アプリケーションノート

Thermo Scientific CO_2 インキュベーターの Steri-Run 滅菌サイクルによる滅菌の証明

キーワード
CO_2 インキュベーター、滅菌、除染、細胞培養

序文

新しい Thermo Scientific CO_2 インキュベーターには、Thermo Scientific Steri-Run 滅菌サイクルが組み込まれています。Steri-Run サイクルは、2 時間の加熱フェーズの後、180℃ 90 分の除染フェーズ、最後に、約 8 時間の冷却フェーズからなっています。サイクル終了後、インキュベーターの温度は設定値になります。

技術的には、「滅菌」とは生命体が存在しないことを言います。物体内部、またはその上に微生物が存在しないことを証明するのは不可能なため、確率的証明を用いて滅菌を定義することができます。滅菌は、欧州薬局方 [1] および米国薬局方 [2] の両方において厳密に定義されています。それぞれの薬局方では、滅菌過程において、微生物の生存率が 100 万(10^6)の 1 より少ない場合に滅菌が証明されると定義しています。またそれぞれの薬局方で、微生物を 6-log($1x10^{-6}$)に減少させることを証明するよう求められています。さらに、乾熱滅菌中は、ファンまたはブロワーを用いて連続的に空気を循環しなければなりません。全ての領域が特定の温度に達していることを保証するためには、詳細な温度分布図を提供しなければなりません。十分な加熱温度や時間が得られない領域では微生物が生存する可能性があるため、このことは重要だといえます。

後から微生物の有無を検査できる製品についてはインキュベーターのようなチャンバー内で滅菌は行いません。そのため、Thermo Scientific CO_2 インキュベーターは、オーバーキル法を用いて統計学的な証明を行うため、米国薬局方（USP）に従って試験されています。この方法は、少なくとも $1x10^6$ の耐熱芽胞菌を除去することを証明し、その後さらに 10^{-6} レベルの殺菌を繰り返し、合計で 10^{-12} の無菌性保証水準（SAL）を与えこれらの要件に従い、Steri-Run 滅菌サイクルを備えた Thermo Scientific CO_2 インキュベーターが完全な滅菌を達成することを示すため、ポートン・ダウンの英国公衆衛生庁（PHE）の生物安全性調査グループによって試験が行われました。試験 [3] の材料、方法、および結果を下記に示します。通常の Steri-Run サイクルは 180℃ 90 分間を維持しますが、試験ユニットでは 180℃ 45 分間維持するように変更しました。これは、完全なサイクルに対して半分の致死率を与えることによって、オーバーキル法の要件を満たすためです。

IQ/OQ 要件の内部仕様測定の一環として、Steri-Run サイクル中、4 台の CO_2 インキュベーターそれぞれで、47 箇所、各 2 回ずつ温度を測定しました。この温度分布図により、全ての領域が特定の温度に達し、維持されることが証明されています。

材料および方法

微生物種

米国薬局方 [2] および欧州薬局方 [1]（EUP）の推奨に基づき、PHE で試験された微生物は下記の通りです。

•*Bacillus atrophaeus*　（ATCC 51189, NCTC10073）
Bacillus subtilis として知られているこの菌体は、熱および乾燥に対して耐性を持つ芽胞菌であり、米国および欧州薬局方等で、乾熱滅菌の指標となっています。PHE に保管されていた芽胞菌の懸濁液を、滅菌蒸留水にて $5.00x10^9$ CFU/mL に希釈しました。

•*Escherichia coli*　（ATCC 25922, NCTC 12241）
E. coli は細胞生物学や分子生物学などの研究室で一般的に使用され、コンタミネーションのおそれがある菌です。NCTC（The National Collection of Type Cultures）から新たにバイアルを入手し、ストックプレートを作成しました。この菌を、10mL

の NB 培地へ添加し、37℃（±2℃）の条件下で 18～24 時間培養を行いました。次にバクテリアの濃度を測定しました。1:10 の希釈溶液を作り、トリプトンソーヤ寒天培地(TSA)プレートに 0.1mL 滴下し、37℃(±2℃)で 18-24 時間培養し、コロニー数を計測して CFU/mL を決定しました。

