

図1. 腹腔内埋植試験における術後1週目の病理所見

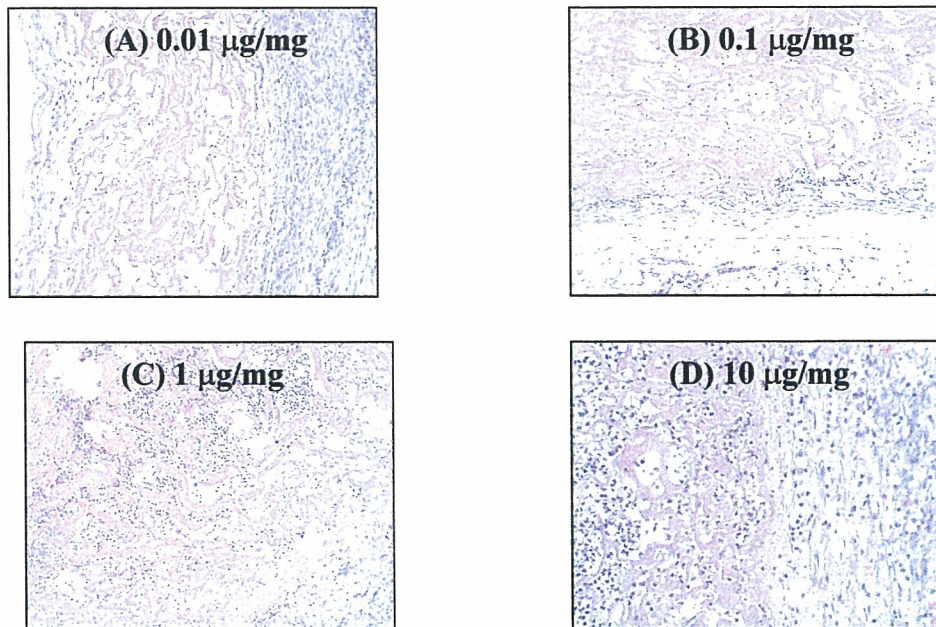


図2. 黄色ブドウ球菌含有シート皮下埋植試験の病理所見

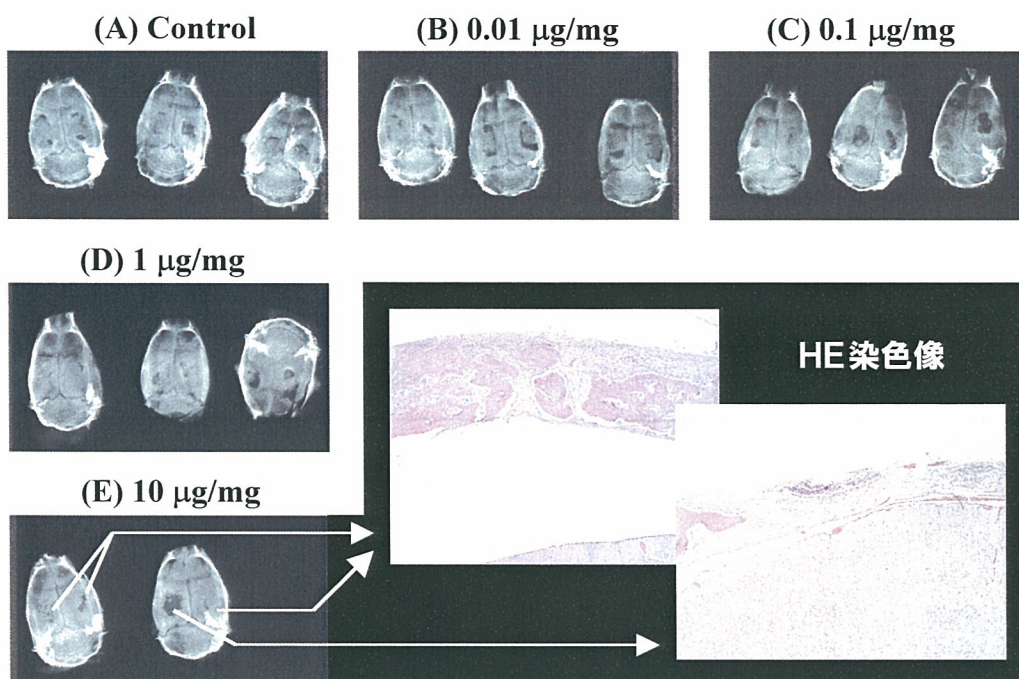


図3. 黄色ブドウ球菌含有シート頭蓋骨埋植試験の病理所見

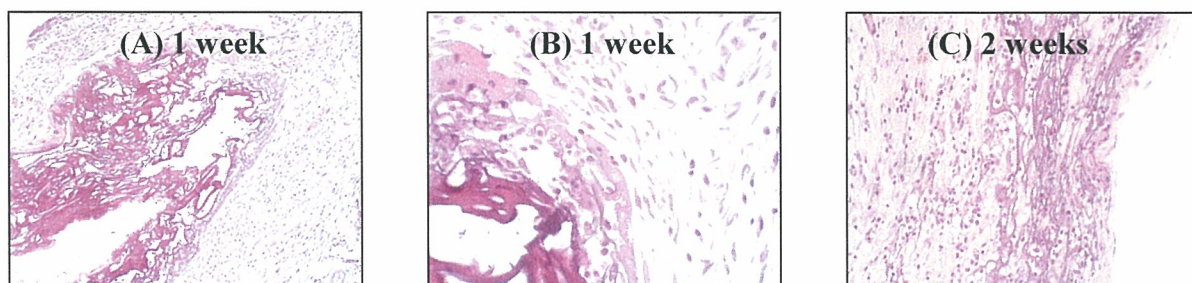


図4. 酸処理ゼラチンシートの生体適合性評価

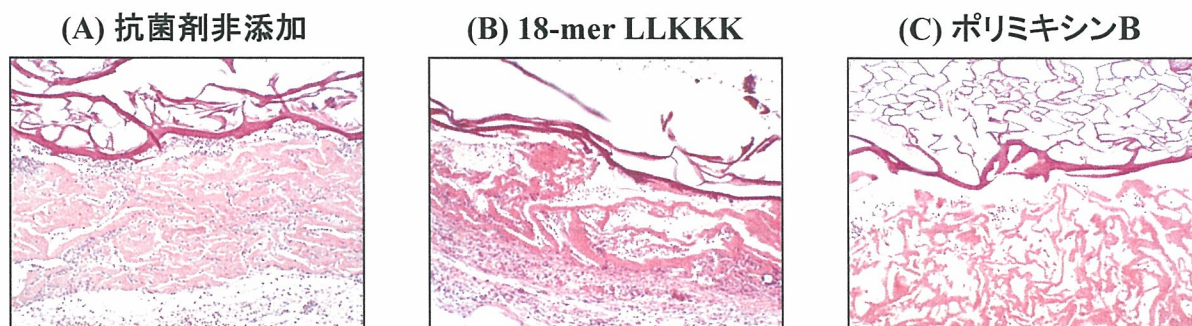


図5. 緑膿菌感染による炎症誘導と抗菌剤の消炎効果

実験群	抗菌剤濃度 (mM)	回収生菌数 (cfu/plate)						平均値 (cfu/plate)	生菌数 (cells/rat)	生菌回収率 (%)
		試験液希釈倍率								
		x 1	x 10	x 100	x 1000	x 10000	x 100000			
陰性対照 (非感染群)	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	0	0	0	0	0	0	0			
	0	0	0	0	0	0	0			
陽性対照 (感染群)	0	-	-	275	262	29	29	32380	$6.5 \times 10^6$	100
	0	-	-	-	-	185	173			
	0	-	-	-	-	764	765			
18-mer LLKKK	1710	0	0	0	0	0	0	< 1	-	-
		2	2	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
	428	0	0	0	0	0	0	< 1	-	-
		0	2	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
42.8	130	119	15	10	3	3	612	$1.2 \times 10^5$	1.9	
	38	10	1	1	0	0				
	-	-	179	135	17	17				
ポリミキシン B	388	0	0	0	0	0	0	0	-	-
		0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
	38.8	0	0	0	0	0	0	0	-	-
		0	0	0	0	0	0			
		0	0	0	0	0	0			
3.88	0	0	0	0	0	0	< 2	-	-	
	2	8	0	0	0	0				
	0	0	0	0	0	0				

表 1. in vivo 抗菌試験結果

