

平成10年度厚生科学特別研究報告書

医療用具滅菌バリデーションに於けるバイオバーデン菌抵抗性の
変動要因の究明

新谷 英晴、三田 泰弘、東 隆夫

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

医療用具滅菌バリデーションに於けるバイオバーデン菌抵抗性の変動要因の究明

主任研究者

新谷 英晴、国立医薬品食品衛生研究所、室長

研究要旨

SCD培地のロット間ならびに／あるいはメーカー間の差により滅菌保証を達成するためのD値が異なることが報告されている。これらの違いについての現象に関しては既に報告されているが、培地組成のどの成分がD値の差に起因しているのかは十分に明らかにされていない。それが明らかにされれば再現性のある滅菌保証が達成されることになる。我々はSCD液体培地（SCDB）ならびに起源、採取時期、純度等の異なる数種の寒天を用いて作成されたSCD寒天固形培地（SCDA）を用い、寒天がバイオバーデン菌のD値に及ぼす影響を検討した。

その結果SCDB培地あるいはSCDA培地を用いて得られたD値にはISO 11138シリーズ（生物指標製造業者への指針）で容認されている ± 0.5 分以上の有意な差が認められた。SCDBはラベルD値に近似した値を与えた。この結果より寒天がD値を上昇させるらしい可能性は考えられる。同一培地メーカー品で純度の異なる2種の寒天を用いてSCDA培地を作成し、そのD値を測定した結果、寒天がD値ばらつきに与える影響については確認された。ただ寒天の中のどの成分がD値ばらつきに関与しているかの確認は今後の研究課題である。可能性として典型金属（Ca, Mg等）、遷移金属（Fe, Mn, Zn等）、不飽和脂肪酸等の可能性が考えられる。寒天の主成分であるアガロース、アガロペクチンのみでは十分な菌生育は認められなかった。このことから菌生育には寒天中の不純物成分が必須であることを示唆している。これと寒天の純度が増すとD値が下がることとが良く符号している。

SCDBとSCDAの生育性能の差を考える場合、寒天の有無以外にパンクレアチン酵素に拠るカゼイン消化物ならびにパepsin酵素に拠る大豆消化物の組成比の違いと同時にグルコースとリン酸二カリウムの有無などを考慮する必要がある。SCDBとSCDAの成分組成比の違いならびにグルコースとリン酸二カリウムの有無がD値の差に与える影響は今後の課題である。

ISO 11138シリーズならびにISO/DIS 14161（生物指標の使用者への指針）の要求に従いもしBIラベルD値を評価する必要がある場合、SCDB培地でD値を評価すればラベルD値と近似したD値を与えることが判明した。しかし本来はBIメーカーがラベル表示に用いたのと同メーカーの同一ロットの培地を用いるのが一番望ましい。

公称菌数に適した培地は寒天固形培地であるが、寒天の純度の違いでSCDA培地の生育性能がばらつくため公称菌数測定にはBIメーカーの推奨するSCDA培地の使用が推奨される。もしそれが不可能な場合はBBL寒天培地以外の市販寒天培地を推奨するが、

それは使用者でバリデートされたい。

A. 研究目的

滅菌バリデーションとは再現性のある科学的根拠を求める実験である。

滅菌バリデーション実施において生物指標の抵抗性（D値）の測定は滅菌保証を確保する上に於て重要である。ISO/DIS 14161に拠ればBIラベルのD値を使用者が確認することは要求されない。滅菌バリデーション研究で使用者に要求されるのは滅菌器内のコールドスポットに置かれたBIの再現性のある死滅を確認し、滅菌保証達成の再現性を確認することである。その際用いたBIの抵抗値に再現性がなければ実滅菌器での滅菌保証の再現性は得られないことになる。

D値測定に関し、ISO/DIS 14161に拠れば、ソイビーンカゼイン消化物液体培地（SCDB）あるいはソイビーンカゼイン寒天固形培地（SCDA）の何れを用いても良いことになっている²⁾。それゆえ両者の何れを用いても得られるD値は同じでなければならない。しかしながら両者で得られるD値が異なる可能性が考えられる。なぜなら培地製造メーカーの違いに拠り得られるD値が異なることが既に報告されており（表1）¹⁾、培地メーカーの違いや同一メーカーでのロット間の違いで異なる滅菌バリデーション結果が得られる可能性が考えられる。