•*Aspergillus brasiliensis*（ATCC 16404）
これは、通常は土壌に生息しているが、実験室での細胞培養において、一般的なコンタミネーションの原因となる黒麹菌です。*A. brasiliensis* を有する 10 個の麦芽抽出培地（MEA）プレートを、30℃(±2℃)で 5 日間、密集状態となるまで増殖させました。胞子を移すため、0.1% Tween の滅菌蒸留水を 5mL ずつ各プレートへ滴下しました。胞子を含む懸濁液は、プレートから回収し、滅菌ユニバーサル容器へ移しました。この懸濁液 0.1mL を 2 枚の TSA プレートへ滴下しました。30℃(±2℃)で 3-5 日間インキュベートしてコロニー数を計測しました。濃度が $1.00x10^6$ CFU/mL であることを確認しました。

•*Geobacillus stearothermophilus*（ATCC 12980, NCTC 10339）
G. stearothermophilus は、熱や乾燥に対し、強い耐性を有している芽胞菌で、米国薬局方、欧州薬局方等で、オートクレーブ滅菌の指標となっています。$2.80x10^6$ CFU/mL の *G. stearothermophilus* を有する APEX Laboratories, Inc.製のステンレスディスクを使用しました。この金属片は使用するまで 4℃で保管し、使用時には速やかに包装をはずしてインキュベーター内に設置しました。

•*Mycoplasma pneumoniae* (ATCC 15531, NCTC 10119)
これは、約 100 種ほどあるマイコプラズマの 1 種です。マイコプラズマは専門的にはバクテリアですが、細胞壁をもたないので一般的な抗生物質には影響を受けません。ヒト病原体や一般的な微生物叢のように、マイコプラズマは細胞培養においてコンタミネーションを起こします。PHE は NCTC から *M. pneumoniae* を入手しました。保存用培養液については、4,400 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去しました。バクテリアを含むペレットは 1mL の Mycoplasma Horse Serum Broth（MHSB）で再懸濁し、使用するまで 4℃(±2℃)で保管しました。

試験用金属片の調製
試験用として、各微生物の調製液を 10μL ずつ、直径 1cm の滅菌済円形ステンレスディスクに滴下しました。このディスクは 37℃(±2℃)で 1 時間乾燥させました。
3 回の滅菌試験それぞれに対し、各微生物について、7 つずつステンレスディスクを調整しました。

各滅菌試験の方法
5 つの試験微生物について調製した金属片を、Steri-Run サイクルを備えた Thermo Scientific CO_2 インキュベーター内に設置しました。下記に示す位置に、各微生物に対する金属片を 1 つずつ設置しました。（図 1）

- 3 段の中段の棚板
- 3 段の下段の棚板
- プレナムの横の後壁
- ガラス扉

ガラスの扉と後壁については、フックで金属片を吊り下げました。

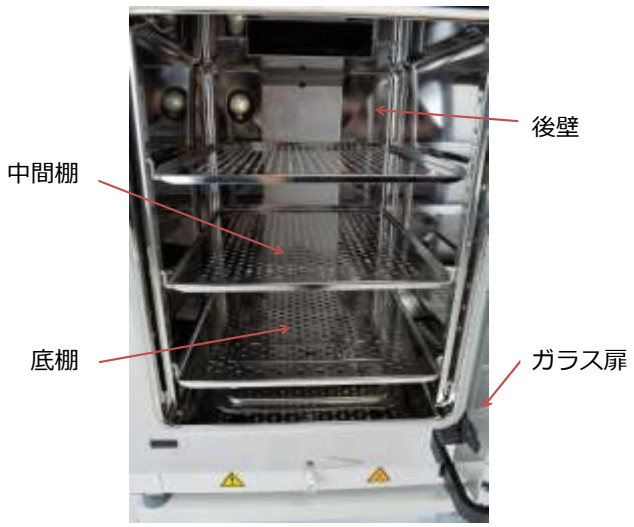


図 1
Steri-Run サイクルを備えた Thermo Scientific CO_2 インキュベーター内部。試験微生物を有する金属片の位置を示しています。

Steri-Run サイクルは、業務時間が終了する頃に、メーカーの指示に従って開始されました。CO_2 インキュベーターは、およそ 2 時間かけて 37℃から 180℃に加熱され、180℃ 45 分間維持されました。通常の Steri-Run サイクルの 180℃のフェーズは 90 分間ですが、今回は設計された致死率の半分での効果を検討するため、条件を変更しました。CO_2 インキュベーターは、180℃のフェーズの後、約 7.5 時間かけて、設定温度の 37℃まで自動的に冷却が行われました。

