

オゾン・過酸化水素混合ガスによる エンドトキシンの不活化ならびに殺菌効果

(国立衛研) 菊池 裕, 福井千恵, ○薮島由二
(株式会社IHI) 山村隼志, 櫻井美栄, 斉藤麻紀子, 松尾健一, 黒松 久

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部



Division of
medical
Devices

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp

本日の講演内容

① エンドトキシンの不活化法と医用材料への応用

- # エンドトキシンとは？
- # ガンマ線照射及び化学処理によるエンドトキシンの不活化
- # 医用材料への応用

② AMED/創薬基盤推進研究事業(菊池班)の紹介

- # オゾン・過酸化水素混合ガスによるエンドトキシンの不活化
- # オゾン・過酸化水素混合ガスによる滅菌効果
- # 医用材料への影響評価
- # 今後の展開

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

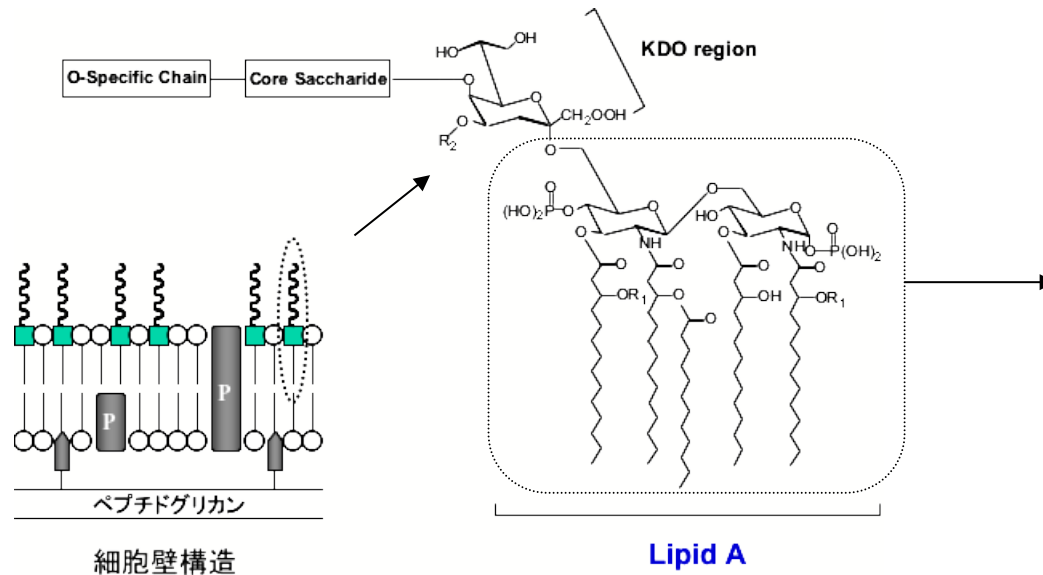


Division of
medical
devices

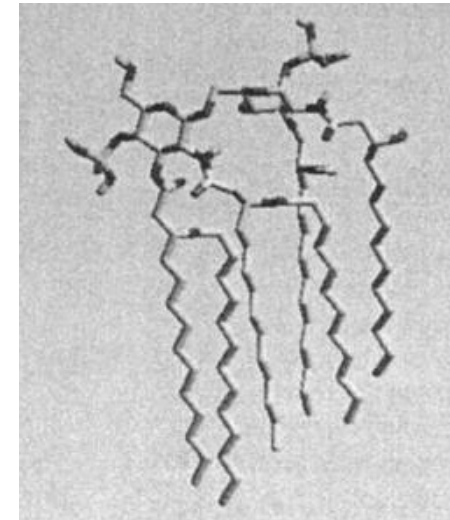
薮島 由二
haishima@nihs.go.jp

エンドキシンとは？

局在部位と化学構造



三次元構造



E.coli lipid A

生物活性

生体レベル

発熱性, 致死毒性, ショック, トランス,
局所・全身シュワルツマン活性, 低血糖,
血清鉄減少反応, アジュバント活性,
トロンボプラスチン産生, 抗腫瘍活性,
放射線障害防御能 アジュバント活性,
網内系殺菌力亢進, 骨髄反応

細胞レベル

マクロファージ活性化能
・サイトカイン産生
・ケモカイン産生
・貧食作用亢進
マイトジェン活性
細胞毒性

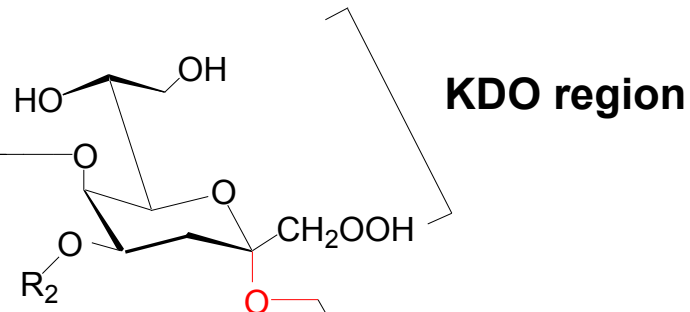
分子レベル

リムルス活性
補体活性化能

エンドキシンの不活化法

O-Specific Chain

Core Saccharide



① 乾燥条件下

- ・250°C/30分の乾熱処理

② 湿式条件下

・酸加水分解

- 弱酸処理: KDO及びグリコシド結合型リン酸基の切断
- 強酸処理: グリコシド結合等の完全解離

・アルカリ加水分解

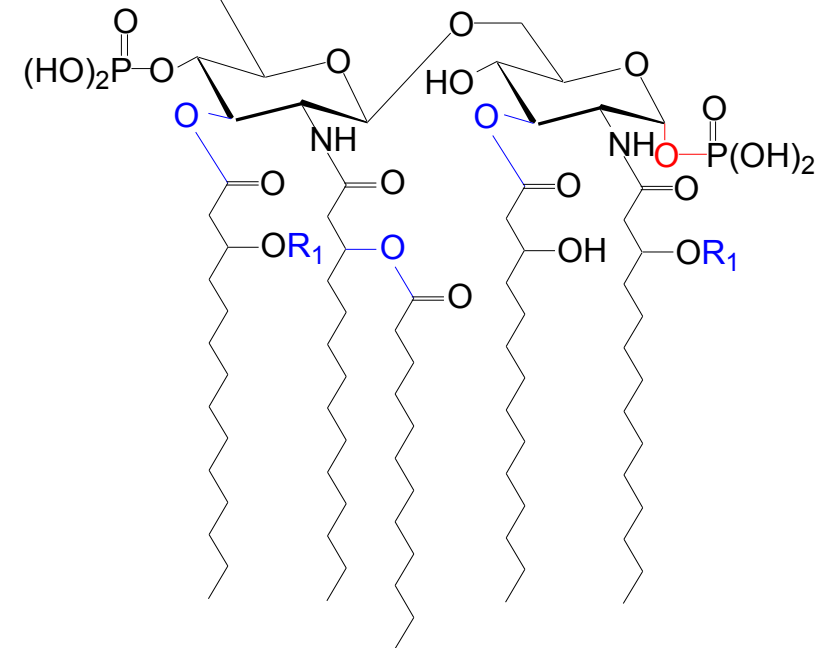
- 弱アルカリ処理: エステル結合型脂肪酸の解離
- 強アルカリ処理: アミド/エステル結合脂肪酸等の解離

・エステル交換反応

- エステル結合型脂肪酸の交換

・酸化剤処理

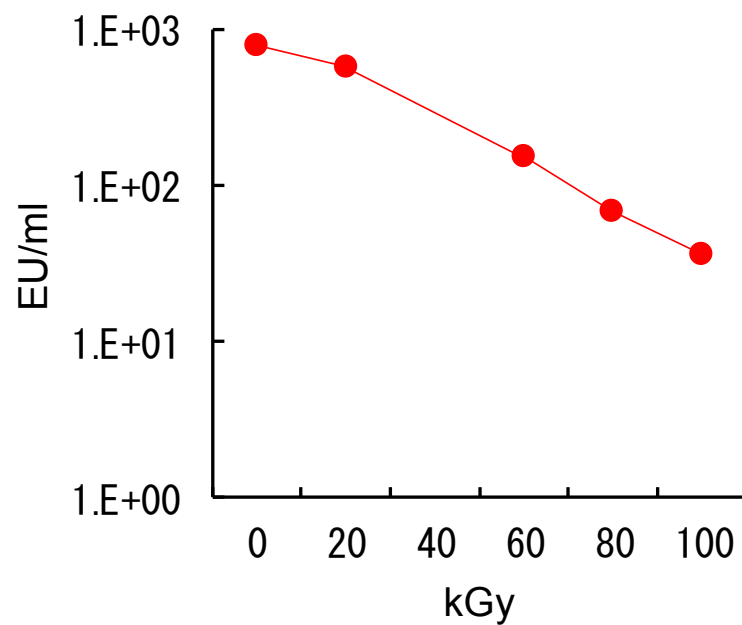
- 強酸性電解水
- 次亜塩素酸ナトリウム



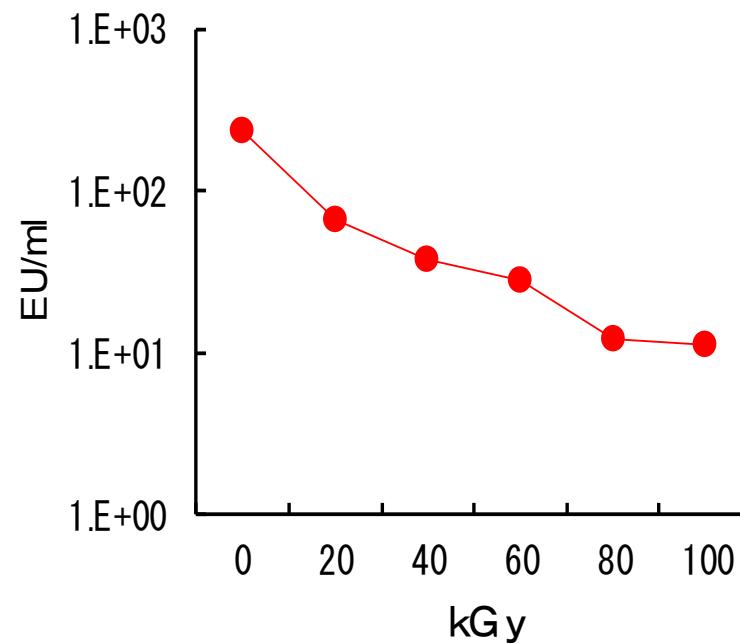
リムルス活性に及ぼすガンマ線照射の影響①

乾燥条件下

LPS レベル
大腸菌 O3 LPS (1 ng)

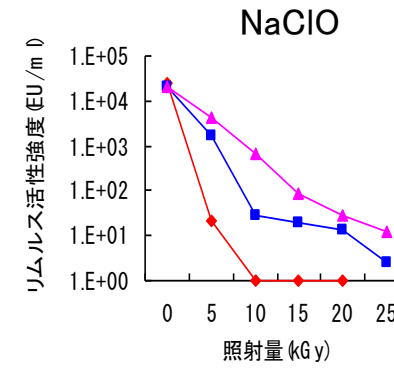
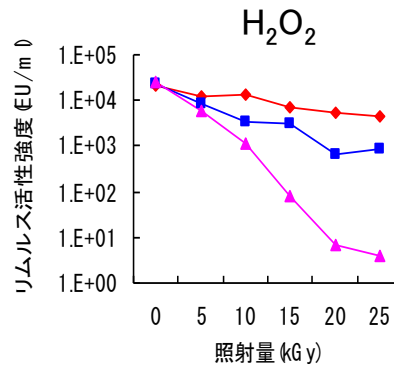
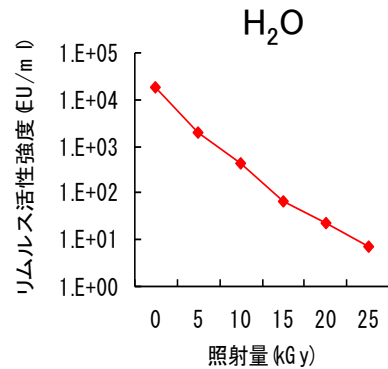


菌体レベル
大腸菌 O111 (10 μg)



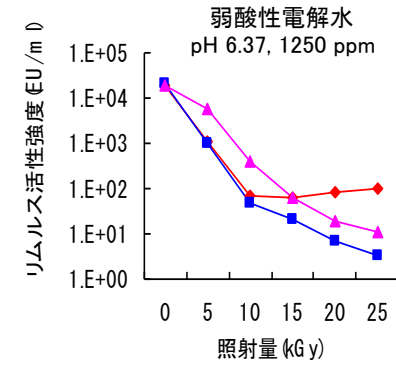
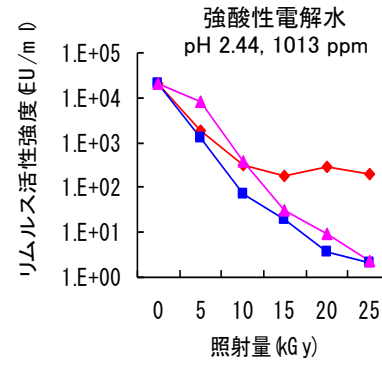
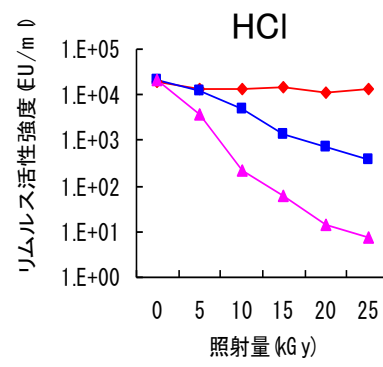
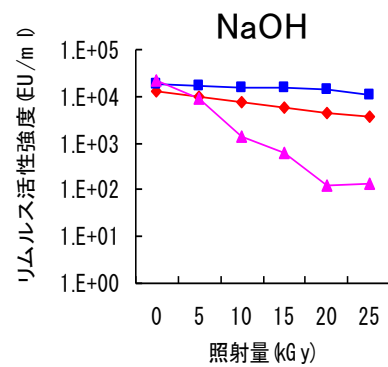
リムルス活性に及ぼすガンマ線照射の影響②

