がある。必要に応じてブレンダーなどで浮遊液を均一に分散させることも可能である。適当な界面活性剤（例えば、0.1 w/v% ポリソルベート 80）を加えて可溶化させてもよい。

試験の手順

(1) カンテン平板混釈法

本法では、直径 9 ~ 10 cm のペトリ皿を使用する。一希釈段階につき 2 枚以上のカンテン培地を使用する。1 mL の試料溶液又は試料溶液を希釈した液を無菌的にペトリ皿に分注する。これにあらかじめ 45 °C 以下に保温されて融けた状態にある滅菌したカンテン培地 15 ~ 20 mL を加え混和する。カンテン培地としては、好気性細菌の検出を目的とする場合はソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を使用する。試料中に混在する生薬の組織片などへの対応や真菌の増殖をできるだけ抑制する目的から、好気性細菌染色色素 TTC 試液や抗真菌剤アムホテリシン B 試液を培地に添加することができる。TTC 試液及びアムホテリシン B 試液は、滅菌したカンテン培地へ使用直前に 1 L 当たり TTC 試液 2.5 ~ 5 mL、アムホテリシン B 試液 2 mL を添加し、混和する。真菌の検出を目的とする場合は抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地、抗生物質添加ポテト・デキストロースカンテン培地又は抗生物質添加 GP カンテン培地のいずれかを使用する。かびがカンテン培地上に拡散する場合は、ローズベンガル試液を培地に添加することができる。ローズベンガル試液は、カンテン培地 1 L 当たり 5 mL を添加し、混和後、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。カンテンの固化後、好気性細菌の試験は 30 ~ 35 °C、真菌の試験は 20 ~ 25 °C で少なくとも 5 日間培養する。多数の集落が出現するときは、好気性細菌の場合は一平板当たり 300 cfu 以下の集落を持つ平板から、真菌の場合は一平板当たり 100 cfu 以下の集落を持つ平板から得られる計測結果を用いて生菌数を算出する。信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養後

5 日以前の計測値を採用してもよい。

(2) カンテン平板表面塗抹法

本法は、固化させ表面を乾燥させたカンテン培地上に 0.05 ~ 0.2 mL の試料溶液をのせ、コンラージ棒などで均等に塗抹する方法である。ペトリ皿の大きさ、使用カンテン培地の種類と量、添加試薬、培養温度と時間及び生菌数算出法などは、カンテン平板混釈法と同様である。

(3) 液体培地段階希釈法（最確数法）

本法では、9 ~ 10 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を入れた試験管を使用する。各希釈段階において 3 本の試験管を使用する。最初の試験管 3 本の各々に 1 mL の試料溶液（0.1 g 又は 0.1 mL の試料を含む）を加えて 10 倍希釈試験管とする。次いでこの 10 倍希釈試験管の各々から 1 mL をとり、3 本の試験管の各々に混和し、100 倍希釈試験管とする。更に 100 倍希釈試験管の各々から 1 mL をとり、3 本の試験管の各々に混和し、1000 倍希釈試験管とする。なお、希釈が必要な場合には同様な操作を繰り返す。対照として各希釈段階の希釈液 1 mL を 1 本の試験管にそれぞれ加える。これらの試験管は 30 ~ 35 °C で少なくとも 5 日間以上培養する。対照の試験管で微生物の増殖が観察されてはならない。結果の判定が難しい場合又はあいまいな結果の場合は、カンテン培地又は液体培地に約 0.1 mL を移植し、30 ~ 35 °C で 24 ~ 72 時間培養し、増殖の有無を判定する。表 29-1 から 1 g 又は 1 mL 当たりの最確数を求める。

第一カラム（0.1 g 又は 0.1 mL の試料を含む）において増殖を示した試験管数が 2 以下の場合、1 g 又は 1 mL 当たりの微生物の最確数は 100 以下の可能性が高い。

表 29-1 微生物の最確数表

下記の量の試料を加えた場合に微生物の増殖が観察された試験管の数			試料 1 g 当たり又は 1 mL 当たりの微生物の最確数
試験管当たり 0.1 g 又は 0.1 mL	試験管当たり 0.01 g 又は 0.01 mL	試験管当たり 1 mg 又は 1 µL	
3	3	3	>1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