コントロール

各試験微生物に対し、それぞれの試験において 3 つずつのポジティブコントロール、ネガティブコントロールで対照実験を行いました。ポジティブコントロールは試験用ディスクと同様の方法で調製しましたが、滅菌サイクル中、インキュベーターには入れませんでした。ネガティブコントロールは、植菌していない滅菌ディスクの評価を行いました。

微生物の分析

Steri-Run サイクルの後にディスクを回収しました。1 回目の試験では、*B. atrophaeus*、 *E. coli*、*A. brasiliensis*、*G. stearothermophilus* を植菌したディスクを、それぞれ 10mL リン酸緩衝生理食塩水（PBS）へ移し、*M. pneumoniae* を植菌したディスクは 10mL MHSB を入れたユニバーサル容器へ移しました。微生物の残留を排除するため、10 分間ボルテックスにより撹拌し、これらの懸濁液 0.1mL を寒天培地へ塗り拡げ、生菌数(TVC)の定量を行いました。それぞれ TSA プレートを使用しましたが、*M. pneumoniae* については Eaton プレートを使用しました。

•*B. atrophaeus*

連続的に PBS で希釈しました。10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} に希釈した懸濁液 0.1mL を TSA プレートに広げ、37℃(±2℃)で一晩培養し、その後コロニーを数えました。

•*E. coli*

連続的に PBS で希釈しました。10^{-1}、10^{-2} 希釈液 0.1mL を 2 枚の TSA プレートに広げ、37℃(±2℃)で 48 時間培養し、その後コロニーを数えました。

•*A. brasiliensis*

連続的に PBS で希釈しました。10^{-1}、10^{-2} 希釈液 0.1mL をデュプリケート用 TSA プレートに広げ、30℃(±2℃)で 3 日間培養し、その後コロニーを数えました。

•*G. stearothermophilus*

連続的に PBS で希釈しました。10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 希釈液 0.1mL を TSA プレートに広げ、60℃(±2℃)で一晩培養し、その後コロニーを数えました。

•*M. pneumonia*

連続的に PBS で希釈しました。10^{-1}、10^{-2} 希釈液 0.1mL を Eaton プレートに広げ、嫌気的条件下において 37℃(±2℃)で、最短 14 日間培養し、その後コロニーを数えました。

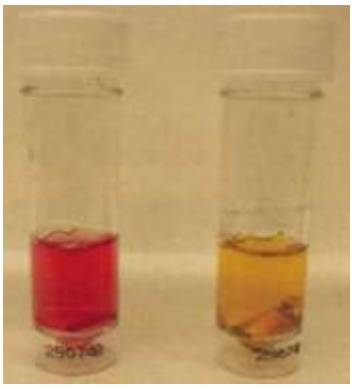
初回の滅菌運転において、完全な滅菌が示されたため、PHE で 2 回目、3 回目の定性的検査を行うこととしました。この回では、*B. atrophaeus*、*E.coli*、*A. brasiliensis*、*G. stearothermophilus* のディスクは、それぞれ 10mL の NB 培地を入れたユニバーサル容器に移し、全て適切な温度（上記参照）で 7 日間培養しました。この間の培養液の濁りは、微生物の増殖および陽性結果を表しており、Steri-Run サイクル中に菌が生存していたことを示します（図 2)。

ネガティブ　　ポジティブ

図 2

NB 培地における、微生物の非増殖／ネガティブコントロール、または増殖／ポジティブコントロールの例。

3 回全ての Steri-Run サイクルの試験を行った後、*M. pneumoniae* を植菌した全てのディスクおよび、10mL MHSB に移したディスクは、37℃(±2℃)で 14 日間培養しました。この間の赤色から橙黄色への色の変化は、陽性結果を表しており、このことは Steri-Run サイクル中に菌が生存していたことを示しています（図 3)。



