



衛研

技術情報

VOL. 2 NO.4

1978

粉末培地の品質管理と保存法

— 培地製造工場を見学して —

近年、細菌検査に用いられる培地の大部分は、粉末培地として市販されている。粉末培地は培地成分の調合、濾過、pH修正の必要がなく容易につくれること、労力や時間の節約ができること、ごく少量の培地を必要とする場合に便利なことなどを利点としているが、逆に次のような欠点もみられる。(1)同じ品名でもメーカーによって性能の異なるものがあり、なかには著しく性能の劣る製品がある。(2)同じメーカーのものでも、まれにロットによる製品むらが認められる。(3)いずれも吸湿性が強く、種類によっては保存中に固まったり変色したりする。以上の欠点のうち、性能の劣る製品は主としてメーカーの研究部門における研究不足に起因するものであり、製品むらは工場での粗雑な品質管理によるものであろう。また保存中の変質は、その保存方法に原因の一端があると考えられる。

さて、私共が粉末培地に最も強く望むことは、再現性のある結果がつけに得られるよう、一定の品質を保持していることである。一定の品質は工場における厳密な品質管理によりつくられ、適切な保存方法によって維持されるものと考えられる。かねてから、この品質管理と保存法に関する知見を得るために培地製造工場を訪問したいと思っていたが、機会にめぐまれ今年の2月22日に栄研化学の野木工場（栃木県下都賀郡野木町）を見学することができた。以下、工場の概況と品質管理の手法を紹介し、あわせて粉末培地の保存法について述べることにする。

工場の概況

東北本線の古河駅を降りて車で10分程走り、午後1時過ぎ工場についた。工場の正門で宿谷譲次長（本社営業部学術担当）の出迎えをうけ、早速見学を始めた。

野木工場は、昭和40年にそれまで各地に散在していた工場を整理統合してつくられたもので30,918㎡の敷地があり、第1工場から第4工場の4つの工場によって構成されている。第1工場は血清学的検査用試薬類、第2工場は細菌検査用培地類、第3工場は生化学的検査用試薬類の製造工場であり、第4工場は包装工場である。なお第1工場には動物舎が付設されており、第3工場の2階に事務所が設けられていた。培地類をつくる第2工場は2階建てで、その主な製造室は次のとおりである。

1階の一角にペプトン、エキス類、寒天末などの培地基材の製造室があり、大型のエキス濃縮器やエキス抽出釜が設備されていた。廊下を隔てた一室には培地成分を粉砕混合する器機類が並んでおり、ここで粉末培地の調合や混合が行われる。2階には小川培地とカルチャーボトルの製造室があり、いずれも検査室レベルとは異なる大きな規模で作業が進められていた。なおカルチャーボトルについては、近く新製品の5号培地（TEPブイヨン）が市販されるとのことである。この2階に位置する細菌試験課において榎本省二課長から品質管理の説明をうけ、その後話題は保存法に及んだ。

粉末培地の品質管理

ここでは粉末培地の品質管理を、その手法に限定して述べたいと思う。

まず、次に示す製造工程をご覧願いたい。

原料試験 → 調合 → 粉砕混合 → 半製品試験
→ 包装 → 製品試験 → 出荷

これは野木工場における粉末培地の製造工程を表わしたもので、原料から最終の製品に至る全工程を通じて品質管理が行われている。すなわち品質管理は原料、半製品ならびに製品について試験を行い、それぞれ社内規格に一致するかどうかを

判定し、その結果を工程に反映させることよって行われる。これらの試験のなかから最も重要と思われる製品試験をとりあげ、その一例としてSS培地の試験法について説明する。

SS培地は、各ロットごとに次の6項目の性状をしらべて判定される。

(1)粉末色調 (2)培地溶状 (3)pH (4)ゼリー強度 (5)乾燥減量 (6)培養成績

上記6項目のうち(6)は細菌学的な比較試験によるものであるが、参考のためにその試験法を次に詳述する。

1)赤痢菌8株、サルモネラ5株、大腸菌7株計20株をトリプトソイブイオンに37°C、18~20時間培養し、滅菌生理食塩液で 10^{-1} ~ 10^{-6} に希釈した菌液をミスラ法(ミスラ法については、微生物検査必携1966年版、P 891~894を参照のこと)により被検培地と対照培地に接種する。37°C、20時間培養後の発育集落数を測定して判定する。