(4) メンブランフィルター法

本法では、メンブランフィルターは、孔径 0.45 μm 以下の適当な材質のものを使用する。フィルターの直径は、約 50 mm のものが望ましいが、異なる直径のものも使用できる。フィルター、フィルター装置、培地などはすべてじゅうぶんに滅菌されていなければならない。通例、20 mL の試料溶液（2g の試料を含む）を量り、2枚のフィルターで 10 mL ずつろ過する。必要に応じて試料溶液を希釈して試験してもよい。菌濃度が高い場合は1枚のフィルター当たり 10 ~ 100 cfu の集落が出現するように希釈することが望ましい。試料溶液をろ過した後、各フィルターは pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH 7.2 のリン酸緩衝液又は使用する液体培地などを洗浄液として用いて、3回以上ろ過洗浄する。1回のろ過洗浄に使用する洗浄液の量は約 100 mL とするが、フィルターの直径が約 50 mm と異なる場合には、大きさに従って洗浄液の量を調整する。脂質を含む試料の場合には、洗浄液にポリソルベート 80 などを添加してもよい。ろ過後、好気性細菌の試験を行うときはソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地の、真菌の試験を行うときはサブロー・ブドウ糖カンテン培地、ポテト・デキストロースカンテン培地又は GP カンテン培地（いずれも抗生物質添加）のいずれかの表面にフィルターを置く。好気性細菌の試験は 30 ~ 35 °C で、真菌の試験は 20 ~ 25 °C でそれぞれ少なくとも 5 日間培養後、集落数を計測する。信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養後 5 日以前の計測値を採用してもよい。

培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

次に記す菌株、若しくはこれらと同等と考えられる菌株を使用することができる。ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を用い、細菌は 30 ~ 35 °C、*Candida albicans* は 20 ~ 25 °C で培養する。

Escherichia coli IFO 3972, ATCC 8739, NCIB 8545 など

Bacillus subtilis IFO 3134, ATCC 6633, NCIB 8054 など

Staphylococcus aureus IFO 13276, ATCC 6538, NCIB 8625 など

Candida albicans IFO 1393, IFO 1594, ATCC 2091, ATCC 10231 など

培養液のそれぞれを pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液又は pH 7.2 のリン酸緩衝液で希釈し、1 mL 当たり 50 ~ 200 cfu 前後の生菌を含む菌液を調製する。使用する培地は菌液を 1 mL 接種し、指定された温度で 5 日間培養したときに、じゅうぶんな増殖又は接種菌数の回収が認められなければならない。試料の存在下と非存在下での比較において菌数の差異が $\frac{1}{5}$ 以下の場合、希釈、ろ過、中和又は不活化などの手段によってその影響を除去しなければならない。培地、希釈液の無菌性又は試験が無菌的に遂行されているか否かを検証するために、使用した pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液又は pH 7.2 のリン酸緩衝液を対照とする。

2. 特定微生物試験

本試験は、腸内細菌とその他のグラム陰性菌、大腸菌、サルモネラ及び黄色ブドウ球菌を測定する試験である。

試料の採取と調製

生菌数試験の試料の採取と調製の項を適用する。

試料溶液の調製

別に規定するもののほか、生菌数試験の試料溶液の調製法を適用する。試料の調製において液体培地を使用する場合は、別に規定するもののほか、それぞれの試験で規定されている培地を使用する。なお、試料の発育阻止物質の除去や分散性を考慮して、試料量と培地量を適宜、調整することができる。

試験の手順

(1) 腸内細菌とその他のグラム陰性菌

(i) 定性試験

試料 10 g 又は 10 mL を量り、乳糖ブイヨン 90 mL を加えて振り混ぜて分散又は溶解し、10 mL をモーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地 90 mL に接種し 35 ~ 37 °C で 18 ~ 24 時間培養する。培養液を軽く振った後、1 白金耳をとり、ブドウ糖添加 VRB カンテン培地上に塗抹し、35 ~ 37 °C で 18 ~ 24 時間培養する。通例、赤又は赤味がかかった集落が検出された場合、陽性と判定する。

(ii) 定量試験

定性試験で腸内細菌とその他グラム陰性菌が認められた場合、試料 10 g 又は 10 mL を量り、乳糖ブイヨン 90 mL に振り混ぜて分散又は溶解し、試料溶液 1 mL (0.1 g 又は 0.1 mL の試料を含む) をモーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地 9 mL に接種し、振り混ぜる。ついでこの希釈試料溶液から 1 mL をとり、モーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地 9 mL に接種し、振り混ぜる (0.01 g 又は 0.01 mL の試料を含む)。更に、希釈試料溶液から 1 mL をとり、モーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地 9 mL に接種し、振り混ぜる (1 mg 又は 1 μL の試料を含む)。なお、更に希釈試料溶液が必要な場合には同様な操作を繰り返す (0.1 mg 又は 0.1 μL の試料を含む)。これらの調製した液を 35 ~ 37 °C で 18 ~ 24 時間培養した後、1 白金耳をとり、ブドウ糖添加 VRB カンテン培地上に塗抹し、35 ~ 37 °C で 18 ~ 24 時間培養する。赤又は赤味がかかった集落が検出された場合、陽性と判定し、表 29-2 に従って菌数を求める。