水溶液中/LPSレベル



◆ 30% ■ 3% ▲ 0.3%

◆ 0.05% ■ 0.005% ▲ 0.0005%



◆ 0.025N ■ 0.0025N ▲ 0.00025N

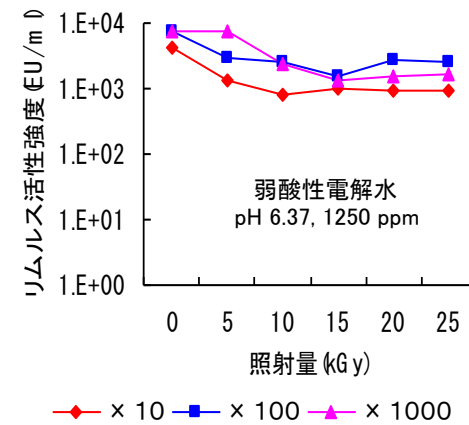
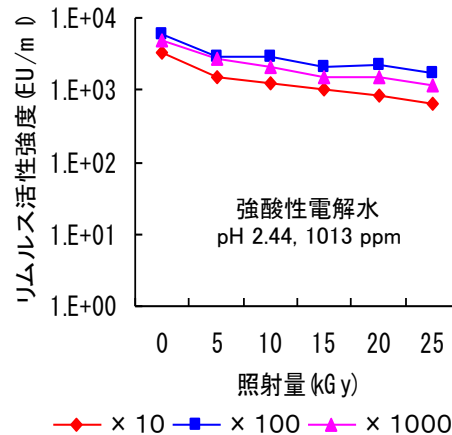
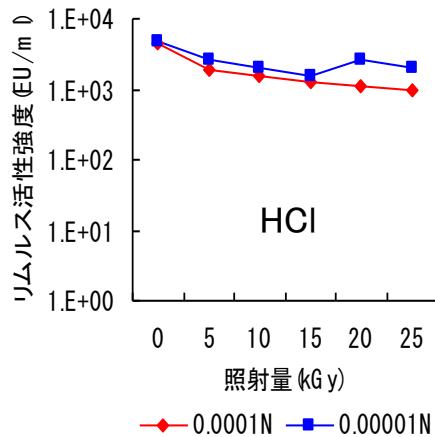
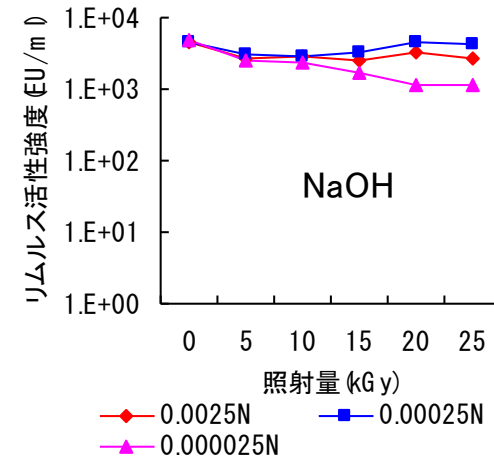
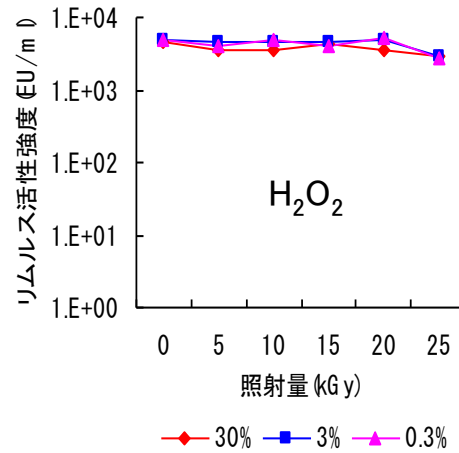
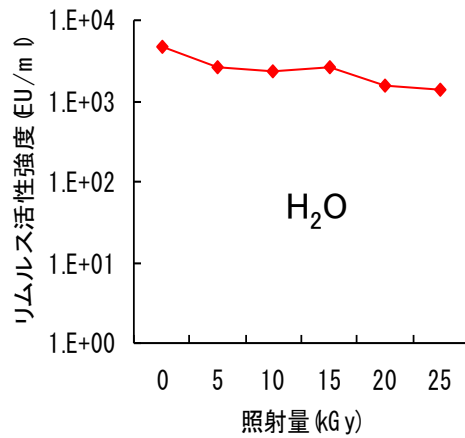
◆ 0.01N ■ 0.001N ▲ 0.0001N

◆ x10 ■ x100 ▲ x1000

◆ x10 ■ x100 ▲ x1000

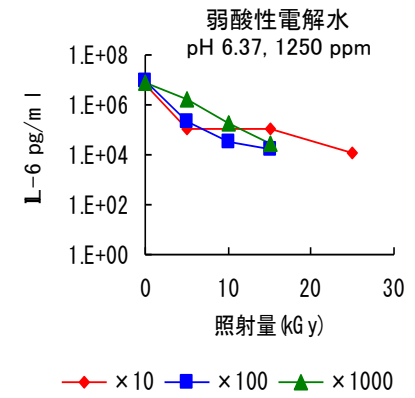
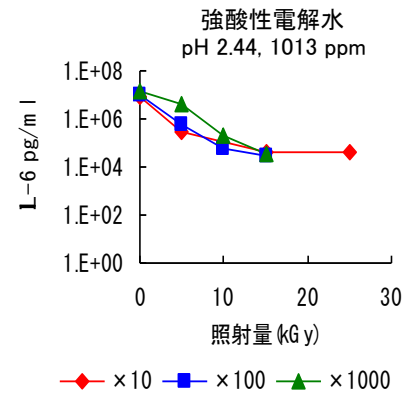
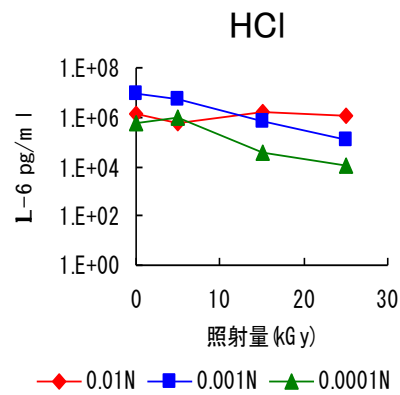
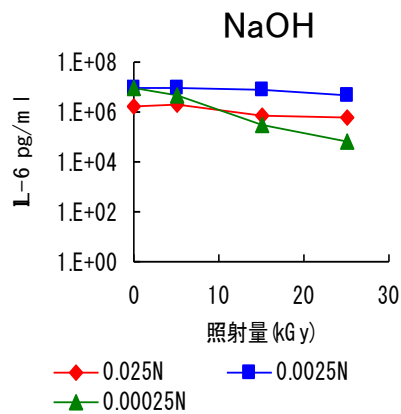
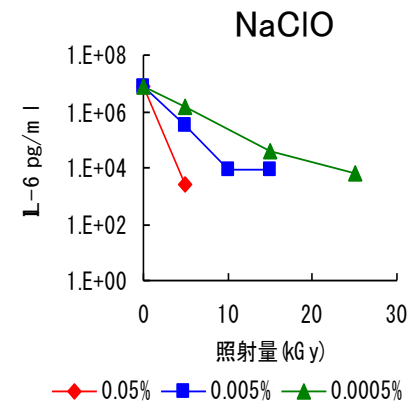
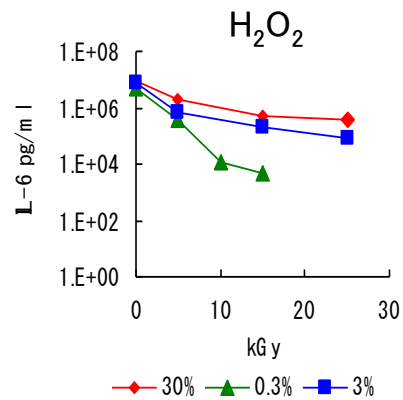
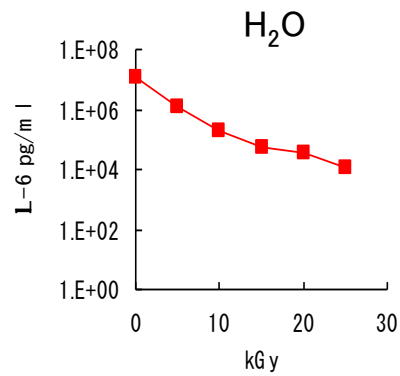
リムルス活性に及ぼすガンマ線照射の影響 ③

水溶液中/菌体レベル



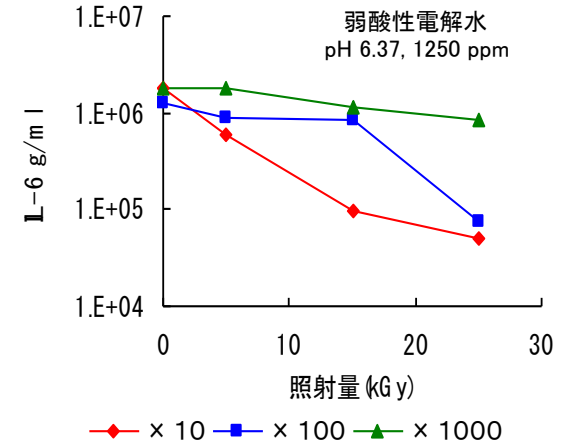
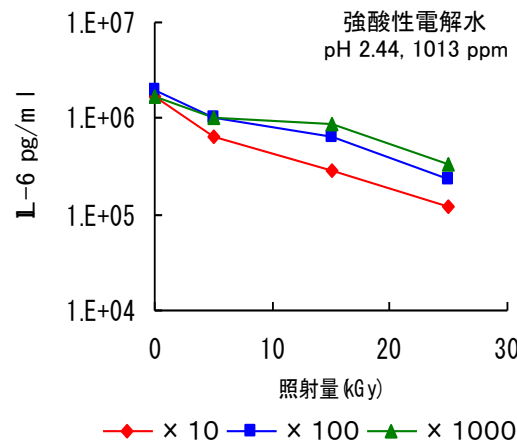
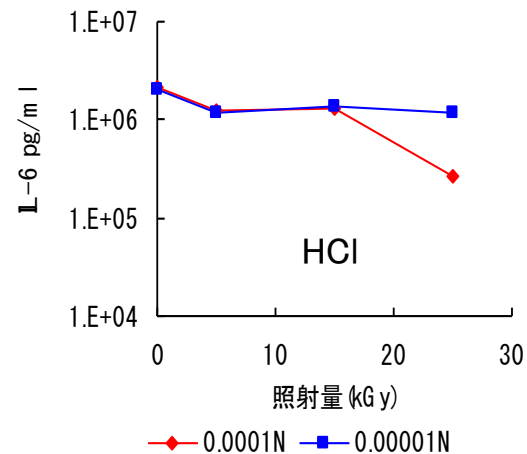
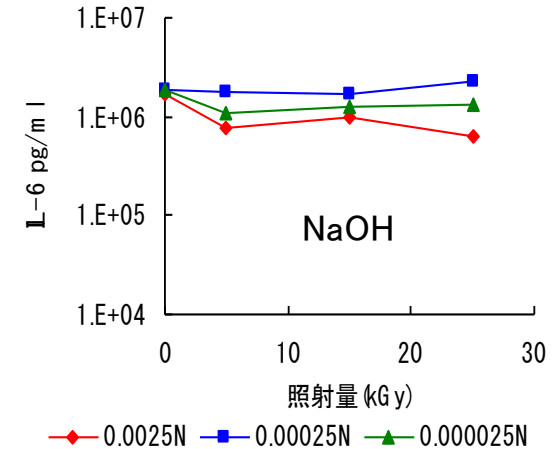
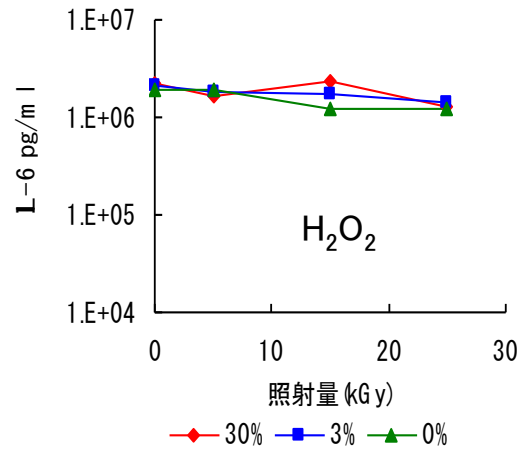
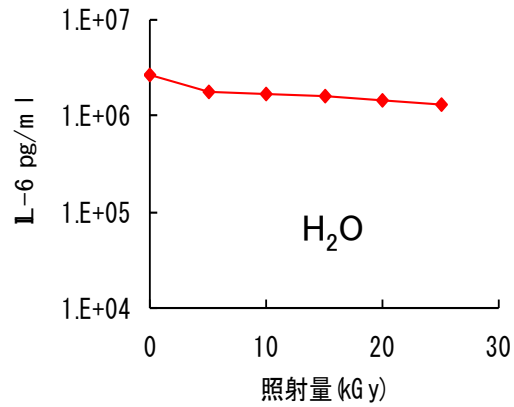
IL-6産生能に及ぼすガンマ線照射の影響①

水溶液中/LPSレベル

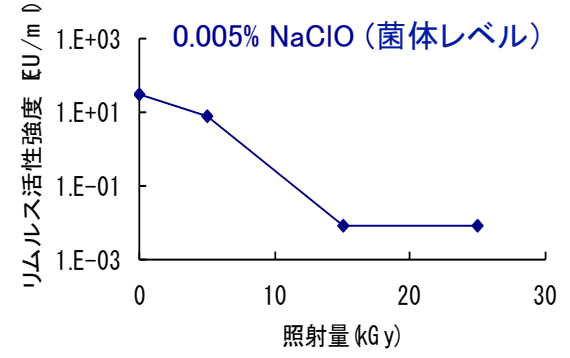
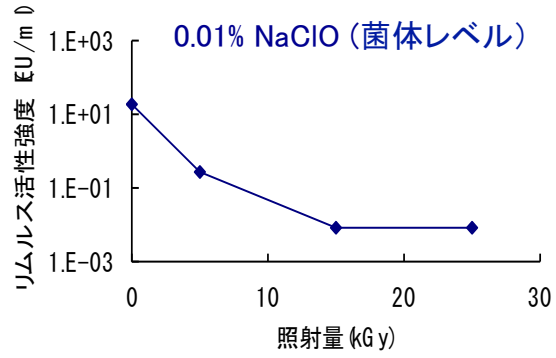
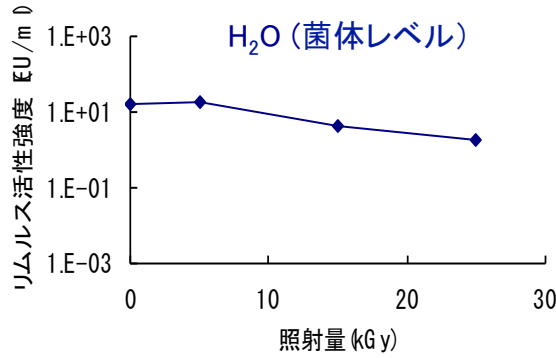
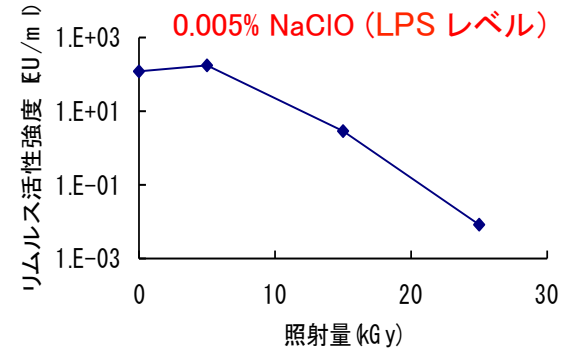
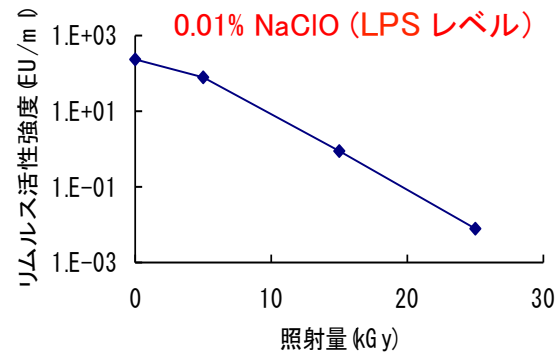
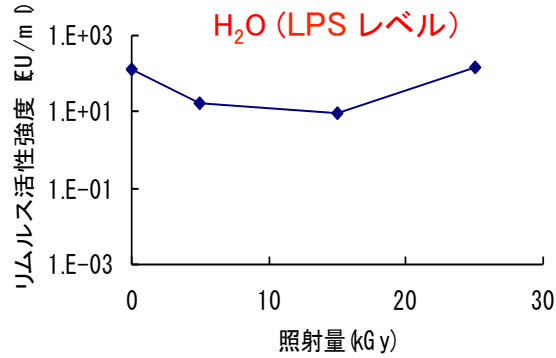


