

添付資料 I-3

1 次のように改める。

2 滅菌法及び滅菌指標体

3 滅菌とは、物質中の全ての微生物を殺滅又は除去することを
4 いう。本参考情報は、無菌製品の製造のほか滅菌が必要な場合
5 に適用する。滅菌法を適用する場合には、各滅菌法の長所・短
6 所を十分理解した上で、包装を含む被滅菌物(製品又は滅菌が必
7 要な設備、器具、材料など)の適合性に応じて、適切な滅菌法を
8 選択する。

9 滅菌においては、滅菌装置据付け(滅菌工程の設計・開発を含
10 む)後、その工程が科学的根拠や妥当性をもって設計どおりに正
11 しく稼動していることを評価する適格性評価に基づき設備の保
12 守点検プログラムを設定すること。また、無菌医薬品の製造を
13 行う製造所では、製造全般に関わる品質システムを確立するこ
14 と。例えば、滅菌後の無菌性を含め品質に影響を及ぼし得る全
15 ての作業を明確にし、製品の微生物汚染を回避するために必要
16 な手順書等を設定し、適切に運用すること。

17 滅菌条件を設定し、滅菌後の無菌性を保証するためには、被
18 滅菌物の滅菌前のバイオバーデンを定期的又は一定滅菌単位ご
19 とに測定すること。測定方法は、4.05微生物限度試験法等を参
20 照する。

- 21 本参考情報には代表的な滅菌法を示すが、これら以外にも
22 ・ 滅菌の機構が十分に解明されている
23 ・ 滅菌工程の物理的な重要パラメーターが明確であり、それ
24 らの制御と測定が可能である
25 ・ 滅菌操作を効果的かつ再現性よく実施できる
26 といった要件を満たし、かつ被滅菌物に悪影響を及ぼさない場
27 合は、他の滅菌法も用いることができる。

28 1. 定義

- 29 本法で用いる用語の定義は、以下のとおりである。
30 ・ フィルターの完全性試験：フィルターの微生物捕捉性能デー
31 タとの相関性が実証された非破壊試験をいう。
32 ・ バイオバーデン：被滅菌物に生存する微生物の群集をいう。
33 ・ D値：微生物の死滅率を表す値で、供試微生物の90%を死滅
34 させ、生存率を1/10に低下させるのに要する時間(Decimal

35 Reduction Time)をいう。

36 ・ F_0 値：乾熱滅菌におけるプロセスの微生物不活化能力の程度
37 であり、20℃のz値(D値を10倍変化させる温度変化の度数)
38 を持つ微生物について、160℃の温度に等価な時間(分)で表
39 される値。

40 ・ F_0 値：湿熱滅菌におけるプロセスの微生物不活化能力の程度
41 であり、10℃のz値(D値を10倍変化させる温度変化の度数)
42 を持つ微生物について、121.1℃の温度に等価な時間(分)で
43 表される値。

44 ・ 無菌性保証水準(SAL)：滅菌後に、生育可能な1個の微生物
45 が製品中に存在する確率をいう。10⁻⁶で表される。

46 ・ 線量(吸収線量)：物質の単位質量当たり付与された吸収エ
47 ネルギーの量。単位はグレイ(Gy)で表す。

48 ・ 重要パラメーター：滅菌工程に本質的に必要であり、計測可
49 能なパラメーター。

50 ・ 載荷形態(ローディングパターン)：被滅菌物の滅菌装置又は
51 照射容器内での数、方向、配置方法について規定した組み合
52 わせ。

53 2. 滅菌法

54 2.1. 加熱法

55 加熱法は、熱によって微生物を殺滅する方法である。

56 2.1.1. 湿熱滅菌法

57 湿熱滅菌法には、一般的に広く用いられている飽和蒸気滅菌
58 とその他の湿熱滅菌とがある。湿熱滅菌における管理項目、ユ
59 ーティリティ及び制御装置を、参考として表1に示した。

60 飽和蒸気滅菌は、加圧飽和水蒸気中で微生物を殺滅する方
61 法をいう。本法の重要パラメーターとしては、温度、圧力及び所
62 定の温度における保持時間がある。したがって、通常の滅菌工
63 程管理においては、温度、圧力及び保持時間を常時監視、測定
64 すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として含
65 まれていること。

66 また、その他の湿熱滅菌には、密封容器中の被滅菌物を滅菌
67 する場合に用いる蒸気加圧運転サイクル、水散布サイクル、水
68 浸漬サイクルなどがある。これらの方法の重要パラメーターと
69 しては、容器内の温度、所定の温度における保持時間がある。

表1 湿熱滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	飽和蒸気滅菌	その他の湿熱滅菌
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> ・ 熱履歴(通例 F_0値で表記) ・ 温度(必要に応じてドレインなど) ・ 圧力(滅菌器内) ・ 所定の温度における保持時間 ・ 被滅菌物の載荷形態 ・ 蒸気品質(過熱度、乾燥度、非凝縮性ガス濃度、必要に応じて化学的純度) ・ 滅菌器の中に復圧などのため導入する空気の品質 ・ 冷却のために用いる水の品質 ・ その他必要な事項 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 熱履歴(通例 F_0値で表記) ・ 温度(必要に応じてドレインなど) ・ 必要に応じて圧力(滅菌器内) ・ 所定の温度における保持時間 ・ 被滅菌物の載荷形態 ・ 滅菌器の中に復圧などのため導入する空気の品質 ・ 冷却のために用いる水の品質 ・ その他必要な事項
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> ・ 蒸気 ・ 滅菌器の中に復圧などのため導入する空気 ・ 冷却のために用いる水 ・ 温度制御装置 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 蒸気 ・ 熱水 ・ 滅菌器の中に復圧などのため導入する空気 ・ 冷却のために用いる水 ・ 温度制御装置

- ・圧力制御装置
- ・時間制御装置
- ・その他

- ・圧力制御装置
- ・時間制御装置
- ・連続式滅菌装置の場合の搬送装置
- ・その他

70 2.1.2. 乾熱滅菌法

71 乾熱滅菌法は、加熱乾燥空気中で微生物を殺滅する方法である。
72 通例、バッチ式乾熱滅菌器又は連続式乾熱滅菌装置を用いる。
73 いずれの場合においても滅菌装置に流入する空気の清浄度に留
74 意する必要がある。乾熱滅菌における管理項目、ユーティリティ
75 ィ及び制御装置を、参考として表2に示した。本法はガラス製、
76 磁製、金属製など耐熱性の高い材質のものや鉱油、脂肪油、固

77 形の医薬品などで熱に安定なものが被滅菌物として適している。

78 本法の重要パラメーターとしては、温度及び所定の温度にお
79 ける保持時間(ベルト速度)がある。同じ加熱による滅菌でも、
80 湿熱滅菌法より高い温度又は長い保持時間が必要となる。通常
81 の滅菌工程管理においては、温度及び保持時間を常時監視、測
82 定すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として
83 含まれていること。

