

図5 GlaN 感作ラット腹腔内埋植試験における肝臓の病理組織学的所見

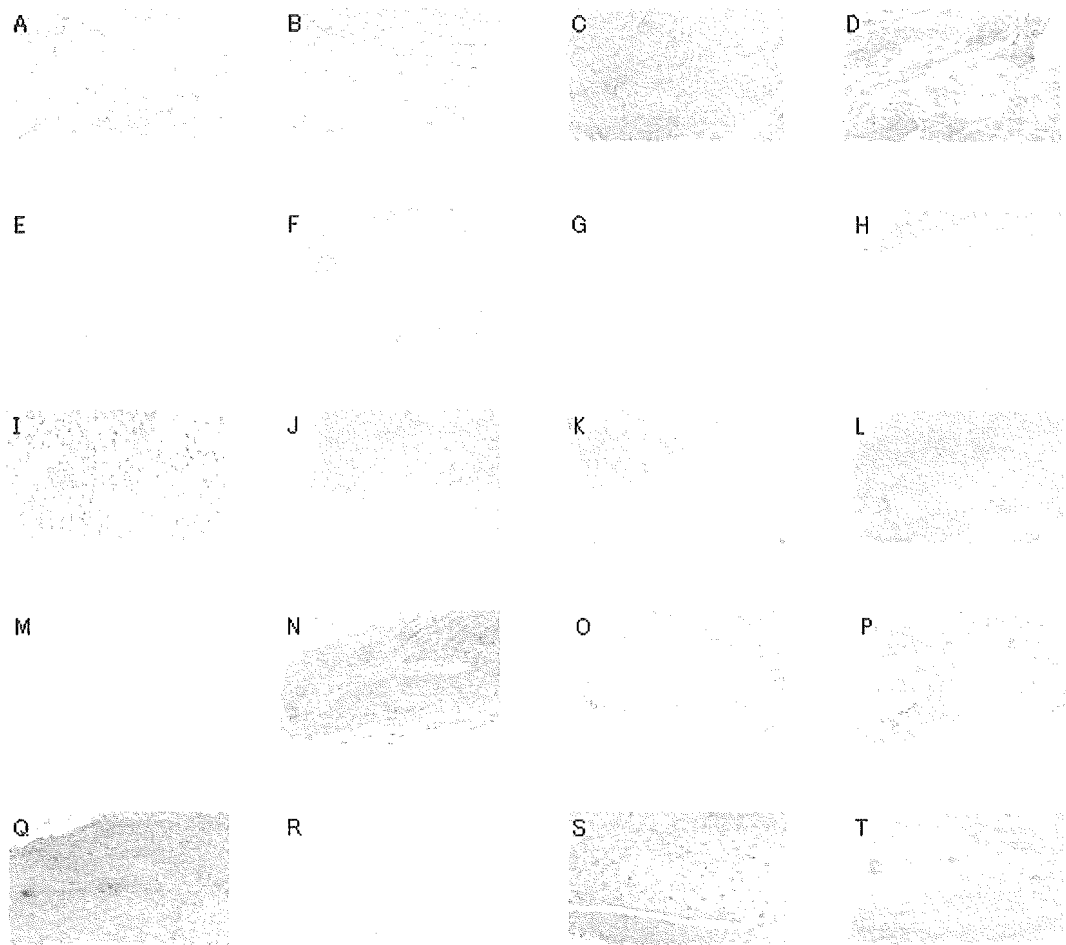


図6 ガンマ線照射コラーゲンシート皮下埋植試験における病理組織学的所見

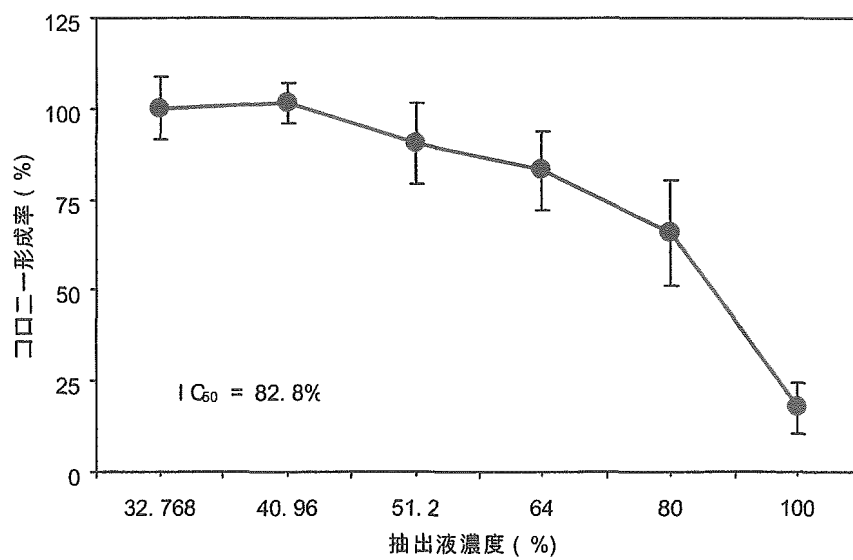


図7 酸処理ゼラチン(pI=9)の細胞毒性試験

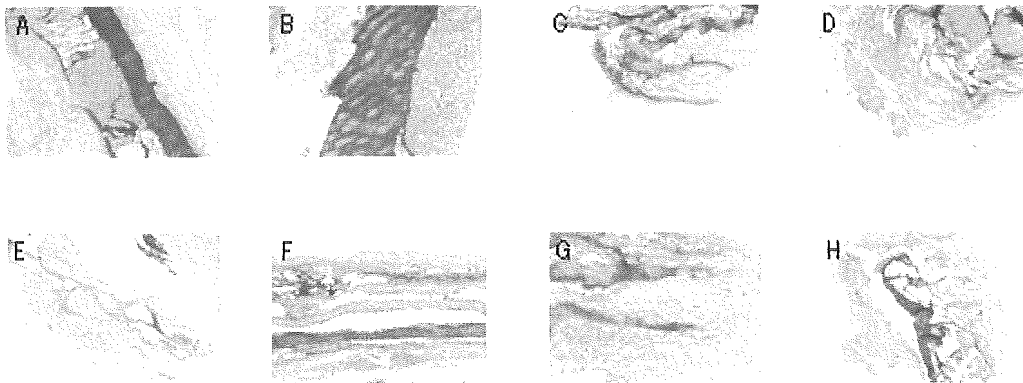


図8 酸処理ゼラチンのラット皮下埋植試験における病理組織学的所見

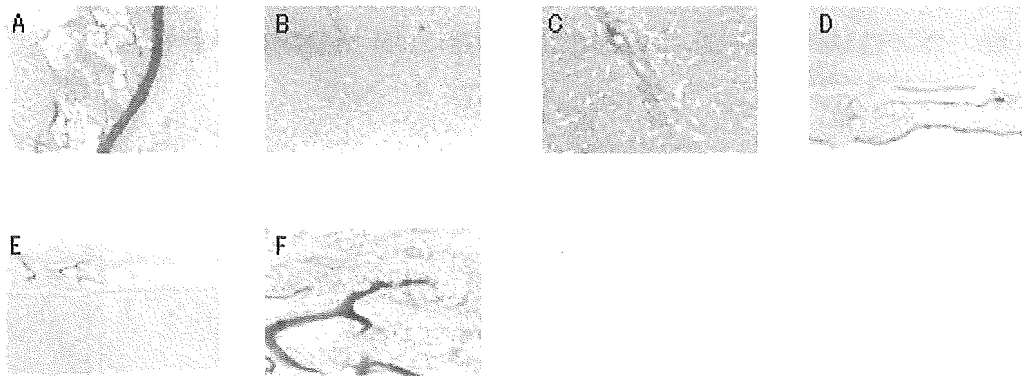


図9 酸処理ゼラチンのラット腹腔内埋植試験における病理組織学的所見

表1 大腸菌O111株乾燥菌体含有コラーゲンシートからのLPS 活性回収率

菌体添加量 (EU/ng)	LPS 活性 実測値 (EU/mg)	回収率 (%)
control	0.13	-
4.8	4.7	96.1
9.5	9.6	99.6
47.6	33.6	70.4
475.5	433.8	91.2
1426.5	1162.8	81.5
4755.0	3100.9	65.2
47550.0	35722.7	75.1

EndoTrap 精製コラーゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法

表2 頭蓋骨欠損部に形成された新生骨量の評価

実験群	症例番号	骨濃度	骨総面積	実験群	症例番号	骨濃度	骨総面積
対照群	1	35	10717	試験群 B	1	20	2397
	2	34	6437		2	23	8819
	3	20	4573		3	21	2399
	4	21	7013		4	22	2028
	5	20	10059		5	20	200
