

(東京医療保健大学大学院学位論文)

Enterococcus faecium を使用した
洗浄消毒装置用生物学的インジケーターの開発

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科 博士課程

2015 年 1 月 14 日

岡 崎 悦 子

***Enterococcus faecium* を使用した洗浄消毒装置用生物学的インジケーターの開発**

背景

洗浄消毒装置 Washer-disinfector (以下、WD) に対して、多くの医療施設は、温度管理や洗浄評価インジケーターを用いた洗浄評価をしている。しかし、それらはあくまで機器の作動状況の確認であり、熱水消毒の効果を評価するためには温度や洗浄の物理的モニタリングだけでなく、消毒効果を直接的に検証できる微生物を使用した評価手段が必要である。

目的

熱水消毒の効果を微生物学的に評価するために、指標菌 *Enterococcus faecium* (以下、*E. faecium*) を使用した生物学的インジケーターbiological indicator (以下、BI) を開発する。そのBI指標菌の安定性、WDを用いた微生物学的な評価、またWDの各種パラメーターのBIに及ぼす影響等を検証した上で、自施設でBIを作製する方法、使用手順、保管について提案する。

実験方法

キャップ付試験管のキャップ部の内底面に指標菌 *E. faecium* JCM 5084 を滴下乾燥して付着させ、培地を入れた試験管本体に接合させるBIを試作した。試作BIをWD庫内16ヵ所に設置し、洗浄・すすぎ・熱水消毒の工程を運転し熱水消毒評価を検証した。3種類の有機物混合指標菌液を作成し、各種BIの時間経過と菌量変化を確認した。65℃に加温した滅菌精製水に菌液を投入する方法で、熱耐性の指標となるD値を算出し、更に有機物混合指標菌液のD値を求めた。2%乾燥酵母混合 *E. faecium* JCM 5084 を用いた推奨BIを完成させ、WDの各種パラメーターについてBIに及ぼす影響を検証した。WDの熱水消毒では殺滅できない芽胞形成菌が混入した場合の偽陽性判定を避けるために、3種類の培地について、BI指標菌の発育と芽胞形成菌の発育抑制の選択性を検討した。

結果

WDを熱水消毒工程まで運転し検証した試作BI 64個はすべて陰性化した。有機物共存下の指標菌を用いたBIは、完成後から5時間後、24時間後まで菌量は安定し、*E. faecium* JCM 5084 の D_{65} 値の平均±標準偏差は 24.21 ± 1.79 秒、乾燥酵母共存下では 27.39 ± 2.74 秒であった。推奨BI 128個を用いて各種パラメーターの影響を検証したところ、洗浄剤や噴射水の当りやすさには影響されず、80℃10分間の熱水消毒工程により陰性化するBIであることが確認できた。BIの陰性化により、 $6\text{Log}_{10}\text{CFU}$ の死滅を認めた。指標菌はTSB培地で発育が速く、0.05%アジ化ナトリウム加TSB培地は、芽胞形成菌の発育を抑制し熱損傷した指標

菌に対し陽性判定が多かった。

結論

2%乾燥酵母混合 *E. faecium* を指標菌とした BI の開発により、WD の管理において温度や洗浄評価など物理的モニタリングではできない熱水消毒の BI での評価を可能にした。本報告の BI 作製方法と使用手順に沿って、各施設が熱水消毒評価を行い、適切な WD 管理をしていくことが望まれる。

目 次

序章

1 背景	1
2 目的	1
3 本論文の構成	1

第1章 基礎検討

1.1 BI 開発に使用する WD の稼働性能～運転中の庫内及び器材内・外の温度推移～	
1.1.1 方法	2
1.1.2 結果	2
1.1.3 評価	3

第2章 BI 開発に関する検討

2.1 指標菌 <i>Enterococcus faecium</i> JCM 5084 を用いた試作 BI の熱水消毒評価の可能性	
2.1.1 試作 BI の作製	4
2.1.2 試作 BI による小型 WD の熱水消毒評価	4
2.1.3 結果	4
2.2 指標菌に混合する有機物の種類と時間経過の影響	
2.2.1 方法	5
2.2.2 結果	5
2.3 指標菌の熱抵抗性 (D 値) に関する検討	
2.3.1 方法	6
2.3.2 結果	6
2.4 BI 判定の影響因子 1: 噴射水の直接接触を考慮した BI の設置位置	7
2.5 BI 判定の影響因子 2: 熱水消毒工程の有無	
2.5.1 方法	7
2.5.2 結果	7
2.6 BI 判定の影響因子 3: 洗浄剤の影響	
2.6.1 方法	8
2.6.2 結果	8
2.7 選択培地の検討	
2.7.1 方法	8
2.7.2 結果	9
2.8 考察	9

