

ガンマ線滅菌に必要な微生物試験

2024年04月17日

株式会社コーガアイソトープ
滅菌研究センター
廣庭 隆行



目 次

- ・ 当社のご紹介
- ・ ガンマ線滅菌に必要な微生物試験
- ・ 微生物試験に必要な設備のご紹介
- ・ 微生物迅速同定について
- ・ エンドトキシン測定について
- ・ まとめ



株式
会社

コーガアイソフ

当社の紹介



所在地：滋賀県甲賀（こうか）市



沿革

	(社)日本アイソトープ協会 甲賀研究所	(株)コーガアイソトープ
1981年 5月	(社)日本アイソトープ協会 甲賀研究所として関西初の 受託照射サービスを開始 (微生物試験受託開始)	
1981年10月		(株)甲賀ラジオアイソトープ 研究所として設立 (1989年 現社名に変更)
1987年 1月		自社施設として1号機を竣工
2006年 8月		2号機を竣工
2009年 6月	役目を終えたとして甲賀 研究所を譲渡	(社)日本アイソトープ協会より 甲賀研究所の事業を譲受 (現 第二工場 3号機および 滅菌研究センター)



許可・認証

放射性同位元素使用許可	(本社工場) 許可番号 使第3892号 (第二工場) 許可番号 使第5639号
医薬品製造業	許可番号 25AZ200011
医療機器製造業	登録番号 25BZ000066
化粧品製造業	許可番号 25CZ200029
再生医療等製品製造業	許可番号 25FZ110002
ISO9001	認証番号 1210025874TMS
ISO13485,11137-1 (微生物試験を含む)	認証番号 Q4N170456184007
ISO14001	認証番号 JQA-EM5984

コーガアイソトープ業務内容

ガンマ線照射受託サービス

当社が受託している主な製品例

滅菌・殺菌

改質



医療機器
衛生用品



医薬品



化粧品



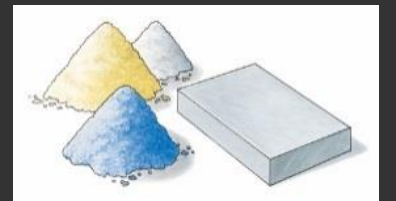
包装容器
包装資材



実験動物
飼料



検査器具



高分子
材料の改質

売上の半分が医療機器

小分け包装も
受託しています



株式会社 コーガアイソトープ

ガンマ線滅菌の実施例（医療機器）

縫合糸

ダイアライザー
（人工透析膜）



人工関節

シリンジ

ランセット

医療機器の滅菌と滅菌研究センター

透析器や体内埋め込みの医療機器は滅菌保証とその維持が必須となります。

継続的に微生物試験が必要（設備・経験要）

放射線滅菌専門の微生物試験の受託機関として40年の研究を行っています



ガンマ線滅菌に必要な微生物試験



滅菌とは

- 殺菌・滅菌

有害菌を問題ないレベルまで減らす

- 滅菌

検証された方法で生育可能な菌が存在しない状態
する

保証が必要

滅菌保証は確率に基づいている

日本では無菌性保証 10^{-6} で滅菌

薬生監麻発1021第5号 滅菌バリデーション基準

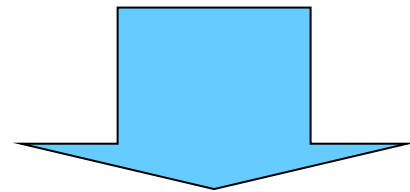


株式会社

コーガアイソフ

S A L = 10^{-6} の意味とは？
無菌性保証レベル
(sterility assurance level)

