

微生物汚染対策効果評価のための バイオロジカル・インジケータの迅速判定方法*

五味弘・荒川宏樹・高橋秀人
藤井修二^{*1}・柳宇^{*2}・田中毅弘^{*3}

Rapid Judgment Method of Biological Indicators for Evaluation of Microbial Pollution Control Effect

Hiroshi Gomi・Hiroki Arakawa・Hideto Takahashi
Shuji Fujii・U Yanagi・Takehiro Tanaka

本研究では、無菌製剤工場等で定期的実施される室内除染の効果の判定に用いる BI (バイオロジカル・インジケータ) に関して、生菌の有無を迅速に測定できる方法を確立することを目的とした。安価で簡便な測定方法を目指し、培養法と市販の ATP (アデノシン三リン酸) 測定器による計数法を組み合わせた迅速で信頼性の高い測定プロトコルを考案し、検証した。その結果、12 時間以内に除染効果の判定が可能であることが確認された。

1. はじめに

2019 年度より検討を行っている浮遊細菌濃度の簡易迅速測定法¹⁾に加えて、無菌製剤工場等で微生物汚染を排除するために定期的に行われている室内除染の効果の簡易迅速試験法について検討した。上記の工場等で行われる除染の成否の判定には、バイオロジカル・インジケータ(BI)が用いられている。現在一般的な、BI の菌を培養して判定する方法(ガス測定法²⁾、平板培地培養法)では、判定に数日～数週間を要するため、施設の使用の制限、製造再開後の陽性判定によるリスクなどが生じおり、迅速な BI の判定方法が求められている(図 1)。

本研究では、高価な測定器等を用いず、現場で簡便に、かつ迅速な BI の判定が可能なる方法を確立することを目的として、生菌の増殖能を利用してコロニー数を増やして、市販の ATP (Adenosine Triphosphate) 測定器³⁾で測定する方法、言わば「マイクログロニーATP 法」に着目して、迅速測定プロトコルと信頼性の高い判定法を考案し、検証した。

2. 本測定方法について

本測定法で用いる菌体、培地、測定器等の諸元を表 1 に示す。二酸化塩素ガス除染の効果判定用の BI 菌である *Bacillus atrophaeus* (枯草菌)⁴⁾⁵⁾ は、芽胞を形成し、温度他の環境耐性が強いためにインジケータに用いられている。培養液は、SCD (Soybean casein digest) 液体培地に芽胞の発芽促進剤を加えたものを用いた。ATP 測定器、捕集キット並びに ATP 消去試薬はキッコーマンバイオケミファ(株)が市販⁶⁾しているものであり、捕集キットは液体用である。なお、この捕集キットの試薬は、ATP に加えて、ATP が加熱、発酵、酵素反応等によって変化する ADP (アデノシン二リン酸)、AMP (アデノシン一リン酸) も測定が可能であり、ATP 単独に比べて感度が高くなっている。

本測定方法の測定手順を図 2 に示す。本測定法は、回収した BI を①専用培養液に浸して一定時間培養し、②培養液を攪拌後に取り分けて ATP 消去試薬を加え、再度攪拌して 30 分間保持することで培養液成分その他菌体内以外にバックグラウンドと

