

を滅菌時間とする。初期菌数 10^6 CFU を有するバイオロジカルインジケータの生残確率は、7Dで10%、8Dで1%となるので、 $(7D \sim 8D) \times 2 = 14D \sim 16D$ となる。ハーフサイクル法は、オーバーキル法と比較して一般的に滅菌時間が延長する。

b) オーバーキル法

オーバーキル法の基本的な考え方は、ヘルスケア製品（医療機器、医薬品、体外診断薬等）の滅菌に関する国際規格用語集（ISO/TS 11139）にあるように、“製品のバイオバーデンと同等以上の抵抗性のあるバイオロジカルインジケータに対して、少なくとも12芽胞対数減少（SLR）を与えることが証明されている滅菌工程”（Sterilization process that is demonstrated as delivering at least a 12 Spore Log Reduction (SLR) to a biological indicator having a resistance equal to or greater than the product bioburden）である。すなわち、オーバーキル法とは 10^{-6} の無菌性保証水準（SAL）を確保する滅菌条件として12Dの滅菌を設定する方法である。各滅菌工程に使用するBIについても国際規格で表A-2のように定められている。

表 A-2. 各種滅菌工程に使用する BI の規格

滅菌法	EO 滅菌	湿熱滅菌	乾熱滅菌	低温蒸気およびホルムアルデヒド滅菌
指標菌	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC9372 等	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC7953 等	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC9372 等	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC7953 等
菌数	1.0×10^6 CFU 以上	1.0×10^5 CFU 以上	1.0×10^6 CFU 以上	1.0×10^5 CFU 以上
D値	2.5 分間以上 (54°C) 12.5 分間以上 (30°C)	1.5 分間以上(121°C)	2.5 分間以上 (160°C)	6 分間以上(60°C)
z 値	—	6°C以上	20°C以上	—
ISO 規格	ISO 11138-1, 2	ISO 11138-1, 3	ISO 11138-1, 4	ISO 11138-1, 5

湿熱滅菌に関する国際規格(ISO 17665-1)では、BIとして *Geobacillus stearothermophilus* を示しているが、その付属書には、*Clostridium sporogenes* や *Bacillus coagulans* も提示している。USP<1035> BIOLOGICAL INDICATORS FOR STERILIZATION には、上記 BI の他に *Bacillus subtilis* も示されている。オーバーキル法の場合、基本的には *G. stearothermophilus* を使用することになるが、他の滅菌条件を設定する場合には、*G. stearothermophilus* 以外の BI や各社が製品や製造環境から分離した最強の熱抵抗性菌を BI として使用することになる。

USP<1035>では、*G. stearothermophilus* の D_{121} の最低値を 1.5 分間、最大値を 3.0 分間としている。

例えば、 $D_{121}=2.0$ 分の *G. stearothermophilus* を BI として 12 SLR の滅菌を行うと、 $2.0 \times 12 = 24$ 分の滅菌時間が必要である。実製品を用いた場合、 D 値が BI の表示 D 値より高くなることも多く、単純に $12D$ の滅菌条件を設定すると製品や容器への影響が懸念される。

一方、被滅菌物内部の温度測定技術の向上により、 F_0 による滅菌工程の管理方法が発展し、理論的に D_{121} 値 = 1 分間の菌数を $12 \log$ 減少させる $F_0 \geq 12$ もオーバーキル条件としている (ISO/TS 17665-2)。

c) BI とバイオバーデン併用法

バイオバーデン/BI 併用法は、一般にオーバーキル条件より熱負荷が少なく、絶対バイオバーデン法よりも被滅菌物に熱負荷をかけることができる場合に採用される。この方法は、BI とバイオバーデン法を組み合わせることで無菌性の保証を行うものであり、あらかじめ BI の情報 (菌数、 D 値、 z 値) 及びバイオバーデンから得られた最も高い熱抵抗性を示す菌の D 値を確認しておく。

この手法は、バイオバーデンから得られた熱抵抗性菌の D 値よりも BI の D 値が高いことが前提となり、通例、以下の式に基づき、滅菌時間を設定する。

$$\text{滅菌時間} = D \times \log N_0 / N$$

D : BI の D_{121} 値

N : 生存許容菌数 (10^{-6})

N_0 : 初期菌数

初期菌数は、最大バイオバーデンに相当する菌数であり、平均バイオバーデン数にその標準偏差の 3 倍を加えたものあるいは $1 \log$ ないし $2 \log$ の余裕を持たせたものになる。オーバーキル法が $12D$ の熱負荷量になるのに対し、バイオバーデンと BI の併用法は、通例、 $6 \sim 7D$ の熱負荷量となる。

