

限定なし



フライト機器及びクリーンルームの微生物検査 ハンドブック

2026 年 3 月 30 日 初版

宇宙航空研究開発機構

ECSS 文書からの引用に関する取り扱い

本ハンドブックにおける ECSS からの引用については、以下のように ECSS 事務局との合意に基づくものとする。

本 JAXA ハンドブックには、ECSS の名義のもと、ESA の特別な許可を得て、ECSS-Q-ST-70-55C “Space product assurance – Microbial examination of flight hardware and cleanrooms ” (2008 年 11 月 15 日) の全部又は一部を引用・翻訳して収録している。ECSS 規格の英語原文は、以下の URL から入手することができる。

ECSS Executive Secretariat (ECSS-Secretariat@esa.int)

P. O. Box 299

2200 AG Noordwijk

The Netherlands

Tel.: +31-71-5655748

www.ecss.nl

本 JAXA ハンドブックの内容については、ECSS 文書からの引用及び翻訳を含め、JAXA が単独で責任を負う。

ECSS 規格から引用した箇所の一覧を、本 JAXA ハンドブックに添付する。

ESA は、ECSS 加盟機関を代表して、明示、黙示又は法令上のいずれであるかを問わず、いかなる保証も行わない。これには、商品性、特定目的への適合性、並びに ECSS 規格及びその引用又は翻訳の内容に誤りがないことについての保証が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ECSS 規格、又は ECSS 規格の全部若しくは一部を引用若しくは翻訳して含む JAXA 規格の適用により生じるいかなる損害についても、ESA 及び ECSS 加盟機関は一切の責任を負わない。

Use of ECSS Material

The use of quotations from ECSS documents in this standard is subject to an agreement with the ECSS Secretariat, as described below.

This JAXA standard contains, in whole or in part, quotation and translation of ECSS-Q-ST-70-55C “Space product assurance – Microbial examination of flight hardware and cleanrooms ” (15 November 2008) with special permission of ESA in the name of ECSS. The original English version of the ECSS Standard is available from:

ECSS Executive Secretariat (ECSS-Secretariat@esa.int)

P. O. Box 299

2200 AG Noordwijk

The Netherlands

Tel.: +31-71-5655748

www.ecss.nl

The content of this JAXA standard, including any quotations and translations of ECSS documents, is the sole responsibility of JAXA.

A list of the quotations from ECSS Standards is attached to this standard.

ESA, in the name of the ECSS members, does not provide any warranty whatsoever, whether express, implied, or statutory, including, but not limited to, any warranty of merchantability or fitness for a particular purpose or any warranty that the contents of its standards and its quotations and translations are error-free.

In no respect shall ESA and the ECSS members incur any liability for any damages resulting from application of ECSS Standards or JAXA standards containing quotations and translations in whole or in part from ECSS Standards.

免責条項

ここに含まれる情報は、一般的な情報提供のみを目的としている。JAXA は、かかる情報の正確性、有用性又は適時性を含め、明示又は黙示に何ら保証するものではない。また、JAXA は、かかる情報の利用に関連する損害について、何ら責任を負わない。

Disclaimer

The information contained herein is for general informational purposes only. JAXA makes no warranty, express or implied, including as to the accuracy, usefulness or timeliness of any information herein. JAXA shall not be liable for any losses relating to the use of the information.

発行

〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1
宇宙航空研究開発機構 安全・信頼性推進部
JAXA (Japan Aerospace Exploration Agency)

目次

1	適用範囲	1
2	関連文書	1
2.1	適用文書	1
2.2	参考文書	1
3	用語、定義及び略語	2
3.1	他の標準で定義される用語	2
3.2	本標準に特有の用語	2
3.2.1	バイオバーデン	2
3.2.2	微生物多様性	3
3.2.3	嫌気性	3
3.3	略語	3
4	原則	4
5	要求事項	5
5.1	微生物検査試験規定	5
5.1.1	一般規定	5
5.1.2	微生物検査試験法の規定	5
5.1.3	微生物検査試験手順の規定	6
5.2	検証	6
5.3	微生物検査試験の準備及び実施	7
5.3.1	一般	7
5.3.2	微生物検査試験の準備	7
5.3.3	微生物学的試験の実施	7
5.3.4	教育訓練	7
5.4	試験結果の記録及び報告	8
5.4.1	試験記録	8
5.4.2	検査報告	8
5.4.3	受入基準及び不適合	8
付録 A	(規程) 微生物検査に対する要求-DRD	10
A.1	DRD の識別	10
A.1.1	要求事項の識別及び参照文書	10
A.1.2	目的及び対象	10
A.2	要求される内容	10
A.2.1	範囲及び内容	10
A.2.2	特記事項	10

付録 B （規程）微生物検査試験仕様及び手順 - DRD	11
B. 1 DRD の識別	11
B. 1. 1 要求事項の識別及び参照文書	11
B. 1. 2 目的及び対象	11
B. 2 要求される内容	11
B. 2. 1 範囲及び内容	11
B. 2. 2 特記事項	11
付録 C （規程）微生物検査試験報告書 - DRD	12
C. 1 DRD の識別	12
C. 1. 1 要求事項の識別及び参照文書	12
C. 1. 2 目的及び対象	12
C. 2 期待される対応	12
C. 2. 1 対象範囲及び内容	12
C. 2. 2 特記事項	12
付録 D （参考）スワブ検査の手順	13
D. 1 スワブ検査 1（標準スワブ検査）	13
D. 1. 1 一般	13
D. 1. 2 サンプル採取	14
D. 1. 3 運搬及び保管	14
D. 1. 4 抽出	14
D. 1. 5 熱処理	15
D. 1. 6 塗抹	15
D. 1. 7 培養	15
D. 1. 8 計数	15
D. 1. 9 対照	15
D. 1. 10 機器，試薬及び消耗品	16
D. 2 スワブ検査 2	17
D. 2. 1 一般	17
D. 2. 2 サンプル採取	17
D. 2. 3 運搬及び保管	18
D. 2. 4 抽出	18
D. 2. 5 塗抹	18
D. 2. 6 培養	18
D. 2. 7 計数	18
D. 2. 8 対照	19
D. 2. 9 機器，試薬及び消耗品	19

D. 3	スワブ検査 3	20
D. 3. 1	一般	20
D. 3. 2	サンプル採取	20
D. 3. 3	運搬及び保管	21
D. 3. 4	抽出	21
D. 3. 5	塗抹	21
D. 3. 6	培養	21
D. 3. 7	計数	21
D. 3. 8	対照	22
D. 3. 9	機器, 試薬及び消耗品	22
D. 4	スワブ検査 4	23
D. 4. 1	一般	23
D. 4. 2	サンプル採取	23
D. 4. 3	運搬及び保管	24
D. 4. 4	抽出	24
D. 4. 5	塗抹	24
D. 4. 6	培養	24
D. 4. 7	計数	24
D. 4. 8	対照	25
D. 4. 9	機器, 試薬及び消耗品	25
D. 5	スワブ検査 5	26
D. 5. 1	一般	26
D. 5. 2	サンプル採取	26
D. 5. 3	運搬及び保管	27
D. 5. 4	抽出	27
D. 5. 5	塗抹	28
D. 5. 6	培養	28
D. 5. 7	計数	28
D. 5. 8	対照	28
D. 5. 9	機器, 試薬及び消耗品	28
D. 6	スワブ検査 6	30
D. 6. 1	一般	30
D. 6. 1. 1	微生物群集構造の解析	30
D. 6. 1. 2	種レベル同定のための追加解析	30
D. 6. 1. 3	同定結果の判定基準	30
付録 E	(参考) ワイプ検査の手順	31

E.1	ワイプ検査 1 (標準ワイプ検査)	31
E.1.1	一般	31
E.1.2	サンプル採取	32
E.1.3	運搬及び保管	32
E.1.4	抽出	32
E.1.5	熱処理	33
E.1.6	混和培養	33
E.1.7	培養	33
E.1.8	計数	33
E.1.9	対照	33
E.1.10	機器, 試薬及び消耗品	34
E.2	ワイプ検査 2	35
E.2.1	一般	35
E.2.2	サンプル採取	35
E.2.3	運搬及び保管	36
E.2.4	抽出	36
E.2.5	混和培養	36
E.2.6	培養	36
E.2.7	計数	37
E.2.8	対照	37
E.2.9	機器, 試薬及び消耗品	37
E.3	ワイプ検査 3	38
E.3.1	一般	38
E.3.2	サンプル採取	38
E.3.3	運搬及び保管	39
E.3.4	抽出	39
E.3.5	混和培養	39
E.3.6	培養	40
E.3.7	計数	40
E.3.8	対照	40
E.3.9	機器, 試薬及び消耗品	40
E.4	ワイプ検査 4	41
E.4.1	一般	41
E.4.2	サンプル採取	41
E.4.3	運搬及び保管	42
E.4.4	抽出	42

E. 4. 5	混釈培養.....	42
E. 4. 6	培養	43
E. 4. 7	計数	43
E. 4. 8	対照	43
E. 4. 9	機器, 試薬及び消耗品.....	43
E. 5	ワイプ検査 5.....	44
E. 5. 1	一般	44
E. 5. 2	サンプル採取.....	44
E. 5. 3	運搬及び保管.....	45
E. 5. 4	抽出	45
E. 5. 5	塗抹培養.....	46
E. 5. 6	培養	46
E. 5. 7	計数	46
E. 5. 8	対照	46
E. 5. 9	機器, 試薬及び消耗品.....	47
E. 6	ワイプ検査 6.....	48
E. 6. 1	一般	48
E. 6. 1. 1	微生物群集構造の解析.....	48
E. 6. 1. 2	種レベル同定のための追加解析.....	48
E. 6. 1. 3	同定結果の判定基準.....	48
付録 F (参考)	スタンプ培地 (コンタクトプレート) 法手順	49
F. 1	スタンプ培地法.....	49
F. 1. 1	一般	49
F. 1. 2	サンプル採取.....	49
F. 1. 3	運搬及び保管.....	49
F. 1. 4	培養	49
F. 1. 5	計数	49
F. 1. 6	対照	50
F. 1. 7	機器, 試薬及び消耗品.....	50
付録 G (参考)	エアサンプリングの手順	51
G. 1	エアサンプリング検査法.....	51
G. 1. 1	一般	51
G. 1. 2	サンプル採取.....	51
G. 1. 3	運搬及び保管.....	51
G. 1. 4	培養	51
G. 1. 5	計数	51

G. 1. 6 対照	52
G. 1. 7 器具・機器, 試薬及び消耗品.....	52
G. 2 エアサンプリング検査法 2	53
G. 2. 1 一般	53
G. 2. 2 サンプル採取.....	53
G. 2. 3 運搬及び保管.....	53
G. 2. 4 培養	53
G. 2. 5 計数	53
G. 2. 6 対照	54
G. 2. 7 器具・機器, 試薬及び消耗品.....	54
添付 : ECSS の引用	55

1 適用範囲

本ハンドブックでは、フライト機器の表面及び微生物学的に管理された環境（例として、クリーンルーム表面、クリーンルーム空気、除染システム）における定量的及び／又は定性的微生物検査試験（以下、試験という。）の手順を定める。

下記の試験方法に関して記載する。

- ・ スワブ、ワイプ、スタンプ培地及びエアサンプラーを使用した表面及び空気サンプリング法と、その後の培養によるバイオバーデンの決定を目的とした微生物汚染の検出
- ・ スワブ及びワイプによる拭き取り法で得られた試料を用いた DNA 分析による、難培養性微生物による汚染の検出

本ハンドブックに記載される試験法は、惑星保護に関する制約が適用される、すべての有人・無人宇宙機、発射装置、搭載物、実験機器、地上支援機器及びクリーンルームにおける微生物汚染の管理に適用される。

本ハンドブックは、分子レベルでの汚染管理には言及しない。

本ハンドブックは、清浄度管理されている（粒子汚染に関する制約がある）クリーンルーム及び関連する管理された環境を管理するための原則や基本的な方法論には言及しない。

本ハンドブックは、ECSS-S-ST-00 (ECSS system - Description, implementation and general requirements) 又は JMR-000 (共通技術文書の定義及び管理) に従い、宇宙プロジェクトの特定の要求や制約に合わせてテーラリングしてよい。

2 関連文書

2.1 適用文書

下記の適用文書は、本ハンドブックに規定する範囲内において本ハンドブックの一部を成す。日付のある適用文書については、これらのいずれに対してもその後の修正あるいは改訂は適用されない。しかし、本ハンドブックに基づく合意をした当事者は、下記適用文書の最新版を適用する可能性について検討することが推奨される。日付のない参照については、参照される適用文書の最新版が適用される。

JMR-005	品質保証プログラム標準
JMR-010	コンタミネーション管理基準
JMR-014	惑星等保護プログラム標準

2.2 参考文書

ECSS-S-ST-00-01	ECSS system - Glossary of terms
ECSS-Q-ST-10-09	Space product assurance - Nonconformance control system

ECSS-Q-ST-20	Space product assurance - Quality assurance
ECSS-Q-ST-20-07	Quality and safety assurance for space test centres
ECSS-Q-ST-70-01	Space product assurance - Cleanliness and contamination control
ECSS-S-ST-00	ECSS system - Description, implementation and general requirements
ECSS-Q-ST-70-53	Space product assurance - Materials and hardware compatibility tests for sterilization processes
ECSS-Q-ST-70-58	Space product assurance - Bioburden control of cleanrooms
ECSS-Q-ST-70-71	Space product assurance - Data for selection of space materials and processes
ASTM D 1193	Standard Specification for Reagent Water
IEST-RP-CC023.2	Microorganisms in Cleanrooms
ISO 14644-1	Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1: Classification of air cleanliness
ISO 14644-2	Cleanrooms and associated controlled environments - Part 2: Specifications for testing and monitoring to prove continued compliance with ISO 14644-1
ISO 14698-1	Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control - Part 1: General principles and methods
ISO 14698-2	Cleanrooms and associated controlled environments - Biocontamination control - Part 2: Evaluation and interpretation of biocontamination data
NASA/SP-20240016475	NASA Planetary Protection Handbook
NASA-HDBK-6022	Handbook for the Microbial Examination of Space Hardware
Ref. Ares (2019) 1305492 - 26/02/2019	The International Planetary Protection Handbook
日本薬局方	
WHO Laboratory Biosafety Manual	

3 用語、定義及び略語

3.1 他の標準で定義される用語

本標準では、JMR-014 で使用されている用語とその定義を適用する。

3.2 本標準に特有の用語

3.2.1 バイオバーデン

規定の試験法により測定された生存する微生物の量

3.2.2 微生物多様性

規定の試験法により同定された微生物種の多様性

3.2.3 嫌気性

≤ 40 ppm O₂の気体

3.3 略語

本ハンドブックにおいては、JMR-014に記載のある略語及び次のものを適用する.