ネガティブ　　ポジティブ

図 3

MHSB における M. pneumoniae の微生物の未成長／ネガティブコントロール（赤）、または成長／ポジティブコントロール（オレンジがかった黄色）の例。

Steri-Run サイクルの効果決定の数式

米国薬局方、欧州薬局方に基づき、Steri-Run サイクルの効果は試験微生物の対数減少値から与えられます。対数減少値は下記の式で決定されます。

$$\text{対数減少値} = \left(\frac{\text{ポジティブコントロールの平均全}CFU}{\text{サンプルごとの平均全}CFU} \right) Log_{10}$$

Steri-Run サイクル中の温度測定

Steri-Run サイクル中に、CO_2 インキュベーター内の全ての領域が最低 90 分間 180℃の温度に達していることを確認するため、4 つの異なる CO_2 インキュベーターで、それぞれ 2 回ずつ試験を行いました。1 つの試験では標準的なガラス扉、もう 1 つの試験では分割式ガラス扉で行いました。

47 本の校正された Ni-Cr/Ni 熱電対（精度±1℃）を、チャンバー内の左、右、後壁、天井、ウォーターリザーバーの床面、ウォーターリザーバーカバー、ガラス扉、3 つの棚に配置しました。計測部は、表面から 15mm 離して固定した棚を除き、その他全て表面に接触していました。

表 1: Aspergillus brasiliensis の生菌数（ATCC 16404）

試験場所	生菌数			最小対数減少値		
	試験 1	試験 2	試験 3	試験 1	試験 2	試験 3
ポジティブコントロール	$2.63x10^4$	$3.28x10^4$	$3.03x10^4$	0	0	0
ガラス扉	NG	NG	NG	>4.4	>4.5	>4.5
後壁	NG	NG	NG	>4.4	>4.5	>4.5
中間棚	NG	NG	NG	>4.4	>4.5	>4.5
底棚	NG	NG	NG	>4.4	>4.5	>4.5

表 2: Escherichia coli の生菌数（ATCC 25922）

試験場所	生菌数			最小対数減少値		
	試験 1	試験 2	試験 3	試験 1	試験 2	試験 3
ポジティブコントロール	$2.20x10^4$	$2.16x10^4$	$2.30x10^4$	0	0	0
ガラス扉	NG	NG	NG	>4.3	>4.3	>4.4
後壁	NG	NG	NG	>4.3	>4.3	>4.4
中間棚	NG	NG	NG	>4.3	>4.3	>4.4
底棚	NG	NG	NG	>4.3	>4.3	>4.4

表 3: Mycoplasma pneumoniae の生菌数（ATCC 15531）

試験場所	生菌数			最小対数減少値		
	試験 1	試験 2	試験 3	試験 1	試験 2	試験 3
ポジティブコントロール	$1.18x10^6$	$1.25x10^6$	$1.33x10^6$	0	0	0
ガラス扉	NG	NG	NG	>6.1	>6.1	>6.1
後壁	NG	NG	NG	>6.1	>6.1	>6.1
中間棚	NG	NG	NG	>6.1	>6.1	>6.1
底棚	NG	NG	NG	>6.1	>6.1	>6.1

表 4: Bacillus atrophaeus endospores の生菌数（ATCC 51189）

試験場所	生菌数			最小対数減少値		
	試験 1	試験 2	試験 3	試験 1	試験 2	試験 3
ポジティブコントロール	$2.48x10^4$	$6.05x10^4$	$1.95x10^6$	0	0	0
ガラス扉	NG	NG	NG	>6.4	>7.8	>6.3
後壁	NG	NG	NG	>6.4	>7.8	>6.3
中間棚	NG	NG	NG	>6.4	>7.8	>6.3
底棚	NG	NG	NG	>6.4	>7.8	>6.3

表 5: Geobacillus stearothermophilus endospores の生菌数(ATCC 12980)