IL-6産生能に及ぼすガンマ線照射の影響②

水溶液中/菌体レベル



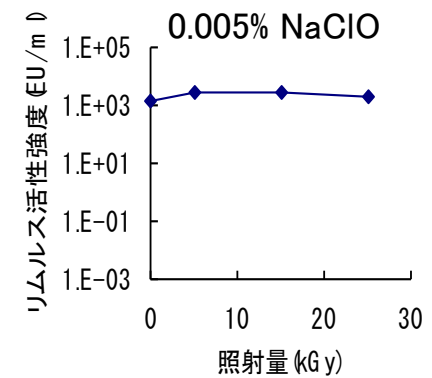
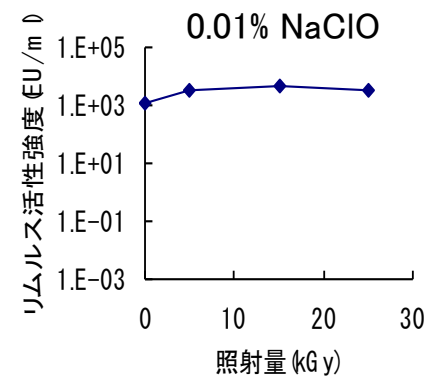
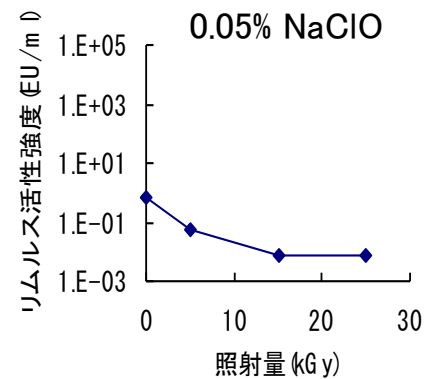
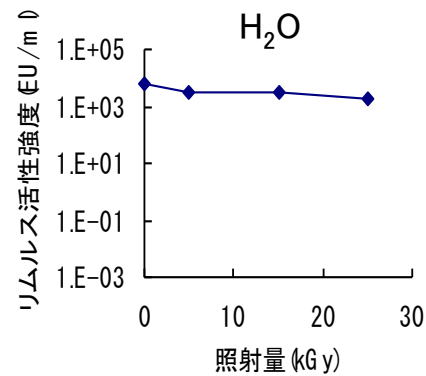
コラーゲン存在下におけるガンマ線照射の影響



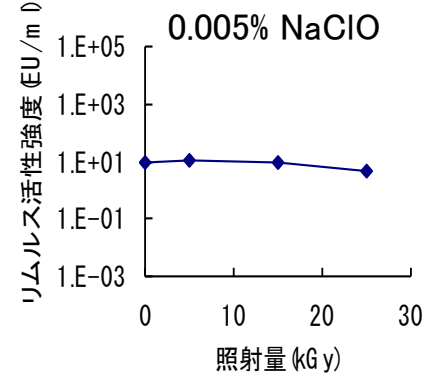
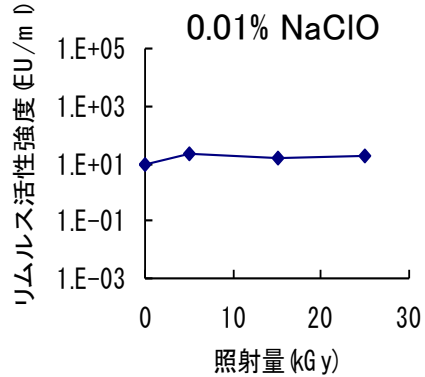
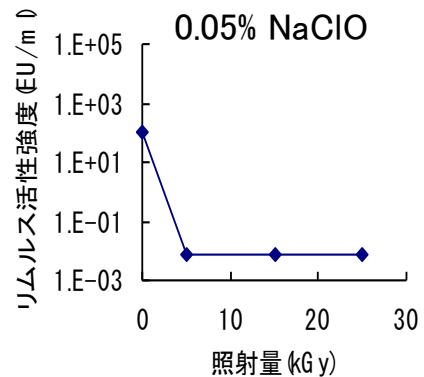
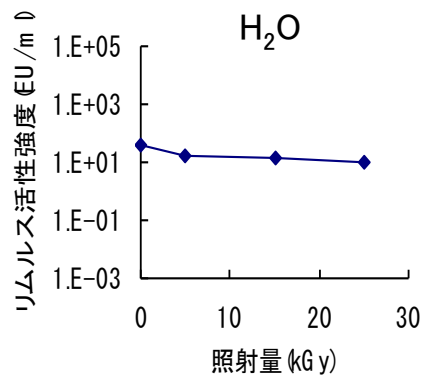
	H ₂ O			NaClO 0.01%			NaClO 0.005%		
	溶解性	残留物量	粘度	溶解性	残留物量	粘度	溶解性	残留物量	粘度
0 kGy	溶解性	-	+++	白色膨潤	+++	++	透明膨潤	+++	++
5 kGy	白色膨潤	+++	-	白色膨潤	+++	-	白色膨潤	+++	-
15 kGy	白色膨潤	++	-	白色膨潤	++	-	白色膨潤	++	-
25 kGy	崩壊	+	-	白色膨潤	+	-	白色膨潤	+	-

アルギン酸存在下におけるガンマ線照射の影響

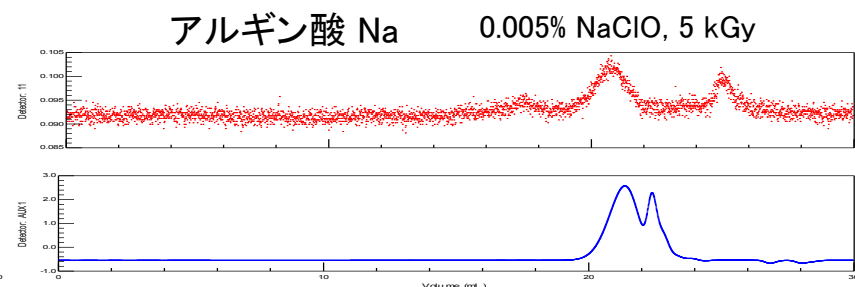
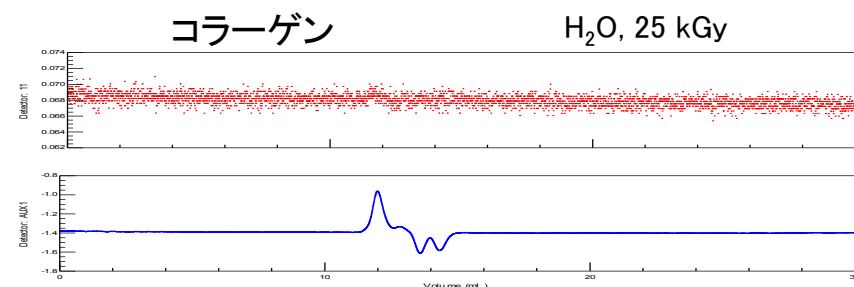
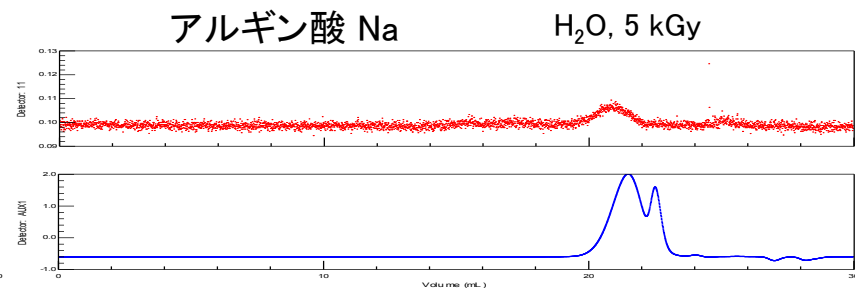
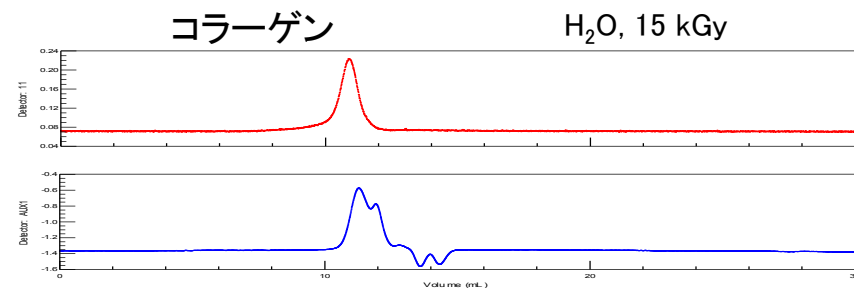
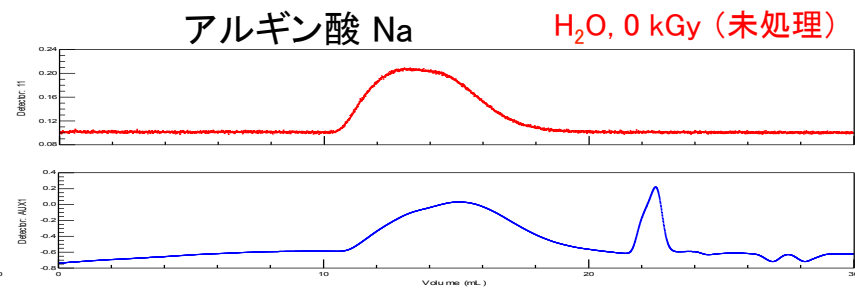
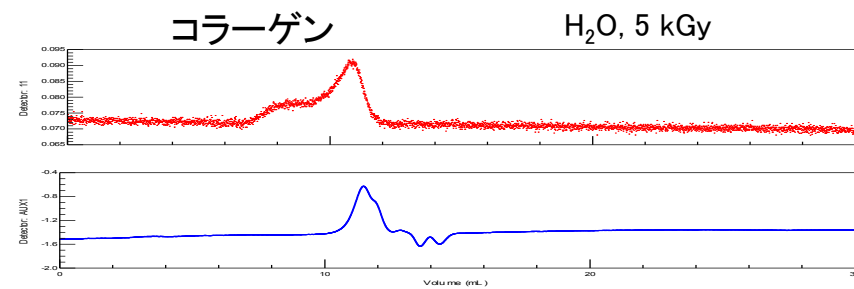
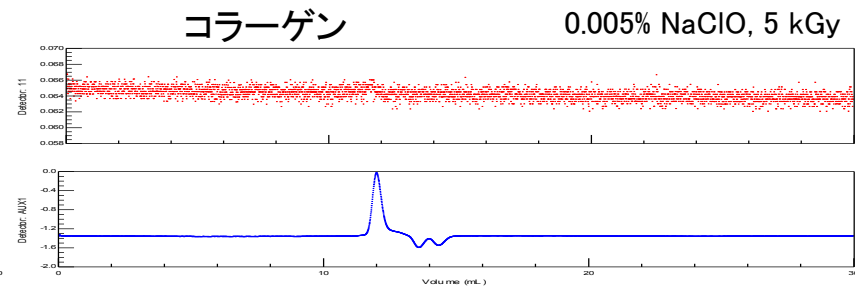
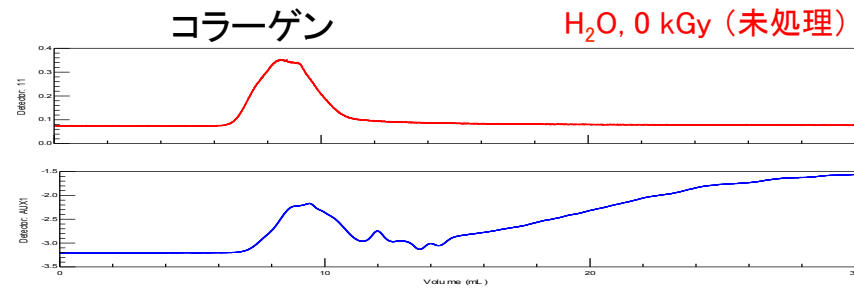
LPSレベル