第3章 結語	12
謝辞	13
文献	14
図表	17
Abstract	36

序章

1 背景

熱水消毒は効果が確実で、消毒薬等を用いないためそれらの残留がなく安全であり、経済的な方法でもあるため、耐熱性器材の消毒には熱水消毒を第一選択とすることが推奨される。

洗浄消毒装置 Washer-disinfector（以下、WD）に対し、多くの医療施設は、その効果保証として温度管理、TOSI[®]、クリーンチェック[®]などの洗浄評価インジケータを用いた洗浄評価をしているが、それらはあくまで機器の運転状況の確認にすぎない¹⁻⁵）。熱水消毒の効果を評価するためには、温度や洗浄の直接的/間接的評価などの物理的モニタリングだけでなく、消毒効果を直接的に検証できる微生物を使用した評価手段が必要である。

2 目的

熱水消毒の効果を微生物学的に評価するために、指標菌 *Enterococcus faecium*（以下、*E. faecium*）を使用した生物学的インジケータ-biological indicator（以下、BI）を開発する。そのBI指標菌の安定性、WDを用いた微生物学的な評価、またWDの各種パラメータのBIに及ぼす影響等を検証した上で、自施設でBIを作製する方法、使用手順、保管について提案する。

3 本論文の構成

本論文では、基礎検討と本実験の二部構成とし、第1章では、BI開発に使用するWDの稼働性能について検討した結果を報告する。第2章ではまず、試作BIを作製してWDを用いて熱水消毒を評価し、推奨BIの開発について、指標菌と混合する有機物の選定や熱抵抗性の検証、WDの各種パラメータのBIに及ぼす影響等の検証からBIの有効性を明らかにした。

第1章 基礎検討

1.1 BI 開発に使用する WD の稼働性能～運転中の庫内及び器材内・外の温度推移～

1.1.1 方法

使用した WD (NP-TM6 改良試作機[®]、パナソニック社)は、外形寸法 W550×D344×H592mm の小型卓上型であり、洗浄方法は固定ノズル噴射式・回転ノズル噴射式で、庫内正面奥右の壁面に9ヵ所、上段左と下段左右に回転式のプロペラにノズル4ヵ所ずつ計12ヵ所設置され、下段の右、左、上段、壁面のノズルから順番に噴射水が出る仕様である。標準コースやスピーディコースなど複数運転コースがある。洗浄・すすぎ(2回)・消毒の各工程においてそれぞれ約3リットルの給水と排水を繰り返し、消毒工程では80℃の熱水を10分間循環させる熱水消毒機能を有する。

WD 運転中の庫内(庫内に器材のない状態；空運転)の温度推移を確認するために、データロガー(midiLOGGER GL220[®] GRAPHTEC 社)を用い、庫内全体をまんべんなく温度測定すべく熱電対(サーモカップル)先端を、図1のごとく庫内を縦横に4分割したそれぞれの中央(①②③④)、および上段左右奥端(⑤⑥)、下段左右の奥端および前面端(⑦⑧⑨⑩)の計10ヵ所に固定した。

器材を入れた状態の器材内の温度も測定するために、図2のごとく口径72mm 深さ80mmのコップ2個(③④)、ならびに口径37mm 深さ155mmのボトル6本(⑤～⑩)の計8個の器材を、WDの下段に設置し、図3のようにサーモカップル先端を各器材内の底面中央に直接器材に触れないよう底面から約1cmの位置に固定した。またこのときの庫内温度も同時に測定するために、上段の左右中央2ヵ所(①②)にもサーモカップルを配置した。

WD の運転は、標準コースに消毒工程を加えたスピーディコース(洗浄→すすぎ→80℃10分間の熱水消毒)を選択し、空運転の庫内、ならびに器材を入れた状態の器材内および庫内の各温度について、5秒間隔で測定した。運転は10回行った。また各測定点について、65℃以上を示した範囲を対象にA₀ value(A₀値)も算出した^{1,2,6)}。

1.1.2 結果

WD 空運転時の庫内、ならびに器材を入れた状態の器材内および庫内の各測定点について、80℃以上を維持した時間の平均±標準偏差、80℃以上の温度幅、またA₀値を、それぞれ表1、表2に示した。空運転の測温結果は、庫内10ヵ所の80℃以上維持時間の平均±標準偏差は16分18秒±55秒から17分29秒±38秒であった。庫内下段(中央の2ヵ所③④、及び4角の⑦⑧⑨⑩)は上段(①②⑤⑥)に比べ維持時間は短い傾向にあった。器材を入れた状態では、庫内環境より器材内の維持時間のほうが長く、器材内は17分51秒±36秒から18分12秒±34秒に対し、庫内では最長17分44秒±29秒であった。総じて、空運転、ならびに器材を入れた庫内および器材内のいずれの測定点においても80℃10分間以上が確認された。80℃以上の温度幅は、空運転時は80℃から86.3℃を示し、器材を入れた場合は80.0℃