表2 乾熱滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	バッチ式乾熱滅菌	連続式乾熱滅菌
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> ・熱履歴(通例F_0値で表記) ・温度 ・所定の温度における保持時間 ・器内外の差圧 ・被滅菌物の載荷形態 ・空気(加熱用、冷却用)の品質 ・その他必要事項 	<ul style="list-style-type: none"> ・熱履歴(通例F_0値で表記) ・温度 ・ベルト速度(保持時間) ・装置内外の差圧 ・載荷密度 ・空気(加熱用、冷却用)の品質 ・その他必要事項
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> ・空気(加熱用、冷却用) ・温度制御装置 ・時間制御装置 ・器内の差圧計 ・HEPAフィルター ・その他 	<ul style="list-style-type: none"> ・空気(加熱用、冷却用) ・温度制御装置 ・時間制御装置 ・装置内の差圧計 ・HEPAフィルター ・冷却装置(必要な場合) ・その他

84 2.1.3. 高周波滅菌法

85 高周波(マイクロ波)を葉液などの被滅菌物に照射すると、吸
86 収された高周波により、被滅菌物の極性分子が配向性を変えよ
87 うと振動し、分子同士の摩擦によりエネルギーを発生する。こ
88 のとき生じる熱(マイクロ波加熱)によって微生物を殺滅する方
89 法を高周波滅菌法という。高周波は、通例、 2450 ± 50 MHzの
90 ものをを用いる。

91 高周波滅菌装置は、マグネトロンを用いて高周波照射を行い
92 加熱する加熱照射部、赤外線ヒーターなどを用いて滅菌温度を
93 保持するための保持部、被滅菌物を冷却する冷却部から構成さ
94 れ、常圧下で被滅菌物を連続的に滅菌する装置である。高周波
95 滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置を、参考
96 として表3に示した。

97 本法は、密封容器等に充填された液状製品又は水分含量の多
98 い製品に適用される。

99 本法の重要パラメーターとしては、被滅菌物の温度、処理時
100 間がある。したがって、通常の滅菌工程管理においては、被滅
101 菌物の温度、処理時間を常時監視、測定すべきであり、そのた
102 めの測定装置は滅菌設備の仕様として含まれていること。

103 高周波による加熱は、熱効率及び応答性に優れ、高温短時間
104 滅菌を連続処理できることが特徴である。ただし、被滅菌物の
105 熱の伝わりやすさによって均一な加熱が難しい場合もある。さ
106 らに常圧環境下での加熱のため、内圧が高くなることから、使
107 用する容器の耐圧性や均一性に注意する必要がある。

表3 高周波滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> ・熱履歴(通例F_0値で表記) ・温度 ・処理時間 ・ベルト速度 ・被滅菌物の形状 ・その他必要事項
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> ・高周波制御装置 ・外部加熱装置(必要な場合) ・冷却装置(必要な場合) ・温度監視装置 ・時間監視装置 ・その他

108 2.2. ガス法

109 ガス法は、滅菌ガスが微生物と接触することによって、微生
110 物を殺滅する方法である。加熱法と比較して低い温度での滅菌
111 が可能で、一般に被滅菌物の熱損傷が少ない方法である。その
112 ため、熱抵抗性の低いプラスチック製容器などに適用される事
113 例が多い。

114 一般的なガスを用いた滅菌法では、汚れや水分が滅菌効果を
115 阻害するため、十分な洗浄、乾燥が重要となる。また、ガスが
116 被滅菌物に吸着される場合では、滅菌効果が減少する。

117 2.2.1. 酸化エチレン (EO) ガス滅菌法

118 EOガス滅菌は、微生物が持つタンパク質、核酸を変性させる

119 ことにより、微生物を殺滅する方法である。EOガスは、爆発性

120 があるため、通例、二酸化炭素などで10～30 %に希釈して用

121 いる。EOガスは、反応性の強いアルキル化剤であるので、EO

122 ガスと反応する製品又はEOガスを吸収しやすい製品の滅菌に

123 は適用できない。

124 滅菌工程はプレコンディショニング、滅菌サイクル及びエア

125 レーションからなる。EOガスは、変異原性などの毒性があるの

126 で、被滅菌物については、エアレーションにより残留EOガスや

127 他の二次生成有毒ガス(エチレンクロロヒドリンなど)の濃度を

128 安全レベル以下に下げることがある。ガスは、法規制に適合す

129 る処理を施して排気する。EOガス滅菌における管理項目、ユー

130 ティリティ及び制御装置を、参考として表4に示した。

131 本法の重要パラメーターとしては、温度、湿度、ガス濃度(圧

132 力)及び時間がある。したがって、通常の滅菌工程管理において

133 は、温度、湿度、ガス濃度(圧力)、及び時間を常時監視、測定

134 すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として含

135 まれていること。

表4 EOガス滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	<ul style="list-style-type: none"> 滅菌ガス導入による圧力上昇、導入時間、最終圧力 温度(滅菌器内及び被滅菌物) 湿度 EOガス濃度(滅菌器内ガス濃度の直接分析が望ましいが、困難な場合は以下の場合も許容される) <ul style="list-style-type: none"> i)使用するガスの質量 ii)使用するガスの容積 iii)初期減圧度とガス投入圧からの換算式採用 作用時間(暴露時間) 被滅菌物の載荷形態 バイオリジカルインジケータの設置点及び培養結果 プレコンディショニング条件(温度、湿度、時間、その他) エアレーション条件(温度、時間、その他) その他必要事項
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> EOガス 注入する蒸気又は水 滅菌終了後、置換する空気 温度制御装置 圧力制御装置 湿度制御装置 時間制御装置 その他

136 2.2.2. 過酸化水素滅菌法

137 過酸化水素による滅菌は、過酸化水素がもつ酸化力又は過酸

138 化水素をプラズマ状態にすることにより発生するラジカルによ

139 る酸化反応によって、微生物を殺滅する方法である。加熱法と

140 比較して低い温度での滅菌が可能であるが、セルロースを材料

141 として用いた使い捨ての作業衣、メンブランフィルターなど過

142 酸化水素を吸着するような被滅菌物では、滅菌効果が減少する

143 ため、このような被滅菌物の滅菌法としては適していない。過

144 酸化水素滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置

145 を、参考として表5に示した。

146 本法の重要パラメーターとしては、濃度、時間、温度がある。

147 プラズマ状態にして滅菌する場合は、高周波装置の管理も重要

148 である。被滅菌物の残存水分、滅菌環境中の湿度が滅菌効果に

149 影響するので、必要な場合は管理すること。

表5 過酸化水素滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	過酸化水素滅菌	過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> 濃度(滅菌器内濃度の直接分析が望ましいが、困難な場合庫内均一性も許容される) 時間 温度 湿度 圧力 過酸化水素の品質 過酸化水素の消費量 被滅菌物の残存水分 被滅菌物の載荷形態 バイオリジカルインジケータの設置点及び培養結果 	<ul style="list-style-type: none"> 濃度(滅菌器内濃度の直接分析が望ましいが、困難な場合庫内均一性も許容される) 時間 温度 湿度 圧力 過酸化水素の品質 過酸化水素の消費量 被滅菌物の残存水分 被滅菌物の載荷形態 バイオリジカルインジケータの設置点及び培養結果