菌体レベル



ガンマ線照射による天然医用材料の分子量変化



リムルス活性に及ぼす化学処理の影響

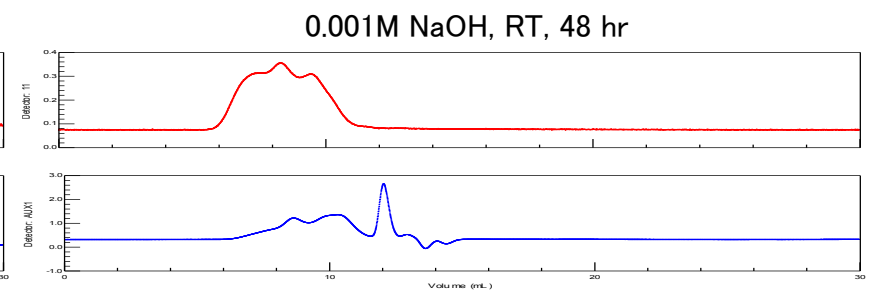
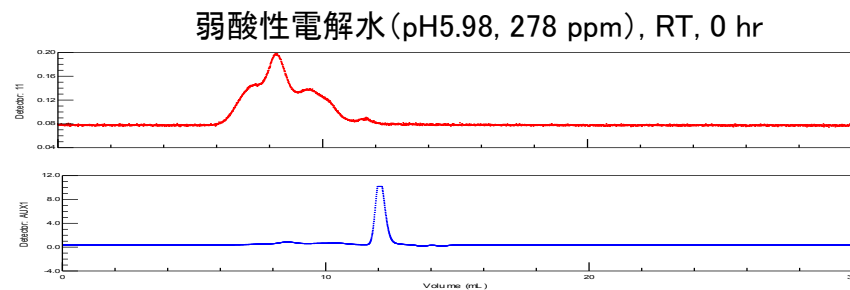
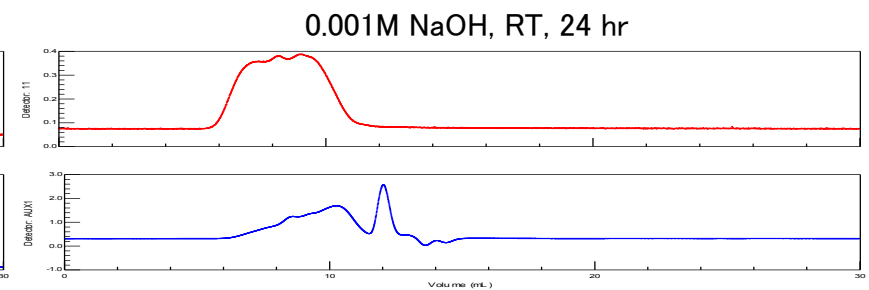
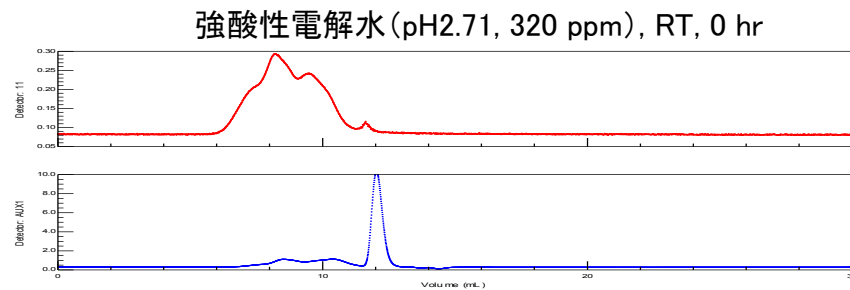
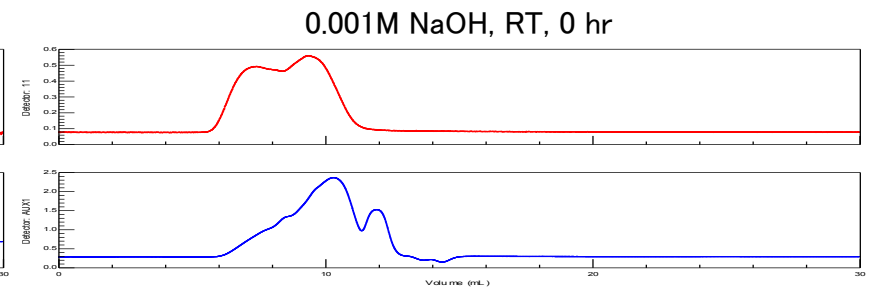
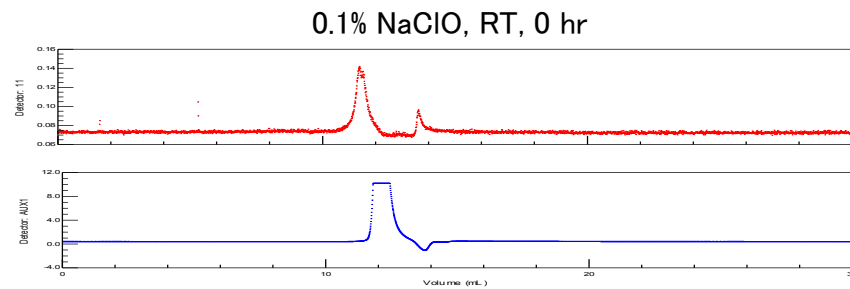
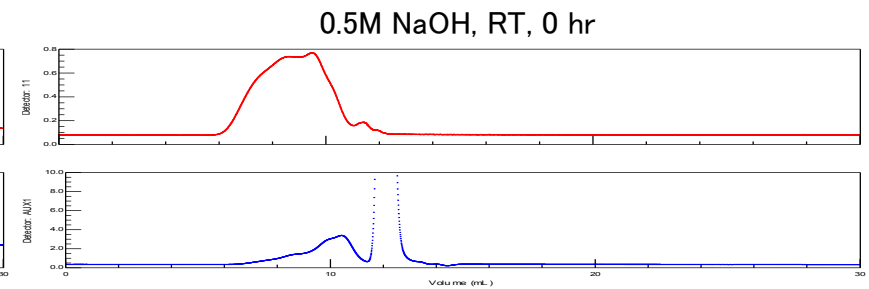
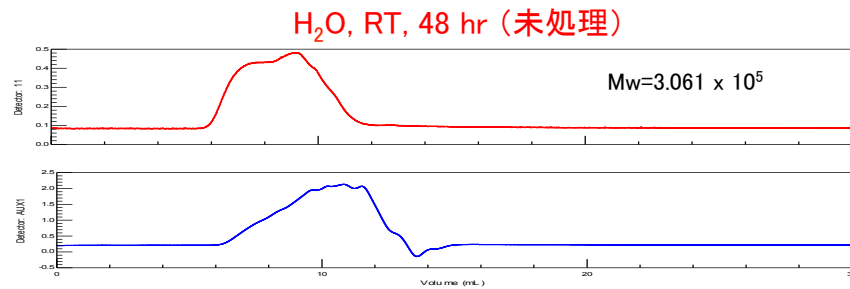
マトリックス存在下

		アルギン酸ナトリウム				コラーゲン			
		LPSレベル		菌体レベル		LPSレベル		菌体レベル	
		EU/ml	回収率 (%)	EU/ml	回収率 (%)	EU/ml	回収率 (%)	EU/ml	回収率 (%)
H ₂ O		8203	100	3791	100	1027	100	1178	100
強酸性電解水* ¹	1708 ppm	596	7	1510	40	0.2	0.02	82	7
	341 ppm	3679	45	2222	59	0.3	0.03	639	54
弱酸性電解水* ²	1484 ppm	1901	23	1267	33	N.D.		457	39
	297 ppm	2939	36	2263	60	0.2	0.02	834	71
NaOH	0.5 M	5	0.06	1.6	0.04	N.D.	0	0.084	0.01
	0.25 M	2	0.02	3.4	0.09	N.D.	0	N.D.	0
	0.1 M	2	0.03	2.8	0.07	N.D.	0	N.D.	0
	0.05 M	2	0.03	4	0.1	0.07	0.01	N.D.	0
	0.025 M	5	0.06	13	0.3	0.81	0.08	0.077	0.007
NaCl	5%	5	0.06	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	0
	1%	8	0.09	4	0.1	N.D.	0	N.D.	0
	0.5%	37	0.5	12	0.3	487.5	47	90	8
	0.1%	320	4	611	16	475.1	46	116	10
	0.05%	415	5	626	17				
	0.025%	669	8	4269	113				
	0.01%	2144	26	1259	33				
	0.005%	2923	36	1834	48				

*1 : pH 2.63

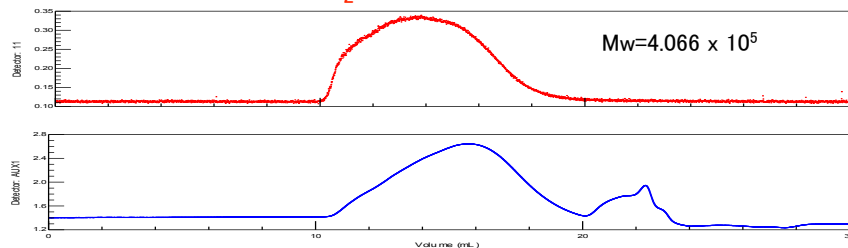
*2 : pH 5.81

化学処理によるコラーゲンの分子量変化

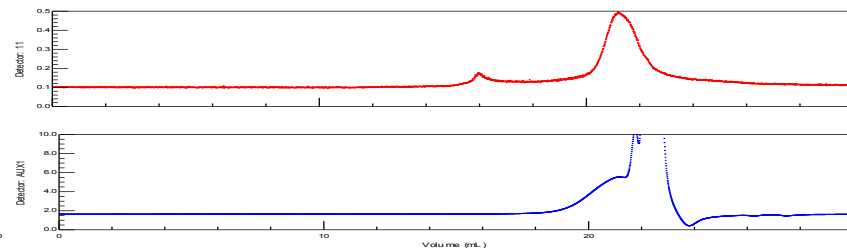


化学処理によるアルギン酸の分子量変化

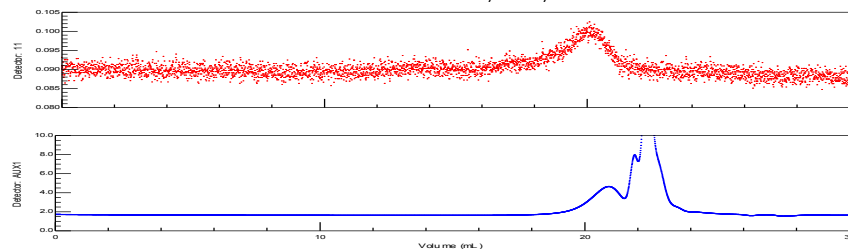
H₂O, RT, 0 hr (未処理)



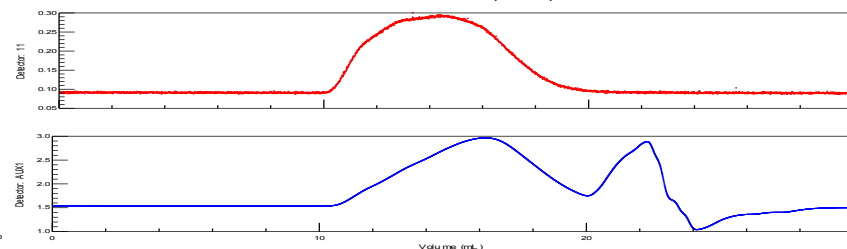
0.5M NaOH, RT, 0 hr



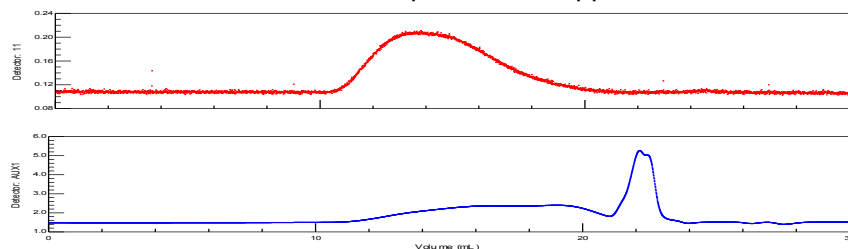
0.1% NaClO, RT, 0 hr



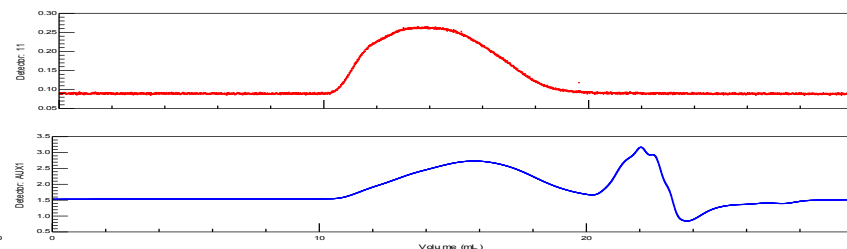
0.001M NaOH, RT, 0 hr



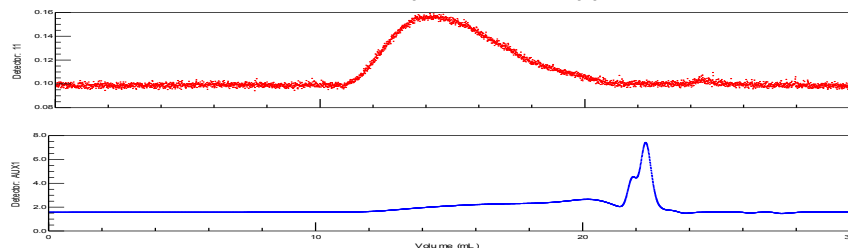
強酸性電解水 (pH2.71, 320 ppm), RT, 0 hr



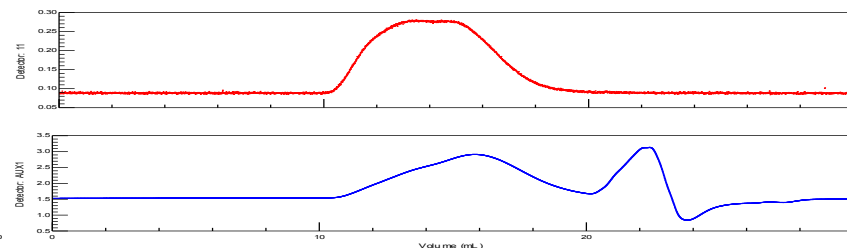
0.001M NaOH, RT, 24 hr



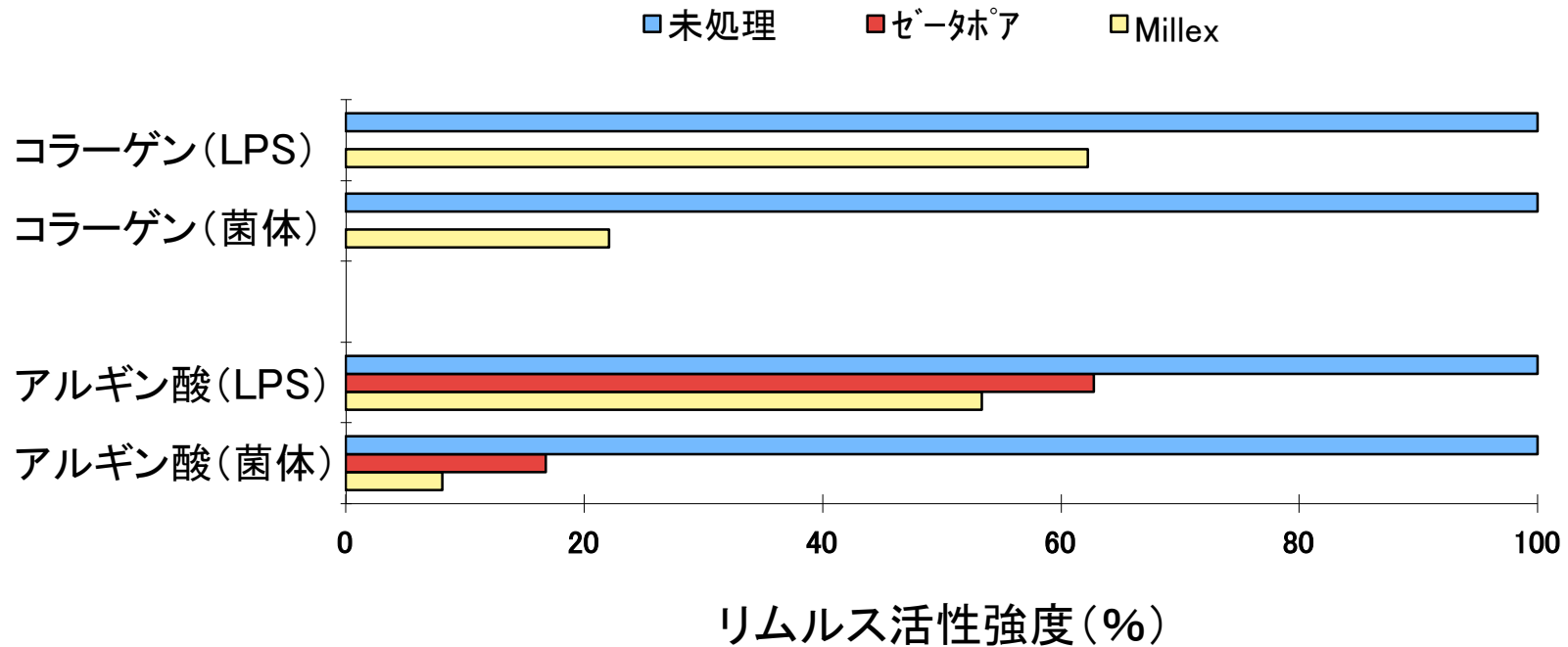
弱酸性電解水 (pH5.98, 278 ppm), RT, 0 hr



0.001M NaOH, RT, 48 hr



フィルター濾過によるリムルス活性の変動



マトリックス回収率

コラーゲン: ゼータポア = 10%
Millex = 62%

アルギン酸: ゼータポア = 89%
Millex = 99%

【小括】ガンマ線照射及び化学処理による不活化

γ線照射

- ・乾燥条件下では殆ど失活しない
- ・LPSレベルの活性は水溶液中での照射で3.5桁低下
- ・菌体レベルの活性は水溶液中での照射でも変化しない
- ・次亜塩素酸Naは濃度依存的に失活を増強する
- ・その他の薬剤はラジカルスカベンジャーとして作用する

