

## 6. autoclave及び乾熱滅菌を用いた滅菌法のvalidationのための滅菌操作実施と解析

担当責任者：郷 正博

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

先端医療振興財団における再生医療等製品の製造施設では、滅菌として autoclave (オートクレーブ) 滅菌と乾熱滅菌を行っている。生物等汚染リスク低減のためには、オートクレーブ及び乾熱滅菌を用いた滅菌法が有効であるが、滅菌の実作業を行った結果を下記に提言する。

1. オートクレーブ滅菌は、簡易滅菌パウチ、もしくは滅菌袋で包装することによって被滅菌物の滅菌を行うべきである。また、廃液ボトルは蓋を開けた状態で簡易滅菌パウチにより包装し滅菌を行うことが適切と考えられる。
2. 乾熱滅菌は、庫内の位置や容器の形態にかかわらず滅菌され、想定されている滅菌条件において滅菌が完全であった。

以上より、乾熱滅菌の信頼性は高いが、オートクレーブ滅菌は微細な条件の違いによって、滅菌が不完全であることが確認された。オートクレーブ滅菌においては、積載パターンを含めて、滅菌条件の詳細を常に意識する必要がある。また、機器バリデーション実施等、機器管理も重要である。

### 【目的】

生物等汚染リスク低減のためには、オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌を用いた滅菌法が有効であるが、実際どの程度滅菌出来ているのか、滅菌バリデーションを行う必要がある。Biological indicator (バイオロジカルインジケター) 等を用いた、滅菌の実作業を行い、結果を提言にまとめる。

### 【内容】

先端医療振興財団が実施中の医師主導治験における治験製品製造施設では、滅菌としてオートクレーブ滅菌と乾熱滅菌を

行っている。再生医療製品の製造工程に使用する資材は、一般的には消耗品であるため、施設における滅菌の重要性は高くない。しかし、すべての資材を消耗品にすることが可能とは限らないため、滅菌及び滅菌バリデーションは重要である。エンドトキシンを不活化できることから、可能な限り乾熱滅菌することが望ましいが、材質によっては不可能な物も多い。そのため、オートクレーブ滅菌と乾熱滅菌を使い分ける必要がある。以下に、当財団が実施した、それぞれの滅菌バリデーションについて簡単にまとめた。

## 1. オートクレーブ滅菌のバリデーション

### (1) 目的

121、20分の条件でオートクレーブを作動させた場合に、被滅菌物が適正に滅菌されるための、被滅菌物の包装方法とチャンバー内の場所等の条件を検証すること。

### (2) 機器

高圧蒸気(オートクレーブ)滅菌器 平山製作所 HV-50

### (3) 実施方法

以下の条件における、滅菌の効果を確認する。

条件：

#### 1) 被滅菌物の包装方法

- ・(蓋のある容器の場合は)蓋を閉じる、または緩めて閉じ、容器全体は包装しない。
- ・滅菌用の袋(簡易滅菌パウチ等)で包装する。
- ・アルミホイルで包装する。

#### 2) オートクレーブチャンバー位置

- ・上
- ・下

バイオロジカルインジケーターを被滅菌物内に設置し、121、20分の条件で滅菌を行う。滅菌後、バイオロジカルインジケーターを57.5のインキュベータで24時間培養する。また、陽性コントロールとして、未滅菌のバイオロジカルインジケーターを同じインキュベータで培養する。

使用したバイオロジカルインジケーター：

ACE test / 福沢商事 / H3723 / Lot:130503 / Exp.2014.11.03

### (4) 評価項目および基準

- 1) バイオロジカルインジケーターに含まれている培地の色調変化により、各条件の滅菌効果を確認する。滅菌が完全であれば、培地の色調は紫から変化しない。滅菌が不完全であれば、指標菌が繁殖し、培地が酸性になり紫から黄色へ変化する。
- 2) 陽性コントロールの培地の色調が紫から黄色に変化することを確認する。

(5) 結果および評価

1) 1回目

1回目は から までの条件を検討した。各条件におけるバイオロジ

カルインジケータの色調を表 1 に示す(紫：滅菌適合、黄：滅菌不適合)。

表 1 オートクレーブ滅菌下の各条件と結果 (1回目)

条件 No.	被滅菌物(対象物)の種類	被滅菌物の包装方法	チャンパー内設置場所	結果
	ステン角型ポット	蓋を閉める	上	黄
		簡易滅菌パウチ	下	紫
		簡易滅菌パウチ	上	紫
	廃液ボトル	緩めた状態で蓋をする	上	黄
	採血管立て	簡易滅菌パウチ	上	紫
	陽性コントロールのため滅菌なし			黄

の結果より、使用したバイオインジケータが有効であることが示され、 の結果よりチャンパー

上下どちらに設置しても完全に滅菌されていることが示された。図 1 に実施時の写真を示した。

①ステン角型ポット内	②オートクレーブ下段	③オートクレーブ上段	④廃液ボトル内	⑤簡易滅菌パウチ内 (採血管立て入り)
				
滅菌 -	+	+	-	+

図 1 オートクレーブ滅菌後のインジケータ写真

以上の結果、ステン角型ポット内と廃液ボトル内は滅菌が不完全であ

ったため、以下の から までの条件で 2 回目の検討を行った。

2) 2回目

表2 オートクレーブ滅菌下の各条件と結果(2回目)