	6	32	9247		6	23	5316
	7	21	1791		7	21	3181
	8	26	7804		8	25	7419
	9	37	3305		9	21	3695
	10	40	7788		10	23	1486
	平均値	28.6	6873.4		平均値	21.9	3694.0
SD	7.8	2912.1	SD	1.6	2713.2		
t-value	-	-	t-value	2.6500	2.5260		
危険率	-	-	危険率	0.0243	0.0211		
試験群 A	1	31	689	試験群 C	1	22	214
	2	37	8494		2	21	3852
	3	19	7544		3	29	6259
	4	22	4640		4	23	434
	5	21	9127		5	22	112
	6	24	10516		6	21	14
	7	20	7037		7	22	270
	8	19	7710		8	22	34
	9	35	10338		9	20	5441
	10	33	3814		10	18	3304
	平均値	26.1	6990.9		平均値	22.0	1993.4
SD	7.1	3102.2	SD	2.8	2474.7		
t-value	0.7473	0.0873	t-value	2.5057	4.0381		
危険率	0.4645	0.9314	危険率	0.0292	0.0008		

表3 肝臓損傷ラットに対する菌体含有コラーゲンシートの致死毒性

動物群	肝臓損傷	対照シート被覆	菌体含有シート被覆	GalN 感作	生存数/試験数	生存率(%)
対照群 A	+	+	?	?	6/6	100
対照群 B	+	+	?	+	6/6	100
試験群 A	+	?	+	?	6/6	100
試験群 B	+	?	+	+	1/6*	16.7