	・ケミカルインジケータの設置点及び結果	・ケミカルインジケータの設置点及び結果
管理すべき ユーティリティ 及び制御装置	・過酸化水素 ・圧力計 ・過酸化水素注入装置	・過酸化水素 ・圧力計 ・過酸化水素注入装置 ・高周波発生装置

150 2.3. 放射線法 160 それぞれ水分子と反応してラジカルなどを生成し、微生物のDNA
151 2.3.1. 放射線滅菌法 161 に損傷を与えることによって殺滅する間接作用がある。
152 放射線滅菌法には、コバルト60を線源としたγ線を被滅菌物 162 両法とも室温で滅菌が可能であるため、熱に不安定な物質に
153 に照射することで微生物を殺滅するγ線照射滅菌と、電子線加 163 適用でき、放射線が透過するためこん包状態での滅菌も可能で
154 速器から放出される電子線を照射することで微生物を殺滅する 164 ある。γ線滅菌は、電子線に比べると透過力が高いため、主に
155 電子線照射滅菌とがある。滅菌方法の選択にあたっては、被滅 165 金属、水、粉末などを含む高密度製品に適している。電子線滅
156 菌物の品質劣化を含む適合性を事前に確認しておくこと。 166 菌は、γ線に比べて単位時間当たりの放射線の量(線量率)が高
157 γ線照射滅菌ではγ線が二次的に発生する電子で微生物を殺 167 いため、処理時間が短くなる。放射線滅菌における管理項目、
158 滅し、電子線照射滅菌では電子が直接微生物を殺滅する。この 168 ユーティリティ及び制御装置を、参考として表6に示した。
159 ような電子による直接作用がある一方で、γ線及び電子線がそ

表6 放射線滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	γ線照射滅菌	電子線照射滅菌
管理項目	・吸収線量 ・被滅菌物の載荷形態(密度) ・照射時間(コンベア速度又はサイクルタイム) ・その他必要な事項	・吸収線量 ・被滅菌物の載荷形態(密度) ・電子ビーム特性(平均電子ビーム電流、電子エネルギー、走査幅) ・その他必要な事項
管理すべき ユーティリティ 及び制御装置	・ベルトコンベア ・線量測定システム ・その他	・電子ビーム測定装置 ・ベルトコンベア ・線量測定システム ・その他

169 2.4. ろ過法 180 などが影響を及ぼす重要パラメーターとして挙げられる。フィ
170 ろ過法は、滅菌用フィルターによって液体又は気体中の微生 181 ルターの微生物除去では、滅菌の対象が液体の場合には、ろ過
171 物を物理的に除去する方法である。したがって、熱、放射線に 182 を行う液体の物理化学的性質(粘度、pH、界面活性作用など)に
172 対して不安定な被滅菌物にも適用できる。なお、ここに記載し 183 影響される。一般に、適切な条件下で培養された指標菌
173 たるろ過による被滅菌物は、0.2µmメンブランフィルターで除去 184 *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146, NBRC 14213)又は
174 できる微生物であり、細菌の中でもマイコプラズマやレプトス 185 これより小さな適切な菌を用いて、フィルターの有効ろ過単位
175 ビラ、またウイルスは対象としない。ろ過法における管理項目、 186 面積(cm²)当たり10⁷ CFU以上をチャレンジし、フィルターの二
176 ユーティリティ及び制御装置を、参考として表7に示した。 187 次側に無菌のろ液が得られることにより、滅菌用フィルターの
177 液体ろ過滅菌では、ろ過時間、ろ過量、ろ過流速、ろ過差圧、 188 微生物捕捉性能は検証される。
178 温度などがフィルターの微生物除去に影響を及ぼす重要パラメ 189 なお、ろ過前の液体中のバイオバーデンは、ろ過滅菌性能に
179 ーターとして挙げられる。気体ろ過滅菌では、ろ過差圧、温度 190 影響を及ぼすため、その管理について考慮する。

表7 ろ過法における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	液体ろ過滅菌	気体ろ過滅菌
管理項目	・ろ過時間 ・ろ過量 ・ろ過流速 ・ろ過差圧 ・温度 ・フィルターの完全性 ・多回使用の場合は、使用期間及びフィルターの滅菌回数 ・その他必要な事項	・ろ過差圧 ・フィルターの完全性 ・使用期間 ・フィルターの滅菌回数 ・気体流れ方向(双方向に流す場合) ・必要な場合は温度 ・その他必要な事項
管理すべき	・圧力計	・圧力計

ユーティリティ
及び制御装置

・流量計
・完全性試験装置
・その他

・流量計
・完全性試験装置
・その他

191 3. 滅菌指標体 (インジケータ)

192 3.1. バイオロジカルインジケータ (BI)

193 3.1.1. 概要

194 BIとは、ある滅菌法に対して強い抵抗性を示す微生物の芽胞

195 を用いて作られた指標体であり、当該滅菌法の滅菌条件の決定

196 及び滅菌工程の管理に使用される。

197 指標体は、その形状から、「ペーパーストリップタイプ」、

198 「金属などの表面に接種するタイプ」、 「液体タイプ」及び「培

199 地とペーパーストリップがあらかじめ封入された培地一体タイ

200 プ」などに分類される。また、担体から分類すると、ろ紙、ガ

201 ラス、ステンレス又はプラスチックなどを担体として、指標菌

202 の芽胞を接種して包装したものと、製品又は類似品を担体とし

203 て指標菌の芽胞を接種したのものがある。代表的な指標菌の例を

204 表8に示した。

表8 代表的な滅菌法別指標菌一覧

滅菌法	菌種	株名	D値等(参考)
湿熱滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953, NBRC 13737	1.5分間以上(121 °C)
乾熱滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721	2.5分間以上(160 °C)
EOガス滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721	2.5分間以上(54 °C) 12.5分間以上(30 °C) ガス濃度 600 mg/L±30 mg/L, 相対湿度 60 %RH
過酸化水素滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 12980, ATCC 7935, NBRC 12550	—

205 3.1.2. 市販BIの表示事項

206 ISO11138-1に従って製造された市販BIの使用者は、BI製造

207 者より使用者に対して提供された次のような情報を確認するこ

208 と。

209 ・製造トレーサビリティ(微生物、単体、包装材料など)

210 ・菌種名

211 ・公称菌数

212 ・抵抗性

213 ・使用方法

214 ・保管条件(温度、使用期間など)

215 ・培養条件(温度、期間、培地など)