表2. ラット埋植試験における NOAEL 値に基づいた LPS 規格値の計算例

適用部位	LPS 回収法	ラット埋植試験				ヒトへの外挿				体重当たりの LPS 許容値 (EU/kg)
		NOAEL 実測値 (EU/mg)	埋植重量 (mg)	体 重 (kg)	体重当たり の LPS 量 (EU/kg)	安全係数				
						UF1	UF2	UF3	UF4	
						種 差	個人差	材料分解 速度	菌 種	
皮 下	EndoTrap 精製 コラゲナーゼ/ HCl 法	433.8	10.0	0.15	28920	10	10	1	1	289
						10	5	1	1	578
						5	5	1	1	1157
						10	1	1	1	2892
	HCl 法	49.2	10.0	0.15	3280	10	10	1	1	32.8
						10	5	1	1	65.6
						5	5	1	1	131
						10	1	1	1	328
	ガイドライン法	8.14	10.0	0.15	543	10	10	1	1	5.43
						10	5	1	1	10.9
						5	5	1	1	21.7
						10	1	1	1	54.3
腹 腔	EndoTrap 精製 コラゲナーゼ/ HCl 法	1162.8	10.0	0.15	77520	10	10	1	1	775
						10	5	1	1	1550
						5	5	1	1	3101
						10	1	1	1	7752
	HCl 法	204.8	10.0	0.15	13653	10	10	1	1	137
						10	5	1	1	273
						5	5	1	1	546
						10	1	1	1	1365
	ガイドライン法	18.5	10.0	0.15	1233	10	10	1	1	1.85
						10	5	1	1	3.70
						5	5	1	1	7.40
						10	1	1	1	18.5
骨欠損部	EndoTrap 精製 コラゲナーゼ/ HCl 法	9.6	6.0	0.15	384	10	10	1	1	3.84
						10	5	1	1	7.68
						5	5	1	1	15.4
						10	1	1	1	38.4
	HCl 法	2.44	6.0	0.15	97.6	10	10	1	1	0.98
						10	5	1	1	1.95
						5	5	1	1	3.90
						10	1	1	1	9.76
	ガイドライン法	0.13	6.0	0.15	5.20	10	10	1	1	0.05
						10	5	1	1	0.10
						5	5	1	1	0.21
						10	1	1	1	0.52