滅菌後の菌数を100万分の1個にすること☆

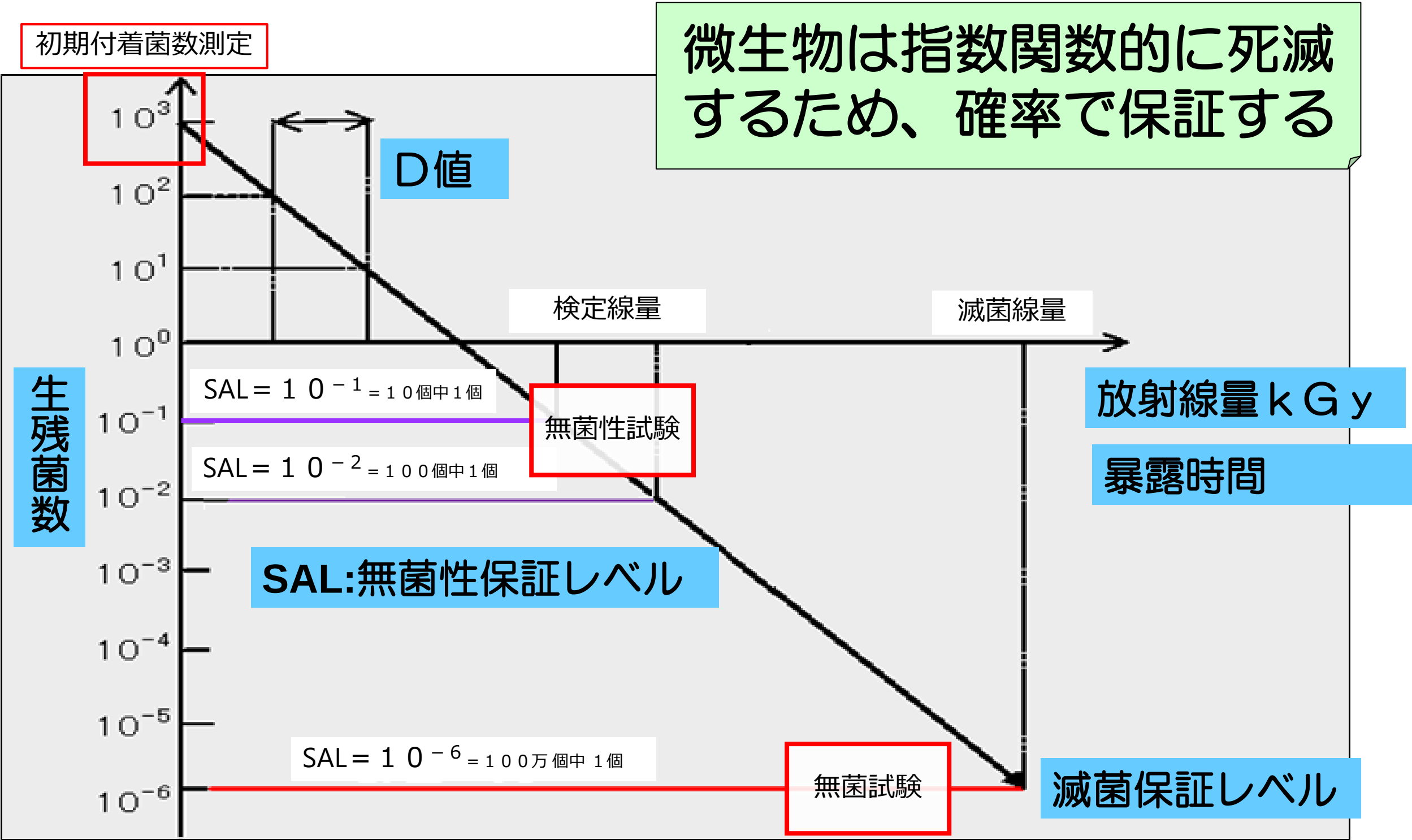


いかえれば

100万個の製品の中の菌の存在確率が1個以下になっていること

⇒科学的な証明が必要

滅菌保証(ISO11137-2) と微生物試験



ガンマ線滅菌に必要な微生物試験とは

微生物試験

- ◆菌数（バイオバーデン）測定試験
- ◆無菌性の試験
- ◆微生物同定試験（MALDI TOF-MS、遺伝子同定）



菌数測定・無菌性の試験



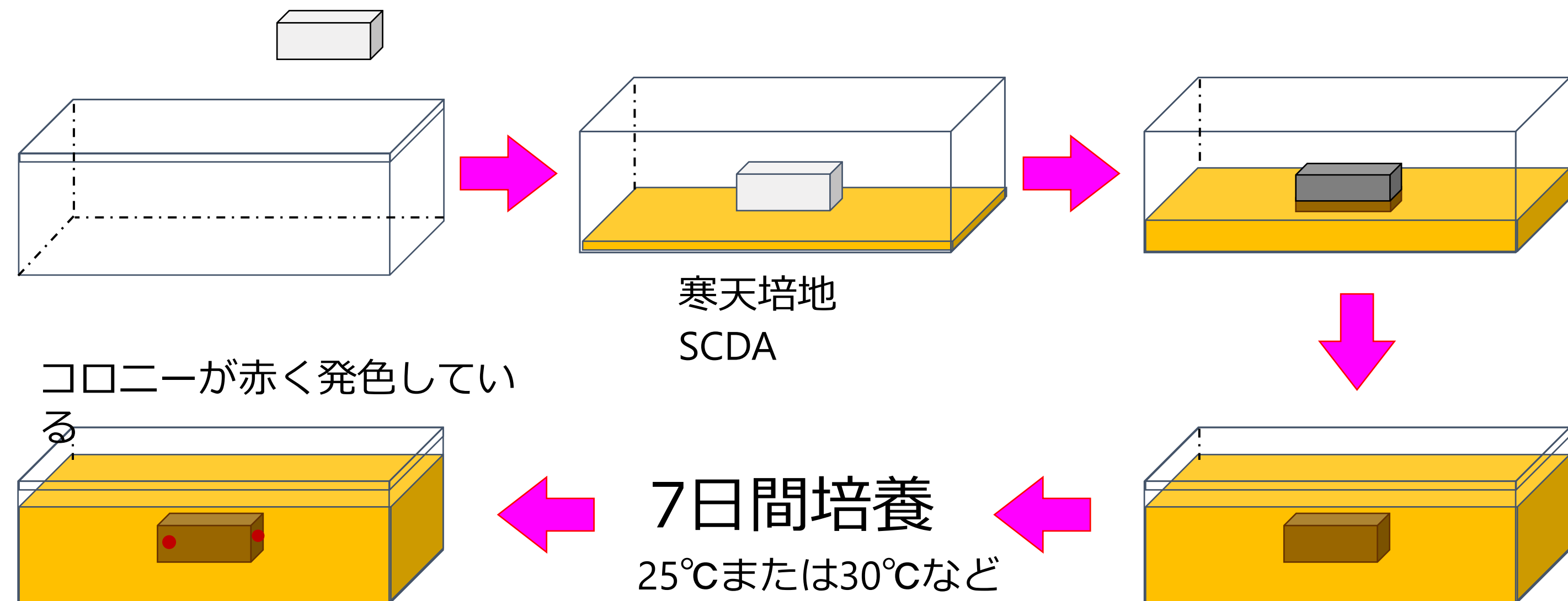
エンドトキシン測定

菌数（バイオバーデン）測定のための目的

1. 滅菌線量を設定するために、滅菌前の製品に
どれだけ菌数が付着しているかを調べる必要がある
2. 定期的に付着菌数を測定し、線量設定時と
変わっていないことを確認する
－ ここまでは規格要求事項 －
3. 製品の原材料・製造環境・工程の管理と改善の
ために付着菌数を測定・同定 ➡ 動態管理
(ISO11737-1:2018 8.1 定めた頻度で
日常のバイオバーデンを測定しなければならない)

