

Spore News

Volume 3, Number 3
September 2006



Garrett Krusheski
Scientific & Technical
Services Manager

What is the *D-difference* in *D-value*?

D 値の違いは何ですか？

時折、当社のカスタマーサービス部門は、非常に具体的かつ/または狭い範囲のみ許容する特定の D 値を有するバイオロジカル・インジケータ (BI) の要求を受けます。例として、EZTest Gas BIs の顧客仕様が 3.5 分を超えない D 値という、注文を受けました。利用可能な在庫を調べると、D 値が 3.6 分のロットが直ちに出荷可能であると判断されました。(実際のこのロットの四捨五入前の D 値は 3.5556 分でした)。顧客はそのロットを受け取ることを拒否し、3.5 分の基準を満たすために新しいロットを製造するように要求してきました。

矩形波致死

3.5 分の D_{EO} 値を有する BI がプロセスサイクルで使用するのに許容可能で、3.5 分を超える値が許容できないかどうかを判断するには、表 1 に示す EZTest ガス D 値データを考慮します。値は、陰性ユニット数/実証 Kill Time * で表示されるユニットの数で示されています。一見して、表 1 のデータは異なるように見えますが、それらは実際に異なっていますか？

Table 1. Comparison of Fraction-negative D-value Data for Various EZTest Gas Lots

BIER Cycle Exposure Time (minutes)	Lot # and Spore Population per Unit				
	Lot A 2.2 X 10 ⁶	Lot B 1.7 X 10 ⁶	Lot C 2.5 X 10 ⁶	Lot D 2.3 X 10 ⁶	Lot E 2.1 X 10 ⁶
16	00/25	---	00/25	---	00/25
18	00/25	00/25	00/25	00/25	00/25
20	03/25	00/25	03/25	00/25	01/25
22	21/25	08/25	07/25	01/25	00/25
24	24/25	23/25	12/25	13/25	06/25
26	25/25	24/25	22/25	20/25	09/25
28	25/25	25/25	24/25	24/25	19/25
30	---	25/25	25/25	25/25	24/25
32	---	---	24/25	25/25	25/25
34	---	---	25/25	---	25/25
36	---	---	25/25	---	---
LHSK D-value	3.2094	3.4871	3.5556	3.6840	3.9982
Rounded LHSK D-value	3.2	3.5	3.6	3.7	4.0

*実証 Kill Time は、全てのユニットが増殖に対して陰性であり、より長時間の全ての曝露において成長が観察されなかった最短の BIER 曝露として定義される。

これらの微妙な差異の差は、「矩形波」の致死性をもたらす生物指標測定器 (BIER) でのみ検出可

能です。矩形波という用語は、BIER が非常に厳しい曝露条件のセット内に制御し、曝露の間、定常状態条件が達成され、維持されるという点で適用可能となります。BIER は：

1. 60 秒以下で 0~600mg / L の EtO ガスをチャージし、
2. ガス濃度を +/- 30mg / L 以内に維持し、
3. 露光温度を +/- 1℃以内に制御し、
4. 相対湿度を +/- 10%以内に維持し、
5. チャンバーを 60 秒以内に大気圧より低い圧力（~0.7 kPa）まで排気します。

このタイプのサイクル・パフォーマンスの結果、各 BIER サイクルのすべての致死率は、簡潔かつ 1 回の用量で BI に到達します。

これと比較して、プロセス容器は、より多くの条件の変動で動作します。ISO 11135 : 1994、附属書 A は、設定点の +/- 3℃のガス曝露中の空のチャンバーの温度範囲が許容されると述べています。負荷をかけたとき、製品は指定された（最低）温度を達成する必要がある、負荷全体の観測される温度記録の範囲は 10℃の広がりを超えてはなりません。ISO 11135 の文書は改訂され、2006 年に公表されたバージョンはサイクルのパラメータにあまり厳しくありませんでした。空のチャンバーサイクル性能の +/- 3℃ の基準はそのまま維持される予定ですが、最高温度が製品に影響を与えない限り、製品負荷全体に渡って 10℃の最高温度の広がりを持ち上げられ、非特定な最高温度に置き換えられる、もしくは、パッケージングの機能に依存します。

プロセス容器の致死性

BIER の厳しい性能パラメータは矩形波の致死率をもたらしますが、生産滅菌器の広い性能は「プロセス容器の致死率」をもたらします。BIER の 60 秒の充填時間とは対照的に、プロセス容器では、適切な濃度に達するまでに 10~40 分かかることがあります。その後の負荷内で、暴露温度の到達にはさらに長い時間がかかります。ガス充填および排気段階中にのみ累積された致死率は、しばしば BI の孢子攻撃を不活性化するのに十分である。またプロセス容器内の排気時間は、製品のパッケージによっては時間がかかる場合があります。暴露条件およびその後の EO ガスの除去ならびにプロセス容器中の暴露段階の間は、カオス状態となり、条件を達成するために比較的長い時間のため、表 1 に見られるような BI 耐性のわずかな差異は、プロセス容器内で検出することはできません。+ BI の孢子曝露を不活性化するには、ガスの充填段階および排出段階のみで累積された致死率が十分です。このことは、様々な医療製品の検証試験のためにゼロ分の曝露を実施した Mosley ら（2002）の研究で実証されました。ストリップスとセルフコンテインド型 BI の両方を使用して、0 分曝露で累積された致死率は、陽性試験ユニットがほとんどないかゼロでした。