表 29-2 定量試験判定基準

各試料溶液における結果				判定 (cfu/g又はmL)
0.1 g 又は 0.1 mL	0.01 g 又は 0.01 mL	1 mg 又は 1 μL	0.1 mg 又は 0.1 μL	
+	+	+	-	10 ⁶ 以上
+	+	-	-	10 ⁵ ~ 10 ⁶ 未満
+	-	-	-	10 ⁴ ~ 10 ⁵ 未満
-	-	-	-	10 ³ 未満

(2) 大腸菌

(i) 定性試験

試料 10 g 又は 10 mL を量り、乳糖ブイヨン 90 mL を加え、振り混ぜて分散又は溶解した液 1 mL を 9 ~ 10 mL の EC 培地を入れた発酵試験管にとり、44.5 ± 0.2 °C の恒温水槽中で 24 ± 2 時間培養し、ガス発生が認められない場合は大腸菌陰性と判定する。ガス発生が認められたときは、ガス発生の発酵管から1白金耳を EMB カンテン培地上に塗抹し、30 ~ 35 °C で 18 ~ 24 時間培養する。EMB カンテン培地で金属光沢を持つ集落又は透過光下で青

黒色を帯びたグラム陰性菌の集落が見出されない場合は大腸菌陰性と判定する。上記の平板で大腸菌が疑われる集落については IMViC 試験（インドール産生試験，メチルレッド反応試験，フォーゲス・プロスカウエル試験及びクエン酸利用試験）を行い，パターンが「++--」又は「-+-」のものを大腸菌と判定する。また，大腸菌迅速同定用培地やキットの使用も可能である。

(ii) 定量試験

液体培地段階希釈法（最確数法）

定性試験で大腸菌の存在が認められた場合，9～10 mL の EC 培地を入れた発酵試験管を使用する。各希釈段階において3本の試験管を使用する。試料 10 g 又は 10 mL を量り，乳糖ブイヨン 90 mL を加え，振り混ぜて分散又は溶解し，最初の発酵試験管3本の各々に 1 mL の試料溶液（0.1 g 又は 0.1 mL の試料を含む）を加えて 10 倍希釈発酵試験管とする。次いでこの 10 倍希釈発酵試験管の各々から 1 mL をとり，3本の発酵試験管の各々に混和し，100 倍希釈発酵試験管とする。更に，100 倍希釈発酵試験管の各々から 1 mL をとり，3本の発酵試験管の各々に混和し，1000 倍希釈発酵試験管とする。対照として各希釈段階の希釈液 1 mL を 1本の試験管にそれぞれ加える。これらの試験管は $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ の恒温水槽中で 24 ± 2 時間培養し，ガス発生が認められた発酵管から 1 白金耳を EMB カンテン培地上に塗抹し， $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で 18～24 時間培養する。EMB カンテン培地で金属光沢を持つ集落又は透過光下で青黒色を帯びたグラム陰性菌の集落の出現した発酵管数から，表 29-1 より最確数を求める。

(3) サルモネラ

試料 10 g 又は 10 mL を量り，乳糖ブイヨン 90 mL を加え，振り混ぜて分散又は溶解し， $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で 24～72 時間培養する。増殖が見られた場合は，培養液を軽く振った後，1 mL ずつを 10 mL のセレナイト・シスチン液体培地及びテトラチオネート液体培地に接種し，12～24 時間培養する。なお，セレナイト・シスチン培地に代えて，ラバポート液体培地を使用することができる。培養後，それぞれの液体培地からブリリアントグリーンカンテン培地，XLD カンテン培地及び亜硫酸ビスマスカンテン培地のうちの少なくとも2種類以上の培地に塗抹し， $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で 24～48 時間培養する。表 29-3 に適合する集落が見出されない場合はサルモネラ陰性と判定する。表 29-3 に適合するグラム陰性桿菌の集落が見出された場合は白金線を用いて TSI 斜面カンテン培地の深部と斜面に疑われる集落を接種し， $35 \sim 37^\circ\text{C}$ で 18～24 時間培養する。サルモネラが存在する場合は深部が黄色となり，斜面部は赤色のまま変化しない。通常，深部でガスの産生が見られるが，硫化水素は産生される場合とされない場合がある。キット使用を含む更に詳細な生化学試験と血清学的試験を併用することで，サルモネラの同定，型別試験を必要に応じて実施する。