2)続いて健康者糞便試験を行う。ただしこの試験は、SS培地に含まれる胆汁酸塩の純度が高くなり製品むらが解消したことから、現在は10ロットにつき1ロットの割合に抜き取って行われる。方法は、5例の健康者糞便のそれぞれ約1gをグリセリン保存液10mlにとりよく混合後、その0.1mlを被検培地と対照培地に塗末培養し、赤色集落数を数えて判定する。

以上の試験により社内規格に適合する製品か否かの判定がなされるが、さらに主要製品であるSS培地では、「残置品チェック」として製品を3年間室温に保存し、前記6項目の試験を行って品質の変化をしらべている。以上、SS培地はきびしい品質管理のもとでつくられており、したがってつねにロット差のない一定の品質を保有するものと理解される。

ところで粉末培地には、時折欠陥のある製品が出現するようで、例えば今年の6月に行われた研修会で指摘したことであるが、各社のジョルダン培地のなかには、明確に判定ができない製品がみられる。一般に粉末培地は、一定の品質が保証されているものとして用いられているが、上述のような製品のあることも考慮に入れて使用する必要があろう。

最後に箭田宰工場長にお目にかかった。お話によると最近見学者が増加する傾向にあり、近く敷

地内に建設する予定の新工場には、見学者に対する配慮がなされるとのことであった。4時過ぎ工場を辞去した。

粉末培地の保存法

はじめに述べたように検査室で粉末培地を保存する場合は、適切な保存方法により品質の低下を防ぐことが必要である。今回の見学において、この保存法に関するいくつかの知見を得たが、そのうち検査室関係で必要と考えられる変質の確認方法と保存上の注意事項について述べる。

変質の確認方法：通常、粉末培地の変質は、粉末の固化や変色などの外観変化を観察することによって判断されるが、品質低下の程度を確かめるには、前述の製品試験にみられるような物理学的試験や細菌学的試験などを必要とする。しかし、これらの方法は手数がかかるので、手軽に行うというわけにはいかない。そこで簡便な方法としてpHを測定し、そのうえで判断することが推奨される。pHはブイオンの場合はそのまま、寒天培地は精製水で5倍に希釈し、25°CでpHメーターにより測定する。

保存上の注意事項：いずれも周知のことではあるが、各注意事項を次にまとめて記述する。

(1)必要量以上の粉末培地を保存しないように心掛ける。(2)古い培地の誤用を避けるため容器に購入日を記入する。(3)高温・湿気・日光を避け、できるだけ乾燥した場所に保存する。(4)変質の早い培地は、開封後すみやかに内袋をゴム輪で封じ、容器を密栓してデシケーターに納める。

以上の注意事項に関連して次の諸点を強調したい。

粉末培地の保存期限は、一般的な医薬品と同様に2か年を目安としているといわれる。しかし粉末培地は、BS培地やリジン培地のように変質し易いものから、SS培地のように比較的安定したもので、その種類により変質の度合いが異なっているので、それぞれに適切な保存法を考慮しなければならない。とくに変質の早い培地に対しては、(4)の措置が必要であるが、メーカーにおいても品質保証の立場から、変質の早い培地類をピックアップし、容器にその旨を記載するとともに製造日を明示する必要がある。

(細菌部 中村章)

A 型肝炎とその原因ウイルス

昭和52年6月、佐賀県基山町において、肝炎の爆発的な流行がおこり、486名の患者が、また、53年4月には、岐阜県神戸町で、おなじく、肝炎の流行で、100余名の患者が発生するという事件が起った。この原因はいずれもA型肝炎であると発表され、この疾患及び原因ウイルスについてにわかに関心が高まって来た。

1 A型肝炎の概略

A型肝炎は昔カタル性黄疸、あるいは、伝染性肝炎とよばれ、血清肝炎（B型肝炎）とは疫学的に区別されていた。A型肝炎とB型肝炎のいくつかの相違点を表1に示した。

表1 ウイルス性肝炎の比較

	A型肝炎	B型肝炎
潜伏期間	21～40日	60～160日
感染経路	経口	経口・非経口
感染媒体	便・尿(?)	血液・唾液・尿(?)
好発年齢	小児～青年	なし
発生状況	流行性・農村	散发性・都会
経過	通常短い	ときとして遷延

1973年Feinstoneらの手によって免疫電顕法により、A型肝炎患者糞便中に直径27nmの粒子が発見され、ついで、Hillemanによって、この粒子がRNAウイルスである事が確認された。

