

# 滅菌保証と微生物試験 (基礎編)

2020年10月6日

滅菌研究センター 福山 貞伸



# 本日の内容

- 微生物について
- 微生物試験
- 無菌性の試験、無菌試験
- バイオバーデン試験、生菌数試験
- 微生物の特性付け、微生物の同定
- 滅菌について

# 微生物について



# 微生物について

目で確認できないくらい小さな生き物

## 微生物

### 菌

細菌  
(bacteria)

納豆菌  
乳酸菌  
大腸菌

真菌  
(fungal)

アオカビ  
パン酵母  
しいたけ

### 原生動物系

ゾウリムシ  
ミドリムシ  
アメーバ

### ウイルス

ノロ  
コロナ  
インフルエンザ

# 微生物について

医療機器を滅菌するときに対象としている

微生物は、**細菌**と**真菌**

原生動物系やウイルスは対象外

医療機器、製薬、化粧品業界では、  
**バイオバーデン (bioburden)** と呼ばれている。



# 細菌と真菌

細菌と真菌の違い（特殊なタイプを除く）

	細菌 原核生物 (DNAがむき出し)	真菌 真核生物 (DNAが核に収納されている)	
		カビ	酵母
大きさ	直径 1 $\mu\text{m}$	太さ 2~10 $\mu\text{m}$	直径 3~4 $\mu\text{m}$
増殖方法	分裂	菌糸形成	出芽
コロニー形成速度	24~48時間	1~2週間	24~72時間
培養条件	好気・嫌気 30-37°C	好気 20-30°C	好気・嫌気 25-35°C

微生物試験を実施する場合は、この違いを考慮する必要がある。

# 細菌や真菌の生息場所

細菌や真菌は、地球上のあらゆる場所に存在している

- 0℃以下の低温、100℃以上の高温環境
- 強酸性、強アルカリ性の環境
- 大気中、水中、地中
- 人や動物の表皮や体内

# 医療機器の製造環境

## 医療機器の製造環境

- ・クリーンルーム内での作業
- ・作業従事者の衛生管理の徹底
- ・作業のオートメーション化 等

しかしながら・・・

細菌や真菌による汚染を防ぐことは難しい

だからこそ、

滅菌が必要



# 滅菌する時に注意が必要な微生物

## 芽胞形成菌

生育環境が悪化した時に、芽胞を形成する菌

*Bacillus*属、*Clostridium*属

## 芽胞

熱や薬剤に強く、数分間の煮沸やアルコール消毒では死滅しない。

## 滅菌法との相性が悪い菌

滅菌法毎に滅菌しやすい菌（相性が良い）、滅菌しにくい菌が（相性が悪い）存在する。

例）放射線滅菌：*Deinococcus radiodurans*

# 微生物試験



# 滅菌する時に必要な微生物試験

- ・ 製品に微生物が付着しているかどうかを調べる試験

無菌性の試験、無菌試験

- ・ 製品に付着している微生物の数を測定する試験

バイオバーデン試験、生菌数試験

- ・ 微生物の種類を調べる試験

微生物の特性付け、微生物の同定

これらの試験を組み合わせて滅菌を保証する。

# 無菌性の試験 無菌試験



# 無菌性の試験、無菌試験

製品に微生物が付着しているかどうかを調べる試験

## 無菌性の試験 (ISO 11737-2)

滅菌されていない製品に対して実施される試験

無菌レベルを確認するために実施

## 無菌試験 (日本薬局方)

滅菌された製品に対して実施される試験

無菌であることを確認するために実施

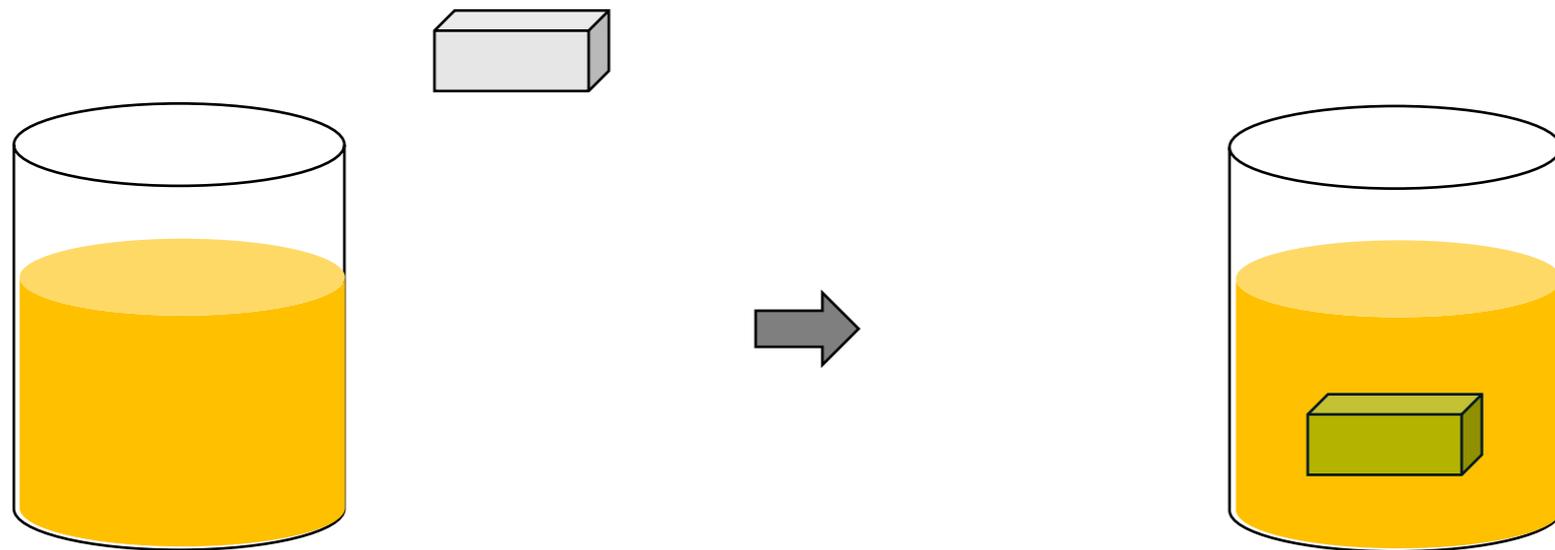
例) 高圧蒸気滅菌    121℃    5分    滅菌されていない  
                                 121℃    20分    滅菌