216 ・廃棄方法

217 BIの性能を決める項目としては、「菌種」、「抵抗性」、「菌

218 数」などがある。抵抗性は、同じ菌種であっても担体又は包装

219 材料の材質若しくは形状によっても変動するため、包装材料を

220 含めた評価が必要である。

221 3.1.3. 市販BI使用時の管理

222 BIを使用する場合には、BI製造者が提示した保管条件、滅菌

223 後から培養開始までの期間、培養条件、廃棄方法などに従い取

224 り扱うこと。特に、保管条件はBIの性能に影響を及ぼすおそれ

225 があるため、取り出してから使用するまでの期間についても長

226 時間放置しないなどの留意をする必要がある。

227 BIは、被滅菌物全体を評価できるように設置する。また、加

228 熱による滅菌におけるコールドスポットのような、それぞれの

229 方法において、滅菌効果が低いと予測される場所にも設置する。

230 回収する場合は、BIの包装材料や担体を破壊しないように留意

231 する。また、包装材料を破壊してしまった場合は、指標菌が放

232 出・拡散する可能性があるため、微生物汚染防止の観点から、

233 手順をあらかじめ決めておくこと。

234 BIを購入して使用する場合、使用者は、必要に応じて受入時

235 に芽胞菌数などの測定を行い、BI製造者の公称菌数との間に大

236 きな差がないことを確認すること。

237 3.1.4. 使用者による滅菌指標体作製時の注意

238 購入したBIを使用せず、製造環境や被滅菌物から回収したバ

239 イオーバーデンを利用して指標体を自作する場合は、使用前に少

240 なくとも次のような事項を評価すること。

241 ・菌種名

242 ・菌数

243 ・抵抗性(当該滅菌温度又は滅菌ガス濃度におけるD値)

244 ・保管条件(温度、使用期間など)

245 ・培養条件(温度、期間、培地など)

246 なお、抵抗性についてはバイオバーデン中の最大の抵抗性菌

247 であることを継続的に示すための評価プログラムを定めること。

248 3.1.5. 市販BIの使用者による改変時の注意

249 購入したBIを包装から取り出し、薬液や資材などの被滅菌物

250 に接種して使用する場合は、菌数や抵抗性が変動するため、使

251 用前にこれらの性能を評価すること。

252 評価を行う場合は、ISO11138やUSP<55>を参照することが

253 できる。抵抗性の評価には、生物指標抵抗性評価装置(BIER)

254 又はオイルバスを用いたキャピラリー法がある。自社にて評価

255 することが困難な場合は、外部試験検査機関を利用することも

256 できる。

257 3.2. ケミカルインジケータ (CI)

258 CIとは、熱、ガス、又は放射線などの作用により化学的又は

259 物理的に変化する指標体である。指標体の形状としては、それ

260 を塗布又は印刷した紙片などがある。滅菌方法に応じて変化する

261 原理は異なるため、使用する滅菌方法に合ったCIを選ぶ必要

262 がある。CIは、使用用途に基づいて以下の6クラスに分類され

263 る。ここに示すクラスは性能の優劣に関与するものではない。

264 なお、CIは滅菌工程の一つ又は複数の重要パラメータの達

265 成を示す指標であるが、滅菌効果や無菌性の保証に用いる指標
 266 ではないため、BIの代わりとして用いることはできない。
 267 クラス1：プロセス・インジケータ
 268 被滅菌物が滅菌工程を経たかどうかを区別することを目
 269 的とする。重要パラメータの1つ又はそれ以上に反応する。
 270 クラス2：特定試験用インジケータ
 271 ISO11140シリーズで規定される、真空型高圧蒸気滅菌装
 272 置の排気能力及び蒸気浸透の試験で使用される。
 273 Bowie-Dickタイプが該当する。
 274 クラス3：単一変数インジケータ
 275 重要パラメータの1つだけに反応する。指定されたパラ
 276 メータの規定値で、滅菌工程に暴露されたことを示す。
 277 クラス4：複数変数インジケータ
 278 重要パラメータの2つ又はそれ以上に反応する。指定さ
 279 れたパラメータの規定値で、滅菌工程に暴露されたことを
 280 示す。
 281 クラス5：インテグレーション・インジケータ
 282 全ての重要パラメータに反応する。ISO11138シリーズ
 283 に規定されているBIの性能要求と同等又はそれ以上の規定
 284 値をもつ。
 285 クラス6：エミュレーション・インジケータ
 286 規定された滅菌サイクルの全ての重要パラメータに反
 287 応する。規定値は、指定した滅菌工程の重要パラメータで
 288 ある。

289 3.3. 線量計
 290 3.3.1. 線量計の種類
 291 放射線照射プロセスにおける線量計とは、放射線を吸収する
 292 ことによる変化から吸収線量を読み取る計器又はシステムであ
 293 り、「再現性」と「放射線の測定が可能な応答性」を持つこと
 294 が要求される。線量計の多くは、使用する照射施設における照
 295 射前後及び照射中の温度並びに線量率などの環境条件(工程パ
 296 ラメータ)によって影響を受ける場合があるため注意を要す
 297 る。線量計の選定や使用については、放射線照射プロセスに対
 298 する線量計システムの選定及び校正指針(ISO/ASTM 51261)が
 299 規定されている。放射線の吸収線量を測定する線量計を表9に
 300 示した。なお、 γ 線線量計は、通例、エネルギー3MeV未満
 301 の電子線を用いる滅菌の工程管理には適さない。

表9 線量計の種類

放射線種類	線量計
γ 線	着色ポリメチルメタクリレート線量計
	透明ポリメチルメタクリレート線量計
	セリックス線量計
	アラニン線量計
γ 線、電子線	セルロースアセテート線量計
	ラジオクロミックフィルム線量計

302 3.3.2. 線量計使用方法
 303 線量計は、放射線の照射条件を決定するために実施する線量
 304 分布測定時に、また、通常の放射線滅菌における被滅菌物の吸
 305 収線量を評価するために使用する。前者では、あらかじめ被滅
 306 菌物内部に線量計を配置し、放射線照射後に回収して、測定シ
 307 ステムで計測することにより、各部位の吸収線量を明確にする。
 308 このとき、放射線の透過性や線量のばらつきからこん包形態の

309 妥当性を確認すると共に、最小及び最大線量と工程パラメータ
 310 との関係を決める必要があるため、線量計を垂直方向、水
 311 平方向の広い範囲に配置する。後者では、線量計を必ずしも被
 312 滅菌物内部の最小や最大線量部位に設置する必要はない。線量
 313 計の設置/回収が容易な管理点を選定し、管理点での吸収線量
 314 を基に被滅菌物の吸収線量を保証する。そのために線量分布測
 315 定において、この管理点と被滅菌物内の最大/最小線量部位と
 316 の量的な関係を明確にすると共に、管理点における合格線量範
 317 囲も算出しておくこと。

318 なお、線量計は、新しく購入して使用する前に校正を行うほ
 319 か、線量計のバッチ切り替え時、及び1年を超えないごとに1回、
 320 校正する。

321 4. 滅菌条件設計法

322 4.1. ハーフサイクル法

323 ハーフサイクル法は、被滅菌物上に存在するバイオバーデン
 324 数や検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性とは関係なく、BIに含
 325 まれる 10^6 CFUの指標菌の全てが死滅する処理時間の2倍の滅
 326 菌時間を採用する方法である。本法は、主にEOなどガス滅菌法
 327 の滅菌条件の設定に使用される。

328 4.2. オーバークイル法

329 オーバークイル法は、被滅菌物上のバイオバーデン数や検出菌
 330 の当該滅菌法に対する抵抗性とは関係なく、 10^6 以下のSALが
 331 得られる条件で滅菌を行う方法である。

