

過酸化水素ガス殺菌技術を軸とした 無菌環境ソリューションの展開

大和製罐株式会社 メディカルサイエンス部 石川 浩介

1. はじめに

当社は総合容器メーカーとして、金属缶やプラスチック容器などを製造する他、容器に充填される内容物の研究開発や飲料充填事業を行っており、無菌飲料充填事業を開始した当初、製造ラインの殺菌にはホルムアルデヒド（以下FA）による燻蒸殺菌を採用していた。しかし、2004年に国際がん研究機関がFAを「グループ1 発がん性がある」に分類したと発表したことをきっかけに、欧米を中心に規制が厳しくなり、日本においては2008年に厚生労働省の政省令改正で¹⁾、FAの使用規制が施行された。その中で、当社が代替殺菌方法として開発を進めてきたのが過酸化水素ガスによる燻蒸殺菌方法であった。過酸化水素ガス殺菌技術の開発を進める中で、ガスの拡散性や殺菌を管理・運用するための指標がないことなど、様々な課題が挙げられた。多くの課題の中で、殺菌を評価するために用いられるバイオリジカルインジケータ（以下BI）についても、検討を行い、

当社では飲料充填事業で培った微生物技術を応用して自社独自のBIにて評価を行っていた。現在では過酸化水素ガス用のBI並びにカスタマイズBIの製造販売を行っている。

これまでに、過酸化水素ガスによる殺菌と殺菌を評価するためのBIの開発を行ってきた。飲料などの微生物制御が必要な製造現場においては殺菌後に清浄度の管理を目的として環境モニタリング培地を用いており、現在、当社では環境モニタリング培地・検査用液体培地などを取り扱っている。空間を殺菌する「過酸化水素ガス殺菌技術」、殺菌を評価するための「BI」、それに加えて、清浄度管理のための「環境モニタリング培地」の3つを「無菌環境ソリューション」と称し（第1図）、現在は製薬業界をメインに展開を進めている。

食品業界においては、2020年6月からHACCPに基づく衛生管理の導入が義務化されることから、衛生管理の向上、すなわち消毒から殺菌へと変化していくことが予想される。本稿では、「殺菌」でお困りのお客様へ展開してきた無菌環境ソリューションについて、実例を交えながら紹介する。

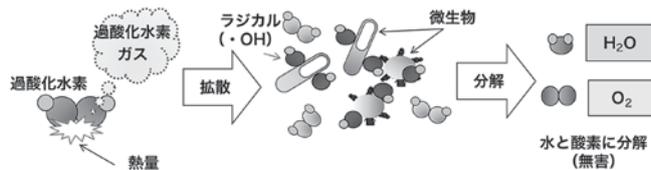


第1図 無菌環境ソリューション
(カラー図表をHPに掲載C085)

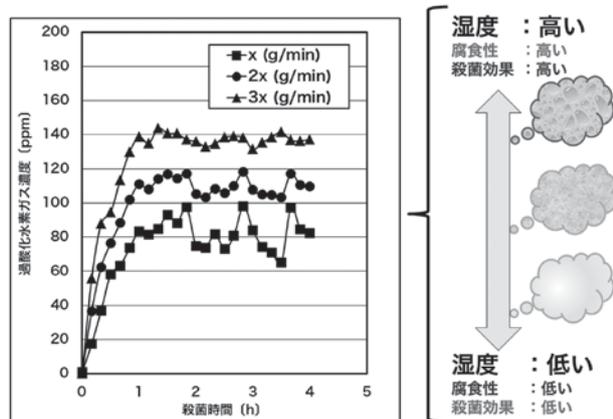
2. 過酸化水素ガス殺菌技術

2-1 過酸化水素ガスの特徴

数ある燻蒸殺菌方法から過酸化水素ガスに着目した理由は「最終的には水と酸素に分解される」という安全性にある（第2図）。また、FAや酸化エチレンガスなどと同等以上の殺菌効果を有するメリットもそのひとつである。ガスの発生方法はいたって簡単で、「過酸化水素水を熱源で加熱・気化させる」だけのことである。一方、デメリットとしては、浸透性が低いことが挙げられる。浸



第2図 過酸化水素ガスの殺菌機構
(カラー図表をHPに掲載C086)



