

以下の操作を1から2の順に実施する。

- 1) 試験を行うSCDB培地を準備する。
- 2) L字管にSCDB培地を3mlずつ入れ (N=4)、121℃で20分間高圧蒸気滅菌した。

2) - 2 菌濃縮液作成

以下の操作を1から5の順に実施する。

- 1) 集めた菌液を90℃、20分間加熱する。これはヒートショック操作でこれで芽胞菌以外の菌を死滅させる。
- 2) 冷却後、遠心する。(12000rpm、20分間、4℃)。
- 3) 上清を捨て、精製水を約2ml入れる。
- 4) 菌液を混濁し、濁度をバイオスキャナーで測定する。
- 5) 濁度が吸光度として0.4~0.6に成るように菌液の濃度を調整する。

2) - 3 発芽率測定

以下の操作を1から3の順に実施する。

- 1) 試料溶液に調整した菌液を30μl添加する。
- 2) 菌液を添加していない試料をバイオスキャナーに入れ、0点を補正する。
- 3) 菌液を添加した試料を2)と入れ替え濁度の変化を測定する。

2) - 4 発芽率 (G t) の計算

下記の計算式に当てはめて測定する。

$$G_t = \frac{a_0 - a_t}{K \times a_0} \times 75$$

G_t = 発芽用培地の t 時間培養後における発芽率。

a_0 = 芽胞を接種されたときの培地の吸光度 (培養0時間)。

a_t = t 時間培養後の芽胞含有培地の吸光度。

K = 吸光度が最低に達したとき (100%) 発芽の $a_0 - a_t$ に対する $a_0 - a$ (芽胞の発芽による定数) = 0.411

75 = 培養後の発芽率が75%であることに由来する。

(Kの求め方)

吸光度が最低に達した場合の $a_0 - a_t$ 対 a の比を5段階の芽胞濃度で測定し求める。

C. 研究結果

カゼイン製ペプトン(PE)の産地と、大豆製ペプトン(PE-S)のメーカーを変えたSCD培地(SCD-B)の組成を以下に示した。単位はグラムである。それらの発芽率の結果を表1ならびに図1に示した。

		検体番号								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
PE	産地a	17.0	17.0	17.0	-	-	-	-	-	-
	産地b	-	-	-	17.0	17.0	17.0	-	-	-
	産地c	-	-	-	-	-	-	17.0	17.0	17.0
PE-S										
	メーカーd	3.0	-	-	3.0	-	-	3.0	-	-
	メーカーe	-	3.0	-	-	3.0	-	-	3.0	-
	メーカーf	-	-	3.0	-	-	3.0	-	-	3.0
食塩		全て5.0								
リン酸2カリウム		全て2.5								
注用ブドウ糖		全て2.5								

寒天のメーカーを変えたSCD寒天培地(SCD-A)組成での結果を以下に示した。単位はグラムである。発芽率の結果を図2に示した。

	J	K	L
PE	15	15	15
PE-S	5	5	5
食塩	5	5	5
寒天	15	15	15
寒天メーカー	G	H	I

SCDA培地の場合図2の上に示した発芽率の観測からは寒天の違いに拠る有意な吸光度の差は認められなかった。

一方図2の下に示した増殖能の実験からは寒天Kを含むSCDA培地は有意に高い吸光度を示した。この培地で得られたD値は3.7分と他の培地より0.6分程高かった。このことは5～7日間培養を要するD値の測定がバイオスキャナーでの400分(約7時間)程の増殖の結果から推定が可能であることを意味する。すなわち、具体的なD値の測定は不可能であるが、D値の高低の推定が7時間くらいの増殖能の結果から推定が可能であることが判明した。

D. 結論

SCD-BとSCD-Aの発芽率には差があるが、PE、PE-Sの産地、寒天のメーカーによる顕著な差は見られない。このことはSCDB培地とSCDA培地のD値の差と一致した。PE、PE-Sの産地による顕著な差が見られないこともD値の結果と一致する。これらの

結果から培養7時間位のバイオスキャナーでの増殖能の結果から培養5～7日目のD値の高低の結果を推定できることになり、培養5～7日後のD値の結果と培養7時間位のバイオスキャナーでの増殖の結果とは良く一致していた。しかし培養7時間位のバイオスキャナーでの増殖能の結果からは具体的なD値は得られない。D値の測定には生残曲線法を用いるにしても部分生残法を用いるにしても5～7日間位の培養は必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

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、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)。