から 86.1℃を示し、最大温は空運転時の方が高い値を示した。また A_0 値（秒）は、すべての測定点において 2500 以上であることが確認された。 A_0 値の最小値は、空運転時の 2750（⑩下段右奥）であった。一方、器材を入れて運転した時の A_0 値は、最小値 2921（①庫内上段右中央）、最高値 3125（⑦ボトル内下段左前面）であった。

参考として、図 4 に空運転における庫内 10 ヶ所の温度推移の一例を示した。

1.1.3 評価

BI 開発においてその判定結果の評価、検証に先立ち、使用する WD の稼働性能について、庫内および器材内の温度推移、ならびに A_0 値の測定を行い、確認した。熱水消毒に要求される条件としては、各国がそれぞれ温度と時間を設定しており^{1, 2, 7)}、たとえば日本では、器材類の熱水消毒の条件として 80℃10 分間を規定している^{1, 2, 8, 9)}。他方、国際標準化機構における WD に関する国際規格（ISO 15883）において A_0 値の概念が導入された⁶⁾。 A_0 値は、高圧蒸気滅菌法の指標である F 値の概念を熱水消毒に応用したもので、微生物の対数的死滅則を用いて、実際の熱水消毒工程を 80℃の熱水消毒に換算して等価消毒時間（秒）で表し、Z 値を 10℃として計算した値を A_0 値とする。 A_0 値の概念においては、65℃以上の熱水に消毒効果があると考え、65℃以上の実測温度の範囲で計算する。 A_0 値は WD の熱水消毒の評価に用いられ、ISO 15883 では、手術器械に用いる WD の性能に対する要件としては A_0 値 3000 以上、ノンクリティカル医療器具等に用いる WD に対する要件は 600 以上を規定している^{1, 2, 6, 10-12)}。

WD の空運転における庫内温度につき、80℃以上を維持する時間は下段よりも上段の方が長い結果となったが、下段においても 80℃10 分間を維持できていることが確認された。また、器材を入れた場合、器材内と器材外（そのときの庫内）では、器材外の方が維持時間は短い結果となったが、80℃10 分間を維持でき、日本の熱水消毒の基準を満たしていることを確認した。また、今回使用した WD は、その対象器材がノンクリティカル器具のため、 A_0 値 600 以上の基準が要件となる。測温データを元に各測定点の A_0 値を求めたところ、空運転、器材を入れた運転の各 10 ヶ所の A_0 値は、いずれも 2500 以上という結果が得られ、上記 ISO15883 の A_0 値の基準値を満たす値であることが確認できた。

第2章 BI 開発に関する検討

2.1 指標菌 *Enterococcus faecium* JCM 5084 を用いた試作 BI の熱水消毒評価の可能性

2.1.1 試作 BI の作製

キャップ付試験管 (Centrifuge Tube with Triple Seal Cap[®]、IWAKI サイテック社)、径 29×高さ 115mm、容積 50mL のキャップ部を担体とし、その内底に指標菌を滴下乾燥して付着させ BI (以下、試作 BI) とし、処理後、培地を予め分注した試験管本体と接合させる方法を考案した。指標菌には熱抵抗性の高い *E. faecium*¹³⁻¹⁵⁾ を選択した。

E. faecium JCM 5084 をトリプトソイ寒天培地にて 30℃ 一夜 (16~24 時間、以下同様) 培養し、発育コロニーをリン酸緩衝液 (pH=7.0) に懸濁し約 10⁹ colony forming units (CFU) /mL の菌液を調製した。この液の 25μL をキャップ内底面に滴下し、室温下、安全キャビネット内で約 2 時間乾燥させ、試作 BI とした。なお、BI を任意に固定設置するために、キャップの外底のほぼ全面に耐熱性両面接着テープ (VHX-802[®] 住友スリーエム) を貼付した。また、接合する試験管本体には、トリプトソイブイオン培地 20mL を分注した。