*生存ラットは極度に衰弱

表4 肝臓損傷埋植試験群の血液生化学検査

検査項目	単位	術後 2 日目										
		非手術群		対照群 A		対照群 B		試験群 A		試験群 B		対照
		平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	平均値	SD	測定値**	SD	平均値
総蛋白	g/dL	6.1	0.55	6.0	1.1	3.4	0.3	6.05	0.21	4.4	nc***	5.8
A/G比		2.2	0.32	1.6	0.5	4.2	1.7	1.05	0.071	2.1	nc	1.75
アルブミン	g/dL	4.2	0.23	3.6	0.2	2.7	0	3.1	0	3	nc	3.7
総ビリルビン	mg/dL	0.04	0.006	0.07	0.04	2.18	0.28	0.045	0.007	2.16	nc	0.035
直接ビリルビン	mg/dL	0.03	0.012	0.06	0.03	1.64	0.14	0.04	0	1.56	nc	0.035
間接ビリルビン	mg/dL	0.003	0.006	0.01	0.01	0.54	0.14	0.005	0.007	0.6	nc	nd****
グルコース	mg/dL	150	14	143	37	79	53	145	9.9	31	nc	182
トリグリセライド	mg/dL	107	26	33	0.71	62	26	42.5	4.9	42	nc	112
リン脂質	mg/dL	135	16	127	11	188	47	130.5	0.7	274	nc	128
遊離脂肪酸	μ EQ/L	558	365	404	187	603	334	285.5	13.4	989	nc	357
総コレステロール	mg/dL	64	7.2	75	14	78	6.4	77.5	3.5	92	nc	58
エステル型コレステロール	mg/dL	51	5.6	59	7.1	12	2.12	61	2.8	9	nc	44.5
遊離型コレステロール	mg/dL	13	1.7	16	7.1	66	8.5	16.5	0.7	83	nc	13.5
コレステロールエステル比	%	80	0.58	79	5.7	15	4.2	79	0	10	nc	76.5
尿素窒素	mg/dL	18	2.09	21	1.3	51	4.7	21.4	1.1	96.6	nc	19.1
クレアチニン	mg/dL	0.2	0.02	0.19	0.05	0.265	0.035	0.215	0.007	0.25	nc	0.21
ナトリウム	mEQ/L	141	0.58	141	2.8	136	0.71	139.5	0.71	135	nc	140
クロール	mEQ/L	98	0.58	100	0.7	89	1.41	99	1.41	96	nc	102
カリウム	mEQ/L	9	1.79	9	3.0	8.3	0.42	8.1	0.28	12.5	nc	9.45
カルシウム	mg/dL	11	0.29	11	0.14	7.3	0.85	10.55	0.21	7.8	nc	10.5
無機リン	mg/dL	12	2.136	11	2.8	11	0.78	7.95	0.78	16.6	nc	11.0
GOT	IU/L	385	363	462	332	10004	3078	199	49.5	9622	nc	309
GPT	IU/L	82	66	99	36	8259	2176	89	24	8172	nc	70
LD	IU/L	3790	2769	4094	2963	14508	5617	1466	216	18400	nc	3044
ALP	IU/L	1673	221	905	277	2044	909	677.5	35	1792	nc	1426.5
γ-GTP	IU/L	<2	nc	3	nc	15	9.9	3	nc	20	nc	3
コリンエステラーゼ	IU/L	7	3	8	nc	9	4.2	5.5	0.71	7	nc	6.5

*試験群 B は全匹死亡, **測定値 n=1, ***nc, not calculated, ****nd, not detected (検出限界以下)

表7 抗 LPS 活性試験

菌体成分	50% 阻害濃度 (18-mer LLKKK IC ₅₀ µg/ml)	
	リムルス活性	IL-6 産生誘導能
JPSE		
1 EU/ml	0.01	0.05
10 EU/ml	0.05	0.08
JPSE + 1% Serum		
1 EU/ml	0.05	0.06
10 EU/ml	0.10	0.09
大腸菌 O3 LPS		
1 ng/ml	0.07	nt
10 ng/ml	0.40	nt
100 ng/ml	0.59	nt
1,000 ng/ml	1.59	nt
10,000 ng/ml	5.82	nt
大腸菌 O111 菌体		
30 ng/ml	0.01	nt
300 ng/ml	0.11	nt
3,000 ng/ml	0.55	nt
30,000 ng/ml	0.78	nt

nt, not tested.