※2020 年度空気調和衛生工学会講演論文¹³⁾ を加筆修正したものである。

*1 東京工業大学名誉教授 *2 工学院大学 *3 東洋大学

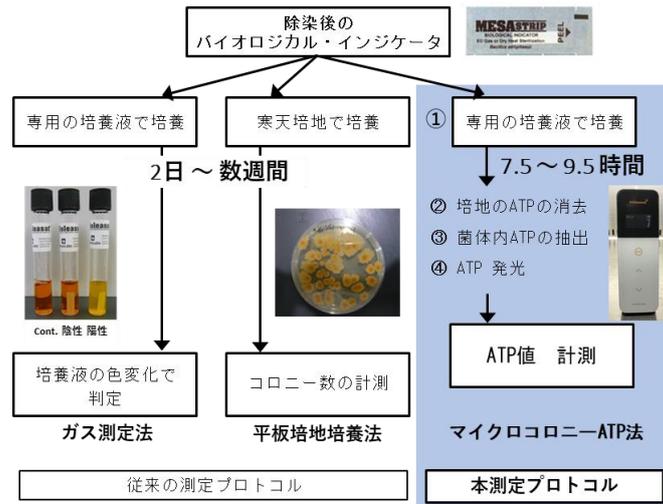


図1 BI評価のための従来法と本測定方法の比較

表1 測定諸元

芽胞菌懸濁液	SSGE/6(Mesa Laboratories, Inc.)
・指標菌	<i>Bacillus atrophaeus</i> (ATCC9372)
・指標菌数	2×10 ⁶ CFU/0.1mL
・溶媒	エタノール 40 vol%
培養液	SCD 培地 + 発芽促進剤
・培養条件	35° C × 0, 3, 5, 7, 9, 11 hr
ATP測定	(キッコーマンバイオケミファ社製)
・測定器	ルミテスター Smart
・捕集キット	ルシパック A3 Water
・補助試薬	ルシフェール ATP消去試薬
平板培地培養法	SCD 寒天培地
・培養条件	35° C × 5日間

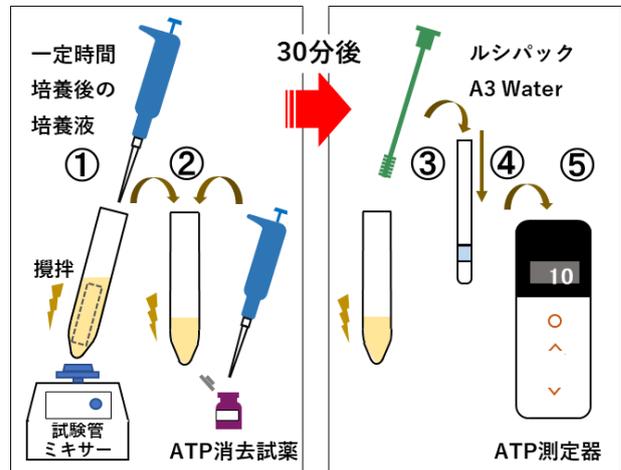


図2 本測定プロトコル

して存在する ATP を消去し、③その培養液を攪拌後、捕集スティックで約 150μL サンプルングし、④捕集キット内で、ATP 抽出液を混合して 25 秒間菌体内の ATP を抽出し、その溶液に ATP 発光試薬を混合して 10 秒間後に、⑤発光量を測定器により RLU (Relative Light Unit) として数値化するものである。

3. 試験方法と試験結果

3.1 試験方法

BI の判定を想定して、試験的に培養液のサンプルを作成して評価した。試験用のサンプルとしては、SCD 液体(以後 SCD) 培養液 1mL 当たり生菌 10⁰CFU と死菌 10⁶CFU を含むサンプル(生菌サンプル)と死菌のみ 10⁶CFU を含むサンプル(死菌サンプル)を作成し、35° C で培養時間 0、3、5、7、9、11 時間後の ATP 量を測定した。生菌サンプルの生菌 10⁰CFU は、表 1 に示す市販の芽胞菌懸濁液を用いて 10 段階階希釈法により作成した。生菌サンプルおよび死菌サンプルに含まれる死菌 10⁶CFU は、前記の懸濁液をシャーレに塗布した BI を作成し、BI 菌を 6 Log 減少できる CT (濃度×時間) 値⁷⁾ の 2 倍の条件で二酸化塩素ガスに暴露して作成した。

また、ATP 法と従来の平板培地培養法の相関を調べるために、ATP 測定と同じ培養時間の SCD 培養液を平板培地に塗抹し、35° C で 5 日間培養後、コロニー数を計数した。

4.2 陰性の判定

陰性の判定も前記の上側信頼限界となる ATP 値を超えなければ良いのであるが、どの時点で陰性と判断するかが判定上の課題となる。この判定に使うのが、各 SCD 培養時間における生菌データで、生菌データが死菌データと一致しないにも関わらず一致すると判定する確率を β とすると、 $1-\beta$ はサンプリング試料中に生菌が存在した場合に、同じ培養時間での死菌データと異なる(すなわち陽性)と判定する場合の検出力となる⁸⁾。換言すれば、この培養時間において死菌データから求めた上側信頼限界を超えなければ、 $1-\beta$ の検出力で陰性と判定できる。 β は、(2)式により t 値を求め、その t 値より外側の t 分布の面積(積分値)になるが、例えば、エクセルでは(3)の関数式を用いて簡易に計算できる。