そこで今回著者らは培地メーカーが異なることに拠りD値がばらつく原因の究明、ならびに現実的な再現性の得られる滅菌保証を達成する方法について検討した。

B. 研究方法

1) 培地

用いたSCDBならびにSCDAの培地組成を表2に示した。

2) SCDBを用いた実験

2) - 1 SCDBの調製

ばらつきの原因を調べるために種々の生産国の牛乳から日本製薬（株）で調製したカゼイン製ペプトン（生産国：A、B、C）、種々の製造メーカーから購入した大豆製ペプトン（製造メーカー：X、Y、Z）の組み合わせから表3に示した9種類のSCDB液体培地を調製した。他のグルコース、リン酸二カリウム等の成分は日局グレードの同一ロット品を使用した。

カゼイン製ペプトンはパンクレアチン酵素で消化し、一定のアミノ態窒素量が得られた段階で消化を停止している。大豆製ペプトンはパパイン酵素で既に消化されている各社製品を購入し、本実験に用いた。

2) - 2 生物指標（BI）

市販の同一BIメーカー（ロット番号 S53003ならびにS53402）のペーパーストリップ型BI（*Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953、NAmsA SPORTROLR STS-05, 10⁵個/ろ紙担体、米国）を使用した（表4）。BIのロットを変えた理由は同一BIメーカーでのBIロット間のD値ならびに公称菌数のばらつきを確認するためであ

る。

2) - 3 D値測定

蒸気加熱滅菌用BIER (Biological indicator evaluator resistmeter、生物指標評価装置、Joslyn Co. Ltd., 米国) を用い、121.1°Cで蒸気加熱滅菌した場合のD値を測定した。

D値測定は部分生残に相当する暴露時間で1回の測定に50枚のBIを用い、制限スタンボマーフィーコクラン法 (LSMCP) を用いて算出した²⁾。

2) - 4 培養

57.5[±]1°Cで7日間培養した。培養期間はバリデーション結果に基づいた。

2) - 5 D値評価方法

ISO 11138-1の規定に従い[±]0.5分の範囲とした²⁾。

3) SCDAを用いた実験

3) - 1 SCDAの調製

同じ寒天メーカーで純度の異なる寒天 (寒天D、E) を用いて2種類のSCDAを調製した (表5)。他の成分は日局グレードの同一ロット品を使用した。

上に記した調製SCDA培地と同時に市販SCDA培地 (X社、Y社製) も用いてD値を測定した。

3) - 2 生物指標 (BI)

市販の同一メーカー、同一ロット (ロット番号S53402) のペーパーストリップ型BI (*Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953、NAmsA SPORTROLR STS-05, 10⁵個/ろ紙担体、米国) を使用した (表4)。

3) - 3 D値測定

蒸気加熱滅菌用BIERを用い、121.1°Cで蒸気加熱滅菌した場合のD値を測定した。

D値測定は生残曲線法を用いて算出した²⁾。

3) - 4 BIの初期菌数の測定

毎分10、000回転で攪拌し、ろ紙と芽胞菌とを分離し、菌数を段階希釈し、調製したSCDAで測定した³⁾。

3) - 5 培養

57.5[±]1°Cで5日間培養した。

3) - 6 評価方法

D値に関してはISO 11138-1の規定に従い[±]0.5分の範囲とした。初期菌数に関しては同様にISO 11138-1の規定に従いラベル公称数の-50%~+300%を許容範囲とした²⁾。

3) - 7 成分組成の分析

カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトン中に含まれる各種アミノ酸量、アミノ態窒素量ならびにイオン量をそれぞれアミノ酸測定キット (和光純薬 (株)) あるいは高速液体クロマトグラフィー法、バンスライク法 (常法に従う) ならびにイオンクロマトグラフィー法で測定した。

寒天中に含まれるイオン量を高速液体クロマトグラフィー法ならびにイオンクロマトグラフィー法で測定した。

カゼイン製ペプトン、大豆製ペプトンならびに寒天のゲルろ過パターンについては水系GPCを用いてパターン分析を行った。

C. 結果及び考察

1) 表3に示した調製SCDBを用いた場合の公称ラベルD値と実験値との比較

BIロット番号S53003ならびにS53402のラベル記載値（菌数公称数、D値）を表6、7に示した。今回調製したSCDB液体培地ではISO 11138の許容範囲である ± 0.5 分を越える有意なD値のばらつきは認められなかった（表6）。BIロット間でも今回用いた2ロットに限定して言えば有意なばらつきはなかった。またBIロットS53402を用いて繰り返し実験を行った結果、繰り返しの再現性は良かった。