寒天重層法

製品を寒天培地中に埋没させて、生成するコロニー数を菌数として測定する方法



寒天重層法の結果

未照射



86個

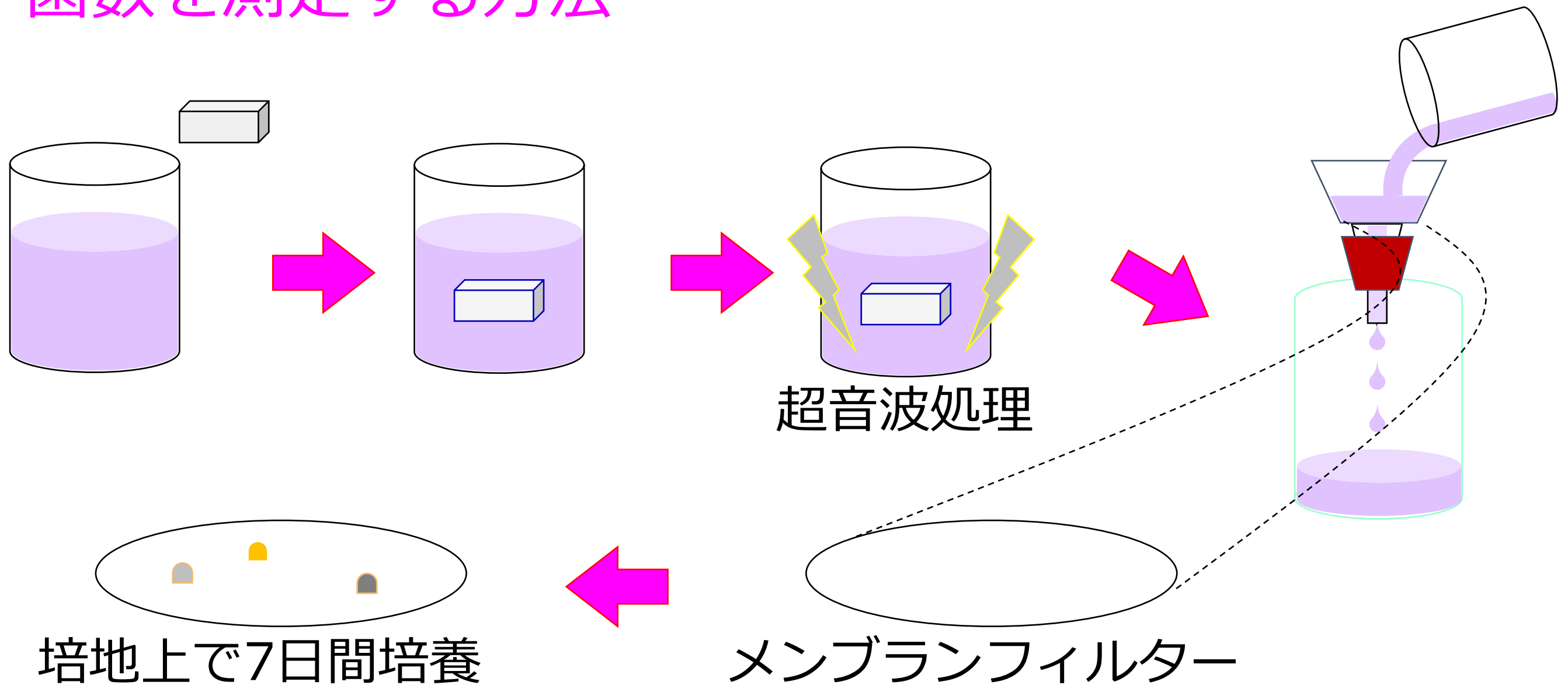
照射後



0個

微生物の取出し (超音波法)

製品を超音波処理することで、製品に付着している菌を洗い出し、洗浄液をフィルターろ過することで、**菌数を測定する方法**



浸漬法、回収法の特徴

	浸漬法	回収法	併用法
回収率試験	不要 計数効率試験が望ましい	添加回収試験のため自然な回収率ではない 回収率試験必要	自然な状態での回収となる 計数効率試験が望ましい
菌数が多い時	数え落としの可能性あり	洗浄液を希釈して測定が可能	洗浄液を希釈して測定が可能
菌数が少ない時	精度が高い	過大評価になりやすい	精度が高い
汚染の位置	分かる	分からない	一部わかる
菌の選択性	酸素要求の強い菌が生えにくい	疎水性の菌は取れづらい	いずれも検知できる

無菌性の試験の目的

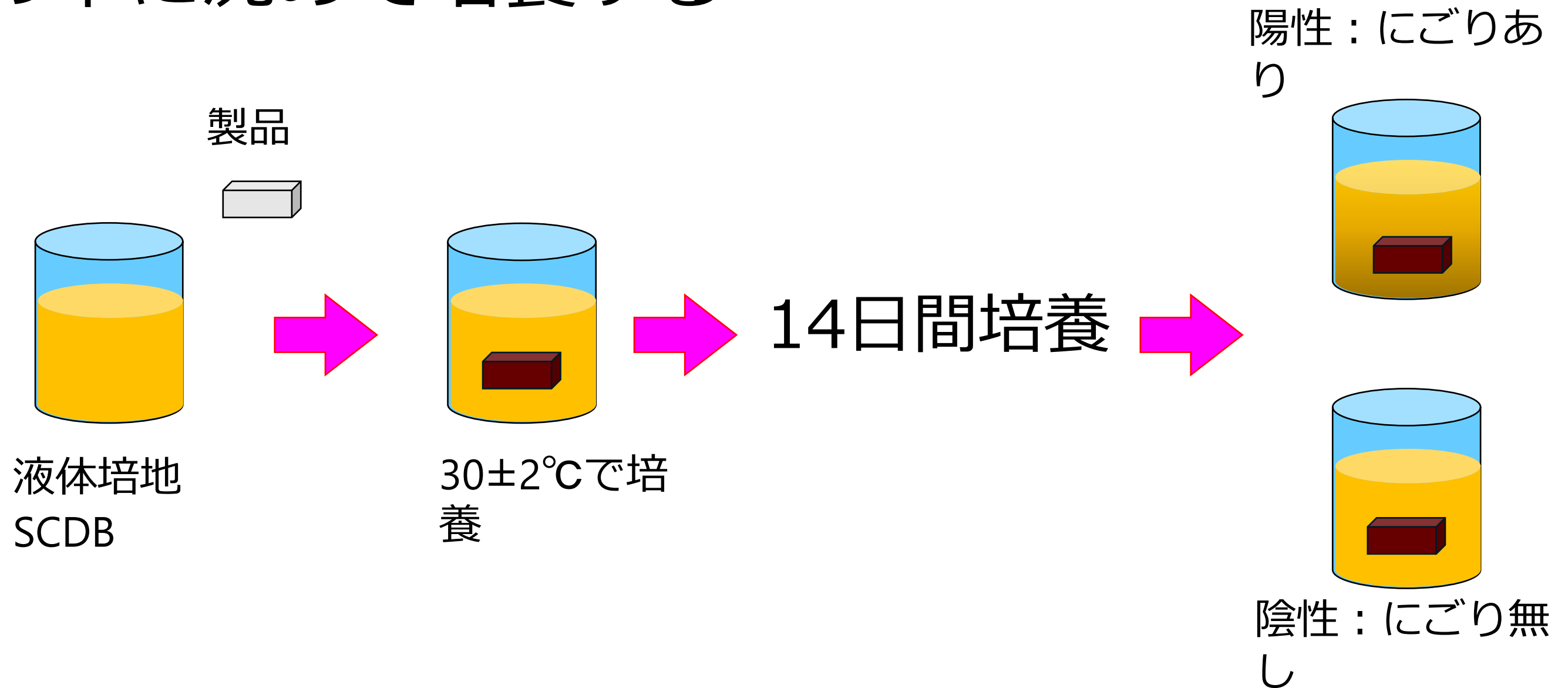
生育可能な菌の有無を判定する試験

滅菌に比べて弱い放射線（検定線量）を照射した製品の
無菌のレベルを調べる試験。滅菌保証の要となっている。
（この場合は**無菌性の試験**と言います）

EOG、AC滅菌にて処理後に製品の無菌工程を確認する
ために実施する試験は**無菌試験**と言って区別しています。
**無菌試験だけで滅菌の保証するには100万個の製品を
試験する必要があります**