$$t = (\text{XLT} - \text{上側信頼限界}) / \text{SELT} \quad (2)$$

ここで XLT :ある培養時間での生菌データの平均値

SELT :同上生菌データの標準誤差

$$\beta = \text{T.DIST}(-t, \text{自由度}, \text{TRUE}) \quad (3)$$

ここで T.DIST はエクセル関数

サンプル数 n を 3~5、死菌データから上側信頼限界を求めた時の危険率を 5%、1% とした場合の β 値を表 3⁹⁾ に示す。5 時間培養では、いずれの危険率、n 数において検出力 $(1-\beta) \times 100$ は数パーセントで、生菌が存在していても信頼限界より高い RLU 値を示す確率は小さいため生菌の存在を検出できない。従って、死菌データから求めた上側信頼限界以下の測定値であっても、それを陰性とは判定出来ないことになる。7 時間培養では、検出力が 95%~99% となるので、上側信頼限界を超えない場合には、95%~99% の検出力で検出されない、すなわち陰性であると判断できる。

表 3 各サンプル数と培養時間における β 値

サンプル数	危険率 α	上側信頼限界 [RLU]	β 値		
			培養時間(hr)		
			5	7	9
3	0.05	20.6	0.969	0.031	0.026
4		17.6	0.971	0.009	0.008
5		16.4	0.972	0.003	0.003
3	0.01	34.0	0.995	0.049	0.027
4		23.9	0.996	0.013	0.009
5		20.5	0.996	0.004	0.003

例えば、現場で測定した 5 サンプルの培養 7 時間後の ATP 平均値 (RLU 値) が、死菌データの上側信頼限界 20.5RLU を超えなければ、7 時間培養の生菌データから計算される検出力 99% 以上 ($\beta=0.004$) で陰性と判定できる。要約すれば、SCD 培養 7 時間以降であれば、相当の信頼確率で判定できる。

なお、今回提示した統計的数値は不偏的なものではなく、データ数が増えれば信頼性が向上するので、その場合には例えばサンプル数を低減することも可能になる。

5. 測定結果の考察

5.1 枯草菌に対する ATP 法と寒天培地培養法の相関

生菌試料の ATP 値と平板培地培養法でのコロニー数の関係を図 4 に示す。コロニー数は、数千 CFU/mL 以降で ATP 値と明確な相関が見られた。参考に、メーカー取説に記載された大腸菌の検量線を同図中に実線で示す。細胞当りの ATP 含量は細菌によって異なると考えられるが、CFU と ATP 値 (RLU) の関係を両対数グラフにすると、菌種が違えば切片は異なるが勾配は同じになると考えられ、本図でも同様な結果が得られている。枯草菌に対しても大腸菌同様に寒天培地培養法に相関する定量性が得られることが判った。

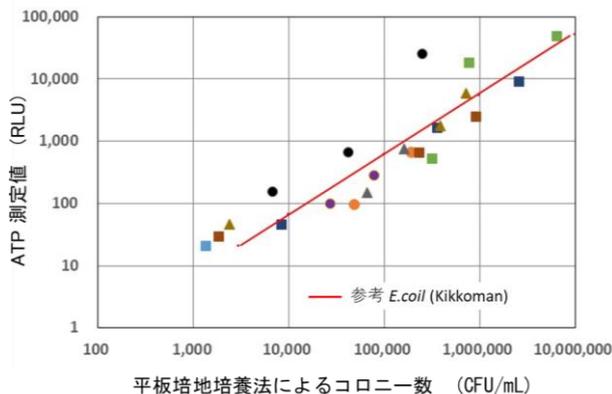


図4 枯草菌のATP測定値とコロニー数の関係

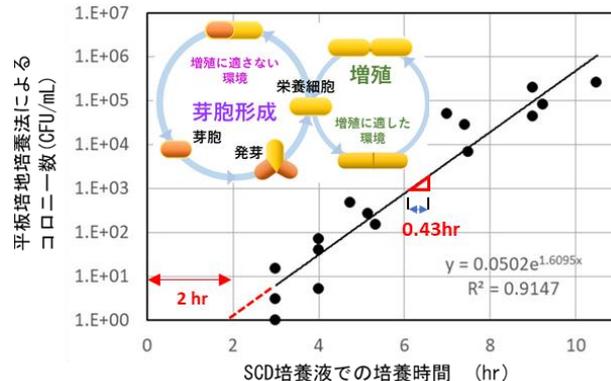


図5 枯草菌の培養での増加特性

5.2 枯草菌の増殖特性

前記の平板培地培養法で測定したコロニー数を縦軸に、SCD培養時間を横軸にして図5に示す。なお、死菌試料を同法で測定したコロニー数は、いずれのSCD培養時間においても全て0CFU/mLであった。