今回の実験で調製し、検討したSCDB液体培地の範囲に限定して言えることはカゼイン製ペプトンの産地及び大豆製ペプトンの製造メーカーの違いがD値測定に及ぼす影響は顕著でないと考えられる。

2) 市販SCDA培地を用いたBIラベル公称数の確認

BIラベル記載値は表4に示したとおりである。これらの公称数を市販SCDA（DIFCO（株）、米国）培地を用い、文献3の攪拌法ならびに寒天平板混釈法を用いて求めた菌数の結果を表7に示した、

これらの結果から実験値はISO 11138-1で許容されている公称数の $-50\% \sim +300\%$ の範囲に入っていることが判明した。

ISO/DIS 14161に拠るとラベル公称数は回収数を記載することになっている。また通常芽胞菌添加数は約20~80%増しに添加されているので、ISO 11138-1規格の範囲を逸脱する可能性は殆ど考えられない。しかし過去他のBIメーカーでラベル記載値を越えた回収数が得られたケースもあった⁴⁾。

3) 市販SCDAを用いて得られた公称数の結果

測定方法は前述の方法と同じで培地のみ市販SCDA培地（X、Y社製）を用いた。その結果得られた公称数を表8に示した。Y社製の場合は公称数の -50% を逸脱するケースであり、これは許容範囲外培地である。

市販品の場合X社製とY社製とで公称数に大きな差が生じることが確認できた。このことから寒天の性状の差がD値のばらつきに起因している可能性が示唆される。

4) 表5に示した調製SCDAを用いた場合の公称ラベルD値と実験値との比較

BIロット番号S53402のラベル記載値（菌数公称数、D値）は既に表4に示したとおりである。

今回調製したSCDA寒天固形培地で得られたD値を表9に示した。これらの結果から得られたD値でSCDA-寒天D培地と市販X社SCDA培地とはいずれも公称値より1分以上

高いことが判明した。SCDA-寒天E培地と市販Y社SCDA培地は実際は同一メーカーの同一培地であり、これはD値の再現が良いことを示している。

SCDA-寒天D培地とSCDA-寒天E培地との差は同一メーカーでの寒天の純度の差であり、寒天Dの方が純度は低い。すなわち精製されていない寒天培地であることを示している。寒天Dを酸（硫酸あるいはりん酸）で加水分解し、その後化成ソーダ（NaOH）で中和したものが寒天Eである。両者の金属イオン量を表14に示す。SCDA-寒天D培地とSCDA-寒天E培地とのD値の差ならびに市販X社製SCDA培地と市販Y社製SCDA培地との差はISO 11138-1の許容範囲（ ± 0.5 分）を越えている。表9に示した全ての結果から培地間に最大1.36分の有意なD値の差があることが判明した。

今回実験に用いた表5の自作SCDA寒天固形培地以外に市販のSCDA寒天固形培地も同時に実験した（表9のX、Y社製SCDA培地）。X、Y社製SCDA培地での平均D値の差は1.02分であり、これもISO 11138-1の許容範囲を越えており、有意な差であると考えられ、本実験結果は市販培地を用いて”ばらつき”を示したグラハムらの実験結果を支持するものである¹⁾。Y社製SCDA培地はラベルD値に近似するが（表9）、表8に示した公称数はISO 11138-1規格から逸脱する。つまりY社製SCDA培地は生育性能の良くない培地と言える。

市販Y社製SCDA培地は公称菌数の点でISO規格範囲外培地製品であり、市販X社製SCDA培地はD値の点でISO規格範囲外培地製品である。

今回の実験で調製し、検討した培地（調製SCDA-寒天D、E培地）の範囲に限定して言えることは寒天純度の違いがD値測定に及ぼす影響は顕著であることが推察される。しかしながら寒天成分の何がD値ばらつきに寄与しているかはこれからは判断できない。今後の研究課題である。

表6と表9を比較した結果、ラベルD値を追認する場合はSCDA寒天固形培地ではなく、SCDB液体培地を用いる必要があると推定する。しかし厳密に言えば、もしラベルD値を追認する必要が生じた場合には⁴⁾、ISO/DIS 14161では情報提供をBI製造メーカーに求め、BI製造メーカーがラベル表示に用いた同一培地メーカーの同一ロットを使用する必要がある。その理由は培地メーカー間の差ならびにロット間の差が確認されているためであり¹⁾、BIメーカーがラベル表示に用いたのと同じ培地メーカーの同一ロットを用いないと正確な意味でラベルD値を追試したことにはならない。しかし現実にはBIメーカーがラベル記載に用いたのと同じメーカー、同一ロットの培地が入手できるかどうかは定かではない。それゆえ表6、9の結果から言えることは生物指標ラベルD値確認の目的にはSCDA寒天固形培地を用いることは避けた方が良く、SCDB液体培地を用いる方がラベルD値に近い値を与えると言える（表6）。