試験場所	生菌数			最小対数減少値		
	試験 1	試験 2	試験 3	試験 1	試験 2	試験 3
ポジティブコントロール	$2.66x10^6$	$8.58x10^6$	$3.18x10^6$	0	0	0
ガラス扉	NG	NG	NG	>6.4	>6.9	>6.5
後壁	NG	NG	NG	>6.4	>6.9	>6.5
中間棚	NG	NG	NG	>6.4	>6.9	>6.5
底棚	NG	NG	NG	>6.4	>6.9	>6.5

表 1-5 微生物試験の結果

それぞれの試験は異なる日に実施。

ポジティブコントロールは、Steri-Run サイクルを受けたサンプルと同じように処理しました。

“NG”：非増殖 （No growth）、対数減少値：除去された微生物のログ値で、上記に記載された通りに計算。

周囲の室温を記録し、通気部、直射日光、近くの機器からの熱については全て遮断しました。各熱電対は 10 秒ごとに測定を行いました。

結果および考察

微生物学的試験

180℃ 90 分間を 180℃ 45 分間に変更した Steri-Run サイクルの微生物学的試験の結果を、表 1-5 に示しました。それぞれの場合について、Steri-Run サイクルの後、ステンレスディスク全てで微生物の増殖は見られず、微生物が完全に除去されていることが証明されました。ポジティブコントロールは、インキュベーター内に入れていないこと以外は、サンプルと同じ処理をしています。ネガティブコントロールでは微生物の増殖は見られず（結果は示していません）、技術的な要因によるサンプルへのコンタミネーションがなかったことを示しています。異なる日での、それぞれの独立した 3 つの試験で、結果の再現性が確認されました。

細胞培養の一般的なコンタミネーション要因となる代表的なもの、黒麹菌（*A. brasiliensis*）、バクテリア（*E. coli*）、マイコプラズマ（*M. pneumoniae*）の全てが、Steri-Run サイクルの滅菌の有効性を証明しています。さらに重要なことに、*B.*

atrophaeus が完全に除去されており、このことは Steri-Run サイクルが、乾熱滅菌の基準に合致することを示しています。オートクレーブ滅菌の生物学的な指標である高耐熱性の *G. stearothermophilus* が完全に除去されたことは、高いレベルでの滅菌を保証しています。これらの高耐熱性微生物を 10^6～10^7 のレベルで除去したことは、滅菌の最低限の基準に合致します。ただし、この結果は 180℃ 90 分間という通常の条件に対して、半分の時間で達成されたものであり、90 分で行った場合、米国薬局方の要件である 10^{-12}～を満たします。

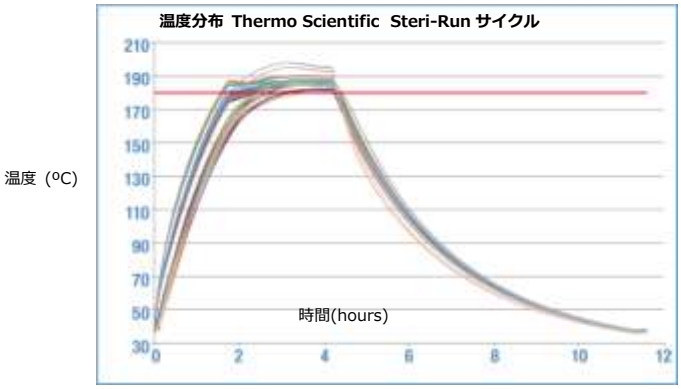


図 4：
フル Steri-Run サイクルの特長を示す温度マップ
熱電温度計はチャンバー内の 47 箇所に配置され、壁、ガラス扉、ウォーターリザーバーカバー、フロア、3 つの棚が含まれています。全領域が最低 180℃に達しました。N=2x4 ユニット。

温度分布

滅菌の証明においては、微生物を除去する温度に達するだけでなく、複数の CO_2 インキュベーターの全領域で、その温度に達し、また維持されるという根拠を示すことが重要です。十分に加熱されない領域があれば、その領域で、耐性を持った微生物が生き残る可能性があります。