332 蒸気滅菌の場合は12Dの滅菌条件をいう。ただし、 F_0 12以上
 333 での滅菌条件もオーバークイル法と称している。

334 4.3. バイオバーデン/BI併用法

335 バイオバーデン/BI併用法は、広範なバイオバーデン調査結
 336 果から最大バイオバーデン数を決定し、目標とするSALを基に、
 337 最大バイオバーデン数以上の試験菌数を有する適当な市販BI
 338 を用いて滅菌時間(又は滅菌線量)を算出する方法である。

339 本法を用いる場合は、被滅菌物のバイオバーデン数を日常的
 340 に調査し、検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性測定も定期的に
 341 実施する必要がある。

342 バイオバーデン調査において、BIの指標菌より抵抗性の強い
 343 菌が検出された場合には、それを用いて指標菌とする。また、
 344 必要に応じて滅菌条件の見直しを行う。

$$345 \text{ 滅菌時間(又は滅菌線量)} = D \times \log(N_0/N)$$

346 D : BIのD値

347 N : 目的とする無菌性保証水準(SAL)

348 N_0 : 被滅菌物の最大バイオバーデン数

349 4.4. 絶対バイオバーデン法

350 絶対バイオバーデン法は、被滅菌物や製造環境から検出され
 351 た菌について、当該滅菌法に対する抵抗性調査を行い、湿熱滅
 352 菌法の場合には、その中から最も抵抗性の強い菌を選び、その
 353 D値を用い、被滅菌物のバイオバーデン数を基に滅菌条件を設
 354 定する方法である。

355 バイオバーデン数は、広範なバイオバーデン調査によって決
 356 定する。本法を用いる場合は、日常のバイオバーデン管理にお
 357 いて、菌数計測及び検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性測定を
 358 日常的に行う必要がある。

359 放射線滅菌法の場合には、ISO11137-2の方法により実施する。

360 5. 参考資料

361 ・ISO 11138-1(2006):Sterilization of health care

362	products-Biological indicators-Part1:General	369	• ISO 11140 -1(2005): Sterilization of health care
363	requirements	370	products-Chemical indicators- Part1:General
364	• ISO11137-2(2006):Sterilization of health care	371	requirements
365	products-Radiation- Part2: Establishing the sterilization	372	• USP <55> BIOLOGICAL INDICATORS -RESISTANCE
366	dose	373	PERFORMANCE TESTS
367	• ISO/ASTM 51261(2002): Guide for selection and	374	
368	calibration of dosimetry systems for radiation processing	375	
376			

試験菌の接種と回収方法

- 試験菌の乾燥による影響確認 -

1. 概要

消毒剤の有効性を評価する方法として「硬質表面キャリアー法」を採用する場合、医薬品製造施設を構成している材質のテスト用キャリアーに試験菌液を接種した後、菌液を乾燥させる手順が採用されることがある。しかし、微生物全般に言える特徴として、「乾燥」によって、微生物の発育が抑制されることや比較的容易に死滅する微生物の存在が知られており、その影響が高いと消毒剤接種前に菌数が減少し、効果の確認に必要な初期菌数が得られなくなる等、正確な消毒剤の効果判断することが困難となる。そのため、乾燥による微生物の影響を調査した。

2. 検討手順

以下の手順で実施した。

- 1) *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis* の菌液を 5 cm × 5 cm のキャリアーの表面に接種し、菌塊が出来ないようにコンラージ棒を用い、菌液をキャリアー表面上で均一にする。
- 2) 1) が乾燥するまで安全キャビネット内で放置する。なお、キャリアー材質の撥水性と菌液の表面張力の影響で、キャリアー表面の一部に菌液が集まることから放置時間中は数回、コンラージ棒を用いて菌液を均一にする。また、乾燥による菌への影響を防止するため、乾燥後は次の操作に素早く移行する。

備考：キャリアー上の菌液の乾燥は、キャリアー材質の影響や安全キャビネットの風量等によって変動し、20～40分程度の時間を要した。

- 3) 各試験菌液を接種したキャリアー1枚に常温の滅菌水 1 mL (表面全体に均一に行き渡る量として設定) を滴下し、コンラージ棒を用いてキャリアー表面全体に滅菌水を行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。
- 4) この状態で5分間放置する。なお、キャリアー材質の撥水性と滅菌水の表面張力の影響で、キャリアー表面の一部に液が集まることから放置時間中は数回、コンラージ棒を用いて液を均一にする。
- 5) 5分後にキャリアー表面の各菌液を懸濁した滅菌水 100 μL をとり、回収液 10 mL に移し、よくかき混ぜる。
- 6) 各回収液を pH7.2 のリン酸緩衝液で段階希釈し、100倍までの希釈液を調製する。
- 7) 各段階希釈液 1 mL ずつを滅菌済シャーレ 2枚に添加し、SCD カンテン培地約 20 mL を用い、混釈法により菌数を計測する。
- 8) 培養条件は 30～35°C で5日間とする。コロニーの形成状態により、正確な菌数を計測できなくなる恐れがある場合は5日間よりも短い培養日数でコロニーを計測しても差支えない。

3. 結果

接種菌数と乾燥後の回収菌数の結果を表 III-1 に示す。

表 III-1 乾燥によるキャリアー上の菌数変動

試験菌	材質	試験者	接種菌数 (CFU/キャリアー)	回収菌数 (CFU/キャリアー)	対数減少量
<i>S. aureus</i>	ステンレス	A	7.2×10^4	4.0×10^3	1.3
<i>P. aeruginosa</i>			2.2×10^4	1.5×10^2	2.1
<i>E. coli</i>			3.3×10^4	8.5×10^2	1.6
<i>C. albicans</i>			3.0×10^4	1.0×10^2	2.5
<i>B. subtilis</i>			9.5×10^4	2.1×10^4	0.7
<i>A. brasiliensis</i>			4.5×10^4	1.2×10^4	0.6

S. aureus, *P. aeruginosa*, *E. coli* 及び *C. albicans* の 4 菌種は *B. subtilis* 及び *A. brasiliensis* に比較すると菌数の減少量が多く、乾燥の影響を受けているものと推測された。

消毒効果を評価するためには、キャリアー上の初期菌数は 10^5 CFU 程度が望ましい。そのため、乾燥による菌数減少量を考慮した試験菌液を調製し、同様の調査を実施した。この時、塩化ピニル、硬質ウレタンゴム、エポキシ樹脂コートキャリアーを用いた材質間の変動、試験者を 2-3 名採用し、試験者間の変動を含め、再調査を実施した。その結果を表 III-2 に示したが、乾燥だけで消毒効果の判定基準に近い菌数減少が発生することがあり、その減少量をキャリアー材質間や試験者間で一定にすることは困難であることが判明した。

その要因としては、「乾燥した」という官能的な判断に個人差があること、キャリアー上の菌液は一様に乾燥するのではなく部分的に生じ、その時点で既に試験菌は影響を受けていること等が推定される。

