

厚生科学研究費補助金（特別研究事業）

平成11年度総括研究報告書

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

新谷 英晴（主任研究者）、数馬 昂始（分担研究者）

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（Soybean Casein Digest、大豆カゼイン消化）培地のロット間ならびに／あるいはメーカー間の差／同一メーカーでのロット間での差により同一BIでのD値が異なることが報告されている。市販培地を用いたD値の相違の現象については既に報告されているが、SCD液体／固形培地組成のどの成分がD値のばらつきに起因しているのかを系統的に確かめた報告例はない。D値のばらつきに原因している成分が明らかにされなければ現実問題として培地性能の再現は得られず、そのため再現性のある滅菌保証は達成されないことになる。

著者等は種々のカゼイン製ペプトン、種々の大豆製ペプトン、種々の寒天を添加して種々のSCD液体（SCDB）培地ならびにSCD寒天固形（SCDA）培地を作成し、それらを用いて個別にばらつきに起因すると考えられる物質について検討した。その結果D値の差を生じさせる成分として寒天の可能性が明らかとなった。それは寒天の純度が高まることに拠って二価イオン（具体的にはカルシウムならびにマグネシウム）濃度が減少し、その結果D値が低くなることを確認した。つまり培地成分のカルシウム濃度がSCD培地（SCDB培地、SCDA培地）でのD値のばらつきに起因していることが判明した。同時にカルシウム濃度の差に拠ってSCD液体培地とSCD寒天固形培地との間で有意にD値が異なることが明らかになった。SCDA培地を用いて得られたD値はSCDB培地を用いて得られたD値より有意に高かった。

SCDA培地とSCDB培地の違いはグルコースならびにリン酸二カリウムの有無とカゼイン消化物ならびに大豆消化物の組成比の違いに由来していると考えられる。それゆえSCDB培地よりグルコースあるいはリン酸二カリウムあるいはそれら両方を除いてD値の変動を調べた結果、リン酸二カリウムの存在が原因していることが判明した。それはリン酸二カリウムの存在に拠って有用なカルシウムが不溶性のリン酸カルシウムとなり培地中の有用なカルシウムイオンが減少するためである。それゆえ培地成分の中にリン酸二カリウムが不在のSCDA培地の場合は不溶性のリン酸カルシウムの形成がないためD値が高かったものと考えられる。

BIロットならびにメーカー間の差についてはロット間ならびにメーカー間の間にも抵抗性ならびに公称菌数のばらつきがあることを確認した。同時に *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953と *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 とで作成されたBIを比較したところ公称菌数については有意なばらつきが認められないが、抵抗値（D値）については後者の方が0.2～0.5分高いことが確認された。それゆえ *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980と *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953とでは滅菌保証の結果に差が生じる可能性が考えられる。これは今後データを示してISO で議論される必要がある。

A. 研究目的

滅菌バリデーション実施において生物指標 (BI) 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 11138-1 (BIメーカーへの指針) に従えば、BIラベル記載D値の測定を使用者が行うことは要求されない。しかしISO/DIS 14161 (使用者への指針) では滅菌保証に失敗した場合、その原因がBIそのものに拠る可能性が考えられる場合は使用者に対してもBIのラベルD値の確認を要求している。しかしそのためにはBiological Indicator Evaluator Resistometer (BIER、生物指標評価装置)の使用が必要である。

使用者は滅菌バリデーション研究で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で滅菌保証の達成を確認することが要求される。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 (生物指標の使用者への指針) に拠れば、SCDB培地あるいはSCDA培地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値が異なることが既に知られている¹⁾。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いる (平成10年度厚生科学研究報告)¹⁾。それゆえ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った滅菌バリデーション結果を与える可能性が考えられる。

そこで本厚生科学研究に於いて著者らは培地メーカーならびにBIメーカーなど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

市販のSCDB培地ならびにSCDA培地を用いた。それぞれ複数メーカーの物で同一メーカー毎に数種類のロット培地を使用した。

2) 培地中のカルシウム濃度の測定

カルシウム濃度は遊離型のみを測定した。そのため5000ダルトンのカットオフ限外ろ過膜を用い、10、000gで40分間遠心分離し、ろ液を原子吸光法で測定した。中空陰極ランプでの波長は422.7nmであった³⁾。

3) 生物指標 (BI)

市販の同一BIメーカー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。

BIメーカー/同一メーカーでのロット間の比較の場合には複数のBIメーカー品ならびに同一メーカーでのロットの異なるBIを用いて比較した。その場合は培地は一定にした。