しかし、ウイルスそれ自体、ウイルスの生体内の動向などは、いまだ解明されていない。

このウイルスは経口的に感染し、肝臓で増殖し、肝臓から胆汁、そして糞便へと排泄される。したがってその感染経路は赤痢と同様、便-口経路である。

我国では過去20年間の環境衛生の改善によって赤痢が減少したように、A型肝炎による感染の機会もほとんどなくなったといえるが、それでも完全に跡を絶ったというわけではない。最近の事例を見てみると、

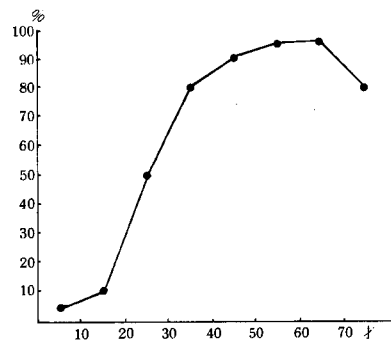
- 1) 昭和50年から52年の間に、和歌山県内の保育所や、青森県、群馬県内の精薄施設での流行など、自分で糞便の処理ができない所での流行。
- 2) 昭和52年と53年の佐賀県と岐阜県での水源汚染による流行。
- 3) 昭和52年に京都においては、2つの食堂を利

用していた若い独身男性に、A型肝炎が多発したとの報告や、栃木県内で、台湾料理のやや生のシジミを食べた人に肝炎が流行したという報告など、食物によると思われる例。

4) A型肝炎の流行地である東南アジアやアフリカへ旅行し、現地で感染し、国内へ持ち込む例。などがあげられる。

近年、免疫粘着法（IAHA法）やラジオイムノアッセイの進歩により、抗体の測定が可能となったが、我国のA型肝炎ウイルスに対する抗体保有状況は、森次らの調査（図1）によると、30才以上では保有率は高く、特に50才以上では90%を越している。これに反して、20才以下では保有率は10%を下廻っている。この事は、先に述べたように環境衛生が、ここ20年著しく改善されて来たこと、また好発年齢が小児から青年に限られることを示している。

図1 日本人の年齢別抗H A抗体保有率



2 A型肝炎の臨床

始めは体温の上昇をきたし、全身倦怠、食欲不振、ついで悪心、嘔吐、下痢や右季肋部の不快感などを訴える。症例によっては呼吸器症状もある。小児では腹痛を訴えるものも多い。

発熱後数日たつと下熱し、黄疸が出現する場合が多いが、小児では黄疸を伴わないものも多く、診断上注意を要する。

肝臓は約70%程度触知でき、圧痛がある。

肝機能検査では、血清トランスアミナーゼが、病初著しく高値を示し、急速に下降する。また小児ではIgMの上昇とTFT反応が陽性になることが多い。

ウイルスの排泄は発症の数日前から、トランス

アミナーゼ極期まで続く。

一般に肝臓の障害の割に、全身状態が良く、30～40日で回復するが、大人ではやや長く、症状も重い傾向にある。

また不顕性感染や、無黄疸例もきわめて多いと思われる。

3 A型肝炎防疫対策上の問題点

防疫対策の基本は赤痢などと同じように、便一口経路を断つ事であるが、次のような問題点に留意する必要がある。

1) A型肝炎の潜伏期は21～40日と長い。このことは、いつ、何によって感染したかという原因究

明を不可能にする。また汚染源や汚染物質に対する対策が遅れることになる。

さらに、東南アジアやアフリカで感染した場合、潜伏期が長いと、空港検疫で発見することがむづかしくなることがある。

2) ウイルスは、発症の数日前から排泄されるために、患者が発見された時にはすでに、ウイルスが多量にばらまかれてしまっている。

3) このウイルスを扱うのはきわめて困難のため、現状では検査出来る機関が少なく、このため、ウイルス排泄者の決定に日数を要し、効果的な防疫措置をとる時期を逸する場合がある。

(ウイルス部 栄 賢司)

先天性代謝異常症とマス・スクリーニング

先天性代謝異常症とは先天的に酵素の異常によって生じる疾患である。

近年のめざましい生化学の発展は次々に新しい代謝異常症の発見をもたらし、今日までに100種類を超える疾患が報告されている。

先天性代謝異常症には精神薄弱を伴うものも少なくないが、フェニルケトン尿症(以下PKUと略)をはじめとするいくつかの疾患は早期発見によって治療が可能であるが、現在マス・スクリーニングの対象になっている疾患は表1の通りである。