# 無菌性の試験操作

製品を培地に直接浸せき

製品を液体培地に投入し、製品全体を培地の中に沈める

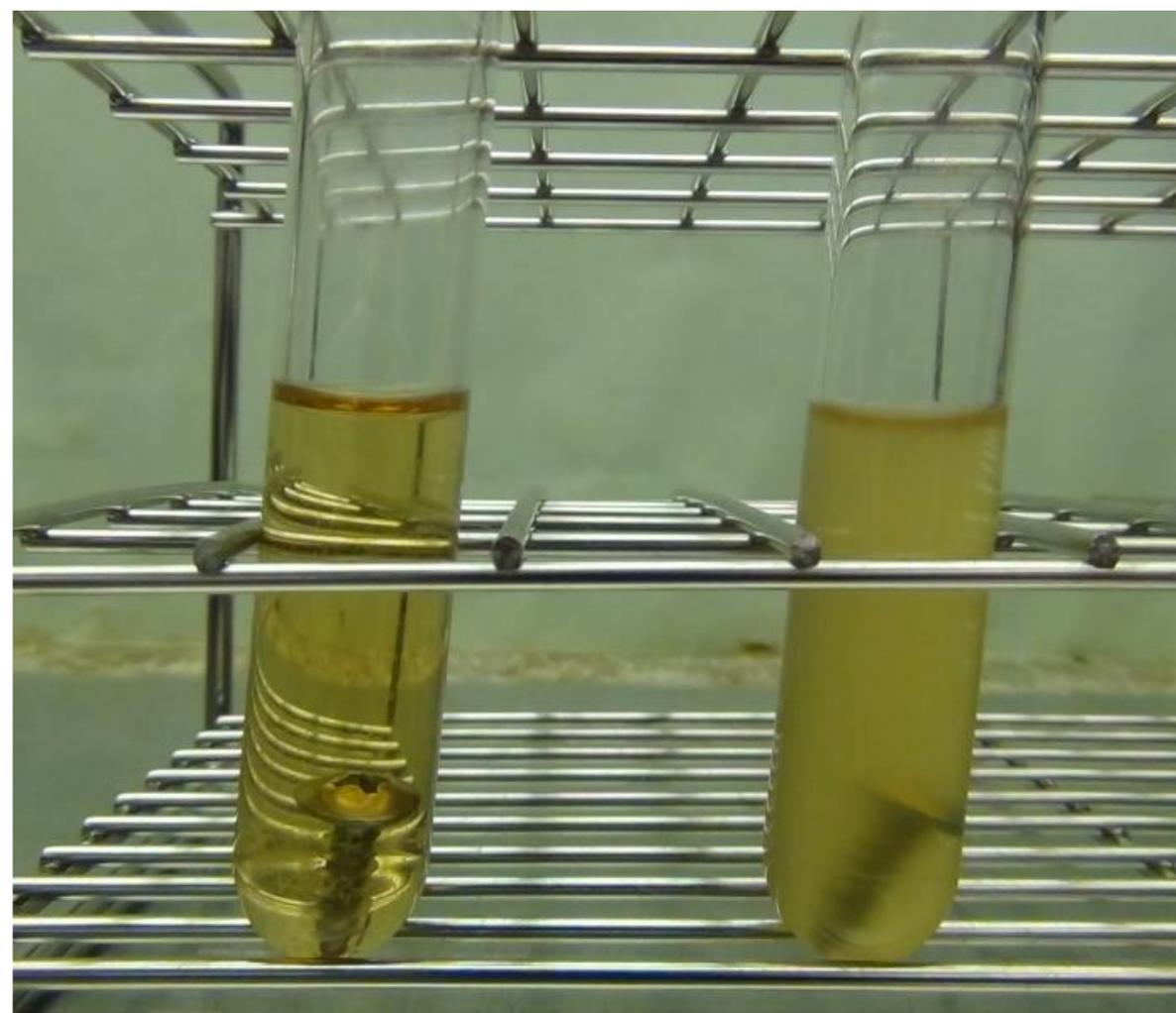
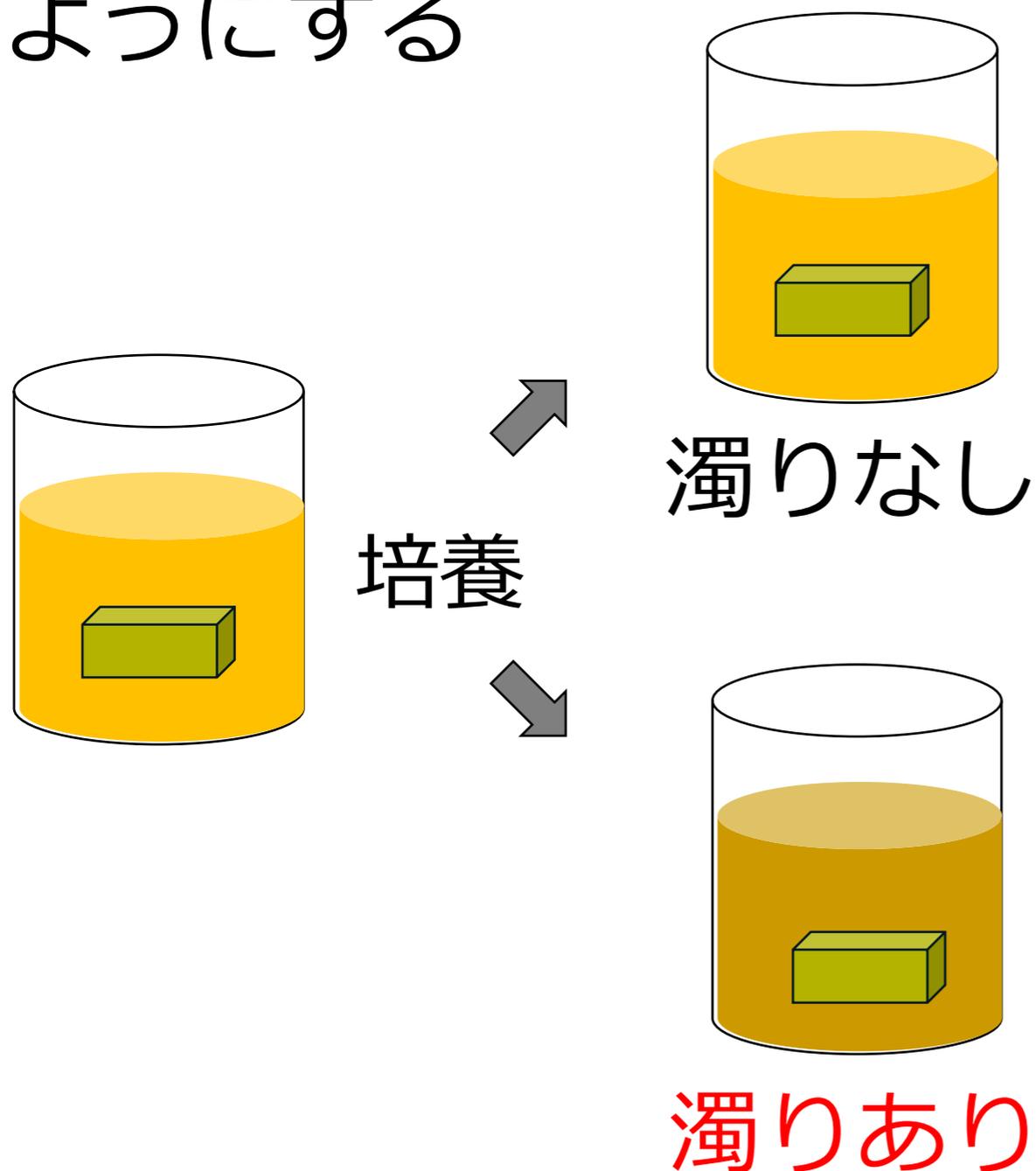