大腸菌 O3 LPS: 1 ng = 27.5 EU

大腸菌 O111 菌体: 1 ng = 0.127 EU

ポリミキシン B の抗リムルス活性:

大腸菌 O3 LPS 10 ng/ml = IC₅₀ 61.1 µg/ml

表5 ガンマ線照射した大腸菌 O111 株乾燥菌体含有コラーゲンの LPS 含量

菌体添加量 (EU/mg)	LPS 活性実測値 (EU/mg) ^a			
	0 kGy	5 kGy	15 kGy	25 kGy
47.6	30.6	28.9	45.2	46.0
475.5	433.8	424.3	436.8	502.2
1426.5	1182.8	919.8	1257.0	1217.5
4755.0	3100.9	2519.5	3510.8	2499.6

^aEndo Trap 精製コラーゲナーゼ消化/HQ (pH 3) 法

表6 抗菌力試験

抗菌剤	50% 発育阻止濃度 (IC ₅₀ nM)	
	黄色ブドウ球菌	緑膿菌
18-mer LLKKK	1.09	41.0
ポリミキシン B	3.49	4.60
ストレプトマイシン	5.96	57.5
ペニシリン G	0.18	無効

表1 ゼラチンハイドロゲルからの10-mer LLKKKアミノ酸検出試験

材料	乾燥重量 (mg)	含水量 (mg)	10-mer LLKKK 含量量(%)	10-mer LLKKK 溶出量 mg (放出率)								放出総量 mg (放出率)
				0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	12 hr	24 hr		
スルホアセチル化ゼラチン	2.4	13.1	1.070	293 (27.4)	156 (14.6)	116 (10.8)	82 (5.8)	59 (5.5)	44 (4.1)	43 (4.0)	773 (72.2)	
コハク化ゼラチン	2.3	10.2	790	431 (54.6)	97 (12.3)	76 (9.6)	47 (5.9)	44 (5.6)	39 (4.9)	37 (4.7)	771 (97.6)	
アミン処理ゼラチン	2.3	32.2	2.990	937 (31.3)	221 (7.4)	119 (4.0)	104 (3.5)	108 (3.6)	103 (3.4)	70 (2.3)	1,682 (56.6)	
酸処理ゼラチン	1.9	57.8	5.900	3,340 (69.7)	367 (6.6)	304 (5.4)	269 (5.2)	291 (5.2)	284 (5.1)	256 (4.6)	5,131 (91.8)	
アルキル化ゼラチン	2.0	10.4	840	349 (41.5)	129 (15.4)	87 (10.4)	77 (9.2)	73 (8.7)	70 (8.3)	58 (6.9)	843 (100.4)	
エチレンジアミン化ゼラチン	1.9	103.3	10,140	7,972 (78.6)	906 (8.9)	397 (3.9)	204 (2.0)	182 (1.8)	99 (1.0)	87 (0.9)	9,846 (97.1)	

表2 ラット埋植試験結果から試算したヒトに対するLPS規格値

適用部位	ラット埋植試験				ヒトへの外挿				
	陽性反応が 認められた LPS実測値 (EU/mg) [†]	埋植重量 (mg)	体重 (kg)	体重当りの LPS重量 (EU/kg)	安全係数				体重当りの LPS許容値 (EU/kg)
					UF1	UF2	UF3	UF4	
					種差	個人差	材料分解 速度	菌種	
皮下	1,162.8	10.0	0.15	77,520	10	10	1	1	775.2
骨再生	33.6	6.0	0.15	1,344	10	5	1	1	1,550
					5	5	1	1	3,100
					10	1	1	1	7,752
					10	10	1	1	13.4
骨再生	33.6	6.0	0.15	1,344	10	5	1	1	26.9
					5	5	1	1	53.8
					10	1	1	1	134.4

[†]EndoTrap 精製コラゲナーゼ消化/HCl (pH 3) 法

2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

新谷英晴

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

(分担)研究報告書

再現性のある滅菌バリデーション達成法に関する研究

(分担)研究者 新谷英晴 国立医薬品食品衛生研究所 理化学試験室長

研究要旨

医療用具に対して最終滅菌を行い、その効果の判定を生物指標の死滅などから評価し、文書化して後、製品が出荷される。これが滅菌バリデーションである。滅菌バリデーション実施後に生残する生物指標菌は損傷菌である。損傷菌は健全菌とは生育性能や栄養要求が異なる。損傷菌の生育を判定できる方法を確立しないと滅菌後に損傷菌が生存したとしてもその生育を確認できないことになる。つまり滅菌効果を過大評価することになる。このことは医療用具の安全性を確保する意味で無視できない。そこで損傷菌の生育性能回復に有効な薬剤の評価、損傷菌の迅速な回復ならびに培地メーカー間の変動をなくすことが普遍的な滅菌バリデーションの確立にとって不可欠となる。本年は乾熱滅菌ならびに高圧蒸気滅菌での生物指標菌でそれらの滅菌で損傷を受けた生物指標菌を用いて検討したので報告する。

A. 研究目的

医療用品は安全性を求めるために最終滅菌され、一定の無菌性保証が確保され、その結果は再現されなければならない。生物指標を用いる無菌性保証の結果は使用される培地性能に拠って影響を受け、また生物指標の滅菌後の損傷の程度に拠って得られる培地性能の結果が異なる。そこで異なる培地メーカーならびに損傷の程度が異なる生物指標を用いて再現性の得られる無菌性保証法の確立方法について検討した。本報告では乾熱滅菌ならびに高圧蒸気滅菌での生物指標菌を用い、それらの滅菌で損傷を受けた生物指標菌について

検討した。

得られた結果は再現性の良い滅菌バリデーション方法の開発に繋がる。

B. 研究方法

1. 乾熱滅菌の場合

レーベン社から購入した乾熱滅菌用生物指標菌(BI) *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 芽胞(初期菌数、 3×10^6 CFU/担体)を用いて乾熱滅菌(160°C)で暴露後6種の培地メーカー(メルク, Difco, BBL, ダイゴ, 栄研化学, 日水)で同一培地である Soybean Casein Digest Agar (SCDA)培地で培養させ、各培地の培地性能の違いに拠って生育