ANI	平均ヌクレオチド同一性
ASTM	米国材料試験協会
DNA	デオキシリボ核酸
DNase	デオキシリボヌクラーゼ
DRD	文書要求定義 (Document Requirement Definition)
IAST	環境科学技術研究所
IPA	イソプロピルアルコール
ISO	国際標準化機構
ITS	内部転写スペーサー領域
MLSA	多座位配列解析法
MLST	多座位配列型別法
NCBI	アメリカ国立生物工学情報センター
NGS	次世代塩基配列シーケンシング
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PDA	ポテトデキストロース寒天
R2A	低栄養寒天
RDP	リボソームデータベースプロジェクト
rDNA	リボソーム DNA
RNase	リボヌクレアーゼ
S	スベドベリ単位
SILVA	SILVA リボソーム RNA 遺伝子データベースプロジェクト
TGA	チオグリコレート寒天
TSA	トリプチケース・ソイ寒天
WGS	全ゲノムシーケンス
WHO	世界保健機関

4 原則

微生物学的検査に関する要求事項, 仕様, 手順及び報告に関連するプロセスを図 4-1 に示す.
 なお, これらに関連する要求事項は, 第 5 章に規定されている.

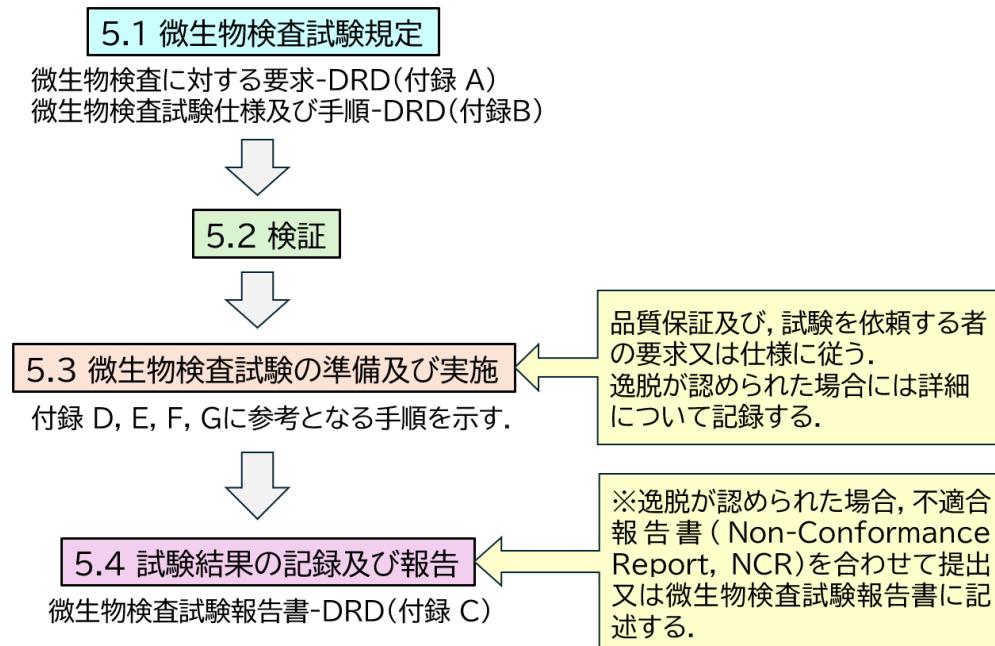


図 4-1: 微生物検査プロセスの概要

5.1 項に微生物検査試験について規定する.

5.2 項には検証について, 5.3 項及び 5.4 項は, 微生物検査の準備, 実施, 記録及び報告に対する要求事項について規定する.

バイオバーデンの測定法は, 全体的なバイオバーデンの量を把握するために用いられるが, サンプル中に含まれるすべての微生物を一般的に評価するものではない.

5 要求事項

5.1 微生物検査試験規定

5.1.1 一般規定

- a. 試験を依頼する者（例：プロジェクト）は、付録 A の DRD に従い微生物検査要求書を提出するものとする。
- b. 微生物検査の要求において、JMR-005 又は ECSS-Q-ST-20 を適用するものとする。
- c. 微生物検査の要求において、JMR-005 又は ECSS-Q-ST-10-09 を適用するものとする。
- d. 試験施設は、JMR-005 の要求事項又は ECSS-Q-ST-20-07 に規定される「安全及びセキュリティ」に関する要求事項に従って運用するものとする。

注記：安全上の問題の例として、危険及び健康被害が挙げられる。

セキュリティ上の問題の例としては、アクセス管理が挙げられる。

- e. 宇宙機ハードウェアに対しては、JMR-010 又は ECSS-Q-ST-70-01 に従い、清浄度及び汚染管理の要求に従うこと。
- f. 試験の実施責任者は、付録 B の DRD に従い、微生物検査計画書を提出するものとする。

注記 1：試験が実施される施設（例として、微生物学試験室）の品質基準は、ISO 17025 に従うことが望ましい。

注記 2：ミッションの目的により、特定の化学的特性を避けるなど具体的な要求が追加されることがある。

5.1.2 微生物検査試験法の規定

5.1.2.1 施設

- a. 作業区域は、機構又は WHO の規則及びガイドラインに従うものとする。
- b. 作業区域及び作業プロセスの環境条件は、特に規定記載がない限り、温度 22 ± 3 °C、相対湿度 45 ± 15 %とする。

5.1.2.2 機器、試薬及び消耗品

- a. 試験の実施責任者は、承認された試験手順を整備し、運用するために必要な機器、試薬、及び消耗品を識別し、リスト化するものとする。

注記：付録 D から付録 G で提案される試験手順を実施する場合、試験の実施責任者は対応する機器、試薬及び消耗品の仕様をリストに記載するものとする。

5.1.3 微生物検査試験手順の規定

5.1.3.1 試験手順

- a. 滅菌したスワブ又はワイプを使用する。サンプリング対象表面に触れたスワブ先端部を、手で触れることなく、容易に分離できるスワブの使用を推奨する。
- b. スワブ 1 本で拭き取る最大表面積は 25 cm² とする。ワイプ 1 枚で拭き取る最大表面積は 1 m² とする。

注記：表面積が最大表面積を超えるエリアからサンプルを採取する場合、複数のスワブ及びワイプを使用してもよい。

- c. バイオバーデンは、中温性好気性細菌及び芽胞を定量的に測定する手法により決定すること。

注記 1：付録 D.1 及び D.2（標準スワブ検査）、E.1 及び E.2（標準ワイプ検査）に例となる手順を示す。

注記 2：これらのサンプリング方法は、水分を含んだスワブやワイプによる拭き取りを許容できる材料や、その複合材に対してのみ適用できる（例：電気化学的適合性、ECSS-Q-ST-70-71 参照）。

- d. 生物多様性は、微生物の種類を特定するための手法によって評価すること。

注記 1：付録 D.2 から D.5（スワブ検査 2 から 5）及び付録 E.2 から E.5（ワイプ検査 2 から 5）に例となる手順を示す。

注記 2：培養が困難又は不可能な微生物（細菌、アーキア（古細菌）、真菌）を含む微生物群集の構成及び多様性を評価する場合には、追加して非培養法による分子生物学的手法による分析が用いられる。付録 D.6（スワブ検査 6）及び付録 E.6（ワイプ検査 6）にガイドラインを示す。

注記 3：これらのサンプリング方法は、水分を含んだスワブやワイプによる拭き取りを許容できる材料や、その複合材に対してのみ適用できる（例：電気化学的適合性、ECSS-Q-ST-70-71 参照）。

注記 4：クリーンルームの管理においては、付録 F（スタンプ培地（コンタクトプレート）法）及び付録 G（エアサンプリング法）に示すように、スタンプ培地法及びエアサンプリング法も適用できる。

- e. エアサンプリング法により、クリーンルームの清浄度を連続的にモニタリングすること。

5.2 検証

試験手順は、試験を依頼する者の要求又は仕様に従って検証されねばならない。

注記：この検証には、絶対的なバイオバーデ数を与える補正係数を設定するために、サンプリング及び分析方法の相対的又は絶対的な効率の評価が含まれる場合がある。

5.3 微生物検査試験の準備及び実施

5.3.1 一般

- a. 試験の実施責任者は微生物検査試験計画書を提出し、検査を依頼した者の承認を得るものとする。
- b. 微生物検査試験計画書には、試験手順を記載するものとする。
- c. 試験手順の作成において、JMR-005 又は ECSS-Q-ST-20 を適用するものとする。

5.3.2 微生物検査試験の準備

5.3.2.1 試験の管理

- a. 試験を実施した場所は、追跡性を確保するため、適切な詳細情報を付して明確に記録しなければならない。
注記：例として、微生物検査試験計画書に記載するなど。
- b. 試験は、少なくとも以下の情報を明示しなければならない。
 - 1. 試験の実施日及び時刻
 - 2. 試験の実施者
 - 3. 試験実施場所を追跡できる参照情報
 - 4. 試験の種類
 - 5. 試験区域又は採取した空気量
 - 6. 試料の保管条件

5.3.2.2 試薬及び消耗品の準備、取扱い及び保管

- a. GLP (good laboratory practice) の規則及びガイドラインに従うものとする。

5.3.3 微生物学的試験の実施

- a. 試験の実施責任者は、付録 B に規定する DRD の要求事項に適合するよう、承認済みの微生物検査試験手順に従って試験を実施しなければならない。

注記 1：付録 D から付録 G に承認された微生物検査手順の例となる手順を示す。

注記 2：無菌操作及び試料の処理は、ISO 14644-1 に規定される粒子清浄度クラス ISO クラス 5 を満たす層流環境（ラミナフロー環境）において実施すること。

5.3.4 教育訓練

- a. フライト機器及びクリーンルームの微生物検査を実施する者は、実施前に微生物学の教育訓練を受けなければならない。

注記：教育訓練のガイドラインとして、ISO 14698 第 1 部、付録 G を参照すること。

5.4 試験結果の記録及び報告

5.4.1 試験記録

- a. 微生物検査の試験記録は、最低 10 年間、あるいは微生物検査を依頼する者の要求する期間、保管しなければならない。
- b. 品質記録には、少なくとも以下の項目を含めるものとする。
 1. 試験の実施日及び時刻
 2. 試験の実施者
 3. 試験の種類及び試験手順
 4. 試験に関する追跡可能な詳細情報
注記：例として、試験場所、領域、採取空気量など。
 5. 試料の保管条件
注記：例として、採取後の包装時温度、輸送時間、試験開始時の温度など。
 6. 試験に使用した機器の詳細
 7. 採取、輸送、又は試験中に異常が発生した場合には、それらの所見
 8. 微生物検査結果の報告書
注記：微生物検査を依頼する者の要求に応じて、バイオバーデンの算出には補正係数を適用する場合がある（5.2 参照）。
- c. 微生物検査の試験記録は、以下に示す文書により構成するものとする。
 1. 付録 A の DRD に適合した微生物検査要求書
 2. 付録 B の DRD に適合した微生物検査試験計画書
 3. 付録 C の DRD に適合した微生物検査報告書
 4. プロジェクトの要求事項（受入基準）への適合性及び関連する不適合事項に関する結論

5.4.2 検査報告

- a. 試験の実施責任者は、付録 C に示す DRD 及び ECSS-Q-ST-20 に規定される「試験報告書」に関する要求事項又は JMR-005 の要求事項に適合した微生物検査報告書を作成しなければならない。
- b. 試験の実施責任者は、作成した試験報告書を微生物検査を依頼する者に提出し、承認を受けなければならない。

5.4.3 受入基準及び不適合

- a. 受入基準は、試験責任部門又は試験の実施責任者と微生物検査を依頼する者との合意に基づき、あらかじめ定義しなければならない。
- b. 機器の故障が疑われる場合、又は実際に故障が発生した場合には、過去の試験結果を再確認し、再検査又は再試験の可否を判断できるよう、全て不適合報告書に記録して

おかねばならない。

- c. 検査手順書には、ECSS-Q-ST-10-09 に記載された不適合処理フローチャートを、当該試験に適用又は必要に応じて修正した形で組み込むものとする。

注記：研究開発活動の範囲においては、この限りではない。

- d. 試験の実施責任者は、不適合の詳細について微生物検査を依頼する者に通知しなければならない。
- e. 試験品の受入検査から最終的な試験結果の算出に至るまでの全工程において、試験に使用した機器及び作業に従事した人員の詳細を含め、追跡できるよう維持しなければならない。
- f. その他の特性の評価は、微生物検査を依頼する者の要求により実施される場合がある。

付録 A（規程）微生物検査に対する要求-DRD**A.1 DRD の識別****A.1.1 要求事項の識別及び参照文書**

本 DRD は、JERG-0-057-HB004 の要求事項 5.1.1a に基づくものである。

A.1.2 目的及び対象

本要求の目的は、フライト機器の表面及び微生物学的に管理された環境（例として、クリーンルームの表面、クリーンルームの空気、除染システム）を対象とし、定量的及び／又は定性的に微生物検査を実施することである。

A.2 要求される内容**A.2.1 範囲及び内容**

- a. 微生物検査要求書は、少なくとも以下の情報を含む、又は参照するものとする。
 - 1. 試験の目的
 - 2. 試験の背景及び根拠
 - 3. 調査対象となるフライト機器又はクリーンルーム施設の識別（休止状態及び運用状態における環境管理を含む）
 - 4. 試験の説明
 - 5. 成果物
 - 6. 試験が実施される施設（例として、微生物学試験室）に適用される品質基準

A.2.2 特記事項

なし

付録 B（規程）微生物検査試験仕様及び手順 - DRD**B.1 DRD の識別****B.1.1 要求事項の識別及び参照文書**

本 DRD は、JERG-0-057-HB004 の要求事項 5.1.1f に基づくものである。

B.1.2 目的及び対象

微生物検査試験計画書は、微生物検査に関する試験を定義する文書である。微生物検査試験計画書は試験の実施責任者によって作成され、微生物検査を依頼する者に提出して審査及び承認を受けるものとする。

B.2 要求される内容**B.2.1 範囲及び内容**

- a. 微生物検査試験計画書は、少なくとも以下の情報を含むか、又は参照するものとする。
 1. 試験計画概要
 - (a) 試験の目的
 - (b) 試験が実施される施設（例として、微生物学試験室）に適用される品質基準
 - (c) 試験手順及び参照される標準（関連する出典を含む）
 - (d) 調査対象となるフライト機器又はクリーンルーム施設の識別（休止状態及び運用状態における環境管理を含む）
 - (e) 試験条件（環境、評価対象の特性、測定手法を含む）
 - (f) 期待される試験の成果
 - (g) 検証プロトコル
 2. 試験手順及び微生物検査を依頼する者が当初要求した条件からの逸脱事項を明確に記述した実施案
 3. 財務及び管理に関する提案
 - (a) 試験の実施責任者
 - (b) 成果物目録
 - (c) 試料準備、試験、結果評価及び報告作成などの必要な作業と、その責任分担の定義
 - (d) 試験スケジュール
 - (e) 項目別の費用内訳