無菌性の試験実施方法

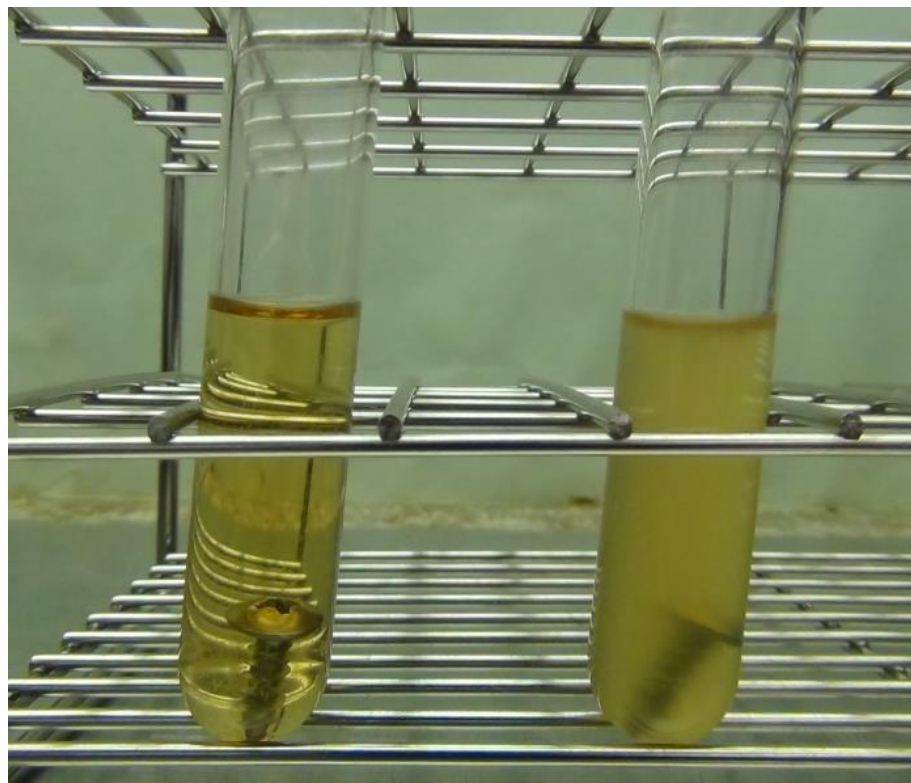
製品を液体培地に直接投入し、製品全体を培地の中に沈めて培養する



無菌性の試験の判定

菌の存在が確認されない 陰性

菌の存在が確認される 陽性



陰性

陽性

菌の存在が確認されるとは？

- ・培地の濁り
- ・培地の臭い
- ・培地の色の変化 等

微生物同定の目的

未滅菌製品に付着している菌や無菌性試験で陽性となった菌の種類を調べる。

- ・ **ISO規格11737 – 1の要求事項** となっている
第三者認証 機関の監査で指摘されている事例もあります
11737-1はEOG、ACも同様。
特にEOGは、ISO11135でも11737-1による付着菌の推定が要求されている(7.3.2)。

微生物同定の目的

- ・ 線量設定試験時と菌種が異なると菌の抵抗性も変わっているため、定期監査試験に不合格になる恐れがある。
放射線抵抗性の強い菌が検出されたら、汚染源の特定と洗浄などの対策が必要。
- ・ 付着菌数を安定的に低減させるため、同定結果をもとにどこから混入したかを推定する（参考情報を参照）
- ・ グラム陰性菌が検出されると発熱性物質（エンドトキシン）が残留している恐れがある。
（ただ、乾燥に弱いものが多いので、
バイオーバーデンでは検出されない場合もある）

微生物のD値

微生物の種類	D値 (kGy)
大腸菌	0.2
サルモネラ・センフテンベルグ	0.2
黒カビ	0.5-0.8
ブドウ球菌	0.7
枯草菌(芽胞)	2.0-2.5
<i>Bacillus pumilus</i> (芽胞)	1.6-3.6
ミクロコッカス・ラジオルランス	2.5
ボツリヌス菌A型	3.1

微生物の種類によって
放射線に対する
抵抗性が異なります。

(「放射線滅菌の現状と展望」, (社)日本アイソトープ協会, 1998、

「食品照射の効果と安全性」, (財)日本原子力文化振興財団, 1991 より)

微生物の同定試験方法

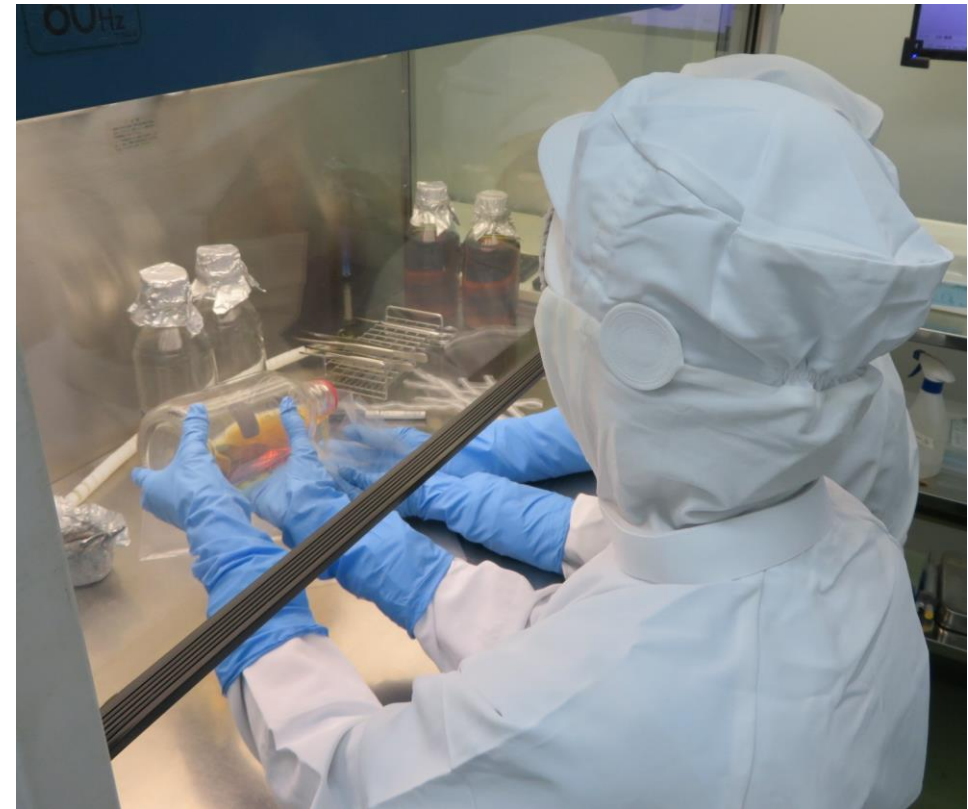
検出された菌の属や種を判定するための試験です。以下の2つの方法で実施しています。

1. **プロテオーム法(MALDI法)** :
微生物のタンパク質を質量分析計**MALDI-TOF MS**で分析し標準菌と比較して同定。
信頼性も高く迅速かつ安価
2. **遺伝子同定法** : リボソーム遺伝子のRNA塩基配列を解析することで同定。現在の系統分類の基礎となっている同定法