以上のことから、テストキャリアーに試験菌液を接種した後、菌液を乾燥させる手順は、消毒効果では無い部分で菌数減少を生じさせ、消毒剤の効果を過剰に評価する可能性が想定された。

そのため、共同実験においては、試験菌液接種量を 50 μ L として、キャリアー上の水分量を必要最低限にすると共に、試験菌を固定させるための放置時間を最短とし、接種菌が乾燥する前に次の操作に移行することとした。

表 III-2 乾燥による菌数変動

試験菌	材質	試験者	接種菌数 (CFU/キャリアー)	回収菌数 (CFU/キャリアー)	対数減少量
<i>S. aureus</i>	塩化ビニル	A	2.2×10^6	6.7×10^4	1.5
		B	2.2×10^6	4.4×10^4	1.7
		C	2.2×10^6	1.5×10^5	1.1
	硬質 ウレタンゴム	A	2.2×10^6	2.2×10^5	1.0
		B	2.2×10^6	2.0×10^5	1.0
		C	2.2×10^6	2.4×10^5	0.9
	エポキシ 樹脂コート	A	2.2×10^6	4.3×10^3	2.7
		B	2.2×10^6	1.9×10^5	1.0
	<i>P. aeruginosa</i>	塩化ビニル	A	1.1×10^6	6.4×10^3
B			1.1×10^6	8.6×10^3	2.1
C			1.1×10^6	4.9×10^3	2.3
硬質 ウレタンゴム		A	1.1×10^6	2.1×10^4	1.7
		B	1.1×10^6	4.0×10^4	1.4
		C	1.1×10^6	6.6×10^4	1.2
エポキシ 樹脂コート		A	1.1×10^6	3.5×10^2	3.5
		B	1.1×10^6	9.8×10^3	2.0
<i>E. coli</i>		塩化ビニル	A	1.9×10^6	1.6×10^5
	B		1.9×10^6	1.1×10^5	1.3
	C		1.9×10^6	8.2×10^4	1.4
	硬質 ウレタンゴム	A	1.9×10^6	1.9×10^4	2.0
		B	1.9×10^6	1.2×10^4	2.2
		C	1.9×10^6	4.9×10^4	1.6
	エポキシ樹脂 コート	A	1.9×10^6	4.0×10^3	2.7
		B	1.9×10^6	1.5×10^4	2.1
	<i>C. albicans</i>	塩化ビニル	A	9.0×10^5	1.6×10^4
B			9.0×10^5	1.5×10^4	1.8
C			9.0×10^5	2.0×10^4	1.7
硬質ウレタン ゴム		A	9.0×10^5	3.1×10^4	1.5
		B	9.0×10^5	3.8×10^4	1.4
		C	9.0×10^5	8.3×10^4	1.1
エポキシ樹脂 コート		A	9.0×10^5	9.0×10^2	3.0
		B	9.0×10^5	5.7×10^4	1.2

消毒剤の中和方法
- 回収液の検討 -

4. 概要

検証対象濃度の各消毒剤を対象に、微生物の回収が可能となる液組成を検討した。その結果、表 1 に示す組成が全ての消毒剤に対して、微生物の回収が可能であることを確認した。

表 III-1 回収液組成

成分	最終濃度	秤取量
大豆レシチン	0.50%	5.0 g
ポリソルベート 80	4.00%	40.0 g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.50%	5.0 g
L-ヒスチジン	0.20%	2.0 g
リン酸二水素カリウム	(15 mM)	2.0 g
カタラーゼ ^{※1}	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

※1: カタラーゼは熱により分解するため、ろ過による無菌化を行った上で使用した。

5. 回収液の調製手順

以下の方法で調製した。

- (1) 大豆レシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウム 5 水和物、L-ヒスチジン、リン酸二水素カリウム及び水を混和し、121°C で 15～20 分間高圧蒸気滅菌する。
- (2) よく振り混ぜ、室温にまで冷却する。
- (3) ろ過による無菌化を行ったカタラーゼを加え、全量 1000 mL とする。
- (4) 滅菌済の適当な分注器を用い、滅菌済の試験管等に回収液を 10 mL ずつ分注する。
- (5) 室温、暗所で保管し、1 週間以内に使用する。

6. 検討手順

以下の手順で実施した。

- (1) 検証対象濃度の各消毒剤を調製し、その 100 μ L を回収液 10 mL に添加した。
- (2) (1) に各試験菌 $10^3 \sim 10^4$ CFU を含んだ液 100 μ L を個別に接種した。
- (3) (2)の液を 90 分程度放置し、作用させた。
- (4) (3) の液 100 μ L ずつを 2 枚の SCD カンテン平板に接種し、カンテン表面塗抹法により、菌数を計測した。平板培地 2 枚で計測された菌数の平均値を「回収された試験菌数」とした。
- (5) 同時に、消毒剤の代わりに滅菌水を添加した回収液に対して同様の操作を行い、SCD カンテン平板培地 2 枚で計測された菌数の平均値を「イニシャル値」とした。
- (6) (4) 及び (5) の培養条件は 30～35°C で最長 5 日間とした。

(7) 以下の式を使用して試験菌の回収率を算出した。

【計算式】

$$\text{回収率 (\%)} = (\text{回収された試験菌数} / \text{イニシャル値}) \times 100$$

(8) 試験菌の回収率が 50～200%であれば、回収液として適切と判断した。

7. 結果

消毒剤ごとの試験菌に対する回収率の結果を表 III-2 に示す。

全ての消毒剤及び試験菌を良好に回収することが出来たことから、表 III-1 の組成は回収液として適切であると判断した。

表 III-2 回収液の微生物回収率

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>E. coli</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
過酸化水素	3.0%	91	89	82	81	85	111	89	97	100
過酢酸	0.21%	80	95	78	80	103	96	104	109	82
次亜塩素酸ナトリウム	0.020%	82	107	74	98	100	108	87	105	91
イソプロパノール	50%	80	104	92	80	114	100	96	109	95
エタノール	70%	98	88	86	114	112	109	99	145	102
ベンザルコニウム塩化物	0.05%	84	102	81	106	95	109	102	125	103
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05%	63	94	92	90	96	82	107	104	94
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05%	91	104	77	100	96	114	86	144	93

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>B. subtilis</i>			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
過酸化水素	3.0%	105	103	92	79	107	97	108	80	78
過酢酸	0.21%	82	115	83	105	73	78	90	104	82
次亜塩素酸ナトリウム	0.020%	99	112	88	96	100	105	110	86	96
イソプロパノール	50%	108	99	98	93	73	85	111	114	92
エタノール	70%	95	110	87	95	87	85	107	94	102
ベンザルコニウム塩化物	0.05%	79	97	54	99	107	103	100	82	88
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05%	94	94	86	100	93	97	104	84	71
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05%	93	115	82	93	80	123	106	88	116

評価方法確立のプロトコル

8. 目的

日本薬局方 参考情報記載の「微生物殺滅法」を改正し、「消毒法及び除染法」と名称変更した上で、GMP で要求される消毒剤の有効性を評価する手法と評価基準を提示する予定である。医薬品製造環境の構造設備は種々の材質から構成されているが、消毒剤の効果は材質によって異なる可能性がある。そこで、医薬品製造環境の構造設備における代表的な表面の構成材質に対して、標準的な消毒剤の有効性評価法を提示するための基礎実験を行う。

