

放射線等による液中微生物の制御

関口正之*

Control of microorganisms in a liquid by ionizing radiation

Masayuki SEKIGUCHI

Abstract The radiation resistances of the bioburden of cut-gut sutures filled with isopropyl-alcohol solution (IPA) were studied. In order to maintain the reliability of delivered doses, Ceric-cerous dosimeters (the facility standard) were calibrated with NPL alanine dosimeters and uniform dose rate areas in the gamma irradiation field were established. The doses measured for 3 batches by a Ceric-cerous dosimeter were equal to the difference within an accuracy of $\pm 2\%$ and the measured doses between Fricke-dosimeter and Ceric-cerous(E98) dosimeter agreed within about 2.3%. Recovery methods of natural bioburden from the sutures were validated by a double filtration method. Reciprocal-shaker treatment showed high recovery efficiency for the bioburden. The bioburden consisted of 5 types of spore forming bacteria and the most radiation-resistant strain was identified as *Bacillus megaterium*, which occupies 6.1% of all (473 isolates). The radiation-resistances of the bacteria were 2.33kGy in IPA solution and 2.15kGy in dried TSB. Using the distribution of radiation-resistance of the bioburden, the doses required for 10^{-2} or 10^{-6} SAL were calculated. It was found that ISO Method 1 gives a higher 10^{-6} SAL dose in spite of a lower 10^{-2} SAL dose at over 0.56 of average bioburden, compared with these for the suture.

Keywords Sterilization, Microorganism control, Ionizing radiation, Dose standardization, Bioburden, Radiation resistance, Sterilization assurance level, Cut-gut suture

1. はじめに

一般的に医療用具はドライな状態で製造される。しかし、ウェットな状態で製造されるものとしては、イソプロピルアルコール (IPA) に封入された腸線縫合糸や我が国独自の水充填型の人工腎臓透析器を挙げることができる。水充填型人工腎臓透析器に関しては、放射線滅菌に対するバイオバーデン (BB) の抵抗性分布¹⁾や共存物質の影響等の研究が行われ、医療用具の放射線滅菌の国際規格 (ISO11137 Method 1)²⁾を採用することの可能性が検討されている。

液体に溶解あるいは懸濁した医薬品の最終滅菌に放射線を利用しようとする研究も多くなされており³⁻⁴⁾、共存する医薬品の放射線分解と滅菌の達成について放射線

を利用する際の課題が明らかにされてきている。

また、滅菌条件設定時の照射試験[検定あるいは監査試験]では、放射線抵抗性評価の信頼性を確保するために目標線量に対して狭い許容線量範囲内の正確な照射と評価が要求される⁵⁾。

本研究ではIPA封入腸線縫合糸に存在するBBをモデルとして、以下の一連の実験を行った。

ガンマ線照射線量の国際標準に対するトレーサビリティの確保と校正、線源照射特性の評価
縫合糸のBB回収方法のバリデーション

BBの菌種の同定とドライ系及びウェット系試料でのBBの放射線抵抗性の評価

IPA中での滅菌条件とISO Method 1の標準抵抗性分布 (SDR) を比較することによる、滅菌検定試験と滅菌保証へ与える影響の検討。

*放射線応用技術グループ

2. 方法

2.1 線量校正及び線源照射特性の評価

2.1.1 線量計

英国国家標準とトレーサビリティが確立している英国物理研究所(NPL)製のアラニン線量計(4素子/デルリン製ガンマ線用ホルダー:NPL-ALと略す)の場合は照射後NPLに郵送しNPLの電子スピン共鳴装置で測定後、線量データを得た。Nordion Inc.製のセリックセラ線量計(CCと略す)は、電位差変化を電位差測定装置により読み取り、バッチ毎の特性係数及び照射温度、測定温度を所定の演算式に与え線量を算出した。

なお、2.1.2及び2.2.3については、2000年4月のNordion Inc.からの緊急情報⁶⁾により、+3.4%の線量補正が必要となった。当所のコバルト60線照射装置(60Co,185 TBq:98年3月末に新線源[国内の使用済み線源を回収、再加工])に関して、昨年度報告した内容⁷⁾について再評価を行った。また、フリック線量計(施設基準線量計:FRKと略す)のデータは、別途測定し作成された線量率表を参照した。