表 29-3 選択培地上におけるサルモネラの形態学的特徴

培地	集落の特徴
ブリリアントグリーンカンテン培地	小型で無色透明又は不透明で白色～桃色（しばしば周囲に桃色～赤色の帯が形成される）
XLD カンテン培地	赤色，中心部に黒点が現れる場合とそうでない場合がある。
亜硫酸ビスマスカンテン培地	黒色又は緑色

(4) 黄色ブドウ球菌

試料 10 g 又は 10 mL を量り，ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地又は抗菌性物質を含まない適当な培地 90 mL を加え，振り混ぜて分散又は溶解する。この試料を含む液体培地を $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で 24～48 時間培養する。培養後，1 mL を 9 mL の 7.5 % 食塩加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に加え $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で 24～48 時間培養する。増殖が見られた場合は，培養液から 1 白金耳をフォーゲル・ジョンソンカンテン培地，ベアード・パーカーカンテン培地又はマンニット・食塩カンテン培地のいずれかの上に塗抹し， $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で 24～48 時間培養する。表 29-4 に示す特徴を持ったグラム陽性菌が見出されない場合は黄色ブドウ球菌陰性と判定する。黄色ブドウ球菌が疑われる集落についてはコアグラゼ試験を行う。哺乳類由来の 0.5 mL の血漿（ウサギ又はウマ由来のものが望ましい；適当な添加物が加えられたものでもよい）を含む試験管に白金耳などを使って疑われる集落を接種し， $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温槽中で培養する。3 時間後に凝固の有無を調べ，その後，適当な時間ごとに 24 時間まで凝固の有無を調べる。コアグラゼ反応陽性と陰性の対照についても同時に試験を行う。凝固が観察されない場合は，黄色ブドウ球菌陰性と判定する。

表 29-4 選択培地上における黄色ブドウ球菌の形態学的特徴

培地	集落の特徴
フォーゲル・ジョンソンカンテン培地	黄色の帯に囲まれた黒色
ベアード・パーカーカンテン培地	透明な帯に囲まれた黒色，光沢あり
マンニット・食塩カンテン培地	黄色の帯に囲まれた黄色

培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

試験には，表 29-5 に掲げられている菌株を規定された培地中で $30 \sim 35^\circ\text{C}$ で 18～24 時間培養して使用する。次に，pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液，pH 7.2 のリン酸緩衝液又はそれぞれの菌株で指定された培地などを用いて，1 mL 当たり約 1000 cfu の生菌を含む溶液を調製する。必要に応じて約 1000 cfu/mL の生菌を含む大腸菌，サルモネラ及び黄色ブドウ球菌の各 0.1 mL を混和して，試料の存在下，非存在下において，培地の有効性及び抗菌性物質の存在などを試験する。

表 29-5 培地の有効性確認と特定微生物試験法の
検証のために使用される菌株と培地

微生物	菌株名	培地
大腸菌	IFO 3972, ATCC 8739, NCIB 8545 若しくはこれ らと同等の菌株	乳糖ブイヨン
サルモネラ	特定せず*	乳糖ブイヨン
黄色ブドウ 球菌	IFO 13276, ATCC 6538, NCIB 8625 若しくはこれ らと同等の菌株	ソイビーン・カゼイン・ ダイジェスト培地

* サルモネラの場合、非病原性又は病原性の弱い菌株が望ましい。

Salmonella typhi は使用しないほうがよい。

再試験

不確定な結果やあいまいな結果が得られた場合は、試料量を最初の試験の 2.5 倍を使って再試験を行う。方法は最初の試験法と同じであるが、試料の増加に比例して、培地などの量を増加させて行う。

3. 緩衝液、培地と試薬

微生物限度試験用の緩衝液、培地と試薬を以下に掲げる。他の培地でも類似の栄養成分を含み、かつ試験対象となる微生物に対して類似の選択性及び増殖性を持つものは使用して差し支えない。

