

論文

各滅菌法による乾燥エンドトキシンの不活化

細淵和成*

棚元憲一**

Inactivation of dry endotoxin by several sterilization methods

Kazunari HOSOBUCHI and Kenichi TANAMOTO

Abstract The method to recover dry endotoxin from glassware and the effect of several sterilization methods on the inactivation of dry endotoxin were examined by using *Limulus* gelation activity as an indicator of endotoxin activity. The following results were obtained,

1. Dry endotoxin was effectively recovered from glassware by mixing with glass beads in the water.
2. About 70 ~90% of endotoxin activity was lost by any of treatment with gamma irradiation, electron beam irradiation, ethylene oxide gas, moist heat, hydrogen peroxide gas plasma and hydrogen peroxide/peracetic acid gas plasma. The residual activity was not further inactivated by any of the sterilization methods tested even in stronger conditions.

Keywords endotoxin inactivation, *Limulus* gelation activity, sterilization, gamma irradiation, electron beam, ethylene oxide, moist heat, gas plasma, dry heat

1. はじめに

エンドトキシン(細菌由来内毒素)に汚染されたディスポーザブル医療用具を使ったために、患者が悪寒や発熱の症状を訴えるという医療事故がたびたび発生している。

このエンドトキシンは、自然界に存在する最も強力な発熱性物質で、熱や化学薬品に対して安定性を有しているため、エンドトキシンがディスポーザブル医療用具にいったん汚染すると、そのエンドトキシンを除去することが非常に困難となっている。

このため、ディスポーザブル医療用具の製造業において、エンドトキシンフリーの製品をいかに製造するかが品質管理上で重要な課題となっている。

そこで、われわれはエンドトキシンの不活化や除去法の開発の一環として、各種滅菌処理によって乾燥エンドトキシンが不活化できるか否かの検討を行ったので報告する。なお、滅菌処理としてはディスポーザブル医療用具の滅菌法に汎用されている4つの方法、および新しく開発された2つの方法を採用した。

2. 方法

2.1 試料

試料としては、エンドトキシンを15mL ガラス製バイ

アル瓶にて凍結乾燥したものをを用いた(濃度: 0.5×10^6 pg/瓶)。なお、エンドトキシンは *Escherichia coli* R3F6 53株由来のものをを用いた。

2.2 回収方法

バイアル瓶底表面から乾燥エンドトキシンを剥離させるために、バイアル瓶に回収液2 mLを加え、各種条件下で回収実験を行った。なお、回収液には日本薬局方注射用水(大塚製薬(株))及びエンドトキシン検出用抽出液(和光純薬工業(株)): ヒト血清アルブミン溶液)を用いた。

2.3 滅菌処理

試料を下記の6つの方法で滅菌処理を行った。なお、比較検討するために250 の乾熱処理も行った。

線処理: 当所の185TBq コバルト-60 (^{60}Co)

線照射装置を用い、種々の線量の線を照射した。

電子線処理: ダイナミترون型電子照射装置(日本照射サービス(株))を用い、加速電圧4.8MeV、ビーム電流20mA、搬送速度11m/minの条件下で種々の線量の電子線を照射した。

酸化エチレンガス処理: Biological indicator evaluator resistometer for ethylene oxide 指標体抵抗評価装置(Joslyn Valve Corporation)を用い、濃度600mg/L、温度54、湿度60%RHの条件下で酸化エチレンガス処理を行った(Fig.1)。

高圧蒸気処理: Biological indicator evaluator resistometer for moist heat 指標体抵抗評価装置

*放射線応用技術グループ

**国立医薬品食品衛生研究所

(Joslyn Valve Corporation) を用い、温度121 の飽和水蒸気処理を行った。

過酸化水素低温ガスプラズマ処理：Sterrad 100装置（ジョンソン・エンド・ジョンソン（株））を用い、濃度6mg/L、温度24、湿度60%RH、時間75分の条件下でプラズマ処理を行った（Fig.2）。この処理過程を1サイクルとして、3サイクルまでの処理を行った。