2.1.2 線量校正

NPL-ALとCCのバッチA97(A97と表す)を、照射位置を2カ所(線源から23.5cm及び19.5cm)、高さ8cmの特定ポイントに配置し、5~35kGyを照射後、CCをNPL-ALで校正した。また、CC(A93)については、前回(1995年)NPL-ALにより校正したデータとも比較した。

2.1.3 CCの線量応答の検討

99年7月1日に、NPL-ALにより最近校正されたバッチA97と過去に出荷され有効期限の切れているバッチA93、最も新しいバッチE98を同一の回転照射台に1線量区3素子づつ配置し、8線量(5~40kGy)について均一な照射を行いバッチA97を介してバッチA93とE98の二次的な校正を行った。FRKとCCを用い照射野の線量率評価の違いについても検討した。

2.2 BB回収方法のバリデーション

腸線縫合糸(クロミック,3-0:150cm)からのBB回収液には0.1%Tween 80加リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いた。回収法には、ホモジナイザー(カップ100ml:5分)、レシプロシェーカー(デュラン瓶100ml:ガラスビーズ,350往復/min,20分)、ボルテックスミキサー(試験管:20分)、超音波(ピーカー100ml,20分)の4つの方法を使用した。各方法により、未滅菌の細切した縫合糸(5mm以下)からナチュラルBB(N-BB)の回収率を求めた。

次に微生物付加法による回収率のバリデーションを行うため、*B.subtilis* IFO3134孢子の水懸濁液を超音波処理後(5分間)、その100 μ l(菌数:約100個)を細切した滅菌縫合糸試料に付加・減圧乾燥(10⁻³torr)をして、

試料を作成した。回収率のバリデーションには、N-BBと同様に4つの回収方法を採用した。なお、比較のためホモジナイザー処理を、絹縫合糸(ブレード糸2-0,40cm \times 2)について実施し、糸の種類による回収率の違いについても検討した。

回収処理後の洗出し液は、ナイロンメッシュとメンブレンフィルタを積層したろ過器でろ過し(二重ろ過法)、メンブレンフィルタ捕集区分(洗出菌:M)とナイロンメッシュ捕集区分(未洗出菌:N)に分けた。前者はトリプチケースソイ寒天(TSA)平板上で培養し、後者は0.02%TTC(トリクロロトリフェニルテトラゾリウムクロライド)を添加したTSA寒天で破砕した糸残渣と共に混雑培養を行いBBの分別測定を行った。

2.3 BBの同定と放射線抵抗性評価

分離菌の同定は、グラム染色及び孢子染色による形態観察及びBBL製簡易同定キット(クリスタルGP)を使用して行った。放射線抵抗性の評価には、分離菌をIPAに懸濁した試料(10⁷~10⁸個/ml)とトリプチケースソイブロス(TSB)の菌懸濁液(約10⁶個/20 μ l)をガラス小試験管に付加、乾燥した試料を使用した。各試料に、⁶⁰Co線を照射し、前者は生残曲線法、後者は無菌試験法を使用したフラクションポジティブ法(3本/1線量区)により放射線抵抗性(D₁₀値)を測定し、得られた結果を比較した。

次に、ISO SDRと腸線縫合糸BBの抵抗性分布の比較、ISO SDRと抵抗性を比較するため、BBの抵抗性分布から10⁻²の検定線量及び10⁻⁶SAL線量を求め特徴を解析した。

3. 結果及び考察

3.1 線量校正及び線源照射特性の評価

Nordionの通知に基づき+3.4%の補正を行った後、CCの3ロット(A93,A97,E98)の個々の測定値を比較した結果、 \pm 2%の変動範囲内にほぼ収まっていた(図1)。

しかし、有効期限を超過したCC(A93)はNPL-ALに比べ平均で4%を超える値を示した。また、CC(A97,E98)の線量値はNPL-AL評価線量に対して平均で2.6%及び3.1%程度高い値を示した。

同様に、FRKとCC(E98)によるガンマ線照射野の線量率分布は、線源から3.5cmの位置で前者が後者より約1.4倍高い値を示し、19.5cmの位置以降では線量計サイズによる誤差要因が小さくなり1.023倍で一定となった(図2)。