菌数に差が生ずるか否かについて検討した。

BI 初期菌数の検討としては、BI の3枚を裁断し 0.1% Tween 80 添加リン酸緩衝液 30ml を加え、冷却しながら攪拌後、検液を回収、この操作を 3 回繰り返して BI の芽胞数を段階希釈法を用いて測定した。

BI を乾熱滅菌器にて暴露させ生残菌を回収後、SCDA 培地にて生残菌数を測定した。また、損傷を受けた芽胞の損傷回復に必要なグルコースを各培地に 0.5% 添加し、添加前後での菌数の比較を行った。

また同時に損傷した BI 菌にグルコース以外の種々の損傷回復剤を添加し、どの薬剤が損傷回復に有効に作用するかについて検討した。試験した薬剤としてはピルビン酸ナトリウム塩、乳酸カルシウム、炭酸カルシウム、D-アラニン、L-アラニン、パンビタン(複合アミノ酸)、L-セリン、リゾチーム、複合アミノ酸、カザミノ酸、塩化マグネシウム、ATP などである。

2. 高圧蒸気滅菌の場合

レーベン社から購入した高圧蒸気滅菌用生物指標菌 (BI) *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 芽胞(初期菌数、 1×10^6 CFU/担体)を用いて高圧蒸気滅菌(121°C)で暴露後 6 種の

培地メーカー(メルク, Difco, BBL, ダイゴ, 栄研化学, 日水)で同一培地である Soybean Casein Digest Agar (SCDA) 培地で培養させ、各培地の培地性能の違いに拠って生育菌数に差が生ずるか否かについて検討した。

BI 初期菌数の検討としては、BI の3枚を裁断し 0.1% Tween 80 添加リン酸緩衝液 30ml を加え、冷却しながら攪拌後、検液を回収、この操作を 3 回繰り返して BI の芽胞数を測定した。

BI を高圧蒸気滅菌器にて暴露させ、生残菌を回収後、SCDA 培地にて生残菌数を測定した。また損傷を受けた芽胞の損傷回復剤としてグルコースあるいはピルビン酸を各培地に 0.5% 添加し、添加有無での生育菌数の比較を行った。

同時に損傷した BI 菌にグルコースあるいはピルビン酸以外の種々の損傷回復剤を添加し、どの薬剤が損傷回復に有効に作用するかについて検討した。試験した薬剤はピルビン酸ナトリウム塩、乳酸カルシウム、ジピコリン酸、パンビタン(複合アミノ酸)、ATP、カタラーゼ、酵母エキス、可溶性でんぷんなどである。

C. 研究結果

1. 乾熱滅菌の場合の結果

表 1 に初発菌数の結果を示した。

表1 *Bacillus atrophaeus* の初発菌回収結果

メーカー別 SCDA培地を用いて培養	Average/cfu (n=3)
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	3.1×10^6
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	3.5×10^6
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	3.4×10^6
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	3.2×10^6
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	3.6×10^6
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	3.1×10^6

表 1 より健全菌である初発菌の場合に於いては培地メーカー間に顕著な差が認められないことが分かった。

表 2 に 160°C で 3 分間乾熱滅菌した損傷菌の生育菌数の比較を示した。

表2 *Bacillus atrophaeus* の暴露後の回収菌数

メーカー別 SCDA培地 にて培養/暴露時間 3分間	Average/cfu (n=3)
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	1.21×10^5
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.18×10^5
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	1.20×10^5
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	1.08×10^5
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	1.02×10^5
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	8.4×10^4

損傷菌の場合には表 1 に示した結果と異なり培地メーカー間に抛る生育性能の差が認められた。

SCDA 培地に 0.5%グルコースを添加し、そこに 3 分間暴露されて損傷した BI を添加し、表 2 に比較して生育菌数の増加の有無ならびに培地メーカー間での生育菌数の差が無くなるかどうかについて検討した。

結果を表 3 に示した。

表3 *Bacillus atrophaeus*の暴露後の回収菌数

0.5%グルコース添加SCDA培地 にて培養/暴露時間 3分間	Average/cfu (n=3)
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	1.47×10^5
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.42×10^5
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	1.47×10^5
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	1.23×10^5
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	1.29×10^5
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	1.20×10^5

表3と表2の回収菌数を比較すると0.5%グルコースを添加することで損傷回復菌数が増加し、同時に培地メーカー間の生育性能に有意差が無くなっていることが分かる。

表4に160°Cで6分間乾熱滅菌した場合の結果を示した。

表4 *Bacillus atrophaeus*の暴露後回収菌数

メーカー別 SCDA培地 にて培養/暴露時間	Average/cfu (n=3)
6分間	
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	1.56×10^3
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.48×10^3
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	9.5×10^2
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	7.7×10^2
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	1.14×10^3
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	4.1×10^2