第3図 過酸化水素ガスと湿度の関係
(カラー図表をHPに掲載C087)

透性が低い場合、机の引き出し奥などの入り組んだ構造にガスが進入しにくくなってしまったり、有機物存在下において殺菌効果が著しく低下してしまう、などが挙げられる。しかし、これらデメリットがありながらも、第十七改正日本薬局方に掲載されたことをきっかけに、過酸化水素ガスはさらに注目を集めている。

過酸化水素ガスの殺菌効果は湿度に依存することが知られており²⁾ (第3図)、使い方を誤れば、殺菌効果が発揮できない場合や殺菌空間に存在する機械や建材などの腐食を招いてしまう恐れがある。過酸化水素ガスのみならず、他殺菌方法についても「殺菌ができなかった」、「殺菌により酷い腐食が見られた」などをよく耳にすることがあるが、殺菌方法の特徴を正しく理解し、使用することが好ましいと考える。

2-2 当社の過酸化水素ガス殺菌技術の特徴

当社の過酸化水素ガス殺菌技術の特徴は、

① 極低濃度殺菌 (80 ~ 150ppm)

(特許5953044号)

腐食性を抑えた濃度域で、殺菌を実現。FAなどの燻蒸殺菌方法では殺菌空間周辺の日張りに多くの時間を要するが、当社が扱う極低濃度は、周

辺の日張りが非常に少なくなる他、殺菌開始から終了までの時間が短縮されるなどのメリットが生まれる。

② ガス均一拡散技術 (特許6063694号)

殺菌空間内に均一に殺菌を施すために、ガス発生装置から配管を伸ばし一定間隔で孔を開け、ガスを噴霧することで拡散させることにより³⁾、ムラ・ムダのない殺菌効果を得ることができる。

③ DHv[®] 殺菌モニタリングシステム

(特許5953044号)

殺菌中に変動する過酸化水素ガス濃度・温度・湿度のデータを集積し、「今どれくらいの殺菌効果があるのか?」、「あとどれくらいで殺菌が終わるのか?」などが確認できる⁴⁾。

④ BIの殺菌設計と検証

統計学的処理により、BIの生存確率を算出し、殺菌効果を明示する。

の4点になる。各特徴についての詳細は「無菌環境ソリューション」で検索いただきたい。

2-3 事例 ~その1~

清浄環境の実現や清浄度維持を目的とした殺菌の頻度は製造要件によって異なる。無菌製剤の場合ではロット毎に滅菌することが日本薬局方により決められており、頻度は高い部類に属される。一方、滅菌の実施が決められていない施設では滅菌頻度は施設管理に一任されており、無菌製剤以外の医薬品製造ラインや実験動物施設、CPC施設 (Cell Processing Center) などがあ、年に1回や施設改修時などに実施される例が多い。

滅菌頻度が高い施設では、当社のシステムを導入する場合は殺菌対象空間内の天井に配管を常設する仕様となっている (第4図)。

滅菌頻度が低い場合、システムを導入すること



第4図 システム導入の例 (カラー図表をHPに掲載C088)



第5図 殺菌サービスの実施例
(カラー図表をHPに掲載 C089)

は非常に少なく、そのようなお客様には「殺菌サービス」を提案している。簡単に説明すると、「殺菌したい空間に機械を持ち込み、殺菌を行い、清浄度の高い空間を作り上げる」という役務サービスになる。殺菌サービスの場合には、天井への配管の常設ができないため、配管を床に敷設する形となり(第5図)、頻度が低いお客様だけではなく、システムを導入する前のデモンストレーションで実施されるお客様も少なくはない。

2-4 事例 ~その2~

過酸化水素ガス発生装置 STERIQUA® は製薬製造ライン向けに開発された製品であり、当初のラインナップは1000立米以下の空間を殺菌できる STERIQUA®-1000のみであった。現在は、500立米以下、200立米以下、10立米以下の殺菌が可能な機種^{そろ}のラインナップ(STERIQUA®-500, 200, N)を揃えている。STERIQUA®-N(第6図)は、無菌動物を飼育するのに使われるビニールアイソレーター(第7図)を殺菌するために開発されたモデルとなっているが、現在では殺菌目的によって用途が広がっている(第8図)。



第6図 STERIQUA®-Nの外観
(カラー図表をHPに掲載 C090)