3.2 BB回収方法のバリデーション

BB回収方法として二重ろ過法による評価方法を適用するため、絹縫合糸(ブレード)を試料にホモジナイザー法で回収試験を行った。表1に未滅菌試料のN-BBについての回収率を、表2に*B.subtilis*孢子を人為的に付加し

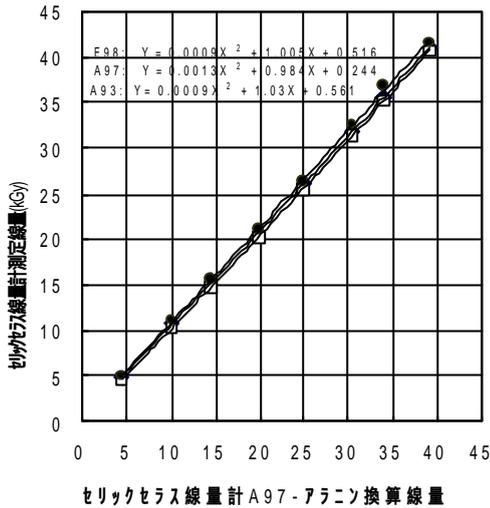


図1 セリクセラス計測値のアラン線量計による校正

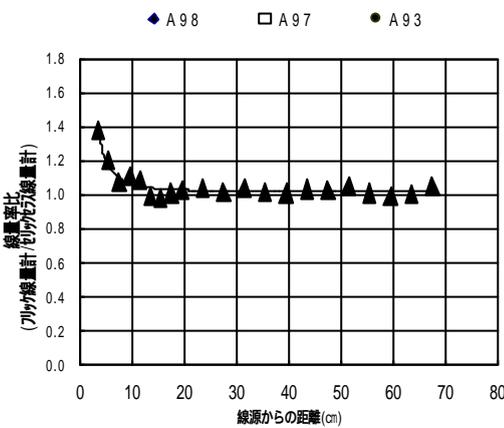


図2 フリッケ及びセリクセラス線量計(E98)によるコバルト-60線源の線量率の評価

た試料についての回収率を示す。いずれの場合も、絹縫合系では、メンブレンフィルタ回収菌数Ⅲがナイロンメッシュ回収菌数Ⅳに比べ著しく大きく、糸に付着した菌が十分に洗い出されることがわかった。

次に、腸線縫合系について、4つの回収処理法についてN-BBと付加菌の回収率を比較した結果を表3に示す。微生物付加法で得た平均回収率(M/微生物付加数)%はN-BBの平均回収率M/(M+N)%より高い値を示した。特に、ボルテックスミキサー法は86.4%の回収率を示した。しかし、4つの回収方法とも、N-BBの平均回収率M/(M+N)が10%以下の低い回収率であった。N-BBの大半が糸内部に存在することが回収を困難にしていると考えられた。このことは、絹縫合系と異なり人為的な微生物の付加がN-BBの存在状態を再現していないことを意味しており、回収方法のバリデーションにおいて注意すべき課題である。試験において、腸線縫合系が洗い出し液で膨潤し時間経過とともに粘着性を持つ傾向が認められ、ボルテックスミキサーでは糸の破碎は進むものの相互に絡み合いナイロンメッシュシートで捕集後の培地埋め込みによる菌数測定を一層困難とした。

表1 絹縫合系の回収率：ホモジナイザー法
(ナチュラルバイオバーデン：n=10×10試行)

試行数	メンブレンフィルタ回収菌数(M)	ナイロンメッシュ回収菌数(N)	総回収菌	総回収率
			(M+N)	(M)/(M+N)%
1	19	2	21	90.5
2	9	0	9	100.0
3	18	1	19	94.7
4	9	1	10	90.0
5	104	4	108	96.3
6	123	15	138	89.1
7	17	0	17	100.0
8	16	2	18	88.9
9	31	0	31	100.0
10	125	6	131	95.4
平均値	47.1	3.1	50.2	94.5

表2 絹縫合系の回収率測定：ホモジナイザー法
(微生物付加法：B.subtilis IF0 3134 孢子)