(1) 緩衝液

(i) リン酸緩衝液, pH 7.2

保存溶液：リン酸二水素カリウム 34 g を水約 500 mL に溶かす。水酸化ナトリウム試液約 175 mL を加え、pH 7.1 ~ 7.3 に調整し、水を加えて 1000 mL とし、保存溶液とする。高圧蒸気滅菌後、冷所で保存する。用時、保存溶液を 800 倍に希釈し、121 °C で 15 ~ 20 分間滅菌して用いる。

(ii) ペプトン食塩緩衝液, pH 7.0

リン酸二水素カリウム	3.56 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	18.23 g
塩化ナトリウム	4.30 g
ペプトン	1.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 6.9 ~ 7.1、0.1 ~ 1.0 w/v% のポリソルベート 20 又はポリソルベート 80 を添加しても差し支えない。

(2) 培地

(i) ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地

カゼイン製ペプトン	15.0 g
ダイズ製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 7.1 ~ 7.3。

(ii) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

カゼイン製ペプトン	17.0 g
-----------	--------

ダイズ製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 7.1 ~ 7.5。

(iii) 抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地

ペプトン (肉製及びカゼイン製)	10.0 g
ブドウ糖	40.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 5.4 ~ 5.8。使用直前に培地 1 L 当たりベンジルペニシリンカリウム 0.10 g とテトラサイクリン 0.10 g を滅菌溶液として加える。ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代わりに培地 1 L 当たりクロラムフェニコール 50 mg を加えてもよい。

(iv) 抗生物質添加ポテト・デキストロースカンテン培地

ポテトエキス	4.0 g
ブドウ糖	20.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 5.4 ~ 5.8。使用直前に培地 1 L 当たりベンジルペニシリンカリウム 0.10 g とテトラサイクリン 0.10 g を滅菌溶液として加える。ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代わりに培地 1 L 当たりクロラムフェニコール 50 mg を加えてもよい。

(v) 抗生物質添加 GP (グルコース・ペプトン) カンテン培地

ブドウ糖	20.0 g
酵母エキス	2.0 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5 g
ペプトン	5.0 g
リン酸二水素カリウム	1.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 5.6 ~ 5.8。使用直前に培地 1 L 当たりベンジルペニシリンカリウム 0.10 g とテトラサイクリン 0.10 g を滅菌溶液として加える。ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代わりに培地 1 L 当たりクロラムフェニコール 50 mg を加えてもよい。

(vi) 乳糖ブイヨン

肉エキス	3.0 g
ゼラチン製ペプトン	5.0 g
乳糖一水和物	5.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 6.7 ~ 7.1。滅菌後はできるだけ速やかに冷却する。

(vii) EC 培地

ペプトン	20.0 g
------	--------

乳糖一水和物	5.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
リン酸水素二カリウム	4.0 g
リン酸二水素カリウム	1.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH 6.8～7.0。滅菌後はできるだけ速やかに冷却する。冷却後もダーラム管中に気泡が残っている試験管は使用しない。

(viii) EMB (エオシンメチレンブルー) カンテン培地

ゼラチン製ペプトン	10.0 g
リン酸水素二カリウム	2.0 g
乳糖一水和物	10.0 g
カンテン	15.0 g
エオシン Y	0.40 g
メチレンブルー	0.065 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH 6.9～7.3。

(ix) モーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地

ゼラチン製ペプトン	10.0 g
ブドウ糖	5.0 g
乾燥した牛胆汁	20.0 g
リン酸二水素カリウム	2.0 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	8.0 g
ブリリアントグリーン	0.015 g
水	1000 mL

全成分を混和し、100°Cで30分間加熱後、速やかに冷却する。加熱後のpH 7.0～7.4。

(x) ブドウ糖添加 VRB (バイオレット・レッド・胆汁酸) カンテン培地

酵母エキス	3.0 g
ゼラチン製ペプトン	7.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
乳糖一水和物	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ブドウ糖	10.0 g
カンテン	15.0 g
ニュートラルレッド	0.030 g
クリスタルバイオレット	0.002 g
水	1000 mL

全成分を混和して、煮沸して溶かす。煮沸後のpH 7.2～7.6。高圧蒸気滅菌してはならない。

(xi) セレナイト・シスチン液体培地

ゼラチン製ペプトン	5.0 g
乳糖一水和物	4.0 g
リン酸三ナトリウム十二水和物	10.0 g
亜セレン酸ナトリウム	4.0 g
L-シスチン	0.010 g
水	1000 mL

