

高圧蒸気滅菌処理の条件と温度に関する検討

研究分担者 杉山和良（国立感染症研究所バイオセーフティ管理室）

研究協力者 伊木繁雄（国立感染症研究所バイオセーフティ管理室）

研究要旨

病原体の不活化の際汎用されるのが高圧蒸気滅菌器であるが、被滅菌物の状態によっては滅菌が不十分となる可能性が懸念される。本研究では、被滅菌物として汎用される実験器具や個人防護具を、また被滅菌物を収容する容器としてオートクレープバッグ及び滅菌缶を用い、様々な条件の下で高圧蒸気滅菌処理を施し、温度計及びケミカルインジケーターにより処理状況を確認した。さらにオートクレープバッグについては、市販品 11 種類について試験を行い、内部温度を検証した。

その結果、オートクレープバッグを用いた場合や滅菌缶の蓋を閉じた場合では、その内部及び被滅菌物内部では設定温度までの上昇は見られなかったが、滅菌缶の口を開放した場合や、蓋を閉じていても 5ml 程度の水を内部に加えた場合には設定温度近辺までの上昇が見られた。

11 種類のオートクレープバッグにおける比較では、片面が紙である 1 種類を除きガウン内部が設定温度まで達することはなかった。ただし、開放状態の方が温度上昇が見られたことから、製品を通過する水蒸気量は十分ではないものと考えられた。したがって、滅菌時はケミカルインジケーターの使用が必要であると考えられた。

ガラス製品やステンレス製滅菌缶では、内部に少量の水を入れることにより設定温度に近い温度上昇が見られた。これは内部で効率的に水蒸気が発生したためと思われる。したがって、これらの器具を用いた滅菌には、内部に少量の水を加えることが効率よい滅菌につながるものと考えられた。今回得られた結果は、教育訓練の場で大いに活用できるものであると考えられた。

A. 研究目的

病原体取扱後には、用いた材料や器具等の消毒・滅菌処理が必須であるが、この際汎用されるのが高圧蒸気滅菌器である。高圧蒸気滅菌は 121℃、2 気圧以上の高温・高圧の条件下で飽和水蒸気被滅菌物に接触した際に放出される凝縮熱を利用して微生物を殺滅するが、被滅菌物の形状や配置に

よっては水蒸気が十分に行き渡らないことが想定され、この場合滅菌が不十分となる可能性が懸念される。したがって、想定される幾つかの条件下において高圧蒸気滅菌処理を行い、装置内の温度分布について調査した。

オートクレープバッグについては、発生した水蒸気被滅菌物に到達するよう水蒸

気透過性を持つ材質であることが謳われているものも存在するが、実際の内部温度については不明である。このため汎用されるオートクレーブバッグを用い、内部温度について検証した。

B. 研究方法

滅菌缶はステンレス製の蓋付角型（200×100×100mm）及び蓋なし筒型（135mmφ×150mm）ものを用いた。被滅菌物には、再利用可能な木綿製ガウン、三角フラスコ（500ml及び1l、ガラス製）、試薬瓶（500ml、本体：ガラス製、蓋：耐熱性樹脂製）、使い捨てのラテックス製手袋、不織布サージカルマスク、不織布メディカルキャップ及びPP製50ml遠心管とした。オートクレーブバッグはPP製の1種類を用いた。

これらを表1に示した条件になるよう組み合わせ、高圧蒸気滅菌器にて121℃、20分処理を行った。この際、温度計及びケミカルインジケータを被滅菌物内に設置し、処理状況を確認した。

オートクレーブバッグの上昇温度の検討については、汚物滅菌に汎用される市販の10種類のオートクレーブバッグ（A～J）を用いた。これに加え、比較対象として内部に飽和水蒸気が充満するよう片面に紙が使われている非汚染物用に設計された1種類（K）も併用した（表2）。被滅菌物は実験衣（ガウン）とし、これらをオートクレーブバッグ内に2着重ねて入れ、以下の設定条件にて同様の操作を行った。

- (1) オートクレーブバッグの口を閉じた（縛った）状態。
- (2) オートクレーブバッグの口を開けた状態（口径約3cm、上向き）。

実際の温度の検証には、高温・高圧条件にて測定可能な市販のボタン電池型温度計これを以下に示す位置に設置し1分ごとに

計測した。

- ・滅菌缶またはオートクレーブバッグ外
- ・滅菌缶またはオートクレーブバッグ内で被滅菌物の外
- ・被滅菌物内の最も水蒸気が到達しにくいと思われる位置

処理状況の確認にはケミカルインジケータを使用し、温度計と同じ位置に設置した。

C. 研究結果

高圧蒸気滅菌処理による被滅菌物内部の上昇温度を表1に示す。

ステンレス製滅菌缶の蓋を閉じた場合は、特に被滅菌物内部では設定温度までの上昇は見られなかった。しかし、滅菌缶の口を開放した場合や、蓋を閉じていても5ml程度の水を内部に加えた場合には設定温度またはそれに近い温度までの上昇が見られ、ケミカルインジケータもより強い反応が見られた（図1）。

ガラス製品である三角フラスコについては、オートクレーブバッグに入れた場合に比べ入れなかった場合の方が温度上昇が見られた。これに5ml程度の水を加えると、設定温度近くまで上昇が見られた。試薬瓶もガラス製品であるが、これをオートクレーブバッグに入れずに蓋を緩めた状態で処理を行ったところ、三角フラスコと同様の結果が見られた。

10種類のオートクレーブバッグ内部の温度上昇の検証では、密閉した場合も開放した場合もオートクレーブバッグ内の温度は比較的高温まで上昇したが、ガウン内部の温度はほとんどで設定温度に比べ20～30℃低くなる結果となった。いずれの場合も密閉した場合に比べ開放した場合の方が高い