+ EtO BIER を 10 分または 15 分ごとに異なる曝露間隔でプログラムすることが可能な場合、これらのデータセットはどのように表示されますか？データセットは、隣接する 1 つの露出で露出したテストユニットの生存率 100%から生

存率 0%まで「飛躍」します。BI をプロセス容器で暴露することは、15 分の露光で刻めることを実行できる BIER を使用することと多少似ています。

プロセスサイクルのガスチャージおよび排気段階でのみ提供される致死率によって、ほとんどのテストユニットが不活性化される場合、BI の機能は何ですか？

BI が検証に使用される場合、そのアプローチは、1) BI /バイオバーデン法、または 2) overkill 法のいずれかです。我々の顧客のほとんどは、ハーフサイクル法とも呼ばれる、overkill 法を使用しています。

設計された overkill 法のバリデーション設計による過剰な検証は、BI が死滅したことの証明を超えて、大幅に拡張されたプロセスを備えています。この余分な処理時間は Sterility Assurance Level (SAL) と同等です。したがって、BI が肯定的（検証されたサイクルで生き残る）であれば、プロセスに設計された「余分な」致死性はすべて「失われている」ということになります。

したがって、ルーチンモニタとしての BI は、致命的なプロセス障害を検出するために使用されるシステムです。現在、すべての重要なプロセスパラメータを測定するために、製品の場所を殺菌するのが最も困難な場所に埋め込むことができる物理的計装システムはありません。前述のように、BI の細菌胞子は、サイクル中のすべての重要なプロセスパラメータを効果的に統合し、BI が配置される特定の場所に存在する正確な致死条件に応答します。

壊滅的な故障の一例は、BI チャレンジが負荷内にある湿気（湿度）が不十分であることです。湿度が低すぎると、プロセスの予想される致死率の 90%以上が失われる可能性があります。検証されたプロセスにおける「予期しない」肯定的なテストユニットは、D 値が所望のレベルよりわずかに大きい BI の使用によるものではなく、それは、重要なプロセス条件の損失および微生物致死性のかなりの部分の喪失に起因します。

D 値はサイクルの開発および検証テスト中に影響を与える可能性があります。D 値のわずかなロット間の差異（BIER で検出可能）は、フルサイクルの生産容器で使用された場合、BI は陽性にはなりません。

D 値の違い

上記で概説したように、D 値評価は、厳密に制御されたサイクルパラメータを有する BIER で実施される。USP と ISO は共に、製造業者が D 値を試験成績書で報告した場合、ラベル表示の +/- 20%以内の結果が元の評価の適切な再現とみなされると述べています。したがって、BIER によって提供される正確な性能能力を用いたとしても、再テストデータの小さな差異が予想されることが認識されます。表 1 から、中央値 D 値は 3.6 分である。+/- 20%の基準を使用すると、2.88~4.32 分の範囲内にある再検査

値は、3.6 分のラベル請求の複製を容認することができます。抵抗性能の観点から言えば、上記のロットは、すべての D 値が中央値の 3.6 分値の +/- 11%以内であるため、同一とみなすことができます。

それにもかかわらず、我々は、陽性結果が出ることを恐れて、要求された最大値よりわずかに高い D 値を有する BI を使用することを拒否する顧客に遭遇します。最近のやりとりでは、顧客は、D 値 3.5556 分の EZTest ロットは受け入れられないと考えられていました。耐性性能データを検討したところ、顧客は、D 値 (CofA に記載してある 3.6 分) に関連して、1 ユニットあたりの菌数 (2.5×10^6) が高いほど計算時間が堅牢になりすぎます (サイドバーを参照)。この場合、D 値はクライアントの最大仕様の 3.5 分を 0.0556 分 (3.3 秒) *超えました。

* 3.5556 分の D 値ロットのフラクションネガティブ法では、実証 Survival Time を実証 Kill Time 範囲に広げるために 225 本の BI を使用しました。これら 225 本の BI のうち、142 は陰性でした。1 つ少ない数の BI が陽性と判定された場合 (すなわち、225 本のうち 143 本の陰性複製)、四捨五入前の D 値は 3.5436 であり、CofA で報告された四捨五入した値は 3.5 分でした。

BI の D 値は孢子菌数とは無関係であることに注意してください。作製された BI の抵抗性能は、孢子、孢子が付着した担体の材料、一次パッケージング、使用される回収培地および使用される培養条件の関数である。当該ロットの BI 当たりの集団が 1.0×10^6 、 5.0×10^6 、または 7.4×10^4 であれば、3.6 分の D 値の結果が得られるであろう。