過酸化水素 / 過酢酸低温ガスプラズマ処理：Plazlyte 装置（Abtox Inc.）を用い、温度33、拡散時間20分、プラズマ時間10分の条件下でプラズマ処理を行った。この処理過程を1サイクルとして12サイクルまでの処理を行った。

乾熱処理：直熱式マuffle炉（（株）いすゞ製作所）を用いて、温度250 の乾熱処理を行った。

2.4 試薬

リムルス試薬にはトキシカラーシステム（生化学工業（株））、また試験用水には注射用水を用いた。

2.5 エンドトキシンの活性値の測定

エンドトキシンの活性値の測定は、リムルス試験合成基質法（マイクロプレート法）によって行った。なお、測定装置にはウェルリーダー SK601（生化学工業（株））を用いた。



Fig.1 Biological indicator evaluator resistometer for ethylene oxide

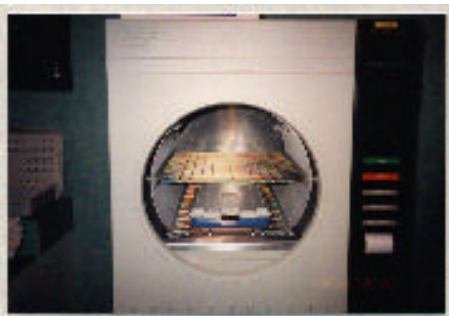


Fig.2 Hydrogen peroxide gas plasma sterilizer

3. 結果と考察

3.1 回収方法の検討

不活化実験に先立ち、まずバイアル瓶から乾燥エンド

トキシンの回収方法を求めた。

エンドトキシンは水によく溶けるため、バイアル瓶に水を加え一定時間室温で放置することによって、簡単にバイアル瓶底表面からエンドトキシンが剥離し、回収できると考えられている。そこで、バイアル瓶に水を加え、1時間放置後、水に回収されたエンドトキシンの量を求めた。その結果、回収率は数%以下で、また再現性は非常に悪かった。そこで、バイアル瓶底表面からエンドトキシンを強制的に剥離させる手段として試験管用ミキサーを使用した。水またはヒト血清アルブミンを回収液に用いた場合、ガラス製ビーズを添加した場合と添加しない場合にわけて、それぞれの回収率を求めた。この結果を Fig.3に示す。なお、点線は100% (5×10^5 pg) 回収できた場合の基準線を示している。

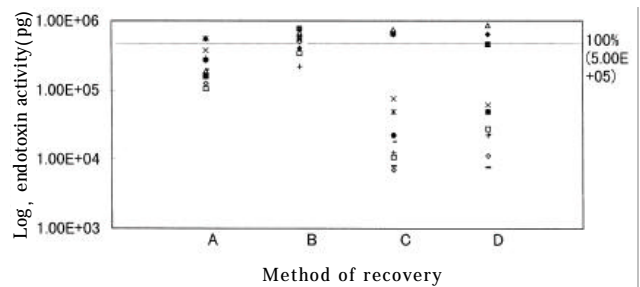


Fig. 3 Recovery of dry endotoxin from glassware by various methods

- A: mixing for 2 min in the water (2mL)
- B: mixing with 10 glass beads (5mm φ) for 2 min in the water (2mL)
- C: mixing for 2 min in albumin solution (2mL)
- D: mixing with 10 glass beads (5mm φ) for 2 min in albumin solution (2 mL)

図から明らかなように、回収液に水を用いて、ガラス製ビーズを加えてミキサーで強く攪拌する方法（B）がエンドトキシンを再現性良く回収できることがわかった。逆に、抽出溶液として販売されているアルブミン溶液を回収液に用いた場合（CとD）では、エンドトキシンを再現性良く回収することができなかった。

上記の結果を踏まえて、滅菌処理によるエンドトキシンの活性値の測定においては、バイアル瓶に2mLの水とガラス製ビーズ（5mm）10個を加えてから、試験管用ミキサーに掛けて1分間以上強く攪拌してから行うことにした。

