

5. 安全cabinet、遠心器、CO₂ 培養器の滅菌法とモニター方法提言の為の
模擬操作実施と解析

担当責任者：鹿村 真之

公益財団法人 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

研究要旨

CPC の清浄度を保つためには、交叉汚染リスクを引き上げる要因の1つと考えられる使用機器（安全キャビネット、遠心機、CO₂ インキュベータ等）の滅菌及び環境モニタリングを行うことが重要である。

今回、滅菌方法とモニタリング方法について、模擬操作の実施を通して検討を行い、環境モニタリングにて評価した。

その結果、CPC のような解放系の室内での交叉汚染防止に、安全キャビネット、遠心機及び CO₂ インキュベータの現在実施している清掃・消毒作業において、施設の清浄度に応じた日本薬局方の環境微生物の許容基準に適合しており、許容基準値以上の菌は認められず、交叉汚染リスクを低減することができていると考えられた。

【目的】

再生医療等製品を製造する CPC や品質管理試験を実施する部屋では、製品の特性に応じ、第十六改正日本薬局方及び ISO14644-1 等で規定された清浄度が保たなければならない。そして、清浄度を保つためには、交叉汚染リスクを引き上げる要因の1つと考えられる使用機器(安全キャビネット、遠心機、CO₂ インキュベータ等)の滅菌及び環境モニタリングを行うことが重要であると考え、今回、滅菌方法とモニタリング方法について、模擬操作の実施を通して検討を行った。また、CO₂ インキュベータ内の汚染に最も関連する要因としてインキュベータ内の加湿用を使用する水の汚染防止方法についても合わせて検討を行った。

【内容】

1. 実施場所
先端医療センター 品質管理試験室
及び 細胞処理室
2. 安全キャビネット
 - (1) 日常清掃・消毒
作業後作業員による文書化された手順に従い下記の如く日常清掃・消毒を行っている。今回(栄養成分の違う)種々の培地(DMEM等)を用いて模擬操作を実施し、実施後の環境衛生をモニタリングした。
 - 1) 消毒用エタノール(70%)を含ませた滅菌済不織布で内部全体を一方方向に清拭する。(汚れがひどい場合は2回行う)

- 2) 消毒用エタノールを含ませた不織布でガラスの外表面及び取手を一方方向に清拭し、スイッチ部分を拭く。
- 3) 使用済みの不織布は感染性廃棄物として処理する。

(2) 定期清掃・消毒

清掃・消毒の専門業者にて、安全キャビネットの清掃・消毒作業を年に1回実施する。消毒剤は、次亜塩素酸ナトリウム6%を0.1%に希釈して使用し、その後75%エタノールで清拭・残留薬剤除去を実施している。

(3) 環境モニタリング方法

定期清掃・消毒時は清掃・消毒の専門業者が、作業前後に環境モニタリングを実施している。専門業者の環境モニタリングは第十六改正日本薬局方参考情報G4「無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法」に従って培地を選定後(一般細菌:SCD寒天培地、真菌:CP加ポテトデキストロース寒天培地)、各微生物検査(浮遊菌、表面付着菌、落下菌)を実施している。

また、特に無菌試験は無菌条件下での作業が求められるため、無菌試験実施時は品質管理試験室作業員自らが、作業前後に作業区域の環境モニタリングを実施している。

環境モニタリングは、第十六改正日本薬局方参考情報G4「無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法」に従って実施しており、浮遊微粒子は作業前後30分までを確認している。また、各微生物検査(浮遊菌、表面付着菌、落下菌)ではSCD培地を使用している。

(4) 環境モニタリング結果

清掃・消毒の専門業者による施設の清掃・消毒作業(定期清掃・消毒)前後のモニタリングでは、施設の清浄度に応じた日本薬局方の環境微生物の許容基準に適合しており、許容基準値以上の菌は認められなかった。

また、無菌試験実施時に作業員が実施している環境モニタリングにおいても同様に、環境微生物の許容基準に適合しており、月々の清掃・消毒作業によって清浄度が保たれていることが確認できた。