バイオバーデンと BI の併用法では、バイオバーデンから得られた最も強い耐熱性菌の D 値よりも高い D 値を有する BI を選定 (一般に *C. sporogenes*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* を使用) し、算出されたバイオバーデンの生存確率が 10^{-6} 以下になることを確認する必要がある。ただし、バイオバーデン菌を生物指標として用いる場合もある。バイオバーデンの抵抗性は、後述の絶対バイオバーデン法と同様、ISO 11138-1 に従い、生残曲線法あるいはフラクションネガティブ法で BIER (BI 評価装置) を用いて測定される。チャレンジする BI は、死滅する必要はなく、チャレンジした BI の菌数減少から得られたバイオバーデンの生存確率が、目的とする SAL (無菌性保証水準) に達していることを証明する。

例として、バイオバーデンを調査し、初期菌数 (推定値) が 10^2 個、スクリーニングより得られた最も強い耐熱性菌の D 値が 0.2 分であったと仮定とする。そこで、実際の滅菌サイクルに D 値の明らかな BI ($D_{121} = 0.5$) をチャレンジし、 $4 \log$ 減少の結果が得られたとすると、微生物学的 F_0 値は、 $F_{0\text{BIO}} = 4 \times D_{121} = 4 \times 0.5 = 2.0$ となる。

$Fo_{BIO} = D_{121} \times (\log_{10} A - \log_{10} B)$ の式を変形すると $\log_{10} B = \log_{10} A - Fo_{BIO} / D_{121}$ となり、初期菌数である $A = 10^2$ 、バイオバーデンから得られた $D_{121} = 0.2$ (分) を代入すると $\log_{10} B = \log_{10} 10^2 - 2/0.2 = -8$ となり、 B は 10^{-8} 、つまり、バイオバーデンの生存確率は 10^{-8} という結果が得られる。この結果から、無菌性の確保に必要な 10^{-6} 以下のレベルを満足していることになる。

また、バイオバーデン/BI 併用法は、日常的なバイオバーデン調査を行い、バイオバーデンの菌数及び耐熱性菌の熱抵抗性の確認を継続的に実施する必要がある。

d) 絶対バイオバーデン法

絶対バイオバーデン法は、熱負荷をかけると製品、包装品が不安定になるものや容器が熱により変形するものなどで前述のオーバーキル法、バイオバーデン/BI 併用法が適用できない場合に採用される。被滅菌物（原材料を含む）のバイオバーデンから得られた菌に対して、スクリーニングテスト（通例、 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ で $10 \sim 15$ 分のヒートショックを与える）を実施することにより、最も強い耐熱性菌を調査する。製品からのバイオバーデンの回収方法は、ISO11737-1 に従い実施する。絶対バイオバーデン法は、バイオバーデンから得られた最も強い耐熱性菌の生存確率が 10^{-6} 以下であることを証明する手法である。この手法では、BI の使用は不必要である。

例として、バイオバーデンで得られた最も強い耐熱性菌の D 値と温度の関係が図 A-1 に示す結果になったと仮定する。

その耐熱性菌の D_{121} 値は、図 A-1 から $D_{121} = 10^{-0.1 \times 121 + 11.5} = 0.25$ (分) となり、その耐熱性菌が 10^6 から 10^{-6} まで減少するのに必要な Fo 値は、以下の式で求めることができる。

$$Fo = D_{121} \times (\log_{10} A - \log_{10} B)$$

この式に $A = 10^6$ 、 $B = 10^{-6}$ 、 $D_{121} = 0.25$ を代入すると、 $Fo = 0.25 \times (6 + 6) = 3.0$ となる。ここで得られた $Fo = 3.4$ が滅菌条件設定の目標値となるものであり、滅菌条件を設定し、熱浸透試験を実施した後、最も滅菌が困難な場所（コールドポイント）で $Fo \geq 3.0$ を十分に満たしていることを確認しなければならない。管理されている製造施設で観測されるバイオバーデンは、実際には 10^6 よりもはるかに少なく、例えば最大のバイオバーデン数が 10^2 であることが証明された場合、 10^2 から 10^{-6} まで死滅させる所要最低 Fo 値は、 $Fo = 0.25 \times (2 + 6) = 2.0$ となり、無菌性保証として $Fo \geq 2.0$ を必要とすることになる。

実際には、 10^6 個のバイオバーデンをコールドポイントにチャレンジし、確実に死滅することを無菌性の試験で確認し、無菌性保証水準である 10^{-6} 以下とする滅菌時間を設定し、無菌性保証を行う。この際安全係数を考慮する必要があるのは当然である。

また、バイオバーデン法では、バリデーション後も継続的かつ頻繁にバイオバーデン調査を行い、より熱抵抗性の強い菌が認められた場合には、再バリデーションを行うことが必要であるとともに、すでに出荷した製品への影響を評価する必要がある。