			総回収菌	総回収率
			(M+N)	(M+N)/T %
1	89	0	89	87.3
2	93	0	93	91.2
3	101	0	101	99.0
平均値	94.3	0	94.3	92.5

塗布菌数 = 102 cfu

3.3 BBの同定と放射線抵抗性評価

腸線縫合系より分離した菌は全て孢子形成菌で、特徴的微生物について同定を行い、放射線抵抗性を調べた結果を表4に示す。多くの分離菌で、TSB懸濁乾燥試料は、IPA懸濁試料より高いD₁₀値(平均で約12%高い)を持つ傾向が認められた。

他の菌株に比べ*B.megaterium*の2菌株はIPA中でも高い放射線抵抗性を示し、ほぼTSB懸濁乾燥試料とほぼ同等の抵抗性を示した。また、*B.megaterium*の1菌株がIPA中での最大D₁₀値(2.33kGy)を示した。

次に、得られた分離菌477菌株について、コロニー性状細胞形態等より最大抵抗性菌が6.1%(29菌株/477菌株)の相対頻度を持つと推定した。同様に残る菌群も、D₁₀値 = 2kGy及びD₁₀値 = 1.5kGyのものがそれぞれ0.21%及び93.71%の頻度を持つように振り分け、腸線縫合系BBの抵抗性分布を作成し、ISO SDRの抵抗性分布と生残曲線に表示し比較した(図3)。この図は、ISO SDRが低線量側では腸線縫合系BBの抵抗性分布とほぼ同一であるにもかかわらず、高線量側では腸線縫合系BBよりも高い抵抗性を持つことを示している。

表5に、製品の平均BBと無菌性保証レベル(SAL)を達成するのに必要な線量の関係を示す。

この表から、ISO SDRは、平均BBが0.063以上において腸線縫合系BBの10⁻⁶のSAL線量を上回り、安全サイドの滅菌線量設定が可能であることがわかる。しかし、ISO 11137 Method 1の滅菌設定法において滅菌検定及び滅菌監査に用いられる10⁻²のSAL線量は、平均BB =

表3 B B回収方法の比較腸線縫合糸

	ナチュラル バイオバーデンの 回収率(%) *1			微生物付加法 (B.subtilis孢子) の回収率(%) *2		
	試料 数	平均 回収率	SD	試料 数	平均 回収率	SD
ホモジナイザー	15	7.6	6.0	6	68.0	13.8
レシプロシーカー	10	7.5	8.7	6	55.8	13.6
ホルテックスミキサー	10	5.8	30.4	6	86.4	11.7
超音波	10	1.6	1.0	6	63.4	8.7

*1: ((M/(M+N)×100), *2: (M/微生物付加菌数)×100(%)

表4 腸線縫合糸からの分離菌と放射線抵抗性

回収率	D ₁₀ 値 (kGy)	
	フクシヨウボジテイフ法	生残曲線法
	TSB懸濁乾燥試料	IPA懸濁試料
<i>B.cereus</i>	1.86	1.52
<i>B.pumilus</i>	1.48	1.38
<i>B.pumilus</i>	1.41	1.44
<i>B.subtilis</i>	1.34	1.30
<i>B.subtilis</i>	1.41	1.38
<i>B.licheniformis</i>	1.33	1.25
<i>B.licheniformis</i>	1.49	1.24
<i>B.licheniformis</i>	2.16	1.32
<i>B.subtilis</i>	1.65	1.22
<i>B.megaterium</i>	1.94	1.90
<i>B.pumilus</i>	1.93	1.53
<i>B.licheniformis</i>	1.15	1.13
<i>B.licheniformis</i>	1.19	1.23
<i>B.licheniformis</i>	2.18	1.14
<i>B.cereus</i>	1.73	1.32
<i>B.megaterium</i>	2.15	2.33