6分間暴露損傷された菌の場合には培地メーカー間に拠る生育性能に顕著な差が認められた。

その生育培地に0.5%グルコースを添加し、その培地に6分間暴露されて損傷したBIを添加し、菌数の増加ならびに培地メーカー間の差が無くなるかどうかについて検討した。

結果を表5に示した。

表5 *Bacillus atrophaeus*の暴露後回収菌数

0.5%グルコース添加SCDA培地 にて培養/暴露時間	Average/cfu (n=3)
6分間	
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	1.75×10^3
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.82×10^3
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	1.66×10^3
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	1.37×10^3
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	1.45×10^3
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	8.4×10^2

表5と表4との回収菌数を比較すると0.5%グルコースを添加することで回復菌数が増加しているが、3分間暴露の場合と比べ、損傷の程度が増すとある特定培地メーカーの培地が他の培地メーカーの培地に比べ生育性能が低下していることが分かった。このことは滅菌バリデーションで培地生育性能を検討するに際しては健常菌ではなく、損傷菌を用いることが不可欠となる科学的根拠を示している。

表6には160℃で5分間暴露され損傷した乾熱滅菌のBIに炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、カザミノ酸、パンビタンを添加した場合と添加しない場合とを比較した結果を示した。

表6 損傷回復剤の添加効果の比較

SCDA寒天培地(日水) /損傷回復剤	Average/cfu (n=3)
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	4.6×10^4
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	4.3×10^4
3. 0.5% Casamino acids (DIFCO)	2.7×10^4
4. 0.1%Panvitan powder (タケダ)	2.7×10^4
5. コントロール (無添加)	2.8×10^4

コントロール(無添加の場合)と比較して炭酸カルシウムならびに乳酸カルシウムの場合に損傷回復が認められた。

表7には160℃で5分間暴露され損傷した乾熱滅菌のBIにL-アラニン、D-アラニン、L-セリン、塩化マグネシウムを添加した場合と添加しない場合とを比較した結果を示した。

表7 損傷回復剤の添加効果の比較

SCDA寒天培地(日水) /損傷回復剤	Average/cfu (n=3)
1. L-Alanine 100 μ g/ml (Wako)	4.40×10^4
2. D-Alanine 100 μ g/ml (TCI)	1.95×10^4
3. L-Serine 100 μ g/ml (Wako)	2.50×10^4
4. 0.2% Magnesium Chloride (KANTO)	2.86×10^4
5. コントロール (無添加)	2.81×10^4

コントロール(無添加の場合)と比較してL-アラニン添加の場合には損傷回復効果が認められたが、D-アラニンは反対に阻害効果が認められた。L-セリン、塩化マグネシウムを添加した場合については顕著な損傷回復効果が認められなかった。

表8には160℃で5分間暴露され損傷した乾熱滅菌のBIに複合アミノ酸、ピルビン酸、リゾチームならびにATPを添加した場合と添加しない場合とを比較した結果を示した。

表8 損傷回復剤の添加効果の比較

SCDA寒天培地(日水) /損傷回復剤	Average/cfu (n=3)
1. 0.1% Amino acids Mixture (Wako)	4.1×10^4
2. 0.5% Sodium pyruvate (Wako)	4.7×10^4
3. Lysozyme from Egg White 50 μ g/ml(Wako)	2.1×10^4
4. ATP 100 μ g/ml (ICN)	2.6×10^4
5. コントロール (無添加)	2.8×10^4

コントロール(無添加の場合)と比較して複合アミノ酸、ピルビン酸添加には損傷回復効果が認められたが、リゾチーム、ATP 添加の場合には顕著な損傷回復効果が認められなかった。

1. 高圧蒸気滅菌の場合の結果

表9に初発菌数の結果を示した。

表9 *Geobacillus stearothermophilus* 芽胞の初発菌数回収試験

メーカー別 SCDA培地 にて培養	Average/cfu (n=3)
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	1.67×10^6
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.77×10^6
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	1.53×10^6
4. Soybean-Casein Digest Aga (日本製薬)	1.56×10^6
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	1.79×10^6
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	1.61×10^6

表9より健常菌である初発菌に於いては培地メーカー間に顕著な差が認められないことが分かる。

表10に121°Cで3分間高圧蒸気滅菌で暴露されたBIの生育菌数を培地毎で比較した結果を示した。

表10 *Geobacillus stearothermophilus* 芽胞の暴露処理後の回収菌数

メーカー別 SCDA培地 にて培養/暴露時間	3分間	Average/cfu (n=3)
1. Tryptic Soy Agar (Difco)		1.89×10^4
2. Trypticase Soy Agar (BBL)		1.66×10^4
3. Tryptic Soy agar (MERCK)		5.4×10^3
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)		1.43×10^4
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)		2.36×10^4
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)		2.99×10^4

損傷菌の場合には表 9 に示した結果と異なり培地メーカー間に抛る生育性能の差が認められた。

SCDA 培地に 0.5% グルコースを添加し、そこに 3 分間暴露されて損傷した BI を添加し、菌数の増加ならびに培地メーカー間の差が無くなるかどうかについて検討した。

結果を表 11 に示した。

表11 *Geobacillus stearothermophilus* 芽胞の暴露処理後回収菌数

0.5% Glucose with SCD Agar にて培養/暴露時間	Average/cfu (n=3)
3分間	
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	1.96×10^4
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.91×10^4
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	5.13×10^3
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	1.72×10^4
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	2.60×10^4
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	3.45×10^4

