原著

ダイアライザーの放射線滅菌線量の検討 (I) —— Microbial Burden の調査 ——

木川 秋子* 三 沢 昇** 立石 恒夫*
磯 勝 明* 木村 俊夫* 真室 哲雄*

Dose Setting for Radiation Sterilization of Dialyzers (I) —— Examination of Microbial Burden ——

*Akiko KIGAWA**, *Sho MISAWA***, *Tsuneo TATEISHI**,
*Katsuaki ISO**, *Toshio KIMURA** and *Tetsuo MAMURO**

* *Japan Radioisotope Association, Koka Laboratory*

121-19, Nakayamadani, Toriino, Koka-cho, Koka-gun, Shiga-ken 520-34

** *Nippon Medical Industries Co., Limited, Quality Control Division*
8-7, Hanukiyachi, Niida, Odate-shi, Akita-ken 018-57

Abstract

In order to obtain the ground for dose setting in radiation sterilization of dialyzers, radiation resistances of 185 non-sporeformer strains and 52 sporeformer strains, which were washed out of 43 products sampled from 10 lots, were examined comparing with the radiation resistance of *Bacillus pumilus* ATCC 27142 spore. Radiation resistances of the non-sporeformer strains were examined in the form of the suspension in phosphate buffer solution, and all the strains were confirmed to have lower resistance than *B. pumilus* spore. On the other hand, radiation resistances of the sporeformer strains were examined in the form of the cellulose fiber strip, on which water suspension of the purified spores was dropped and then air-dried. It was found that 11 strains of the 52 strains showed higher resistance than *B. pumilus* spore. The strongest strain was identified to be *B. megaterium* and found to have about 40 percent higher D-value than *B. pumilus* spore. As the result of the present study it was decided to use both *B. pumilus* ATCC 27142 and the *B. megaterium* as biological indicators, with which dialyzers are to be loaded for the dose setting experiment.

はじめに

ダイアライザーをコバルト-60ガンマ線照射

* 日本アイソトープ協会・甲賀研究所

** 日本医工株式会社・品質管理部

(原稿受付：昭和61年6月10日)

により滅菌するさいの滅菌線量を設定するための根拠を得ることを目的として、滅菌前付着菌の放射線抵抗性を *Bacillus pumilus* ATCC 27142 の芽胞と比較しながら検討した。本研究の結果に基づいてきめた指標菌を用いて、滅菌線量設定のために行ったD値測定実験について

(34) 医 器 学 Vol. 56, No. 8 (1986)

は、次報で報告する。(D値: decimal reduction dose, 生菌数を10分の1に減少するために必要な線量)

試 験 方 法

1. 試 料

試料は、日本医工株式会社製中空糸型ダイアライザー FB 110 M である。本体は包装袋内に密封されているが、血液出入口および透析液出入口のいずれも開放となっているので、血液側、透析液側、本体表面および包装袋内面の4部位について付着菌の調査を行うこととした。

2. 滅菌前付着菌の洗出し方法

洗浄液として、ペプトン 1%, Tween 80 0.1%を含む生理食塩液(以下、PTS と略記する)を用いた。

(1) 血液側および透析液側

ダイアライザーを鉛直に保持し、図1のよう

図1 血液側および透析液側の滅菌前付着菌の洗出し

な配管、接続を行った。2つの三角フラスコ内に、それぞれ 300 ml の PTS を入れ、血液ポンプにより、血液側および透析液側にそれぞれ流速 300ml/分で15分間 PTS を循環させた。このさい、ダイアライザー内から気泡を除去するために、バイブレーターをあててダイアライザーを振動させた。循環終了後、洗浄液をメンブランフィルター (Millipore HAWG 047 SJ, 孔径 0.45 μ m) で濾過した。

(2) 本体表面

血液出入口および透析液出入口を滅菌ずみシリコンキャップで密栓し、本体をポリエチレン袋に入れ、袋内に PTS 500 ml を入れた。袋

内の空気をできるだけ追い出して封じ、この袋をさらにもう1つのポリエチレン袋に密封した。これを、振盪器 (ヤマト科学製, 型式 SA-31) の振盪板上にガムテープおよび固定用棒で固定し、振盪数 280 回/分、振盪幅 40 mm で10分間振盪した。つぎに、振盪物を裏返して10分間振盪した(合計 20 分間振盪)。振盪終了後、洗浄液をメンブランフィルターで濾過した。