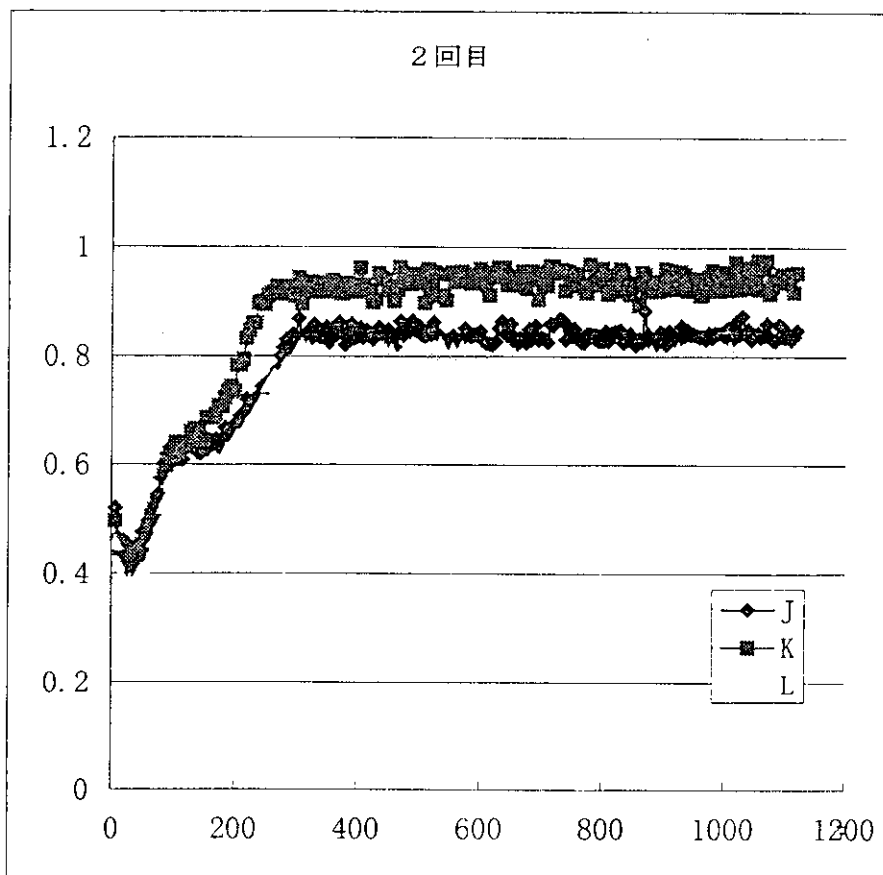
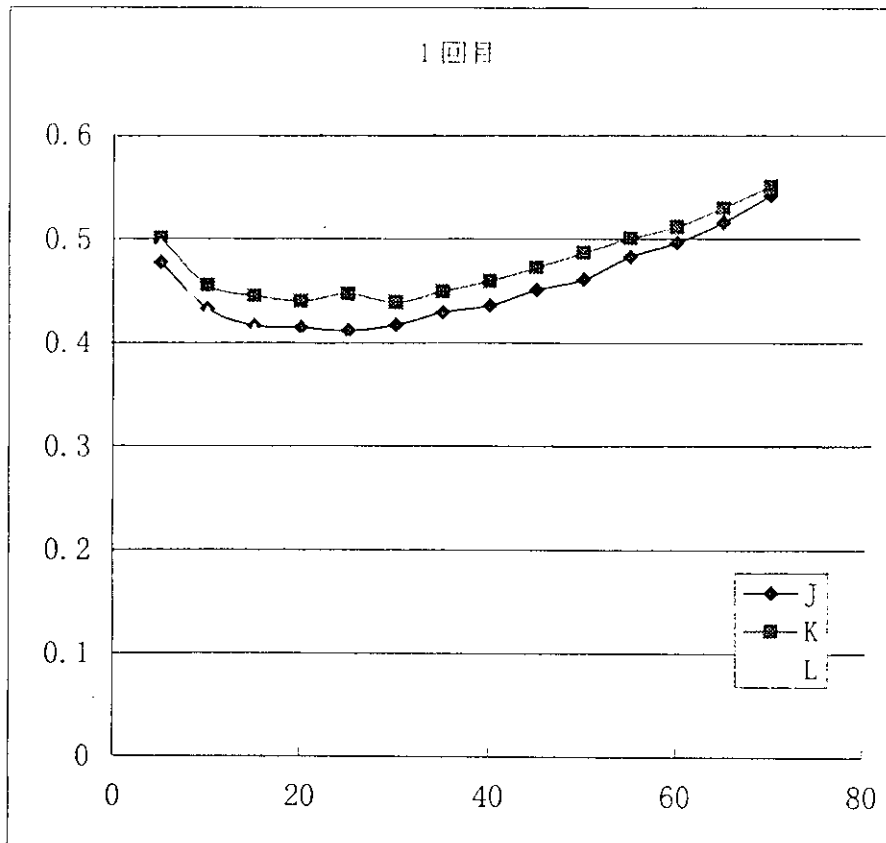
3. 新谷 英晴、佐々木 公一、森 由美、梶原 庸生、田中 敦子、西浦 寿一、高橋 正毅、小久保護、林 秀雄、滅菌保証の連続性を達成するために要求される事項について、大阪、PDA Asia Symposium、2/6(1999)。