4) D値測定

蒸気加熱滅菌用BIER (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。

SCDB培地の場合には制限スタンボマーフィーコ克蘭法 (LSMCP) を、SCDA培地の場合には生残曲線法を用いた²⁾。両算出方法の間には有意なD値の差がないことが確認されている⁴⁾。

5) 滅菌後のB Iの培養

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^{7, 8)}。

6) 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⁾。

7) 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培地で測定した⁵⁾。

C. 結果及び考察

1) 市販SCDA培地を用いて得られた公称数測定結果

市販XならびにY社製のSCDA培地を用いた。その結果得られた公称数測定結果を表1に示した。

表1の結果から市販Y社製のSCDA培地が示す菌数はISO 11138-1で許容されている公称数の-50%~+300%の範囲以下であること、すなわち損傷菌生育に不十分な培地(=フォールスネガチブを与える)培地の可能性が考えられる。

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る。”ばらつき”の点ではグラハム等の実験結果と同様な傾向が認められた¹⁾。

2) 調整ならびに市販SCDA培地を用いたD値ならびに金属イオン測定結果

寒天DならびにEを用いてSCDA培地を調整した。寒天DならびにEに含まれ、顕著な濃度差を示した金属イオンであるカルシウムとマグネシウムの代表的な値を表2に示した。ここで市販X社製SCDA培地は寒天Dを、市販Y社製SCDA培地は寒天Eを使用している。測定したD値の結果を表3に示した。

これらの結果から、SCDA-寒天D培地ならびに市販X社製SCDA培地を用いて得られたD値はいずれもラベル公称値(1.9分)より1分以上高いことが判明した。この差はISO 11138-1の許容範囲(ラベル表示の₋0.5分以内)を越えている。

一方SCDA-寒天E培地ならびに市販Y社製SCDA培地は実際は同一メーカー培地であるが、それらを用いて得られたD値はそれぞれ2.25分ならびに1.93分であった。このことから寒天が同じであると類似したD値を示し、寒天中のカルシウム濃度(表2)が異なることに拠って与えるD値が変動することが判明した。表2には同時にマグネシウム濃

度も顕著に異なるので同時に記載したが、マグネシウム濃度に拠って菌数やD値が変動する現象は認められなかった。つまりSCDA培地でD値測定にばらつきを示す原因は寒天中のカルシウム濃度に拠ることが判明した。高いD値を示したSCDA培地ほどカルシウム濃度が高く、低いD値を示したSCDA培地ほどカルシウム濃度が低いことが判明した。マグネシウムでのD値上昇効果は顕著ではなかった。

今回実験に用いた市販のSCDA寒天固形培地（X、Y社製SCDA培地）での公称数の結果（表1）から言えることはY社製SCDA培地はISO 11138-1の公称数の許容範囲である-50%~+300%以下であり、その意味で市販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（3.25分）がラベルD値（1.9分）より1分以上高いことからISO規格範囲外培地製品となる。ラベルD値は実際はSCDB培地を用いて測定された。SCDB培地とSCDA培地とでは得られるD値に約1分の差があることが確認されている（平成10年度厚生科学研究報告）。それゆえラベルD値をSCDA培地で測定すれば約3分のD値を与えると推定される。

ところでSCDB培地とSCDA培地とでのD値の差の理由もカルシウムで説明がつく。これはSCDA培地組成中にはリン酸二カリウムが存在していないためである。リン酸二カリウムが存在しているとカルシウムと反応して不溶性のリン酸カルシウムが形成し、菌に有効なカルシウムが減少するためである。そのためにD値が低くなったのである。

D値とカルシウム濃度との関係を表4に示した。最初の8mg/Lは内因性のカルシウム量である。8~80mg/L付近まではカルシウム濃度の変化に対しD値の変動が急激である。一般に培地（SCDBならびにSCDA）中に含まれているカルシウム量は最大で60mg/L位であるため、カルシウム濃度の変動でD値が急激に変動する部分に入っていたため培地のロットやメーカーの違いでD値が大きく異なった物と思われる。100~120mg/L付近ではD値はほぼ一定となっているがこれは人為的に塩化カルシウムを培地に加えたもので、天然にはこのようなカルシウム量のSCD培地は存在しない。しかし再現可能な培地を作成する場合は培地に塩化カルシウムを00~120mg/L位添加すれば良い。反対にEDTAを添加すれば菌は生育せず、見かけ上減菌保証されたこととなる。つまり培地の操作で見かけの減菌保証は操作できることを理解されたい。