B.2.2 特記事項

なし

付録 C（規程）微生物検査試験報告書 - DRD

C.1 DRD の識別

C.1.1 要求事項の識別及び参照文書

本 DRD は、JERG-0-057-HB004 の要求事項 5.4.2a に基づくものである。

C.1.2 目的及び対象

微生物検査試験報告書の目的は、サンプリングされた表面又はクリーンルーム内の空気における微生物汚染の定量的及び／又は定性的な証拠を提供することである。

C.2 期待される対応

C.2.1 対象範囲及び内容

微生物検査試験報告書は、少なくとも以下の情報を含むか、又は参照するものとする。

1. 文書の作成目的、対象、内容及び作成に至った理由の説明
2. サンプリング対象となったフライトハードウェア又は微生物学的に管理された環境の説明、又はそれらの識別特性を記載した文書への参照。

注記：例として、「微生物検査依頼書（DRD）」など。

3. 試験が実施される施設（例として、微生物学試験室）に適用される品質基準
4. 検証プロトコル
5. 校正に用いた機器
6. 微生物検査試験手順の記述、又はその手順を記載した文書への参照

注記：例として、「微生物試験仕様及び手順 DRD」など。一般に、この内容には実施時の試験手順の記述及び初期手順からの逸脱内容（及びその影響に関する検討）を含む。

7. 試験結果
8. 統計解析
9. 試験結果に関する考察
10. 結論及び提言

C.2.2 特記事項

なし

付録 D（参考）スワブ検査の手順

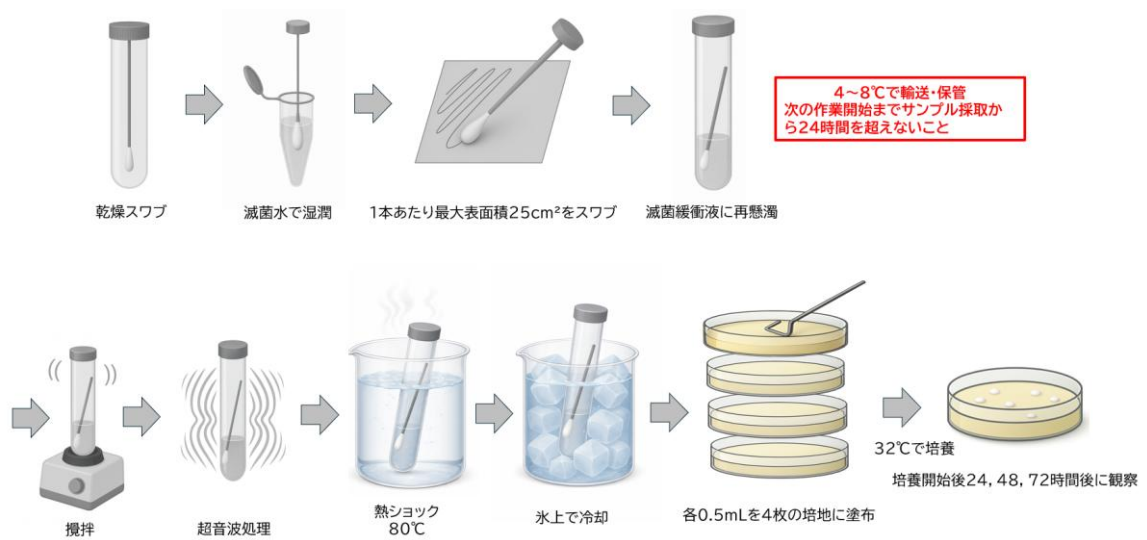
対象とする微生物の性質に応じた培養による 5 つのスワブ検査手順を示す。

- D.1 スワブ検査 1：中温性好気性細菌及び芽胞（標準スワブ検査）
- D.2 スワブ検査 2：中温性好気性細菌
- D.3 スワブ検査 3：低温性／耐冷好気性細菌
- D.4 スワブ検査 4：中温性好気性菌類（酵母，かび）
- D.5 スワブ検査 5：中温性嫌気性細菌
- D.6 スワブ検査 6：分子生物学的手法に基づく群集構造解析

D.1 スワブ検査 1（標準スワブ検査）

D.1.1 一般

本検査法により，80℃，15 分間の熱処理に耐えることができる中温性好気性細菌及び芽胞を検出する．スワブ検査 1（標準スワブ法）のフローチャートを図 D-1.1 に模式的に示す。



※ 本フローチャートはChatGPT(OpenAI)を用いて作成した。

図 D-1.1: スワブ検査 1（標準スワブ検査）のフローチャート

D.1.2 サンプル採取

すべてのスワブ試料及び対照試料の採取に備えて、十分な数の滅菌スワブと、ASTM Type IIB (ASTM D1193) 又は日本薬局方精製水相当の滅菌水（以下、滅菌水という。）を入れたチューブを準備する。手袋を着用し、適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する。無菌操作により、滅菌スワブを容器から取り出し、その先端を滅菌水を入れたチューブ内で湿らせる。その後、スワブを試験管の内壁に軽く押し当て、余分な水分を除去する。

スワブを試料採取面に対しておよそ 30° の角度で保持する。スワブを一定方向に動かしながら、スワブ先端を回転させつつ、最大 25 cm² の測定面積全体を均一に拭き取る。次に、スワブの動かす方向を 90° 変えて、同様に全面を拭き取る。さらに、スワブの動かす方向を 135° 変えて、3 回目の拭き取りを行い、全面のサンプリングを完了する（図 D-1.2）。

採取後、スワブ先端を滅菌した 2.5 mL の PBS + 0.02 v/v % Tween 80 (pH 7.2)（以下、緩衝液という。）が入ったサンプルチューブに挿入し、スワブ軸を破断点で折って試験管内に収める。

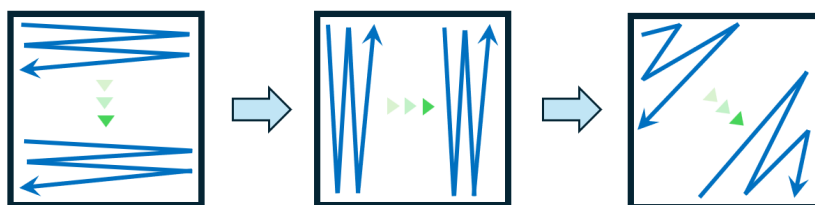


図 D-1.2: スワブ検査 1（標準スワブ検査）における拭き取り手順

D.1.3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと。

D.1.4 抽出

緩衝液及びスワブを含む各サンプルチューブをボルテックスミキサーにセットし、最大出力で 5～6 秒間攪拌する。

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し、サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ、120 ± 5 秒間、超音波処理を行う。洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること、及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること。

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい。ただし、40 kHz を上限として使用してよい。

D.1.5 熱処理

ボルテックス処理した懸濁液及びスワブを含むサンプルチューブを $80 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水浴に浸し、規定温度に達した後 15 分間保持する。パイロットチューブに温度計を挿入して水温を確認し、水浴の水位は試験管内液面より高く保つこと。

熱処理後は速やかに冷却し、温度を ($30\sim 35^{\circ}\text{C}$) まで下げる。培地への塗布操作までに 10 分以上要する場合は氷浴に保持してもよいが、その保持時間は 45 分以内に留めるべきである。

D.1.6 塗抹

スワブ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し、無菌操作により 0.5 mL ずつを TSA 又は R2A 培地プレート表面に分注する。合計 2 mL を使用する。滅菌スプレッダーを用いて培地表面に均一に広げ、培養前に水分が十分吸収されるまで静置すること。

D.1.7 培養

シャーレの蓋側を下にして、 $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで培養すること。

D.1.8 計数

試料プレートは、培養開始後 24 時間及び 48 時間の時点で観察すること。肉眼でコロニーが確認された場合は、その数を計数し、データを記録すること。最終的なコロニー数は培養 72 時間後に確認し、記録すること。72 時間後の最終計数が完了するまでは、シャーレの蓋を外さないこと。

D.1.9 対照

10 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも 1 本のフィールド（採取環境）陰性対照を採取し、1 日に少なくとも 3 本を確保すること。滅菌スワブを容器から取り出し、滅菌水で湿らせた後、空気中で 2～4 秒間振り、滅菌緩衝液を含む試験管に戻す。

なお実験室では、少なくとも 2 本のラボ陰性対照を作成すること。滅菌スワブ先端を滅菌水で湿らせ、空気に曝露することなく滅菌緩衝液を含む試験管に戻すこと。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

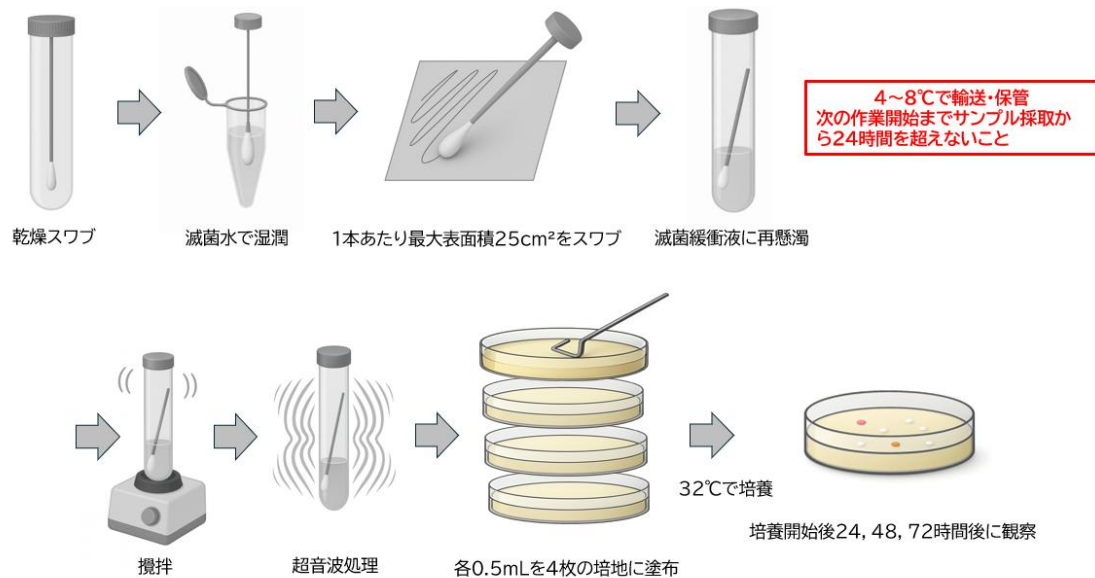
D.1.10 機器、試薬及び消耗品

- ・ 手袋（パウダーフリー）
- ・ 乾燥した滅菌スワブ
- ・ スワブを湿らせるための ASTM Type IIB (ASTM D1193) 又は日本薬局方精製水相当の滅菌水を入れたチューブ
- ・ 滅菌緩衝液 (PBS + 0.02 v/v % Tween 80, pH 7.2) 2.5 mL を入れたチューブ
- ・ ガラスチューブ（オプション）
- ・ 冷蔵庫 (4~8℃)
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ 恒温水槽 (80 ± 2℃)
- ・ 氷槽
- ・ 温度計
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌コンラージ棒
- ・ TSA 又は R2A 培地（直径 90 mm）
- ・ インキュベーター (32 ± 1℃)

D.2 スワブ検査 2

D.2.1 一般

本検査法により中温性好気性細菌を検出する。スワブ検査 2 のフローチャートを図 D-2.1 に模式的に示す。



※ 本フローチャートはChatGPT(OpenAI)を用いて作成した。

図 D-2.1: スワブ検査 2 のフローチャート

D.2.2 サンプル採取

すべてのスワブ試料及び対照試料の採取に備えて、十分な数の滅菌スワブと、滅菌水を入れたチューブを準備する。手袋を着用し、適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する。

無菌操作により、滅菌スワブを容器から取り出し、その先端を滅菌水を入れたチューブ内で湿らせる。その後、スワブを試験管の内壁に軽く押し当て、余分な水分を除去する。

スワブを試料採取面に対しておよそ 30° の角度で保持する。スワブを一定方向に動かしながら、スワブ先端を回転させつつ、最大 25 cm² の測定面積全体を均一に拭き取る。次に、スワブの動かす方向を 90° 変えて、同様に全面を拭き取る。さらに、スワブの動かす方向を 135° 変えて、3 回目の拭き取りを行い、全面のサンプリングを完了する (図 D-2.2)。

採取後、スワブ先端を 2.5 mL の滅菌緩衝液が入ったサンプルチューブに挿入し、スワブ軸を破断点で折って試験管内に収める。

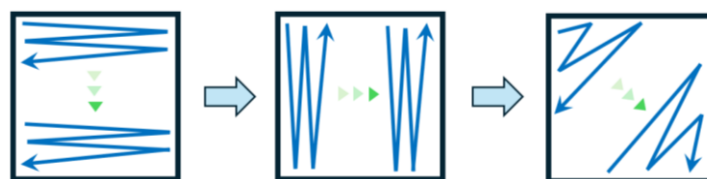


図 D-2. 2: スワブ検査 2 における拭き取り手順

D. 2. 3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し，4～8℃で保管する．サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと．

D. 2. 4 抽出

緩衝液及びスワブを含む各サンプルチューブをボルテックスミキサーにセットし，最大出力で 5～6 秒間攪拌する．

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し，サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ，120 ± 5 秒間，超音波処理を行う．洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること，及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること．

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい．ただし，40 kHz を上限として使用してよい．

注記：熱処理を行ってはならない．

D. 2. 5 塗抹

スワブ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し，無菌操作により 0.5 mL ずつを TSA 又は R2A 培地プレート表面に分注する．合計 2 mL を使用する．滅菌スプレッダーを用いて培地表面に均一に広げ，培養前に水分が十分吸収されるまで静置すること．

D. 2. 6 培養

シャーレの蓋側を下にして，32 ± 1℃のインキュベーターで培養すること．

D. 2. 7 計数

24 時間及び 48 時間後に寒天培地を検査する．視認できるコロニーが観察される場合，計数しデータを記録する．72 時間時点で最終的なコロニー数を検査し記録する．72 時間時点の最終的な計数を実施するまでシャーレの蓋は開けないでよく．シャーレの写真を残しておくと，コロニーの多様性判定に有用である．必要であれば，同定及び微生物アーカイブの前に，画線培養により単一コロニーを得る．

D.2.8 対照

10 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに，少なくとも1本のフィールド（採取環境）陰性対照を採取し，1日に少なくとも3本を確保すること．滅菌スワブを容器から取り出し，滅菌水で湿らせた後，空気中で2～4秒間振り，滅菌緩衝液を含む試験管に戻す．