温度まで到達する傾向が見られた。しかし、ケミカルインジケータの呈色反応はいずれも不十分であり、密閉でも 120.5℃まで温度上昇が見られた D のオートクレーブバッグ内の反応は、ステンレス缶（蓋閉）内の 50ml 遠心管内部における 116℃での反応よりも弱いものであった（図 1）。

これに対し比較対象として行った K は、オートクレーブバッグ内の温度は 120.5℃で D と差がなかったものの、ケミカルインジケータの呈色反応は全く異なっており、コントロール（121℃、20 分）と差が見られなかった。ガウン内の温度上昇も設定温度近くまで到達しており、またケミカルインジケータの反応もコントロールと差がなかった（図 1）。

D/E. 考察と結論

高圧蒸気滅菌は水蒸気を持つ凝縮熱を利用した滅菌方法であるが、水蒸気が釜や被滅菌物の内部に充満し被滅菌物に直接触れることが効率的な滅菌へと繋がることから、高圧蒸気滅菌器は釜の内部を水蒸気で飽和するために工程初期の段階で内部の空気が除去される仕組みとなっている。しかし、被滅菌物の形状や材質、配置等の状態によっては部分的に空気が残り、その結果温度にむらが生じ十分な滅菌効果が得られない可能性がある。また被滅菌物に直接蒸気を当てるのが困難な場合は、被滅菌物に対し凝縮熱を効率よく伝えなければならないが、この効率は被滅菌物を覆う材質により異なるものと思われる。

今回は、ステンレス製の滅菌缶やガラス器具及びプラスチック製のオートクレーブバッグを用い、さらに内部への水蒸気の取り込み状態の違いにおける熱伝導性を検討

するため、開放状態と密閉状態で比較を行った。また滅菌缶やガラス器具、オートクレーブバッグ内に少量の水を加えて内部で水蒸気を発生させることによる温度上昇についても検討した。

被滅菌物としては、日常的に用いられるものとして実験用のマスク、手袋、帽子、プラスチック製の遠心管及びガウンを用いた。

高圧蒸気滅菌は、飽和水蒸気による 121～124℃で 15 分間以上の処理が日本薬局方で定義づけられていることから、121℃、20 分で行われるのが一般的である。このため今回は 121℃、20 分の設定条件にて検討した。

滅菌缶の蓋を閉じた場合やオートクレーブバッグを用いた場合において、温度上昇が不十分であったことは、凝縮熱が内部まで十分伝達されていなかったことを意味する。これらの条件では内部に空気が存在するため、十分な熱伝導性をもたらすには内部の空気が効率的に除去され水蒸気が入り込むことが重要であるが、今回の結果から内部が水蒸気で十分満たされていないことが示唆された。これらについて開放状態にした場合、滅菌缶やガラス器具では設定温度近辺まで上昇が見られたが、オートクレーブバッグ内のガウンについては温度上昇が不十分であった。これは、ガウン内部に含まれる空気が抜けにくいために十分な水蒸気が到達されなかったためと考えられる。

ガラスやステンレスの容器に少量の水を加えた場合には、内部温度が設定温度近辺まで上昇し、ケミカルインジケータもより強い反応が見られた。同様の現象は被滅菌物内部でも確認された。これは、容器内部で水蒸気が効率的に発生したためと考え

られた。したがって、ガラス製品の滅菌やステンレス製滅菌缶を用いた汚物滅菌の場合は、内部に少量の水を入れることにより滅菌が達成されやすくなると思われた。

またガラス器具内部が水で満たされている場合には、500ml 程度であれば設定温度近辺まで上昇が見られた。データは示していないが、開放状態のプラスチック製容器に対し同様の実験を行ったところ、106.5℃までしか上昇が見られなかった。したがって、液体滅菌時の十分な温度上昇は液面が水蒸気に触れてさえいれればよいのではなく、凝縮熱をあらゆる角度から伝達することが重要なのであって、そのためには液体を収納する容器の熱伝導性が極めて重要な要素であると考えられた。

一方オートクレーブバッグについては、発生した水蒸気が被滅菌物に到達するよう水蒸気透過性を持つ材質であることが謳われているものがあるが、今回試験に供した製品はいずれも比較対象製品である K に比べ温度上昇、ケミカルインジケータの呈色反応ともに不十分であった。K ではガウン内部であっても高い温度上昇が見られていることから、A～J ではオートクレーブバッグを通過する水蒸気が十分ではないことを示唆している。これはオートクレーブバッグを開放状態にすることにより温度上昇が見られたことから、オートクレーブバッグを使用した滅菌処理の際には開放状態とすることが望ましいと考えられた。ただし、ケミカルインジケータの呈色反応はいずれも不十分であり、119℃まで温度上昇が見られた D（開放）のオートクレーブバッグ内の反応は、ステンレス缶（蓋閉）内の 50ml 遠心管内部における 116℃での反応よりも弱いものであった。これは、滅菌缶内では

水蒸気の発生により湿度の上昇が見られたのに対し、オートクレーブバッグ内には十分な水蒸気が供給されなかったためであると考えられる。したがって、滅菌時にはケミカルインジケータを最も水蒸気が到達しにくい場所に設置することが強く望まれる。

高圧蒸気滅菌は水蒸気を持つ凝縮熱により、有害物質を発生させることもなく安全に感染性物質を不活化できる優れた滅菌法であるが、十分な効果を得るためにはその性質を熟知しておくことが必要である。今回得られた結果は、教育訓練の場で大いに活用できるものであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 特許出願状況