本来ラベルD値を追認する必要が生じた場合²⁾⁶⁾、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BIラベル表示に用いたのと同じ培地メーカーの同一培地ロットを用いるのが正しい方法であり、ISO/DIS 14161で推奨される方法である。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でさらにロットが同じ培地が入手できるかどうかは定かでない。それがISO 11138シリーズならびにISO/DIS規格で記述はできても現実に実現困難な例である。

3) SCDA培地での培地中のカルシウム濃度とD値との関係

表5に示したとおりでカルシウム濃度が高い程D値が高いことが分かる。Student t statistical test (t検定)の結果有意差が統計的に認められた。

またカルシウム濃度とD値との相関関係で言えば、例えばN社の場合D値とカルシウム濃度の間の相関係数は約0.9で良好であった。

4) 人為的に塩化カルシウムを添加して培地中のカルシウム濃度を一定にした場合D値は一定となるか

結果を表6に示した。カルシウム濃度を70 mg/Lと一定にした場合O~I社ではD値はほぼ一定となった。それはt検定でも”有意差なし”という結果からも理解できる。理解できないのはカルシウム濃度を70 mg/Lと一定にしたにも関わらず若干高いD値を示すN社製培地の存在である。統計的には有意差はないが、表5で得られたカルシウム量を一定にしない場合のN社と他のメーカーの培地とでは有意なD値の差が認められた。

それゆえばらつきの原因物質としてカルシウムと言い切るにはまだ未知成分の存在の可能性を考慮する必要があるが、いずれにしろ多くの部分はカルシウムで説明可能であることが判明した。

5) SCDB培地での培地中のカルシウム濃度とD値との関係

表4~6に示された様にD値のばらつく原因が培地中のカルシウム濃度に拠るのであれば、SCDA培地だけがばらつきを示すのではなく、SCDB培地の場合もD値がばらつくはずである。その結果を表7に示した。表4~6と同様カルシウム濃度の増加につれてD値も増加した。

それでは平成9年の研究結果でSCDB培地でD値のばらつきが認められなかった理由はなぜなのか。それは多分カゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトンを替えたつもりがN社の規格の範疇に入っていたためと思われる。

SCDB培地とSCDA培地ではカゼイン製ペプトンならびに大豆製ペプトンの組成比が異なるが、組成比の差が異なることに拠ってD値変動に与える可能性は少ないと考えられる。それらの可能性は実験で確認される必要があるが、SCDB培地あるいはSCDA培地の組成比を変えると通常言われているSCD培地ではなくなる。

6) SCDB培地組成より各成分を除いて作成した培地のD値

SCDB培地よりそれぞれグルコースあるいはリン酸二カリウムあるいはその両者を除き、それらに1.5%の寒天を加えて得られたSCD寒天固形培地を用い、生育菌数測定より生残曲線法で得られたD値を表8に示した。

これらの結果からリン酸二カリウムの不在がD値を高める要因と考えられる。これは既に述べたとおり不溶性のリン酸カルシウム形成に寄与し、その結果有効なカルシウムを培地中より減少させるためと考えられる。

7) B1メーカー間、ロット間ならびに担体の違いに拠るD値の差について

同一BIメーカーのロット間では菌数ならびにD値に顕著な差は認められなかった。BIメーカーが異なると表9、10に示したとおり大きな相違が認められた。

D値を追認する場合はBIメーカーの推奨に従わなければならないため、この表で得られたD値データは正しい値ではなく、同一培地を用いた場合の比較データである。菌数に関しても培地の影響を無視できない。つまりSCDA培地を使用しているため寒天の純度の違いに拠って異なった菌数が得られる可能性は否定できない。

また芽胞菌を塗布する担体の違いに拠って（この場合の芽胞菌は 10^5 cfu/担体の *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953で高圧蒸気用BIERを用いた）D値が大きく異なることがわかった（表11）。

Bacillus stearothermophilus ATCC 7953と *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980との間では後者が0.2～0.5分の範囲でD値が高いことが判明した。

そこでBIの担体ならびに一次包装の素材の違いで菌のD値が変動するゆえ、それらを一定にし、芽胞懸濁液（*B. stearothermophilus* ATCC 7953）のみをNAmSAならびにRavenから購入し、芽胞懸濁液を同一担体に均一に塗布し、同一素材の一次包装で包装してペーパーストリップ型BIを自作し、それを高圧蒸気用BIERを用いて滅菌し、SCDB培地(DIFCO社製)で部分生残法を用いて得られたD値を表12に示した。

表12に示した様に両メーカーの芽胞懸濁液が異なっても得られたD値はほぼ同じであったことからBIの担体ならびに一次包装の素材を一定にすれば、芽胞菌懸濁液の入手先が異なっても得られるD値は同じであることが判明した。