(5) 交叉汚染防止

安全キャビネットでの交叉汚染を防止するために、試験目的に応じて安全キャビネットの使用を制限しており、特に無菌条件が求められる無菌試験で実施する安全キャビネットは無菌試験の実施以外では使用しないように定めている。その他、細胞を培養する際に使用する安全キャビネットや培地性能試験等の陽性菌株を使用する安全キャビネットもそれぞれ異なる安全キャビネットを使用している。上記の安全キャビネットは品質試験室としても区分けされた部屋に設置しており、物理的な隔離処置を実施している。

3. 遠心機

(1) 日常清掃・消毒

作業後作業員による文書化された手順に従い下記の如く日常清掃・消毒を行っている。

- 1) 作業後遠心機内の水滴を不織布で拭き取る。

- 2) 消毒用エタノール(70%)を含ませた不織布で内部及び外部を清拭する。(汚れがひどい場合は2回行う)
- 3) 内部が乾燥するように蓋を開けておく。
- 4) 使用済みの不織布は感染性廃棄物として処理する。

(2) 交叉汚染防止

遠心を行うチューブや遠心管等の蓋がしっかりと閉まっているかを確認し、遠心作業を行う。また、同日に試験が重なり、異なる細胞を使用する場合は作業を行う時間を分け、交叉汚染防止に努めている。

4. CO₂ インキュベータ

(1) 作業員による日常及び定期清掃・消毒

作業後作業員による文書化された手順に従い下記の如く日常清掃・消毒を行っている。今回(栄養成分の違う)種々の培地(DMEM等)を用いて模擬操作を実施し、インキュベータ内で培養した。作業としては、

- 1) CO₂ インキュベータ開閉時に内部を確認し、加湿用バット以外の場所に水滴等を確認した場合は水滴を不織布で拭き取り、その後消毒用エタノール(70%)を含ませた不織布で外部を清拭する。
- 2) 半年ごとにCO₂ インキュベータ内棚、ネジを含め取り外しが可能なものは全て取り外す。取り外した内装は消毒用エタノール(70%)で清拭後、局法収載滅菌処理方法

である乾熱滅菌法にて滅菌する。

内装を取り外した後のCO₂ インキュベータは内部を確認し、水滴等を不織布で拭き取った後に滅菌蒸留水を含ませた不織布にて拭き上げる。拭き上げる際にはCO₂ インキュベータ内部のみではなく、内扉及び外扉等についても実施する。蒸留水で拭き上げた後、消毒用エタノール(70%)を含ませた不織布にて清拭する。

- 3) CO₂ インキュベータ下部に設置されているCO₂ インキュベータ用加湿バットの加湿用水は滅菌蒸留水を使用しており、1か月ごとに交換している。交換の際にはバット内の加湿用水を廃棄し、残っているバットの水分を拭き取った後、滅菌蒸留水で浸した不織布で拭き、消毒用エタノール(70%)を含ませた不織布にて清拭する。
- 4) 使用しているCO₂ インキュベータはドアの開閉時に一定時間、加湿用水に殺菌灯が照射される形式のものを使用している。殺菌灯の照射は加湿用水のみに照射され、培養中の細胞への影響はない。
- 5) 使用済みの不織布は感染性廃棄物として処理する。

(2) 定期清掃・消毒

清掃・消毒の専門業者によるCO₂ インキュベータの清掃・消毒作業を年に1回に実施する。清掃・消毒は内部のみだけでなく、外装及び内装についても実施している。消毒剤として、6%次亜塩素酸ナトリウム液を0.1%に希釈して

使用し、その後 75%エタノールで清拭・残留薬剤除去を実施している。

(3) 環境モニタリング方法

定期清掃・消毒時に専門業者が、日常清掃・消毒作業は品質管理試験室の作業員自らが、作業前後に施設の環境モニタリングを実施している。

環境モニタリングは、第十六改正日本薬局方 参考情報 G4「無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法」に従って培地を選定後(一般細菌:SCD 寒天培地、真菌:CP 加ポテトデキストロス寒天培地)、各微生物検査(浮遊菌、表面付着菌、落下菌)を実施している。