なし

表 1 高圧蒸気滅菌処理による被滅菌物内部の上昇温度

A. 個人防護具

	ガウン内	マスク内		手袋内		帽子内	
		ガウン上部 に設置	ガウン下部 に設置	ガウン上部 に設置	ガウン下部 に設置	ガウン上部 に設置	ガウン下部 に設置
AC バッグ使用 密閉		113.0 2		116.5 2		119.0 1	
AC バッグ使用 開放、ガウン1	108.5 2	111.0 3	107.5 3	110.0 2	109.0 3	109.0 3	112.0 3
AC バッグ使用 密閉、ガウン1	101.0 1	102.0 2	108.5 2	105.0 6	113.5 1	110.0 3	116.5 4

数値: 上が最高温度(°C)、下が最高温度記録時間(分)

B. 三角フラスコ

	500ml 三角 フラスコ内	500ml 三角 フラスコ内 (水 1ml)	500ml 三角 フラスコ内 (水 1ml)、 AC バッグ+ 水 20ml	500ml 三角 フラスコ内 (水 5ml)	500ml 三角 フラスコ内 (水 500ml)	1000ml 三角 フラスコ内	1000ml 三角 フラスコ内 (水 1000ml)
AC バッグ使用 密閉	117.0 4	112.0 1					
AC バッグ使用 密閉、ガウン1			118.0 2				
AC バッグ使用 開放					118.5 1		
AC バッグ使用 密閉、水 20ml	116.0 4	117.0 2					
AC バッグ使用せ ず 開放	120.5 5						
AC バッグ使用せ ず アルミホイル 蓋	119.5 4	118.0 4		120.5 14	121.0 10	120.5 6	119.5 4

数値: 上が最高温度(°C)、下が最高温度記録時間(分)

C. 試薬瓶

	瓶内
500ml 試薬瓶	119.5 4
500ml 試薬瓶 (水 1ml)	117.5 2
500ml 試薬瓶 (水 5ml)	120.0 2
500ml 試薬瓶 (水 500ml)	120.0 7

数値: 上が最高温度(°C)、下が最高温度記録時間(分)

D. 滅菌缶

	缶内	50ml 遠心管(蓋なし)	50ml 遠心管(蓋半開)
ステンレス缶 開放		120.5 7	120.5 5
ステンレス缶 蓋閉	119.5 4	116.5 4	116.5 4
ステンレス缶 蓋閉、水 1ml	118.0 3		
ステンレス缶 蓋閉、水 5ml		119.5 5	119.5 2
筒型滅菌缶 開放	120.5 16	121.0 8	120.5 5
筒型滅菌缶 一部開放	120.5 5		
筒型滅菌缶 蓋閉	120.0 1	111.0 4	111.0 3
筒型滅菌缶 蓋閉 水 5ml	121.5 9	119.0 5	
筒型滅菌缶 蓋閉 水 2ml	118.5 1		

数値: 上が最高温度(°C)、下が最高温度記録時間(分)

表2 高圧蒸気滅菌処理時のオートクレーブ
バッグ及びガウン内部の上昇温度

AC バッグ の種類	AC バッグ内		ガウン内	
	密閉	開放	密閉	開放
A	117.5 2	119.0 5	86.5 5	97.0
B	119.0 2	ND	90.0 8	ND
C	118.0 1	119.5 2	82.5 15	94.5 4
D	120.5 8	119.0 2	94.5 10	99.5 2
E	117.5 4	119.5 5	84.0 9	95.0 3
F	118.0 4	119.5 4	94.5 10	103.0 2
G	116.0 3	119.0 1	94.5 3	106.5 1
H	96.0 6	113.5 2	81.5 5	99.5 3
I	118.0 2	120.5 3	89.0 4	95.5 3
J	115.0 3	118.5 3	87.0 18	93.0 3
K	120.5 10	-	120.0 7	-

数値:上が最高温度(℃)、下が最高温度記録時間(分)



D の AC バッグ内
(密閉, 120.5℃, 8分)



D のガウン内
(密閉, 94.5℃, 10分)



K の AC バッグ内
(120.5℃, 10分)



K のガウン内
(120.0℃, 7分)



ステンレス缶 (蓋閉)
50ml 遠心管内
(116.5℃, 4分)



ステンレス缶 (蓋閉) +5ml 水
50ml 遠心管内
(119.5℃, 5分)



コントロール
(121℃, 20分)

図1 ケミカルインジケータの反応

病原体輸送容器に対する消毒・滅菌処理後の影響に関する検討

研究分担者 杉山和良（国立感染症研究所バイオセーフティ管理室）

研究協力者 伊木繁雄（国立感染症研究所バイオセーフティ管理室）

研究要旨

国内で販売されている病原体輸送容器は再利用が担保されていないが、その根拠は明確ではない。再利用の場合、内装容器は安全性を図るため滅菌等の処理が必要と考えられる。このため、流通量の多い市販品4点について汎用性の高い消毒・滅菌処理である高圧蒸気滅菌処理、紫外線照射または薬液（消毒用アルコールによる清拭、次亜塩素酸ナトリウム浸漬）処理を施し、国連規格試験のうち2試験（破裂試験及び内圧試験）を行い、再利用の可否について検討した。

その結果、試験に供した容器は全て破裂試験で合格となった。内圧試験では2種類はいずれの処理後も合格となったが、別の2種類はいずれの処理後も不合格となった。消毒・滅菌処理後の容器にはある程度の劣化が想定されるが、容器の種類で消毒・滅菌処理後の合否に違いが生じたことから、すべての容器について再利用に関する統一見解は示せないものと考えられた。また劣化の進行具合は容器の種類ごとに異なると考えられることから、再利用の容器は容器への影響を踏まえ適切なものを選択すべきであると考えられた。今回の研究成果を基に、メーカーが担保する使用条件を明確にした後、病原体輸送に関する教育訓練資料として活用する予定である。