(3) 包装袋内面

包装袋から本体を取り出したのち、袋内に PTS 200 ml を入れ、袋の切断部を封じた。この袋をポリエチレン袋に入れ密封し、これを振盪板上にガムテープで貼りつけ、上記の条件で10分間振盪したのち、洗浄液をメンブランフィルターで濾過した。

3. 洗い出した菌の培養方法

洗浄液を濾過したメンブランフィルターを、標準寒天培地(日水製薬, 以下、SAと略記する)の平板培地に載せ、31°C で48時間培養した。メンブランフィルター上に生育した全コロニーをそれぞれSA平板培地に画線し、31°C で24時間培養した(生育の遅い菌については2~3日間培養)。生育コロニーのうちから、1個の独立コロニーを釣菌し、さらにSA斜面培地で31°C で培養した。

上記のようにして得た菌株のうち、非芽胞形成菌については約2週間ごとに、芽胞形成菌については2~3ヵ月ごとに継代培養を行った。

4. 菌の分類方法

S. T. Cowan と K. J. Steel による「医学細菌同定の手引き」¹⁾、衛生技術会編「微生物の簡易検査法」²⁾および東による「食品中の好気性芽胞菌とその簡易同定(I), (II)」³⁾を参考として菌分類を行った。

グラム反応、カタラーゼ反応、形態および芽胞形成の有無を調べ、図2に示すようにして、菌をI~VII群に大別した。ついで、種々の生化学試験を行って、群ごとに分類を進めた。

5. 非芽胞形成菌と *B. pumilus* 芽胞との放射線抵抗性の比較試験方法

非芽胞形成菌と *B. pumilus* 芽胞との放射線抵抗性の比較試験は、りん酸緩衝液懸濁液の形態で行った。試験菌株をSA斜面培地で31°C

図2 第1次分類

で17時間培養し（生育の遅い菌については2～3日間培養），菌苔を白金耳で少量かきとり，りん酸緩衝液（M/15 KH_2PO_4 : M/15 Na_2HPO_4 = 3 : 7, pH 7.2）に懸濁させた．このさい，濁り具合を目視により調整し，菌濃度になるべく $\sim 10^8/\text{ml}$ となるようにつとめた．*B. pumilus* 芽胞については，甲賀研究所に保存してある *B. pumilus* ATCC 27142 芽胞水懸濁液（ $\sim 8 \times 10^8$ spores/ml）をりん酸緩衝液で希釈した．

抵抗性比較試験は，以下に述べるように，3段階で実施した．第1段階では，菌のりん酸緩衝液懸濁液を 12 mm 径の共栓試験管に入れ，照射線量率 ~ 0.09 MR/h で $0.15 \sim 0.24$ Mrad の照射を行い，照射終了後直ちに，〔付記〕（本節の後尾に記す）に述べる方法で菌濃度の測定を行った．同時に，未照射菌液の菌濃度も測定し，生残率を求めた．同一調製ロットのりん酸緩衝液に懸濁し，かつ同時に照射した *B. pumilus* 芽胞についても生残率を求め，両生残率の大小に基づいて放射線抵抗性を比較した．

第1段階において *B. pumilus* 芽胞に比べて抵抗性が同等もしくは大きい可能性があると認められた菌株について，あらたに菌懸濁液を調製し，第2段階の試験を行った．この段階では， $0.69 \sim 0.81$ Mrad の照射を行った．

第2段階において *B. pumilus* 芽胞に比べて抵抗性が同等もしくは大きい可能性があると認められた菌株は，第3段階の試験に進ませた．第3段階では， ~ 0.8 Mrad をこえる線量を含む段階的線量を照射し，生残曲線を描き，D値を求め，まったく同一の条件で得た *B. pumilus* 芽胞の生残曲線およびD値と比較検討した．