全成分を混和し、加温して溶かす。最終のpH 6.8～7.2。滅菌してはならない。

(xii) テトラチオネート液体培地

カゼイン製ペプトン	2.5 g
肉製ペプトン	2.5 g
デソキシコール酸ナトリウム	1.0 g
炭酸カルシウム	10.0 g
チオ硫酸ナトリウム五水和物	30.0 g
水	1000 mL

固体を含む上記溶液を煮沸する。使用当日に水 20 mL にヨウ化カリウム 5 g 及びヨウ素 6 g を溶かした液を加える。更に滅菌ブリリアントグリーン溶液 (1 → 1000) 10 mL を加え、混和する。その後は培地に熱を加えてはならない。

(xiii) ラパポート液体培地

ダイズ製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸二水素カリウム	1.6 g
マラカイトグリーンシュウ酸塩	0.12 g
塩化マグネシウム六水和物	40.0 g
水	1000 mL

マラカイトグリーンシュウ酸塩と塩化マグネシウム六水和物及び残りの成分をそれぞれ別々に水に溶かして、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後、混和して使用する。最終のpH 5.4～5.8。

(xiv) ブリリアントグリーンカンテン培地

ペプトン (肉製及びカゼイン製)	10.0 g
酵母エキス	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
乳糖一水和物	10.0 g
白糖	10.0 g
フェノールレッド	0.080 g
ブリリアントグリーン	0.0125 g
カンテン	20.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、1分間煮沸する。使用直前に121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH 6.7～7.1。約50°Cに冷却してペトリ皿に分注する。

(xv) XLD (キシロース・リジン・デソキシコール酸) カンテン培地

D-キシロース	3.5 g
塩酸 L-リジン	5.0 g
乳糖一水和物	7.5 g
白糖	7.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
酵母エキス	3.0 g
フェノールレッド	0.080 g
デソキシコール酸ナトリウム	2.5 g
チオ硫酸ナトリウム五水和物	6.8 g
クエン酸アンモニウム鉄(III)	0.80 g
カンテン	13.5 g
水	1000 mL

全成分を混和して、煮沸して溶かす。煮沸後のpH 7.2～7.6。高圧蒸気滅菌してはならない。過剰な加熱は避ける。煮沸後、約50°Cに冷却してペトリ皿に分注する。

(xvi) 亜硫酸ビスマスカンテン培地

肉エキス	5.0 g
------	-------

カゼイン製ペプトン	5.0 g
肉製ペプトン	5.0 g
ブドウ糖	5.0 g
リン酸三ナトリウム十二水和物	4.0 g
硫酸鉄(II)七水和物	0.30 g
亜硫酸ピスマス・インジケーター	8.0 g
ブリリアントグリーン	0.025 g
カンテン	20.0 g
水	1000 mL

全成分を混和して、煮沸して溶かす。煮沸後の pH 7.4 ~ 7.8。高圧蒸気滅菌してはならない。過剰な加熱は避ける。煮沸後、約 50 °C に冷却して、ペトリ皿に分注する。

(xvii) TSI (トリプルシュガーアイアン) カンテン培地

カゼイン製ペプトン	10.0 g
肉製ペプトン	10.0 g
乳糖一水和物	10.0 g
白糖	10.0 g
ブドウ糖	1.0 g
硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物	0.20 g
塩化ナトリウム	5.0 g
チオ硫酸ナトリウム五水和物	0.20 g
フェノールレッド	0.025 g
カンテン	13.0 g
水	1000 mL

全成分を混和して、煮沸して溶かした後、小試験管に分注して 121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 7.1 ~ 7.5。斜面カンテン培地として使用する。なお、上記の組合わせに加えて、肉エキスや酵母エキス 3 g を含むものや、硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物の代わりにクエン酸アンモニウム鉄(III)を含むものも使用して差し支えない。

(xviii) 7.5 % 食塩加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

カゼイン製ペプトン	17.0 g
ダイズ製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	75.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g
水	1000 mL

(ii) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (5 g 塩化ナトリウム含有) に塩化ナトリウム 70.0 g を加え、全成分を混和し、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 7.1 ~ 7.5。

(xix) フォーゲル・ジョンソンカンテン培地

カゼイン製ペプトン	10.0 g
酵母エキス	5.0 g
D-マンニトール	10.0 g
リン酸水素二カリウム	5.0 g
塩化リチウム	5.0 g
グリシン	10.0 g
フェノールレッド	0.025 g
カンテン	16.0 g
水	1000 mL

全成分を混和した後、1分間煮沸して溶かす。121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌後、45 ~ 50 °C に冷却する。滅菌後