液体培地の中に沈める

# 培養

28-32℃ 14日間 (ISO 11737-2参照)

菌を増殖させ、培地を濁らせることで目視確認できるようにする



濁りなし

濁りあり

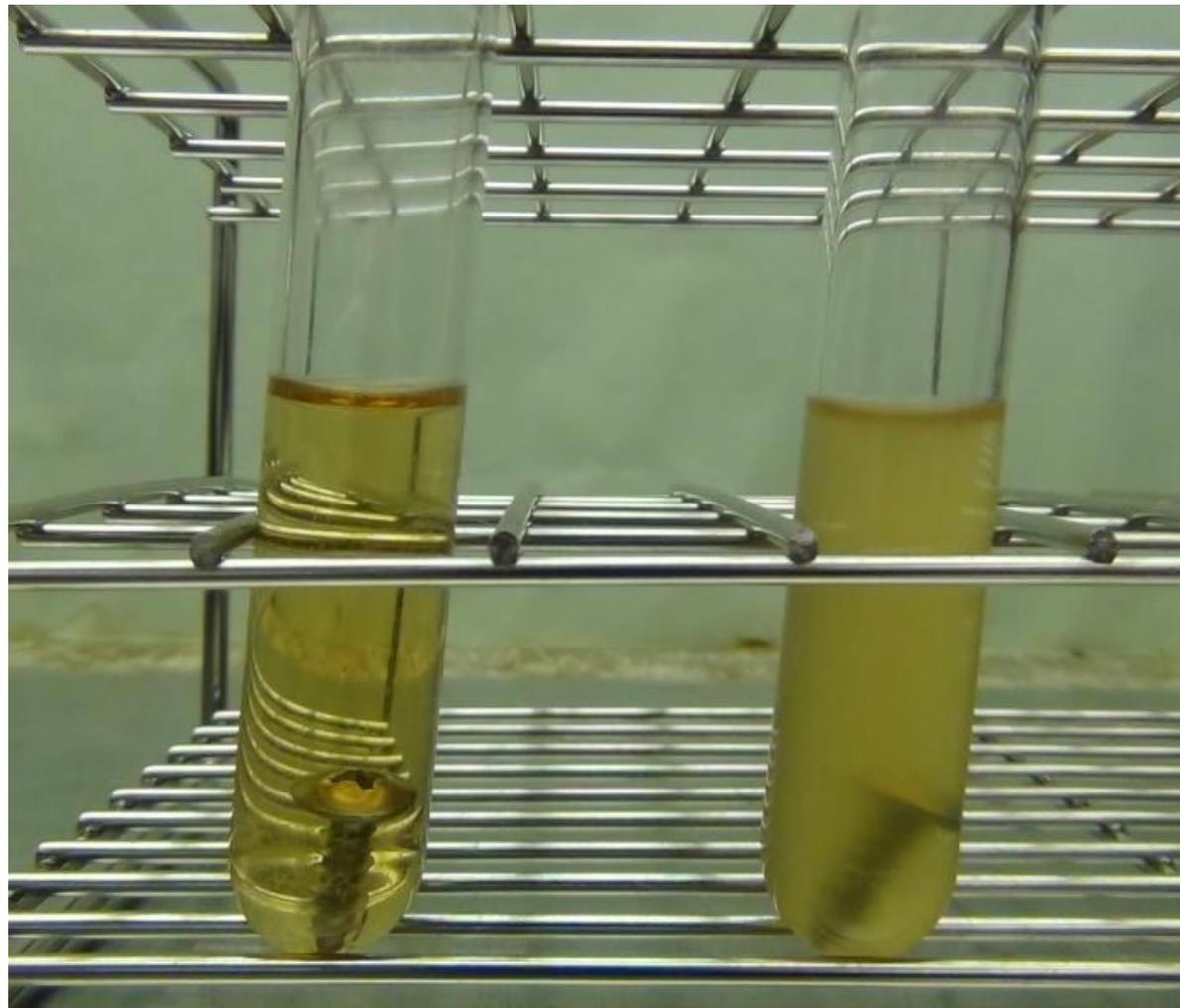
# 判定

菌の存在が確認される

陽性

菌の存在が確認されない

陰性



陰性

陽性

## 菌の存在

- 培地の濁り
- 培地の色の変化 等

# バイオバーデン試験 生菌数試験



# バイオバーデン試験、生菌数試験

製品に付着している**微生物の数を測定する**試験

バイオバーデン試験 (ISO 11737-1)  
生菌数試験 (日本薬局方)