## 2. 再現性のある滅菌バリデーション達成法

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。損傷菌は健常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EOG, ガンマ線あるいは電子線滅菌で損傷を受けたそれぞれの生物指標菌を用いて損傷回復剤の有効性について検討した。

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EOG, ガンマ線あるいは電子線滅菌での生物指標菌を用い、それらの滅菌で損傷を受

けた生物指標菌を用いて損傷回復剤の効果を検討した。

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. EOG 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、 $3.5 \times 10^6$  CFU/担体) を用いて  $600 \pm 30$  mg/L,  $60 \pm 10\%$  RH,  $54 \pm 1^\circ\text{C}$ ) に3分間ならびに10分間暴露させて損傷芽胞を得た。

EOG 滅菌で暴露後 3 種の培地メ

ーカー（メルク，BBL，日水）の Soybean Casein Digest Agar (SCDA) 培地で培養させ、各培地メーカー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。

照射後のBI菌数の測定方法としては、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。

EOG 滅菌で損傷したBI菌に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複合ビタミン、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、L-アラニン、D-アラニン、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、グルコースなどを用い、損傷回復能の違いについて検討した。

## 2. ガンマ線滅菌の場合

レーベン社から購入したガンマ線滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus pumilus* 芽胞 (初期菌数、 $2.0 \times 10^6$  CFU/担体) ならびに *Bacillus megaterium* 芽胞 (初期菌数、 $1.4 \times 10^6$  CFU/担体) を用い *Bacillus pumilus* の場合には 5kGy の照射、

*Bacillus megaterium* の場合には 2kGy あるいは 5kGy 照射して損傷菌を得た。*Bacillus megaterium* はシヨルダーを示すが、*Bacillus pumilus* はシヨルダーを示さない。両方ともかつてはガンマ線滅菌用生物指標菌 (BI) と考えられていた芽胞菌である。

*Bacillus megaterium* 芽胞は 2kGy 照射近辺ではシヨルダーを示すため、同じ損傷菌でも 2kGy 照射と 5kGy 照射との間に差があるか否かについても検討した。損傷菌は BBL 社製の SCDA 培地で培養させた。

照射後のBI菌数の測定方法としては、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。

ガンマ線滅菌で損傷したBI菌に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複合ビタミン、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、L-アラニン、D-アラニン、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、可溶性でんぷん、活性炭、グルコースなどを用い、損傷回復能の違いについて検討した。

### 3. 電子線滅菌の場合

レーベン社から購入した電子線滅菌用生物指標菌 (BI) *Bacillus megaterium* 芽胞 (初期菌数、 $1.4 \times 10^6$  CFU/担体) を用い、それに 4.5kGy 照射して損傷菌を得た。損傷菌は BBL 社製の SCDA 培地で培養させた。

照射後の BI 菌数の測定方法としては、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。

電子線滅菌で損傷した BI 菌に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複合ビタミン、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、L-アラニン、D-アラニン、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、グルコースなどを用い、損傷回復能の違いについて検討した。

## C. 研究結果

### 1. EOG 滅菌の場合

表1 *Bacillus atrophaeus* spore strip のEOGに暴露後、回収試験による生残菌数

EOG暴露、メカ一別 Soybean Casein Digest Agarにて培養	Average CFU/strip
BBL(3分間暴露)	$1.33 \times 10^5$
日水(3分間暴露)	$1.03 \times 10^5$
MERCK(3分間暴露)	$1.13 \times 10^5$
BBL(10分間暴露)	$3.13 \times 10^3$
日水(10分間暴露)	$1.95 \times 10^3$
MERCK(10分間暴露)	$2.18 \times 10^3$

初期菌数  $3.5 \times 10^6$  / strip (Lot. 1162251)

Damaged spores : EOG (  $600 \pm 30$ mg/L,  $60 \pm 10\%$ RH)

SCDA 培地: Lot. 4180042 (BBL) , VM 267758 (MERCK) , Lot 067410 (日水)

表 1 のデータより *Bacillus atrophaeus* の EOG 滅菌での D 値は

約 3 分であり、生残曲線は直線であることが分かった。



表2 Recovery stimulants with damaged spores suspension

Soybean-Casein Digest Agar (日水) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	$1.18 \times 10^5$
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	$1.37 \times 10^5$
3. 0.5% Glucose (DIFCO)	$1.26 \times 10^5$
4. 0.5% Sodium pyruvate (Wako)	$1.07 \times 10^5$
5. 対照 (無添加)	$1.07 \times 10^5$