微生物試験に必要な設備のご紹介



微生物試験の設備 (交差汚染を防止するための作業環境)



無菌性の試験の実施中
の作業状況

クリーンベンチ

クラス100（日本薬局方：グレードA）

試験前後に清浄度の確認を行っています



株式会社 コーガアイトーフ

微生物試験の設備



恒温槽（インキュベーター）

各種培養温度（20～25℃、28～32℃、30～35℃）に対応しています
庫内の温度は自動温度記録計にて連続的に監視しています

微生物試験の設備



大型超音波洗浄機



ストマッカー

バイオバーデン回収用装置

製品からのバイオバーデンを回収するための装置として、**超音波洗浄機**
ストマッカー、**振とう機**、**ボルテックスミキサー**等があります
製品の性状により使い分けます

微生物試験の設備



オートクレーブ滅菌器

培地／試薬の滅菌を行います

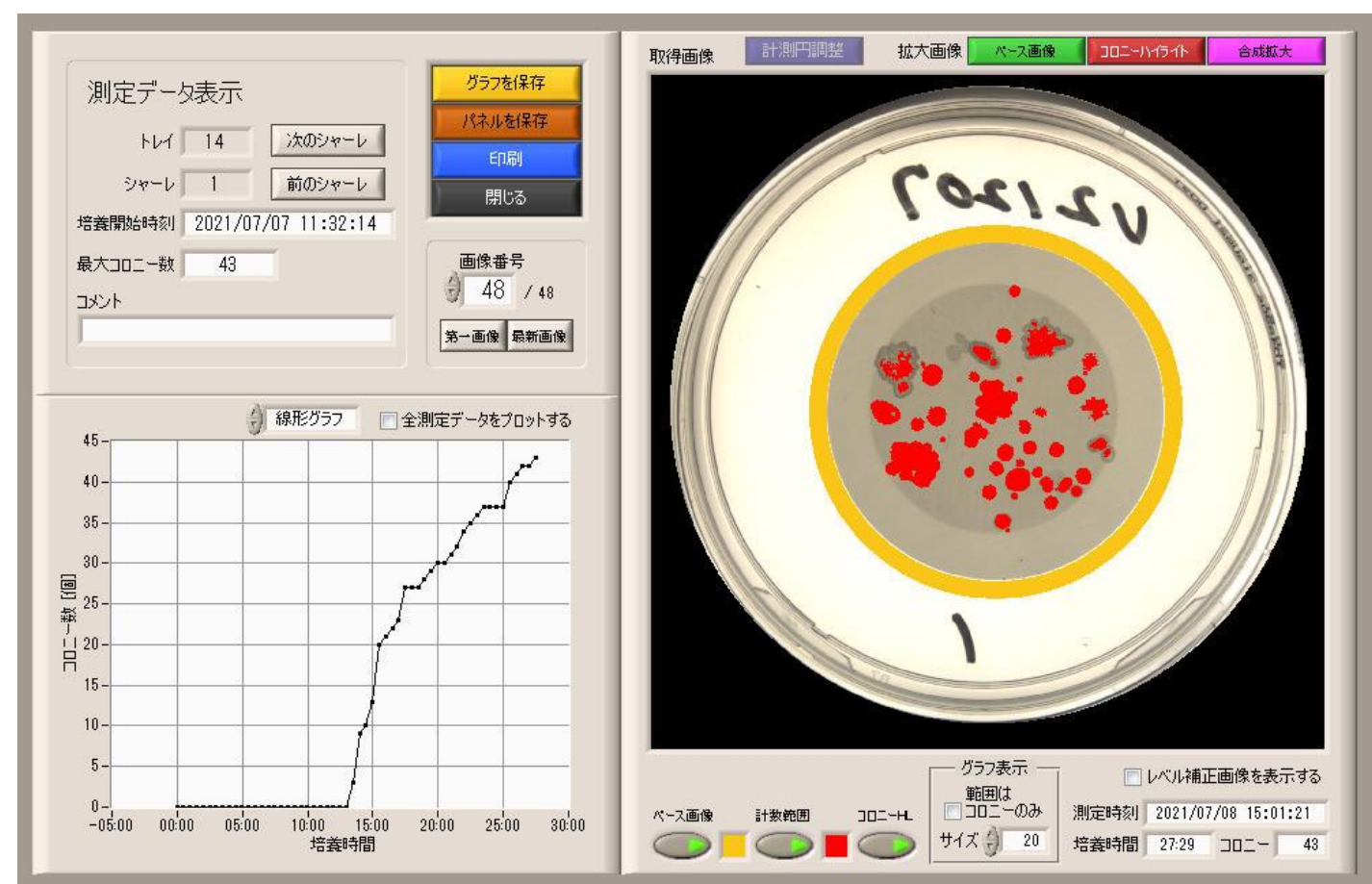


乾熱滅菌器

通常の滅菌条件（160～170℃）だけではなくエンドトキシンの不活化（250℃）まで対応します

金属／ガラス器具の滅菌を行います

微生物試験の設備 (自動コロニー観測装置の導入)