A. 研究目的

国内で販売されている病原体輸送容器には国産、輸入品含め様々なものがあるが、一部を除きいずれも再利用が担保されていない。しかしその根拠は明確ではなく、ボトルタイプの容器は比較的高価な上、使用後も外観上変化が現れない場合が多いため、再利用を望む声が多い。容器を再利用する場合、安全性を図るため内装容器は滅菌等の処理が必要と考えられるが、処理に伴う容器への影響は否めない。このため今回、容器に対する汎用性の高い消毒・滅菌処理

の影響を調べ、再利用の可否について検討した。

B. 研究方法

試験には、汎用な容器4種類（A：国産品、B、C及びD：いずれも輸入品）を選択した。これらの容器について、表1に示す処理を施し、その後、国連が規定した病原体輸送容器の規格試験¹⁾の一部である破裂試験と内圧試験に供した。今回実施した試験の合格基準を表1に記す。本実験では消毒・滅菌処理を伴う数回程度の再利用を想定し、

根拠となる条件よりも厳しい条件下で実施した。

(i) 破裂試験

液体を満たした一次容器を梱包し、質量 7 kg 以上直径 38mm で衝撃点端部曲径 6mm 以下の鋼製棒を供試容器の 1m 上部より容器の側面及び底面に対して垂直落下させ、一次容器からの漏れを生じないこと。

(ii) 内圧試験

二次容器に対し摂氏 -40°C 及び $+55^{\circ}\text{C}$ の 2 条件で 95kPa の内圧（水圧試験圧力）をかけ、漏れを生じないこと。

本研究では、破裂試験において約 100ml の水を満たしたガラス製容器を内装容器の中に梱包し、既定の試験を行った（図 1）。耐圧試験では、 $+60^{\circ}\text{C}$ の水又は -44°C の不凍液を容器内に満たし、それぞれインキュベーター又はフリーザー内で圧力ポンプによる既定の圧力を加えることで試験を実施した（図 2）。

C. 研究結果

1. 高圧蒸気滅菌処理

高圧蒸気滅菌処理においては、A 及び C は外観上の変化を生じなかった。B は 134°C 処理で溶解したことから、 134°C 処理後の国連規格試験に供することができなかった。D は 121°C 及び 134°C 処理のいずれの場合も本体に若干の歪みが生じた。

破裂試験では、二次容器に破損が生じる場合があったが、いずれも一次容器からの水の漏洩はなく、試験に供したすべての容器が試験基準をクリアした。

内圧試験では、A 及び C は試験基準をクリアした。B は -44°C 及び 60°C のいずれの条件でも漏れが生じた。D は -44°C での漏れは生じなかったが、 60°C では漏れが生じた。

2. 紫外線照射処理

2 時間の紫外線照射処理では、いずれの容器についても見た目における変形や変色等は認められなかった。

破裂試験では、二次容器に破損が生じる場合があったが、いずれも一次容器からの水の漏洩はなく、試験に供したすべての容器が試験基準をクリアした。

内圧試験では、A 及び C は試験基準をクリアしたのに対し、B 及び D は 60°C での漏れを生じた。

3. 薬液処理

薬液処理では、いずれの薬液による処理の後においても外見上の変化を生じた容器はなかった。

破裂試験では、二次容器に破損が生じる場合があったが、いずれも一次容器から水の漏洩はなく、試験に供したすべての容器が試験基準をクリアした。

内圧試験では、0.5%次亜塩素酸ナトリウム浸漬処理の場合、A 及び C はいずれの薬液処理後においても各温度条件における漏れを生じなかったのに対し、B 及び D は 60°C での漏れを生じた。一方 80%エタノールによる清拭処理の場合、A 及び C はいずれの薬液処理後においても各温度条件における漏れを生じなかったが、B は -44°C と 60°C の両方で、D は 60°C での漏れを生じた。

以上の試験結果を表 2 にまとめた。

D/E. 考察と結論

高圧蒸気滅菌処理後は、B 及び D の容器は内圧試験に合格することができなかった。これらの容器本体には熱によるものと思われる変形が確認されていることから、物理的な熱変性が漏れの原因となったものと考えられた。

紫外線照射処理後も、B 及び D の容器は内圧試験に合格することができなかった。

紫外線照射処理では高圧蒸気滅菌処理のような視覚的に明らかな変性は見られていないが、漏れはいずれも蓋と本体の間からであることから、蓋の内側にあるパッキンが紫外線の影響を受けた可能性があると考えられた。

0.5%次亜塩素酸ナトリウム浸漬及び 80%エタノールによる清拭のいずれの処理の場合も、B 及び D の容器は内圧試験に合格することができなかった。高濃度の次亜塩素酸ナトリウムはゴムを劣化させることがあり、またウレタンゴムやアクリルゴムなどアルコールの影響を受け易いものもある。漏れはいずれも蓋と本体の間からであることから、B 及び D の容器に用いられているパッキンの材質に原因があると考えられた。

本試験の結果から、B 及び D の容器はこれらの消毒・滅菌処理後の再利用が困難であるものと考えられた。

消毒・滅菌処理後の容器にはある程度の劣化が想定されるが、今回の試験結果から、消毒・滅菌処理が及ぼす影響が容器の種類により異なることが判明したことから、再利用する場合は容器への影響を踏まえ適切なものを選択すべきであると考えられた。ただし今回は消毒・滅菌処理を伴う数回程度の再利用を想定し、根拠となる条件よりも厳しい条件下で実施した。したがって、今回処理後に不合格となった容器であっても、再利用できる条件が存在する可能性もある。逆に影響を受けにくい容器であっても、条件が厳しくなれば影響を受ける場合もある²⁾。