化学処理

エンドキシン活性の不活化に有効な薬剤

強酸性電解水, 弱酸性電解水, 水酸化ナトリウム,
次亜塩素酸ナトリウム

【小括】医用材料存在下における不活化

濾過処理

菌体レベルの活性はメンブランフィルター濾過により80-90%程度除去可能。

γ線照射

マトリックスに混在するエンドトキシンは低濃度の次亜塩素酸 Na 併用照射により失活可能だが、マトリックス自体の性状に大きな影響を及ぼす。

化学処理

マトリックスに混在するエンドトキシンは化学処理により失活可能だが、酸性電解水、次亜塩素酸 Na および高濃度の水酸化ナトリウム処理はマトリックス自体の性状に大きな影響を及ぼす。

マトリックスの構造を保持した状態でエンドトキシン活性を低下させるためには、Millexフィルタ濾過後の低濃度の水酸化ナトリウム処理が効果的である。

オゾン・過酸化水素混合ガス装置の開発

AMED/創薬基盤推進研究事業(官民共同研究事業)

医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発 (平成26年度から3年計画)

菊池グループ(国立衛研)/分担研究開発課題

- ① リムルス試薬による樹状細胞等を用いたエンドキシン測定法の検証に関する研究
- ② エンドキシン測定法に用いるヒトiPS細胞由来樹状細胞の樹立に関する研究
- ③ ヒトiPS細胞由来樹状細胞の解析とエンドキシン測定法への適用に関する研究



Human Cell-based pyrogen Test (HCPT) の有用性検証

- ④ オゾン・過酸化水素混合ガス滅菌法とエンドキシン等発熱性物質不活化に関する研究



新規滅菌装置の開発, 薬事申請へ向けた性能評価

株式会社IHI
との共同研究

研究協力者(敬称略)

三瀬勝利(PMDA専門委/元・国立衛研副所長)

降矢 勉(ハムリー株式会社学術顧問/元・国立衛研動物管理室長)

渡部一人(中外製薬株式会社富士御殿場研究所主幹研究員)

白井淳資(東京農工大学獣医伝染病学講座教授)

オゾン・過酸化水素混合ガス装置の開発

開発当初の目的

従来のCBRN除染技術

化学 (Chemical)、生物 (Biological)、放射性物質 (Radiological)、核 (Nuclear)

従来、化学兵器 (Chemical)、生物兵器 (Biological) の除染には次亜塩素酸カルシウム (さらし粉) 溶液等塩素系除染剤を使用することが中心

特徴

強い酸化力

化学兵器 ⇒ 分解

生物兵器 ⇒ 不活化

問題点

除染剤は塩素成分を含有

金属の腐食など装備品の機能損耗招く



精密機器



施設内部

応用展開

材料劣化が少なく、環境に優しいガス滅菌法



- EOG滅菌に代わるガス滅菌ニーズ
- 非耐熱性製品にも適用可能な常温乾燥下におけるエンドキシン不活化ニーズ

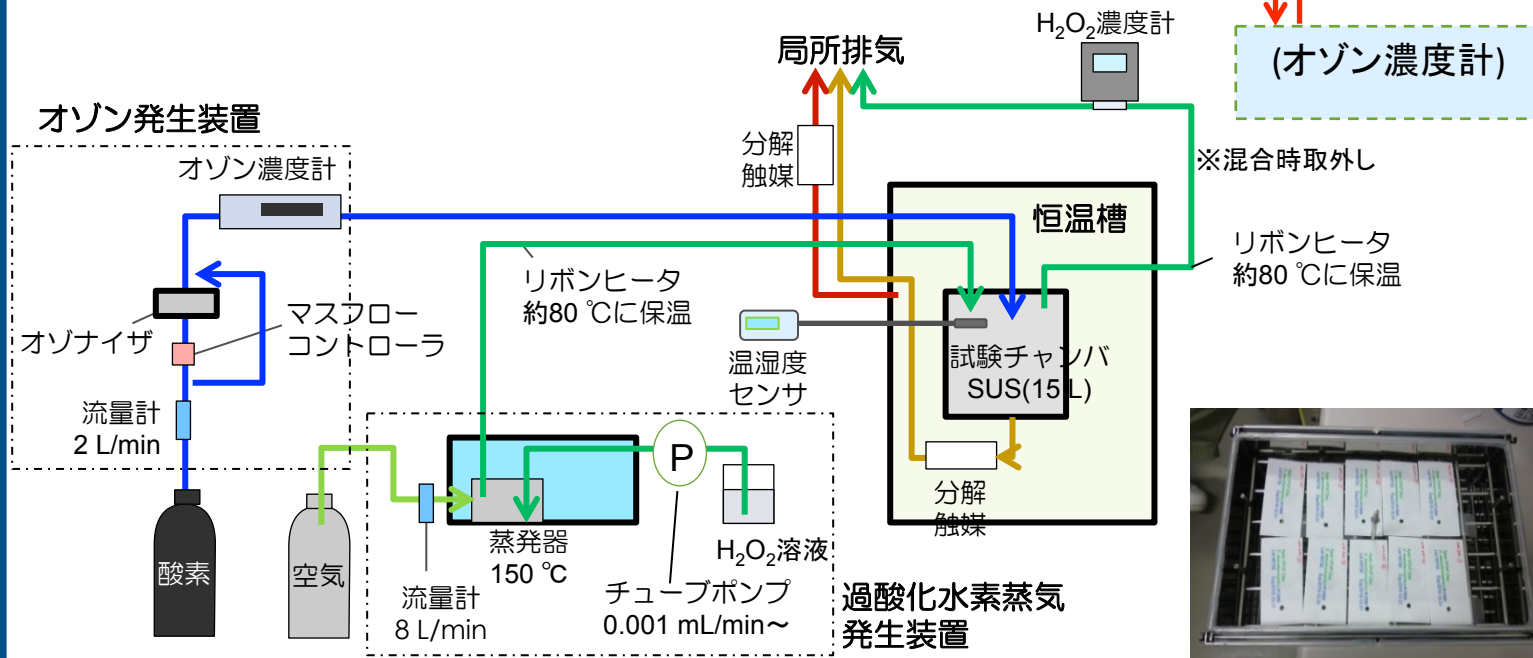
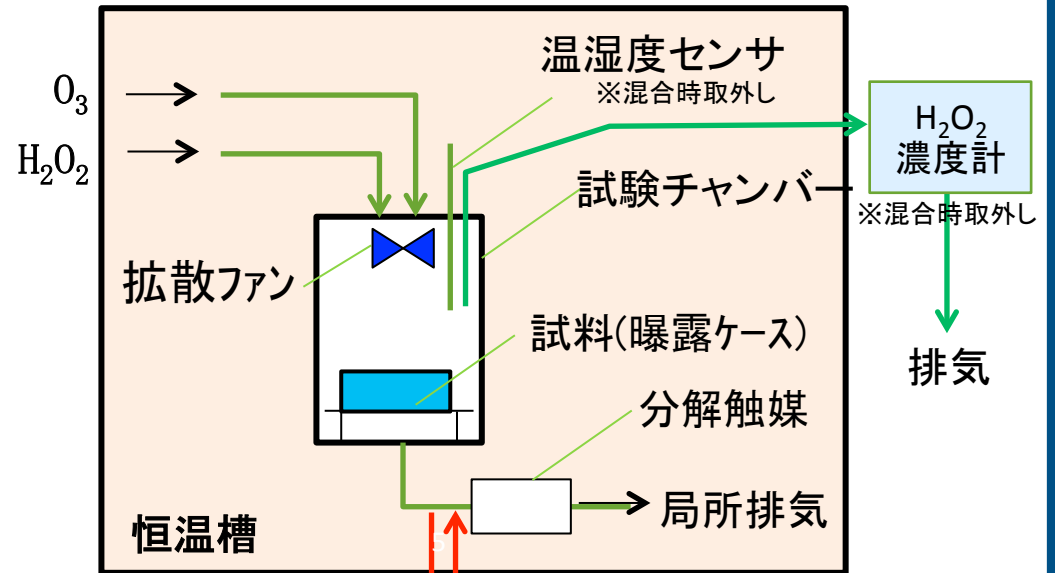
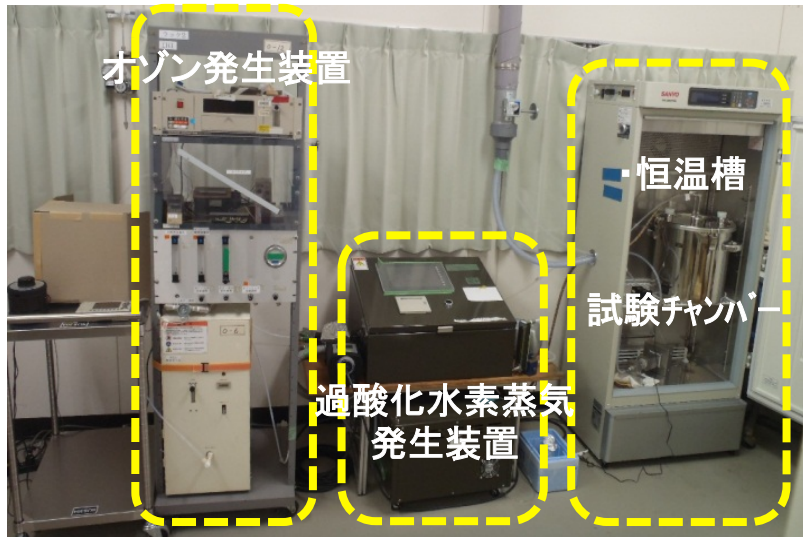


医薬・医療・農業分野への
応用展開



国立衛研と株式会社IHIの
共同研究がスタート

オゾン・過酸化水素混合ガス装置の構成



試験チャンバ
ステンレス製(15L)



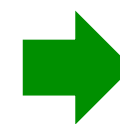
曝露ケース(蓋付)
BI(10枚)

従来の滅菌法のエンドトキシン不活化効力

方式	ガンマ線	電子線	EOG	高圧蒸気	過酸化水素 低温ガス プラズマ	過酸化水素/過酢酸 低温ガス プラズマ
処理法	185TBq Co ⁶⁰	加速電圧4.8 MeV, ビーム電流20mA, 搬送速度11m/min	濃度600mg/L, 温度54°C, 湿度60%RH	温度121°C飽和水蒸気処理, 蒸気投入時間6秒間, 排気時間10-12秒間	濃度6mg/L, 温度24°C, 湿度60%RH, 時間75分, 3サイクル	温度33°C, 拡散時間20分, プラズマ時間10分, 12サイクル
結果	20kGyの照射で93%不活化 93%	19kGyの照射で72%不活化 72%	30分の暴露時間で76%不活化。120分まで暴露しても活性減少に変化なし。 76%	2分間の処理で89%不活化。処理時間を増やしても活性減少に変化なし。 89%	1サイクルで74%不活化。サイクル数を増やしても活性減少に変化なし。 74%	6サイクルで95%不活化。サイクル数を増やしても活性減少に変化なし。 95%

出典: 東京都立産業技術研究所研究報告 第2号: 126-129 (1999)

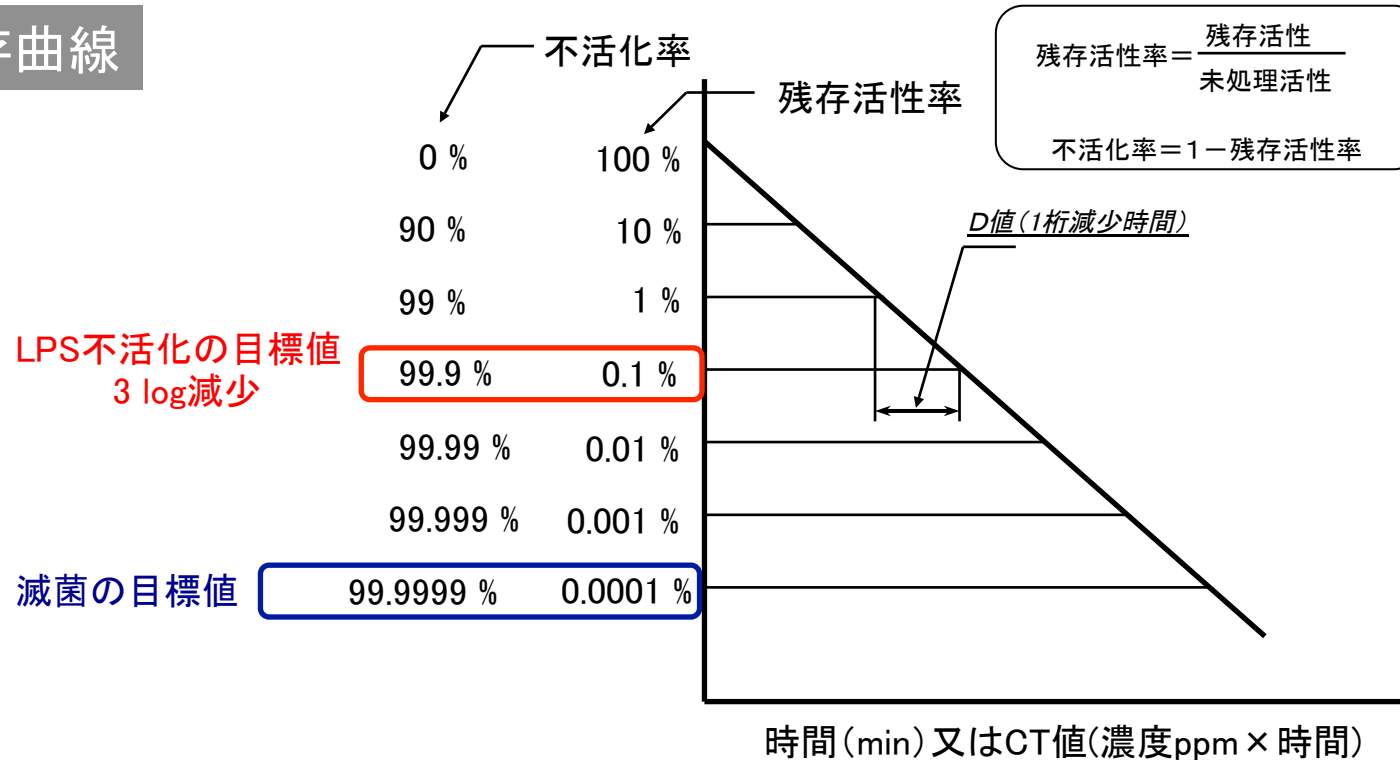
非耐熱性製品を被験物とした滅菌法のエンドトキシン不活化効力はいずれも2桁に達しない