シャーレ設置用のトレイ

μ3D オートスキャナー

高感度CCDカメラにて30分毎にシャーレを撮影し、画像の変化を自動的に比較してコロニーとそれ以外の判別が可能

高感度、迅速観察が可能

コロニー測定データ

コロニー数のトレンドグラフ
カウントされたコロニー画像

微生物迅速同定について



当社のMALDI-TOF MS 同定システム

ブルカー社製の微生物同定システム

臨床検査を含めて国内の200施設で微生物同定装置として導入・使用されています

菌体成分を質量分析計により測定し、標準菌と照合して解析する方法です。

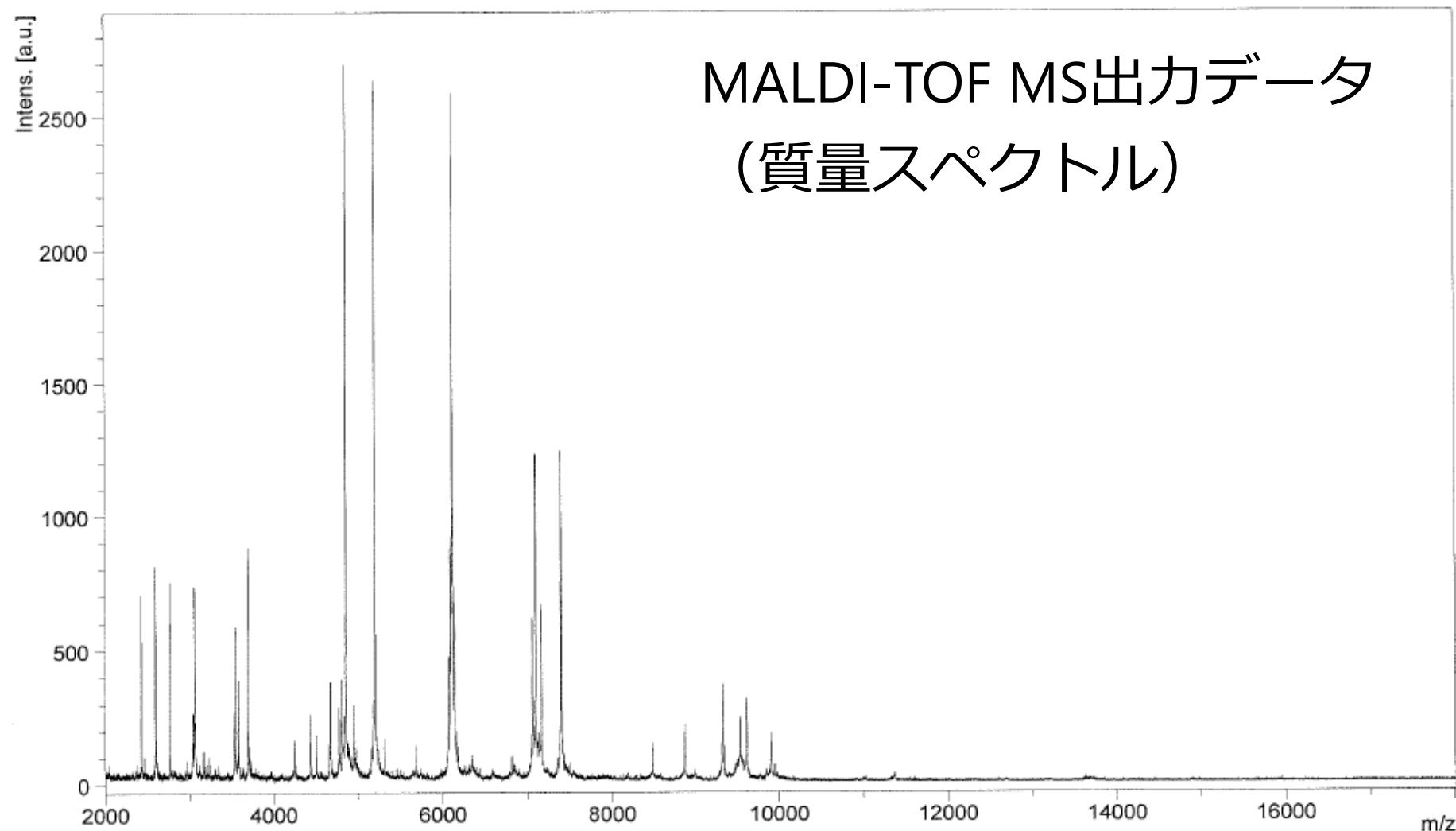
遺伝子同定法や生化学的性状による同定と比較して、格段に迅速に菌名が得られます

- ・微生物を種レベルで同定可能
- ・16S rRNAシーケンシングの結果と高い一致率
- ・コロニーから数十分で同定



判定

微生物固有のタンパク質パターンを標準菌のパターンとマッチングすることで同定します



マッチング解析の結果は評価値で示される

評価値

2.00~3.00	信頼性が高い同定結果
1.70~1.99	信頼性が低い同定結果
0.00~1.69	同定不能

微生物同定試験の設備

Thermo Fisher SCIENTIFIC社製

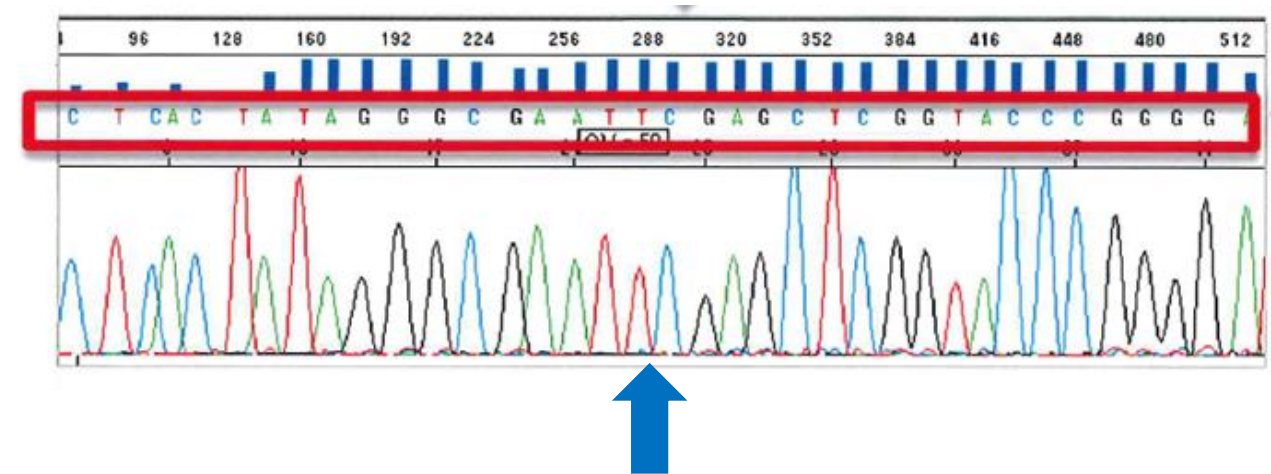
微生物遺伝子同定システム

医薬品製造分野において、世界各国で採用されているシステム
本方法はリボソームRNA遺伝子の塩基配列を解析し、
データベースと照合することで菌を同定する手法です。



遺伝子同定装置

DNAシーケンサ（DNAの塩基配列を読み取る装置）及びサーマルサイクラー（被検菌の標的DNAの増幅（PCR）に用いる装置）



塩基配列データ

リボソームRNA遺伝子の塩基配列を解析し、データベースと照合することで菌を同定します

当社が受託している微生物迅速同定法

	測定時間	対象	特 徴
プロテオーム法 (MALDI法)  MALDI Biotyper ブルカー社製	10~30 分間	細菌 酵母	微生物のタンパク質を分析して同定 信頼性も高く迅速かつ安価である
遺伝子型分析  Thermo Fisher SCIENTIFIC社製	8~10時間	細菌 カビ 酵母	リボソームRNA遺伝子の塩基配列を解析することで同定 現在の系統分類の基礎となっている