の pH 7.0 ~ 7.4。これに滅菌亜テルル酸カリウム溶液 (1 → 100) 20 mL を加えて混和する。

(xx) ベアード・パーカーカンテン培地

カゼイン製ペプトン	10.0 g
肉エキス	5.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化リチウム	5.0 g
グリシン	12.0 g
焦性ブドウ酸ナトリウム	10.0 g
カンテン	20.0 g
水	950 mL

全成分を混和し、時々激しく振り混ぜながら加熱し、1分間煮沸する。121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌した後、45 ~ 50 °C に冷却する。滅菌後の pH 6.6 ~ 7.0。これに滅菌亜テルル酸カリウム溶液 (1 → 100) 10 mL と卵黄乳濁液 50 mL を加えて緩やかに混和した後、ペトリ皿に分注する。卵黄乳濁液は卵黄約 30 %、生理食塩液約 70 % の割合で混和して調製する。

(xxi) マンニット・食塩カンテン培地

カゼイン製ペプトン	5.0 g
肉製ペプトン	5.0 g
肉エキス	1.0 g
D-マンニトール	10.0 g
塩化ナトリウム	75.0 g
フェノールレッド	0.025 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、時々激しく振り混ぜながら加熱し、1分間煮沸した後、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後の pH 7.2 ~ 7.6。

(3) 試薬・試液

(i) アムホテリシン B 試液 アムホテリシン B 粉末 22.5 mg を滅菌精製水 9 mL に溶かす。

アムホテリシン B 粉末 アムホテリシン B にデオキシコール酸ナトリウムが添加され γ 線滅菌されたもの。

(ii) 胆汁酸塩 動物の乾燥胆汁より製した黄褐色の粉末で、タウロコール酸ナトリウムやグリココール酸ナトリウムからなり、コール酸として 45 % 以上を含む。5 % 水溶液の pH は 5.5 ~ 7.5 の範囲にある。

(iii) 2,3,5-トリフェニル-2H テトラゾリウム塩酸塩試液 (TTC 試液) 2,3,5-トリフェニル-2H テトラゾリウム塩酸 0.8 g を水に溶かし 100 mL とする。小試験管などに小分けした後、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。遮光して保存する。

(iv) ローズベンガル試液 ローズベンガル 1 g を水に溶かし 100 mL とする。

ローズベンガル $C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_6$ [特級] 赤褐色の粉末で、水に融けて紫赤色を示す。

(4) 調製

(i) TTC 添加カンテン培地の調製

0.8 % TTC 試液を滅菌したカンテン培地へ使用直前に 1 L 当たり 2.5 ~ 5 mL (20 ~ 40 mg/L) を添加し、混和する。

(ii) アムホテリシン B 添加カンテン培地の調製
 r 線滅菌されたバイアル瓶入りアムホテリシン B 粉末 22.5 mg (添加剤としてデオキシコール酸ナトリウム使用) に滅菌精製水 9 mL を加え溶解する。121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌したカンテン培地へ使用直前に培地 1 L 当たりアムホテリシン B 液 2 mL (5 mg/L) を添加し、混和する。

(iii) ローゼベンガル試液添加カンテン培地の調製
 ローゼベンガル 1 g を水 100 mL に溶かし、カンテン培地 1 L 当たり 5 mL (50 mg/L) を添加し、混和後、121 °C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。

30. 浸透圧測定法 (オスモル濃度測定法)

浸透圧測定法は、試料のオスモル濃度を凝固点降下法を用いて測定する方法である。

ある溶液につき、溶媒は自由に通すが溶質は通さない半透膜を隔てて、純溶媒をおくとき、溶媒の一部はこの膜を透過して溶液内に浸透する。この溶媒の浸透によって半透膜の両側に生じる圧力差が、浸透圧 Π (Pa) と定義される。浸透圧は溶液中の分子及びイオンなど粒子の総濃度に依存する物理量であり、溶質の種類によらない。浸透圧、凝固点降下、沸点上昇など、溶質の種類によらず、分子及びイオンなど総粒子濃度に依存する性質を溶液の束一的性質という。

