

SporeNews

MesaLabs

biological indicators newsletter

Volume 11, No. 3



エチレンオキシド滅菌に対する耐性解析 by Beth Ridgeway

BI の分析証明書 (COA) に表示されていない微生物が見つかった場合、お客様より連絡を頂くことがあります。お客様でポジティブコントロールとして単離培養した場合や、滅菌後の陽性反応の場合、また品質テストで同定した場合に連絡を頂くことがあります。ほとんどの場合、エチレンオキシド滅菌と乾熱滅菌で使用される *Bacillus atrophaeus* で連絡を頂きます。この BI が、今回の Spore News での主な焦点となります。これらの汚染はどこからきたものでしょうか？考えられる原因は以下のようにいくつか考えられますが、これらに限定される訳ではありません。

- 不適切な無菌技術によって、滅菌後に汚染されることがあります。すなわち汚染した微生物は技術者由来である場合です。
- 環境；空気中の微生物は培養中の BI、または培地を汚染する場合があります。
- 非滅菌培地を使用する場合。
- BI の製造課程で汚染された場合。

汚染原因の微生物は、一般的には非常に少ない数 (10CFU 以下) であり BI に含まれる *Bacillus atrophaeus* は 10^6 存在するために、正確な数を確かめることは困難です。*Bacillus atrophaeus* は、他の種と区別するのに役立つオレンジ色のコロニーを形成します。汚染原因の微生物をカウントするにはあまりにも少ない数なので、10 倍希釈してから、直接プレートに接種する必要があります。何人かのお客様は、ポジティブコントロールを培養増殖させることによって、汚染した微生物の割合を出そうと試みました。しかし、それぞれの微生物が異なった増殖や死滅条件を持っているために、これは非常に不正確な評価となります。確実に無菌操作が行われていると仮定した場合、この試験は他の微生物が混ざっているかどうかを確認することに有効ですが、汚染した微生物の割合を出すには使用すべきではありません。そもそも BI の性能に悪影響を及ぼすほど、汚染した微生物は問題なののでしょうか。BI の純度に関する基準とはどういったものかを見ていきましょう。

USP 37, General Chapters: <1035> BIOLOGICAL INDICATORS FOR STERILIZATION
キャリアと一次パッケージングは、いかなる（物理的、化学的、微生物学的）汚染があってはならない。

USP 37, Monographs: Biological Indicators for Moist Heat, Dry Heat, and Gaseous
Modes of Sterilization, Nonpaper Carriers

純度- 適切なプレート培地を利用してキャリアから回収された後、他の微生物が汚染しているかの証拠
がありません。

USP 37, Monographs: Biological Indicators for Ethylene Oxide Sterilization, Paper
Carrier

純度-適切な培地上で孢子を調べることで、他の微生物に汚染されたという証拠はありません。

ANSI/AAMI/ISO 11138-1:2006, Sterilization of Health Care Products-Biological
Indicators-Part 1: General Requirements

4.1.1 Quality systems

製造業者は、ISO11138 で要求される全ての操作を網羅するために、公式な品質システム（例えば、
ISO13485、GMPs、もしくは他の国ごとの要求事項等）を確立し文書化し維持しなければなりません。
特に製造業者は、BI の性能に悪影響を及ぼす汚染を最小限に抑えるため、生産のすべての段階で予
防処置を講じなければならない。

5.2 Carrier, primary and secondary packaging

5.2.1 キャリアと一次包装及び二次包装の材料は、BI に悪影響を及ぼす汚染（物理的、化学的、
微生物学的）が含まれてはならない。

5.3 Inoculated carrier

5.3.2 製造業者が、複数の菌株を使用する場合、指定された滅菌プロセスにおける試験に使用する
微生物に影響を及ぼさない事を実証している場合を除いて、接種するキャリアのバッチは一つの株を使用
しなければならない。

汚染問題を評価する場合、MesaLabs 社は汚染が BI の耐性性能に典型的な悪影響を及ぼさないと
考えています。これは、もし BI 製造プロセス中に、汚染が検出された場合に特に当てはまります。もしも汚
染が、培養した際に、不適切な無菌技術や空気中の浮遊汚染によって検出された場合、これは、他の
問題を引き起こす場合があるが、BI の性能に悪影響を与えるものではありません。耐性性能の観点から
見る場合、D 値は『規定された 90%の不活性化に到達するのに必要な時間もしくは容量』と定義されま
す。エチレンオキシドの BI が、*Bacillus atrophaeus* の 10^6 個の孢子を含み、3.5 分の D 値をもつ