本実験では、各試験条件に対して適切な繰り返し数を設定することにより、評価法の室内再現性を確認すると共に、統一したプロトコルを基に、複数の試験室で消毒剤の有効性評価を実施し、得られた結果を比較することで、評価法の室間再現性についても考察する。

9. 実験材料

2.1 消毒剤

表 III-1 に示す消毒剤を使用する。

滅菌した日本薬局方 精製水の規格を満たす水を用い、検証濃度の消毒剤を調製する。

表 III-1 消毒剤の種類と濃度

消毒剤	使用濃度 ^{※1}	検証濃度 ^{※2}
過酸化水素	3%	3%
過酢酸	0.2 ~ 0.3%	0.2%
次亜塩素酸ナトリウム	0.02 ~ 0.05%	0.02%
イソプロパノール	50 ~ 70%	50%
エタノール	70%	70%
ベンザルコニウム塩化物	0.05 ~ 0.2%	0.05%
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05 ~ 0.5%	0.05%
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05 ~ 0.5%	0.05%

※1 : 消毒剤メーカーが治具や構造設備等へ適用する際に推奨しており、医薬品製造環境で汎用されている濃度である。

※2 : 本検証においては、汎用される使用濃度の下限値をワーストケースとして採用する。

2.2 対象材質

表 III-2 及び図 1 に示す材質のキャリアー (サイズ 5 cm × 5 cm) を準備し、試験に供する。こ

のキャリアーを除塵した上で過酸化水素水に一晩以上浸漬して、清浄な状態にする。

表 III-2 清浄区域及び無菌操作区域で使用される構造設備の材質

材質	適用例
ステンレス	作業台, タンク, 機器類
ガラス	窓, 遮蔽板
ポリカーボネート	遮蔽板, 容器
化粧ケイ酸カルシウム (化粧材質: ポリエステル樹脂, ウレタン樹脂等)	壁, 天井
エポキシ樹脂コート	床
塩化ビニル	床, カーテン, ビニル袋
硬質ウレタンゴム	床
ニトリルゴム	手袋

図1 各材質の外観



2.3 試験菌

消毒剤の効果を評価するための試験菌は、各分類群の代表菌種を選定する。これらの試験菌を日本薬局方 <4.05> 微生物限度試験法に記載されている条件で培養及び希釈して使用する。ただし、*Bacillus subtilis* については日本薬局方 <4.02> 抗生物質の微生物学的力価試験法を参考に芽胞懸濁液を調製する。調製済の市販品の使用も可である。なお、試験菌液の調製には pH7.2 のリン酸緩衝液を用いる。詳細は表 III-3 に示す。

表 III-3 試験菌と培養条件

試験菌		培養条件		
		培地	温度	時間
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633 等		芽胞懸濁液	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 等	サブロー	20 ~ 25 °C	2 ~ 3 days
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 等	PD 斜面	20 ~ 25 °C	5 ~ 7 days

2.4 回収液

消毒剤の効果を中和しながら試験菌を回収するために用いる回収液の組成を表 III-4 に示す。

表 III-4 回収液の組成

成分	最終濃度	秤取量
大豆レシチン	0.50%	5.0 g
ポリソルベート 80	4.00%	40.0 g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.50%	5.0 g
L-ヒスチジン	0.20%	2.0 g
リン酸二水素カリウム	(15 mM)	2.0 g
カタラーゼ*	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

*：カタラーゼは熱により分解するため、ろ過による無菌化を行った上で使用した。

【調製方法】

- (1) 大豆レシチン，ポリソルベート 80，チオ硫酸ナトリウム 5 水和物，L-ヒスチジン，リン酸二水素カリウム及び水を混和し，加温溶解した後，121°C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。
- (2) よく振り混ぜ，室温にまで冷却する。
- (3) ろ過による無菌化を行ったカタラーゼを加え，全量 1000 mL とする。
- (4) 滅菌済の適当な分注器を用い，滅菌済の試験管等に回収液を 10 mL ずつ分注する。
- (5) 室温下，暗所で保管し，1 週間以内に使用する。

10. 実施項目

3.1 消毒剤の有効性評価法の検証

日本薬局方 参考情報 「消毒法及び除染法」に記載予定の消毒剤の有効性評価法について，そ

の妥当性を検証する。なお、参考情報には2種類の評価法を収載する予定であるが、ここでは実製造現場での使用状態に近い評価が可能な「硬質表面キャリアー法」を対象とする。参考情報収載案については、別添資料を参照のこと。

3.2 分担

本評価法確立の共同実験には14社の試験室が参画する。各試験室は消毒剤ごとに分担する。各試験室では日にちを変えて3回繰り返すことにより、評価法の室内再現性を、また同じ条件の実験を2つ以上の試験室で繰り返し、得られた結果を比較することにより、評価法の室間再現性をそれぞれ確認及び考察する。

【参画企業】(五十音順)

アステラスファーマテック株式会社	サノフィ株式会社	参天製薬株式会社
塩野義製薬株式会社	第一三共株式会社	大日本住友製薬株式会社
武田薬品工業株式会社	中外製薬株式会社	東和薬品株式会社
バイエル薬品株式会社	ファーマパック株式会社	メルク株式会社
持田製薬工業株式会社	ロート製薬株式会社	

11. 実施方法

消毒剤2種、ステンレス製のキャリアーを対象とした時の試験手順を以下に示す。ここで示した操作を6菌種に対して実施する。

(参考情報：同時に複数の操作を実施する場合は、キャリアーを統一する方が、菌種を統一する場合よりも、菌液の乾燥時間や回収操作がほぼ同等となり、煩雑性と結果のバラつきが抑制される)

- 9) 10^{6-7} CFU/mL の *E. coli* を含んだ菌液 50 μ L を、滅菌済シャーレ等に配置した 5 cm \times 5 cm のキャリアーの表面に接種する。これを3枚準備する。菌塊が出来ないように、コンラージ棒を用い、菌液をキャリアー表面上で均一にする（接種菌液量を 50 μ L とすることで、キャリアー表面上の水分を最少とし、実製造現場の状況を可能な限りシミュレートする）。



菌液接種



菌液の均一化

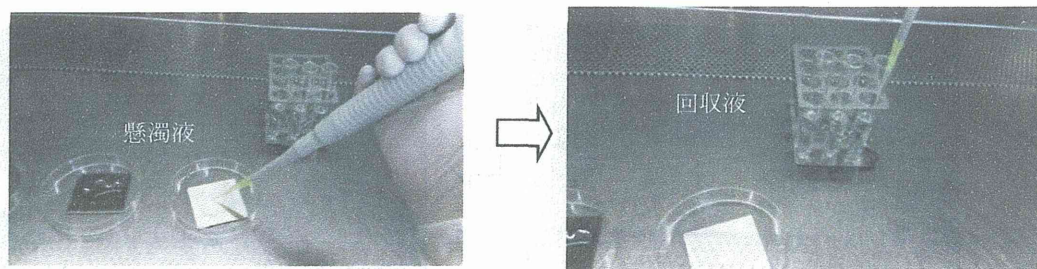
- 10) 1)と同様の操作を *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis* についても実施し、計 18 枚の試験菌を接種したキャリアーを作成する。