Damaged spores : EOG( 600±30mg/L, 60±10%RH, 54°C, 3 mins)

表3 Recovery stimulants with damaged spores

Soybean-Casein Digest Agar (日水) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	$2.08 \times 10^3$
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	$2.95 \times 10^3$
3. 0.5% Glucose (DIFCO)	$1.98 \times 10^3$
4. 0.5% Sodium pyruvate (Wako)	$1.41 \times 10^3$
5. 対照 (無添加)	$1.68 \times 10^3$

Damaged spores : EOG( 600±30mg/L, 60±10%RH, 54°C, 10 mins)

表4 Recovery stimulants with damaged spores suspension

Soybean-Casein Digest Agar (日水) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. L-Alanine 100 $\mu$ g/ml (Wako)	$1.19 \times 10^5$
2. D-Alanine 100 $\mu$ g/ml (TCI)	$1.07 \times 10^5$
3. 0.1% Panvitan powder (Wako)	$1.22 \times 10^5$
4. 0.1% Amino acids mixture (Wako)	$1.11 \times 10^5$
5. 対照 (無添加)	$1.12 \times 10^5$

Damaged spores : EOG( 600±30mg/L, 60±10%RH, 54°C, 3mins)

表5 Recovery stimulants with damaged spores suspension

Soybean-Casein Digest Agar (日水) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. L-Alanine 100 $\mu$ g/ml (Wako)	$1.97 \times 10^3$
2. D-Alanine 100 $\mu$ g/ml (TCI)	$1.28 \times 10^3$
3. 0.1% Panvitan powder (Wako)	$1.68 \times 10^3$
4. 0.1% Amino acids mixture (Wako)	$1.90 \times 10^3$
5. 対照 (無添加)	$1.66 \times 10^3$

Damaged spores : EOG( 600±30mg/L, 60±10%RH, 54°C, 10 mins)

Biological Indicator から回収 された損傷芽胞の生残菌数をメー

カーが異なる培地（BBL, MERCK, 日水）で測定した。その結果、培地による差が示された。一番多く生残菌数を示したのが BBL であり MERCK、日水の順であった（表 1）。

そこで表 2 から表 5 で示したとおり、一番少ない損傷回復を示し

た日水の SCDA 培地に損傷回復剤を添加して損傷回復剤の効果を調べた。その結果 3 分間暴露と 10 分間暴露とで損傷回復効果に若干の相違があるが、概ね乳酸カルシウムとグルコース添加に拠って損傷の回復が認められることが分かった。

## 2 ガンマ線滅菌の場合

表6 *Bacillus megaterium* spore strip の放射線照射後、回収試験による生残菌数

放射線照射、Soybean-Casein Digest Agarにて培養	Average CFU/strip
N = 1 2 kGy照射	$1.87 \times 10^5$
5 kGy照射	$4.00 \times 10^2$
N = 2 2 kGy照射	$2.01 \times 10^5$
5 kGy照射	$4.10 \times 10^2$
N = 3 2 kGy照射	$1.91 \times 10^5$
5 kGy照射	$4.30 \times 10^2$

初期菌数  $1.4 \times 10^6$  / strip

表 6 の結果から、本菌はショルダーを示すことが分かった。

表7 *Bacillus pumilus* peper strip 放射線照射後の回収試験による生残菌数

放射線照射、Soybean-Casein Digest Agarで培養	Average CFU/strip
N = 1 5kGy照射	$4.0 \times 10^2$
N = 2 5kGy照射	$4.1 \times 10^2$
N = 3 5kGy照射	$4.2 \times 10^2$

初期菌数  $1.4 \times 10^6$  /strip

本菌はショルダーを示さず、D値は約 1.3kGy であった。

表8 Recovery stimulants with damaged spores suspension

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	$1.90 \times 10^5$
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	$2.25 \times 10^5$
3. 0.5% Soluble starch (DIFCO)	$1.91 \times 10^5$
4. 0.15% Charcoal activated (SIGMA)	$1.86 \times 10^5$
5. 対照 (無添加)	$2.02 \times 10^5$

- ・表示菌数  $1.4 \times 10^6$ /strip ( *Bacillus megaterium* )
- ・放射線処理 ( 2kGy)
- ・N=3 ( 平板3枚の平均値を記載.)

表9 Recovery stimulants with damaged spores suspension

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. L-Alanine 100 $\mu$ g/ml (Wako)	$1.78 \times 10^5$
2. D-Alanine 100 $\mu$ g/ml (TCI)	$1.80 \times 10^5$
3. Panvitan powder 0.1% (Wako)	$1.52 \times 10^5$
4. Amino acids mixture 0.1% (Wako)	$1.80 \times 10^5$
5. Sodium pyruvate 0.5% (Wako)	$1.48 \times 10^5$
6. 対照 (無添加)	$1.54 \times 10^5$

- ・表示菌数  $1.4 \times 10^6$  /strip ( *Bacillus megaterium* )
- ・放射線処理 ( 2kGy)
- ・N=3 ( 平板3枚の平均値を記載.)