今回の結果を受け、メーカーが一定の条件下での再利用を担保する可能性があることから、今後はメーカーとの交渉を行い、メーカーが担保する使用条件を明確にする計画である。一方処理後に不合格となった

B 及び D の容器についても、他条件における再利用の可能性は否定できないが、メーカーが再利用について担保していないことから、現段階では1回のみを使用を限度とすることが望ましい。本実験にて得られた情報は、メーカー側の対応を確認後、病原体輸送に関する教育訓練資料として活用する予定である。

参考文献

- 1) 財団法人日本舶用品検定協会：危険物の容器及び包装の検査試験基準（小型容器）（附属書2 病毒をうつしやすい物質用の小型容器），2009.
- 2) 厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 バイオリスク管理の包括的強化及び必要な教材等の開発と実践の評価に関する研究：平成 21 年度総括・分担研究報告書，99-104，2010.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 特許出願状況

なし

表 1 病原体等輸送容器処理条件と根拠

方法	条件	根拠
1. 高圧蒸気滅菌	121℃, 20 分	日本薬局方 [121～124℃, 15min]
	134℃, 25 分	感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き (厚生労働省) [134℃, 18min]
2. 紫外線 (254nm 付近の波長) 消毒	156・m/cm ² 、線量は校正された線量計により確認)を 2 時間	WHO 飲料水水質ガイドライン [タバコモザイクウイルスの 99%不活化に要するエネルギー：59,000・J/cm ² ※]
3. 薬液消毒	5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウム浸漬を 3 時間	CDC Guidelines for State Health Departments (Revised October 14, 2001) [5,000ppm, 1 時間以上の浸漬 (炭疽菌培養物による汚染がある場合)]
	80%エタノールによる清拭を 10 回	感染症法に基づく消毒・滅菌の手引き (厚生労働省) [76.9～81.4vol%エタノールによる清拭]

※紫外線積算光量[μJ/ cm²]=紫外線強度[μW/cm²]×照射時間[sec]

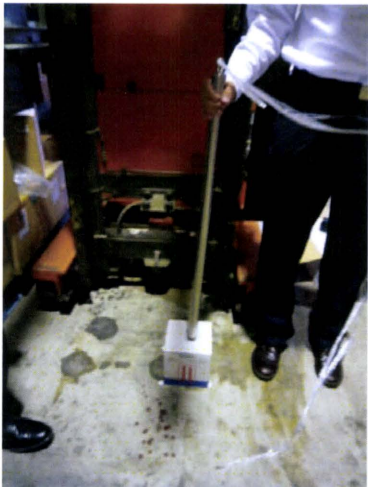


図 1 破裂試験

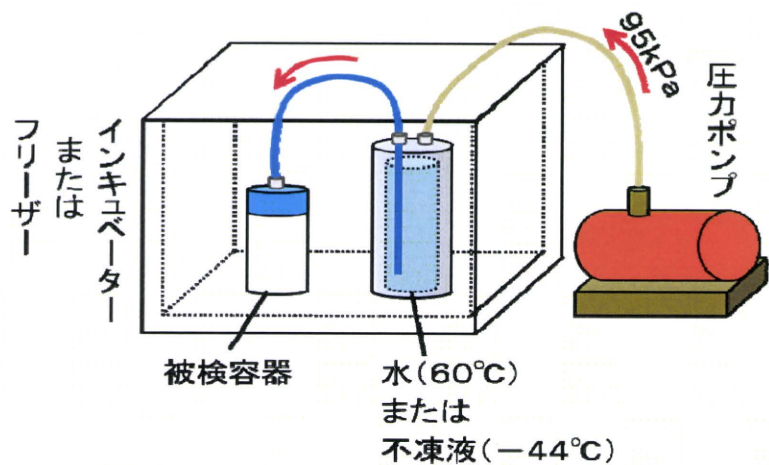


図 2 内圧試験

表 2 各消毒・滅菌処理後の国連規格試験結果

A 破裂試験

処理	落下 部位	容器			
		A	B	C	D
高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分) × 3 回	側面	合格	合格	合格	合格
	底面	合格	合格	合格	合格
高圧蒸気滅菌 (134℃, 25 分) × 3 回	側面	合格	合格	合格	合格
	底面	合格	合格	合格	合格
紫外線 (254nm 付近の波長) 照射 (156 $\mu\text{m}/\text{cm}^2$ 以上) , 2 時間	側面	合格	合格	合格	合格
	底面	合格	合格	合格	合格
5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウム 浸漬, 3 時間	側面	合格	合格	合格	合格
	底面	合格	合格	合格	合格
80%エタノール清拭×10 回	側面	合格	合格	合格	合格
	底面	合格	合格	合格	合格

B 内圧試験

処理	試験 温度	容器			
		A	B	C	D
高圧蒸気滅菌 (121℃, 20 分) × 3 回	-44℃	合格	不合格	合格	合格
	60℃	合格	不合格	合格	不合格
高圧蒸気滅菌 (134℃, 25 分) × 3 回	-44℃	合格	実施 不可	合格	合格
	60℃	合格		合格	不合格
紫外線 (254nm 付近の波長) 照射 (156 $\mu\text{m}/\text{cm}^2$ 以上) , 2 時間	-44℃	合格	合格	合格	合格
	60℃	合格	不合格	合格	不合格
5,000ppm 次亜塩素酸ナトリウム 浸漬, 3 時間	-44℃	合格	合格	合格	合格
	60℃	合格	不合格	合格	不合格
80%エタノール清拭×10 回	-44℃	合格	不合格	合格	合格
	60℃	合格	不合格	合格	不合格