医療機器の場合

培養条件は決められているが、様々な材質の製品があるため、材質ごとに最適な試験方法を選択する必要がある。

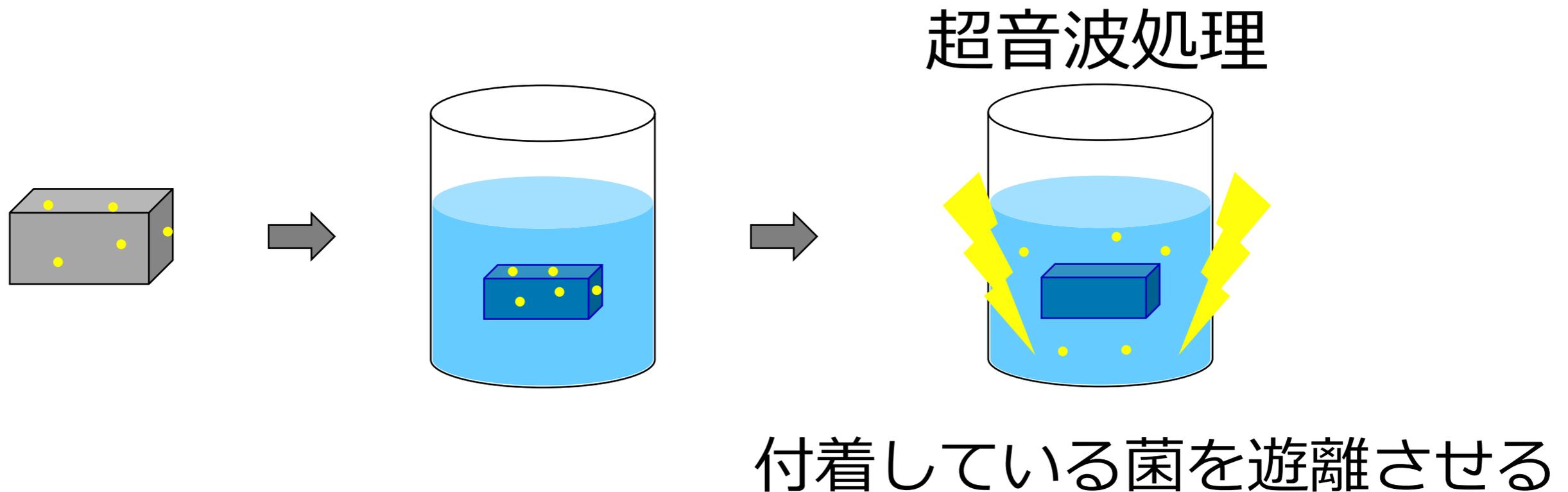
例) 金属製品：超音波法      繊維製品：ストマック法



# バイオオーバーデン試験操作

## 微生物の取り出し（超音波法）

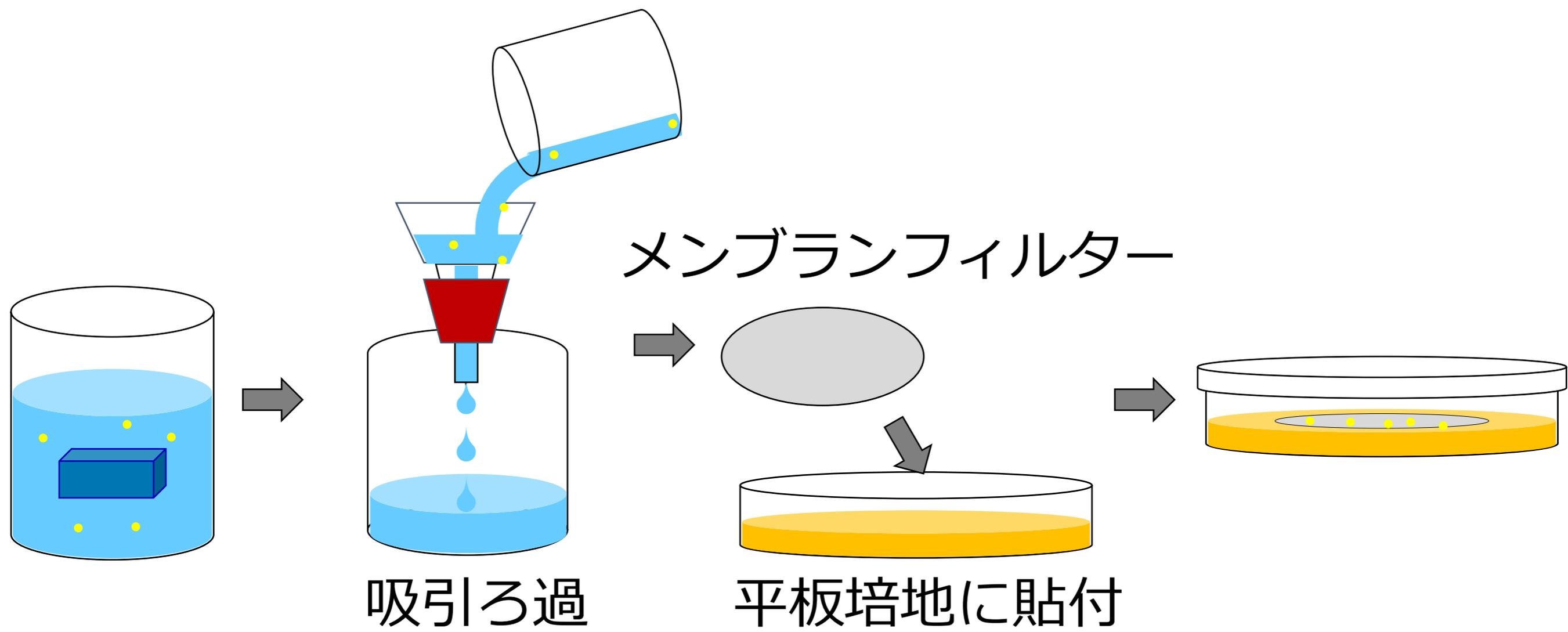
製品を超音波処理し、製品に付着してる菌を洗い出す



# バイオオーバーデン試験操作

## 膜ろ過法

洗浄液をメンブランフィルターでろ過する  
ろ過後、メンブランフィルターを寒天培地に貼付する

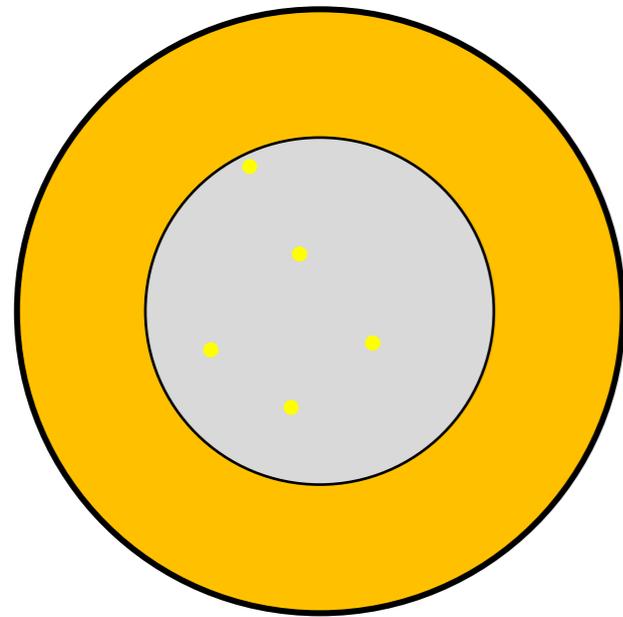
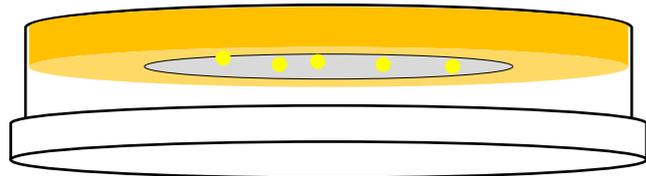


# 培養

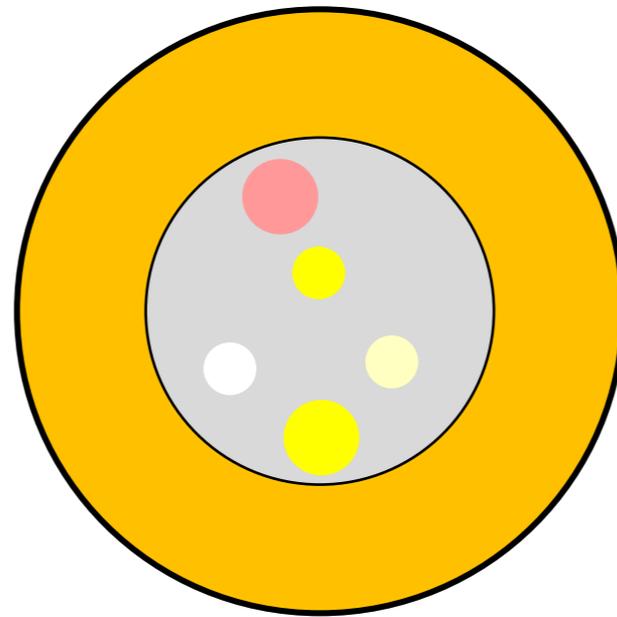
細菌：30-35℃ 3~7日間 真菌：20-25℃ 5~7日間

(ISO 11737-1参照)