表10 Recovery stimulants with damaged spores suspension ( *Bacillus megaterium* )

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	$2.3 \times 10^2$
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	$2.7 \times 10^2$
3. 0.5% Soluble starch (DIFCO)	$2.2 \times 10^2$
4. 0.15 % Charcoal activated (SIGMA)	$2.3 \times 10^2$
5. 対照 (無添加)	$2.1 \times 10^2$

- ・表示菌数  $1.4 \times 10^6$  /strip ( *Bacillus megaterium* )
- ・放射線処理 ( 5kGy)
- ・N=3 ( 平板3枚の平均値を記載.)

表11 Recovery stimulants with damaged spores suspension (*Bacillus megaterium*)

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. L-Alanine 100 $\mu$ g/ml (Wako)	$3.1 \times 10^2$
2. D-Alanine 100 $\mu$ g/ml (TCI)	$2.9 \times 10^2$
3. Panvitan powder 0.1% (Wako)	$2.3 \times 10^2$
4. Amino acids mixture 0.1% (Wako)	$2.8 \times 10^2$
5. Sodium pyruvate 0.5% (Wako)	$2.3 \times 10^2$
6. 対照 (無添加)	$2.4 \times 10^2$

- ・表示菌数  $1.4 \times 10^5$  /strip ( *Bacillus megaterium* )
- ・放射線処理 ( 5kGy)
- ・N=3 ( 平板3枚の平均値を記載.)

表12 Recovery stimulants with damaged spores suspension (*Bacillus pumilus*)

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	$6.0 \times 10^2$
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	$6.2 \times 10^2$
3. 0.5% Soluble starch (DIFCO)	$4.8 \times 10^2$
4. 0.15 % Charcoal activated (SIGMA)	$4.7 \times 10^2$
5. 対照 (無添加)	$4.7 \times 10^2$

- ・表示菌数  $2 \times 10^6$  /strip ( *Bacillus pumilus* )
- ・放射線処理 ( 5kGy)
- ・N=3 ( 平板3枚の平均値を記載.)

表13 Recovery stimulants with damaged spores suspension (*Bacillus pumilus*)

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. L-Alanine 100 $\mu$ g/ml (Wako)	$6.4 \times 10^2$
2. D-Alanine 100 $\mu$ g/ml (TCI)	$6.9 \times 10^2$
3. Panvitan powder 0.1%(Wako)	$7.1 \times 10^2$
4. Amino acids mixture 0.1% (Wako)	$7.2 \times 10^2$
5. 0.5% Sodium pyruvate (Wako)	$6.3 \times 10^2$
6. 対照 (無添加)	$4.8 \times 10^2$

- ・表示菌数  $2 \times 10^6$  /strip ( *Bacillus pumilus* )
- ・放射線処理 ( 5kGy)
- ・N=3 ( 平板3枚の平均値を記載.)

## 0.5% Glucose 添加試験

表14 Glucose addition to the damaged spores with gamma-ray irradiation

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) With or without 0.5% Glucose added	Average CFU/strip
1. 2kGy <i>B. megaterium</i>	$1.9 \times 10^5$
Control (無添加)	$1.7 \times 10^5$
2. 5kGy <i>B. megaterium</i>	$2.1 \times 10^2$
Control (無添加)	$1.7 \times 10^2$
3. 5kGy <i>B. pumilus</i>	$5.8 \times 10^2$
Control (無添加)	$5.1 \times 10^2$

- ・0.5% Glucose培地に添加
- ・放射線処理 (2、5kGy)
- ・平板3枚の平均値を記載

放射線照射 (2kGy) あるいは (5kGy) した *Bacillus megaterium* の場合の損傷回復剤としては両方同様な薬剤であるという結果が示された。放射線滅菌され損傷を受けた生物指標菌に対して乳酸カルシウム、L-Alanine, D-Alanine、アミノ酸混合液、グルコース添加

に拠って損傷回復効果が認められた (表 8-11、14)。この損傷回復は 2kGy の場合も 5kGy の場合も同様であったことから、ショルダー現象部分 (2kGy 照射部分) の修復に特別な薬剤を要求する可能性は否定された。

### 3 電子線滅菌の場合

表15 *Bacillus megaterium* or *Bacillus pumilus* spore strip の放射線照射後、回収試験による生残菌数

電子線照射、Soybean-Casein Digest Agarにて培養	Average CFU/strip
<i>Bacillus megaterium</i> 4.5 kGy照射	$2.3 \times 10^3$
<i>Bacillus pumilus</i> 4.5 kGy照射	$2.5 \times 10^3$

- ・表示菌数  $1.4 \times 10^6$ /strip (*Bacillus megaterium*),  $2 \times 10^6$  / strip (*Bacillus pumilus*)
- ・ Damaged spores : 電子線照射 4.5kGy

表16 Recovery stimulants with damaged spores suspension (*Bacillus megaterium*)