当社の同定試験フロー



同定菌の参考情報 例

同定報告書速報と同時に
弊社のデータベースに記載
のある菌については、
以下の情報を参考として
送付いたします。

- ・ 菌の情報
- ・ 菌名の日本読み
- ・ 放射線抵抗性（D 値）
- ・ BSL（日本細菌学会のバイオ
セーフティレベル）

同定菌の参考情報

<i>Acinetobacter baylyi</i>（アシネトバクター・バイリイ） D値：— kGy，BSL分類：記載なし 大きさ1.0～1.5×1.5～2.5μmの球桿菌で、発育に酸素を必要とし、運動性はない。カタラーゼ試験陽性、オキシダーゼ試験陰性で、ブドウ糖非発酵型のグラム陰性菌である。
<i>Staphylococcus epidermidis</i>（スタフィロкокカス・エピデルミディス） D値：— kGy，BSL分類：BSL1* グラム陽性の球菌でコアグラール陰性のブドウ球菌である。人間の皮膚表面、鼻腔などの最も普遍的な常在菌であり、表皮ブドウ球菌と言われる。通常は非病原性であり、他の病原菌から表皮を守るバリアとしての役割が知られるが、体内に侵入すると病原性を発することもある。酸素のあるところでも酸素のないところでも増殖できる通性嫌気性菌である。比較的乾燥に強い菌である。空中浮遊菌としても検出される。
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>（ステノトロホモナス・マルトフィリア） D値：— kGy，BSL分類：BSL1* 本菌は、土壌、水、植物などのさまざまな環境で見られる好気性のグラム陰性菌でブドウ糖非発酵型菌でもある。鞭毛を有するため運動性がある。また、病院環境でも発生し、血流感染症、呼吸器感染症、尿路感染症、手術部位感染症を引き起こす可能性がある。細胞の大きさは、幅1.5μmで長さ1.5～2.5μmである。一般的な栄養寒天培地でのコロニーの色調は、淡い黄色である。カタラーゼ及びオキシダーゼ試験は陽性である。生育温度は20～42℃で、最適温度は30～35℃である。pHは5～9で最適pHは6～7である。
<i>Bacillus horneckiae</i>（バチルス・ホルネキアエ） D値：— kGy，BSL分類：記載なし 本菌はケネディ宇宙センターのクリーンルームより分離された<i>Bacillus</i>属の芽胞形成菌である。好気性のグラム陽性桿菌（幅が1～1.5μm、長さが4～6μm）で、運動性がある。細胞の末端に横円形の芽胞を形成する。生育温度は5～40℃で、最適温度は30℃であり、pHは7～10で、最適pHは7であった。NaCl塩濃度は10%の存在下でも生育できた。ソイビーンカゼインダイジェスト寒天培地で32℃で24時間培養後のコロニーは、黄色がかった無地で、直径は3mmで、コロニーの縁は不規則な形であった。芽胞は紫外線に対して抵抗性であった。芽胞は熱、紫外線、放射線、化学薬品に対して抵抗性を示す。
<i>Bacillus horikoshii</i>（バチルス・ホリコシイ） D値：— kGy，BSL分類：記載なし 本菌は、土壌より分離された好アルカリ性菌で、<i>Bacillus</i>属の芽胞形成菌である。好気性の桿菌（幅が2～0.7μm、長さが0.7～4μm）でグラム陽性菌である。細胞の準末端に横円形の芽胞を形成する。芽胞形成期細胞は幾分膨化する。生育温度は10～40℃であり、pHは7～8で、最適pHは8であった。NaCl塩濃度は2～9%の存在下で生育できた。コロニーは小さい円形で、縁全体が光沢のある表面で、色調は光沢のある白色である。芽胞は熱、紫外線、放射線、化学薬品に対して抵抗性を示す。

無断で 本資料の一部を複製して使用しないでください。
BSL分類は「BSL1*」以上の菌種を記載しています。「BSL1*」は日和見病原体を意味します。
本資料は、当社の知見、WEB資料、保有する文献・データを参考に作成しています。
本資料の取り扱いにより生じた不利益については、当社は責任を負いません。
参考資料としてご利用ください。



エンドトキシン測定試験について



エンドトキシン測定が必要とされる理由

エンドトキシンは**グラム陰性菌**の**細胞壁**の構成成分であり、菌が死んでも残留する。

⇒つまり環境中のどこにでもあり、陰性菌の有無で変化する

エンドトキシンは**発熱物質**であり、非常に微量でも体内に侵入すると**発熱、炎症、ショック症状**などを引き起こす。

⇒血液と接触、体内に入る製品にはエンドトキシンがないことを定期的に確認することが必要となる

グラム陰性菌とは

グラム染色による菌の識別による分類

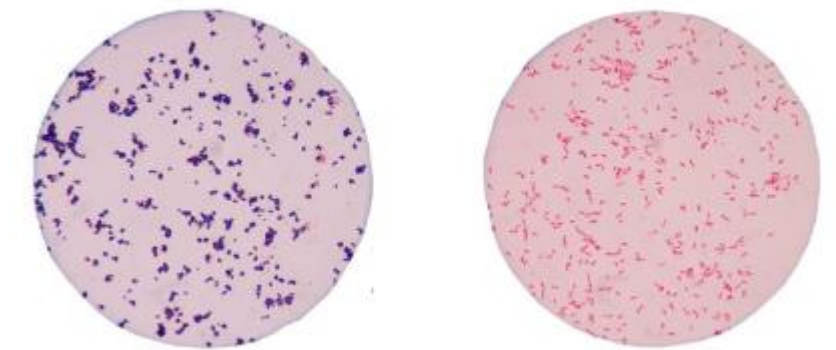
- ・グラム陽性菌

細胞壁が厚く紫で染まると色が落ちない

乾燥に強い

土壌、空中浮遊菌

バチルス属



グラム陽性菌

陰性菌

- ・グラム陰性菌

細胞壁が薄く、染まっても色が落ちる

乾燥に弱く水付近に多くいる。

腸内細菌など

細胞壁にエンドトキシンを持つ 死滅しても毒素は残る

エンドトキシン測定受託の背景

ガンマ線滅菌の対象となる医療機器等の以下の製品では、生物学的安全性試験として、発熱物質（エンドトキシン）の測定が推奨され、評価不要と判断する場合にはその理由を明確にすると記載されている。（薬生機審発0106第1号 令和2年1月6日）

- ・インプラント（体内埋め込み製品）
- ・血液と接触する製品（例）注射針、注射筒、メス等
- ・透析関連（体内と体外を連結する）製品
- ・再生医療関連製品 など

当社が線量設定・監査と同時に受託することでメーカー様の利便性に貢献できると判断し、受託を開始した。



株式会社

コーガアイソフ

医療機器の承認申請等に必要な 生物学的安全性評価 (薬生機審発0106第1号)

項目

細胞毒性、刺激性、発熱性、全身毒性他

多くは、材質や製造方法が変わらなければ、申請時に一度データを取っておけば問題ない

発熱性⇒ グラム陰性菌由来のエンドトキシン

製造開始後にも大きく変化する可能性有

さらに乾燥に弱いいため、死滅していてバイオバーデンには検出されなくても、毒素であるエンドトキシンは残っている可能性がある。

以上から定期的な測定をお勧めしています。

参考 エンドトキシン測定要求根拠 (FDA)