しかしここで判然としない点はBIメーカーの一つであるNAmsA Co. Ltd.はSCDB液体培地を用いて部分生残法でD値を算出し、一方Raven Co. Ltd.はSCDA固形培地を用いて生残曲線法でD値を算出しながら両者ともほぼ同じ2分のD値をラベルに記載している。本事実が判明したため、将来の実験で両者のBIの抵抗性に差がないかどうかを調べる予定にしている。

SCDB液体培地を用いた場合のD値測定法としては部分生残法（主としてスタンボマー

フィーコクラン法)に限定される²⁾。ここで部分生残法と生残曲線法の間には有意なD値の差はないが、後者の方が若干低く出ることが予想される⁵⁾。それゆえSCDB培地とSCDA培地でのD値を比較する場合はD値測定法を同一にし(SCDAは生残曲線法と同時に部分生残法も可能であるため、SCDBで可能な部分生残法の適用が望ましい)、培養期間はバリデートされた期間を採用するのが望ましい。培養期間のバリデートの方法については既述した^{6, 7)}。

表10ではカゼイン製ペプトンの産地を変えてSCDB培地ならびにSCDA培地を5種類(GからK社まで)作成し、SCDB培地の場合は前者の場合はスタンボマーフィーコクラン法を用いて、SCDA培地の場合は生残曲線法を用いてD値を測定した。表10のSCDB培地の結果は表6の結果と類似し、表10のSCDA培地の結果は表9の寒天D培地ならびに市販X培地の結果と類似した結果を与えた。表10の結果から言えることはカゼイン製ペプトンの産地を変えて作成されたSCDB培地ならびにSCDA培地を用いて得られたD値のばらつきは顕著ではなかったが、SCDB培地とSCDA培地の間でのD値は有意に認められ、これはISO 11138が許容する許容範囲 ± 0.5 分を越えていた。ラベルD値に近い値を与える培地はSCDB培地であった。

各種市販カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトン中に含まれる各種アミノ酸量、アミノ態窒素量ならびにイオン量をそれぞれ表11~13に示した。多少のばらつきは認められるが、メーカー間に顕著な差がないことが分かる。

市販カゼイン製ペプトン、大豆製ペプトンならびに寒天の水性GPCによるゲルろ過パターンでもパターンで見ると顕著な差は認められなかった。相対分子量は1000ダルトン以下が主でこれはアミノ酸として3~5個程度つながったペプチドに相当する。それゆえ高速液体クロマトグラフィーでの分析も充分可能である。

結局以上行ったマクロな分析では微生物が栄養要求するレベルのミクロな分析は可能ではないのかもしれない。

D. 結論

SCDB培地とSCDA培地を用いて得られたD値の間には1分以上の有意な差が認められた。これは培地成分組成の差(例えばグルコース、リン酸二カリウム)の有無(表2参照)あるいはカゼイン製ペプトン、大豆製ペプトンの組成比(表2参照)の差に拠るのかもしれない。これらについては今後検討する予定である。

文献1で示したグラハムらの結果は表9の市販X、Y社SCDA培地のD値で示したとおりのばらつきを示すことがわかった。同時に表9に示したとおり寒天に関して言えば寒天D、Eで作成されたSCDA寒天固形培地のD値の間には有意な差が認められた。このことから市販SCDA培地でのD値の差(表9の市販X、Y社SCDA培地のD値)は寒天の純度の差に由来すると考えられる。同時にSCDA培地と前二者の培地とでは表2に示したとおり成分組成ならびに組成比も異なるため必ずしも寒天純度のみで一義的に議論できない。組成比のみならず、リン酸二カリウムあるいはグルコースの有無の可能性も同時に考慮する必要がある。

表9に示した市販SCDA培地(市販X、Y社製)のD値の差の原因を究めるのが本来の

研究の目的であった。一応その差の原因として寒天の純度の可能性が考えられる（表9、14）。しかしSCDA培地に大豆製ペプトン消化物メーカーあるいは消化時間を変えてばらつきを与えるかどうかを確認する必要があると考える。

カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトンの成分分析の結果からも市販製品間に顕著な差は認められなかった。カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトンの水系GPCのゲルろ過パターンのパターン分析でも市販製品間に顕著な差は認められなかった。大豆製ペプトンには内分泌攪乱物質としてイソフラボノイド、植物ステロール、クメスタンを含む植物エストロゲンが含まれている。これらの量の違いがSCD培地のメーカー間、同一メーカーのロット間の差になった可能性も否定できない。本件に関しては今後検討する必要がある。

表10に示すとおり自作SCDBと自作SCDAとでは得られるD値が1分以上異なる。それゆえラベル表示に使用した培地をBIメーカーに確認し、それと同一メーカーの同一ロットを使用する必要がある。さもないとラベルD値は追認されない可能性がある。BIメーカーがレベルに記載した際用いたのと同じ培地メーカーの同一ロット培地が使用できない場合、あるいはその様な情報がBIメーカーから入手できない場合は、表6、10で示した著者らの実験結果から、SCDB液体培地を用いスタンボマーフィーコクラン法でD値算出をすることを勧める。

実際の滅菌保証に於いてはバリデーション研究で滅菌保証が達成されるBI条件を確立し^{6,7)}、そのBIロットを日常管理に用い、BIロット、メーカーあるいは種類を変更する場合は、バリデーション研究で滅菌保証の達成が確認されているBIと抵抗性等の相関が得られるBIを採用すれば滅菌保証の連続性は確保される。必要な場合、変更を予定しているBIとバリデートされたBIとを同時に滅菌器内のコールドスポットに入れて両者で同じ滅菌保証が達成されることを確認すればより確実となり、ラベル記載値の確認も不要となる。

E. 謝辞

本実験を行うにあたり御協力頂いたエーザイ（株）佐々木 公一氏、蒲川 拓治氏、森 由美氏、日本ペクトンデケンソン（株）伊藤 潤平氏、日本製薬（株）西浦 寿一氏、テルモ（株）高橋 正毅氏、渋谷工業（株）小久保 護氏、K2インターナショナル（株）数馬 昂始氏に深く謝意を表す。

F. 参考文献

- 1) Boris, C. and Graham, G.: Medical device and diagnostic industry, The effect of recovery medium and test methodology on biological indicators (1985).
- 2) 古橋正吉（監修）、新谷英晴（編集）：医療用品の滅菌方法／滅菌バリデーション／滅菌保証、日本規格協会、東京（1996）。
- 3) Shintani, H., Tahata, T. and Takahashi, M.: Biomed. Instrum. Technol., 29, 113-124 (1995)。

4) 柴崎 勲 (監修)、環境衛生管理技術体系、第2巻、有害微生物管理技術、フジテクノシステム、東京、作成中。

5) 新谷英晴、高橋正毅：防菌防黴、23、195 (1996)。

6) 新谷英晴、数馬昂始：防菌防黴、26、309-320 (1998)。

7) 新谷英晴、防菌防黴：25、703-709 (1997)。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 新谷英晴、防菌防黴：26、385-393 (1998)。

2. 新谷英晴、防菌防黴：26、453-465 (1998)。

3. 越川富比古、新谷英晴、防菌防黴：26、511-520 (1998)。

4. 新谷英晴、Pharmatech Japan：14、1173-1179 (1998)。

5. 仲谷満子、新谷英晴：防菌防黴：26、580 (1998)。

6. 新谷英晴、医科器械学会：68、478-479 (1998)。

7. 新谷英晴、数馬昂始：防菌防黴、26、309-320 (1998)。

8. 新谷英晴、数馬昂始：防菌防黴、26、629-638 (1998)。

9. 新谷英晴：防菌防黴、26、647-656 (1998)。

10. 新谷 英晴、佐々木 公一、森 由美、梶原 庸生、田中 敦子、東 隆夫、高橋 正毅、小久保護、林 秀雄、防菌防黴、27、(1998)。

2. 学会発表

1. 新谷 英晴、佐々木 公一、森 由美、梶原 庸生、田中 敦子、東 隆夫、高橋 正毅、小久保護、林 秀雄、滅菌保証に於ける培地のばらつきに関する研究、防菌防黴学会、東京、5/26 (1998)。

2. 新谷 英晴、医療機関に対する滅菌保証のISO要求事項の総括、医科器械学会、横浜、6/5 (1998)。

3. 新谷 英晴、佐々木 公一、森 由美、梶原 庸生、田中 敦子、東 隆夫、高橋 正毅、小久保護、林 秀雄、滅菌保証の連続性を達成するために要求される事項について、大阪、PDA Asia Symposium、2/6 (1999)