つまり見かけ上両メーカーのBIのD値に差が見られたのは担体、一次包装の素材、担体への塗布方法の違い等に原因する可能性が考えられる。菌懸濁液のBIメーカーに拠る性能の差は否定されたことから、芽胞形成方法ならびに芽胞形成培地の差に拠る可能性は否定できると考える。

両BIメーカーがラベル表示に用いた培地が異なる故、使用者はラベル表示を確認する必要が生じた場合は、BIメーカーがラベル記載に使用した培地と同一培地メーカーの培地を用いる必要がある。それゆえバリデーションと日常管理とは同一ロットのBIを使用し、新規BIロットに変更する場合にはバリデートされたBIロットと新規ロットとを同時に比較し、両者の相関をとることが重要である。両者の相関が良好であれば、新規ロットを単独に日常管理での滅菌保証に使用できる。相関の確認は日常管理の中で実施すれば良い。

D. 結論

SCD (Soybean Casein Digest 大豆カゼイン消化物) 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値が異なることが知られている。市販培地を用いたD値の相違の現象については既に報告されているが、培地組成のどの成分がD値のばらつきに原因しているのかを系統的に確かめられた例はない。D値のばらつきに原因する成分が特定されなければ再現性のある滅菌保証は達成されないことになる。そこで種々のカゼイン製ペプトン、種々の大豆製ペプトン、種々の寒天を組み合わせて種々のSCD液体 (SCDB) 培地ならびにSCD寒天固形 (SCDA) 培地を作成

し、それらを用いて個別にD値ならびに菌数について検討した。

その結果D値の差を生じさせる組成として寒天の可能性が明らかとなった。寒天の純度が高まることに拠って培地中のカルシウム、マグネシウム量が減少し、D値が低くなることが確認され、本現象は市販SCDA培地でも同様に確認された。同時にSCD液体培地とSCD寒天固形培地との間で有意にD値が異なることを明らかにした。SCDA培地を用いて得られたD値はSCDB培地を用いて得られたD値より有意に高かった（約1分）。前者の場合は生残曲線法で、後者の場合は部分生残曲線法のスタンボマーフィーコクラン法を用いてD値を測定した。具体的に寒天のどの成分がD値ばらつきに影響しているかをクロマトグラフィーを用いて成分分析した結果、培地中のカルシウム濃度に依存していることが判明した。同時に培地中のカルシウム濃度とD値とが相関し、カルシウム濃度が増える程D値が高まり、カルシウム濃度が80mg/LまではD値増加は急激であるが120~150mg/Lではプラトーになることが確認された。それゆえ培地中のカルシウム濃度を120~150mg/L位に維持すれば再現性の良いD値を与える培地が得られる。ここでカルシウムで見られた現象はマグネシウムでは殆ど認められなかった。

SCDA培地とSCDB培地とのD値の差（前者が後者に比べ1分程D値が高い）についても培地中のカルシウムで説明できる。つまり後者には前者に含まれていないグルコースならびにリン酸二カリウムが存在する。ここでリン酸二カリウムが存在した場合、リン酸二カリウムが培地中のカルシウムと反応し不溶性のリン酸二カルシウムの沈殿を形成し、有用なカルシウムが減少するためと推察でき、同時にリン酸カルシウムの沈殿を検出している。それゆえ組成成分の中にリン酸二カリウムが不在している前者の培地の方がD値が高かった理由は、リン酸カルシウムの沈殿形成がなかったためである。SCDA培地組成とSCDB培地組成との間にはカゼイン消化物ならびに大豆消化物の組成比の違いが認められるが、組成比の違いは顕著なD値ばらつきの原因ではないと考えられる。

確立した再現性の良いD値を与える培地を用いてBIロットならびにメーカー間でのBI性能の差について検討した。ISO 11138-3は高圧蒸気滅菌についてのBI菌を記述しているが、そこでは*B. stearothermophilus* ATCC 7953ならびにATCC 12980の使用が容認されている。両者の容認のためには両者のD値が同一滅菌条件で同等でなければならないが、実際は後者の方が約0.2~0.5分程高い。

BIメーカーの芽胞懸濁液が異なっても得られたD値はほぼ同じであったことからBIの担体、一次包装の素材ならびに担体への芽胞塗布方法などを一定にし、成育培地、D値計算方法などを一定にすれば、芽胞菌懸濁液の入手先が異なっても得られるD値は同じであることが判明した。