本図より本培養条件での枯草菌の倍加(2倍に増殖する)時間は、0.43hrであった。また、近似曲線を外挿して縦軸1CFU/mLになる時間を求めると、2時間程度となり、この時間以降からコロニー数の増加傾向が始まると想定できる。この時間遅れは、芽胞が発芽して増殖を開始⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾するまでに本培養条件では2時間程度を要するためと考える。

なお、図3で培養5時間までATP値が増加しないのは、この増殖開始の遅れと使用した本測定法の検出下限レベル(本測定結果では11RLU程度)が重なったためである。

5.3 生菌の検出限界に関する考察

今回作成した生菌試料は、 10^6 CFU/0.1mLレベルのメーカ菌液を10倍段階希釈法によって 10^0 CFU/mLとしている。そのため、実際に存在する菌数は1mL当たり1~9CFUに分布している可能性がある。仮に生菌数が最も少ない1CFU/mLの場合に培養7時間でATP値がどの程度になるかを枯草菌の増殖特性とATP測定の感度から検討してみる。

図5の結果より、発芽及び増殖までの時間遅れを2時間、倍加時間を0.43hrとすると、最初にSCD培養液中に1CFU/mLの生菌が存在した場合に7時間後の生菌数 C_7 は、2の実質増殖時間/倍加時間のべき乗、すなわち $C_7=2^{[(7-2)/0.43]}=3,165$ (CFU/mL)となる。図4より、この時のATP値は30RLU程度となり、死菌サンプルのATP測定値の平均値11RLU(図3)より大きくなるので、1CFU/mLの生菌の存在は検出可能なレベルになると言える。

次に、BIに生菌が1CFU生き残っていた場合に検出可能な培養時間を検討する。この場合は培養液を何ミリリットルにするかで初期濃度が変わることになる。あまり培養液が多いと初期濃度が小さくなる。BIが全て浸漬される最少の培養液の量として、2mL程度が適当と考えられる。この量であればATP測定1サンプルで150 μ Lを使うので、5サンプル分を使っても余裕はある。この場合には、初期濃度は計算上0.5CFU/mLとなるので、前出の計算で7時間後の生菌数 C_7 は、3,165の半分、1,580CFU/mL程度となる。この生菌数では、図4を見ると10RLUに近くなり、死菌サンプルの平均値と近くなるので判定が難しくなる可能性が高い。したがって、BIに残存する1CFUの生菌を判定するには、培養時間を9時間程度にすることが推奨される。

なお、判定の期限に余裕があれば、9時間丁度に測定する必要はなく、9時間以上であれば作業に都合の良い時間に測定すれば良い。例えば11時間後に測定した場合、生菌が存在すれば必ず9時間後よりはATP値は大きくなるので、より高い信頼確率で判定できる。

6. おわりに

本測定法は、比較的安価な測定器で測定でき、測定操作も簡単で、結果を数値として扱うことができるのでそれ自体、大変、利便性が高く、信頼性も高い測定方法と言える。また、BIの培養液を継続して培養しておけば再測定も可能なため、測定ミス等に対する冗長性もあると言える。

現在、除染ガスとしては、従来から用いられてきたホルムアルデヒドがWHOから発癌性を警告されたことから、

代替ガスとして過酸化水素、二酸化塩素ガス等が用いられるようになった。これらのガスの除染は、ホルムアルデヒドよりも短時間で済むことも利点となっている。除染の工程としては、①除染対象室の養生、除染用機器の設置、BIの設置等の前準備、②除染対象室への除染ガスの導入と保持、③除染終了後、人体や製品等に影響がない濃度まで除染ガスを分解あるいは換気するエアレーション、④BI回収、後片付け、⑤BI判定による除染効果の確認、に大きく分けることが出来る。ホルムアルデヒド代替ガスで除染工程時間を比べると、二酸化塩素ガスは過酸化水素に比べて前記③のエアレーションの時間が比較的短く、トータルとしても若干短い。作業内容や機器の台数、養生の割合にもよるが、二酸化塩素ガス除染の①前準備～③エアレーションまでの工程時間は9時間程度¹²⁾で済み、朝の9時から作業を開始して除染作業当日の夕刻までにはBI回収が可能となることが多い(図6)。BIの判定が12時間以内であれば、除染作業翌日の早朝までに判定が出来、除染の完了を確認して操業を開始出来るので、除染対象施設使用者の利便性をさらに増すことが出来る。