なお実験室では，少なくとも2本のラボ陰性対照を作成すること．滅菌スワブ先端を滅菌水で湿らせ，空気に曝露することなく滅菌緩衝液を含む試験管に戻すこと．

これらの対照は，拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること．

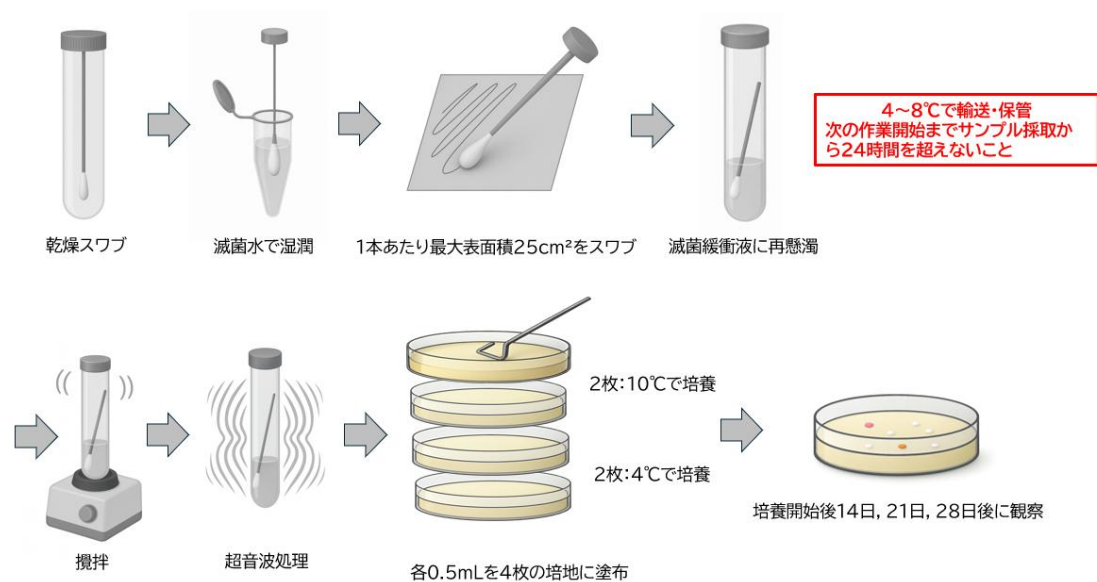
D.2.9 機器，試薬及び消耗品

- ・ 手袋（パウダーフリー）
- ・ 乾燥した滅菌スワブ
- ・ スワブを湿らせるための滅菌水を入れたチューブ
- ・ 滅菌緩衝液 2.5 mL を入れたチューブ
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌コンラージ棒
- ・ TSA 又は R2A 培地（直径 90 mm）
- ・ インキュベーター（32 ± 1℃）

D.3 スワブ検査 3

D.3.1 一般

本検査法により，低温性／耐冷好気性細菌を検出する．スワブ検査 3 のフローチャートを図 D-3.1 に模式的に示す．



※ 本フローチャートはChatGPT (OpenAI) を用いて作成した。

図 D-3.1: スワブ検査 3 のフローチャート

D.3.2 サンプル採取

すべてのスワブ試料及び対照試料の採取に備えて，十分な数の滅菌スワブと，滅菌水を入れたチューブを準備する．手袋を着用し，適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する．

無菌操作により，滅菌スワブを容器から取り出し，その先端を滅菌水を入れたチューブ内で湿らせる．その後，スワブを試験管の内壁に軽く押し当て，余分な水分を除去する．

スワブを試料採取面に対しておよそ 30° の角度で保持する．スワブを一定方向に動かしながら，スワブ先端を回転させつつ，最大 25 cm² の測定面積全体を均一に拭き取る．次に，スワブの動かす方向を 90° 変えて，同様に全面を拭き取る．さらに，スワブの動かす方向を 135° 変えて，3 回目の拭き取りを行い，全面のサンプリングを完了する（図 D-3.2）．

採取後，スワブ先端を 2.5 mL の滅菌緩衝液が入ったサンプルチューブに挿入し，スワブ軸を破断点で折って試験管内に収める．

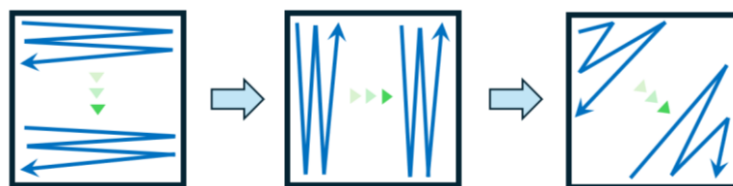


図 D-3. 2: スワブ検査 3 における拭き取り手順

D. 3. 3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し，4～8℃で保管する．サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと．

D. 3. 4 抽出

緩衝液及びスワブを含む各サンプルチューブをボルテックスミキサーにセットし，最大出力で 5～6 秒間攪拌する．

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し，サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ，120 ± 5 秒間，超音波処理を行う．洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること，及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること．

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい．ただし，40 kHz を上限として使用してよい．

注記：熱処理を行ってはいらない．

D. 3. 5 塗抹

スワブ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し，無菌操作により 0.5 mL ずつを TSA 又は R2A 培地プレート表面に分注する．合計 2 mL を使用する．滅菌スプレッダーを用いて培地表面に均一に広げ，培養前に水分が十分吸収されるまで静置すること．

D. 3. 6 培養

シャーレの蓋側を下にして，2 つは 10 ± 1℃，他の 2 つは 4 ± 1℃で培養するとよい．

D. 3. 7 計数

14 日及び 21 日後に寒天培地を検査する．視認できるコロニーが観察される場合，計数しデータを記録する．28 日時点で最終的なコロニー数を検査し記録する．28 日時点の最終的な計数を実施するまでシャーレの蓋は開けないでおく．シャーレの写真を残しておくと，コロニーの多様性判定に有用である．必要であれば，同定及び微生物アーカイブの前に，画線培養により単一コロニーを得る．

D.3.8 対照

10 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに，少なくとも1本のフィールド（採取環境）陰性対照を採取し，1日に少なくとも3本を確保すること．滅菌スワブを容器から取り出し，滅菌水で湿らせた後，空気中で2～4秒間振り，滅菌緩衝液を含む試験管に戻す．

なお実験室では，少なくとも2本のラボ陰性対照を作成すること．滅菌スワブ先端を滅菌水で湿らせ，空気に曝露することなく滅菌緩衝液を含む試験管に戻すこと．

これらの対照は，拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること．

D.3.9 機器，試薬及び消耗品

- ・ 手袋（パウダーフリー）
- ・ 乾燥した滅菌スワブ
- ・ スワブを湿らせるための滅菌水を入れたチューブ
- ・ 滅菌緩衝液 2.5 mL を入れたチューブ
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌コンラージ棒
- ・ TSA 又は R2A 培地（直径 90 mm）
- ・ インキュベーター（10±1 °C）
- ・ インキュベーター（4 ± 1 °C）

D.4 スワブ検査 4

D.4.1 一般

本検査法により，中温性好気性菌類，つまり酵母やかびを検出する．スワブ検査 4 のフローチャートを図 D-4.1 に模式的に示す．

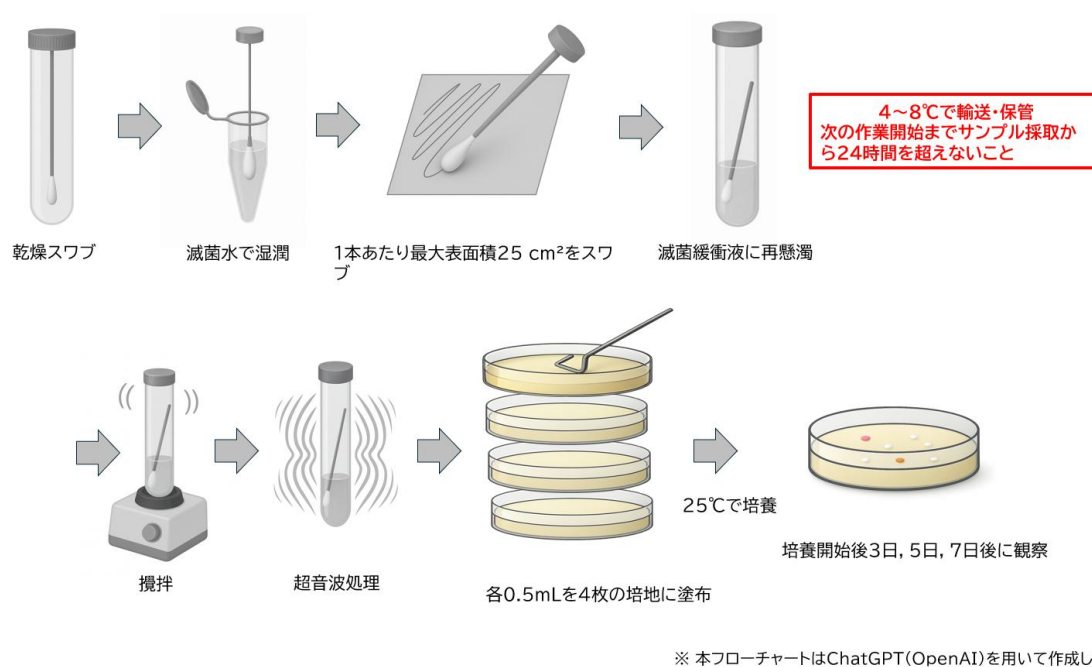


図 D-4.1: スワブ検査 4 のフローチャート

D.4.2 サンプル採取

すべてのスワブ試料及び対照試料の採取に備えて，十分な数の滅菌スワブと，滅菌水を入れたチューブを準備する．手袋を着用し，適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する．

無菌操作により，滅菌スワブを容器から取り出し，その先端を滅菌水を入れたチューブ内で湿らせる．その後，スワブを試験管の内壁に軽く押し当て，余分な水分を除去する．

スワブを試料採取面に対しておよそ 30° の角度で保持する．スワブを一定方向に動かしながら，スワブ先端を回転させつつ，最大 25 cm² の測定面積全体を均一に拭き取る．次に，スワブの動かす方向を 90° 変えて，同様に全面を拭き取る．さらに，スワブの動かす方向を 135° 変えて，3 回目の拭き取りを行い，全面のサンプリングを完了する（図 D-4.2）．

採取後，スワブ先端を 2.5 mL の滅菌緩衝液が入ったサンプルチューブに挿入し，スワブ軸を破断点で折って試験管内に収める．

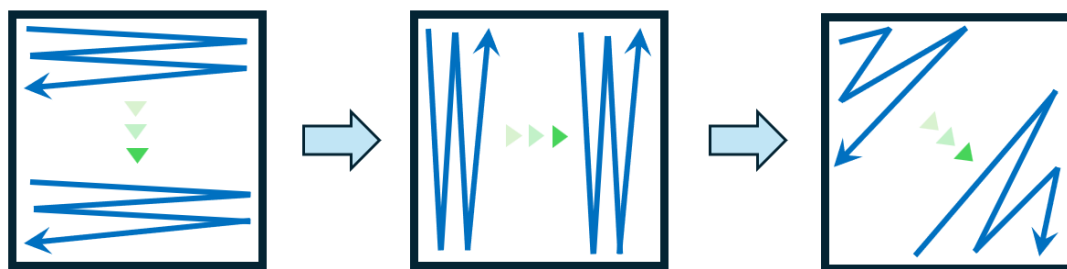


図 D-4. 2: スワブ検査 4 における拭き取り手順

D. 4. 3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し，4～8℃で保管する．サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと．

D. 4. 4 抽出

緩衝液及びスワブを含む各サンプルチューブをボルテックスミキサーにセットし，最大出力で 5～6 秒間攪拌する．

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し，サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ，120 ± 5 秒間，超音波処理を行う．洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること，及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること．

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい．ただし，40 kHz を上限として使用してよい．

注記：熱処理を行ってはならない．

D. 4. 5 塗抹

スワブ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し，無菌操作により 0.5 mL ずつをクロラムフェニコールを添加した PDA 培地プレート表面に分注する．合計 2 mL を使用する．滅菌スプレッダーを用いて培地表面に均一に広げ，培養前に水分が十分吸収されるまで静置すること．

D. 4. 6 培養

シャーレの蓋側を下にして，25 ± 1℃で培養する．

D. 4. 7 計数

3 日，5 日，7 日後に寒天培地を検査する．視認できるコロニーが観察される場合，計数しデータを記録する．7 日時点で最終的なコロニー数を検査し記録する．7 日時点の最終的な計数

を実施するまでシャーレの蓋は開けないでおく。シャーレの写真を残しておくと、コロニーの多様性判定に有用である。必要であれば、同定及び微生物アーカイブの前に、画線培養により単一コロニーを得る。

D.4.8 対照

10 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも1本のフィールド（採取環境）陰性対照を採取し、1日に少なくとも3本を確保すること。滅菌スワブを容器から取り出し、滅菌水で湿らせた後、空気中で2～4秒間振り、滅菌緩衝液を含む試験管に戻す。

なお実験室では、少なくとも2本のラボ陰性対照を作成すること。滅菌スワブ先端を滅菌水で湿らせ、空気に曝露することなく滅菌緩衝液を含む試験管に戻すこと。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

D.4.9 機器、試薬及び消耗品

- ・ 手袋（パウダーフリー）
- ・ 乾燥した滅菌スワブ
- ・ スワブを湿らせるための滅菌水を入れたチューブ
- ・ 滅菌緩衝液 2.5 mL を入れたチューブ
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌コンラージ棒
- ・ クロラムフェニコールを添加した PDA 培地（直径 90 mm）
- ・ インキュベーター（25±1℃）

