

技術ノート

キット製品のバイオバーデン回収率評価における課題

Research for the recovery efficiencies of bioburden from a medical product kit

関口正之*

1. はじめに

複数のコンポーネントから構成されるディスプレイキット医療製品は、病院での多様な手術への迅速な対応と中材業務の合理化という点から需要が伸びてきている。

しかし、滅菌時には、各コンポーネントの材質への影響、バイオバーデン(BB)評価に特別の配慮が必要となる。

微生物付加法による回収率測定において、管状構造や閉鎖的な構造部品を持つキット製品では、微生物付加の完全性(減圧乾燥処理による微生物飛散防止)とBB回収方法や代表するコンポーネントの選定が重要となる。そこで、回収率測定ではサフラニン色素を用いた予備試験を行い、実際の測定ではナイロンメッシュフィルタ(NMF)とメンブレンフィルタ(MB)を組み合わせた二重ろ過法を適用し、その有効性を検討した。

2. 方法および結果

2.1 試料

注射筒、カテーテル、フィルタ、ニードルの各部品を組み立てて使用する特殊な麻酔用カテーテルキットを試料とした。なお、BB回収率を評価する際に、注射筒は外筒、吸子、ゴムに分解、それぞれ適切な大きさに切断した。カテーテルは5mm以下に、ニードルは3つに切断した。またフィルタは完全な形のものと同様に切断したものについて検討した。なお、試料の洗出しには、0.1% Tween 80を含むりん酸緩衝生理食塩水(PBS: pH 7.2)を使用した。

2.2 サフラニン色素を用いた予備試験

0.125%サフラニン溶液(可溶性デンプン1%添加)の20~50 μ lを回収が困難と考えられるニードル、カテーテルの管腔、フィルタの閉鎖的部分に付加、 10^{-3} torrで20分間又は弱減圧下一昼夜放置し、試料を作成した。

色素濃度の決定は、最大吸収波長(517nm)での吸光度測定により行い、塗布量に対する回収率を求めた。回収方法と回収容器は、超音波処理(28kHz,100W)、平底培養試験管(150ml)、レシプロシェーカー処理(水平振とう:200cycle/分)、広口三角フラスコ(500ml)、レシプロシェーカー処理(縦振とう:300 cycles/分)、広口ガラス瓶(500ml)、いずれも洗出液はPBSを用いた。

色素を用いたシミュレーションは、複雑な箇所への微生物付加の適正な減圧乾燥条件と回収条件の決定、回収

困難な部品(フィルタ)の特定に有効であった。回収処理方法では、他の方法に比べ超音波処理の色素回収率が高かった。また、超音波処理の場合、フィルタのOUT側に付加した色素の回収は、半割により著しい改善が認められた。(表1)

表1 回収処理方法と色素回収率

回収方法	処理時間	フィルタ	フィルタ(半割)	ニードル	カテーテル
超音波照射	1min	0.09	0.14	0.66	0.84
	5min	0.13	0.20	0.90	0.93
	10min	0.15	0.32	0.89	1.00
	20min	0.22	0.67	0.94	0.99
水平振とう	10min	0.11	0.19	0.05	0.95
	20min	0.17	0.23	0.13	1.00
縦振とう	10min	0.21	0.16	0.42	0.87
	20min	0.24	0.19	0.75	0.92

(色素塗布量を1.00とした場合の相対回収率で示す)

2.3 微生物付加法による回収率測定

*B.subtilis var nigar*及び*Asp.nigar*胞子を回収の指標菌として用い、約40~100個/20~50 μ lを塗布した。

2.3.1 コンポーネント単位での評価

注射筒パレル、注射筒吸子ゴム、カテーテル、ニードル、フィルタ(半割及び全体、メンブレン単独)を対象として、一定菌数の指標菌胞子を色素の回収試験と同様の条件で付加・乾燥し、回収用の試料を作成した。洗出し方法と使用容器は、超音波処理(28kHz,100W:10分)+レシプロシェーカー処理(20分)、広口ガラス瓶(450ml)、超音波処理(28kHz,100W:30分)、広口三角フラスコ(500ml)の2つの方法と容器で行った。

洗出し処理後、PBSを積層ろ過装置(MB[孔径:0.45 μ m]の上にNMF[孔径:60 μ m]を積層)に流し込み吸引ろ過を行い、3回PBSで容器内を洗浄ろ過した。MBはトリプチケースソイ寒天培地(TSA)平板上に載せ32で培養し、生育したコロニー数を洗出された菌(回収菌)とした。また、容器内に残ったコンポーネントとNMF上に捕集されたコンポーネント残さは、20ppmのトリクロロトリフェニルテトラゾリウムクロライドを含むTSA培地で埋め込み同一の条件で培養した。の結果をそれぞれ表2,3に示す。

いずれの場合もフィルタ(半割)が最も菌の回収率が低くなり、回収方法による差は小さかった。(但し、変動係数は超音波処理のみの方が小さくなった)

*放射線応用技術グループ

表2 法による部品のBB回収率の測定, 試行数 N=5

部品名	ケーテル	フィルタ (半割)	注射筒 (パレル)	注射筒 (吸子)	ニードル
MB平均 回収菌数	51.5 (7.5)	46.8 (11.2)	56.4 (6.2)	52.8 (5.3)	45.6 (4.8)
NMF平均回 収菌数	6.8	+	+	+	+
塗布菌数	77.0	77.0	77.0	77.0	71.3
回収率(%)	66.9	60.8	73.2	75.3	71.2

回収率 = (MB平均回収菌数) / 塗布菌数 : *B.subtilis*
(超音波処理:10分 + レシプロシェーガー処理:20分),
+印は拡散コロニーのため菌数測定不能, ()内は変動係数を示す。