オゾン・過酸化水素混合ガスの効果？

エンドキシン不活化の目標値と試験条件

生存曲線



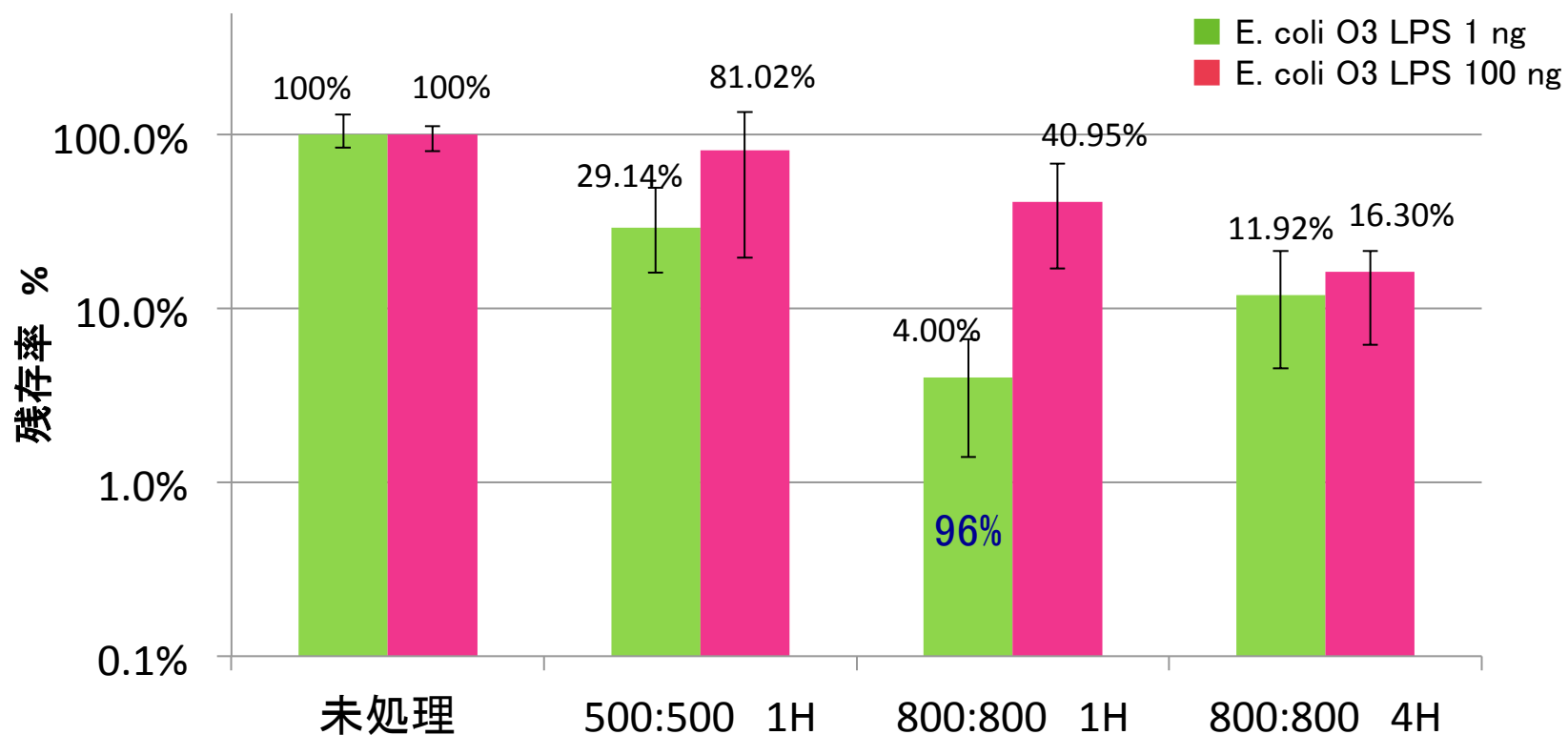
試料 (EI, Endotoxin Indicator)

- ・LPS: E. coli O3K2a2bH3 ATCC23501
- ・担体: バイアル瓶(16Φ), ガラス板(5mm各)

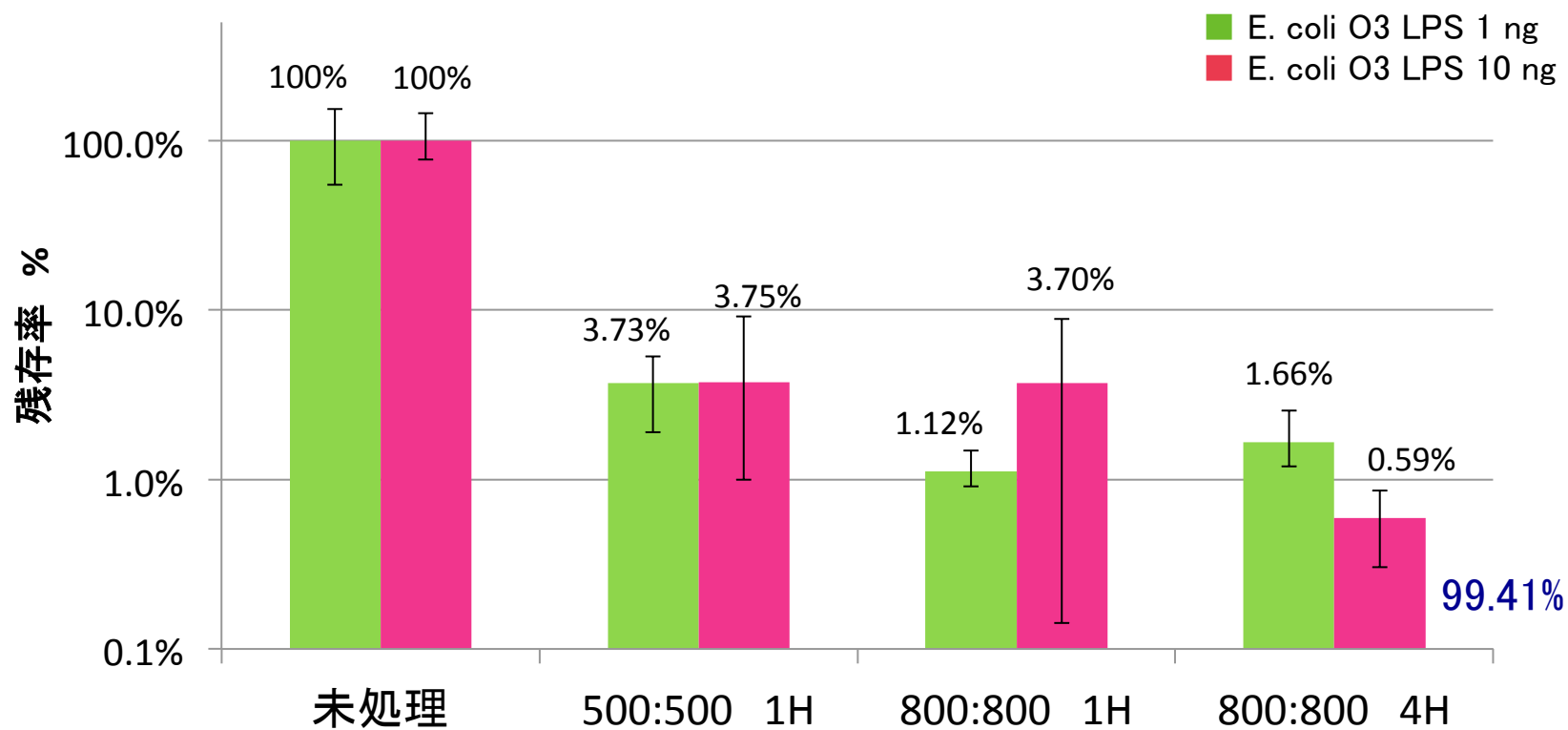
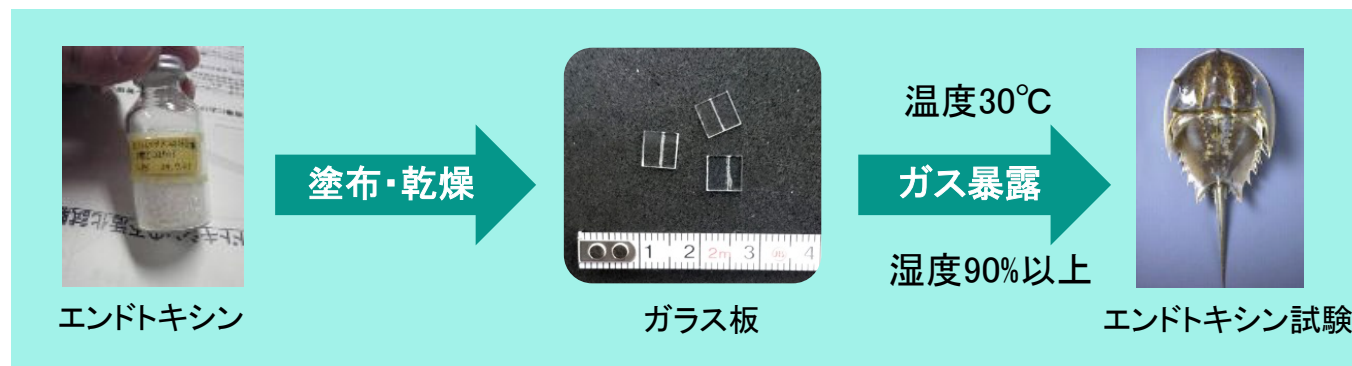
エンドキシン試験