3.2 滅菌処理によるエンドトキシンの活性変化

ディスポーザブル医療用具の滅菌方法がエンドトキシンの不活化に役に立てば、微生物の滅菌と同時にエンドトキシンの不活化が同時に行え、効果的な方法に繋がる。しかし、過去の研究では既存の滅菌方法ではエンドトキシンの不活化に対して否定的な結果が報告されている。そこで、既存の滅菌方法を過剰処理行えば、エンドトキシンが不活化できるのか、また新たに開発された滅菌方法によってエンドトキシンが不活化できるのかを求めてみた。

線処理：一般にディスポーザブル医療用具の滅菌線量には25kGyの線量が使われている。そこで、滅菌線量の4倍の100kGyまでの線量をエンドトキシンに照射してみた。この結果を Fig.4に示す。図

から明らかなように、線照射による乾燥エンドトキシンの活性変化は、20kGy 近くの線量の照射で93%近くが不活化されるが、それ以降100kGy までの線量を照射しても不活化はほとんど認められなかった。なお、活性の減少率(対数)と線量との関係を1次式に当てはめると、相関係数は0.61であった。

電子線処理：線照射と同じように電子線をエンドトキシんに照射し、その時の活性変化を求めた。この結果を Fig.5に示す。図から明らかなように、電子線照射による乾燥エンドトキシンの活性変化は、19kGy 近くの線量の照射で72%近くが不活化され、それ以降は線量の増加に伴って徐々に不活化されているが、その不活化量は極わずかであった。なお、活性の減少率(対数)と線量との関係を1次式に当てはめると、相関係数は0.87であった。そこで、エンドトキシンの活性を1/10に減少させるに必要な線量(D値)を求めると70kGyであった。

酸化エチレンガス処理：バイオロジカルインジケータの抵抗性評価のために開発された滅菌指標体抵抗性評価装置を用いて、エンドトキシんに酸化エチレンガスを曝露した時の活性変化を求めた(Fig.6)。なお、この時のガス投入時間は65~99秒間、ガス排気時間は69~85秒間であった。図から明らかなように、酸化エチレンガスによるエンドトキシンの活性変化は、30分の曝露時間で76%近くが不活化

されるが、それ以降120分まで曝露しても活性の減少は認められなかった。なお、活性の減少率(対数)と線量との関係を1次式に当てはめると、相関係数は0.62であった。

高圧蒸気処理：酸化エチレンガス滅菌と同様に滅菌指標体抵抗性評価装置を用いて、エンドトキシんに121の飽和水蒸気を曝露した時の活性変化を求めた(Fig.7)。なお、この時の蒸気投入時間は6秒間、蒸気排気時間は10~12秒間であった。図から明らかなように、高圧蒸気処理によるエンドトキシンの活性変化は、2分の処理で89%近くが不活化され、それ以降は処理時間を増やしても活性の減少は認められなかった。なお、活性の減少率(対数)と線量との関係を1次式に当てはめると、相関係数は0.62であった。

過酸化水素低温ガスプラズマ処理：酸化エチレンガス滅菌法の代替法と開発され、最近医療機関で使われてきたガスプラズマ滅菌装置を用いて、エンドトキシンの活性変化を求めた。この結果を Fig.8に示す。図から明らかなように、過酸化水素低温ガスプラズマ処理による乾燥エンドトキシンの活性変化は、サイクル数1回の処理で74%近くが不活化されたが、それ以降は処理サイクルを増やしても不活化は認められな

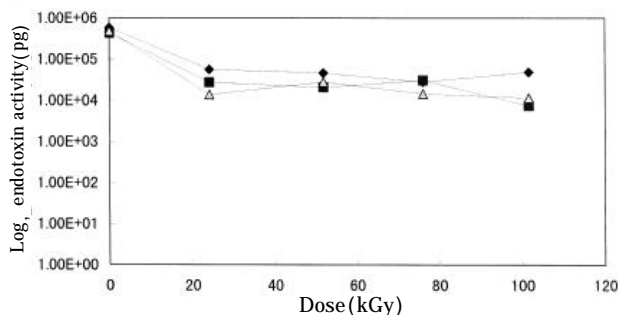


Fig.4 Inactivation of dry endotoxin by gamma-irradiation
γ-ray: 185TBq⁶⁰Co-γ irradiator