市販BIのD値がメーカーに拠って差が見られたのは担体、一次包装の素材、担体への塗布方法の違いなどに拠ると考えられる。芽胞形成方法ならびに芽胞形成培地の差に拠る理由は否定された。BIメーカーに拠って成育培地が異なり、それがD値の差として表われる可能性を考慮する必要がある。

使用者自身がプラントでの最抵抗性のバイオバーデン菌を用いてBIを自作して滅菌保証する絶対バイオバーデン法を用いる場合には、芽胞菌を担体に均一に塗布する技術も確立されなければならない。多くの場合BIのD値がばらつく原因としてBI芽胞菌の担体

への不均一な塗布法に起因することが考えられる。その結果団子状の芽胞の塊 (clump) が担体表面にでき、外部の死菌が内部の生菌の保護作用をしている可能性が考えられる。それが顕著に現われるのは菌数の増大につれてD値のばらつきが大きくなる場合である。この場合は明らかにclumpの存在が予想され、それは走査電子顕微鏡で表面を観察すれば、理解できる。担体表面に均一に芽胞菌を塗布する技術は簡単に見えてBIメーカーのノウハウの部分でもある。それゆえBIメーカー間、同一メーカーのロット間に性能の差がある以上、現実問題としては連続した滅菌保証を達成していくには、BIを新規の物に替える場合には、従来のBIと新規BIとの相関を同一滅菌条件で確認し、滅菌保証の連続性を確保する必要がある、それは日本の主張でISO/DIS 14161に入れられた事実である。

それゆえ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、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と既に滅菌保証がバリデートされたBIとを同時に滅菌器内のコールドスポットに入れて両方で同じ滅菌保証が達成されることを確認すれば滅菌保証はより確実となる。このことは培地メーカー、ロットに関しても同様のことが言える。

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、日本ベクトンデケンソン (株) 伊藤 潤平氏、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る。

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)、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) Pybus, J., Feldman, F.J., and Bowers, G.N., Clin. Chem., 16, 998 (1970).
- 4) 新谷英晴、高橋正毅: 防菌防黴、23、195 (1996)。
- 5) Shintani, H., Tahata, T. and Takahashi, M.: Biomed. Instrum. Technol., 29、113-124 (1995)。
- 6) 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。
- 7) 新谷英晴、数馬昂始: 防菌防黴、26、309-320 (1998)。
- 8) 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：25、703-709 (1997)。
2. 新谷英晴、Biocontrol Sci.：2、43-45 (1997)
3. 新谷英晴、Biomed.Instrument.Technol.：31、387-390 (1997)
4. 新谷英晴、防菌防黴：26、385-393 (1998)。
5. 新谷英晴、防菌防黴：26、453-465 (1998)。
6. 越川富比古、新谷英晴：防菌防黴：26、511-520 (1998)。
7. 新谷英晴、Pharmatech Japan：14、1173-1179 (1998)。
8. 仲谷満子、新谷英晴：防菌防黴：26、580 (1998)。
9. 新谷英晴、数馬昂始：防菌防黴、26、309-320 (1998)。
10. 新谷英晴、数馬昂始：防菌防黴、26、629-638 (1998)。
11. 新谷英晴：防菌防黴、26、647-656 (1998)。
12. 新谷英晴：医科器械学会、68、478-479 (1998)。
13. 新谷英晴：防菌防黴、26、687-700 (1998)。
12. 新谷英晴、医科器械学会：68、478-479 (1998)。
13. 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：防菌防黴、27、145-151 (1999)。
14. 新谷 英晴：防菌防黴、27、97-108 (1999)。
15. 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、Biomed. Inst. Technol., in press (1999)。

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：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、(1998、5)。
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、(1998、6)。
3. 新谷 英晴：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、PDA Asia Symposium、(1999、2)。
4. Shintani, H: Sterility assurance attainment for places difficult to insert biological indicator、4th Annual Conference on International Validation (1998、11)
5. Shintani, H: Several problems to be conquered for attaining reproducible sterility assurance、PDA Asia symposium (1999、2)
6. 新谷 英晴：医療用品の滅菌バリデーションならびに滅菌保証に伴う諸問題と解決法、第14回GMPとバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム (1999、3)

7. 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：医療用具滅菌保証達成に於ける生育培地の変動要因の究明、第26回防菌防黴学会（1999、5）

8. 新谷 英晴：ISO/TC 198 が要求する再現性のある滅菌保証法とは、第74回医科器械学会総会（1999、5）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

平成11年5月特許申請中。

表 1 生物指標 (BI, Lot S53402) の公称菌数測定結果

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培地使用) 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 2 寒天の金属イオン濃度 (ppm)