表 11 と表 10 との回収菌数を比較すると 0.5% グルコースを添加することで損傷回復菌数が増加することが分かった。

しかしながら、表 10 で低生育数を示した培地については 0.5% のグルコースを添加しても他の培地メーカーに比べて生育性能が落ちることが分かった。これは表 5 の結果と良く一致していた。

表 12 に 121°C で 5 分間高圧蒸気滅菌した場合の結果を示した。

表12 *Geobacillus stearothermophilus* 芽胞の暴露処理後の回収菌数

メーカー別SCDA培地 にて培養/暴露時間	Average/cfu (n=3)
5分間	
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	2.3×10^3
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.7×10^3
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	3.9×10^2
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	1.7×10^3
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	2.8×10^3
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	5.1×10^3

5 分間暴露損傷した菌の場合には表 9 に示した健常菌の場合と異なり培地メーカー間に抛る生育性能に顕著な差が認められた。

次いで SCDA 培地に 0.5% グルコースを添加し、そこに 5 分間暴露されて損傷した

BI を添加し、菌数の増加ならびに培地メーカー間の差が無くなるかどうかについて検討した。

結果を表 13 に示した。

表13 *Geobacillus stearothermophilus*芽胞の暴露処理後の回収菌数

0.5% Glucose with SCD Agar にて培養/暴露時間 5分間	Average/cfu (n=3)
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	2.9×10^3
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	2.2×10^3
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	5.7×10^2
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	2.5×10^3
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	3.7×10^3
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	5.7×10^3

5 分間暴露され損傷を受けた BI を 0.5%グルコースを添加された培地で培養すると表 12 に示した無添加の場合に比べ損傷回復菌数が増加していたが、3 分間暴露の場合と同様に、ある特定のメーカーの培地が他のメーカーの培地に比べ生育性能が落ちることが分かった。これは培地の中に含まれる他の損傷回復成分が欠如しているためと推察される。

このことは滅菌バリデーションで培地生育性能を検討するに際しては損傷菌を用いることが必要になることが示唆されている。

次にグルコースに替えてピルビン酸を添加した場合のデータを表 14 に示した。

表14 *Geobacillus stearothermophilus* 芽胞の暴露処理後の回収菌数

0.5% Sodium Pyruvate with SCD Agar にて培養/暴露時間 5分間	Average/cfu (n=3)
1. Tryptic Soy Agar (Difco)	2.3×10^3
2. Trypticase Soy Agar (BBL)	1.9×10^3
3. Tryptic Soy agar (MERCK)	2.6×10^2
4. Soybean-Casein Digest Agar (日本製薬)	4.2×10^3
5. Pearlcore Trypto-Soy Agar (栄研化学)	5.4×10^3
6. Trypto-Soy Agar Nissui (日水製薬)	6.4×10^3

ピルビン酸添加の場合についても、表 13 に示したグルコース添加の場合と同様に無添加の場合に比べ損傷回復菌数が増加しているが、ある特定のメーカーの培地が他のメーカーの培地に比べ生育性能が低下していることが分かった。これは培地の中に

含まれるたの損傷回復成分が欠如しているためと思われる。

このことから滅菌バリデーションで培地生育性能を検討するに際しては損傷菌を用いることが必要になることが示唆される。

表 15 には 121°C で 4 分間暴露され損傷した乾熱滅菌の BI に乳酸カルシウム、ジピコリン酸、パンビタン、複合アミノ酸、リゾチーム、ATP、酵母エキス、可溶性でんぷんならびにカタラーゼを添加した場合と添加しない場合(コントロール)とを比較した結果を示した。

表15 損傷回復剤の添加効果の比較

SCDA培地 (MERCK) /損傷回復剤	Average/cfu (n=3)
1. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	1.7×10^3
2. Dipicolinic Acid 100 μ g/ml (Wako)	-
3. 0.1% Panvitan Powder (Takeda)	1.6×10^3
4. 0.1% Amino Acids Mixture(Wako)	1.7×10^3
5. Lysozime 50 μ g/ml (Wako, SIGMA)	-
6. ATP 100 μ g/ml (ICN)	1.1×10^3
7. 0.5% Yeast Extract (BBL)	9.7×10^2
8. 0.5% Soluble Starch (DIFCO)	1.3×10^3
9. Catalase 150 μ g/ml (Wako)	1.1×10^3

1.1x 10³CFU/ml (コントロール)

コントロールは無添加の場合である。コントロールと比較して、乳酸カルシウム、パンビタン、複合アミノ酸、可溶性でんぷん添加の場合は損傷回復が認められるが、他の成分添加の場合には顕著な損傷回復が認められないことが分かった。

同様な実験をグルコースならびにピルビン酸で行った(表 16)。

表16 損傷回復剤の添加効果の比較

SCDA培地 (MERCK) /損傷回復剤	Average/cfu (n=3)
1. 0.5% Glucose (DIFCO)	1.57×10^3
2. 0.5% Sodium Pyruvate (Wako)	1.46×10^3