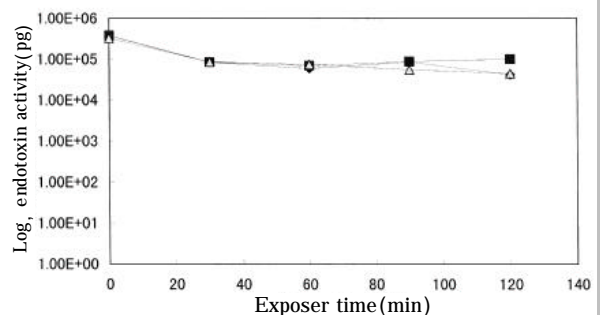


Fig.6 Inactivation of dry endotoxin by ethylene oxide gas
ethylene oxide gas: Biological indicator evaluator resistometer for ethylene oxide, 600mg/L, 54°C, 60%RH

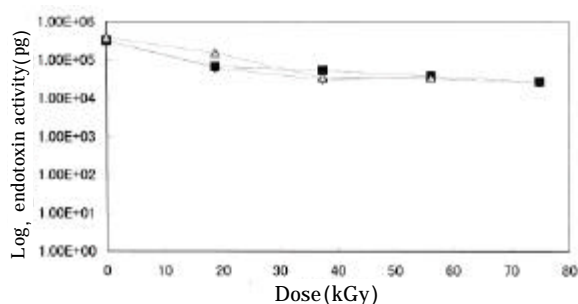


Fig.5 Inactivation of dry endotoxin by electron beam irradiation
electron beam: Dynamics Dynamitron accelerator, 4.8MeV, 20.0mA, 11.0m/min

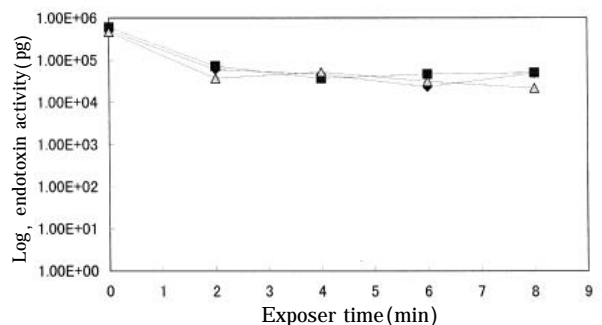


Fig.7 Inactivation of dry endotoxin by moist heat
moist heat: Biological indicator evaluator resistometer for moist heat, 121°C

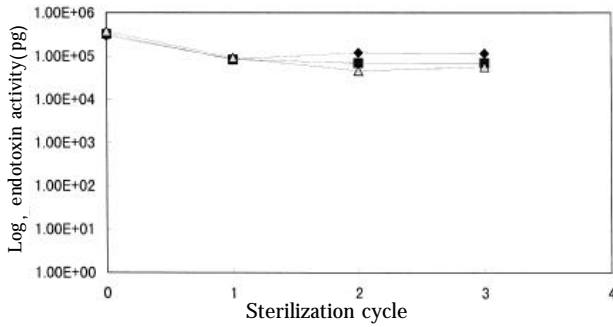


Fig. 8 Inactivation of dry endotoxin by hydrogen peroxide gas plasma
hydrogen peroxide gas : Sterrad 100, 6mg/L, 24°C, 60%RH, 75min

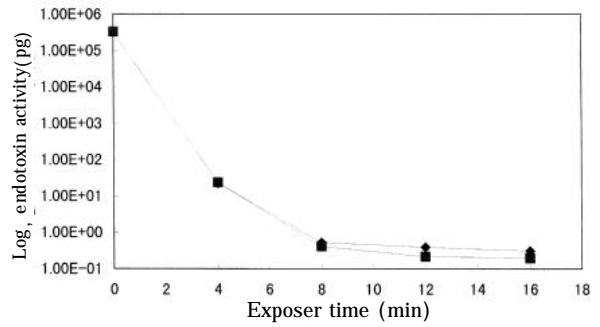


Fig. 10 Inactivation of dry endotoxin by dry heat
dry heat : directly heated muffle furnace, 250°C