D.5 スワブ検査 5

D.5.1 一般

本検査法により，中温性嫌気性細菌を検出する．スワブ検査 5 のフローチャートを図 D-5.1 に模式的に示す．

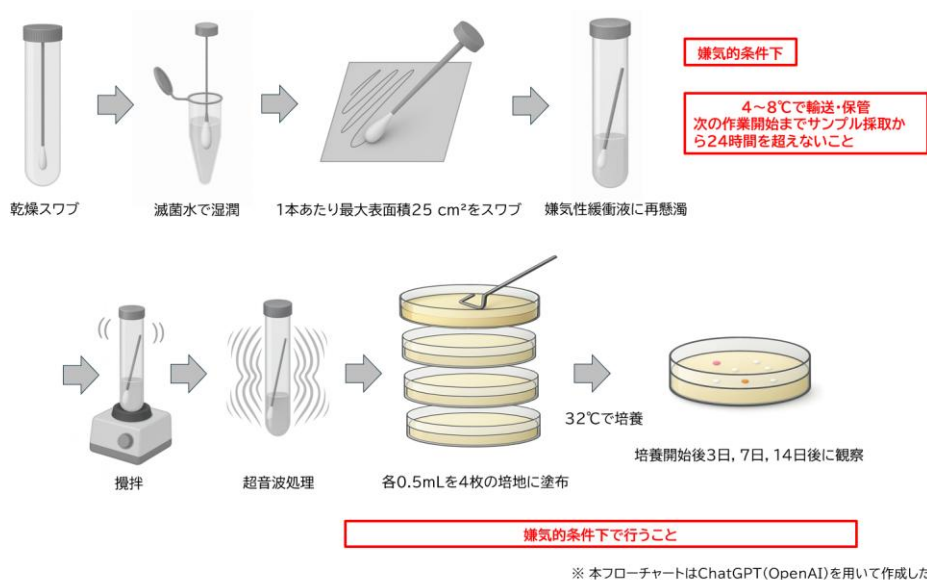


図 D-5.1: スワブ検査 5 のフローチャート（再懸濁以降は嫌気条件下とする）

D.5.2 サンプル採取

サンプリング前に，嫌気性緩衝液を入れた十分な数のチューブを準備する．酸化還元指示薬としてレサズリンナトリウム (0.001 g/l) を加え，窒素ガスを通気する．次に，0.5 g/l 硫化ナトリウム九水和物を添加し，嫌気性緩衝液を還元する．使い捨てシリンジ及び滅菌注射針を用いて pH を 7.2 に調整すると，酸化還元指示薬は無色に変化するはずである．嫌気条件下（嫌気チャンバー内）において，セラムボトルネックのガラス製容器（注射針でガス置換できるタイプの小型密閉ガラス容器）に 10 mL ずつ分注し，ブチルゴム栓及びクランプで密閉する．窒素ガスの置換と減圧を交互に 3 回行い，最後に窒素ガスを充填した後，溶液をオートクレーブ滅菌する．

サンプリングの前に，次の手順でシステイン塩酸塩及び硫化ナトリウムの混合溶液も準備する．システイン塩酸塩 0.5 g 及び硫化ナトリウム九水和物 0.5 g を蒸留水 10 mL に溶解させ，pH を 7 に調整する．空気を窒素ガスと置換し，オートクレーブ滅菌する．

サンプリングの直前に，滅菌した注射針でゴム栓に穴を開けて嫌気性緩衝液の入ったガラス瓶を脱気し，チューブのクランプを外す．

滅菌手袋を着用し，適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する．

無菌操作により，滅菌スワブを容器から取り出し，その先端を滅菌水を入れたチューブ内で湿らせる．その後，スワブを試験管の内壁に軽く押し当て，余分な水分を除去する．

スワブを試料採取面に対しておよそ 30° の角度で保持する．スワブを一定方向に動かしながら，スワブ先端を回転させつつ，最大 25 cm^2 の測定面積全体を均一に拭き取る．次に，スワブの動かす方向を 90° 変えて，同様に全面を拭き取る．さらに，スワブの動かす方向を 135° 変えて，3回目の拭き取りを行い，全面のサンプリングを完了する（図 D-5.2）．

採取後，嫌気性緩衝液の入ったチューブの栓を取り外し，スワブ軸を破断点で折ってスワブ先端を嫌気性緩衝液試験管内に収め，すぐに新しい滅菌ブチルゴム栓で密閉する．酸化還元指示薬が赤色に変化した場合には，滅菌済みの使い捨てシリンジ及び滅菌注射針を用いて，システイン塩酸塩及び硫化ナトリウムの混合液を 0.1 mL 添加し，チューブ内容物を還元する．一定時間が経過しても酸化還元指示薬が無色に戻らない場合は，還元剤の濃度を 0.1 mL ずつ段階的に増加させる．

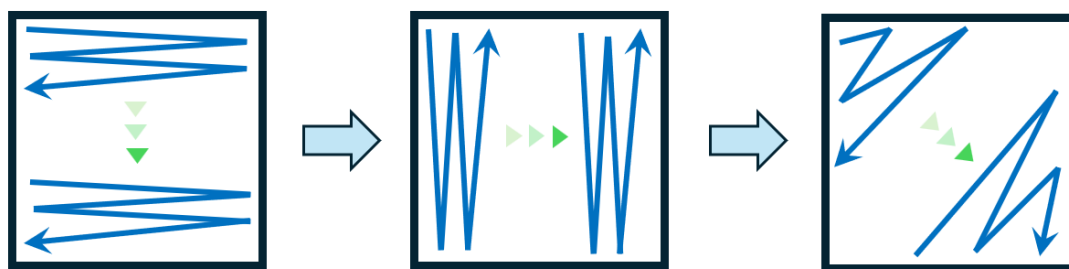


図 D-5.2: スワブ検査 5 における拭き取り手順

D.5.3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し， $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管する．サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと．

D.5.4 抽出

緩衝液及びスワブを含む各サンプルチューブをボルテックスミキサーにセットし，最大出力で 5～6 秒間攪拌する．

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し，サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ， 120 ± 5 秒間，超音波処理を行う．洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること，及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること．

超音波洗浄機の周波数は $19\sim 27\text{ kHz}$ とすることが望ましい．ただし， 40 kHz を上限として使用してよい．

注記：熱処理を行ってはいらない。

D.5.5 塗抹

スワブ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで5～6秒間攪拌し、無菌操作により0.5 mLずつをTGA培地プレート表面に分注する。合計2 mLを使用する。滅菌スプレッダーを用いて培地表面に均一に広げ、培養前に水分が十分吸収されるまで静置すること。

D.5.6 培養

シャーレの蓋側を下にして、嫌気条件下において $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で培養すること。

D.5.7 計数

3日、7日、14日後に寒天培地を検査する。視認できるコロニーが観察される場合、計数しデータを記録する。14日時点で最終的なコロニー数を検査し記録する。14日時点の最終的な計数を実施するまでシャーレの蓋は開けないでおく。シャーレの写真を残しておくと、コロニーの多様性判定に有用である。必要であれば、嫌気性条件下で画線培養を行い、単一コロニーを得る。また、必要に応じて植え継ぎを行う。

D.5.8 対照

10試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも1本のフィールド（採取環境）陰性対照を採取し、1日に少なくとも3本を確保すること。滅菌スワブを容器から取り出し、滅菌水で湿らせた後、空気中で2～4秒間振り、滅菌緩衝液を含む試験管に戻す。

なお実験室では、少なくとも2本のラボ陰性対照を作成すること。滅菌スワブ先端を滅菌水で湿らせ、空気に曝露することなく滅菌緩衝液を含む試験管に戻すこと。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

D.5.9 機器、試薬及び消耗品

嫌気性微生物の培養における一般的な機器（例として、ガス装置、グローブボックス）

- ・ 手袋（パウダーフリー）
- ・ 乾燥した滅菌スワブ
- ・ スワブを湿らせるための滅菌水を入れたチューブ
- ・ 嫌気性滅菌緩衝液 10 mL を入れたチューブ
- ・ システイン塩酸塩及び硫化ナトリウムの混合液を入れたチューブ
- ・ 使い捨てシリンジ及び滅菌注射針

- ・ クリンパー／デクリンパー
- ・ 滅菌ブチルゴム栓
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌コンラージ棒
- ・ TGA 培地（直径 90 mm）
- ・ 嫌気培養装置
- ・ インキュベーター（32 ± 1℃）

D.6 スワブ検査 6

D.6.1 一般

培養が困難又は不可能な微生物（細菌，アーキア（古細菌），真菌）を含む微生物群集の構成及び多様性を評価する場合には，スワブ検体から核酸を抽出し，分子生物学的手法に基づく群集構造解析を実施する．

以下に解析にあたっての基本的ガイドラインを示す．

D.6.1.1 微生物群集構造の解析

rRNA 遺伝子等を標的とした核酸の増幅・塩基配列解析による群集構造解析を実施する場合，以下の点に留意すること．

- 試薬及び用水の管理：核酸抽出，増幅反応，ライブラリ調製及びこれらに付随する工程に使用する用水は，ASTM Type I（ASTM D1193 準拠）又は日本薬局方「注射用水」に相当する DNase/RNase フリーの超純水を使用すること．使用試薬は分子生物学用途として品質管理されたものを用いること．
- コンタミネーション防止：スワブ及び軸部は，ポリエステル等の化学合成素材から成る滅菌済み製品を用いること（DNA フリー：DNA の混入（コンタミネーション）がないこと）．器具・消耗品は核酸汚染防止措置を講じたものを使用すること．
- 手法の妥当性確保：プライマー選択，PCR 条件，配列決定法（NGS 等），及びデータ解析アルゴリズムは，実施時点における最新の科学的知見に基づき，信頼性と再現性が担保されたものを採用すること．
- 精度管理：解析の妥当性を検証するため，必要に応じて適切な陽性対照（ポジティブコントロール）及び陰性対照（ネガティブコントロール）を設定すること．

D.6.1.2 種レベル同定のための追加解析

rRNA 遺伝子解析のみでは種レベルの識別が困難な場合，より高い解像度を有する分子生物学的手法を適用する．目的及び対象微生物に応じ，以下の手法から適切なものを選択すること．

- 多遺伝子解析（MLSA/MLST 等）：複数のハウスキーピング遺伝子を用いた解析．
- 高変異領域解析：真菌における ITS 領域など，種間差異が顕著な領域を標的とした解析．
- ゲノム全域評価：全ゲノム配列解析（WGS）及び平均ヌクレオチド同一性（ANI）解析．
- 系統学的解析：公的データベース（GenBank (NCBI)，SILVA，RDP 等）との相同性検索に基づく系統樹作成．

D.6.1.3 同定結果の判定基準

種レベル同定の妥当性は，採用した遺伝子領域の保存性及び変異度，参照データベースの信頼性（Type Strain の有無等），ならびに解析手法の再現性を総合的に評価した上で判断すること．

付録 E （参考）ワイプ検査の手順

対象とする微生物の性質に応じた培養による 6 つのワイプ検査手順を示す。なお、PBS +Tween 80 への再懸濁以降は付録 D のスワブ検査と同様の手順である。

- E.1 ワイプ検査 1：中温性好気性細菌及び芽胞（標準ワイプ法）
- E.2 ワイプ検査 2：中温性好気性細菌
- E.3 ワイプ検査 3：低温性／耐冷好気性細菌
- E.4 ワイプ検査 4：中温性好気性菌類（酵母，かび）
- E.5 ワイプ検査 5：中温性嫌気性細菌
- E.6 ワイプ検査 6：分子生物学的手法に基づく群集構造解析

E.1 ワイプ検査 1（標準ワイプ検査）

E.1.1 一般

本検査法により、15 分間 80℃の熱処理に耐えられる中温性好気性細菌及び芽胞を検出する。本ワイプ検査手順は、基本的に付録 D.1 に記載されるスワブ検査手順と同じである。

注記：これらの手順の代替法として、抽出懸濁液の濃縮に、標準的なメンブレンフィルター法が使用可能である。

ワイプ検査 1（標準ワイプ検査）のフローチャートを図 E-1.1 に模式的に示す。

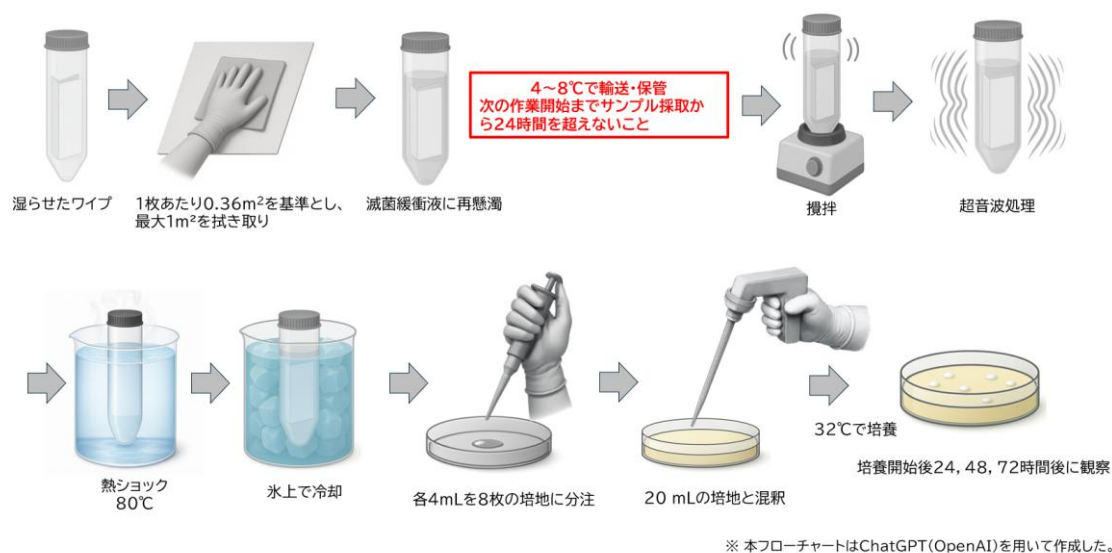


図 E-1.1: ワイプ検査 1(標準ワイプ検査)のフローチャート

E.1.2 サンプル採取

4 mL の滅菌水であらかじめ湿らせた、15 cm × 15 cm 程度の滅菌ポリエステルワイプを必要数用意し、すべてのサンプル及び対照を収容できるように、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶を準備する。サンプル採取ごとに、70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭し、少なくとも 4 サンプルごとに 1 回手袋を交換する。

ワイプをサンプル表面に平らに置き、一定の強い圧力を掛けながら表面全体を拭き取る。拭き取り面積は 0.36 m² (60×60 cm) を基準とし、最大 1 m² とする。ワイプを拭き取った面（汚れた面）が内側になるように一度折りたたむ。ワイプを動かす方向をそれぞれ 90° 回転させ、拭き取った面（汚れた面）が内側になるように再び折りたたむ。続いて 135° 回転させ、計 3 回対象範囲をワイプで拭き取る。採取が終わったら、ワイプを滅菌チューブ又は瓶に移す。

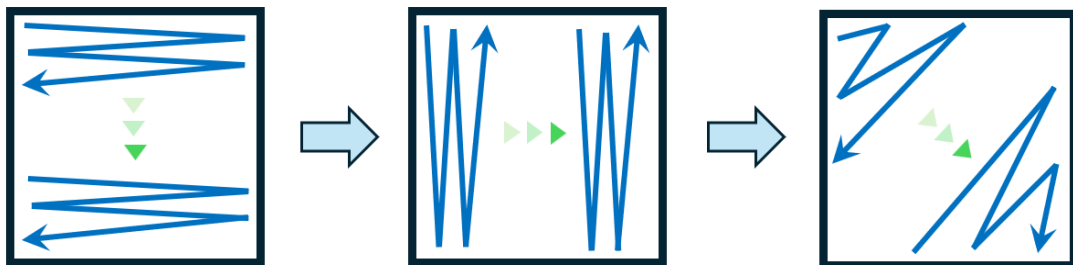


図 E-1.2: ワイプ検査 1（標準ワイプ検査）での拭き取り手順

E.1.3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと。

E.1.4 抽出

各サンプルに 20 mL の滅菌緩衝液を加え、チューブ又は瓶を再密閉する。

瓶の様にあまり効率的でない場合でも、ボルテックスミキサーの最高出力で 5～10 秒間攪拌する。あるいは、堅く密閉された瓶にワイプが入っている場合には、蓋を閉めて 15 秒間激しく振る。