表1 SCDB, SCDAならびにSCDB/A培地の培地メーカー
ならびにロット間（2ロット）に拠るD値（分）の相違

培地メーカー	LOT	SCDB	SCDB/A	SCDA
L	A	0.86	1.18	0.84
	B	1.30	1.80	0.98
M	A	1.10	2.48	1.84
	B	1.34	2.68	1.94
N	A	1.52	2.12	3.07
	B	1.31	1.93	2.33
Y	A	2.16	2.46	2.10
	B	1.61	2.35	2.06

Bacillus stearothermophilus ATCC 7953 芽胞を使用。121.1℃,
10分間BIERで高圧蒸気滅菌を行う。60℃, 7日間培養。

表 2 培地組成（単位 g/L）

組成	SCDB	SCDA
カゼイン製ペプトン	17.0	15.0
大豆製ペプトン	3.0	5.0
食塩	5.0	5.0
燐酸1水素2カリウム	2.5	—
ブドウ糖	2.5	—
寒天	—	15.0

培地滅菌後のpHを7.1～7.5に調整。

表 3 調製したSCDB培地組成

培地	カゼイン製ペプトン	大豆製ペプトン	他の成分
1	生産国: A	X社	日本局方グレード
2	生産国: A	Y社	日本局方グレード
3	生産国: A	Z社	日本局方グレード
4	生産国: B	X社	日本局方グレード
5	生産国: B	Y社	日本局方グレード
6	生産国: B	Z社	日本局方グレード
7	生産国: C	X社	日本局方グレード
8	生産国: C	Y社	日本局方グレード
9	生産国: C	Z社	日本局方グレード

表 4 生物指標 (BI) ラベル記載値

ロット	S53003	S53402
公称菌数	1.8X10 ⁵ 芽胞個/枚	1.7X10 ⁵ 芽胞個/枚
D値 (121.1 °C)	1.9分	1.9分

製造者 : NAmSA, USA

品番 : STS-05, 10⁵個/枚添加されているという意味。

表 5 調製したSCDA培地組成

組成	SCDA	SCDA
カゼイン製 ペプトン	生産国:A	生産国:A
大豆製 ペプトン	X社	X社
食塩	日局グレード	日局グレード
寒天	D	E
市販X社製SCDA		
市販Y社製SCDA		

表 6 表3に示したSCDB培地組成を用いて得られたD値(分)

生物指標ロット	S53003	S53402 (1回目)	S53402 (2回目)	
培地 試験回数	D値(分)	D値(分)	D値(分)	
1	1回目	1.91	2.23	2.06
	2回目	1.91	2.20	2.08
2	1回目	1.84	2.27	1.84
	2回目	1.78	2.01	1.86
3	1回目	1.72	2.15	1.94
	2回目	1.80	2.00	1.99
4	1回目	2.05	2.67	2.25
	2回目	2.10	2.07	2.19
5	1回目	2.05	2.19	2.30
	2回目	2.20	2.22	2.30
6	1回目	2.14	2.12	2.18
	2回目	2.19	2.08	2.16
7	1回目	2.04	2.14	2.40
	2回目	2.17	2.14	2.35
8	1回目	2.07	2.28	2.21
	2回目	2.18	2.32	2.30
9	1回目	1.99	2.20	2.20
	2回目	2.10	2.14	2.11

表 7 生物指標 (BI) の公称菌数確認結果
(各n=10)

BI	S53003	S53402
1	177300	225000
2	158000	210000
3	173000	229000
4	149000	233000
5	172000	234000
6	189000	193000
7	165000	163000
8	163000	214000
9	173000	192000
10	176000	211000
平均	167000	210000
S.D.	11201	22431
C.V(%)	6.7	10.7

表 8 生物指標 (BI, Lot S53402) の初期菌数測定結果

培地	1回目	2回目	平均
	cfu/枚	cfu/枚	cfu/枚
市販X社SCDA	156000	138000	147000
市販Y社SCDA	66000	94000	80000

公称数 (DIFCO Co. Ltd, SCDA使用) 170000

公称数の許容範囲 -50~+300% (ISO 11138-1)、

それゆえ市販Y社SCDAは許容限度以下の生育性能培地。

表 9 生物指標 (BI, Lot S53402)
のD値測定結果

培地	平均 D値 (分)
SCDA-寒天D	3.29
SCDA-寒天E	1.93
市販X社SCDA	3.25
市販Y社SCDA	2.23

ラベルD値 (DIFCO Co. Ltd, SCDA使用) 1.90分
D値の許容範囲 ± 0.5 分 (ISO 11138-1),
それゆえSCDA-寒天D培地と市販X社SCDA培地は許容限度外。