第7図 ビニールアイソレーター
(ジック社製)の殺菌の様子
(カラー図表をHPに掲載 C091)



第8図 STERIQUA®-Nの応用事例
(カラー図表をHPに掲載 C092)
パスボックスへの適用例と殺菌対象物へ直接ガスを噴霧するハンディタイプ

クリーンルームなどの清浄度が高いエリアへは、パスボックスやパスルームといった空間を通じてモノの搬入出を行うが、一般的には消毒用エタノールやUV照射による外装殺菌を行って移動させる。近年は Dirty エリアと Clean エリアの間の移動において、器物表面(モノの外装面)の「殺菌」は不十分ではないかとの指摘の声が多い。我々は、「消毒から殺菌へ」をスローガンとし、前述のパスルームのような小規模空間に対して、よりグレードの高い清浄環境実現へ取り組みを進めている。STERIQUA®-Nは用途に応じて複数の殺菌仕様を導入することができ、例えば、一般細菌を2~3log殺滅するプログラムであれば数十分、一般芽胞菌を6log殺滅するプログラムであれば約4時間といったように処理時間を変更し、1台で同一の空間における殺菌効果の変更や容積の異なる空間の殺菌が可能となる。殺菌の要望は、パスボックスやパスルーム以外にも更衣室や安全キャビネットなどの空間・モノにより用途は多岐に渡る。

3. BI

3-1 BIについて

BIとは、被滅菌物の滅菌確認又は補助的に使用されるもので生物学的指標体を指す。一般的にはろ紙、ガラス、ステンレス、プラスチックなどの担体に指定の菌株が塗布されており、過酸化水素ガスについては *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, 12980の芽胞は抵抗性が強いことが知られており、指標体として使用することが可能で、作業を対象とした除染については環境微生物

第1表 滅菌方法と菌株の一例⁵⁾

滅菌方法	菌株名	NBRC	ATCC
湿熱滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	13737	7953
乾熱滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	13721	9372
EOガス滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	13721	9372
過酸化水素滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	12550	12980
		13737	7953

の代表として、*Bacillus atrophaeus* ATCC 9372の芽胞を指標菌として使用することも可能である。その他の指標菌については、第1表を参照されたい⁵⁾。

3-2 当社 BI 製作の特徴

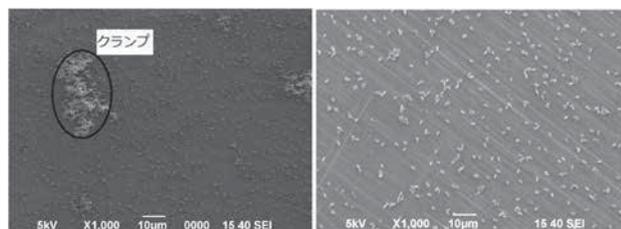
①カスタマイズ BI の製作

規格品の担体は皿型のステンレス板(外径25φ)となっている。製造ラインや製品から単離された菌株を指定の担体に塗布することにより、お客様の要望に合わせた BI も製作可能。

②担体への均一な塗布

BI を製作する上で如何に菌を均一にひとつひとつ塗布できるかが重要となってくる。微生物が塊の状態のまま塗布された場合、クランプと呼ばれる菌塊が発生し(第9図)、殺菌不良の原因のひとつになるからである。

3-3 BI の評価事例

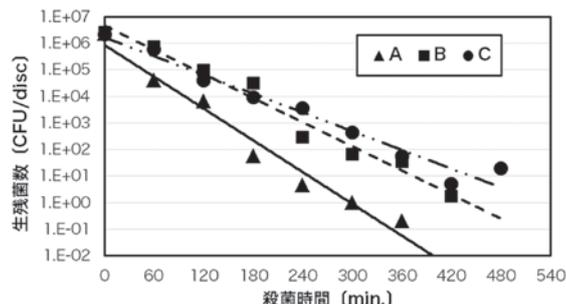


第9図 電子顕微鏡による BI 表面観察
左：クランプの様子 右：均一に塗布されている様子

ここでは、第45回日本防菌防黴学会にて桑原らが発表した内容をもとに過酸化水素ガスと BI の評価事例について紹介する。

BI は被滅菌物の滅菌確認をするもの、つまり、実施した滅菌工程が正しかったかどうかを確認するために用いられる。しかし、得られる結果に対して判断基準を明確に定めていない場合には、滅菌が成功したのか？失敗したのか？が判断できないケースが問題になる。