〔付記〕りん酸緩衝液懸濁液の菌濃度測定法

PTS 18 ml を入れたホモジナイザーのカッ

プ（容量 100 ml）に測定すべき菌液 2 ml を加え，10,000 rpm で3分間ホモジナイズする．ホモジネートから 0.5 ml を採取して PTS 4.5 ml の入ったモルトン栓試験管（15 mm 径）に入れ，オートミキサーで10秒間攪拌する．同様な PTS による階段希釈をさらに必要回数だけ行う．適当な希釈段階の液から 1 ml を採取し，SA 平板混釈を行う．未照射菌液，照射菌液のいずれについても，希釈段階を数多くとり，コロニー計数に便利な希釈段階が含まれるようにする．

6. 芽胞形成菌と *B. pumilus* 芽胞との放射線抵抗性の比較試験方法

芽胞形成菌と *B. pumilus* 芽胞との放射線抵抗性の比較試験は，芽胞の水懸濁液をセルローズファイバー沱紙片に塗布風乾した形態で行った．

6.1 芽胞水懸濁液の調製方法

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 ppm, CaCl_2 100 ppm を添加した SA 培地 50 ml を入れた 300 ml 容量の綿栓三角フラスコに試験菌を接種し， 31°C で7～10日間培養した．鏡検により十分に芽胞化が進んでいることを確認したのち，下記の精製操作を行った⁴⁾．

培養フラスコに 5 mm 径のガラスビーズ数十個と少量の滅菌水を入れ，ガラスビーズを静かにならして菌苔をかきとり，さらに滅菌水を加えて静かに振盪しながらガラスビーズとともに菌液をビーカに移した．傾斜により菌液だけを遠沈管に移したのち， 5°C , 6,000 rpm で15分間遠沈した．つぎに，沈殿を約 10 ml の滅菌水に懸濁し，芽胞化していない栄養細胞を殺すために 80°C で10分間加熱処理を行った．急冷後，再び遠沈管に移し，上記と同様な遠沈洗

(36) 医 器 学 Vol. 56, No. 8 (1986)

浄を3回繰返した。

得られた沈殿を滅菌水 10~20 ml に懸濁して芽胞水懸濁液を調製した。こうして調製された芽胞水懸濁液は冷蔵庫 (5°C) で使用前まで保存した。

6.2 芽胞塗布用紙片の作製方法

上記の芽胞水懸濁液を水で希釈し, 10^8 spores/ml 程度 (場合によっては, 10^9 spores/ml 程度) としたものを, 用紙片への芽胞塗布用液として用いた。塗布用液を, 0.1 ml メスピペットを用いて, 0.1 ml ずつセルローズファイバー用紙片 (東洋用紙 No. 525, 40×10 mm) に滴下し, 約 10^7 spores/piece の塗布量とした。塗布後, クリーンベンチで4時間風乾し, 1枚ずつメッキンバッグ (HOGY, 20×70 mm) に密封し, D値測定実験開始まで冷蔵庫 (5°C) で保存した。

塗布用液の芽胞濃度の測定はつぎのようにして行った。塗布すべき全用紙片の半数の塗布が終了したとき, 同様なピペット操作で5回塗布液を採取し (合計 0.5 ml), ホモジナイザーのカップに入れた。カップに 0.1% Tween 80 水溶液 19.5 ml を加え, 10,000 rpm で3分間ホモジナイズし, ホモジネートから 0.5 ml を採取し, 0.1% Tween 80 水溶液による階段希釈を必要回数行い, 希釈液 1 ml を SA 平板混釈した⁵⁾。

6.3 用紙片からの芽胞回収および回収芽胞数の測定

40 ml の 0.1% Tween 80 水溶液を入れたホモジナイザーカップに芽胞塗布用紙片を入れ, 10,000 rpm で3分間ホモジナイズした。ホモジネートの 0.5 ml を採取し, これに 0.1% Tween 80 水溶液による階段希釈を必要回数だけ行い, SA 平板混釈を適用して芽胞濃度を測定し, これから回収芽胞数を算出した。ホモジネートの 0.5 ml を採取するにさいしては, セルローズ繊維によるピペットの目詰まりを防ぐために, ステンレスの網を用いた。