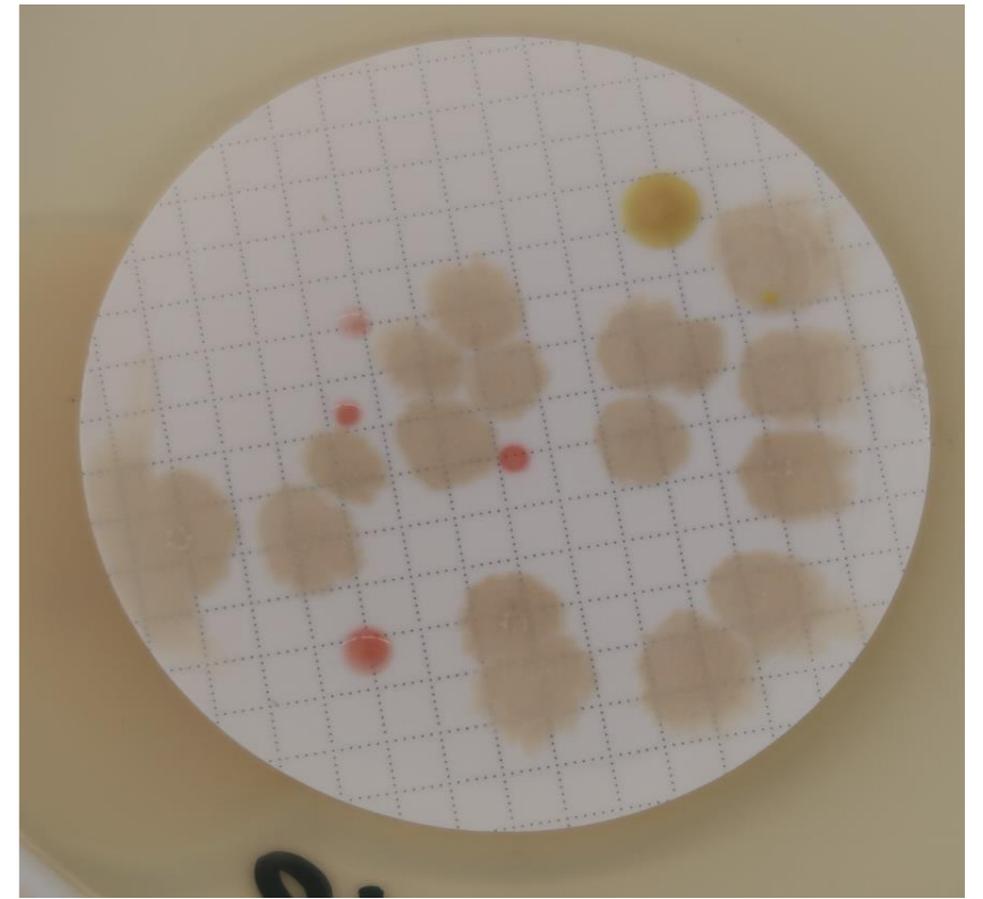
コロニを形成させ、目視確認できるようにする



→  
培養



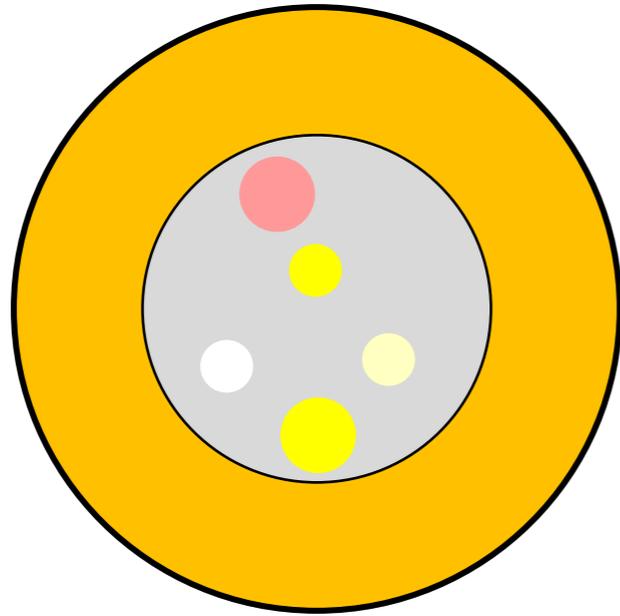
コロニを形成



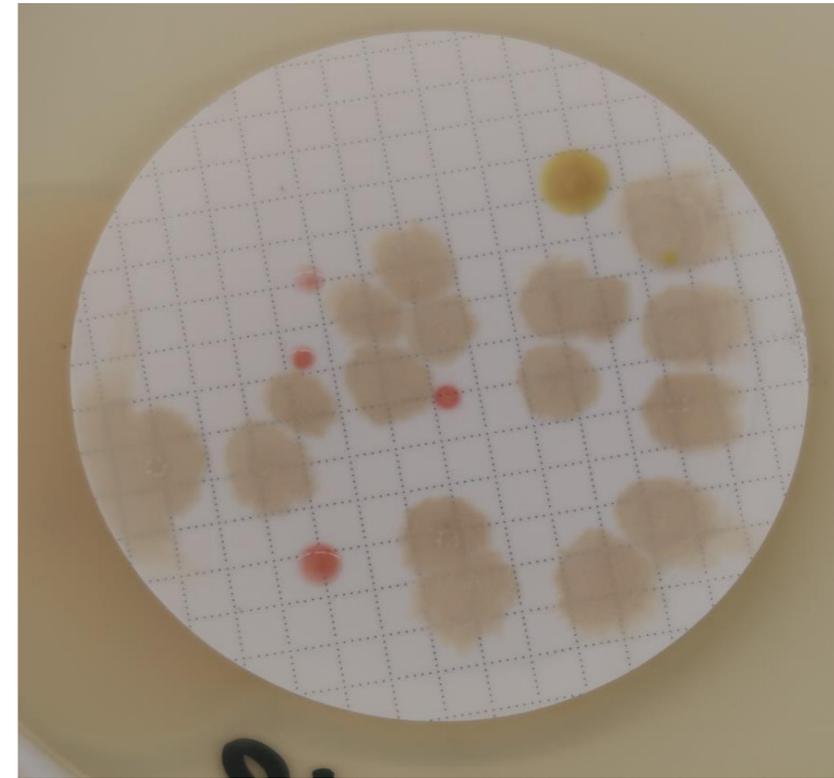
メンブランフィルター  
上のコロニ形成

# 計測

形成したコロニ数を計測する



5 CFU



22 CFU

コロニ形成単位 (Colony forming unit : CFU)