温度分布については 47 点で 8 回の試験を行いました。結果の平均を図 4 に示しました。はじめ、標準的な Steri-Run サイクルは 37℃から開始し、約 2 時間で 180℃まで上昇しました。示される通り、中には他よりも早く 180℃に達する領域がありますが、47 点すべての領域で、180℃ 90 分間が維持されていました。多くの領域で 180℃よりかなり高い温度になっています。興味深いことに、チャンバー全体が 3 時間以上にわたって 160℃以上になっています。米国歯科協会 [4]、米国疾病予防センター[5]、世界保健機構 [6] などは、160℃で 2～3 時間の乾熱滅菌を推奨しています。複数の CO_2 インキュベーター（合計 8 つの試験）の詳細な温度分布図は、Steri-Run サイクルが全領域において 180℃に達し、それを維持している根拠を明示しています。

結論

PHE での 3 つのそれぞれの試験で、自動化高温滅菌サイクル Steri-Run を備えた Thermo Scientific CO_2 インキュベーターは、通常の滅菌時間の半分の時間で、生物学的指標となる微生物を、完全に滅菌する(>1x10^6)ことが証明されました。このように、180℃ 90 分間（今回の試験では 45 分間）の標準的な Steri-Run サイクルは、10^{-12}SAL を達成するように設計されており、また滅菌を証明するためのオーバーキル法の基準を達成しています。

PHE の試験で、条件を変更した Steri-Run サイクルは、一般的な細胞培養のコンタミネーション要因（*A. brasiliensis*、*E. coli*、*M. pneumoniae*）、乾熱滅菌やオートクレーブの滅菌評価に使用される耐熱性芽胞菌（*B. atrophaeus*、*G. stearothermophilus*）を除去することが示されました。PHE の試験における詳細な温度分布図で、微生物を除去するのに必要な時間の倍の時間、全ての領域で致死温度が維持される構造であることが示されました。

一般的なコンタミネーションをなくすことが今後の課題であると、専門家は認識しています。Steri-Run サイクルは、培養細胞の品質向上への取り組みの新しいツールとなります。
Steri-Run サイクルを備えた Thermo Scientific CO_2 インキュベーターは、チャンバー全体で、完全で均一的な滅菌を保証します。ボタンを押すだけで、シンプルな夜間のルーチンが開始され、微生物的なコンタミネーション要因を迅速かつ容易に除去し、部品を別途オートクレーブすることや、毒性のある殺菌剤を用いる必要性がなくなります。

参考文献

1. 欧州評議会欧州医薬品及び健康管理品質局(EDQM)、欧州薬局方、第 8 版、フランス・ストラスブール(2014)。

2. 米国薬局方会議。米国薬局方第 37 版。ロックビル、メリーランド、米国(2014)。

3. イングランド公衆衛生サービス。Thermo Scientific Steri-RunTM サイクルを備える Thermo ScientificTM CO_2 インキュベータの滅菌サイクルの効果に関する評価。レポート番号 14/036,2014。試験は Thermo Fisher Scientific によって行われました。

4. 米国歯科協会。歯科器具の滅菌及び消毒(2004)。2009 年に改訂。

5. アメリカ保健福祉省疾病管理予防センター。健康管理用品での消毒及び滅菌のためのガイドライン(2008)。

6. 世界保健機構。国際薬局方第 4 版(2014)。

詳細については、Thermo Fisher Scientific の URL(**thermofisher.com/CO2** および **thermofisher.com/cellfactory**)を参照してください。

提供：Thermo Fisher Scientific　　文責：ワケンビーテック株式会社

ワケンビーテック株式会社

本　　社　〒606-8171　京都市左京区一乗寺西水干町17番地
西日本営業部　〒525-0029　滋賀県草津市下笠町945番地1
TEL(077)568-2911／FAX(077)568-2944
東日本営業部　〒132-0025　東京都江戸川区松江2丁目10番22号
TEL(03)5661-3220／FAX(03)5661-3230
営業推進部（テクニカルセンター）　〒562-0035　大阪府箕面市船場東1丁目12番地8
TEL(072)749-5300／FAX(072)749-5600
CS部（サービスセンター）　〒525-0029　滋賀県草津市下笠町945番地1
TEL(077)568-3661／FAX(077)568-3830
http://www.wakenbtech.co.jp