先天性代謝異常症のマス・スクリーニングはPKU患者の検索を目的として、1956年米国California州において実施されたのが最初である。これは通常“おむつテスト”と呼ばれる方法で、新生児の尿中フェニルピルビン酸を検出するもので、尿によるPKU・スクリーニングの第一歩であった。その後、フェニステキス試験紙法、呈色反応、ペーパクロマトグラフィー等で尿中フェニルピルビン酸を検出する方法が相次いで開発され、世界各地で多数の新生児がスクリーニングされた。しかし、尿によるPKU・スクリーニング法では多数の患者が発見もれになっていることが指摘され、その数はPKU患者の40-70%と推定された。わが国においては東京都で昭和46年までに26万名の新生児を検査して1名、兵庫県では昭和41年から昭和50年までの10年間に70万名近い新生児を検査して7名のPKU患者が発見されたにすぎず、

岡山県では昭和47年までに19万名を検査して陽性者0名、愛知県では昭和41年から昭和48年までの8年間に22万名の新生児を検査したが、1例の陽性者も発見されなかった。

米国の細菌学者Gathrie(1961)は新しいPKU・スクリーニング法として、血液を用いて行う微生物抑制試験法(いわゆるガスリー法)を開発した。ガスリー法は枯草菌のある菌株とフェニアラニンの代謝阻害剤とをある適当な割合に加えた培地に、新生児の血液を採血汚紙にしみ込ませたものを一定の面積の小円板状(ディスク)に切り抜き、培地にのせて培養し、菌の発育の度合いから、血中のフェニアラニンを定量する方法である。また、ガスリー法は代謝阻害剤を変えることにより、PKU以外の他の疾患をもスクリーニングすることができる。

このガスリー法によって、米国では1963年春から同年末までに40万名を超える新生児がスクリーニングされ、39名のPKU患者が発見された。この数はそれまでの尿によるスクリーニングあるいは疫学的推定より出されていた頻度よりはるかに多く、この方法の有効性が実証された。

わが国においては昭和42年からガスリー法によるPKU・スクリーニングが始められ、昭和47年からはPKUばかりでなく、いくつかの先天性代謝異常症をも同時に検査するマルチプル・スクリーニングがいくつかの研究機関で実施された。昭和48年には代謝異常スクリーニング研究会が、

表1 スクリーニングの対象になっている先天性代謝異常症

疾患名	欠損酵素	血中増加物質
フェニルケトン尿症	フェニルアラニン水酸化酵素	フェニルアラニン
楓糖尿症	側鎖アミノ酸 α -ケト酸炭酸酵素	ロイシン、(イソロイシン)、 (バリン)
ホモシスチン尿症	シスタチオニン合成酵素	メチオニン
ヒスチジン血症	ヒスチダーゼ	ヒスチジン
ガラクトース血症	ガラクトース・1・リン酸ウリジル トランスフェラーゼ	ガラクトース

昭和49年には先天性代謝異常スクリーニングに関する研究班がそれぞれ発足した。このような研究、実践の結果、厚生省は昭和51年度より尿によるPKU・スクリーニングの中止とガスリー法の採用を決め、昭和52年10月より都道府県、政令市において実施すること、検査機関は地方衛生研究所等で行うこととした。

愛知県では先天性代謝異常による精神障害等発生予防対策事業の一環として、昭和49年度より、他の自治体に先駆けて、受検を希望する一部の新生児についてガスリー法による検査を実施してき

た。昭和51年度までの過去3年間に67,578名を検査し、PKU 3名、ガラクトース血症1名の患者が発見された。昭和52年度からはこの事業が国の補助対象にもなり、また全出生児を対象に実施することが望ましいので、検査対象者の拡大をはかり(対象者 35,000名、名古屋市をのぞく)、愛知県産婦人科医会の協力を得て、この事業を実施した。検査項目はPKU、楓糖尿症、ホモシスチン尿症及びヒスチジン血症の4項目である。

昭和52年度の検査成績は表2に示した通りであった。検体送付医療機関は192施設、検査者総数

表2 昭和52年度 マス・スクリーニングでの成績

月別	検体送付医療機関数	検査者数	検査項目別陽性者数									
			PKU		楓糖尿症		ホモシスチン尿症		ヒスチジン血症			
			1*	2**	1*	2**	1*	2**	1*	2**		
S.52.4月	73	1,567	0		0		0		0		0	
5	124	2,687	0		1	0/1	1	0/1	2	0/2		
6	134	3,294	4	0/4	8	0/7	4	0/4	6	1/6 (0)		
7	139	3,586	5	0/5	9	0/9	7	0/7	16	0/16		
8	145	3,829	7	0/7	5	0/5	3	0/3	11	1/10 (1)		
9	152	3,940	0		4	0/4	1	0/1	22	0/22		
10	156	3,859	0		0		0		0			
11	158	3,556	0		0		0		1	0/1		
12	157	3,534	0		4	0/4	1	0/1	2	1/2 (1)		
S.53.1	155	3,785	0		1	0/1	1	0/1	1	0/1		
2	159	3,578	0		1	0/1	2	0/2	1	1/1 (1)		
3	160	3,805	0		0		1	0/1	0			
総計		41,020	16	0/16	33	0/32	21	0/21	62	4/61 (3)		