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し、サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ、120 ± 5 秒間、超音波処理を行う。洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること、及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること。

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい。ただし、40 kHz を上限として使用してよい。

E.1.5 熱処理

ボルテックスミキサーで攪拌し超音波処理した懸濁液及びワイプを入れたチューブあるいは瓶を $80 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水浴に 15 分間浸漬し、加熱する。パイロットチューブに温度計を挿入して水温を確認し、水浴の水位は試験管内液面より高く保つこと。

熱処理後、チューブ又は瓶を急激に冷却し、内容物を $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 以下にする。塗抹作業全体に 10 分以上を要する場合は、熱処理を行ったチューブ又は瓶を塗抹まで水槽に置くこと。

E.1.6 混釈培養

必要に応じて、ワイプ抽出懸濁液を滅菌緩衝液で適切に希釈する。

ワイプ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し、マイクロピペットを用いて 4.0 mL ずつ直径 90 mm の滅菌シャーレ 8 枚に分注する。合計 32 mL の懸濁液を使用する。

各シャーレに、オートクレーブ滅菌で溶解し、保温した $48 \sim 50^{\circ}\text{C}$ の TSA 又は R2A 培地 20 mL を加え、穏やかに回転させて内容物を混合し、室温で固化させる。

E.1.7 培養

シャーレの蓋側を下にして、 $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで培養すること。

E.1.8 計数

試料プレートは、培養開始後 24 時間及び 48 時間の時点で観察すること。肉眼でコロニーが確認された場合は、その数を計数し、データを記録すること。最終的なコロニー数は培養 72 時間後に確認し、記録すること。72 時間後の最終計数が完了するまでは、シャーレの蓋を外さないこと。

E.1.9 対照

6 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも 1 枚フィールド（採取環境）陰性対照を採取すること。

あらかじめ滅菌水で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプをチューブから取り出し、およそ 2～4 秒間空气中でワイプを振り、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れる。

なお、実験室においては、ラボ陰性対照を少なくとも 2 枚作製すること。滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm の滅菌ワイプを、空气中に曝すことなく（安全キャビネット又はクリーンベンチ内で）、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れる。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

E. 1.10 機器，試薬及び消耗品

- ・ 予め滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイブ
- ・ 滅菌緩衝液 20 mL を入れたチューブあるいは瓶
- ・ 冷蔵庫 (4~8℃)
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 恒温水槽 (80 ± 2℃)
- ・ 超音波破碎機 (ソニケーター)
- ・ 氷槽
- ・ 温度計
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌シャーレ (直径 90 mm)
- ・ TSA 又は R2A 培地
- ・ インキュベーター (32 ± 1℃)
- ・ 滅菌手袋
- ・ 70 % IPA 又は消毒用エタノール

E.2 ワイプ検査2

E.2.1 一般

本検査法により、中温性好気性細菌を検出する。本ワイプ検査手順は、基本的に付録 D.2 に記載されるスワブ検査手順と同じである。

注記：これらの手順の代替法として、抽出懸濁液の濃縮に、標準的なメンブレンフィルター法が使用可能である。

ワイプ検査2のフローチャートを図 E-2.1 に模式的に示す。



※ 本フローチャートはChatGPT(OpenAI)を用いて作成した。

図 E-2.1: ワイプ検査2のフローチャート

E.2.2 サンプル採取

4 mL の滅菌水であらかじめ湿らせた、15 cm × 15 cm 程度の滅菌ポリエステルワイプを必要数用意し、すべてのサンプル及び対照を収容できるように、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶を準備する。サンプル採取ごとに、70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭し、少なくとも4サンプルごとに1回手袋を交換する。

ワイプをサンプル表面に平らに置き、一定の強い圧力を掛けながら表面全体を拭き取る。拭き取り面積は0.36 m² (60×60 cm) を基準とし、最大1 m²とする。ワイプを拭き取った面（汚れた面）が内側になるように一折りたたむ。ワイプを動かす方向をそれぞれ 90° 回転させ、拭き取った面（汚れた面）が内側になるように再び折りたたむ。続いて 135° 回転させ、計 3 回対象範囲をワイプで拭き取る。採取が終わったら、ワイプを滅菌チューブ又は瓶に移す。

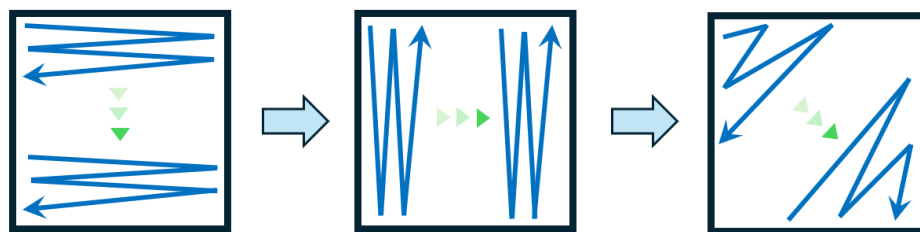


図 E-2.2: ワイプ検査 2 での拭き取り手順

E. 2.3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと。

E. 2.4 抽出

各サンプルに 20 mL の滅菌緩衝液を加え、チューブ又は瓶を再密閉する。

瓶の様にあまり効率的でない場合でも、ボルテックスミキサーの最高出力で 5～10 秒間攪拌する。あるいは、堅く密閉された瓶にワイプが入っている場合には、蓋を閉めて 15 秒間激しく振る。

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し、サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ、120 ± 5 秒間、超音波処理を行う。洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること、及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること。

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい。ただし、40 kHz を上限として使用してよい。

注記：熱処理を行ってはならない。

E. 2.5 混釈培養

必要に応じて、ワイプ抽出懸濁液を滅菌緩衝液で適切に希釈する。

ワイプ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し、マイクロピペットを用いて 4.0 mL ずつ直径 90 mm の滅菌シャーレ 8 枚に分注する。合計 32 mL の懸濁液を使用する。

各シャーレに、オートクレーブ滅菌で溶解し、保温した 48～50℃の TSA 又は R2A 培地 20 mL を加え、穏やかに回転させて内容物を混合し、室温で固化させる。

E. 2.6 培養

シャーレの蓋側を下にして、32 ± 1℃のインキュベーターで培養すること。

E. 2.7 計数

試料プレートは、培養開始後 24 時間及び 48 時間の時点で観察すること。肉眼でコロニーが確認された場合は、その数を計数し、データを記録すること。最終的なコロニー数は培養 72 時間後に確認し、記録すること。72 時間後の最終計数が完了するまでは、シャーレの蓋を外さないこと。

E. 2.8 対照

6 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも 1 枚フィールド（採取環境）陰性対照を採取すること。

あらかじめ滅菌水で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプをチューブから取り出し、およそ 2 ～4 秒間空气中でワイプを振り、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れる。

なお、実験室においては、ラボ陰性対照を少なくとも 2 枚作製すること。滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm の滅菌ワイプを、空气中に曝すことなく（安全キャビネット又はクリーンベンチ内で）、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れること。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

E. 2.9 機器、試薬及び消耗品

- ・ 予め滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプ
- ・ 滅菌緩衝液 20 mL を入れたチューブあるいは瓶
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌シャーレ（直径 90 mm）
- ・ TSA 又は R2A 培地
- ・ インキュベーター（32 ± 1℃）
- ・ 滅菌手袋
- ・ 70 % IPA 又は消毒用エタノール

E.3 ワイプ検査3

E.3.1 一般

本検査法により、低温性／耐冷好気性細菌を検出する．本ワイプ検査手順は、基本的に付録D.3に記載されるスワブ検査手順と同じである．

注記：これらの手順の代替法として、抽出懸濁液の濃縮に、標準的なメンブレンフィルター法が使用可能である．

ワイプ検査3のフローチャートを図E-3.1に模式的に示す．

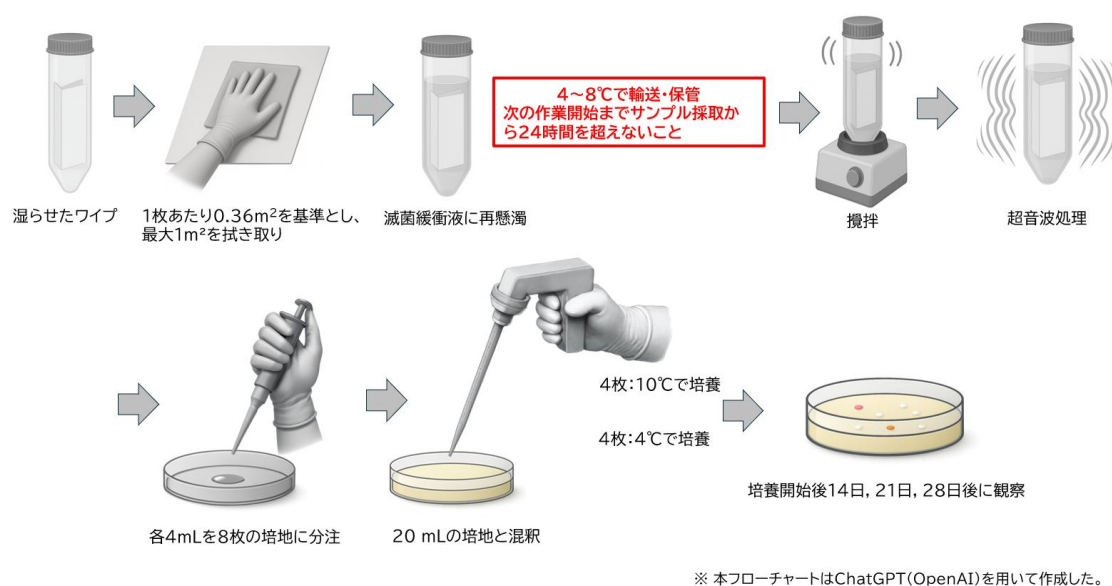


図 E-3.1: ワイプ検査3のフローチャート

E.3.2 サンプル採取

4 mL の滅菌水であらかじめ湿らせた、15 cm × 15 cm 程度の滅菌ポリエステルワイプを必要数用意し、すべてのサンプル及び対照を収容できるように、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶を準備する．サンプル採取ごとに、70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭し、少なくとも4サンプルごとに1回手袋を交換する．

ワイプをサンプル表面に平らに置き、一定の強い圧力を掛けながら表面全体を拭き取る．ワイプを拭き取った面（汚れた面）が内側になるように一度折りたたむ．拭き取り面積は0.36 m² (60×60 cm) を基準とし、最大1 m²とする．ワイプを動かす方向をそれぞれ90°回転させ、拭き取った面（汚れた面）が内側になるように再び折りたたむ．続いて135°回転させ、計3回対象範囲をワイプで拭き取る．採取が終わったら、ワイプを滅菌チューブ又は瓶に移す．

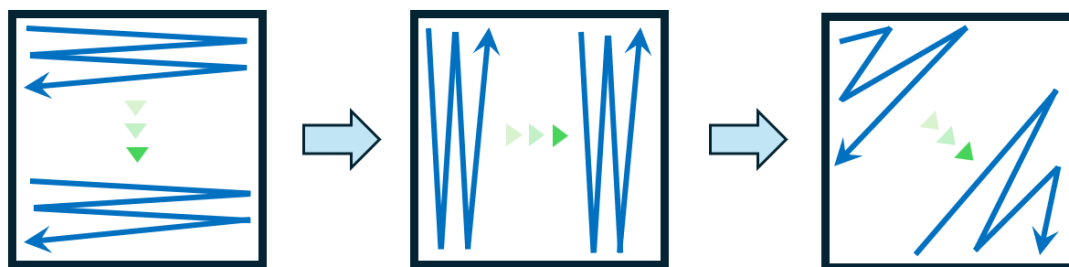


図 E-3.2: ワイプ検査 3 での拭き取り手順

E. 3.3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと。

E. 3.4 抽出

各サンプルに 20 mL の滅菌緩衝液を加え、チューブ又は瓶を再密閉する。

瓶の様にあまり効率的でない場合でも、ボルテックスミキサーの最高出力で 5～10 秒間攪拌する。あるいは、堅く密閉された瓶にワイプが入っている場合には、蓋を閉めて 15 秒間激しく振る。

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し、サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ、120 ± 5 秒間、超音波処理を行う。洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること、及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること。

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい。ただし、40 kHz を上限として使用してよい。

注記：熱処理を行ってはならない。

E. 3.5 混釈培養

必要に応じて、ワイプ抽出懸濁液を滅菌緩衝液で適切に希釈する。

ワイプ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し、マイクロピペットを用いて 4.0 mL ずつ直径 90 mm の滅菌シャーレ 8 枚に分注する。合計 32 mL の懸濁液を使用する。

各シャーレに、オートクレーブ滅菌で溶解し、保温した 48～50℃の TSA 又は R2A 培地 20 mL を加え、穏やかに回転させて内容物を混合し、室温で固化させる。

E.3.6 培養

シャーレの蓋側を下にして、4つは $10 \pm 1^\circ\text{C}$ 、他の4つは $4 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養するとよい。

E.3.7 計数

14 日及び 21 日後に寒天培地を検査する。視認できるコロニーが観察される場合、計数しデータを記録する。28 日時点で最終的なコロニー数を検査し記録する。28 日時点の最終的な計数を実施するまでシャーレの蓋は開けないでおく。シャーレの写真を残しておく、コロニーの多様性判定に有用である。必要であれば、同定及び微生物アーカイブの前に、画線培養により単一コロニーを得る。

E.3.8 対照

6 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも 1 枚フィールド（採取環境）陰性対照を採取すること。

あらかじめ滅菌水で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプをチューブから取り出し、およそ 2 ～4 秒間空気中でワイプを振り、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れる。

なお、実験室においては、ラボ陰性対照を少なくとも 2 枚作製すること。滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm の滅菌ワイプを、空気中に曝すことなく（安全キャビネット又はクリーンベンチ内で）、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れること。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

E.3.9 機器、試薬及び消耗品

- ・ 予め滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプ
- ・ 滅菌緩衝液 20 mL を入れたチューブあるいは瓶
- ・ 冷蔵庫（ $4 \sim 8^\circ\text{C}$ ）
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌シャーレ（直径 90 mm）
- ・ TSA 又は R2A 培地
- ・ インキュベーター（ $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ）及び（ $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ）
- ・ 滅菌手袋
- ・ 70 % IPA 又は消毒用エタノール