1個の菌から1個のコロニが形成されるということに基づいており、**コロニ数 = 菌数**とみなしている

# 微生物の特性付け 微生物の同定



# 微生物の特性付け、微生物の同定

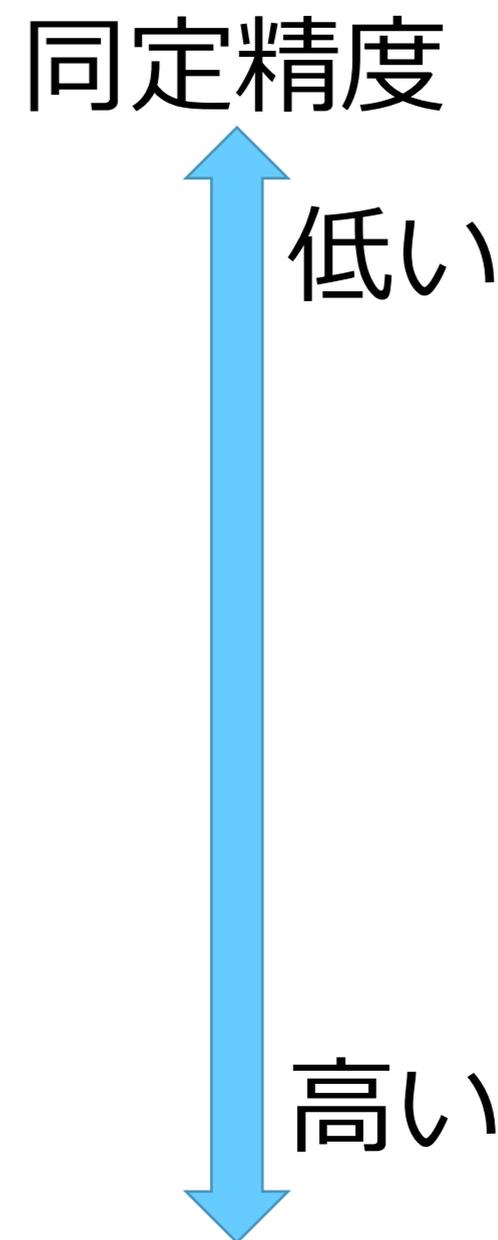
微生物の特徴や種類を調べる試験

## 微生物の特性付け (ISO 11737-1)

- コロニ形態
- 細胞形態
- 分染
- 選択培地
- 生化学的特性
- **プロテオーム法**
- **遺伝子型分析**

見た目で判定  
大まかな分類

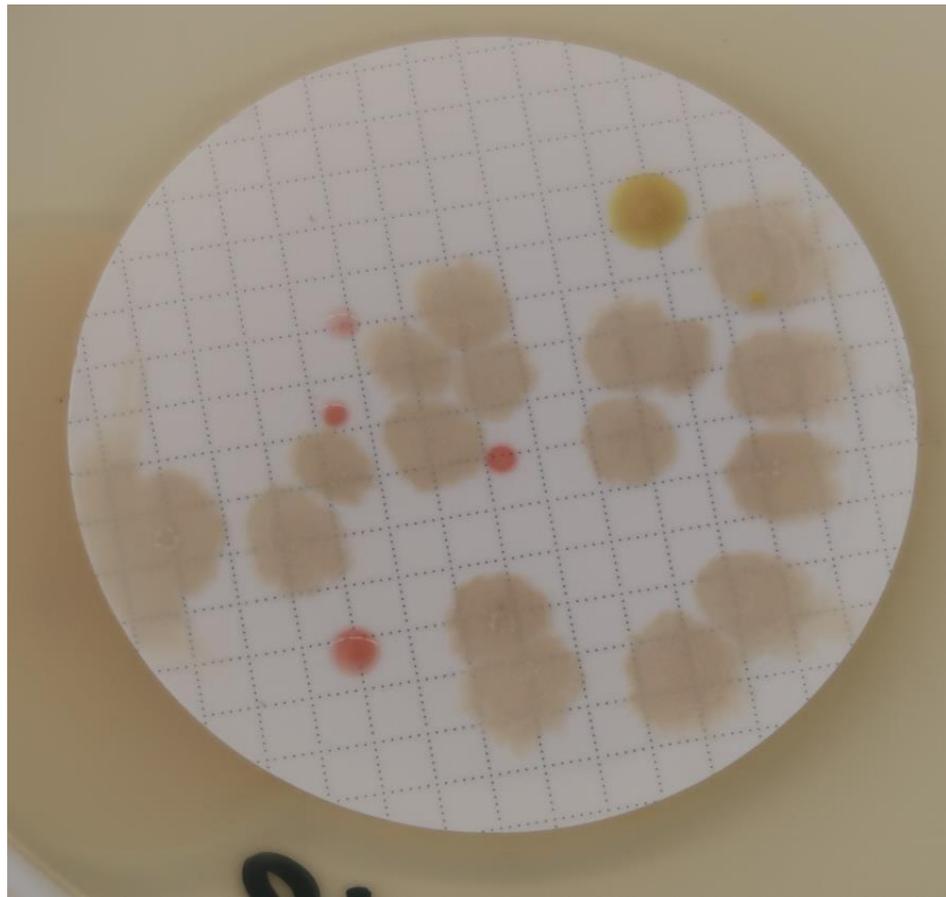
結果を数値化  
菌名を推定



# 遺伝子型分析とプロテオーム法の比較

	対象	結果	精度	測定時間
遺伝子型分析  DNAシーケンサ	細菌 カビ 酵母	属・種	良い	8~10 時間
対象が広く、確実な同定が可能				
プロテオーム法  MALDI TOF/MS	細菌 酵母	属・種	若干劣る	10~30 分間
短時間で大量の検体を処理できる				