*: 第1回目検査 **: 再提出された検体の検査、分母は再提出された検体数、分子は陽性者数。()内は専門病院でヒスチジン血症と診断されたもの。

は41,020名であった。送付されてきた検体のうち、検体が不適当の理由で再採血を必要としたのは148件(血液量の不足145件、血液汚紙の汚染3件)、うち、再提出されたのは110件(血液量の不足107件、血液汚紙の汚染3件)で35名の新生児は未検査のままであった。また、陽性もしくは疑陽性の疑いで再採血を必要としたのは132件、全送付検体の0.32%を占めた。この値は名古屋市における昭和49年度の0.28%と比べて若干多かった。再検査の結果では大部分が陰性になったが、精密検査の必要ありと認められた4名について(4名ともヒスチヂン血症の疑い)専門病院で診断の結果、1名は正常、3名がヒスチヂン血症と決定された。その発生は新生児14,000名につき1名の頻度であった。

本県では昭和49年から昭和52年の4年間に10万名を超える新生児がガスリー法によるスクリーニングをうけ、すでに7名の先天性代謝異常患者が発見されており、早期発見、早期治療の成果をあげている。昭和53年度はさらに検査対象者の一層の拡大(対象者数45,000名)をはかるとともに、ガラクトース血症についてもスクリーニングを実施している。

いずれにせよ、これらの治療可能な代謝異常による精薄児の数は決して多くはないが、早期発見、早期治療がなされるならば、正常な社会生活を送ることが可能である。したがって、このスクリーニングの意義を十分に理解して、より多くの新生児がこの検査を受けられることを望むものである。(生物部 恩田祐行)

質疑応答

梅毒血清反応のガラス板法における判定時間

質問:梅毒血清反応のガラス板法において鏡検する場合、反応終了後時間がたつとだんだん粒子が大きくなっていくように見えますが、何分以内に判定すればよいのでしょうか。

答:梅毒血清反応検査指針には、ガラス板上で血清と抗原とを混ぜ、水平回転運動によって両者を反応させた後、ただちに顕微鏡で凝集の有無を読むように記載されているだけで鏡検までの適当な時間については決められていない。そこで反

応終了後の時間と凝集像について当所で実験を行った。その結果、5分以内は反応直後と同じ成績であったが、7.5分以降では少しずつ凝集塊が大きくなる傾向が認められた。ただし、この実験は室温24℃、湿度44%で行なったものであるので、温度・湿度が変化すれば、当然これらの結果は異なるものと考えられる。このことから、反応後ただちに判定することが最も望ましいので、ガラス板法は一度に大量の検体を実施しないように注意する必要がある。

(細菌部 松井博範)

技術情報アンケートから

—ご協力ありがとうございました—

このたび、技術情報について、既刊分の受けとめ方と今後の在り方についてアンケートをお願いしましたところ、96%の各位からのご協力をいただき、感謝いたしております。

さて、アンケートを集約した結果について、その要点をつぎにご報告致します。

1. 既刊号について、読まれた記事の表題別の傾向をみると、保健所における試験検査業務に直接関係のあるものが特に多く見うけられた。
2. 担当業務に参考になったかどうかとの設問においては、参考になったとの答が70%であった。
3. 表現方法の適否については、理解しにくいものがあつたとの答が26%あつた。
4. 今後希望する表題を集計してみると、試験検査法の解説・検討(81%)、新しく問題になってきた事柄(74%)、学術文献の紹介(41%)、質疑応答(32%)、学会などの動き(27%)の順であつた。
5. その他の希望欄に記入された方は16名あつたが、その主旨を整理してみると、つぎの3点であつた。

- (1) 保健所における試験検査について技術面の解説をできるだけ多くする。
- (2) 質疑応答欄と文献紹介を充実する。
- (3) 広い分野の記事を掲載する。

アンケートの集約結果から以上のようなことがわかりましたので、今後の原稿執筆と編集に際し充分考慮するように致します。尚、掲載希望の表題・内容等について、具体的にご連絡頂き度いのでよろしくお願ひ致します。(編集委員)