

Volume 11, No. 3



EO ガス滅菌に対する中温性孢子抵抗性に対する分析

By Beth Ridgeway

時折お客様から、分析証明書（CofA）に表示されていないバイオロジカル・インジケータ（BI）の微生物を特定したと連絡がくることがあります。これらの場合のいくつかは、培養した陽性コントロールの単離や、サイクルでの予期せぬ陽性反応、または内部精度管理試験で最初の種同定のために連絡があります。ほとんどの場合、問題の BI は、エチレンオキシド（EtO）、乾熱滅菌プロセスに使用される *Bacillus atrophaeus* の中温性孢子を含むものである。今回の Spore News ではこれらの BI が主な焦点となります。それで、このコンタミネーションはどこから来たのですか？ という質問に対しては、以下に含まれる可能性が高いですが、これらに限定されるものではありません：

- BI を露出または培養する際の不適当な操作が、滅菌暴露後の汚染を引き起こす。すなわち、微生物は技術者の手法から来た場合。
- 環境；空気中の微生物は、培養中に BI または培地を汚染する可能性。
- 非滅菌培地。
- BI の製造過程での汚染。

汚染した細菌の数は、典型的に非常に少ない（10CFU 未満）ので、BI 上に 10^6 の孢子が存在するため、培養によって正確な数を確かめることは困難です。*Bacillus atrophaeus* は、この種を他のものと区別するのに役立つオレンジ色のコロニー形態を有します。汚染物質を数えるためにはあまりにも少ないため、10-1 希釈（この希釈係数が *Bacillus atrophaeus* の増殖を生み出す）で直接接種することが通常必要です。一部のユーザーは、陽性対照を培養と増殖によって、汚染レベルのパーセント値を列

拳または決定しようと試みていました。これは、主に各生物の成長率と死亡率が異なるため、非常に不正確な評価方法となります。この試験は、厳格な無菌技術が採用されていると仮定して別の生物が存在するかどうかを確認するのに有効であるが、汚染率を決定するために使用すべきではありません。これらは BI のパフォーマンスに悪影響を与えるほど、汚染は問題になっているのでしょうか？ BI に関する規格ではどのように言っているのでしょうか。

USP 37 General Chapters : <1035>滅菌バイオリジカル・インジケータ

『担体及び一次包装は、バイオリジカル・インジケータの性能または安定性に悪影響を及ぼす汚染（物理的、化学的または微生物的）を含んではならない。』

USP 37 Monographs : 湿熱、乾熱、およびガス滅菌のためのバイオリジカル・インジケータ、紙ではない担体

『純度 - 適切な培地プレートを使用して担体から回収された孢子の検査後、他の微生物汚染の証拠はありません』

USP 37 Monographs : エチレンオキシド滅菌用のバイオリジカル・インジケータ、紙担体

『純度 - 適切な培地プレートを使用して孢子を調べることによって、他の微生物汚染の証拠はありません』

ANSI / AAMI / ISO 11138-1 : 2006、ヘルスケア製品の滅菌 - バイオリジカル・インジケータ 第 1 部 : 一般要件

4.1.1 品質システム

『製造者は、ISO 11138 のこの章で要求されるすべての操作を網羅する正式な品質システム（例えば、ISO 13485、GMPs、またはその他の国内または地域の要件）を確立し、文書化し、維持しなければならない。特に、製造者は、生物学的指標の性能に悪影響を及ぼす汚染を最小限に抑えるため、生産の全段階で予防措置を講ずるものとする。』

5.2 担体、一次および二次包装

5.2.1 『担体、一次及び二次包装の材料には、バイオリジカル・インジケータの性能に悪影響を及ぼす汚染（物理的、化学的又は微生物的）が含まれてはならない』

5.3 接種された担体

5.3.2 『複数の菌株の使用が特定のプロセスにおける試験生物の性能に著しい影響を及ぼさないことを製造業者が実証しない限り、接種された担体のバッチ内で、試験生物の 1 つの株のみを使用する』
汚染の問題を評価する際 MesaLabs 社では、汚染は一般的に BI の抵抗性の性能に悪影響を及ぼ

さないと考えている。これは、特に BI 製造プロセス中にコンタミネーションが検出された場合に当てはまりません。培養中に不適切な無菌技術または浮遊汚染によって汚染物質が回収された場合、これはまったく異なる種類の問題を提起するが、必ずしも BI 性能に悪影響を与えるものではありません。抵抗性の観点から見ると、D 値は、「規定された用量条件下で試験微生物集団の 90%の不活化を達成するのに必要な時間または用量」と定義される。したがって、*Bacillus atrophaeus* の 1.0×10^6 個の孢子を含み場合、典型的なものは恐らく 3.5 分の D 値を有する BI を想定されます。それが BI 当たり 100CFU で汚染され、微生物を汚染する微生物が試験微生物に匹敵する抵抗性を有していても、曝露の初期段階で汚染物質が殺され、試験種を「生存」する可能性は実質的にゼロとなります。