E.4 ワイプ検査 4

E.4.1 一般

本検査法により、中温性好気性菌類、つまり酵母やかびを検出する。本ワイプ検査手順は、基本的に付録 D.4 に記載されるスワブ検査手順と同じである。

注記：これらの手順の代替法として、抽出懸濁液の濃縮に、標準的なメンブレンフィルター法が使用可能である。

ワイプ検査 4 のフローチャートを図 E-4.1 に模式的に示す。

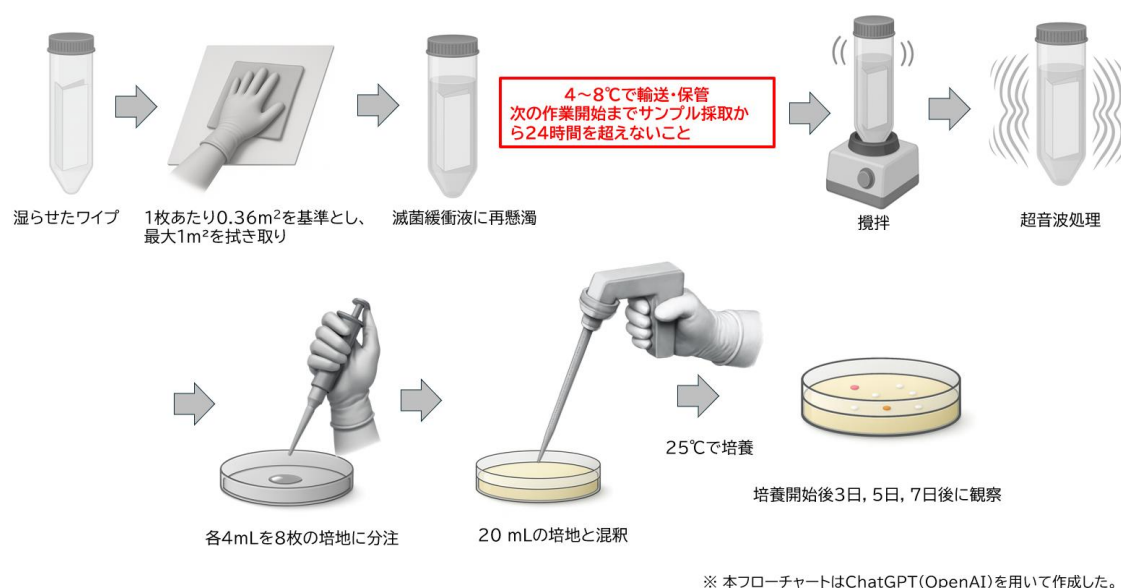


図 E-4.1: ワイプ検査 4 のフローチャート

E.4.2 サンプル採取

4 mL の 滅菌水であらかじめ湿らせた、15 cm × 15 cm 程度 の滅菌ポリエステルワイプを必要数用意し、すべてのサンプル及び対照を収容できるように、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶を準備する。サンプル採取ごとに、70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭し、少なくとも 4 サンプルごとに 1 回手袋を交換する。

ワイプをサンプル表面に平らに置き、一定の強い圧力を掛けながら表面全体を拭き取る。ワイプを拭き取った面（汚れた面）が内側になるように一度折りたたむ。拭き取り面積は 0.36 m² (60×60 cm) を基準とし、最大 1 m² とする。ワイプを動かす方向をそれぞれ 90° 回転させ、拭き取った面（汚れた面）が内側になるように再び折りたたむ。続いて 135° 回転させ、計 3 回対象範囲をワイプで拭き取る。採取が終わったら、ワイプを滅菌チューブ又は瓶に移す。

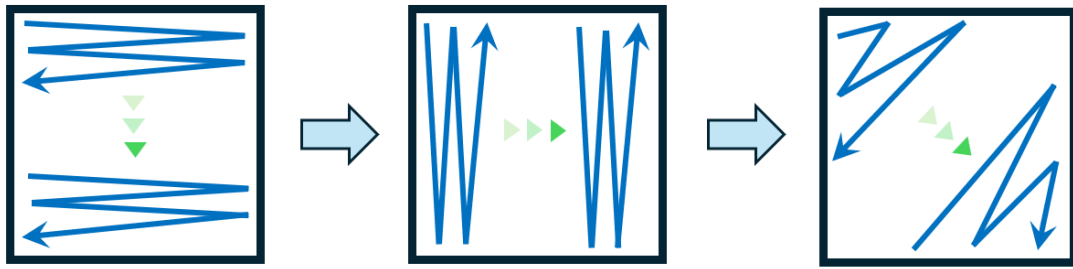


図 E-4. 2: ワイプ検査 4 での拭き取り手順

E. 4. 3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと。

E. 4. 4 抽出

各サンプルに 20 mL の滅菌緩衝液を加え、チューブ又は瓶を再密閉する。

瓶の様にあまり効率的でない場合でも、ボルテックスミキサーの最高出力で 5～10 秒間攪拌する。あるいは、堅く密閉された瓶にワイプが入っている場合には、蓋を閉めて 15 秒間激しく振る。

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し、サンプルチューブを超音波洗浄槽に入れ、120 ± 5 秒間、超音波処理を行う。洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること、及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること。

超音波洗浄機の周波数は 19～27 kHz とすることが望ましい。ただし、40 kHz を上限として使用してよい。

注記：熱処理を行ってはならない。

E. 4. 5 混釈培養

必要に応じて、ワイプ抽出懸濁液を滅菌緩衝液で適切に希釈する。

ワイプ抽出懸濁液をボルテックスミキサーで 5～6 秒間攪拌し、マイクロピペットを用いて 4.0 mL ずつ直径 90 mm の滅菌シャーレ 8 枚に分注する。合計 32 mL の懸濁液を使用する。

各シャーレに、オートクレーブ滅菌で溶解し、48～50℃に保温した、クロラムフェニコールを添加した PDA 培地 20 mL を加え、穏やかに回転させて内容物を混合し、室温で固化させる。

E. 4. 6 培養

シャーレの蓋側を下にして、 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ のインキュベーターで培養すること。

E. 4. 7 計数

試料プレートは、培養開始後 3 日、5 日及び 7 日後の時点で観察すること。肉眼でコロニーが確認された場合は、その数を計数し、データを記録すること。最終的なコロニー数は培養 7 日後に確認し、記録すること。7 日後の最終計数が完了するまでは、シャーレの蓋を外さないこと。シャーレの写真を残しておくと、コロニーの多様性判定に有用である。

E. 4. 8 対照

6 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも 1 枚フィールド（採取環境）陰性対照を採取すること。

あらかじめ滅菌水で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプをチューブから取り出し、およそ 2 ～4 秒間空气中でワイプを振り、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れる。

なお、実験室においては、ラボ陰性対照を少なくとも 2 枚作製すること。滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm の滅菌ワイプを、空气中に曝すことなく（安全キャビネット又はクリーンベンチ内で）、20 mL の滅菌緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れること。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

E. 4. 9 機器、試薬及び消耗品

- ・ 予め滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプ
- ・ 滅菌緩衝液 20 mL を入れたチューブあるいは瓶
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置（ソニケーター）
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 滅菌シャーレ（直径 90 mm）
- ・ クロラムフェニコールを添加した PDA 培地
- ・ インキュベーター（ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ）
- ・ 滅菌手袋
- ・ 70 % IPA 又は消毒用エタノール

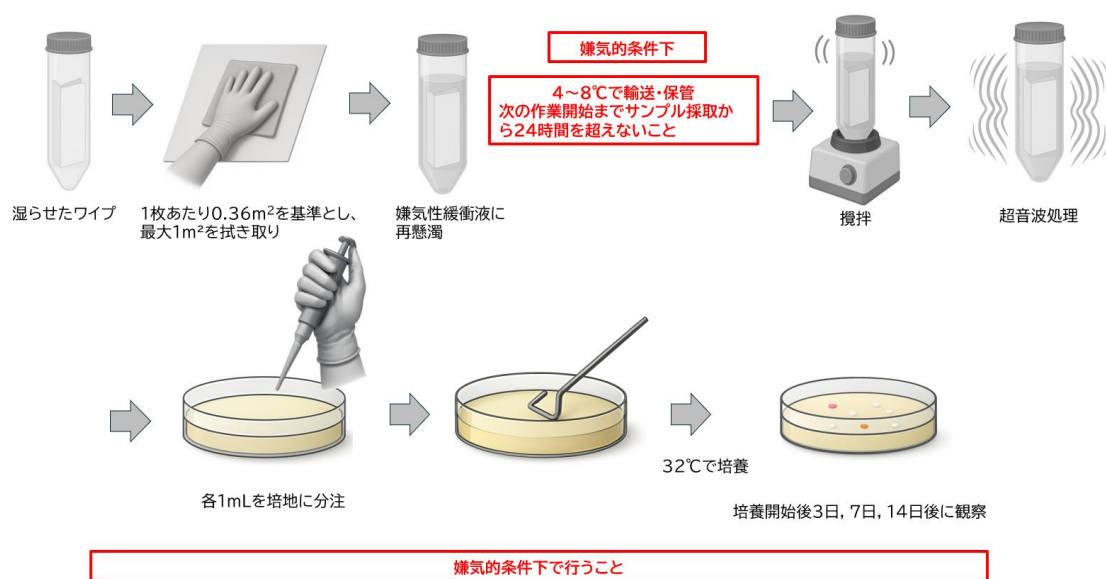
E.5 ワイプ検査5

E.5.1 一般

本検査法により、中温性嫌気性細菌を検出する。本ワイプ検査手順は、基本的に付録 D.5 に記載されるスワブ検査手順と同じである。

注記：これらの手順の代替法として、抽出懸濁液の濃縮に、標準的なメンブレンフィルター法が使用可能である。

ワイプ検査5のフローチャートを図 E-5.1 に模式的に示す。



※ 本フローチャートはChatGPT(OpenAI)を用いて作成した。

図 E-5.1: ワイプ検査5のフローチャート（再懸濁以降は嫌気条件下とする）

E.5.2 サンプル採取

4 mL の滅菌水であらかじめ湿らせた、15 cm × 15 cm 程度の滅菌ポリエステルワイプを必要数用意する。サンプリングの前に、80 mL の嫌気性緩衝液が入った十分な数の 100 mL ガラス瓶も用意する。酸化還元指示薬としてレサズリンナトリウム(0.001 g/L)を加え、窒素ガスを通気する。次に、0.5 g/L 硫化ナトリウム九水和物を添加し、嫌気性緩衝液を還元する。使い捨てシリンジ及び滅菌注射針を用いて pH を 7.2 に調整すると、酸化還元指示薬は無色に変化するはずである。嫌気条件下（嫌気チャンバー内）において、ガラス瓶に 80 mL ずつ分注し、スクリュキャップで密閉する。窒素ガスの置換と減圧を交互に行い、最後に窒素ガスを充填した後、溶液をオートクレーブ滅菌する。

サンプリングの前に、次の手順でシステイン塩酸塩及び硫化ナトリウムの混合溶液も準備する。システイン塩酸塩 0.5 g 及び硫化ナトリウム九水和物 0.5 g を蒸留水 10 mL に溶解させ、pH を 7 に調整する。空気を窒素ガスと置換し、オートクレーブ滅菌する。

サンプリングの直前に、嫌気性緩衝液が入ったボトルのスクリーキャップを取り外す。

サンプル採取ごとに、70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭し、少なくとも4サンプルごとに1回手袋を交換する。

ワイプをサンプル表面に平らに置き、一定の強い圧力を掛けながら表面全体を拭き取る。ワイプを拭き取った面（汚れた面）が内側になるように一度折りたたむ。拭き取り面積は0.36 m² (60×60 cm) を基準とし、最大1 m² とする。ワイプを動かす方向をそれぞれ90°回転させ、拭き取った面（汚れた面）が内側になるように再び折りたたむ。続いて135°回転させ、計3回対象範囲をワイプで拭き取る。採取が終わったら、ワイプを滅菌チューブ又は瓶に移す。

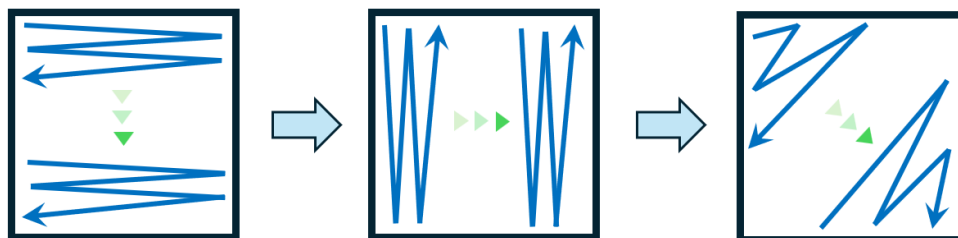


図 E-5. 2: ワイプ検査 5 での拭き取り手順

嫌気性緩衝液が入った瓶から栓を取り外し、ワイプを溶液中に入れ、滅菌した新しい栓で直ちに瓶を閉じる。穏やかに瓶を振り、ワイプ全体が液体に浸るようにする。酸化還元指示薬が赤色に変化した場合には、滅菌済みの使い捨てシリンジ及び滅菌注射針を用いて、システイン塩酸塩及び硫化ナトリウムの混合液を0.1 mL 添加し、チューブ内容物を還元する。一定時間が経過しても酸化還元指示薬が無色に戻らない場合は、還元剤の濃度を0.1 mL ずつ段階的に増加させる。

E. 5.3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後24時間以内に処理を行うこと。

E. 5.4 抽出

瓶の様にあまり効率的でない場合でも、ボルテックスミキサーの最高出力で5～10秒間攪拌する。あるいは、堅く密閉された瓶にワイプが入っている場合には、蓋を閉めて15秒間激しく振る。

サンプルチューブがガラス製でない場合にはガラスチューブに移し、サンプルチューブを超

音波洗浄槽に入れ、 120 ± 5 秒間、超音波処理を行う。洗浄槽内の液面がサンプル容器の液面より上にあること、及びサンプル数が超音波洗浄装置の性能定格を超えないことを確認すること。

超音波洗浄機の周波数は 19~27 kHz とすることが望ましい。ただし、40 kHz を上限として使用してよい。

注記：熱処理を行ってはならない。

E. 5. 5 塗抹培養

嫌気条件下において、寒天培地上に塗抹する。安全キャビネット又はクリーンベンチ内で、TGA 培地の表面にワイプ抽出懸濁液を 1 mL ずつ分注、塗布し、計 20 mL 使用する。

滅菌コンラージ棒を用いて、希釈液を表面にできるだけ均一に広げる。培地に水分が吸収されるまで待ち、インキュベーションを行うこと。

E. 5. 6 培養

シャーレの蓋側を下にして、嫌気条件下において、 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーターで培養すること。

E. 5. 7 計数

3 日、7 日及び 14 日後に寒天培地を検査する。視認できるコロニーが観察される場合、計数しデータを記録する。14 日時点の最終的な計数を実施するまでシャーレの蓋は開けないでおく。シャーレの写真を残しておく、コロニーの多様性判定に有用である。