- ・試薬: エンドスペシー® ES-50Mセット
- ・標準品: 日本薬局法エンドキシン標準品

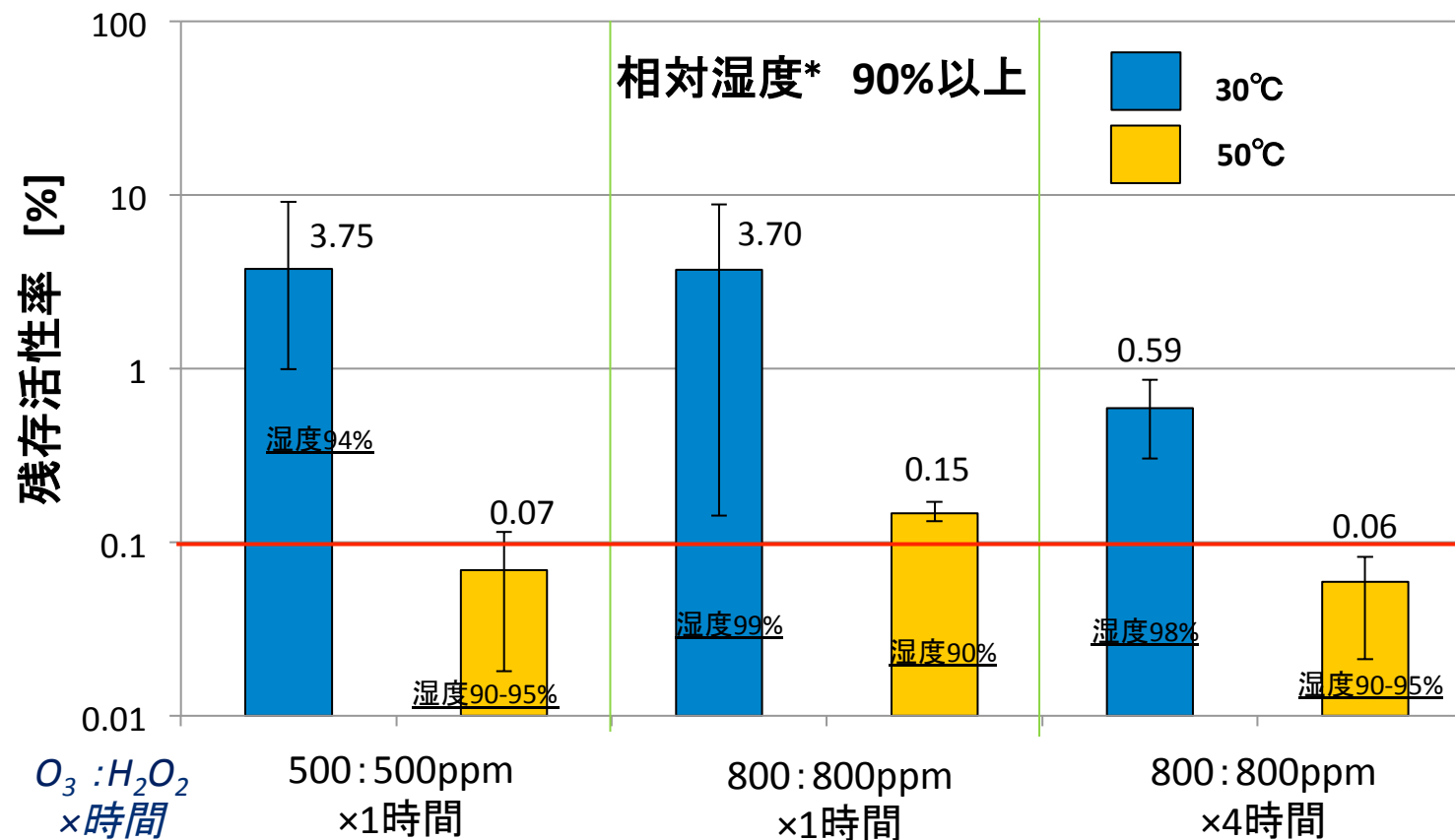
オゾン・過酸化水素混合ガス処理 1stトライアル



オゾン・過酸化水素混合ガス処理 2ndトライアル



処理条件の最適化 ①温度

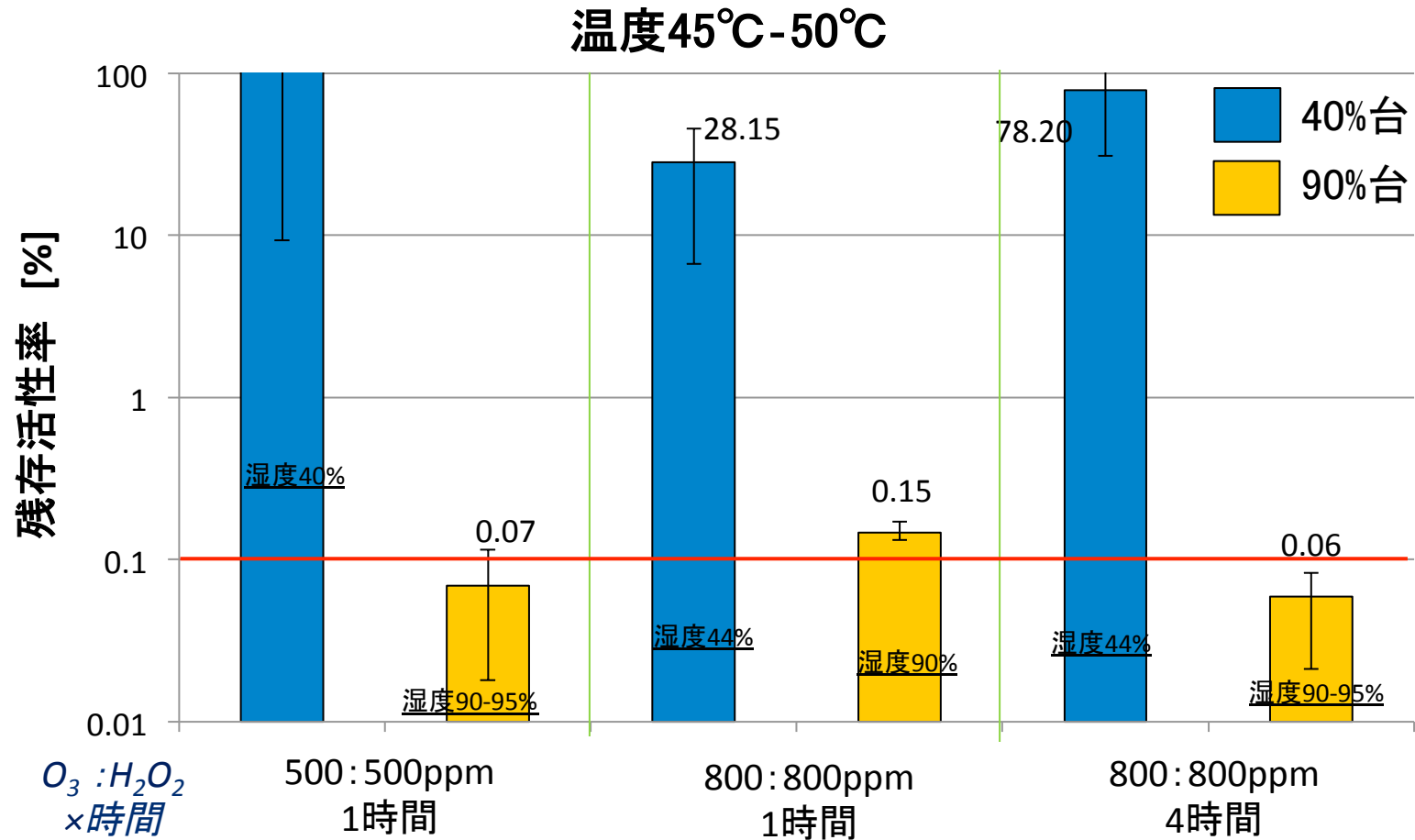


相対湿度90%以上の場合、温度が高い方が不活化効力も高い

* 相対湿度

- ・静電容量式センサによる測定値。
- ・過酸化水素存在下では、水蒸気の場合より高値を示す。この資料で提示の湿度は全てこの見かけの値を用いる。

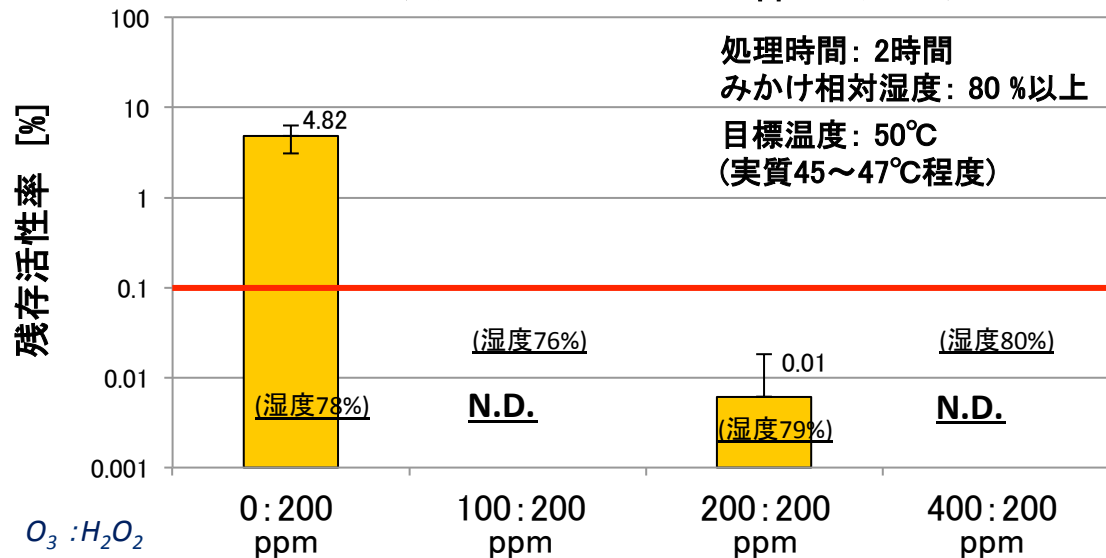
処理条件の最適化 ②相対湿度



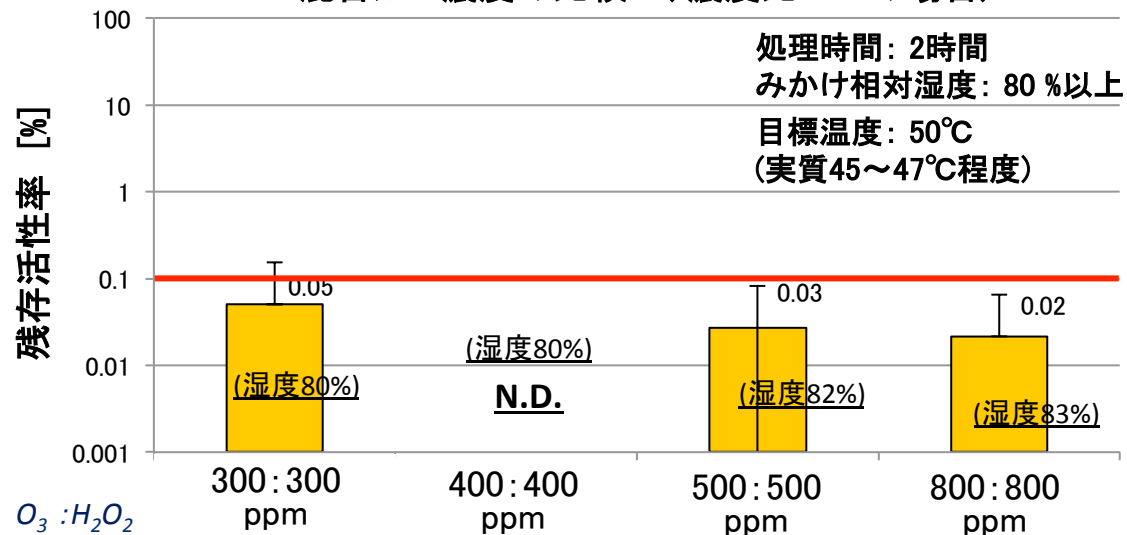
温度約50°Cの場合、相対湿度が高い方が不活化効力も高い

処理条件の最適化 ③ガス濃度

混合ガス濃度の比較 (過水200ppm固定の場合)



混合ガス濃度の比較 (濃度比1:1の場合)



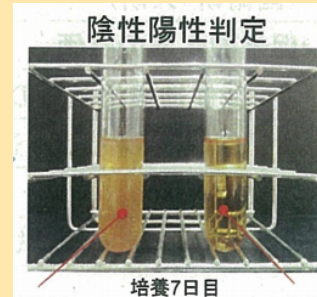
① 温度50°C/湿度80%で、2時間処理する場合、200ppm:200ppm程度までガス濃度を下げても、目標値である3Log減少の不活化効果が確認された。(但し再現性確認が必要)

② 今後、減圧タイプ試験装置を用いて不活化条件の**最適化**を試みると共に、菌体レベルの不活化についても検討する。

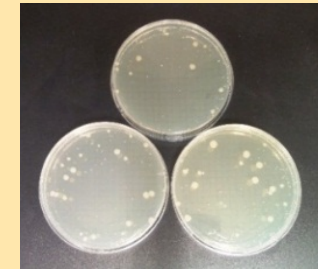
オゾン・過酸化水素混合ガスの殺菌効果



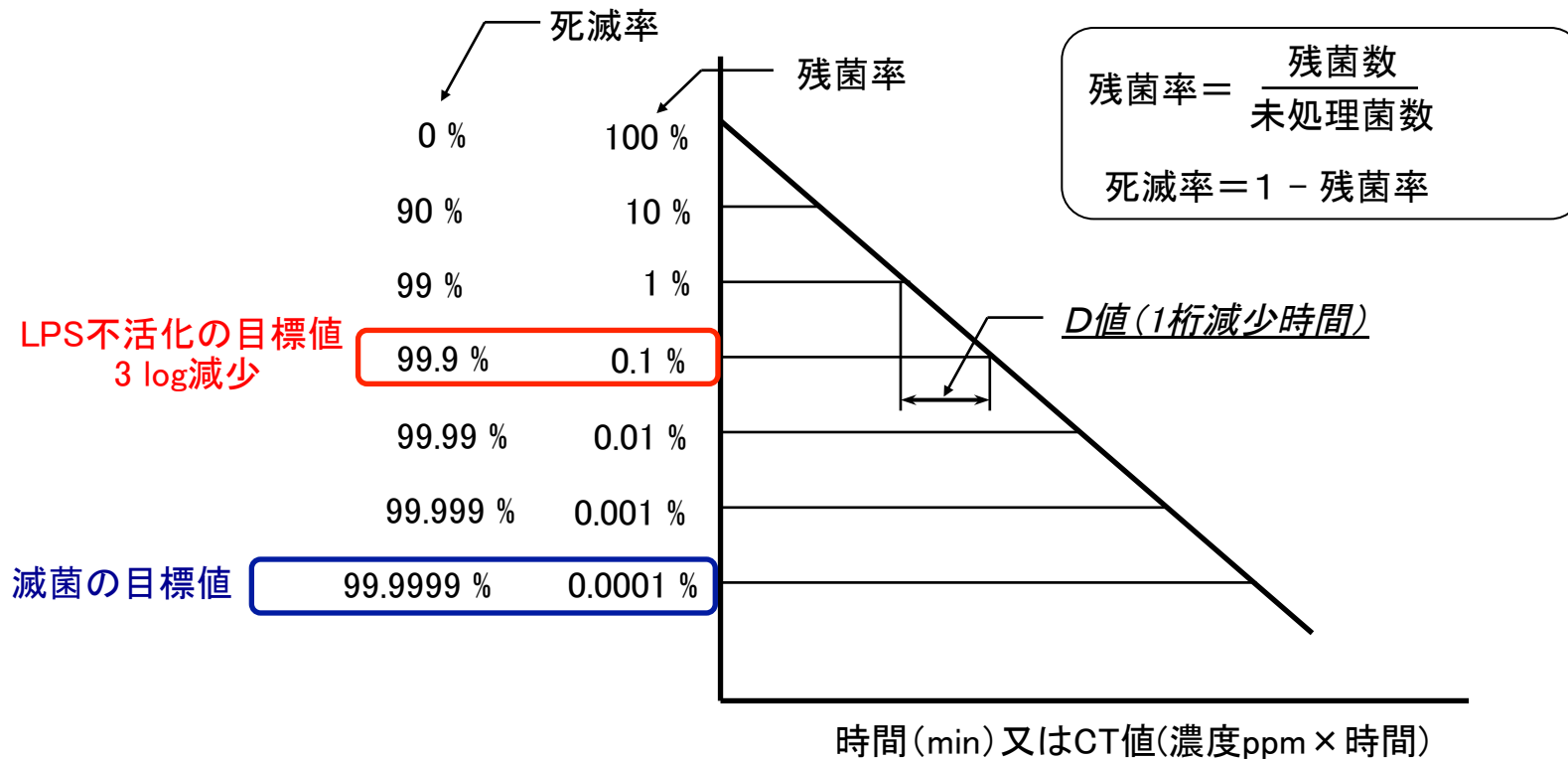
BI (Mesa Labs社製, 開封状態)
 指標菌 *G. Stearothermophilus* 1.6×10^6 cfu
 ATCC12980



部分生残の条件を観測
 ⇒(D値算出)

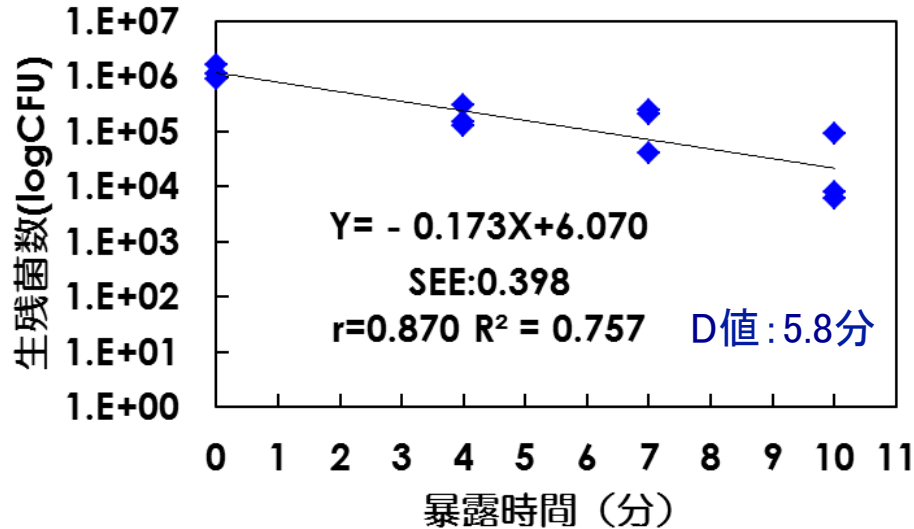


コロニーから菌数を計測
 ⇒生残曲線(D値算出)



生存曲線法によるD値の算出

30±2°C, 55±5%RH, O₃:H₂O₂=200ppm:200ppm



混合ガスにおいても、生残菌数が処理時間に比例して直線的に減少することが確認された。

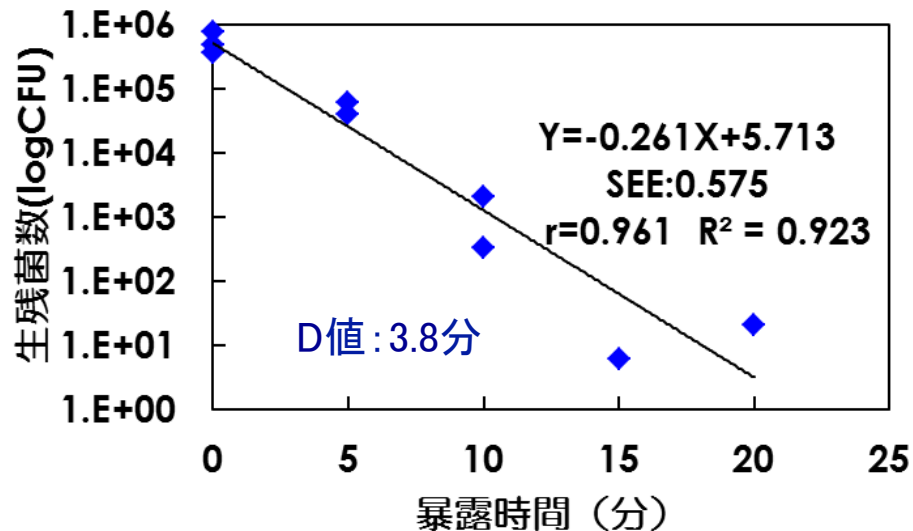


滅菌保証の時間管理が可能



滅菌条件の最適化

30±2°C, 55±5%RH, O₃:H₂O₂=300ppm:300ppm

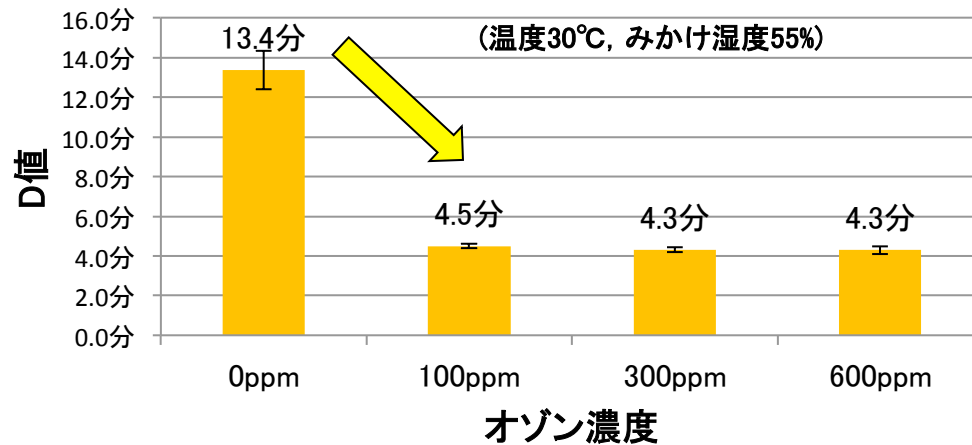


* 相対湿度

- ・静電容量式センサによる測定値。
- ・過酸化水素存在下では、水蒸気の場合より高値を示す。この資料で提示の湿度は全てこの見かけの値を用いる。

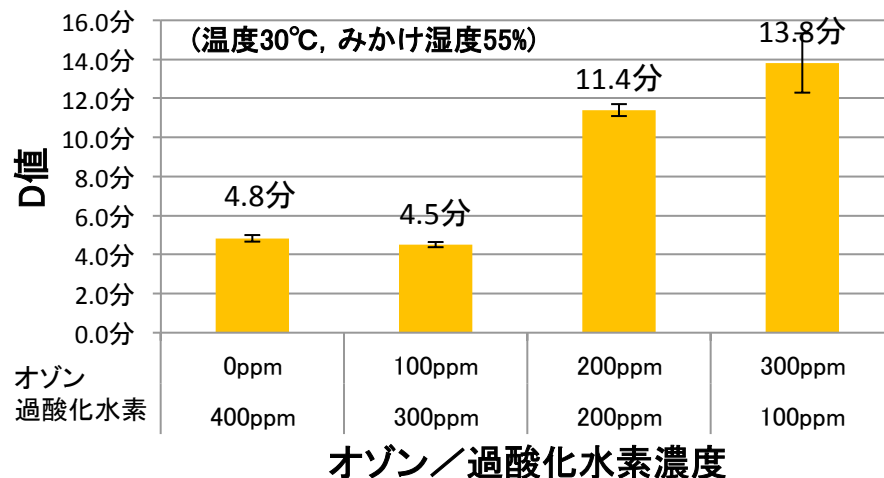
殺菌効果に関する条件検討 ①ガス濃度比

オゾン濃度の影響確認 (過酸化水素300ppm固定)