# 検出菌の全数確認

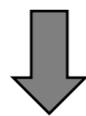


## 従来の方法

- ① 見た目で分類  
白：17、黄色：1、赤：4
- ② 代表として  
白、黄色、赤のコロニに対して同定試験を実施

## MALDI TOF/MSを用いた同定

- ① 全てのコロニに対して同定を実施



同定精度が向上する（品質向上）

# 滅菌



# 滅菌とよく似た言葉

## 局方解説書

滅菌 : 物質からすべての微生物を殺滅または除去すること

殺菌 : 微生物を殺すこと

消毒 : 病原菌等人に対し有害な微生物を除去、死滅、無害化すること

殺菌、消毒の定義には、定量性がない

滅菌の定義には定量性がある



# 滅菌とは？

日本薬局方

被滅菌物の中の**全ての微生物を殺滅または除去**すること

ヘルスケア製品の滅菌に関するISO規格

製品を生育可能な**微生物が存在しない状態**にするために用いるバリデートされたプロセス

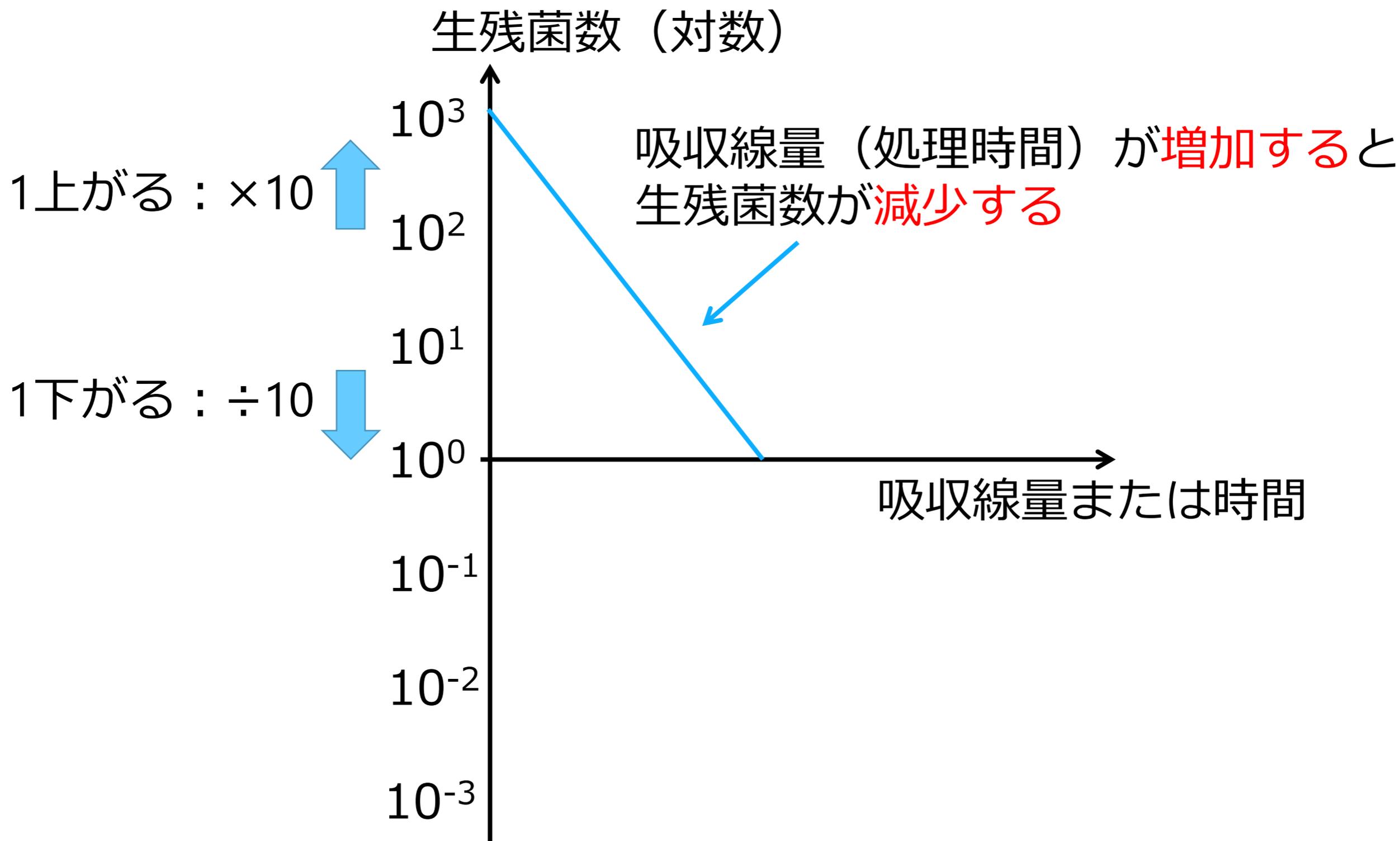
全ての微生物を殺滅または除去  
微生物が存在しない状態

= **微生物が存在しない**  
**ことを証明する**



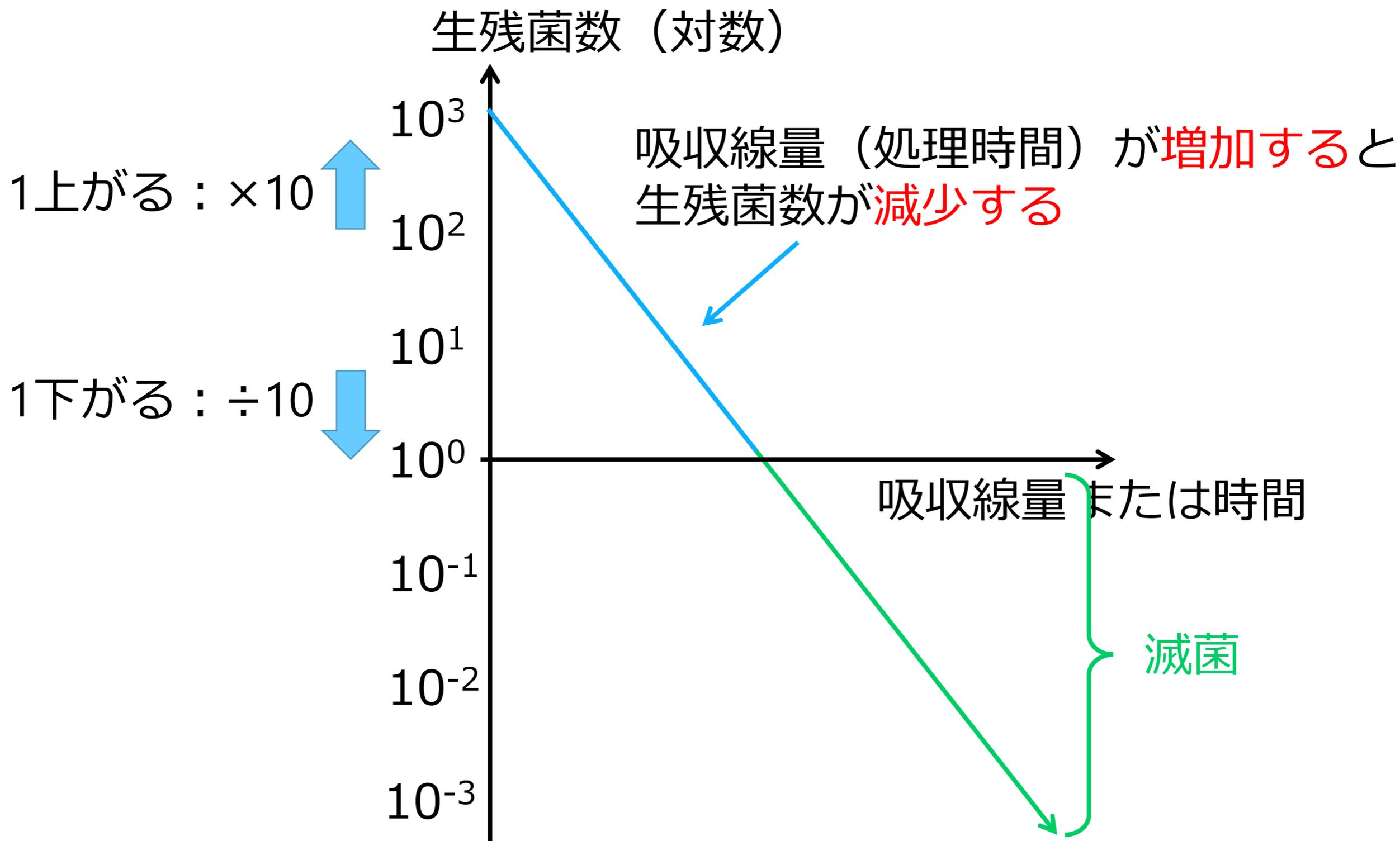
# 滅菌処理と菌数の変化

製品1個に付着している菌数の変化（生残曲線）



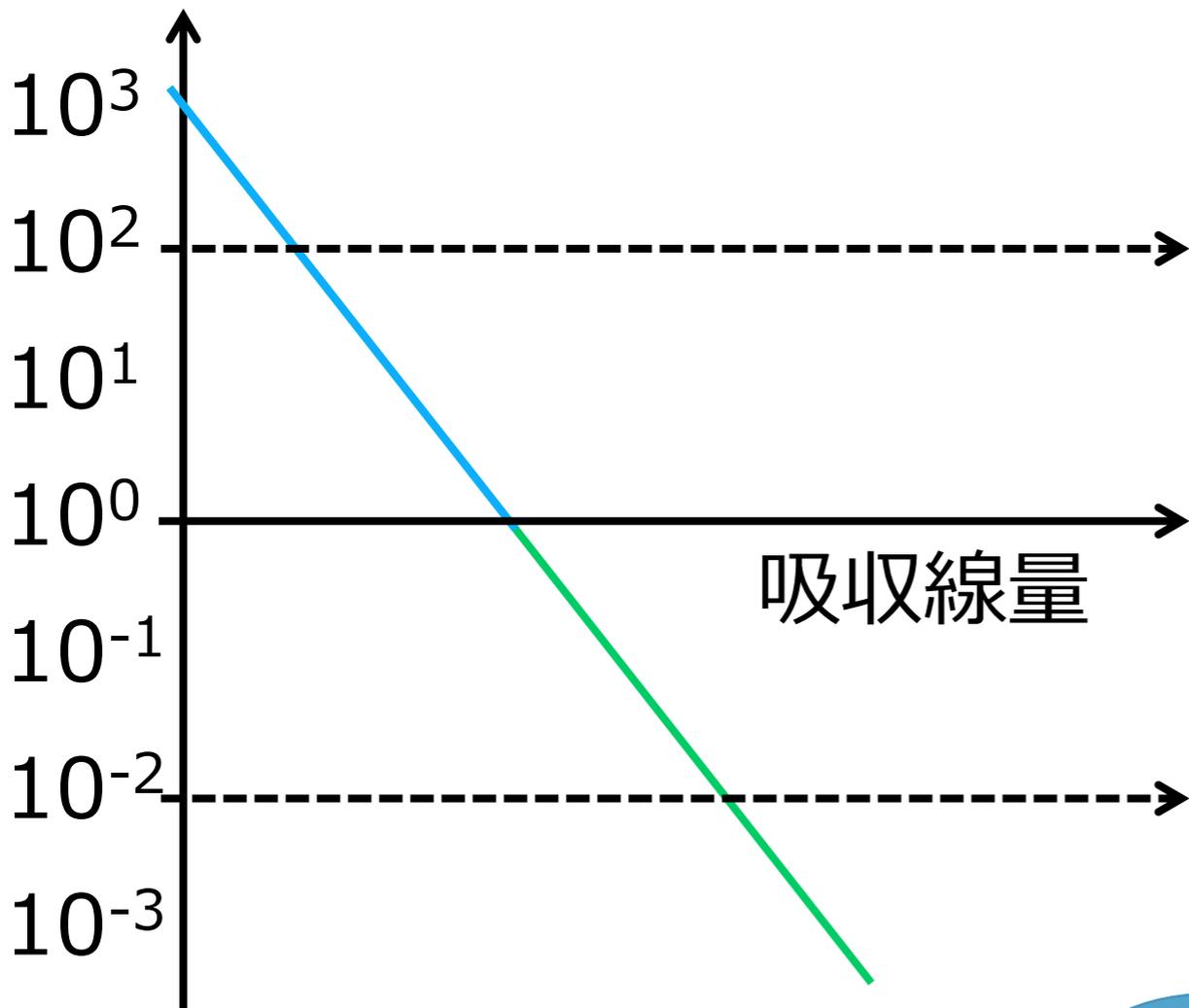
# 滅菌処理と菌数の変化

製品1個に付着している菌数の変化（生残曲線）



# 滅菌の概念図

生残菌数