- 11) *E. coli* を接種したキャリアー1枚に、常温の滅菌水 1 mL (表面全体に均一に行き渡る量として設定) を滴下し、コンラージ棒を用いて、キャリアー表面全体に滅菌水を行き渡らせるとともに、試験菌を懸濁させる。他の1枚については消毒剤①を、残りの1枚には消毒剤②をそれぞれ 1 mL 滴下し、コンラージ棒を用いて、キャリアー表面全体に行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。



- 12) 3)と同様の操作を他の5菌種を接種したキャリアーについて実施する。この状態で5分間放置する。なお、キャリアー材質の撥水性と滅菌水(消毒剤)の表面張力の影響で、キャリアー表面の一部に液が集まることから放置時間中は約1分ごとに均一化操作を行う。
- 13) 5分後にキャリアー表面の *E. coli* を懸濁した滅菌水 100 μ L をとり、回収液 10 mL に移し、よくかき混ぜる。同様に、キャリアー表面の *E. coli* を懸濁した消毒剤①及び消毒剤② 100 μ L をとり、回収液 10 mL に移し、よくかき混ぜる。他の5菌種を懸濁した滅菌水、消毒剤①及び消毒剤②についても同様の操作を実施する。



- 14) 各回収液を pH7.2 のリン酸緩衝液で段階希釈し、100 倍までの希釈液を調製する。
- 15) 各段階希釈液 1 mL ずつを滅菌済シャーレ 2 枚に添加し、SCD カンテン培地約 20 mL を用い、混釈法により菌数を計測する。
- 16) 培養条件は 30 ~ 35°C で 5 日間とする。コロニーの形成状態により、正確な菌数を計測で

きなくなる恐れがある場合は、5日間よりも短い培養日数で計測しても差支えない。なお、コロニー計測は30～300 CFUの範囲内のプレートを対象に行う。該当するプレートが無い場合又は2種類の希釈段階から30～300 CFUの範囲内にあるコロニーを認めた場合は、希釈段階の少ない液で得られた計測値を採用する。

- 17) 消毒剤で懸濁し、シャーレ2枚で計測された菌数の平均値を「消毒後の菌数」、滅菌水で懸濁し、シャーレ2枚で計測された菌数の平均値を「初期菌数」とする。

【菌数の算出】

$$\text{菌数} = a \times b \times c \times d$$

a : シャーレ2枚の平均値【CFU】

b : 段階希釈倍数 (1倍 or 10倍 or 100倍)

c : 10 (回収液の量)【mL】

d : 10 (消毒剤中の菌数に換算する係数. 1 mL中の100 μ Lに対する菌数を計測)

- 18) 「消毒後の菌数」と「初期菌数」をそれぞれ対数換算し、以下の式を使用して試験菌の対数減少量を算出する (小数点2桁目を四捨五入し、少数点1桁で表記する)。

【計算式】

$$\text{対数減少量} = \text{Log (消毒後の菌数)} - \text{Log (初期菌数)}$$

- 19) 他7種の材質のキャリアーについて、上記1)～10)の操作実施する。
- 20) 上記1)～11)の操作について日にちを変えて、それぞれ3回繰り返す。
- 21) 使用した各キャリアーは、3%過酸化水素水に一晩以上浸漬して清浄な状態にする。

12. 付則

参考資料消毒法及び除染法 (参考情報 改定案の抜粋)

参考資料

消毒法及び除染法 (参考情報 改定案の抜粋)

2.2 評価法

清浄区域及び無菌操作区域等に消毒法を適用する場合は、消毒剤の濃度、作用時間、消毒対象となる表面の材質、その消毒剤で減少させたい微生物の種類等を考慮し、その条件の有効性を確認する。以下に評価法の例を示す。評価において、対象微生物に対して有効と判断された条件を採用する。なお、科学的に正しいことが立証できれば、例示した評価法以外の方法を採用しても差し支えない。

2.2.1 試験菌懸濁法

実際に使用する希釈液 (精製水、水道水、他) を用いて、実際に使用する濃度の消毒剤を調製する。調製した消毒剤に $10^5 \sim 10^6$ CFU の試験菌を接種する。常温で規定時間 (通例、5～15分間) 作用させた後、消毒剤を希釈、又は除去 (ろ過) する。希釈液又はろ過後の洗浄液には、必要に応じてレシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウムなどの不活化剤を含有する液を用いて消毒剤を中和する。接種した試験菌数及び消毒後の試験菌数の計測は、<4.05> 微生物限度試験法 I. 3.4.製品存在下での測定法の適合性の要件を満たす条件で実施する。消毒剤作用前後の試験菌数から対数減少量を算出し、細菌及び真菌では 3Log 以上、芽胞では 2Log 以上の減少を認めた場合、各々の対象微生物に対して有効であると判断する。有効性の評価に使用する試験菌は表 III-2 を参照し、必要な菌種を選定する。これらの試験菌は日本薬局方 <4.05> 微生物限度試験法に記載されている条件で培養及び希釈して評価に使用する。ただし、*Bacillus subtilis* については日本薬局方 <4.02> 抗生物質の微生物学的力価試験法を参考に芽胞懸濁液を調製して評価に使用する。なお、表 III-2 に示す菌種と同等であれば、他の菌種を使用することができる。

2.2.2 硬質表面キャリアー法

約 5 cm × 5 cm の各種表面材質のキャリアーを適切な精度が得られる数量準備する。 $10^5 \sim 10^6$ CFU の試験菌をキャリアーの広範囲に接種し、乾燥させた後、実使用濃度の消毒剤を滴下する。常温で規定時間 (通例、5～15分間) 作用させた後、希釈しながら、キャリアー上の試験菌を回収する。回収液には、必要に応じてレシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウムなどの不活化剤を含有する液を用いて消毒剤を中和する。回収方法は JIS T11737-1:2013 を参考にストマック法、振とう法等を採用する。接種した試験菌数及び回収した試験菌数は、4.05 微生物限度試験法 I. 3.4.製品存在下での測定法の適合性の要件を満たす試験条件で計測する。消毒剤作用前後の試験菌数から対数減少量を算出し、2.2.1 試験菌懸濁法に規定された減少量を十分に上回る効果を認めた条件を各々の対象微生物に対して有効であると判断する。有効性の評価に使用する試験菌は表 III-2 を参照し、必要な菌種を選定するほか、環境モニタリングで検出頻度の高い代表菌 1～2 株を追加することが望ましい。なお、表 III-2 に示す菌種と同等であれば、他の菌種を使用することができる。試験菌の培養及び希釈等については 2.2.1 試験菌懸濁法の規定を参考にする、また、清浄区域又は無菌操作区域で使用される各種表面の材質の例を表 III-3 に示すが、評価においては実使用状況を考慮の上、適宜追加する。