- ① 過酸化水素ガス単独処理と比較して、オゾンガスを併用することにより、D値が約1/3まで低下したことから、混合ガスの優位性が確認された。
- ② 促進酸化により生成されたOHラジカル等が殺菌効果の発現に関与しているものと推測した。また、オゾンガスは必要以上に添加する必要がないことも判明した。

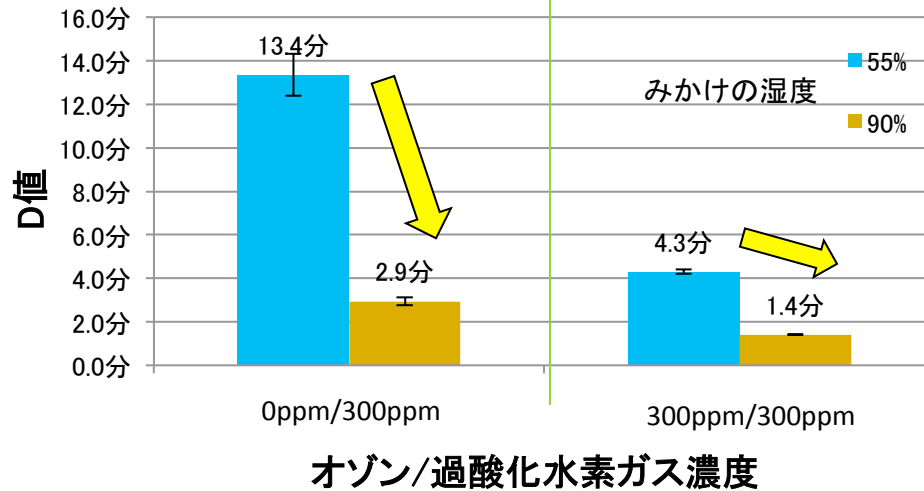
合計濃度(400ppm)統一比較



過酸化水素ガスの割合が少ないよりは、オゾンガスと等濃度あるいは過酸化水素ガスの割合が多い方が殺菌効果も高い傾向を示すことが確認された。

殺菌効果に関する条件検討 ②温度・湿度

湿度の影響確認(温度30°C)



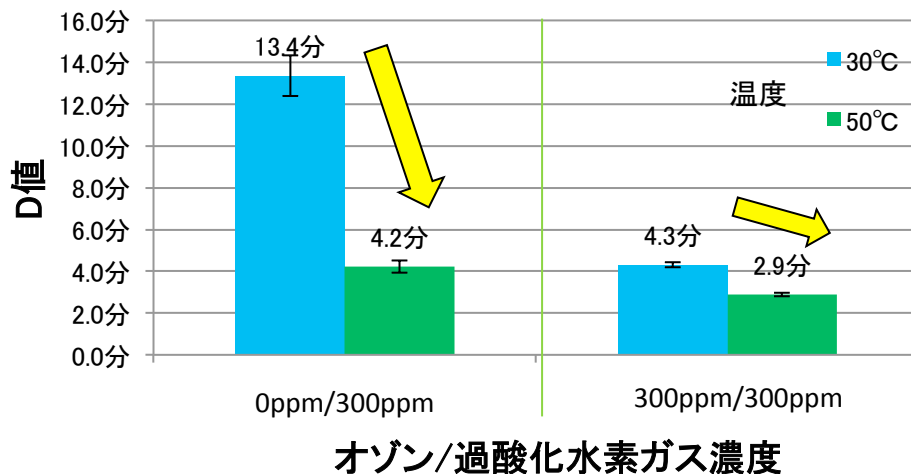
湿度の影響

- ・湿度が高いほど、D値が低下する。
- ・但し、材料劣化を防ぐため、結露しないことが重要(90%を上限)。

温度の影響

- ・温度が高いほど、D値が低下する。
- ・但し、非耐熱性製品を被験物とするため、50°Cを上限とする。

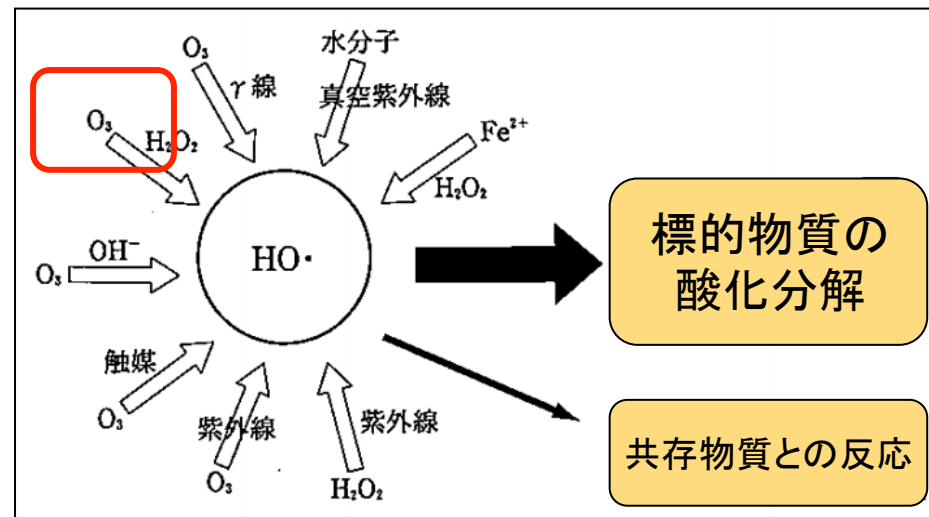
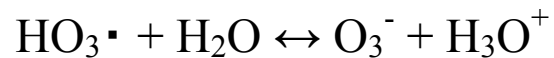
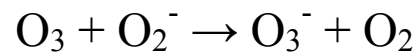
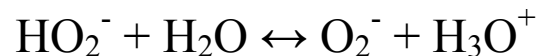
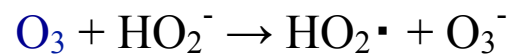
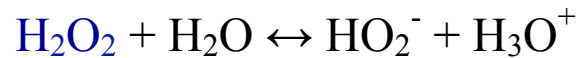
温度の影響確認(みかけ湿度55%)



現在、温度50°C/湿度90%条件下で殺菌効果の最適化を行っている(目標D値:1分以下)。

混合ガスによる殺菌・エンドキシン不活化原理

過酸化水素蒸気ガスとオゾンガスの混合に伴い、OH(ヒドロキシ)ラジカル又はその他のラジカルが発生し、その促進酸化作用により、殺菌及びエンドトキシン不活化効力が発現すると考えられる。



「オゾンハンドブック」より
※水溶液中での反応

材料に及ぼす影響評価(細胞毒性試験)

オゾン・過酸化水素混合ガス処理による材質変化を
細胞毒性の発現を指標として評価

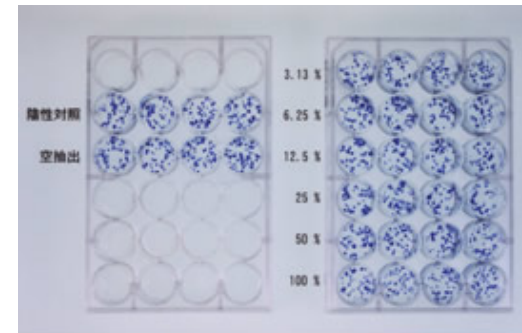


血液バッグ
(テルモHP)



人工関節
(岩井整形外科内科病院HP)

ガス処理



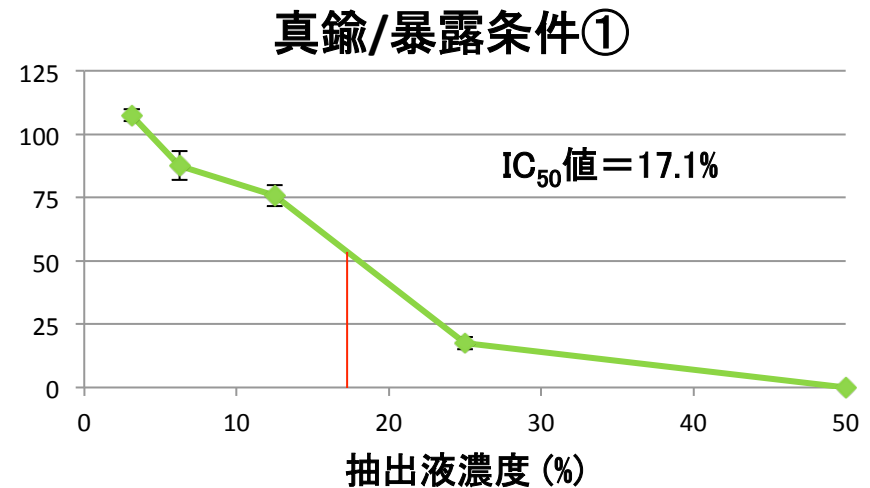
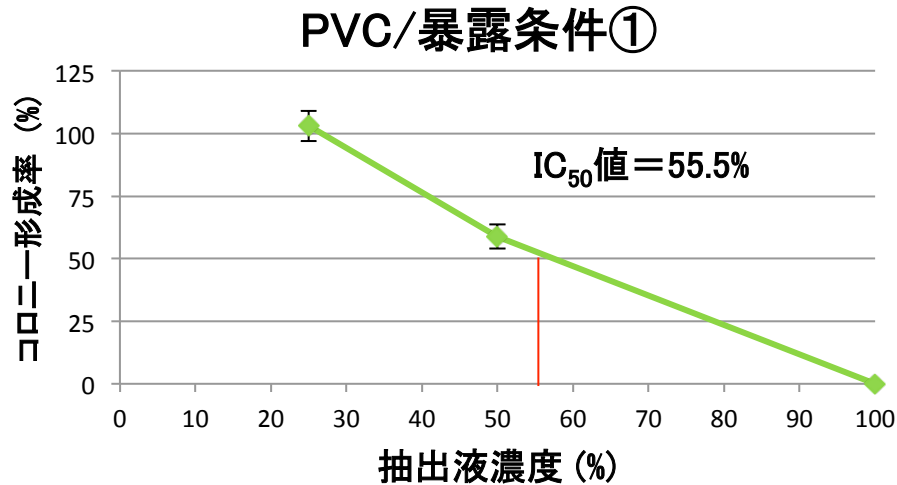
細胞毒性試験(食品分析センターHP)

条件	O ₃ ガス	H ₂ O ₂ ガス	時間	温度	湿度	備考
①	800 ppm	800 ppm	4時間	50℃	90%	エンドキシン不活化条件
②	800 ppm	—	4時間	50℃	90%	対照条件
③	—	800 ppm	4時間	50℃	90%	対照条件
④	200 ppm	200 ppm	2時間	30℃	50%	滅菌条件

被験物(モデル材料)

- ① 超高分子量ポリエチレン(UHMWPE):人工関節ライナー
- ② 軟質ポリ塩化ビニル(PVC):汎用型医療機器
- ③ 真鍮:容易に酸化される材料(H₂O₂ガス滅菌等の評価材料)

細胞毒性試験結果



条件	O ₃ ガス	H ₂ O ₂ ガス	時間	温度	湿度	50%阻害濃度 (IC ₅₀ 値)		
						UHMWPE	PVC	真鍮
①	800 ppm	800 ppm	4時間	46°C	84%	無毒性	55.5%	17.1%
②	800 ppm	—	4時間	47°C	87%	無毒性	57.0%	15.5%
③	—	800 ppm	4時間	47°C	84%	無毒性	70.8%	15.9%
④	200 ppm	200 ppm	2時間	32°C	68%	無毒性	71.7%	18.8%
未処理	—	—	—	—	—	無毒性	71.7%	15.9%

UHMWPE: ガス暴露の有無を問わず無毒性。

PVC: 高濃度O₃ガスを利用した時に弱い毒性を新たに発現(⇒O₃ガス濃度を極力下げる)。

真鍮: 未処理の状態でも毒性有り。ガス暴露後でも毒性は増加しない。

【小括】エンドトキシン不活化及び殺菌効力

エンドトキシン不活化効力

- ①エンドトキシンの不活化には温度及び湿度が大きく影響する。
- ②温度50°C/相対湿度80%条件下、各200 ppmの混合ガスで2時間処理することにより、LPSレベルの活性は3桁減少する。
- ③今後、減圧タイプ試験装置を開発して、不活化条件の最適化を行う。
- ④菌体レベルの不活化についても検討する。

殺菌効力

- ①過酸化水素ガス単独時の殺菌効果はオゾンガス添加により増強される。
- ②オゾンガス量は必要以上に添加する必要がない。
- ③温度及び湿度ともに高い方がD値が向上する。
現在の最適値 ⇒ 30°C/90%RH/各300 ppm:D値=1.4分
- ④温度50°C/湿度90%での滅菌効果について検討中。

材料への影響

- ①モデルスタディの結果をみる限り、材料へ与える影響は無視できる。
- ②今後、様々な材料への影響を評価する。

今後の展望

滅菌・除染装置

医療用滅菌装置



参考イメージ: IHIシバウラ製 オゾン装置

移動型燻蒸装置



自動生産システム

無菌充填ラインライン



参考イメージ: IHI施工事例

滅菌・消毒市場

医薬品製造ライン

再生医療機器・手術用オペ具等

鳥インフル・口蹄疫

エンドキシン不活化市場

液薬製造ライン

再生医療機器・手術用オペ具等

透析機器等

抗がん剤等の分解市場

抗がん剤製造ライン

抗生物質製造ライン

病院調剤室

市場ニーズ1

施設に優しい滅菌・消毒

市場ニーズ2

エンドキシン不活化

市場ニーズ3

危険薬剤の分解

技術シーズ

CBRN除染技術

終わりに

ご静聴ありがとうございました



国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

薮島 由二
haishima@nihs.go.jp