表 1 SCDB培地を用いた発芽率と発育性能

評価項目	発芽率 (G_t)	発育性能 *
培地 A	16.0	1.0
B	18.8	0.95
C	14.2	1.14
D	16.6	1.05
E	16.5	1.06
F	17.8	1.16
G	19.0	1.16
H	17.6	1.11
I	19.5	1.15
平均	17.3	1.09

* 培地Aの発育性能を1としたときの比率
(増殖曲線の面積比) で表示した

PE	PE-S	Sam. No.	1回自作	2回自作	3回自作
a	d	A	<p>No. 1A Gt=16.0±2.396</p>	<p>No. 2A Gt=13.1±0.068</p>	<p>No. 3A Gt=15.7±3.614</p>
a	e	B	<p>No. 1B Gt=18.0±1.585</p>	<p>No. 2B Gt=13.5±0.800</p>	<p>No. 3B Gt=16.6±4.134</p>
a	f	C	<p>No. 1C Gt=20.5±3.954</p>	<p>No. 2C Gt=14.0±3.429</p>	<p>No. 3C Gt=15.0±3.315</p>
b	d	D	<p>No. 1D Gt=16.8±1.055</p>	<p>No. 2D Gt=14.2±2.289</p>	<p>No. 3D Gt=16.7±3.617</p>
b	e	E	<p>No. 1E Gt=16.5±0.694</p>	<p>No. 2E Gt=13.7±2.133</p>	<p>No. 3E Gt=17.2±4.358</p>
b	f	F	<p>No. 1F Gt=15.9±0.991</p>	<p>No. 2F Gt=9.4±0.058</p>	<p>No. 3F Gt=17.1±4.2576</p>
c	d	G	<p>No. 1G Gt=19.5±0.897</p>	<p>No. 2G Gt=10.6±0.115</p>	<p>No. 3G Gt=19.1±3.880</p>
c	e	H	<p>No. 1H Gt=18.3±0.873</p>	<p>No. 2H Gt=14.2±0.084</p>	<p>No. 3H Gt=18.4±2.708</p>
c	f	I		<p>No. 2I Gt=12.8±0.055</p>	<p>No. 3I Gt=18.0±2.613</p>



厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
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

分担研究者

三田泰弘、エーザイ（株）美里工場、工場長

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が¹⁾、培地組成のどの成分がD値の差に起因しているかは未だに明らかにされていない。それが明らかにされなければ再現性のある滅菌保証が達成されないことになる。なぜなら使用する培地に拠って結果が異なるからである。

寒天がバイオバーデン菌のD値に及ぼす影響を検討するため、分担研究者の東らはSCD液体培地（SCDB）ならびに同一メーカーで純度の異なる2種の寒天を用いてSCD寒天固形培地（SCDA）を作成した。

作成されたSCDA培地を用いて分担研究者の三田らは純度の異なる寒天で作成されたSCDA培地を用いた場合菌抵抗性に差が認められるかどうかについて検討した。SCDB培地を用いた場合はラベルD値に近似した値を与えた。しかしSCDA培地ではSCDB培地で得られたD値より約1分高いD値が得られた。このことから純度の低い寒天を用いた場合はD値を上昇させる可能性が推察された。同時に純度の異なる寒天の間で有意なD値の差が認められたため、寒天の純度のばらつきがD値のばらつきに原因している可能性が考えられる。

もしBI使用者がBIラベルD値を評価する必要がある場合でしかもBIメーカーからラベル表示の情報が得られない場合は、SCDB培地を用いてD値を評価すればラベルD値と近似した値を与えることが判明した。公称菌数に適した培地は寒天固形培地であるがSCDA培地の生育性能がメーカーならびにロットに拠ってばらつくため、本来はラベル記載に用いた培地と同一メーカーの同一ロット培地を使用すべきであるが、それが不可能な場合はBBL寒天培地以外の市販寒天培地の使用を推奨する。

A. 研究目的

平成9年度ではD値測定に使用するSCDB培地の主成分であるカゼイン製ペプトンと大豆製ペプトンの産地による影響について検討した。カゼイン製ペプトンは3箇国、大豆製ペプトンは3社製の物を選択し、それらの組み合わせから9種類のSCDB培地を調製した。

各培地を用いて2ロットの生物指標（*Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 芽胞）の121.1℃に於けるD値をBIER（生物指標評価装置）を用いて測定した。その結果何れの培地に於いてもISO 11138シリーズで要求される ± 0.5 分を満足する値であった。この結果からSCDB培地成分の産地あるいは製造業者の違いがD値測定に及