製品数	菌数
1個	1000
1個	100
1個	10
1個	1
1個	0.1
1個	0.01
1個	0.001

製品数を増やすことで菌数を1にする

製品100個中に1個の菌が存在している状態

10個	1
100個	1
1000個	1

無菌レベル

# 滅菌に求められる無菌レベル

ヘルスケア製品の滅菌に関するISO規格では、  
規定されていない

滅菌バリデーション基準は、  
10<sup>-6</sup>を達成することを無菌性の保証としている。

日本では10<sup>-6</sup>以下を滅菌としている

\* 10<sup>-3</sup>を採用している製品もある

10<sup>-6</sup>とは、  
製品100万個に菌が1個、見つかるレベル



# 無菌レベルが $10^{-6}$ であることの証明

滅菌条件の設定方法（日本薬局方参照）

- ① 滅菌前の製品に付着している菌の数と菌と滅菌法との相性を考慮しない方法（ガス滅菌、湿熱滅菌）
- ・ ハーフサイクル法
  - ・ オーバーキル法
- ⇒ 微生物試験が不要
- ② 滅菌前の製品に付着している菌の数と菌と滅菌法との相性を考慮する方法（放射線滅菌）
- ・ バイオオーバーデン/BI併用法
  - ・ 絶対バイオオーバーデン法
- ⇒ 微生物試験が必要

# ありがとうございました。

お問い合わせは・・・

株式会社 コーガアイソトープ

滅菌研究センター

福山 貞伸

E-mail [fukuyama@koga-isotope.co.jp](mailto:fukuyama@koga-isotope.co.jp)

どうぞよろしくお願いいたします。