教育用バイオロジカル・セーフティキャビネットの検査基準の検討

研究分担者 重松 美加（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究分担者 安藤 秀二（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究協力者 伊藤 健一郎（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究要旨

各国でバイオセーフティ関連の製品検査が行われており、基準が異なっている。この違いにより、製品の流通が認められないこともある。バイオリスク管理の教育用教材として作成した、スケルトンの教育用バイオロジカル・セーフティキャビネット（BSC）を、日本工業規格の検査基準とオーストラリアの検査基準のそれぞれにしたがって検査し、検査基準の違いによって BSC の評価に違いがあるかを検証し、基準の根底にある考え方の差異とその意義について検討した。

A. 研究目的

実習訓練のために制作した教育用の四方がガラス面となっているバイオロジカル・セーフティキャビネット（BSC）が、欧州と米国の異なる 2 種類の基準を満たしているかを比較検討する。BSC の基準は各国でことになっており、その違いの理由と背景にある考え方について知ること、出荷時検査に合格した規格品の意味するところを理解し、研修内容への反映を目的として行う。

B. 研究方法

日本エアーテック社の協力を得て、既存の Class IIA/B3 を元に 4 面にガラスを入れた教育実習用の BSC を作成しており、これは日本工業規格（JIS）に合格している。制作後 1 年で、オーストラリア（欧州）基準での検査と、同時期に再度日本工業規格に従った検査を実施し、両基準の違いとその理論背景について検討を行った。

（倫理面への配慮）

本分担には、倫理面の配慮が必要な情報は含まれていないが、写真については、個人が

特定できないように配慮した。

C. 研究結果

日本における BSC 点検は、JIS に基づき、（社）日本空気清浄協会が定めた「バイオハザード対策用クラス II キャビネット現場検査マニュアル」に沿って行われている。今回は、4 週間以内に、この米国の基準に近い JIS に対する検査と、欧州基準に近いオーストラリアの基準で検査を行い、比較した。

11 項目に加え、複数段階の細目で実施された検査のうち、キャビネット内の清浄度を保つ機能についてはほぼ同一であり、今回対象とした訓練用の BSC はより厳しい基準で満たしていた（図 1）。

差が見られた項目は下記のように複数あった。

- 1) 前面ガラス開閉に際して、大きく開くとアラームがなるが、ガラス面が下がり、閉まり気味になっても鳴らない。ガラスは適正の高さがあり、許容できる上下幅は狭いことから、一方だけの警報では適正に保てない
- 2) HEPA フィルターの透過性（目詰まり）の確認が難しい。

- 3) 吹出し風速の測定方法と基準が両者で異なる (図 2)
- 4) 気流バランス検査の基準が異なる

以上の差は、キャビネットの作業空間の中、中央を清浄に保つ方向に偏っていた。作業面の両端で噴出し流量が少なく、逆に下向きに吸い込む力が強いことから、外部の空気も巻き込んで乱流が生じていた。また、BSC の四隅での噴出し流量が少なく、基準で異なる測定位置によっては、ラミナ・フローが保たれていなかった。

2 TEST METHODS COVERED BY THE AUSTRALIAN STANDARDS
2.1. Evaluation Biological safety cabinets Class II - DESIGN (AS 2232.2-2009)

No.	Standard text / Findings / Comments (PASS/FAIL)
AS 2232.2 - 3.a	Standard text: The cabinet shall be a self-contained device encompassing a protected work zone with associated cabinetry and fittings.
	PASS / FAIL: PASS
	Comments: N/A
AS 2232.2 - 3.b	Standard text: The work zone shall be supplied, through its entire upper surface, with air passed through a HEPA filter and removable filter guard in such a way as to deliver a vertical, unidirectional downward flow of filtered air.
	PASS / FAIL: PASS
	Comments: N/A
AS 2232.2 - 3.c	Standard text: The front face of the work zone shall include a viewing window and a work access opening through which room air is drawn to form an air barrier that minimizes egress of aerosols through the opening.
	PASS / FAIL: PASS
	Comments: N/A
AS 2232.2 - 3.d	Standard text: The supplied filtered air and drawn room air shall be recovered partly through a removable air intake grille located inside the cabinet and immediately under the work access opening and partly at the rear of the work floor. All recovered air shall be passed from beneath the work floor into a return air plenum chamber integral to the back and/or sides of the cabinet. A removable work floor shall be located in the work zone. NOTE: The work zone is defined as that space between the plane of the removable work floor and the protective guard fitted below the HEPA filter supplying unidirectional downward flow air. The work zone does not include the volume above the removable air intake grille to a height equivalent to the bottom of the viewing window.
	PASS / FAIL: PASS
	Comments: N/A
AS 2232.2 - 3.e	Standard text: The air barrier between the work zone and the room environment shall be created across the full width of the work access opening by induction of room air through the removable air intake grille.
	PASS / FAIL: PASS
	Comments: N/A

図 1. オーストラリア基準に対する BSC 検査結果

2.2 Air velocity and uniformity (AS 1807.1-2006)

TEST METHOD	TEST DESCRIPTION	PASS CRITERIA	PASS, FAIL, N/A
AS 1807.1	Air velocity and uniformity	Average 0.30 to 0.50 m/s. Variance within ± 20% of average.	FAIL

Before adjustments

Pressure drop Filter filter (Pa)	115 Pa
Pressure drop Exhaust filter (Pa)	85 Pa

0.45	0.50	0.46	0.47	0.41
0.32	0.39	0.38	0.38	0.30
0.28	0.33	0.36	0.35	0.31

Average (m/s)	0.38	Variation Max (%)	11.8	FAIL
Minimum (m/s)	0.30	Variation Min (%)	18.2	FAIL