E. 5. 8 対照

6 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、少なくとも 1 枚フィールド（採取環境）陰性対照を採取すること。

あらかじめ滅菌水で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイプをチューブから取り出し、およそ 2~4 秒間空気中でワイプを振り、80 mL の滅菌嫌気性緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れる。

なお、実験室においては、ラボ陰性対照を少なくとも 2 枚作製すること。滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm の滅菌ワイプを、空気中に曝すことなく（安全キャビネット又はクリーンベンチ内で）、80 mL の滅菌嫌気性緩衝液が入った滅菌チューブ又は瓶にワイプを入れること。

これらの対照は、拭き取りスワブサンプルと同様の方法で分析すること。

E. 5.9 機器, 試薬及び消耗品

- ・ 嫌気性微生物の培養における一般的な機器 (例えば, ガス装置, グローブボックス)
- ・ 予め滅菌水 4 mL で湿らせた 15 cm x 15 cm 滅菌ワイブ
- ・ 滅菌嫌気性緩衝液を入れたスクリュウキャップガラスビン
- ・ シス테인塩酸塩及び硫化ナトリウムの混合溶液を入れたバイアル瓶
- ・ 滅菌注射針及びシリンジ
- ・ 滅菌栓
- ・ 滅菌手袋
- ・ 70 % IPA 又は消毒用エタノール
- ・ クーラーボックス
- ・ 冷蔵庫 (4~8°C)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 超音波洗浄装置 (ソニケーター)
- ・ マイクロピペット及び滅菌チップ
- ・ 滅菌コンラージ棒
- ・ TGA 培地
- ・ 嫌気培養装置
- ・ 恒温器 (32 ± 1°C)

E.6 ワイプ検査 6

E.6.1 一般

培養が困難又は不可能な微生物（細菌，アーキア（古細菌），真菌）を含む微生物群集の構成及び多様性を評価する場合には，ワイプ検体から核酸を抽出し，分子生物学的手法に基づく群集構造解析を実施する．

以下に解析にあたっての基本的ガイドラインを示す．

E.6.1.1 微生物群集構造の解析

rRNA 遺伝子等を標的とした核酸の増幅・塩基配列解析による群集構造解析を実施する場合，以下の点に留意すること．

- 試薬及び用水の管理：核酸抽出，増幅反応，ライブラリ調製及びこれらに付随する工程に使用する用水は，ASTM Type I（ASTM D1193 準拠）又は日本薬局方「注射用水」に相当する，DNase/RNase フリーの超純水を使用すること．使用試薬は分子生物学用途として品質管理されたものを用いること．
- コンタミネーション防止：外来核酸の混入を防ぐため，ワイプは化学合成繊維製で，滅菌処理が施された製品を使用すること（DNA フリー：DNA の混入（コンタミネーション）がないこと）．器具・消耗品は核酸汚染防止措置を講じたものを使用すること．
- 手法の妥当性確保：プライマー選択，PCR 条件，配列決定法（NGS 等），及びデータ解析アルゴリズムは，実施時点における最新の科学的知見に基づき，信頼性と再現性が担保されたものを採用すること．
- 精度管理：解析の妥当性を検証するため，必要に応じて適切な陽性対照（ポジティブコントロール）及び陰性対照（ネガティブコントロール）を設定すること．

E.6.1.2 種レベル同定のための追加解析

rRNA 遺伝子解析のみでは種レベルの識別が困難な場合，より高い解像度を有する分子生物学的手法を適用する．目的及び対象微生物に応じ，以下の手法から適切なものを選択すること．

- 多遺伝子解析（MLSA/MLST 等）：複数のハウスキーピング遺伝子を用いた解析．
- 高変異領域解析：真菌における ITS 領域など，種間差異が顕著な領域を標的とした解析．
- ゲノム全域評価：全ゲノム配列解析（WGS）及び平均ヌクレオチド同一性（ANI）解析．
- 系統学的解析：公的データベース（GenBank (NCBI)，SILVA，RDP 等）との相同性検索に基づく系統樹作成．

E.6.1.3 同定結果の判定基準

種レベル同定の妥当性は，採用した遺伝子領域の保存性及び変異度，参照データベースの信頼性（Type Strain の有無等），ならびに解析手法の再現性を総合的に評価した上で判断すること．

付録 F（参考）スタンプ培地（コンタクトプレート）法手順
（スタンプ培地を用いて固体表面の菌数を測定する手順）

F.1 スタンプ培地法

F.1.1 一般

本検査法により、平坦で滑らかで乾燥したクリーンルーム室内や衣服の表面に付着した中温性好気性菌を検出する。

F.1.2 サンプル採取

購入したスタンプ培地の購入ロット毎に、製品保証、目視検査、滅菌状態、培地性能について問題がないか、確認を済ませておくことが望ましい。また、スタンプ培地は製造元の推奨に従って保管されており、サンプリング日から培養期間終了までの間、製造元が保証する保存条件及び有効期限内であることが望ましい。市販のスタンプ培地の円形培養面積は約 25 cm²である。

滅菌手袋を着用し、適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する。

スタンプ培地を均一に被検面に押し付けるための用具（アプリーケーター）を使用する場合、事前に消毒すべきである。サンプリング場所では、スタンプ培地の蓋を無菌的に取り外し、蓋を下にして持ち、もう一方の手でアプリーケーターをターゲット表面に 10 秒間、横に動かさずに押し付ける。

又は、スタンプ培地を親指と人差し指で持ち、培地の底を人差し指で一定の圧力でしっかりと表面に押し付け、10 秒間、横に動かさずに押し続ける。

サンプリング完了後、直ちにスタンプ培地の蓋を閉じ、スタンプが触れた表面にごくわずかな残留物をも残さぬよう、無菌の消毒したワイプで慎重に拭き取る。

F.1.3 運搬及び保管

サンプルを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと。

F.1.4 培養

スタンプ培地の蓋側を下にして、32 ± 1℃のインキュベーターで培養すること。

F.1.5 計数

24 時間及び 48 時間後に寒天培地を検査する。視認できるコロニーが観察される場合、計数しデータを記録する。72 時間時点で最終的なコロニー数を検査し記録する。72 時間時点の最終的な計数を実施するまでスタンプ培地の蓋は開けないでおく。

F.1.6 対照

10 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに，培地面を接触させないことを除き上述の手順に従ったフィールド（採取環境）陰性対照を，少なくとも 1 日あたり 3 個作成すること．

なお，実験室においては，ラボ陰性対照を少なくとも 2 個作成すること．

これらの対照は，試料と同様の方法で分析すること．

F.1.7 機器，試薬及び消耗品

- ・ スタンプ培地
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 恒温器（32 ± 1℃）
- ・ 滅菌手袋

付録 G（参考）エアサンプリングの手順

G.1 エアサンプリング検査法

G.1.1 一般

クリーンルーム内の空気中の微生物汚染度を測るために、吸引式エアサンプラーを使用し、滅菌されたゼラチン膜フィルターに空気を通過させてサンプルを採取する。この試験では、中温性好気性菌が検出される。

注記：他の素材のメンブレンフィルターも適宜使用することができる。

G.1.2 サンプル採取

購入したゼラチンフィルターの購入ロット毎に、製品保証、目視検査、滅菌状態、使用する培地上におけるコロニー形成能について問題がないか、確認を済ませておくことが望ましい。また、フィルターは製造元の推奨に従って保管されており、サンプリング日から培養期間終了までの間、製造元が保証する保存条件及び有効期限内であることが望ましい。

滅菌手袋を着用し、適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する。

サンプルの収集場所において、滅菌されたゼラチンフィルターを包装から無菌的に取り出し、エアサンプラーに取り付ける。ゼラチンフィルターを水平方向になるよう配置して露出させ、30 リットル／分の流量で空気を通過させ、サンプルを採取する。各ゼラチンフィルターで収集する空気の量は 300 リットルを超えてはならない。

サンプル採取後、ゼラチンフィルターをエアサンプラーから無菌的に取り外し、滅菌された輸送容器に包装する。

G.1.3 運搬及び保管

サンプルチューブを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に処理を行うこと。

G.1.4 培養

ゼラチンフィルターのホルダー上部を無菌的に取り外し、寒天培地の表面にフィルターを数秒間押し付けて、フィルターを寒天に付着させ、フィルターホルダーの下部を廃棄する。

シャーレの蓋側を下にして、32 ± 1℃のインキュベーターで培養すること。

G.1.5 計数

24 時間及び 48 時間時点で寒天培地を検査する。視認できるコロニーが観察される場合、計数しデータを記録する。72 時間時点で最終的なコロニー数を検査し記録する。72 時間時点の最終的な計数を実施するまでシャーレの蓋は開けないでおく。

G.1.6 対照

10 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに，エアサンプラーで空気を採取しないことを除き，上述の手順に従ったフィールド（採取環境）陰性対照を，少なくとも 1 日あたり 3 個作成すること．

なお，実験室においては，エアサンプラーで空気を採取しないことを除き，上述の手順に従ったラボ陰性対照を少なくとも 2 個作成すること．

これらの対照は，試料と同様の方法で分析すること．

G.1.7 器具・機器，試薬及び消耗品

- ・ 充電式バッテリー付携帯型エアサンプラー
- ・ 滅菌ゼラチンフィルターユニット（捕集面積 38.5 cm²）
- ・ フィルター運搬用バッグ
- ・ 寒天培地（直径 90 mm）
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ 恒温器（32 ± 1℃）
- ・ 滅菌手袋

G.2 エアサンプリング検査法 2

G.2.1 一般

クリーンルーム内の空気中の微生物汚染度の計測に向けた、培地衝突型エアサンプリング手法について述べる。培地衝突型は、ふるい目状の穴を通して強制的に空気を吸引し、微生物を培地プレート表面に捕集する手法である。この試験では、中温性好気性菌が検出される。

- ・ 培地プレートは基本的に滅菌された 90 mm の TSA 培地プレート又は R2A 培地プレートを使用する。
- ・ ISO14698-1 に準拠した手法を使用すること。

G.2.2 サンプル採取

購入又は作成した培地プレートは、購入ロット毎・作成毎に、製品保証、目視検査、滅菌状態、使用する培地上におけるコロニー形成能について問題がないか、確認を済ませておくことが望ましい。また、培地プレートは製造元の推奨に従って保管されており、サンプリング日から培養期間終了までの間、製造元が保証する保存条件及び有効期限内であることが望ましい。

事前にエアサンプラーの捕集蓋・埃よけカバー等滅菌可能なものはオートクレーブ滅菌すること。滅菌できないものはエタノール等により消毒すること。

滅菌手袋を着用し、適宜 70 % IPA 又は消毒用エタノールで手袋を清拭する。

サンプルの収集場所において、滅菌された培地プレートを包装から無菌的に取り出し、エアサンプラーに取り付ける。培地プレートを水平方向になるよう配置して露出させ、100 リットル／分程度の流量で、ふるい目状の穴を通して強制的に空気を吸引し、微生物を培地プレート表面に捕集する。クリーンルームのレベルに応じて、収集する空気の量は設定すること。例えば、ISO class 8 の場合は、500 L 程度が望ましい。

サンプル採取後、培地プレートをエアサンプラーから無菌的に取り外し、培地プレートをシーリングし、滅菌された輸送容器に包装する。

G.2.3 運搬及び保管

培地プレートを微生物学試験室などの試験施設に運搬し、4～8℃で保管する。サンプルは採取後 24 時間以内に培養を開始することが望ましい。

G.2.4 培養

シャーレの蓋側を下にして、32 ± 1℃のインキュベーターで培養すること。

G.2.5 計数

24 時間及び 48 時間時点で寒天培地を検査する。視認できるコロニーが観察される場合、計

数しデータを記録する。72 時間時点で最終的なコロニー数を検査し記録する。72 時間時点の最終的な計数を実施するまでシャーレの蓋は開けないでおく。ふるい目状の穴を通過する際の衝突効率補正を考慮すること。

G. 2. 6 対照

10 試料（あるいはそれ以下）のサンプル採取ごとに、エアサンプラーで空気を採取しないことを除き上述の手順に従ったフィールド（採取環境）陰性対照を、少なくとも 1 日あたり 3 個作成すること。

なお、実験室においては、エアサンプラーで空気を採取しないことを除き上述の手順に従ったラボ陰性対照を少なくとも 2 個作成すること。

これらの対照は、試料と同様の方法で分析すること。

G. 2. 7 器具・機器，試薬及び消耗品

- ・ 充電式バッテリー付携帯型エアサンプラー（培地衝突型）
- ・ 寒天培地（直径 90 mm, TSA 又は R2A）
- ・ 冷蔵庫（4～8℃）
- ・ クーラーボックス（培地運搬用等）
- ・ 安全キャビネット又はクリーンベンチ
- ・ インキュベーター（32 ± 1℃）

添付：ECSS の引用

JERG-0-057-HB004 Microbial examination of flight hardware and cleanrooms			ECSS-Q-ST-70-55C Microbial examination of flight hardware and cleanrooms		note
Paragraph No.	Paragraph Title (Japanese)	Paragraph Title (English)	Paragraph No. and Title	Sentence quoted	
1	適用範囲	Scope	1 Scope	FULL	
2	関連文書	Normative references	2 Normative references	Full, with some portions tailored for JAXA	
3	用語、定義及び 略語	Terms, definitions and abbreviated terms	3 Terms, definitions and abbreviated terms	Full, with some portions tailored for JAXA	
4	原則	Principles	4 Principles	Full, with some portions tailored for JAXA	
5	要求事項	Requirements	5 Requirements	Full	
付録 A	(規程) 微生物 検査に対する要 求-DRD	Request for microbiological examination - DRD	Annex A (normative) Request for microbiological examination - DRD	Full	
付録 B	(規程) 微生物 検査試験仕様及 び手順 - DRD	Microbiological examination test specifications and procedures (Work Proposal) - DRD	Annex B (normative) Microbiological examination test specifications and procedures (Work Proposal) - DRD	Full	
付録 C	(規程) 微生物 検査試験報告書 - DRD	Microbiological examination test report - DRD	Annex C (normative) Microbiological examination test report - DRD	Full	
付録 D	スワブ検査の手 順	Procedures for swab assays	Annex D (informative) Procedures for swab assays	Full, with some portions tailored for JAXA	Major revision of Section D. 6
付録 E	ワイプ検査の手 順	Procedures for wipe assays.	Annex E (informative) Procedures for wipe assays.	Full, with some portions tailored for JAXA	Major revision of Section E. 6
付録 F	スタンプ培地 (コンタクトプ レート) 法手順	Procedures for contact plates	Annex F (informative) Procedures for contact plates	Tailored for JAXA	
付録 G	エアサンプリン グの手順	Procedure for active air sampling	Annex G (informative) Procedure for active air sampling	Tailored for JAXA	