計算 VS 実証 Survival と Kill time

計算された Kill Time は次の式を使用して導出されます。

計算された Kill Time (分) = $(\log_{10} \text{菌数} + 4) \times (\text{D 値})$

計算された Survival Time は、次の式を使用して導出されます。

計算された Survival Time (分) = $(\log_{10} \text{菌数} - 2) \times (\text{D 値})$

USP と ISO は、CofA に計算された Survival Time と Kill Time を製造業者に含める必要がありますが、プロセス孢子対数減少 (SLR) の観点から見ると、これらの数値は限定された値です。この側面を説明するために、EZTest ガスのロット B (表 1 参照) の抵抗性能を考慮してみます。生存孢子菌数を 1 対数だけ減少させるのに必要な曝露条件の特定のセットでの時間として D 値を定義すると、以下の致死動態が適用可能である。

Table 2. Death Kinetics for Lot B, Population = 1.7×10^6 , D-value = 3.5-minutes

Minutes of Exposure in a BIER	Number of SLRs Achieved in BI	Number of Viable Spores per BI	Log ₁₀ Number of Viable Spores per BI	Percentage of Exposed BIs That Will Test Positive
0.0	0	1.7×10^6	6.23	100%
3.5	1	1.7×10^5	5.23	100%
7.0	2	1.7×10^4	4.23	100%
10.5	3	1.7×10^3	3.23	100%
14.0	4	1.7×10^2	2.23	100%
17.5	5	1.7×10^1	1.23	100%
21.0	6	1.7×10^0	0.23	100%
24.5	7	1.7×10^{-1}	-0.77	17%
28.0	8	1.7×10^{-2}	-1.77	1.7%
31.5	9	1.7×10^{-3}	-2.77	0.17%
35.0	10	1.7×10^{-4}	-3.77	0.017%
38.5	11	1.7×10^{-5}	-4.77	0.0017%

表 1 から、D 値評価を実施する場合、ロット B の実証 Survival Time および実証 Kill Time は、それぞれ 20.0 分および 28.0 分であることが観察されました。表 2 は、21.0 分の実証 Survival Time (D 値評価の間は試験されていない) および 28.0 分の実証 Kill Time を予測します。†

† 各サイクルで曝露された 25 本の BI

試験ユニットの 1.7%が陽性になります

$25 \times 0.017 = 0.425$ の陽性

$0.425 < 1$ なので、曝露した 25 本のゼロ陽性と予想されます

1.7×10^6 の菌数および 3.5 分の D 値では、ロット B の計算された Survival Time は 14.81 分であり、計算された Kill Time は 35.81 分です。ロット B の実証 Kill Time はわずか 28.0 分で、7.81 分の差であることを留意してください。

実証 Kill Time と計算された Kill Time との相違の理由は、計算された Kill Time の式に現れる「+4」です。表 2 に見られるように、BI あたり 10^6 個の孢子で開始する場合、曝露された試験ユニットの間で死滅を達成するためには、8 個の SLR (すなわち、開始菌数を超える 2 個の SLR) が必要です。計算された Kill Time の式の「+4」は、10 の SLR を最初の菌数 10^6 にする曝露時間になります。この致死レベルは、孢子チャレンジを不活性化するのに必要なレベルを十分上回っています。

以前に述べたように、顧客は 3.6 分の D 値 (Lot C) を拒否し、計算された Kill Time が大きすぎると述べました。3.5 分の D 値 (ロット B) の計算されたキルタイムは 35.81 分であり、このロットはクライアントに受け入れられると考えられていました。表 1 から、35.81 分の BIER でロットのいずれかが曝露された場合、4.0 分の D 値を有するものを含めて、すべての試験単位が不活性化されることに留意してください。

考察

EO BIER 規格では、指定された条件を $600\pm 30\text{mg/L}$ の EO で、 $54\pm 1^\circ\text{C}$ 、 $60\pm 10\%\text{RH}$ に維持する必要があります。また、EO ガス濃度の達成およびその後のチャンバーの排気が 60 秒以内に達成されることが必要です。このような厳密な条件は、定常状態条件の達成と矩形波致死率をもたらし、表 1 に見られるわずかな差異を観察することができます。しかし、プロセス容器内に暴露されると、抵抗性能のこれらの微妙な差異を確認することは不可能である。

そのような制限要因が保証されていない特定のパフォーマンス要件を実装しないように注意する必要があります。検証されたプロセスサイクルを監視するために BI が特定の狭い性能範囲を持たなければならないという認識は、不適切なアプローチとなります。

検証されたプロセスにおける予期しない陽性試験ユニットは、D 値が希望のレベルよりわずかに大きい BI の使用によるものではありません。陽性 BI は、重要なプロセス条件の喪失および微生物致死部分の喪失に起因します。試験成績書の D 値は、特定の一連の曝露条件に対する抵抗の正確な推定値です。サイクル開発中に影響を与える可能性があります。通常、フルサイクル生産では陽性 BI が問題というわけではありません。

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。※日本語訳は原文解釈の参考としてご利用下さい。

<https://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2014/07/Spore-News-Vol-3-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