実験では同じ型式でロットが異なる3種類



第10図 生残プロットと死滅近似曲線

(ロット A, B, C) の BI (*G.stearothermophilus* 10⁶ CFU/disc) を購入し、一定の温度・湿度・過酸化水素ガス濃度条件下において曝露させ、曝露後の BI を液体培地にて培養を行い、陰陽性による判定を行った。

結果を第10図に記載する。ロット A では、約300分で6 log の減少が確認できたが、ロット B, C では約420分若しくはそれ以上の時間をかけなければ、6 log の減少は確認できなかった。また、死滅曲線がテーリングを示す場合もあった。これらの結果から分かるように、同じ菌株であるのに拘わらず製造ロットが異なれば、同一環境下における殺菌剤・殺菌方法に対する強さ、いわゆる抵抗性は異なることを表している。つまり、BI を殺菌効果の妥当性を確認する指標として用いる場合には、殺菌時の温度・湿度・ガス濃度(薬剤濃度など)以外に BI が変動するパラメータとして関与していることが考えられた。

殺菌・滅菌を評価する上で、無菌性保証水準 (Sterility Assurance Level : SAL) が国際的に用いられているが、「微生物をゼロにする」ということではなく、「生育可能な1個の微生物が製品に存在する確率」とされており、SAL 10⁻⁶では100万個の菌が1個残る確率となる。微生物の生残菌数は対数値として取り扱うことから 10⁰= 1, 10⁻¹=0.1 … となり、微生物は分割ができないため、0未満は確率的概念となる⁶⁾。さらに、対数値の論理式においては0になることはないため、推計学的概念を取り入れ、限りなく0に近い生残確率を10⁻⁶とし、SAL 10⁻⁶としている。しかし、実際には供試した全ての BI が陰性にならなければ殺菌失敗とするケースがほと

らんどで、これにより殺菌に用いる薬剤の濃度を上げることや殺菌時間を延ばす対策を講じ、殺菌対象空間の腐食・劣化が確認されることにより、「この殺菌方法は腐食する」などの間違った解釈をしてしまうこともある。

4. 環境モニタリング培地

ここまで無菌環境ソリューションの「過酸化水素ガス」、「BI」について紹介した。特に製薬業界では、高頻度で「浮遊菌、付着菌、落下菌」などの環境微生物モニタリング検査を実施しており、以下に紹介するような環境モニタリング培地が用いられる。当社は、ドイツの培地専門メーカーである Pharma Media Dr.Müller 社（以下、PMM 社）の日本総代理店を担っており、製薬企業様へ培地を提供している（第11図）。PMM 社は、品質が高い・ユーザーフレンドリーな設計・高い中和性能・カスタマイズの受託などを特徴としており、創立が2013年と間もないがヨーロッパにおいてシェアを急



第11図 PMM 社培地 (カラー図表を HP に掲載 C093)

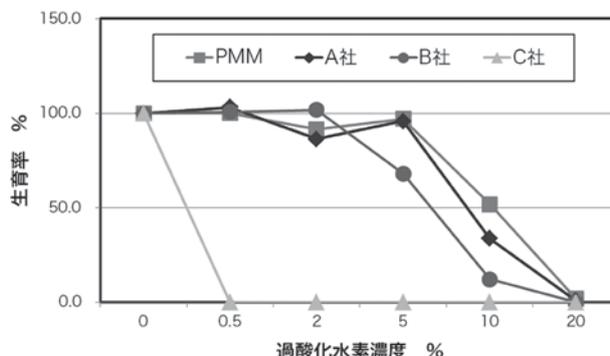
ここでは、第45回日本防菌防黴学会にて筆者らが発表した内容をもとに培地の中和剤について記載する。製造環境の清浄度を確認するために用いられる環境モニタリング培地は用途・包装形態・ガンマ線照射の有無・中和剤の種類などにより多くの製品が各社から販売されている。製造現場の殺菌に用いた薬剤が残留している環境下において微生物のサンプリングを行った場合、残留した薬剤が培地に付着することにより捕捉した微生物が生育せず、結果が0 CFU（陰性）となることがある。これが偽陰性と呼ばれるものである。偽陰性を防ぐために、日本薬局方 参考情報 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法には「培地には、モニタリング箇所で使用若しくは製造される消毒剤又は抗菌剤の効果を打ち消すか抑制するた