また、枯草菌を使った測定は除染効果の判定目的以外にも多いと考えるので、本技術が微生物汚染対策に広く貢献できれば幸いである。

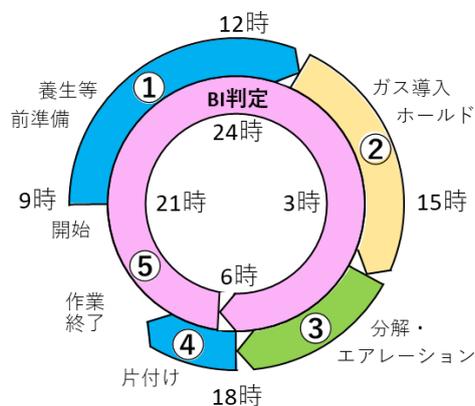


図6 二酸化塩素ガスによる除染工程の一例

謝辞

統計的判定法に関してご指導を頂いた長岡技術科学大学生物機能工学専攻、高原美規准教授に感謝の意を表します。

文献

- 1) 藤井修二,柳 宇,田中毅弘,荒川宏樹,那須正夫,浮遊微生物濃度の簡易迅速測定法の検討,第 36 回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会講演論文集,177-178(2019).
- 2) 富塚一路,藤井修二,柳宇,田中毅弘,荒川宏樹,工場における品質管理への応用を念頭においた浮遊細菌の簡易モニタリング方法の検討,空気調和・衛生工学会大会学術論文集,137-140(2019).
- 3) 第十七改正日本薬局方—参考情報、参 114-115(2016).
- 4) United States Pharmacopeia,chapter 1229.7(2013).
- 5) JIS B 9918-1(2008)クリーンルーム及び関連制御環境—微生物汚染制御—第1部:一般原則及び基本的な方法.
- 6) キッコーマンバイオケミファ社ホームページ <https://biochemifa.kikkoman.co.jp/> .
- 7) 荒川宏樹,高橋秀人,二酸化塩素ガスを用いた微生物除染特性の把握,第 34 回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会講演論文集,241-244(2017).
- 8) 大垣俊一,Type II error と Power analysis,Argonauta 11:3-16(2005).
- 9) 荒川宏樹,高橋秀人,五味弘,藤井修二,柳 宇,田中毅弘,那須正夫,除染効果判定のための微生物迅速試験法の開発,第 37 回空気清浄とコンタミネーションコントロール研究大会講演論文集,165-168(2020).
- 10) 蜂須賀養悦:芽胞(細菌性孢子)発芽のメカニズム,化学と生物,7(9),509-516(1969).

- 11) 枯草菌の孢子形成と発芽に関する研究、摂南大学微生物学研究室資料、1-2(2018).
- 12) 株式会社イカステリファームホームページ <https://www.ikari-sterifirm.co.jp/service/> .
- 13) 五味弘,荒川宏樹,高橋秀人,藤井修二,柳 宇,田中毅弘:微生物汚染対策効果評価のためのバイオロジカル・インジケータの迅速判定方法,令和2年度空気調和・衛生工学会大会学術論文集,141-144(2020).

ABSTRACT

Aseptic pharmaceutical manufacturing factories regularly carry out indoor decontamination to eliminate microbial contamination, and it is hoped to promptly determine the decontamination effect in order to promptly resume operations. The purpose of this study is to establish a method that can easily and quickly determine BIs(Biological Indicators) in the field using inexpensive measuring instruments, and we devised and validated a rapid and reliable decision protocol by a Micro Colony - ATP(Adenosine Triphosphate) method that combines culture method with measurements by a commercially available ATP measuring instrument. As the result, it was confirmed that the judging decontamination effect was possible within 12 hours.