ばす影響は問題になるレベルではないと判断した。

一方、D値測定方法には部分生残法の他に生残曲線法がISO 11138シリーズで使用が認められている。GrahamらはSCDA培地で生残曲線法を使用してD値を測定した場合最大で2.23分の差を報告している¹⁾。この差の原因は平成9年度の実験結果から推定する限りカゼイン製ペプトンでも大豆製ペプトンでもない様に考えられる。SCDA培地に含まれる残された天然成分としては寒天であるので寒天に着目した。

そこで同一製造メーカーで純度の異なる2種類の寒天を用いてSCDA培地を調製した。同時に2種類の市販SCDA培地についても同時にD値を測定し、寒天の違いに拠りD値がばらつくかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) SCDA培地

SCDA培地は製造メーカーの異なる寒天D、Eを用いて表1のとおりに調製した。これらの他に市販X社製SCDAと市販Y社製SCDAを用いた。

2) 生物指標 (BI)

生物指標には高圧蒸気滅菌法の生物指標として用いられる *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (ロット番号S53402) のペーパーストリップ型BI (NAmsA SPORTROLR STS-05, 10⁵個/ろ紙担体、米国) を使用した。

3) D値測定

生物指標の加熱滅菌にはBiological Indicator Evaluator Resistometer (BIER, Joslyn Sterilizer Corporation) を用いた。D値測定は2回繰り返し行った。

1回目の滅菌には121.1°Cで1、2、3、4、5分間暴露した。2回目の滅菌には121.1°Cで2、4、6、8、10分間暴露した。各暴露条件には生物指標を50枚使用する制限スタンポマーフィーコ克蘭法 (LSMCP) を用いた。

暴露後生物指標を無菌的に取り出し、0.1% Tween 80を含む注射用水50mLに入れ攪拌し、完全に繊維状に崩した。その液を段階希釈し、寒天平板混釈法で57.5±1°Cで5日間培養後、生残菌数を計数した。D値は生残曲線法より算出した。初期菌数は未処理の生物指標を用いて同様な操作で測定した。

C. 結果及び考察

1) 寒天純度に拠るD値の違い

寒天D、Eを処方したSCDA培地ならびに市販X社製SCDA培地ならびに市販Y社製SCDA培地を用いて得られたD値を比較し、表2に示した。この結果寒天純度の違いでD値が異なることが判明した。SCDA-寒天E培地と市販Y社SCDA培地とは同一培地メーカー一品であることから、D値の再現性は良好であった。

2) SCDB培地とSCDA培地のD値の差について

調製したSCDB培地を用いた平成9年の実験で得られたD値と本年度の研究で得られ

たD値との差はISO 11138シリーズで許容されている ± 0.5 分以上のばらつきを示した。またラベル表示値（1.9分）とも1分以上の有為な差を認めた。

D値測定法としてSCDB培地を用いる場合は部分生残法（スタンボーマーフィー—コ克蘭法）を、SCDA培地を用いる場合は生残曲線法で行った。部分生残法（スタンボーマーフィー—コ克蘭法）と生残曲線法の間には有意なD値の差はないと報告されている²⁾。

3) 初期菌数

未処理BIを用いた初期菌数の結果を表3に示した。ISO 11138シリーズに拠るとBIの初期菌数はラベル記載値の $-50 \sim +300\%$ の範囲が許容範囲である。市販SCDA寒天培地では寒天の純度により公称数の -50% を下回る培地があり、芽胞の発芽ならびに増殖性能に問題があると考えられる。ここで表2と3を同時に見た場合、公称菌数が少ない培地はD値も低い培地であることが判明する。

D. 結論

以上、寒天の純度の違いがD値に及ぼす影響については、今回の実験から有意な差が認められた。公称菌数が少ない培地はD値も低い培地であることが判明した。すなわち*B. stearothermophilus*の発芽ならびに増殖能力に乏しい培地はD値も低く、公称菌数も少ない培地であることが判明した。SCDA培地組成はカゼイン消化物、大豆消化物、食塩ならびに寒天である。カゼイン消化物、大豆消化物の結果からはばらつきが認められなかった。それゆえ残った唯一の天然物因子である寒天がD値ばらつきの原因物質として確定された。寒天もその純度が大きな因子である。寒天成分の何がばらつきに関与しているか今後の実験で確定される必要がある。

E. 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) 新谷英晴、高橋正毅：防菌防黴、23、195（1996）。

G. 研究発表

1. 論文発表

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、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 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 2 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	3.2 9
SCDA-寒天E	1.9 3
市販X社SCDA	3.2 5
市販Y社SCDA	2.2 3

ラベルD値 (DIFCO Co. Ltd, SCDA使用) 1.9 0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3 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。