

【研究報告】

オゾン水滅菌バリデーション

山本克治,福永栄

日本医療オゾン研究会会報, Vol.4, No.3, 4-6. (1997)

研究報告

オゾン水滅菌バリデーション

石川島播磨重工業株式会社 技術本部 山本克治, 福永栄

1. はじめに

当社では、石川島芝浦機械株式会社と共同で、オゾンガスを利用した室内殺菌装置、ベッドマット殺菌装置、殺菌ロッカーを開発し、1996年3月に薬事法医療用具製造承認を取得した。これらの装置の詳細は、文献1で報告したが、これらは消毒装置であり、バリデーションは任意性があった。一方、滅菌バリデーションは、最近になってISO/TC198国際規格ができ、厚生省もこれに沿った滅菌バリデーション規準を定め、日本薬局方も改正されつつある。オゾンも滅菌を狙うことができる段階になってきたので、その滅菌バリデーションの方法と結果を紹介する。

2. 滅菌バリデーションのためのD値測定方法

滅菌 (Sterilization) の定義は、「すべての微生物を完全に殺滅、除去してしまうこと」、消毒 (Disinfection) の定義は、「病原性のある微生物をすべて殺滅、除去して感染の危険を除くこと」となっているが、具体的でなく、バリデーション (Validation) の基準となりえない。ISO国際規格によれば、滅菌の定義は、「 10^{-6} 以下のSAL (Sterility Assurance Level) にする条件」である。即ち、 10^6 個の製品の内、微生物汚染が1個以下を保証することである。

滅菌条件の決定方法には、オーバーキル法、ハーフサイクル法、バイオバーデン法がある。オーバーキル法は最大抵抗菌を対象にして、初菌数 10^6 を 10^{-6} 以下のSALにすること即ち死滅率指数 (Death Rate Exponent) が12D (Decimal Power) の殺菌効果を得ることである。具体的には、D値を12倍したものが滅菌条件となる (図を参照)。ハーフサイクル法とバイオバーデン法の詳細は省略するが、概ね、15Dと9Dの殺菌効果を得ることに等価である。

滅菌の (最大抵抗菌の) 生物指標については、ISO国際規格では過酸化水素について規定されており、オゾンも殺菌機構が過酸化水素に類似しているので、それに準拠した。具体的には *Bacillus subtilis* ATCC 9372、*Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980である。

一般に殺菌剤の殺菌効果は、条件が一定の場合、Chick式 (次式) による。

$$-\log(m/N) = kC^aT$$

m: 生残菌数、N: 初発菌数、k: 速度定数、C: 殺菌剤濃度、T: 接触時間

m/Nは生存率 (生残率、Survivor Rate) であり、左辺は減少指数 (Reduction Exponent、死滅率指数 Death Rate Exponent、対数減少 Log Reduction) で単位はDである。次亜塩素酸、ヨウ素、オゾンなどは $a=1$ であるといわれ、濃度Cと時間Tの積はCT値 (CT value) と定義されている。

D値 (D value) は次式で定義できる。左式は、90%死滅時間 (Decimal reduction time)、右式は、90%死滅CT値 (Decimal reduction CT value) になる。分母は死滅率指数である。

$$D[\text{min}] = T / \log(N/m) \quad D_{CT}[\text{mg} \cdot \text{min}/\text{L}] = CT / \log(N/m)$$

m: 生残菌数、N: 初発菌数、T: 接触時間、CT: CT値

ISO国際規格では、D値測定の方法として、生残曲線法とフラクションネガティブ法 (部分生残法) を定め

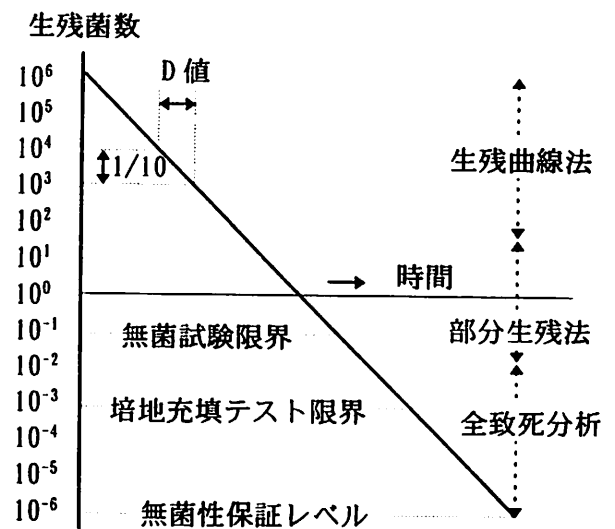


図 生残曲線

ている。さらに、フラクションネガティブ法には、Stumbo-Murphy Cochran法 (SMCP)、Spearman-Kärber法 (SKP) 及びそれぞれの制限法 (Limited SMCP、Limited SKP) の4つの方法があるが、一般的なものはLSMCPである。

LSMCPでは、無菌試験法で全数陽性、部分陰性、全数陰性の条件を見つけて、部分陰性1点の条件から、最確値法により生残菌数を推定して、前述の式からD値を求める。

$$D = T / (\log N - \log(n/r))$$

N：初発菌数、n：部分陰性条件の試料数、r：部分陰性条件の陰性数、T：接触時間
分母第2辺はポアソン分布により平均生残菌数 m として、生残菌数が0になる「陰性」の確率が、 $r/n = \exp(-m)$ であるからことから導出される。いわゆる最確値法である。