第2表 阻害物質に対する一般的な中和剤 / 中和法

阻害物質	中和剤/中和法
グルタルアルデヒド、水銀剤	亜硫酸水素ナトリウム
フェノール類、アルコール、アルデヒド類、ソルビン酸塩	希釈
アルデヒド類	グリシン
四級アンモニウム化合物、パラオキシ安息香酸エステル類、ビス-ピグアニド類	レシチン
四級アンモニウム化合物、パラオキシ安息香酸エステル類、ヨウ素	ポリソルベート
水銀剤	チオグリコール酸塩
水銀剤、ハロゲン類、アルデヒド類	チオ硫酸塩
エデト酸(EDTA)	マグネシウム又はカルシウムイオン

めの不活化剤を加えてもよい。」と推奨されており、それらが各社から販売されている中和剤入り培地となっており⁵⁾、中和する薬剤によって種類が異なる（第2表）⁷⁾。市場では、代表的な中和剤としてL (Lecithine), T (Thiosulphate, 又は Th), H (Histidine), T (Tween, 又は P: ポリソルベート) が添加されたものが流通しており、SCD LP や TSA LTH (LTHTh) などがある。

メーカー各社の中和剤入り培地について、過酸化水素における中和性能を確認したところ以下に述べる結果が得られた。方法は、培地へ過酸化水素水を任意の濃度で塗布し、そこへ *Staphylococcus aureus* を塗布、薬剤未塗布のものと比較して生育率を算出することにより中和性能を比較した。PMM 社、A 社、B 社は同等の中和性能を示したが、C 社については中和剤が入っているのにも拘わらず、試験で実施した最低濃度の過酸化水素を中和することができなかった（第12図）。本稿では割愛するが、他細菌・真菌にお



第12図 各社中和剤入り培地の中和性能 (カラー図表を HP に掲載 C094)

いても同様の結果が確認された。以上の結果から、偽陰性を回避するために中和剤入り培地を使用することは有効な対策であり、環境中の微生物をより確実に検出し、清浄度を確認するためには、製造現場で使用している薬剤の種類（又は組成）を理解し、それに見合った適切な培地を使用することが望ましいと我々は提案する。

5. おわりに

製薬業界同様に殺菌がなくてはならない業界は食品・飲料・化粧品・製薬など多く存在する。化粧品業界においては化粧品メーカーが化粧品GMPへの取り組みを積極的に進めているが、依然として微生物汚染を受けた製品の自主回収が発

生している⁸⁾。まだまだ微生物制御に関する正確な予防・対策が求められているのが現状であり、問題を解決するには殺菌などの微生物を除去する方法や清浄度の維持・管理方法、さらには現場作業員への教育など様々な課題が挙げられる。本稿を通じて、過酸化水素ガスの特徴、殺菌を実施したあとの評価に関する考え方、管理手法について触れていただき、現場で運用されている方法の見直しや問題解決のヒントになれば幸いである。

※本件に関するお問い合わせ先

大和製罐株式会社

〒100-7009 東京都千代田区丸の内2-7-2

www.daiwa-can.co.jp

参 考 文 献

- 1) 労働安全衛生法施行令の一部を改正する政令 2007年政令 375号
- 2) 無菌製剤施設における過酸化水素除染の高効率化に関する検討 大林組技術研究所報 No.80 2016
- 3) 過酸化水素ガス殺菌技術の解明 殺菌因子に関する研究と殺菌モニタリングシステムの開発 クリーンテクノロジー 2014.6
- 4) 過酸化水素ガスによる環境殺菌技術とその利用 食品と容器 第54巻 別刷
- 5) 第十七改正日本薬局方 参考情報 p2411, 2428, 2432
- 6) 医薬品, 医療機器滅菌の新しいトレンド”放射線滅菌”【第2回】 https://www.gmp-platform.com/topics_detail/id=936
- 7) 日本薬局方 第十七改正 4.05 微生物限度試験法 p111
- 8) Antibact. Antifung. Agents Vol.48, No.2, p67-73 (2020) 化粧品の防腐技術者のための講座 part2