表3 法による部品のBB回収率の測定, 試行数 N=5

部品名	ケーテル	フィルタ (半割)	注射筒 (パレル)	注射筒 (吸子)	ニードル
MB平均 回収菌数	58.2 (10.4)	47.5 (5.4)	51.2 (8.4)	64.3 (13.2)	51.2 (6.7)
NMF平均回 収菌数	4.3	+	+	+	+
塗布菌数	85.3	85.3	85.3	85.3	72.0
回収率(%)	68.2	55.7	60.0	75.3	71.2

回収率 = (MB平均回収菌数) / 塗布菌数 : *B.subtilis*
(培養試験管 + PBS100ml, 超音波処理:30分)
+印は拡散コロニーのため菌数測定不能, ()内は変動係数を示す。

表4 フィルタ(未分割)のBB回収率の測定, 試行数N=5

洗出し処理	超音波30分 PBS 20ml 押出	減圧脱気 超音波30分 PBS 20ml 押出	超音波30分 PBS 20ml 押出
指標菌	<i>B.subtilis</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Asp.nigar</i>
超音波洗液 回収菌数	0.2	1.6	0.4
押出処理 回収菌数	3.0 (4.6)	4.8 (3.3)	3.8 (3.1)
塗布菌数	85.3	85.3	122
総合 回収率(%)	3.5	5.6	3.1

(培養試験管 + PBS 100ml : 菌はOUT側に付加, ()内は変動係数)

表5 メンブレンフィルタ素材とBB回収率, 試行数 N=5

メムブレ種 類	ポリアミド IN側*	ポリアミド OUT側*	セルロース ナイトレート	セルロース 混合エステル	ポリアミド (他社)
MB回収 菌数	30.0	32.4	11.0	22.4	18.0
培地埋込 測定菌数	5.8	22.0	13.8	7.0	8.4
塗布菌数	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0
回収率(%)	81.1	87.6	29.7	60.5	48.6

回収率 = (MB回収菌数) / 付加菌数, *本製品
(超音波処理:30分, *B.subtilis*)

表6 キット製品全体からの回収率の測定, 試行数N=5

処理容器	広三角フラスコ(500ml) + PBS 150ml		広口ガラス瓶(500ml) + PBS 150ml	
処理方法	超音波処理 30分		超音波処理10分 + 縦振とう処理20分	
塗布 微生物	<i>B.subtilis</i>	<i>Asp.nigar</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Asp.nigar</i>
平均MB 回収菌数	45.3 (5.2)	43.2 (4.6)	52.0 (11.4)	65.2 (5.4)
塗布菌数	80.7	80.7	106.3	95.7
回収率(%)	56.1	53.5	48.9	68.1

*微生物は, 回収率の低いフィルタ(半割)に付加し, 他の全
ての部品が共存する条件で回収処理を実施

2.3.1 フィルタの回収特性評価

ハウジング内にメンブレンが組み込まれたフィルタユニット(未分割)からの菌の回収率を, 減圧脱気と超音波処理, 注射筒によるPBS(20ml)の押出処理を組合せ求めた。

回収前の減圧脱気処理や超音波回収, PBS押出しによってもフィルタのOUT側に付加した菌の回収率は10%以下の低レベルであり, 未分割フィルタからの菌の回収は困難であった(表4)。また, メンブレンの菌の保持能力を検討するため, 各種のメンブレンフィルタについて超音波処理による菌の回収率を比較した(表5)。その結果, 本製品のフィルタのメンブレン(ポリアミド製)ではIN側及びOUT側への菌の付加による回収率の差は小さく比較的高い回収率(80%以上)を示した。しかし, OUT側に付加したセルロースナイトレート製メンブレンの菌回収率は30%程度にまで低下した。超音波処理後のメンブレンに残存する菌の状態を写真1に示す。以上からフィルタのハウジングの構造とメンブレンフィルタの微生物保持能力が相乗的に菌の回収効率に影響を与えていることがわかった。

2.3.2 キット製品全体での回収率測定

コンポーネントの回収率試験で最も回収率の低かったフィルタを指標コンポーネントとして, 菌の付加試料(半割)を作成し, キットの他のコンポーネントと一緒にして回収処理を行った。超音波処理(30分)は, 細菌・真菌ともに50%以上の回収率が得られ, 変動係数も超音波と縦振とうの組合せ処理より小さくなった。以上から, 回収効率と操作の容易さから超音波処理の採用が適当と判断した(表6)。

3. まとめ

色素による前試験から, 微生物付加及び回収方法などの選択に関して有益な知見を得た。微生物付加法での回収率は, 超音波処理(30分)単独でもレシプロシェーカーを組み合わせた方法と同等の回収率を示した。但し, 各コンポーネントの中で半割にしたフィルタが最も回収率が低く, 未分割のフィルタについては減圧脱気/超音波処理, PBSの押出処理を行っても菌の回収が困難であった。フィルタの材質やハウジングが回収率に影響を与えると推定した。

また, キット製品全体からの細菌及び真菌の回収率は超音波処理により共に約50%を達成できた。

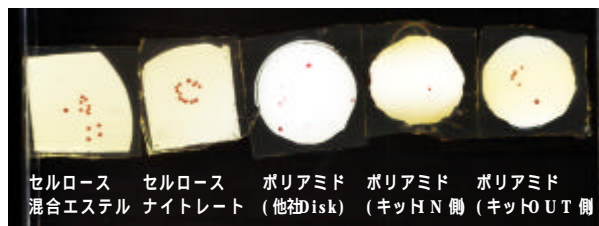


写真1. メンブレンに残留する菌の状態
(超音波処理後)

(原稿受付 平成12年7月25日)