寒天	Ca	Mg
寒天D	2568.6	1275.7
寒天E	95.7	65.3

表 3 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	2.25
ラベル値	1.90

公称数 (DIFCO Co. Ltd, SCDA培地使用)

D値の許容範囲 ± 0.5 分 (ISO 11138-1)、

寒天D,Eはそれぞれ純度の低い、高い寒天である。

表 4 SCDA培地中のCa量とD値との関係

Ca量 (mg/L)	D値 (分)
8	2.02
20	2.52
40	2.76
60	3.02
80	3.22
100	3.33
120	3.40
150	3.44

8mg/Lは内因性カルシウム量。本濃度が培地に
拗ってばらつくため、D値がばらついた。

表 5 カルシウム濃度の異なる市販SCDA培地とD値

培地メーカー	ロット (A~C)	D値 (分)	カルシウム濃度 (mg/L) *
O		2.72	53.5
		2.78	65.0
		2.53	50.9
L		1.89	27.3
		1.83	8.5
		2.00	15.7
I		1.73	14.2
		2.10	29.0
		2.25	20.2
N		2.75	48.6
		3.13	54.6
		3.27	66.0

* 40 mg/LのSCDA中に含まれるカルシウム量
D値とカルシウム濃度の相関係数は0.92 (N社の例)

表 6 カルシウムを添加して培地中のカルシウム濃度を一定にした場合の市販SCDA
培地とD値

培地メーカー	ロット (A~C)	D値 (分)	カルシウム濃度 (mg/L) *
O		2.86	70.0
		2.97	70.0
		2.71	70.0
L		2.73	70.0
		3.01	70.0
		2.93	70.0
I		2.82	70.0
		2.99	70.0
		2.94	70.0
N		3.17	70.0
		3.37	70.0
		3.39	70.0

* 70 mg/Lになる様に表4のカルシウム量に更に添加してSCDA中のカルシウム量を70 mg/Lとした。

表 7 カルシウム濃度の異なる市販SCDB培地とD値

培地メーカー	BIメーカー	平均D値 (分)	平均カルシウム濃度 (mg/L) * n=4
L	A	1.28	5.3
	B	2.21	
I	A	1.45	25.3
	B	2.38	
N	A	1.75	38.6
	B	2.70	

* 30 mg/LのSCDA中に含まれるカルシウム量
D値とカルシウム濃度の相関係数はBIメーカーAの場合は0.97、Bの場合は0.96。

表 8 SCDB培地、SCDB/A培地ならびにSCDA培地組成各成分のD値に及ぼす影響

培地	(g/L)	A	B	C 変形SCDA	D SCDB/A	E SCDB
カゼイン製 ペプトン	17.0					
大豆製 ペプトン	3.0					
食塩	5.0					
リン酸 ニカリウム	2.5		—	—		
グルコース	2.5	—		—		
寒天	15.0					—
D値 (分)		2.2	3.0	3.2	2.3	2.2

培地Eは本来のSCDB培地。培地DはSCDB/A培地。AはSCDB/A培地からグルコースの欠如した培地。BはSCDB/A培地からリン酸ニカリウムの欠如した培地。CはSCDB/A培地からグルコースとリン酸ニカリウムの欠如した培地。

リン酸ニカリウムの存在により、有効なカルシウムイオンが不足するためD値が減少したと思われる。

表 9 同一培地を用いてメーカーの異なるBIの公称菌数とD値の違いについて

BI メーカー	X	Y
平均D値 (分)	2.2	1.2
回収菌数	+100%以内*	+300%以上*

* ラベル記載公称数に対する割合を示す。ラベル公称D値は1.9分で公称菌数は 1.9×10^5 cfuである。

平均D値ならびに回収菌数はそれぞれDIFCO Broth, DIFCO Agar培地で行った。D値算出法はSMCP法である。DIFCO菌体回収法は本文で示したとおりである。

実際にはX社の場合はD値ならびに回収菌数はそれぞれDIFCO Broth, Standard Agar培地で行っている。D値算出法はSMCP法である。Y社の場合はD値ならびに回収菌数は両者ともAcumedia Agar培地で行っている。D値算出法はEN法である。SCDB培地とSCDA培地との間にD値の差が認められるゆえ、本表のD値データは実際はあくまで比較のため、実際はBIメーカーの推奨する培地を用いて行う必要がある。Yメーカーの公称数が+300%を超えるのはISO規格外製品となる。

表 10 BIメーカーの違いに拠る菌数ならびにD値の違い

BIメーカー	平均菌数	ラベル菌数 (cfu/担体)	平均D値 (分)	ラベルD値
A	153630	170000	2.21	1.9
B	512325	110000	1.28	1.9