Inflow (m³/min)	V (m³/min) = 381	Each opening = 205 x 1000 mm (A = 0.205 m²)
Exhaust flow (m³/min)	1 = N/A* 2 = N/A* 3 = N/A*	4 = N/A* 5 = N/A* Average = 2.35 (m³/min)
Exhaust area (m²)	2 1 4	A (m²) = 0.649 V (m³/min) = 381
I = N/A*		
W = N/A*		

図 2. 流入速度と流量の検査結果

D. 考察

両基準に合格する結果を比較すると、JIS と米国基準では、特にキャビネットの作業面にあるものの清浄度を厳しく保ち、オーストラリアと欧州の基準では、キャビネットの前で作業している研究者に向かって何もリークしないように、定められていた。一口に規格検査の合格品といっても、一次バリアに関わる基準が異なっている。BSC を使って研究を行っている人の技量によっては、このキャビネットがどちらの基準を満たしているかが安全性に大きく関わってくる。人材を養成し、技量を磨く以外に、使用機器についての正確な情報を知っておくことで、その使い方、使用上の注意へ十分に経緯を払い、バイオリスクによる被害を生じない様にするのが肝要である。

E. 結論

クラス I I 生物学用安全キャビネットの規格検査の基準は各国で異なっており、その違いをよく理解し、バイオセーフティの視点から使用に当たっての注意点を認識することは、曝露機会の低減につながる。また、この規準の違いは、実験計画に際して適切な機器の選定に有用であるほか、バイオリスク評価の際に不可欠な情報となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

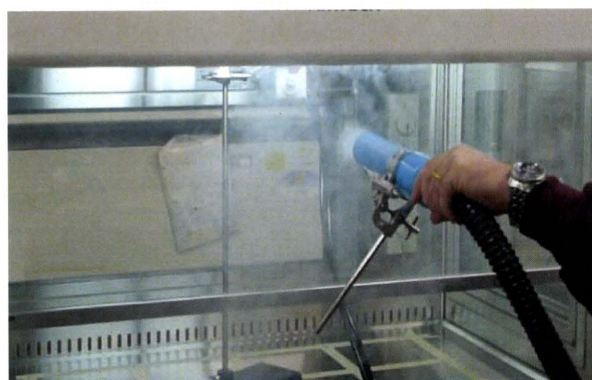
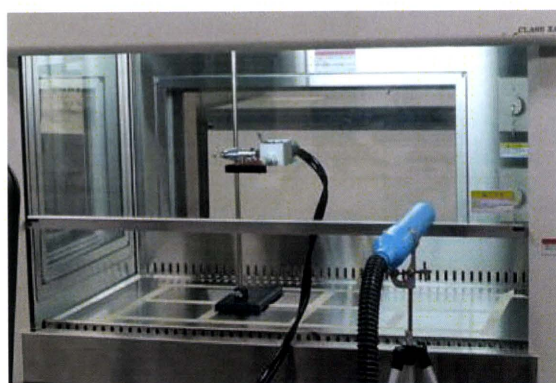
(予定を含む)

なし

別添 1. 測定機器例



別添 2. 検査の状況



バイオセキュリティとバイオセーフティリスク評価ツールに関する研究

研究分担者 重松 美加（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究協力者 Susan A. Caskey（サンディア国立研究所）

研究協力者 Jennifer M. Guadoso（サンディア国立研究所）

研究要旨 バイオリスク管理は、実験施設の管理責任者が最終的な責任を持つ、管理部門の業務である。微生物学関連の背景をもたない管理職も考えられ、その場合は研究者との共同作業となる。しかし、管理の最初のステップであるバイオリスク評価は、経験の蓄積から確率論に基づいてなされているため、バイオリスク管理についての専門知識を必要とする。また、管理運営者は常に費用効率の良い選択をする様に期待されている。本分担では、このような対象者に加え、経験の少ない研究者や、実験室主任が現場でバイオリスク評価を行う際の、評価の指針となる支援ツールを提供することを目標としている。質問に回答してゆくにつれて理解して行ける様なツールを検討し、バイオセキュリティについては英語版、日本語版と昨年度に作成し、今年度はインドネシア語、ロシア語、中国語を作成した。バイオセーフティは3年をかけた理論構築に国際協力し、成果物としてのWEB版の日本語、インドネシア語、ロシア語版の材料を作成した。現在進行形で進められているWEB版の多言語対応へ無償提供する。

A. 研究目的

バイオリスクの評価の難しさと、その実施が安全確保の最も効果的な手段であることが理解され始めているが、評価手法についての理解が浸透していない。これまで、十分な経験を積んだ者による評価か、自己流あるいは、チェックリストを使った方法かのいずれかがとられてきており、理論とデータに基づく論理的な方法は採用されていない。多くの研究や診断に携わる施設でバイオリスク管理の責任者を特定することが求められるようになり、どんな立場の人でも当事者となる可能性が生まれたために、評価の指針となるツールの需要が高まった。

昨年度から、日常的に活用できるバイオリスクの自己評価の支援ツール: Biosecurity Risk Assessment Model Tool (BioRAM) の日本語を含む複数言語版のCD-R起動し、個々の施設のセキュリティ情報を保護するために、個別の

コンピュータにのみ、評価結果を保存するツールの仕組みを検討、作成してきた。

今年度はインドネシア語、ロシア語などのBioRAM version 2のCD-Rを完成し、同じ仕組みで多言語版が作成できることを確認し、広く活用できるように国際機関へ提供する。

B. 研究方法

米国サンディア国立研究所の研究協力者と共にリスクの自己評価ツールのCD-R上ソフトウェアへのプログラム化を検討した。昨年度作成したプログラムを基に、必要な項目をインドネシア語、ロシア語、中国語の環境に適した翻訳を行い、日本語の際にとったものと同じ仕組みで、ソフトウェア間の連携の問題点を解決し、病原体の特性等の更新が必要な情報は、他のプログラムには影響なく、安全にその部分のみ上書きできるような、連結プログラムの調整を行った。