なお、これらの微生物学的評価、すなわちバイオバーデンの見積もりならびに無菌性の

試験等の実施に当たっては該当する ISO 11737 シリーズを適用する必要がある。

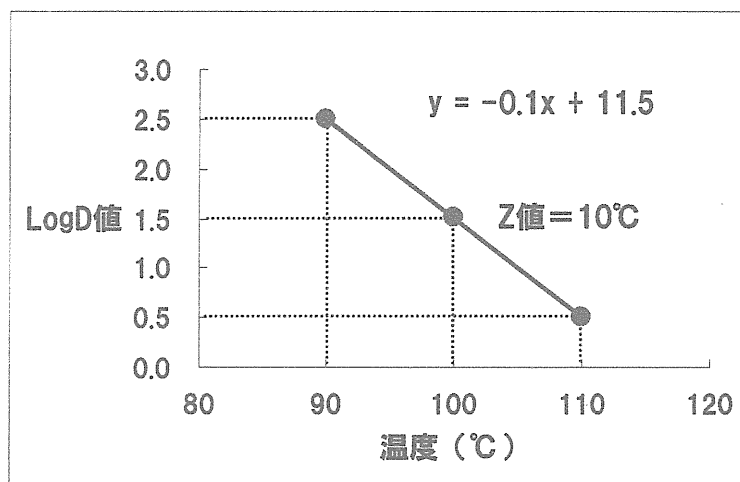


図 A-1. D値と温度の関係

参考資料

- 1) ISO 11138-1:2006 Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 1: General requirements
- 2) ISO 11138-2:2006 Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 2: Biological indicators for ethylene oxide sterilization processes
- 3) ISO 11138-3:2006 Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 3: Biological indicators for moist heat sterilization processes
- 4) ISO 11138-4:2006 Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 4: Biological indicators for dry heat sterilization processes
- 5) ISO 11138-5:2006 Sterilization of health care products — Biological indicators — Part 5: Biological indicators for low temperature steam and formaldehyde sterilization processes
- 6) ISO/TS 11139:2006 Sterilization of health care products— Vocabulary
- 7) ISO 11737-1:2007 Sterilization of medical devices—Microbiological methods—Determination of a population of microorganisms on products
- 8) ISO 11737-2:2009 Sterilization of medical devices—Microbiological methods—Tests of sterility performed in the validation of a sterilization process
- 9) 無菌操作法による無菌医薬品の製造指針. 平成 23 年 4 月 20 日, 監視指導麻薬対策課より事務連絡
- 10) 滅菌バリデーション基準. 平成 23 年 3 月 30 日, 薬食監麻発 0330 第 5 号.

11) ISO/JIS 規格準拠 ヘルスケア製品の滅菌及び滅菌保証 日本規格協会
(2011) .

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐々木次雄	第3節 ワクチン製造所における微生物管理試験	技術情報協会	ワクチンの市場動向と開発・製造実務集	技術情報協会	日本	2012	1-32
佐々木次雄	非無菌医薬品の微生物学的品質特性	技術情報協会	ワクチンの市場動向と開発・製造実務集	技術情報協会	日本	2012	1-25
室井正志、 棚元憲一	IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した TLR シグナリングの抑制的調節	日本エンドトキシン・自然免疫研究会	エンドトキシン・自然免疫研究	医学図書出版	日本	2011	7-10

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Muroi M. and Tanamoto K.	IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6	Biochim. Biophys. Acta	1823	255-263	2012
Nakamura K, Ohtsuki T, Mori, Hoshino H, Hoque A, Oue A, Kano F, Sakagami H, Tanamoto K, Ushijima H, Kawasaki N, Akiyama H, Ogawa H.	Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine	Antiviral Res.	94	89-97	2012
Nobuyasu Yamaguchi, Masashi Torii, Yuko Uebayashi, and Masao Nasu	Rapid, semiautomated quantification of bacterial cells in freshwater by using a microfluidic device for on-chip staining and counting	Appl. Environ. Microbiol.	77	1536-1539	2011
Nobuyasu Yamaguchi, Kouichi Tanaka, Takashi Baba, Norihide	Rapid enumeration of low numbers of moulds in tea based drinks using an automated system	Int. J. Food Microbiol.	145	365-369	2011

Amano and Masao Nasu					
Nobuyasu Yamaguchi, Takashi Baba, Katsuji Tani, and Masao Nasu	Inactivation of bacteria in freshwater by momentary decompression following high pressurization	Microbes and Environments	26	92-94	2011
山口進康, 稗田はつき, 一條知昭, 那須正夫	国際宇宙ステーションから回収した機器における細菌の現存量	第 27 回宇宙利用シンポジウム 発表論文集		221-223	2010
山口進康, 那須正夫	微生物迅速検出法の現状と応用 (総説)	ソフト・ドリンク技術資料	165	19-36	2011
Shigeo Kojima, Satoshi Okada, Tsuguo Sasaki, Tetsuya Oba, Akihiko Fujise, Kumiko Kusuyama	Reliability Study for Membrane-Processed Water for Injection (WFI)	PDA J. of GMP and Validation in Japan	13	47-55	2011