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	$1.82 \times 10^3$
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	$2.13 \times 10^3$
3. 0.5% Glucose (DIFCO)	$2.17 \times 10^3$
4. 0.5% Sodium pyruvate (Wako)	$1.88 \times 10^3$
5. 対照 (無添加)	$1.78 \times 10^3$

- ・表示菌数  $1.4 \times 10^6$  / strip
- ・ Damaged spores : 電子線照射 4.5kGy

表17 Recovery stimulants with damaged spores suspension (*Bacillus megaterium*)

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. L-Alanine 100 $\mu$ g/ml (Wako)	$1.91 \times 10^3$
2. D-Alanine 100 $\mu$ g/ml (TCI)	$2.70 \times 10^3$
3. 0.1% Panvitan powder (Wako)	$1.99 \times 10^3$
4. 0.1% Amino acids mixture (Wako)	$2.01 \times 10^3$
5. 対照 (無添加)	$1.73 \times 10^3$

- ・表示菌数  $1.4 \times 10^6$  /strip (*Bacillus megaterium*)
- ・ Damaged spores : 電子線照射 4.5kGy放射線処理

表18 Recovery stimulants with damaged spores suspension (*Bacillus pumilus*)

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average CFU/strip
1. 0.1% Calcium Carbonate (Wako)	$2.32 \times 10^3$
2. 0.2% Calcium Lactate (nacalai tesque)	$2.52 \times 10^3$
3. 0.5% Glucose (DIFCO)	$2.70 \times 10^3$
5. 0.5% Sodium pyruvate (Wako)	$2.68 \times 10^3$
5. 対照 (無添加)	$2.51 \times 10^3$

- ・表示菌数  $2 \times 10^6$  /strip (*Bacillus pumilus*)
- ・ Damaged spores : 電子線照射 4.5kGy
- ・ N=3 (平板3枚の平均値を記載.)

表19 Recovery stimulants with damaged spores suspension (*Bacillus pumilus*)

Soybean-Casein Digest Agar (BBL) /recovery stimulants	Average/cfu /strip
1. L-Alanine 100 $\mu$ g/ml (Wako)	$2.64 \times 10^3$
2. D-Alanine 100 $\mu$ g/ml (TCI)	$2.59 \times 10^3$
3. 0.1% Panvitan powder (Wako)	$3.10 \times 10^3$
4. 0.1% Amino acids Mixture (Wako)	$2.99 \times 10^3$
5. 対照 (無添加)	$2.54 \times 10^3$

- 表示菌数  $2 \times 10^6$  /strip (*Bacillus pumilus*)
- Damaged spores : 電子線照射 4.5kGy
- N=3 (平板3枚の平均値を記載)

電子線滅菌された *Bacillus megaterium* の場合は何れの薬剤も多少の差はあれ、損傷回復能を示した (表 16、17)。その中で特に乳酸カルシウム、グルコース、D-alanine、アミノ酸混合液が顕著な損傷回復能を示した (表 16、17)。

## D. 考察

### 1 EOG 滅菌の場合

健全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 (表 1)。そこで一番少ない損傷回復を示した日水の SCDA 培地に種々の損傷回復剤を添加して損傷回復剤の効果を調べた。

EOG に 3 分間暴露された *Bacillus atrophaeus* の場合は乳酸カルシウムとグルコースで損傷回復が認められた。しかしピルビン酸の添加では損傷回復効果は認められなかつ

た (表 2)。同様に L-Alanine, D-Alanine, Panvitan, Amino acids mixture についても顕著な損傷回復効果は認められなかった (表 4)。

EOG で 10 分間暴露された場合の損傷芽胞の回復効果については 3 分間暴露と異なる場合もあった。SCDA 培地に炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、グルコース添加で損傷回復効果が認められ、特に乳酸カルシウムの場合に顕著であった (表 3)。同時に L-Alanene, Amino acids mixture 添加の場合も明確な損傷回復効果を与えた (表 5)。しかし D-Alanine, Sodium pyruvate, Panvitan では回復効果が認められなかった (表 3、5)。

炭酸カルシウム、L-Alanene, Amino acids mixture が 3 分間暴露と 10 分間暴露とで異なった結果を与えた理由については分からない。D-Alanine, Sodium pyruvate は、損傷回復に抑制的に働いた結果の様

に見えるが、表2で示された3分間暴露の結果からは必ずしも阻害作用があるとは断定できない。

## 2 放射線滅菌の場合

放射線滅菌され損傷を受けた生物指標菌に対して乳酸カルシウム、L-Alanine, D-Alanine、アミノ酸混合液、グルコース添加に拠って損傷回復効果が認められた(表8-11、14)。この損傷回復は2kGyの場合も5kGyの場合も同様であったことから、一般に培地への馴化あるいは損傷回復に拠って生ずるとされるショルダー現象部分(2kGy照射部分)の修復に対して特別な薬剤を要求するのでは無いことが分かった。