場合を考えます。もし、BI に 100CFU の汚染があり、汚染微生物が試験微生物に匹敵する抵抗性を持っていたとしても、汚染微生物は暴露初期の段階で死滅し、試験微生物において生き残る可能性は殆どありません。疑問として『これらの微生物の抵抗性はどのぐらいでしょうか？』や『抵抗性能に影響がないことをどうやって確認するのですか？』が残ります。これらを評価するために、4 つの異なる微生物を用いて、エチレンオキシド耐性について試験を行いました。微生物の 2 種、*Bacillus cereus* と *Bacillus thuringiensis* が選ばれました。これらは一般的に孢子形成の汚染物質であることが知られています。また、*Bacillus subtilis* "5230"と *Bacillus pumilus* はランダムに選ばれました。試験のために、BI の 4 つのバッチは、 10^6 個を用いて 4 つのそれぞれの微生物で製造しました。濃度検定は、それぞれのバッチで確認して、BIER を用いて Fraction negative 法を用いて、各バッチで 10 個ずつ用いて確認しました。7 日間データを記録して、培養後 Stumbo Murphy Cochran 法を用いて計算しました。これらの結果を Table1 に示します。

Table 1: Ethylene Oxide Resistance of Mesophilic Spore

Organism	Population	D-value (in minutes)
<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

別の試験では、BI が COA に記載された耐性をもつかどうかを調べました。2 つの微生物 (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* 5230) が選ばれました。MesaStrips の *Bacillus atrophaeus* をグラシン紙から取り除き、*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* 5230 をそれぞれ 10^6 個接種しました。ストリップを一晚乾燥させ、次いでグラシン紙に再パッケージしました。BIER を用いて Fraction negative 法を用いて、各バッチで 10 個ずつ用いて確認しました。すべてのバッチを同じサイクルで行いました。次いで、適切に通気させ、TSB 培地で 30-35℃で 7 日間培養しました。7 日間データを記録し、Stumbo Murphy Cochran 法を用いて計算しました。7 日間の最後に、最長サイクルから陽性反応だったチューブから単離して確認したところ、*Bacillus atrophaeus* のみの存在を確認しました。すべてのプレートで、*Bacillus atrophaeus* のみの増殖を示しました。

抵抗性能を Table2 に示します。

Table 2: Resistance of *Bacillus atrophaeus* Strips Inoculated with Another Organism

BI configuration	D-value (in minutes)
<i>Bacillus atrophaeus</i> only	3.8
<i>Bacillus atrophaeus</i> inoculated with 10^6 <i>Bacillus cereus</i> spores	3.9
<i>Bacillus atrophaeus</i> inoculated with 10^6 <i>Bacillus subtilis</i> 5230 spores	3.9

試験した微生物すべては、*Bacillus atrophaeus* の耐性より低い抵抗性を示しました (Table1) 。たとえ BI が他の微生物に大量にコンタミされていたとしても、この研究データは Table2 のデータが示すように、測定された D 値は 0.1 分の増加しか示さなかったため、全体の抵抗値に対して無視できることを示し

ています。MesaLabs 社の純度の基準は、 $\leq 0.0001\%$ レベルが必要であることは注目すべきに値します。これは BI の 100 万個の試験孢子に 1 つの汚染微生物に相当する事になります。上記のデータから、これは非常に合理的かつ過度なレベルであることは明らかです。プロセス管理は、BI 製造におけるすべてのステップで実施、確認し、われわれはこのレベルの純度を達成していることを保証します。まとめとなりますが、もしあなたが以下の質問をする場合、あなたは必ず以下の回答に自信がなければなりません。

質問 『BI は、これらの低い汚染レベルで使用されていますか？』

回答 『はい。』

質問 『プロセスに影響を及ぼしますか？』

回答 『いいえ。』

質問 『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。原文は下記リンクでご確認できます。

<http://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2014/04/Spore-News-Vol-10-No-4.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