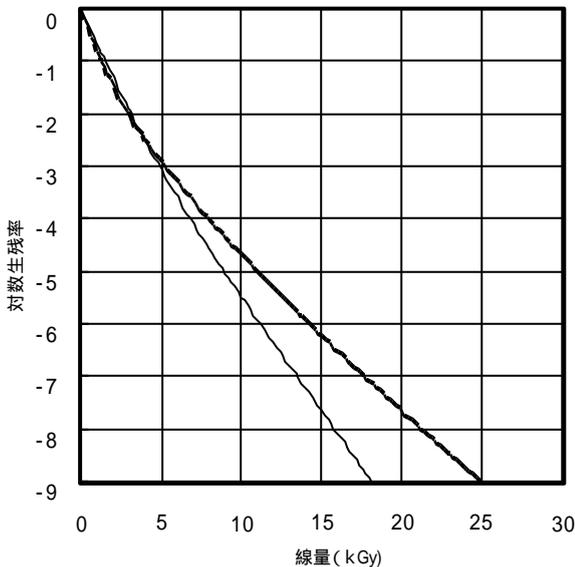


図3 ISO SDRと腸線縫合糸BBの抵抗性の比較

— ISO SDR - - - 腸線縫合糸BB

2.99以下の場合に腸線縫合糸BBで求めた値より小さくなるという逆転現象を示した。

平均BBが0.1の場合、SDRに比べ腸線縫合糸BBのSAL=10⁻²線量は23%大きくなり、ISO 11137が規定する線量照射許容誤差(±10%)をも逸脱しているため、ISO Method1で検定試験を行う場合に不合格となる確

率が高くなると考えられる。

4. まとめ

線量計の校正と放射線照射場再評価を行い、CCはNPL-AL評価線量に対してよい一致を示した。CC(E98)とフリッケ線量計による照射場の線量率分布の評価では、Nordion通知による補正を行い既報告に比べ測定値の差が改善された。

液中微生物の放射線による制御のモデルには、IPA封入腸線縫合糸を選び、N-BB及び微生物付加法による回収、及び評価法を検討した。腸線縫合糸に微生物を付加して求めた回収率は80%を越える例もあったが、N-BBの回収は、4つの処理方法とも10%以下にとどまり、絹縫合糸の場合と明確な対照を示した。N-BBは全て*Bacillus*属細菌でTSB懸濁乾燥試料とIPA懸濁試料より平均で12%高いD₁₀値を示し、IPA試料の最大D₁₀値は*B.megaterium*の2.33kGyであった。また、ISO SDRは腸線縫合糸BBより高い抵抗性を持つが、平均BBが2.99未満では検定線量試験(SAL=10⁻²)の線量が腸線縫合糸BBより小さくなるという逆転現象が認められた。

表5 無菌性保証レベル(SAL)と放射線量の関係(kGy:表中)

平均 BB: cfu	ISO SDR		腸線縫合糸BB	
	SAL=10 ⁻²	SAL=10 ⁻⁶	SAL=10 ⁻²	SAL=10 ⁻⁶
0.063	1.0	10.4	1.2	8.5
0.10	1.3	11.0	1.6	8.9
1.05	3.0	14.3	3.2	11.2
2.99	4.0	15.8	4.0	12.3
10.69	5.3	17.8	4.9	13.6
104	8.0	21.3	6.8	15.9
1021	11.0	24.9	9.0	18.2

参考文献

- 1) 平成7年度 新医療技術開発研究事業報告書
医療機器センター, 医療用具の滅菌保証の評価の基礎に関する研究, 新谷英晴, 中村晃忠, 武久正昭, 佐藤良成, 陸 兆新, 田部井雅枝, 関口正之, 越川 富比古, 小林敏和, P152-161
- 2) ISO 11137, "Sterilization of health care products - Requirements for validation and routine control - Radiation sterilization"(1994).
- 3) M.L.Botelho, M.C.Godinho, M.Partidario and M. E. Andrad : Radiat.Phys.Chem,42,605-609(1993)
- 4) T.A.DuPlessis and I. C. Rosekilly : Radiat. Phys. Chem., 46, 611-615 (1995).
- 5) Panel on Gamma & Electron Irradiation Guidance Notes on the Dosimetric Aspects of Dose-setting Methods, Dec (1996).
- 6) Investigation Report - Calibration of Ceric-Cerous Dosimeter (2000 April 27) Nordion. Inc.
- 7) 関口正之: 東京都立産業技術研究所研究報告 第2号, P122-125 (1999).

(原稿受付 平成12年7月25日)