特に対象品をアメリカに輸出されているメーカーでは毎製造ロットごとの測定が求められているとお聞きしています。

Submission and Review of Sterility Information in
Premarket Notification (510(k)) Submissions for
Devices Labeled as Sterile

(<https://www.fda.gov/media/74445/download>)

P.7 The sponsor should provide the information outlined below:

2. a statement confirming that endotoxin testing will be conducted **on every batch**

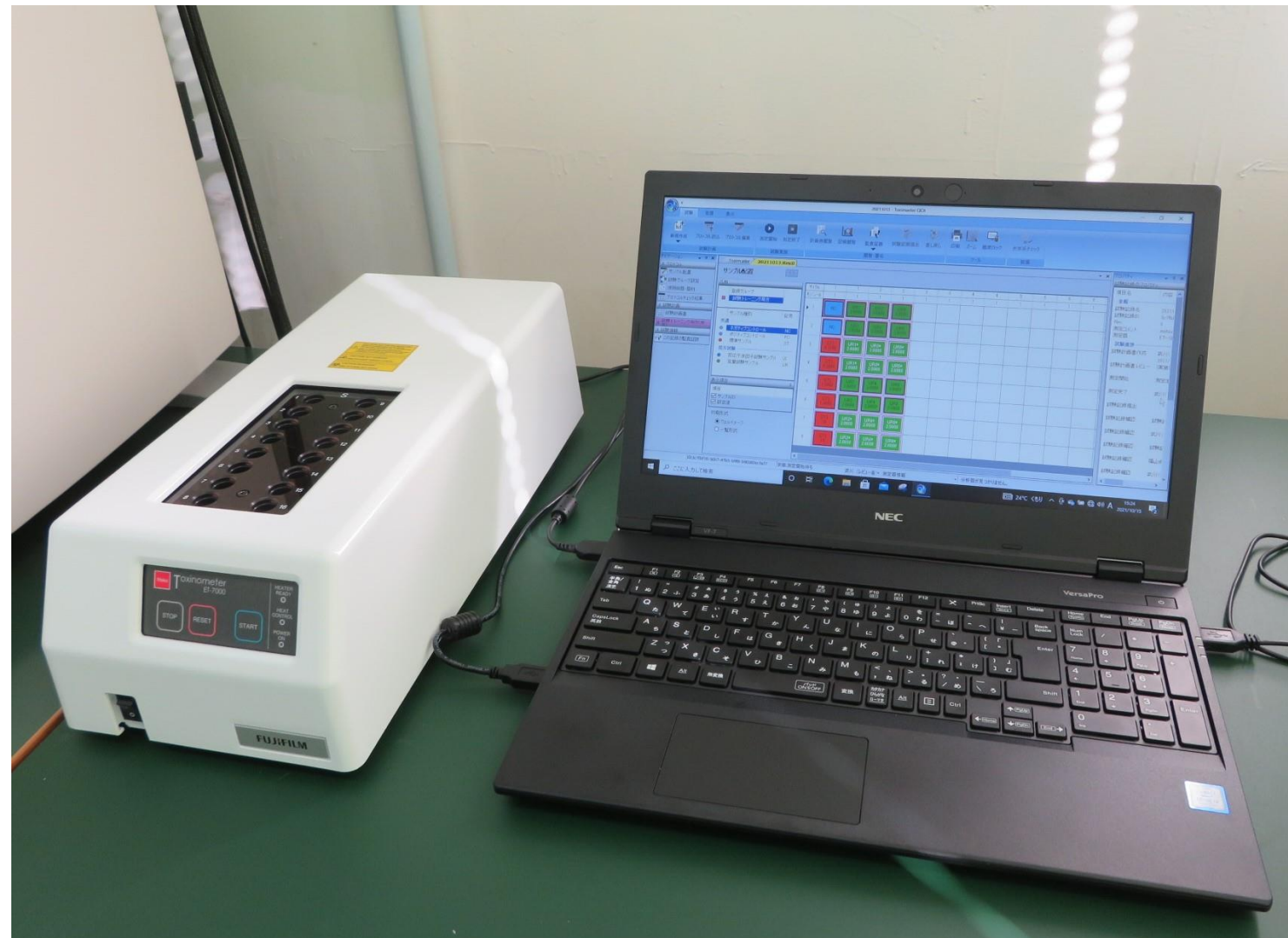
エンドトキシン測定原理

エンドトキシンはカプトガニの血球抽出物から作られる試薬（**ライセート試薬**）と反応する。

ライセート試薬の溶液にエンドトキシンを混ぜると溶液が**ゲル化**または**発色**する。

またエンドトキシン濃度によりゲル化、発色に至る時間が異なるためにエンドトキシン濃度を定量することができる。

エンドトキシン測定装置



富士フイルム和光純薬（株）社製
トキシノメータ ET-7000

2022年5月よりエンドトキシン試験の受託を
はじめました。



株式会社

コーガアイソフ

エンドトキシン測定法

以下の方法うち、比濁法と比色法を受託しています

測定方法	準拠規格	試験内容
ゲル化法	日本薬局方	・ 限度試験 ・ 定量試験
比濁法	日本薬局方 米国薬局方	・ 溶液が試薬と反応してゲル化する ・ ゲル化して白濁するため透過光量が少なくなる
比色法	日本薬局方	・ 溶液が試薬と反応してゲル化する ・ ゲル化とともに黄色に変色し、透過光量が少なくなる

エンドトキシン測定ご依頼にあたって

以下の情報をお教えてください

1. 製品の形状、材質
2. 反応干渉因子試験の要否（初回は実施が必要）
3. エンドトキシン規格値（1製品あたりのエンドトキシン限度値）
4. 準拠規格（通常「日本薬局方」に準拠します）
5. エンドトキシン測定方法

※注意 反応干渉因子試験の結果、エンドトキシン抽出液を高倍率の希釈が必要ながあります。この場合より感度の高い比色法での実施が必要になります。

費用・納期は製品・頻度によって大きく異なりますので
上記を元に別途お見積りさせていただきます。



株式会社

コーガアイソフ

まとめ

ガンマ線滅菌で必要な微生物試験とは

- ・ 滅菌前の製品に付着している生菌数の測定
- ・ 検定線量照射後の製品の無菌性の確認
- ・ どのような微生物が付着しているかを確認する

⇒同定試験

が重要となります。

コーガアイソトープ滅菌研究センターでは、革新SRCと銘打ち、今後もさらに試験品質の向上を目指すため、

- ・ 医薬品で求められるFDA21CFRpart11の同定への導入
- ・ 試験所の能力の認定規格ISO17025の取得

を進め、お客様に安心してご利用いただけるよう

「感動品質」を提供してまいります。



株式会社

コーガアイソトープ