しかしながら、『これらの微生物の抵抗性はどのぐらいですか？』『抵抗性の性能に影響がないことをどのように確認しますか？』については疑問が残っています。

これを評価するために、4 種の異なる微生物をエチレンオキシドの抵抗性について試験しました。*Bacillus cereus* および *Bacillus thuringiensis* の 2 種は、一般に単離された孢子形成性汚染物質であるために選ばれました。*Bacillus subtilis* 5230 および *Bacillus pumilus* の 2 種の生物は、2 つの他の中温性孢子形成因子以外という以外、特定の理由はなくランダムに選択しました。試験のために、4 つのバッチのストリップ BI を、 10^6 の集団を用いて 4 つの微生物を用いて製造しました。菌数測定を各バッチについて行い、次いでエチレンオキシドの BIER を用いてフラクションネガティブ法で、各バッチについて 10 枚（単位）/曝露を行いました。各バッチからの 10 単位を同じサイクルで暴露しました。次いで、ユニットを適切に通気させ、TSB 培地で、 $30^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ 、7 日間培養しました。7 日間、データを記録し、培養後 Stumbo Murphy Cochran 法を用いて計算しました。これらの結果を表 1 に示します。

表 1：中温性孢子のエチレンオキシド抵抗性

微生物	菌数	D 値 (分)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	2.7×10^6	3.8
<i>Bacillus subtilis</i> 5230	2.4×10^6	2.9
<i>Bacillus cereus</i>	3.5×10^6	2.0
<i>Bacillus pumilus</i>	3.0×10^6	3.7
<i>Bacillus thuringiensis</i>	3.1×10^6	1.6

BI の孢子が分析証明書に記載された抵抗性に影響を及ぼすか否かを定めるために別の試験を行いました。この研究のために 2 つの微生物、*Bacillus cereus* および *Bacillus subtilis* 5230 を用いました。*Bacillus atrophaeus* の担体をグラシン紙（一次包装）から取り出し、担体にそれぞれの微生物 10^6 個の孢子を接種した。ストリップを一晩乾燥させ、次いで、グラシン紙に再パッケージングしました。各バッチについて、10 枚（単位）/曝露で BIER を用いたフラクションネガティブ法にて試験をしました。すべてのバッチが同じサイクルで暴露されました。次いで、ユニットを適切に通気させ、TSB に培養し、 $30^{\circ}\text{C} \sim$

35℃で7日間培養しました。7日間、データを記録し、培養後D値を Stumbo Murphy Cochran 法を用いて計算しました。7日間の終わりに、最も長いサイクルの陽性チューブを単離して、*Bacillus atrophaeus* の増殖を確認しました。*Bacillus atrophaeus* の抵抗性を表2に示す。

表2 : *Bacillus atrophaeus* ストリップに他の微生物を接種した場合の抵抗性

微生物	D 値 (分)
<i>Bacillus atrophaeus</i> only	3.8
<i>Bacillus atrophaeus</i> と 10^6 <i>Bacillus cereus</i>	3.9
<i>Bacillus atrophaeus</i> と 10^6 <i>Bacillus subtilis</i> 5230	3.9

上記のデータは純度と汚染に関する MesaLabs 社の立場を再確認しています。試験した微生物の全てが、*Bacillus atrophaeus* の抵抗性より低い耐性を示しました（表1のデータより）。BIが他の生物に大量に汚染されていたとしても、この研究のデータは表2で測手されたD値に対して0.1分の増加しか示さないため、全体の抵抗測定値で無視できる程度の変化であることを示しています。MesaLabs社の純度基準は、 $\leq 0.0001\%$ のレベルを必要としていることは注目に値します。これは、BIの100万個の試験孢子ごとに1つ以上の汚染微生物に相当します。上記のデータから、非常に合理的かつ過度に非かめた受け入れレベルであることが明らかです。プロセス管理はBI製造におけるすべての段階で実施され、このレベルの純度を達成することを保証します。要約すると、あなたが次の質問のいずれかを尋ねる場合には、以下に示す答えに自信を持ってください。

『私のBIは、これらの低レベルの汚染で使用することができますか？』

回答 『はい』

『それは私のプロセスに影響を与えるのでしょうか？』

回答 『いいえ』

『私はUSPとISOの定められたガイドラインに従っていますか？』

回答 『はい』

Spore News を翻訳しております。原文は下記 URL でご確認できます。

<https://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2014/07/Spore-News-Vol-11-No-3.pdf>

ご不明点、ご質問、製品のお問い合わせに関してはレーベン・ジャパン株式会社までお気軽にお問い合わせ下さい。

レーベン・ジャパン株式会社 埼玉県越谷市川柳町 3-110-8

TEL : 048-961-1781 FAX : 048-961-1782

メールでのお問い合わせ : info@raven-japan.jp