3. オゾン水滅菌のD値測定試験方法と結果

菌種		<i>Bacillus stearothermophilus</i>		
オゾン水濃度		60 mg/L		
初発菌数		約 10 ⁴		
T[s]	n	r	D 値 (LSMCP)	
			[sec]	[mg·min/L]
30	5	0		
45	50	25	10.8	10.8
60	50	40	(12.9)	(12.9)
75	50	45	(15.1)	(15.1)
90	5	5		

菌種		<i>Bacillus subtilis</i>		
オゾン水濃度		40 mg/L		
初発菌数		約 10 ⁴		
T[s]	n	r	D 値 (LSMCP)	
			[sec]	[mg·min/L]
15	5	4		
30	50	31	6.9	4.6
45	50	36	(10.0)	(6.7)
60	50	43	(12.4)	(8.3)
75	5	5		

表 D 値測定試験結果

D 値測定法は、オゾン水曝露の場合、普通は懸濁液法で行われるが、ここではフィールドを想定して、指標菌をプラスチック容器に負荷して試験した。指標菌は前述のように、*B. subtilis* ATCC 9372、*B. stearothermophilus* ATCC 12980である。

初発菌数を 10⁶ で試験したところ、短時間では全数陰性の条件が得られなかった。これは、微小面積に細菌を塗布したため、バイオフィームの影響が出たためと推定できる。ISOメンバーの意見では、初発菌数は任意でよいということなので、バイオフィーム影響を少なくするため初発菌数を約 10⁴ とした。試験結果を表に示す。*B. stearothermophilus* はオゾン水濃度 60 mg/L の条件で試験した。最初の部分陰性は接触時間 45 秒で得られ、理論的には、60 秒以降は全数陰性が得られるはずであるが、60 秒、75 秒と部分陰性となってしまった。これは、細菌の塗布状態が一個所に偏ってしまうために、重層構造になり滅菌できない条件になっているためと推定できる。ISOメンバーの意見では、最初の部分陰性1点でD値を算出できるということであったので、45秒の結果から、*B. stearothermophilus* のD値は、10.8 秒 (10.8 mg·min/L) となる。厳密には、初発菌数も統計計算しなければならないが、ここでは省略する。

B. subtilis はオゾン水濃度 40 mg/L の条件で試験した。*B. stearothermophilus* と同じ傾向が出たが、D値は、6.9 秒 (4.6 mg·min/L) であった。オートクレーブ処理の例と同じで、*B. stearothermophilus* が *B. subtilis* より数倍程度強いことが判った。

4. まとめ

オゾン水は滅菌に適用可能であることが判った。そのD値は、最大抵抗菌と思われる *B. stearothermophilus* を対象にして 10 mg·min/L 程度であり、他の滅菌方法に比較して、かなり短時間の処理が可能になる。オゾンガスも同様の効果があるとの報告例がある。

課題として、データを安定させるため細菌の塗布方法を含めた試料の調製方法を確立する必要がある。で

できれば、標準的なバイオインジケータがあればそれを使いたい。*B. stearothermophilus* や *B. subtilis* 以外の強い抵抗菌も調査する必要がある。また、データを一般化するために懸濁液法でもD値を求める必要がある。

オゾン法の最大の特徴は、滅菌対象物、曝露環境に対して悪影響を与えないことであり、従来の滅菌法では適用しにくかった材料に対して適用できる可能性がみえてきたので、今後の進歩と普及が期待できる。

参考文献

- 1) 山本克治、清水昌巳、高橋亮二：オゾン殺菌・脱臭装置の開発、医療オゾン研究、増刊1、pp.109-116 (1996)
- 2) 古橋正吉：医療用品の滅菌方法／滅菌バリデーション／滅菌保証 (1996)
- 3) 佐々木次雄：バイオバーデン試験方法及び環境微生物試験方法 (1996)
- 4) 平田強：オゾンの消毒効果、第1回日本オゾン協会、オゾンに関するセミナー(1991)
- 5) 杉光英俊：オゾンの基礎と応用、光琳 (1996)
- 6) 神力就子：オゾンによる細菌・ウイルスの不活化機構、新版オゾン利用の新技术、pp.91-110 (1993)

第3回研究講演会の案内

とき：平成10年4月17日（金）　　ところ：東急車輛製造(株)、東京都渋谷区
発表申し込み締め切りは1月末を予定しています。会員の発表は当然ながら、
非会員の発表も歓迎しますので、オゾン関連研究者にご紹介下さい。

新入会員の紹介（入会順）

- 1 木内 彰 宗谷地区農業共済組合 〒098-55 北海道枝幸郡中頓別 149
専門：大動物臨床
- 2 吉崎 隆 戸田建設株式会社エンジニアリング部技術研究所
〒104 中央区八丁堀 4-6-1
専門：建築設備
- 3 堀 泰典 あさひ歯科医院 〒513 鈴鹿市長太旭町 4 丁目 3-32
専門：歯科
- 4 (法人会員)
日本特殊陶業株式会社 〒485 小牧市大字岩崎 2808
業務：オゾン発生器、オゾン水製造装置の開発・販売
- 5 (法人会員)
エナジーサポート株式会社 〒484 犬山市字上小針 1 番地
業務：オゾン防汚染装置の設計・製作
- 6 飯沼 清栄 株式会社グランヒル大阪 〒545 大阪市阿倍野区西田辺町 2-8-6-2A
専門：薬剤師、医療と健康に関する情報の提供
- 7 寺脇 英志 ハイブリッド アメルング アジア・太平洋駐在事務所
〒651-22 神戸市西区糀台 3 丁目 27-6
業務：血液凝固測定装置の販売