高分子溶液の浸透圧は、セルロース膜などの半透膜を介しての静水圧の変化から直接測定されるが、低分子溶液の浸透圧測定のために用いられる適当な半透膜はない。低分子溶液の浸透圧を直接に測定することはできないが、ある溶液中の分子及びイオンなどの総粒子濃度を知れば、その溶液が生理的条件下に置かれたとき、細胞膜を隔てての溶媒 (水) の移動の方向と大きさを知ることができる。純溶媒に対する溶液の凝固点降下、沸点上昇、蒸気圧降下など、他の束一的性質は、温度又は圧力などの直接測定から容易に求められる。溶液のこれらの束一的性質は、浸透圧と同様に総粒子濃度に依存する量であり、これらの性質を利用して測定される総粒子濃度をオスモル濃度と定義する。オスモル濃度は、質量基準で表すとき質量オスモル濃度 (osmolarity, mol/kg)、容量基準で表すとき、容量オスモル濃度 (osmolarity, mol/L) と定義されるが、実用的には容量オスモル濃度が用いられる。

別に規定するもののほか、オスモル濃度の測定には凝固点降下法を用いる。凝固点降下法は、溶媒に溶質を溶かした溶液の凝固点が低下する現象を利用し、得られた凝固点降下度 ΔT (°C) と質量オスモル濃度 m の間にある次式の関係を用いて、凝固点降下度から質量オスモル濃度 m を求める方法である。

$$\Delta T = K \cdot m$$

ここで K はモル凝固点降下定数であり、溶媒が水の場合 1.86 °C kg/mol である。モル凝固点降下定数は、質量モル濃度で定義されるため、上式の関係からは質量オスモル濃度が得られることになるが、希薄濃度領域では数値的にこの値を容量オスモル濃度 c (mol/L) に等しいものとみなすことができる。本測定法では実用的な容量オスモル濃度を採用するものとし、その単位として Osm (osmol/L) を用いる。1 Osm は、

溶液 1 L 中にアボガドロ数 (6.022×10^{23} /mol) に等しい個数の粒子が存在する濃度を表し、1 Osm の 1000 分の 1 を 1 mOsm とする。

オスモル濃度は、通例、mOsm の単位を用いて示す。

装置

通例、水の凝固点 (氷点) 降下度の測定から、オスモル濃度を求める。浸透圧測定装置は、一定量の溶液を入れる試料セル、温度制御用の冷却装置と冷却槽及びサーミスター温度計からなる。

操作法

測定には、装置により定められた一定容量の試料溶液を用いる。

あらかじめ二点校正法により浸透圧 (オスモル濃度) 測定装置の校正を行う。予想される試料のオスモル濃度を挟む、高低二種の装置校正用オスモル濃度標準液を用いて凝固点温度を測定し、装置の校正を行う。なお、測定する試料のオスモル濃度が 100 mOsm 以下の場合、二種のオスモル濃度標準液のうち一種は、水 (0 mOsm) を用いることができる。次に、試料セル及びサーミスターを装置指定の方法により清浄にした後、試料溶液について凝固点温度を測定し、凝固点降下度の濃度依存性より質量オスモル濃度を求め、これを容量オスモル濃度に読み替える。

なお、オスモル濃度が 1000 mOsm を超える場合、蒸留水を用いて試料を n 倍希釈し ($1 \rightarrow n$)、この液につき同様な測定を行うことができる。この場合、 n 倍希釈溶液を用いて測定され、希釈倍数を掛けて得られたみかけのオスモル濃度であることを明示する。なお、希釈測定を行う場合、生理食塩液のオスモル濃度に近くなるよう、希釈倍数を選択する。

また、凍結乾燥品など試料が固体の場合、指定された溶解液に溶かして試料溶液とする。

装置の適合性

測定しようとする試料溶液のオスモル濃度に近い濃度を有する標準液の一つを選び、6 回以上の繰り返し測定を行って、装置の適合性を試験するとき、試験の再現性は、2.0 % 以内であり、規定のオスモル濃度からのずれは、3.0 % 以内である。これに適合しないとき、再度、二点校正を行った後、装置の適合性試験を繰り返す。

装置校正用オスモル濃度標準液の調製

塩化ナトリウム (標準試薬) を 500 ~ 650 °C で 40 ~ 50 分間乾燥した後、デンケーター (シリカゲル) 中で放冷する。下表に示した各オスモル濃度標準液に対応する量の塩化ナトリウムを正確に量り、水 100 g を正確に加えて溶かし、各オスモル濃度標準液とする。

表 30-1 装置校正用オスモル濃度標準液

装置校正用オスモル濃度標準液	塩化ナトリウムの量
100 mOsm 標準液	0.309 g
200 mOsm 標準液	0.626 g
300 mOsm 標準液	0.946 g
400 mOsm 標準液	1.270 g
500 mOsm 標準液	1.593 g
700 mOsm 標準液	2.238 g
1000 mOsm 標準液	3.223 g