条件 No.	被滅菌物(対象物)の種類	被滅菌物の包装方法	チャンパー内設置場所	結果
	エアサンプラー蓋	アルミホイルで覆う	上	紫
	エアサンプラー蓋	アルミホイルで覆い ステン角型ポットに 入れ蓋を閉める	上	黄
	ステン角型ポット	蓋を閉める	上	黄
	廃液ボトル	蓋は閉めずアルミホ イルで口を覆う	上	黄
	廃液ボトル	蓋を開けた状態で簡 易滅菌パウチへ入れ る	上	紫
	メガネ	滅菌袋	上	紫
	陽性コントロールのため滅菌なし			黄

2回目の検討より、ステン型ポット内に入れ蓋を閉めた状態で滅菌を行ったものと廃液ボトルの蓋を閉じた状態で滅菌を行ったものは、1回目の検討同様、滅菌が不完全であることが示された。

(6) 結論

蓋を閉めた状態のステン角型ポット内や、アルミホイル等で口を塞いだ廃液ボトル内は滅菌が不完全であった。すなわち、ステン角型ポット内に被滅菌物を入れ滅菌を行うことは、滅菌条件として適切でないことが結論された。したがって、簡易滅菌パウチ、もしくは滅菌袋で包装することによって被滅菌物の滅菌を行うべきである。また、廃液ボトルは蓋を開けた状態で簡易滅菌パウチにより包装し滅菌を行うことが適切と考えられる。

2. 乾熱滅菌のバリデーション

(1) 目的

250℃、30分の条件で乾熱滅菌器を稼働させた場合、包装方法、庫内の位置に関わらず、被滅菌物が滅菌されているかどうかを検証する。

(2) 機器

乾熱滅菌器 東京理化器械 NDS-420

(3) 実施方法

以下の条件における、滅菌の効果を確認する。

条件：

1) 乾熱滅菌器、庫内の位置

- ・上段 (左奥、右奥、左手前、右手前)
- ・下段 (左奥、右奥、左手前、右手前)

2) 被滅菌物の包装方法

- ・(蓋のある容器の場合は)蓋をし、容器全体を包装しない。
- ・ガラス器具の口はアルミホイルで覆う。

表3 乾熱滅菌下の各条件と結果

条件 No.	被滅菌物(対象物)の種類	被滅菌物の包装方法	庫内設置場所	結果
	(バイオロジカルインジケータのみ)	アルミホイルで覆う	上段 左奥	-
	同上	同上	上段 右奥	-
	同上	同上	上段 左手前	-
	同上	同上	上段 右手前	-
	同上	同上	下段 左奥	-
	同上	同上	下段 右奥	-
	同上	同上	下段 左手前	-
	同上	同上	下段 右手前	-
	ステン型ポット	蓋を閉める	下段	-
	ビーカー	口をアルミホイルで覆う	上段	-
	メスシリンダー	同上	上段	-
	陽性コントロールのため滅菌なし			+

バイオロジカルインジケータのアンブルを被滅菌物内に設置し、250、30分の条件で滅菌を行う。尚、庫内の位置による滅菌効果を確認する目的で、バイオロジカルインジケータのアンブルを準備し、滅菌の際はバイオロジカルインジケータのアンブルをアルミホイルで覆った状態にする。

滅菌後、バイオロジカルインジケータのアンブルを割り、芽胞菌の付いたガラス線維ろ紙を取り出し、寒天培地(ソイビーン・カゼイン・ダイジェストブロス培地)に接種し、インキュベータ35.0設定で7日間培養を行う。また、陽性コントロールとして、未滅菌のバイオロジカルインジケータから取り出した芽胞菌の付いたガラス線維ろ紙を、同様にインキュベータで培養する。

使用したバイオロジカルインジケータ：

ACE test / 福沢商事 / H6302 / Lot:130207 / Exp.2014.08.07

(4) 評価項目および基準

1) ガラス線維ろ紙の周辺に芽胞菌由来コロニーが検出されなければ、滅菌は完全に行われているとみならず。滅菌が不完全であればコロニーは検出される。

2) 陽性コントロールを接種した培地からコロニーが検出される。

(5) 結果および評価

培地における菌増殖の有無(+、-)を表3に示した。

(+ : 菌増殖有 滅菌不適合、- : 菌増殖無 滅菌適合)

の結果より使用したバイオロジカルインジケータが有効であることが示され、から の結果より庫内上下段、場所に関わらず滅菌されていることが示された。またステン角型ポット内、ビ

ーカー内、メスシリンダー内においても検討時の包装方法で滅菌されていることが示された。

#### (6) 結論

庫内上下段、場所に関わらず滅菌された。ステン角型ポット内は蓋を閉めた状態でも中は滅菌され、ビーカー、メスシリンダーにおいても口をアルミホイルで覆っていても中は滅菌されていた。したがって、想定されている滅菌条件において滅菌が完全であることが結論され

た。

以上より、乾熱滅菌の信頼性は高いが、オートクレーブ滅菌は微細な条件の違いによって、滅菌が不完全であることが確認された。オートクレーブ滅菌においては、積載パターンを含めて、滅菌条件の詳細を常に意識する必要がある。また、機器バリデーション実施等、機器管理も重要である。

以上