1.1x 10³CFU/ml (コントロール)

コントロールと比較してグルコースならびにピルビン酸添加の場合には今まで示して

きた結果と同様に有意に損傷回復が認められることが分かった。

表 17 にはカルシウム、蛋白、グルコースなどの複合体として考えられるミルクを添加した場合について検討した結果を示した。

表17 損傷回復におよぼすミルクの影響

SCDA培地 (MERCK) /損傷回復剤	Average/cfu (n=3)
コントロール	1.03×10^4
1. 1% Fresh milk	1.10×10^4
2. 1% Skim milk	1.46×10^4

損傷回復に於いて培地へのミルクの添加が有効であることが分かったが、ミルクの中でも液体ミルクより粉ミルクの方が有効であることが判明した。

次に損傷菌の培養温度と回復菌数との関係を表 18 に示した。

表18 培養温度と回復菌数との関係

0.5% グルコース添加SCDA培地 (MERCK) /培養温度	Average/cfu (n=3)
1. Incubation at 47°C	1.63×10^4
2. Incubation at 55°C	4.13×10^3

1.1×10^3 CFU/ml (コントロール)

コントロールと比較して損傷菌の場合には培養温度が低い方が生育菌数が多いことが分かる。

D. 考察

1 乾熱滅菌の場合

健常菌の場合には培地メーカーに拠る顕著な生育菌数の差は認められないが、3 分間暴露損傷させた場合には培地メーカーに生育性能の差が認められた。しかし生育培地に 0.5%グルコースを添加すると培地メーカー間の生育性能に顕著な差が認められず、また生育菌数も増大した。6 分間の暴露の場合に

も3分間暴露の場合と同様に培地メーカーに生育性能の差が認められた。そこに 0.5%グルコースを添加すると生育菌数は増大したが、特定の培地メーカーには他のメーカーに比べて生育性能が悪いことが分かった。

160°C で 5 分間暴露された損傷菌生育培地に種々の損傷回復剤を添加した結果、カルシウム、L-アラニン、複合アミノ酸、ピルビン酸が損傷回復に有効であ

ることが分かった。D-アラニンは阻害に作用した。このことは芽胞のエキソスポアに存在するアラニンラセマーゼの作用で生成した D-アラニンが L-アラニンの損傷回復作用を阻害した可能性が考えられる。

またカルシウムが損傷回復に有効であったこととは異なり、リボゾームの構造維持や ATP の補酵素として必要なマグネシウムが損傷回復に殆ど有効に作用しなかった理由については現時点では良く分からない。

2 高圧蒸気滅菌の場合

健常菌の場合には培地メーカーに拠る顕著な生育菌数の差は認められないが、3 分間暴露損傷させた場合には培地メーカーに生育性能の差が認められた。乾熱滅菌の場合と異なる点は、3 分間暴露損傷させた菌の生育培地に 0.5% グルコースを添加しても菌数の増加は認められるが、ある特定の培地メーカーの生育性能が劣っていることが確認された。5 分間の暴露の場合にも 3 分間暴露の場合と同様に培地メーカーに生育性能の差が認められ、そこに 0.5% グルコースあるいはピルビン酸を添加した場合、生育菌数は増大したが、それらを添加したとしても特定の培地メーカーには他のメーカーに比べて生育性能が悪いことが分かった。

その意味で滅菌効果を過大評価しな

いためと正確な滅菌バリデーションを行うためには培地性能試験は健常菌ではなく損傷菌を用いて行う意義がある。

121°C で 4 分間暴露された損傷菌生育培地に種々の損傷回復剤を添加した結果、カルシウム、パンビタン、複合アミノ酸、可溶性でんぷん、ピルビン酸、グルコースが損傷回復に有効であることが分かった。複合アミノ酸の中の最大の寄与は L-アラニンの存在と思われる。

損傷菌については培養温度が低く、長い期間培養することで損傷回復がはかれると期待される。その理由としては損傷菌の回復に要する誘導期間 (lag phase) が長いことが考えられる。

E 結論

1. 健常菌の場合には培地メーカーに拠る顕著な生育菌数の差は認められない。
2. 損傷菌生育培地に、カルシウム、L-アラニン、複合アミノ酸、ピルビン酸、グルコース添加が損傷回復に有効であり、培地メーカー間の生育性能の差を少なくさせる効果がある。
3. 損傷菌については培養温度が低く、長い期間培養する必要がある。

G 研究発表

1 論文発表

1. Sasaki K, Shintani H, Itoh J, Kamogawa T, Kajihara Y. (2000) Effect

of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Appl Environ Microbiol.*, **66**, 5509-5513.

2. Shintani H, Sasaki K, Kajiwara Y, Itoh J, Takahashi M, Kokubo M. (2000) Validation of D value by different SCD culture medium manufacturer and/or different SCD culture medium constituent. *PDA J Pharm Sci Technol.*, **54**, 6-12.

2 学会発表

新谷英晴(2006)加熱滅菌での滅菌バリ
レーションに於いて損傷菌を考慮する
意義について、日本防菌防黴学会

H. 知的所有権

1. 特許

新谷英晴、再現性のある滅菌保証達成
方法、日本特許第 3085533 号。