また、放射線照射(5kGy)した *Bacillus pumilis* の場合は、炭酸カルシウム、乳酸カルシウム、L-アラニン、D-アラニン、Panvitan、アミノ酸混合液、ピルビン酸ナトリウム、グルコースに損傷回復効果が認められた(表12-14)。

可溶性でんぷんならびに活性炭は何れの場合も損傷回復効果は認められなかった(表8、10、12)。

## 3 電子線滅菌の場合

電子線滅菌された *Bacillus pumilis* の場合は炭酸カルシウムの場合を除いて何れの薬剤も損傷回

復能を示した(表18、19)。その中で特にグルコース、Panvitan、アミノ酸混合液添加で顕著な損傷回復能が示された(表18、19)。*Bacillus megaterium* で顕著な回復能を示した。乳酸カルシウム、D-alanine、グルコースは *Bacillus pumilis* では顕著では無かったが、回復能を示すことには違いはない。

乳酸カルシウムの回復能が良くなかったのは他の滅菌法で見られた結果とは異なっていた。

## E 結論

1. 滅菌方法ならびに菌、暴露時間(損傷の程度)に拠って損傷回復に要する回復剤が異なる。
2. その理由は滅菌メカニズムの違いと菌本来が有する栄養要求の違いに起因すると思われる。
3. 損傷菌生育培地に、乳酸カルシウム、L-アラニン、複合アミノ酸、グルコースなどの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。複合アミノ酸の主たる効果はL-アラニンに拠ると考えられる。
4. 平成17年度の研究結果で得られた加熱滅菌での損傷回復の場合、ピルビン酸が損傷回復に有効であったがEOGならびに放射線滅菌で



はピルビン酸の有効性は余り認められなかった。これはそれぞれの滅菌メカニズムの違いに拠ると思われる。加熱滅菌は蛋白変性あるいは酸化で、EOGは核酸塩基あるいはタンパク質に対するアルキル化剤、放射線滅菌は核酸塩基のラジカル破壊に基づくという相違が存在する。

## G 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Shintani, H: Importance of Considering Injured Microorganisms in Sterilization Validation, Biocontrol Science, 11(3), 91-106 (2006)
- 2 新谷英晴：損傷菌ならびに貧栄養菌の特性およびこれらの菌の修復・培養条件について[5] 放射線滅菌に拠る損傷ならびにその耐性、防菌防黴、34(10)、645-652 (2006)
- 3 新谷英晴：損傷菌ならびに貧栄養菌の特性およびこれらの菌の修復・培養条件について[6]、化学薬剤に対する微生物の損傷と回復、防菌防黴、34(11)、731-740 (2006)

### 2 学会発表

1. 新谷英晴 (2006) 加熱滅菌での滅菌バリデ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

2. 新谷英晴 (2007) EOG 滅菌あるいは照射滅菌での滅菌バリデ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。

### 3. 医療材料の免疫毒性評価手法の開発

五十嵐 良明

医療材料の免疫毒性評価手法の開発

分担研究者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部室長

研究要旨

医療機器の抽出に用いられる植物油のLLNAにおけるリンパ節活性化反応に対する影響を検討した。アセトン、AOO(4:1)、AOO(1:4)及びオリーブ油について比較したが、これらの中で有意な差はなかった。それぞれの溶媒にHCAを溶解して試験したところ、AOO(4:1)を溶媒としたときに最もSI値が高くなった。生理食塩水を抽出液として用いたときのマウスへの塗布方法として、界面活性剤、糊剤の添加、及び有機溶媒混合法を検討した。SLS溶液、DMSOでは他の溶媒に比べて高い値を示し、結果としてHCAのDMSO溶液のSI値は低くなった。今回試験した中ではT80を添加して塗布する方法が適切と思われた。コラーゲンを主とする医療機器の抽出液についてリンパ節活性化反応は認めず、これらの医療材料の皮膚感作性はないと評価した。

複数の化学物質を併用したときの感作性反応を調べた。EMCを前処理した場合、感作性物質のリンパ節活性化反応は変化なかった。SLSを前処理すると、低濃度での感作性反応が増強されることがわかった。皮膚浸透量を増加させるような物質を併用した場合、他の試験物質の反応に影響することが示唆された。

タンパク質及びタンパク製医療機器の即時型アレルギー性を、生理食塩水抽出液についてアジュバントとともに投与し、血清中の総IgE抗体価を測定して評価した。陽性タンパク質OVAは著しい抗体価の上昇を示したが、BSAによる上昇率は少なかった。FBSに関しては若干の総IgE抗体価の上昇を示し、アレルギー性が疑われた。試験した医療機器において総IgE抗体価が増加するものはなく、即時型アレルギーを起こす可能性は少ないと判断した。

A. 研究目的

医療機器及び材料のアレルギー性を評価するには、原則として試料の抽出を行い、得られた抽出物について試験することになる。医療機器は生体に使われるものから、抽出溶媒としては体液に類似した溶媒を用いることが求められる。我が国の医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン<sup>1)</sup>では、抽出条件として溶媒／試料比、抽出時間及び温度を記しているが、溶媒については国際標準規格 ISO 10993 シリーズに順ずるとして明確な記載はされていない。ISO 10993-12<sup>2)</sup>では、極性及び非極性溶媒をそれぞれで抽出することとされ、生理食塩水や植物油などが上げられ、エタノール溶液な