6.4 用紙片塗布芽胞のD値測定方法

メッキンバッグ入りの芽胞塗布用紙片を, さらにポリエチレン袋 (40×75mm, 厚さ 0.1mm) に封入し, これを図3のようなアクリル樹脂製

図3 芽胞塗布用紙片試料を照射するさいに用いたアクリル樹脂製ケース

のケースに入れた状態で定照射線量率 ~ 0.6 MR/h で照射した。

D値測定実験は, 下記のように, 2段階で実施した。第1段階では, 0.2~0.5 Mrad の範囲で4線量をあてた。照射用紙片から芽胞を回収し, 生残芽胞数を測定するとともに, 3枚の未照射用紙片について回収芽胞数を測定して平均値を求めた。各線量における生残率を算出し, 生残曲線を描き, これに基づいてD値を定めた。なお, 芽胞回収操作における異常の有無を確かめるために, 3枚の未照射用紙片の回収芽胞数測定値の平均を, 塗布用液 1 ml 中の芽胞数測定値の10分の1で割った値として芽胞回収率を求め, この値が十分に高いことを確認した。

第1段階において *B. pumilus* 芽胞よりも抵抗性が高いと認められた菌株については, 第2段階の実験を行った。この段階では, 0.4~1 Mrad の範囲で4線量をあてた。

試 験 結 果

1. 滅菌前製品から洗い出され, 培養された菌

滅菌前製品のサンプルとして, 昭和59年9月から昭和60年3月までの間に製造された10ロット, 43個の製品を用い, これらから合計239個の菌を検出した (血液側: 100株, 透析液側: 67株, 本体表面: 52株, 包装袋内面: 20株)。

図2に, 菌の分類結果をあわせ示す。I, IVおよびVI群には該当菌株がなかった。V群に属するもの1株およびVII群に属するもの1株は継代培養中に死滅した。したがって, 放射線抵抗性試験は237菌株について行った。

本稿では, III, VおよびVII群をまとめて非芽

胞形成菌と称し、Ⅱ群を芽胞形成菌と称している。

2. 非芽胞形成菌と *B. pumilus* 芽胞との放射線抵抗性の比較結果

図4に、りん酸緩衝液懸濁液を用いて行った

図4 りん酸緩衝液懸濁液を用いて行った第1段階および第2段階の抵抗性比較試験の結果例（非芽胞形成菌，数字は菌株番号）

第1段階および第2段階の抵抗性比較試験の結果を例示する。このような比較試験の結果，試験した185株のうち，No. 136 および No. 228（いずれも *Micrococcus*）の2菌株のみが *B. pumilus* 芽胞と同等もしくは大きい抵抗性をもつ可能性があると考えられたので，第3段階のD値測定実験に進ませた。

図5は，No. 136, No. 228 および *B. pumilus* 芽胞について得られた生残曲線を示す。No. 136 および No. 228 はいずれも，低線量域では *B. pumilus* 芽胞よりも大きい抵抗性を示すが，高線量域では抵抗性が著しく小さい。今， $0 \sim nD$ の線量範囲における平均のD値を nD/n で表わすこととすると，図5から表1のようなD値が求められる。

以上の実験結果から，検出された非芽胞形成菌はすべて *B. pumilus* 芽胞よりも放射線抵抗性が小さいと結論された。

図5 りん酸緩衝液に懸濁した *B. pumilus* 芽胞および菌株 No. 136 および No. 228 の生残曲線

表1 菌株 No. 228, No. 136 および *B. pumilus* 芽胞についてみいだされたD値（りん酸緩衝液中，単位：Mrad）

strain D-value	<i>B. pumilus</i> spore	No. 228	No. 136
1 D/1	0.28 ₅	0.59	0.44
2 D/2	0.28 ₅	0.36 ₇	0.28 ₀
3 D/3	0.28 ₅	0.27 ₃	0.21 ₃
4 D/4	0.28 ₅	0.22 ₅	0.17 ₆

図6 汚紙片に塗布した *B. pumilus* 菌株 No. 190（最強）および No. 221（最弱）の生残曲線

3. 芽胞形成菌の芽胞と *B. pumilus* 芽胞との放射線抵抗性の比較結果

52株の芽胞形成菌および *B. pumilus* の芽胞をそれぞれ汚紙片に塗布したものを用い，第1段階のD値測定実験を行った結果，試験した52株のうちの10株が *B. pumilus* 芽胞よりも抵抗性が大きい可能性があると考えられた。