(4) 環境モニタリング結果

年に 1 回の清掃・消毒の専門業者による CO₂ インキュベータの清掃・消毒作業、及び 2 ヶ月に 1 回の施設の清掃・消毒作業前後の環境モニタリングにて、施設の清浄度に応じた日本薬局方の環境微生物の許容基準に適合しており、許容基準値以上の菌は認められなかった。また、加湿用水にかび等も発生しておらず、培養細胞のコンタミネーションも認められていなかった。

(5) 交叉汚染防止

CO₂ インキュベータでの交叉汚染を防止するために、CO₂ インキュベータを数台設置し、培養目的に応じて使用する CO₂ インキュベータを区別しており、物理的な隔離処置を施している。

【考察】

CPC のような解放系の室内での交叉汚染防止に、安全キャビネット、遠心機及び CO₂ インキュベータの清掃・消毒作業の

適格性を検討したところ、現在実施している方法において、環境微生物の許容基準値に不適合な菌の増殖は認められず、交叉汚染リスクを低減することができていると考えられた。

今後より清浄度の維持が可能で、効果的な交叉汚染防止を可能とするため、以下の方法を提言する。

(1) 安全キャビネット

- 1) 作業終了時の消毒作業に加え、年に 1 回、定期清掃は、次亜塩素酸ナトリウム 6% を 0.1% に希釈して消毒作業を行い、70%エタノールで清拭・残留薬剤除去を行うことにより、作業領域の清浄度の維持が可能である。
- 2) 試験実施時(平均週 1 回)に 1 回の施設の環境モニタリングを実施することにより、汚染の早期発見、対応が可能である。
- 3) 安全キャビネット内の清浄度の維持に、安全キャビネット内の表面付着菌のモニタリングを行うが、コンタクトプレート法では培地成分が付着する可能性がある。安全キャビネット内の表面付着菌のモニタリングは、表面付着菌の有無をさらに調べるため清拭できない部位を中心にスワブ法で実施することが望ましい。

(2) 遠心機

- 1) ローター等の取り外し可能な部品は、滅菌処理が可能な材質のものを選択する。

- 2) 遠心機の消毒手順に係る効果及び頻度を、環境モニタリングプログラムを通して確立する。
- 3) 環境モニタリングによる測定ポイント及び測定箇所は、リスクアセスメントに基づいて作成する。
- 4) 遠心機内部は入り組んでいるため、表面付着菌のモニタリング方法はスワブ法を採用する。

(3) CO₂ インキュベータ

作業員及び清掃・消毒の専門業者による日常清掃・消毒作業が適切に行われていたが、今後は下記の事項を検討実施することにより、インキュベータ内の清浄度の維持が可能であり、汚染の早期発見、対応が可能となる。

- 1) 清掃・消毒の専門業者による CO₂ インキュベータの清掃・消毒作業を年に 1 回に実施する。使用薬剤は次亜塩素酸ナトリウム 6% を 0.1% に希釈して使用し、75% エタノールで清拭・残留薬剤を除去する。
- 2) 半年ごとに CO₂ インキュベータ内棚、ネジを含め取り外しが可能なものは全て外し、局法収載滅菌処理方法である乾熱滅菌法にて滅菌する。その際、内部及び外装についても清掃・消毒作業を実施する。
- 3) 環境モニタリングによる測定ポイント及び測定箇所は、リスクアセスメントに基づいて作成し、消毒・滅菌手順に係る効果及び頻度を確立する。

- 4) 加湿用水には滅菌蒸留水を使用し、定期的に交換及び殺菌灯の照射などの滅菌処理を行うことにより、インキュベータ内の汚染リスクを低減する。
- 5) 表面付着菌のモニタリング方法は清掃・消毒専門業者と相談しながらスワブ法も検討する。

安全キャビネット、CO₂ インキュベータ、遠心機などの消毒・滅菌は、交叉汚染を防止する為にも、菌の検出がないということが前提であり、必須である。現在我々が行っている消毒方法で問題は生じていないが、もし菌が検出された場合は、菌を同定し専門業者による消毒・滅菌とその後のモニタリングを実施し、無菌を確認したのち、作業を再開する。その後も同様の菌などが検出した場合は、対策を講じるが、リスクの削減に要する費用(消毒作業の繰り返し)に比べて削減効果が少ない場合によっては機器の破棄を含めて検討する。これらの方策はあらかじめ規定した清掃手順書に従って実施する。

以上