表 11 担体に拠るD値の違い

担体	D値 (分)
スパンガラスディスク	0.85
アルミニウムホイル	0.87
スチールディスク	1.0
ろ紙	1.4
プラスチック	1.5
ガラス	1.9

B. stearothermophilus ATCC 7953
 の 3.0×10^5 cfu/担体を使用。121.1℃
 での高圧蒸気滅菌用BIERを使用し、部分生残法
 (スパーマンカーバー法) でD値を算出した。

表 12 NAmSAならびに Ravenでの D値測定の差

芽胞懸濁液 供給	NAmSA	Raven
ラベルD 値 (分) (121.1 °C)	1.5	1.5
実測値 (分) n=4 (min)	2.03 ¹⁾	1.97

1) ISO 11138-3に拠ればラベルD 値の乖離
 範囲の許容は±0.5分ゆえ本データはわずかに
 逸脱しているが、これは実験誤差範囲と考える。
 むしろここには示さなかったが、公称菌数は
 ラベル値の-50~+300%であるが本BIの実験
 データはラベル記載菌数の+700%で、
 それゆえ本来は棄却品に相当する。

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 数馬 昂始、K2インターナショナル（株）、社長

研究要旨

著者等は種々のカゼイン製ペプトン、種々の大豆製ペプトン、種々の寒天を添加して種々のSCD液体（SCDB）培地ならびにSCD寒天固形（SCDA）培地を作成し、それらを用いて個別にD値のばらつきの原因について検討した。その結果D値の差を生じさせるSCD成分組成は純度の異なる寒天に拠ることを明らかにした。従来の実験でSCD液体培地とSCD寒天固形培地との間で有意にD値が異なることが明らかにされている。

現時点で再現性を有する滅菌保証を達成していくに際し生物指標（BI）のロット間の差、メーカー間の差の有無の可能性について議論されている。それゆえSCD培地（SCDBならびにSCDA培地）でのD値のばらつきの原因が究明されたので、再現性のある培地を用いてBIのロット間の差、メーカー間の差の可能性の有無について検討した。その結果検討した範囲ではロット内には有意な差は認められなかったが、メーカー間には有意なD値の差が認められた。また*Bacillus stearothermophilus* ATCC 9372と*Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980の間には菌生育性能の差を認めたが、この相違はISO 11138規格が許容する ± 0.5 分の範囲内であった。同時に担体に拠りD値が大きく変動することが判明した。

A. 研究目的

滅菌保証の指標の一つであるD値の変動許容範囲はISO11138規格に拠れば ± 0.5 分である。現実には培地メーカーならびに同一メーカーでもロットの変動によりD値はそれ以上ばらつくことがある（平成9年度厚生科学研究報告）。D値のばらつきには培地組成成分が関与している。それゆえD値のばらつきを無くさない限り、再現性が良くかつ普遍的な滅菌保証は達成されない。本研究の目的は普遍的な滅菌保証が達成できる培地並びに生物指標（BI）条件を確定することにある。これが本研究の目的である。

現時点でISO/TC 198 規格で要求されるラベル表示培地名はSCD培地という表示だけである。SCD培地にはSCDB培地ならびにSCDA培地が含まれる。これらの培地は培地メーカー間ならびに同一培地メーカーのロット間でも抵抗性のばらつきが多く、ばらつきを減少させることが当面の解決すべき課題である。さもないとバリデーション研究ならびに日常管理で同一メーカーの同一培地ロットを用いない限りバリデーション研究は無意味となり、バリデーション研究で得られた滅菌保証は日常管理で達成されないことになる。その様な事態を避け、普遍的な滅菌保証が得られる培地条件を見つける必要がある。

平成10年までの実験で培地の抵抗性（D値）にばらつきを与える因子は寒天の純度（特にカルシウム濃度）であることが確認された。それゆえ培地中のカルシウム濃度を制御すれば再現性の良い滅菌保証が達成できる培地作成が可能となった。

その後制御されたSCD培地（SCDA培地ならびにSCDB培地）を用いてBIメーカー間ならびに同一メーカーでのロット間でのD値のばらつく原因について調べたので報告する。

B. 研究方法

1) 生物指標 (BI)

市販2社のBI (*Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953、 10^5 個/ろ紙担体)を用いた。それらのラベル記載の公称数、D値を表1に示した。

2) 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、制限スタンポマーフィーコ克蘭法 (LSMCP) を用いて算出した。