どの有機溶媒も追加で提案されている。そのため、抽出溶媒によって試験結果が変化する可能性がある。皮膚感作性試験 local lymph node assay (LLNA)では水系溶媒での抽出液は動物への塗布が困難であり、なんらかの工夫が必要となる。有機溶媒についてもそれ自体の刺激性の影響や浸透性によって反応性が変化する可能性があるが、皮膚感作性試験についてこれらの可能性を十分検討した例はない。

医療機器の抽出物は、製造の際に加えられた添加剤や高分子材料の分解物が含まれた混合物と考えられる。従って、抽出物の試験は複数の化学物質の併用と言える。界面活性剤は洗剤などに使われ、プラスチックなど高分子材料には

酸化防止剤や紫外線吸収剤が配合されており、接触頻度が多く、他の化学物質との複合曝露が多いと考えられる。そこで、これらとアレルゲンを併用したときにアレルギー反応が影響を受けるかどうか検討した。

近年、動物愛護への関心が高まり、動物を用いない皮膚感受性試験法の開発が積極的に行われている。日本では化粧品企業が主となって樹立細胞を用いた方法を開発した。<sup>3,4)</sup> *In vitro*法はまだ多くの課題が残されていると思われるが、将来的に医療機器への適用が可能かどうか検討しておく必要がある。

医療機器によるアナフィラキシーショックは生命の危機に直結する重大な問題である。アナフィラキシーショックは即時型アレルギーによるものであるが、これを評価するような動物を用いる確立した試験法はない。近年、タンパクアレルギーの評価指標として血清抗体価を測定するのが有用ではないかと考えられている。<sup>5,6)</sup>ここでは、いくつかのタンパクアレルゲンと医療機器の生理食塩水による抽出液を投与し血清抗体価を測定することにより、試験法の確立に向けた基礎的データを収集した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

$\alpha$ -n-ヘキシルけい皮酸( $\alpha$ -n-hexyl cinnamic aldehyde, HCA)は東京化成工業から、アセトン、プロピレングリコール(PG)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)、Tween80 (polyoxyethylene(20) sorbitan monooleate, T80)、Tween20、カルボキシメチルセルロースナトリウム塩(CMC)、2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB)、トリメリト酸無水物(trimellitic anhydride, TMA)及び硫酸ニッケル六水和物( $\text{NiSO}_4$ )は和光純薬工業から、pluronic L92 (PL92)は BASF 社から入手した。綿実油は MP Biomedicals 社から、生理食塩水は大塚製薬から購入した。5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)はナカライテスクから入手し、生理食塩水に溶解して 10 mg/ml とした。Ovalbumin(OVA, albumin chicken egg, Grade V)、RPMI-1640 培地、1%

globlins(Cohn fraction II,III)溶液、0.1 mol/l 炭酸緩衝液(pH 9.6)、Tris-buffered saline (TBS)及び 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 基質溶液は Sigma-Aldrich 社から入手した。牛血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA)として albumin, bovine fraction V solution (30%)を、IgE 標準液として mouse monoclonal IgE anti-dinitrophenyl (DNP) antibody (clone SPE-7)を Sigma-Aldrich 社から入手した。牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS)、2-mercaptoethanol、penicillin G-streptomycin 溶液及びリン酸塩緩衝液(phosphate buffered saline, pH 7.2, PBS)は invitrogen 社のものを用いた。アジュバンドとして Alum (aluminum hydroxide hydrate [ $\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ] gel suspension)を LSL 社から購入した。Rat-monoclonal anti-mouse IgE antibody は Southern Biotechnology Associates 社から入手した。Hourseradish peroxidase labeled goat anti-mouse IgE は Nordic Immunology 社から入手した。IgG、IgG 定量試薬キットは Bethyl 社から購入した。BrdU 測定用 ELISA キットは Roche Diagnostics GmbH 社の Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)を用いた。ATP 測定にはキッコマン社の試薬キット(Luciferol 250 Plus)を用いた。TetraColor ONE は生化学工業から購入した。FITC 標識抗 CD86 抗体(B70/B7-2)、FITC 標識マウス IgG1,  $\kappa$  (isotype control)及び 1%パラホルムアルデヒド溶液(CellFIX)は BD Pharmingen 社、FITC 標識抗 CD54 抗体(clone 6.5B5)は Dako 社から入手した。

医療機器として、市販ゴム手袋、止血用ゼラチンスポンジ(スポンゼル、アステラス製薬)、コラーゲン使用吸収性局所止血材として、インテグランシート(日本臓器製薬)およびアピテン(ゼリア新薬工業)を用いた。

### 2. 動物

雌性 BALB/c 系および CBA/N マウスは日本 SLC から購入し、8~12 週齢で試験に用いた。マウスには餌及び飲料水は自由に摂取させ、1 群 3 または 4 匹とした。

### 3. 細胞