図7 濾紙片に塗布した芽胞のD値(3D/3)の分布

図8 みいだされた33株の *B. pumilus* 芽胞のD値(3D/3)の分布

これら10株について第2段階のD値測定実験を行った結果、すべて *B. pumilus* 芽胞よりも大きいD値を示すことがわかった。

図6は、52株のうちでもっとも大きい抵抗性を示した No. 190 (*B. megaterium*, $3D/3=0.230$ Mrad), もっとも小さい抵抗性を示した No. 221 (*B. subtilis*, $3D/3=0.120$ Mrad) および比較に用いた *B. pumilus* ATCC 27142 の芽胞 ($3D/3=0.167$ Mrad) について得られた生残曲線を示す。

図7は、D値(3D/3の値)の分布を示す。

芽胞形成菌のうちでもっとも多くみいだされた33株の *B. pumilus* のD値は、図8のように、比較に用いた *B. pumilus* ATCC 27142 のD値($3D/3=0.167$ Mrad)をほぼ中心として分布している。

おわりに

医療用具の滅菌線量を設定する根拠を得るための microbial burden の調査研究として、デ

イスポーザブル注射筒・注射針、ガーゼ付絆創膏および月経処理用タンポンに関して、それぞれ細淵ら⁶⁾、細淵ら⁷⁾、および岩崎ら⁸⁾の報告がある。細淵らは止血パッド(ガス滅菌)の Bio-burden の調査も行っている⁹⁾。

調査対象製品の種類や製造場所によって菌種の分布が異なるのは当然のことであるが、非芽胞形成菌の検出割合は、上記の調査の場合の方が本調査の場合の~78%に比べてきわめて低い。

しかし、放射線低抗性の高い芽胞形成菌の芽胞のD値の分布については、比較的に類似した結果が得られた。すなわち、放射線滅菌の指標菌としてしばしば用いられる *B. pumilus* ATCC 27142 の芽胞よりも高いD値を示すものの割合として、細淵らが15~35%の値を得たのに対して^{7,8)}、本研究では約20%の値を得た。

滅菌線量を設定するためには、ダイアライザーに指標菌を負荷した試料を用いてD値測定実験を行うことになるが、指標菌としては、滅菌前付着菌のうちの最強菌である *B. megaterium* の芽胞を使用するのが安全の点から合理的である。しかし、放射線滅菌の標準的指標菌として多用されている *B. pumilus* ATCC 27142 の芽胞も指標菌としてD値測定実験を行うことが、他製品の滅菌線量設定のための実験結果との比較が便である意味において、有用であると考えられる。

参考文献

- 1) S. T. Cowan and K. J. Steel : Manual for the Identification of Medical Bacteria, 医学細菌同定の手びき<第2版>坂崎利一訳 近代出版(1973)
- 2) 金子精一編著 : 微生物の簡易検査法 衛生技術会(1980)
- 3) 東 量三 : 食品中の好気性芽胞菌とその簡易同定(I), (II), New Food Industry, 4, 67(1962), 4, 61(1962)
- 4) 砂田毅ら : 放射線滅菌インジケータ, 医科器械学叢書4, 滅菌法消毒法第4集, 綿貫詰, 實川佐太郎, 榊原欣作編集, 文光堂, 157(1962)
- 5) 木川秋子ら : *Bacillus pumilus* 孢子水懸濁液の菌濃度測定(I), (II), 防菌防黴誌, 11, 667(1983), 12, 421(1984)

- 6) 細淵和成ら：デイスポーザブル医材の放射線滅菌線量の検討（Ⅰ）——デイスポーザブル注射筒・注射針の Bioburden 調査および滅菌線量の算出，医器学，53，499（1983）
- 7) 細淵和成ら：デイスポーザブル医材の放射線滅菌線量の検討（Ⅱ）——ガーゼ付絆創膏の Bioburden の調査および滅菌線量の算出，ibid.，54，311（1984）
- 8) 岩崎義雄ら：デイスポーザブル医材の放射線滅菌線量の検討（Ⅲ）——月経処理用タンボンの Microbial Burden の調査および滅菌線量の算出，ibid.，55，244（1985）
- 9) 細淵和成ら：止血用パッドの Bioburden の調査とエチレンオキサイドガス滅菌，防菌防黴誌，12，529（1984）