表 10 SCDBならびにSCDA培地を用い、
測定法を変えて得られたD値 (分)

カゼイン製ペプトン D値測定方法	SCDB SMCP ¹⁾	SCDA EN ²⁾
G社	2.29	3.03
H社	2.03	3.03
I社	2.13	2.79
J社	2.06	2.91
K社	2.10	2.94

1) 部分生残法 (スタンボマーフィーコ克蘭法)

2) 生残曲線法

表 11 A社製カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトンの成分組成

組成	大豆製ペプトン	カゼイン製ペプトン
窒素 (%)		
総量	9.7	13.2
アミノ酸総量 (%)	1.7	4.4
無機質 (%)		
塩化ナトリウム	5.2	2.8
灰分	12.1	6.2
カルシウム	0.3	0.03
銅	0.00003	0.0001
鉄	0.004	0.001
カリウム	3.0	0.07
マグネシウム	0.24	0.01
マンガン	0.0002	0.007
ナトリウム	2.14	2.48
リン	0.25	0.9
イオウ	0.46	0.3
亜鉛	0.0002	0.003
炭水化物 (%)	35.0	微量
アミノ酸 (%)		
アラニン	2.5	2.5
アルギニン	3.8	3.0
アスパラギン酸	7.2	5.8
シスチン	0.7	0.5
グリシン	2.6	1.6
グルタミン酸	12.7	18.3
ヒスチジン	1.2	2.2
イソロイシン	2.1	4.2
ロイシン	3.9	7.8
リジン	3.4	6.6
メチオニン	0.6	2.5
フェニルアラニン	2.0	3.7
プロリン	3.0	8.8
セリン	3.0	4.5
スレオニン	2.3	3.4
トリプトファン	0.2	1.0
チロシン	1.6	1.4
バリン	2.5	5.4

表 1 2 B社製カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトンの成分組成

組成	大豆製ペプトン	カゼイン製ペプトン
窒素 (%)		
総量	9.2	13.0
アミノ酸総量 (%)	2.4	4.4
無機質 (%)		
塩化ナトリウム	3.2	3.2
灰分	15.1	6.2
無機質 (ppm)		
カルシウム	300	410
マグネシウム	2000	340
カリウム	31000	930
ナトリウム	29000	21000
アミノ酸 (mg/g)		
アラニン	22.7	25.5
アルギニン	35.4	30.0
アスパラギン酸	82.6	85.0
シスチン	5.7	2.5
グリシン	5.6	2.6
グルタミン酸	111.0	207.3
ヒスチジン	11.2	20.2
イソロイシン	23.7	45.7
ロイシン	3.9	7.9
リジン	3.3	6.8
メチオニン	6.2	2.3
フェニルアラニン	23.2	37.4
プロリン	26.0	92.8
セリン	25.0	44.5
スレオニン	18.3	31.4
トリプトファン	2.6	4.7
チロシン	16.5	17.4
バリン	2.5	56.1
分子量分布 (%)		
1万以上	0	0
1万~5000	0	0
5000~2000	0	0
2000~1000	7.4	16.4
1000以下	92.6	83.6
平均分子量	366	537

表 13 C社製カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトンの成分組成

組成	大豆製ペプトン	カゼイン製ペプトン
アミノ酸総量 (%)	2.4	4.4
塩化ナトリウム (%)	5.2	5.8
全窒素量 (%)	9.0	13.0
イオン (ppm)		
銅	0.5	0.9
鉄	27.2	12.5
カリウム	23800	530
マグネシウム	1500	255
ナトリウム	24000	15000
アミノ酸 (mg/g)		
アラニン	26	24
アルギニン	44.8	28.0
アスパラギン酸	77.2	53.8
シスチン	7.0	2.5
グリシン	26	16
グルタミン酸	127	173
ヒスチジン	14.8	23.2
イソロイシン	27.1	42
ロイシン	45.9	70.8
リジン	39.5	35.6
メチオニン	6	22.5
フェニルアラニン	27.0	37.7
プロリン	31.0	52.8
セリン	33.0	40
スレオニン	25.3	32.4
トリプトファン	4.4	13.0
チロシン	18.6	24.4
バリン	30.5	49.5

表14 寒天の金属イオン濃度 (ppm)

寒天	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	K
寒天D	2568.6	1275.7	11,181	38.1	<1.0	<1.0	2.5	417
寒天E	95.7	65.3	24,343	20.6	<1.0	<1.0	3.7	1242