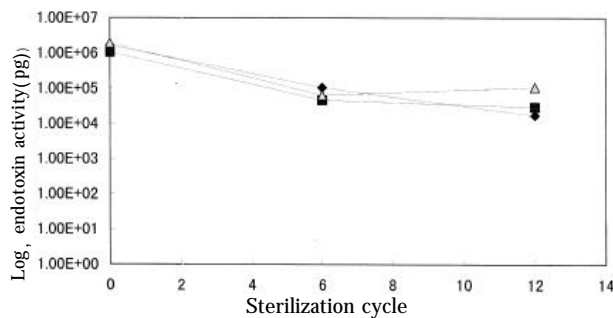


Fig. 9 Inactivation of dry endotoxin by hydrogen peroxide/peracetic acid gas plasma
hydrogen peroxide / peracetic acid gas : Plazlyte, 33°C, vapor soak time 20min, plasma phase time 10min

った。なお、医療機関での医療用具の滅菌には1サイクルの処理が行われているのが一般的である。

過酸化水素/過酢酸低温ガスプラズマ処理：本滅菌装置はわが国の医療機関に導入されていないが、上記のガスプラズマ滅菌装置とは違った薬剤の組み合わせを行っているため、本装置でエンドトキシンの処理を行った。この結果を Fig. 9 に示す。図から明らかなように、過酸化水素/過酢酸低温ガスプラズマ処理による乾燥エンドトキシンの活性変化は、サイクル数6回の処理で95%近くが不活化されたが、サイクル数を増やして12回処理を行っても活性の変化は認められなかった。

以上、6つの滅菌法による乾燥エンドトキシンの不活化変化を求めたが、6つの方法とも同じようにエンドトキシンの7~9割近くを不活化できるが、残りの部分を不活化することは困難であることがわかった。

エンドトキシンは化学的にリポ多糖であり、その活性部位はリポド A であることが知られている。そして、このリポド A はジグルコサミン、リン酸、脂肪酸を構成因子とし、いずれの因子も活性に大きく関わっている。このため、これらの因子を分解または化学的修飾することでエンドトキシンの活性を消失させることが可能と考えられる。今回用いた滅菌法では、上記因子のいずれか一部の弱い部位を分解または化学的に修飾し、エンドトキシンの7~9割(1 Log)近くの活性を失わせたも

のと考えられる。しかし残りの活性部位は過剰滅菌処理しても消失させることはできなかった。このように単独の滅菌法では乾燥エンドトキシンの不活化(3 Log以上の減少)は難しい。

水溶液中のエンドトキシンが線/次亜塩素酸ナトリウムを併用することで、効率良く不活化できたように、今後は相乗効果を期待できるような滅菌法の併用を検討する必要がある。その可能性として、Fig. 10には乾熱処理したエンドトキシンの活性変化を示す。250と高熱ではあるが、エンドトキシンを確実に分解し、その活性を消失させていることがわかる。このように、熱との併用効果を考える必要がある。

4.まとめ

6種類の滅菌法による乾燥エンドトキシンの活性変化をリムルス試験で調べた。この結果、乾燥エンドトキシンは線、電子線、酸化エチレンガス、高圧蒸気、過酸化水素ガスプラズマ、過酸化水素/過酢酸ガスプラズマによって7~9割近く不活化されるが、残りの活性部分は過剰な条件で滅菌処理しても不活化することができなかった。今後は、乾燥エンドトキシンの不活化方法としては、2種類以上の滅菌方法を併用し、相乗効果を検討する必要がある。

謝辞 滅菌処理にご協力をいただきました川澄化学工業(株)、サクラ精機(株)、ジョンソン・エンド・ジョンソン(株)、(株)ニッショー、日本照射サービス(株)、(株)千代田製作所の各社に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) S. Guyomard, V. Goury, J. C. Darbord: Radiat. Phys. Chem., 31, 679-684(1988).
- 2) 細淵和成, 棚元憲一: 東京都立産業技術研究所研究報告, 1, 113-116(1998).

(原稿受付 平成11年8月9日)