121.1°C で所定の時間暴露後、無菌的にBIを取り出しSCDB培地(DIFCO Co. Ltd)に入れた。培地を温浴で15分間加温後、培養器 ($57.5 \pm 1^\circ\text{C}$) で7日間培養した。培養期間はバリデートされた期間である。

3) 菌数測定

10^5 個/担体のBIを0.1% Tween 80の界面活性剤を含む注射用水50mLに入れ、10,000回転で攪拌して完全に繊維状に崩した。その液を段階希釈し、寒天平板混濁法で $57.5 \pm 1^\circ\text{C}$ で5日間培養後、生残菌数を計数した (ISO/DIS 14161)。用いた培地はSCDA培地(DIFCO Co. Ltd)である。

C. 結果及び考察

菌数ならびにD値を表2に示した。

同一BIメーカーのロット間では菌数ならびにD値に顕著な差は認められなかった (表2、3)。表4ならびに表5に示した様にBIメーカーが異なると大きなD値の相違が認められた。但し本実験はBIメーカー間の比較のために行った実験で、BIラベル表示確認を目的にした実験ではない。それゆえSCDB培地とSCDA培地との間で生育性能に差があることを考えればここで得られた値をそのままラベル表示と比較はできない。ラベル表示を追認する場合にはISO/DIS 14161に記述があるとおりBIメーカーの推奨に従いBIメーカーがラベル表示に用いた培地メーカーの同一ロットの培地を用いなければならない。

BIロット間ならびにメーカー間の性能のばらつきの原因の可能性としては担体への菌の不均一塗布が考えられる。BIメーカー間の性能の差は担体への菌の不均一塗布に加え芽胞形成法ならびに選択した芽胞形成培地の違いなども考慮する必要があるがこれらBI作成法はISO/DIS 14161では情報非公開事項となっているため問題を余計困難にして

いる。表6に示したとおり菌担体に拠ってもD値が大きく異なることが判明した。ISO 11138-2（高圧蒸気滅菌）ではD値は1.5分以上とされている。一般的に使用されている担体はろ紙であるが、本データに従えばろ紙担体は使用できず、プラスチックかガラス担体の使用となる。何れにしろ担体に拠ってD値が異なることが理解できる。

Bacillus stearothermophilus ATCC 7953と*Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980との間に顕著な抵抗性の差は認められなかった。しかし後者の方が前者に比べ0.2分～0.5分程抵抗値が高いことは確認された。しかしこの差はISO 11138で許容されている ± 0.5 分の範囲内のばらつきである。

そこでBIの担体ならびに一次包装の素材の違いで菌のD値が変動するゆえ、それらを一定にし、芽胞懸濁液（*B. stearothermophilus* ATCC 7953）のみをNAMSAならびにRavenから購入し、芽胞懸濁液を同一担体に均一に塗布し、同一素材の一次包装で包装してペーパーストリップ型BIを自作し、それを高圧蒸気用BIERを用いて滅菌し、SCDB培地(DIFCO社製)で部分生残法を用いて得られたD値を表7に示した。

表7に示した様に両メーカーの芽胞懸濁液が異なっても得られたD値はほぼ同じであったことからBIの担体ならびに一次包装の素材を一定にすれば、芽胞菌懸濁液の入手先が異なっても得られるD値は同じであることが判明した。

つまり見かけ上両メーカーのBIのD値に差が見られたのは担体、一次包装の素材、担体への塗布方法の違い等に原因する可能性が考えられる。菌懸濁液のBIメーカーに拠る性能の差は否定されたことから、芽胞形成方法ならびに芽胞形成培地の差に拠る可能性は否定できると考える。

両BIメーカーがラベル表示に用いた培地が異なる故、使用者はラベル表示を確認する必要が生じた場合は、BIメーカーがラベル記載に使用した培地と同一培地メーカーの培地を用いる必要がある。それゆえバリデーションと日常管理とは同一ロットのBIを使用し、新規BIロットに変更する場合にはバリデートされたBIロットと新規ロットとを同時に比較し、両者の相関をとることが重要である。両者の相関が良好であれば、新規ロットを単独に日常管理での滅菌保証に使用できる。相関の確認は日常管理の中で実施すれば良い。

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、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と既に滅菌保証がバリデートされた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滅菌保証はより確実となる。

D. 結論

同一BIメーカーのロット間では菌数ならびにD値に顕著な差は認められなかった。BIメーカーが異なると大きな相違が認められた。

ロット間のばらつきの原因としては担体への菌の不均一塗布に拠ると思われる。BIメーカー間の差は担体への菌の不均一塗布に加え芽胞形成法（形成培地の選択）なども考慮