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）
分担研究報告書

医療用具滅菌バリデーションに於けるバイオバーデン菌抵抗性の変動要因の究明に関する研究

分担研究者 東 隆夫 日本製薬（株）ライフテック部部长

研究要旨

ISO（国際規格）TC（技術委員会）198（医療用品の滅菌）のWG4（作業部会4、生物指標）で作成された規格であるISO 11138-1,2,3ならびにISO/DIS（国際規格案）14161に拠れば、生物指標（BI）を用いて滅菌保証するに際し、SCDB（大豆カゼイン消化液体）培地もSCDA寒天固形培地（SCDA培地）の使用も容認されている。それゆえ両培地を用いて得られたD値（decimal reduction value）は同じでなければ信頼できる滅菌保証は達成されない。しかし実際には培地の違いでD値が異なることが判明した。ところでD値算出のためには5～7日間の培養と菌数測定等を要する。それを培地添加後の数時間の芽胞発芽率ならびに増殖能の結果から推定できないかどうかについて調べた。その結果D値と培養7時間後の増殖率の結果との間には良好な相関が認められた。

A. 研究目的

医療用具滅菌バリデーションは平成9年7月1日より実施され、査察用件となった。ISO TC 198のWG4（生物指標）で作成された規格であるISO 11138-1,2,3ならびにISO/DIS14161に拠れば、生物指標（BI）を用いて滅菌保証するに際し、SCDB培地もSCDA培地の使用も容認されている。それゆえ両培地を用いて得られたD値は同じでなければ満足いく滅菌保証は達成されないことになる。しかし現実には培地の違いでD値が異なることが知られている。D値算出のためには5～7日間の培養と菌数測定等を要する。それを培地添加後の数時間の芽胞発芽率あるいは増殖能の結果で推定可能かどうかについて検討した。

B. 研究方法

1) 芽胞作成方法

1) - 1 芽胞作成培地

今回の実験では以下の組成の芽胞作成培地を使用した

カゼイン製ペプトン	10g
酵母抽出物	2g
寒天	15g
MnCl ₂ ・4H ₂ O	55mg
CaCl ₂ ・2H ₂ O	150mg

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.3mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250mg
蒸留水	1000ml

1) - 2 芽胞作成培作成方法

操作の手順は以下のとおりでaからdの順番に実施した。

a MnCl₂ · 4H₂Oを2.75g、MgSO₄ · 7H₂Oを12.5g、FeSO₄ · 7H₂Oを15mg秤量し、それらを0.01Nの塩酸500mlに溶解させ、121℃で20分間高圧蒸気滅菌した。

b CaCl₂ · 2H₂Oを7.5g秤量し、それを500mlの0.01N塩酸に溶解させ、121℃で20分間高圧蒸気滅菌した。

c カゼイン製ペプトンを10g、酵母抽出物を2g、寒天を15g秤量し、それらを精製水980mlに溶解させ、121℃で20分間高圧蒸気滅菌した。

d Cの溶液を攪拌しながら、a,bをそれぞれ10mlずつ加えた。

1) - 3 使用菌液

N Am S A社 孢子懸濁液蒸気滅菌用懸濁液 (菌株、*Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953、菌数10⁵ cfu/ml)

1) - 4 芽胞集菌方法

以下の方法で行った。実施順序は1) から13) の順に実施した。

- 1) 培地を作成しシャーレに約40mlずつ固める。
- 2) 前培養した菌液をシャーレに約0.1mlずつ塗抹する。
- 3) 55℃で7日間培養する。
- 4) 培養後、シャーレに精製水を入れ、エーゼで菌を掻き取る。
- 5) ピペットで菌液を吸い取り、遠心管にまとめる。
- 6) 遠心を行う (12000rpm、15分間、4℃)。
- 7) 上清を捨て、沈殿物の表面をピペティングを行い、削り洗う。
- 8) 精製水を入れ、沈殿物を混濁する。
- 9) 遠心を行う (12000rpm、20分間、4℃)。
- 10) 7)~9)の操作を少なくとも4回繰り返す。
- 11) 沈殿物を10mlの遠心管1本に集める。
- 12) 6)~8)の操作を少なくとも2回繰り返す。
- 13) 冷蔵保存する。

注) 操作はすべて、冷却化で行う。

操作中に位相差顕微鏡で芽胞の状態を確認する (光っていれば生きた芽胞の存在を意味する)。

2) 発芽率測定

2) - 1 試料作成