(倫理面への配慮)

個人を特定する情報は含まないため、倫理面での問題は無いと判断される。知的財産権に配慮し、各オープンソースのソフトウェアの使用許諾条件にも配慮して研究を行った。研究協力者が米国国籍であることから、同国の規定順守にも配慮した。バイオセキュリティ情報の取り扱いに配慮し、施設、個人が特定でき無い仕組み（詳細は昨年度報告を参照）がツールに組み込んである。

C. 研究結果

1) バイオセキュリティリスクの評価ツール

- ① 英語、日本語以外の言語での使用を可能にするため、言語環境に合わせて表示できることを確認し、本体の翻訳作業を実施した。
- ② インドネシア語、ロシア語、中国語の翻訳を作成した。
- ③ 言語別に順次CD-Rに搭載し、正常起動を確認した。
- ④ 日本語プログラムを用いたリスク評価は、これまでのベータ版プログラムと同様に機能し、CD-R保存プログラムと、ローカルハードディスク保存のリストと評価結果は正確に分離されていた。つまり、起動時に相対パスを利用し、データベースとしての一覧と BioRAM ディレクトリ以下を、ディレクトリごとにハードディスクへコピーし、それ以下をアプリケーションディレクトリとして使用する形式で、評価終了後にCD-Rを取り出すと、評価結果はCD-Rには残らないようにした。

2) バイオセーフティリスクの評価ツール

バイオセーフティリスクの評価ツールの作成は、研究協力者らの所属する米国サンディア国立研究所と、カナダの公衆衛生局（PHAC）が中心となり、研究分担者も微生物および公衆衛生分野の専門家としてその当初より協力してきた（図 1）。完成した評価ツールは、米国サンディア国立研究所の WEB 上から利用者

登録し、英語版がダウンロード可能となっている。今後、同研究所は国際保健機関への提供により、広く利用できる様にする計画である。しかし、多言語での提供は WHO 公用語であることから、本研究班では専門家が少なく、特にこのツールを必要としていると考えられるインドネシア、ロシア、中国の言語へ翻訳し、日本語版と合わせ、4ヶ国語での提供を目指した。国際版（英語）としては、実際の事例でバイオセーフティ専門家による従来のマニュアル評価とほぼ一致した結果がでることが検証されている。

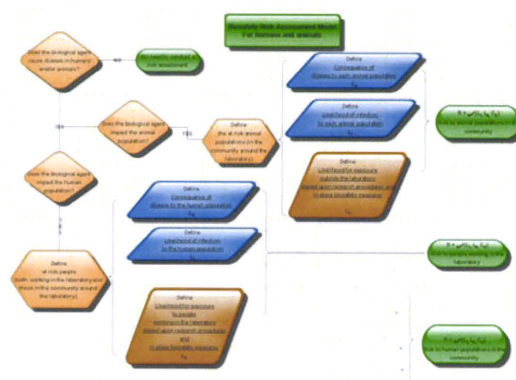


図 1. バイオセーフティリスク評価のアルゴリズム
(米国サンディア国立研究所他)

D. 考察

各国で建設された封じ込め実験室の多くはすでに使用が始まっている。WHO その他の先進各国の病原体管理部門が協力して、バイオリスク評価の実践と日常的導入を推進してきたが、現実の封じ込め実験室のデザインや設計は委託業者や、国際的コンサルタントに任せているところがほとんどである。日常的利用者は、実験室の運用により利益を受ける会社や組織からの報告をそのまま受け取るのではなく、信憑性を含め、そのデータを批判的に評価する能力を持つことが少なくとも求められている。周辺国や隣国も実験室の事故や、意図的に持ち出された際に影響を受けることから、国際的に共有できる評価の方法、特に対策

や対応に際しての意思決定をする人々、必ずしもバイオリスク管理の専門家で無い者も理解ができる手法の採用が求められてきた。

バイオセキュリティとバイオセーフティのリスクの自己評価ツールは、同一の理論に基づいた確率計算をプログラムにし、CD-R起動で、半定量のバイオリスク評価結果を多数が共有する解決策のひとつである。英語版を複数の現場で使用した結果では、コメントやリスク緩和策の提案を得ることはできないが、欧米の専門家による一週間に渡る評価作業と同様のバイオリスク評価結果を示し、誰でも使える有用なツールであることが示された。

アジアやアフリカなどのバイオリスク管理の専門家が不足している地域では、専門家に評価を依頼するコストの削減や、自分たちでの事前審査や評価結果の検証と理解を可能にするため、今回作成したインドネシア語、ロシア語、中国語版の CD-R 版ツールには国際的な期待も影響も大きい。当該国の公衆衛生当局や WHO などへの提供による活用を検討する。

E. 結論

自己評価を支援するツールとして検討してきた BioRAM の CD-R 起動版の多言語化を試みた。日常的にリスク評価に使うソフトウェアへとして、成果物は当該言語を使用する地域へ提供し、現場での活用を促進する。

参考資料： R. M. Salerno, J. Gaudioso. Appendix B: Example Biosecurity Risk Assessment Methodology, in *Laboratory Biosecurity Handbook*, CRC Press, USA, 2007, pp. 115-131.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) S. Caskey, J. Gaudioso, R. Salerno, S. Wagner, M. Shigematsu, G. Risi, J. Kozlovac, V. Halkjær-Knudsen, E. Prat. Biorisk Assessment (BioRAMs). ABSA 53rd Annual Biological Safety Conference, Denver, USA, Oct 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

参考資料：学会発表 1)