2.1.2 試作 BI による小型 WD の熱水消毒評価

試作 BI を両面テープで滅菌シャーレに固定し、それらを図 5 のごとく庫内の噴射水が当たりやすい位置 16 ヶ所に設置した。熱水消毒の効果を評価するため、洗浄工程には洗浄剤を用いず、洗浄・すすぎ・熱水消毒の工程を選択し、運転終了後、図 6 に示すごとく、操作者の手がキャップ内側に触れないよう試験管のねじの部分を使ってキャップ部を回収した。回収したキャップ部はトリプトソイブイオン培地 20mL を入れた試験管に接合し、手動で上下に 10 回攪拌後、30℃ のインキュベータで 6 日間まで培養した後、培地の混濁有無を目視で判定した。試験は 4 回実施した。なお、WD で処理を行わない試作 BI を陽性コントロールとして運転毎に 2 個用意し、トリプトソイブイオン培地 20mL を入れた試験管に接合、以下同様の操作を行った。また菌量測定用として運転毎に 2 個用意し、リン酸緩衝液 10mL を入れた試験管に試作 BI を接合し、手動で上下に 10 回攪拌し菌を回収した。その液をリン酸緩衝液で 10 倍段階希釈し、トリプトソイ寒天培地にそれぞれ 100μL 塗抹した。30℃ 2 日間培養後コロニーカウントし、試作 BI 1 個当たりの菌量を算出した。

2.1.3 結果

各試験における試作 BI の培養後判定結果を表 3 に示した。WD で処理された計 64 個の試作 BI は培地の混濁は認められず、すべて陰性と判定された。他方、コントロールの試作 BI 計 8 個はすべて培地の混濁が見られ陽性と判定された。試作 BI 1 個当たりの菌量の平均±標準偏差は、7.3±0.2Log₁₀CFU であった。

両面テープで固定された試作 BI は、熱処理試験後も全て元の状態を維持し、またその回収においてはキャップ内側に手指が触れることなく操作可能であった。

2.2 指標菌に混合する有機物の種類と時間経過の影響

2.2.1 方法

BI の有機物混合指標菌を検討するために、牛血清アルブミン (Bovine serum albumin : BSA)、乾燥酵母、Artificial Test Soil (ATS、healthmark 社、蛋白 (23mg/mL)、ヘモグロビン (8mg/mL) および炭水化物 (6mg/mL) 含入) を有機物として選択した。トリプトソイブイオン培地で 30℃ 一夜培養した *E. faecium* JCM 5084 を遠心分離し、滅菌精製水で 2 回洗浄した後、滅菌精製水に懸濁させ約 10⁹CFU/mL の菌液を調製した。各有機物溶液と菌液を混合し、それぞれ 0.3%BSA 混合菌液、2%乾燥酵母混合菌液、ATS 混合菌液とし、さらに対照としてリン酸緩衝液混合菌液の各指標菌液を作成した。キャップ付試験管は、Conical Centrifuge Tubes[®] (Thermo Scientific Nunc 社) を用い、これらの菌液をキャップ内底に 25μL を滴下し、2.1.1 で示したごとく、安全キャビネット内、室温で約 2 時間乾燥させ BI を作製した。乾燥直後、および滅菌シャーレ中蓋をして室温 5 時間後および 24 時間後の各 BI 菌量につき、リン酸緩衝液 10mL を入れた試験管を BI に接合させた後、有機物混合指標菌液の固着を考慮し上下に 30 回攪拌して、目視で残留の無いことを確認しながら菌の回収をした。その液をリン酸緩衝液で 10 倍段階希釈した各液 100μL をトリプトソイ寒天培地に塗抹して 30℃ 48 時間まで培養、発育コロニーをカウントし各 BI の 1 個当たりの菌量を算出した。

各 BI 計 6 個の菌量につき、その平均と標準偏差を算出した。また、混合する有機物と菌量の関係につき時間毎に一元配置分散分析をおこない、有機物ごとの時間経過と菌量の関係について対応のある t 検定による分析をおこなった。

2.2.2 結果

BI 乾燥後の時間経過と菌量の変化について図 7 に示した。有機物混合 BI の菌量は平均 7.19Log₁₀CFU から 7.34 Log₁₀CFU を推移し、リン酸緩衝液混合の BI は 6.53 Log₁₀CFU から 6.92 Log₁₀CFU であった。乾燥直後、5 時間後、24 時間後いずれもリン酸緩衝液混合の BI より有機物混合の BI の菌量が多い結果となった。

各有機物混合 BI の乾燥直後から経過時間と菌量平均±標準偏差を表 4 に示した。それぞれの経過時間の菌量を比較すると、乾燥直後の最小値を示したものは 0.3%BSA 混合の BI 7.29 Log₁₀CFU、0.2%乾燥酵母混合の BI と ATS 混合の BI は 7.32 Log₁₀CFU であった。5 時間後の最小値を示したものは 0.2%乾燥酵母混合の BI 7.19 Log₁₀CFU、最大値は 0.3%BSA 混合の BI 7.30 Log₁₀CFU であった。24 時間後の最小値は 0.2%乾燥酵母混合の BI 7.22 Log₁₀CFU、最大値は ATS 混合の BI 7.34 Log₁₀CFU であった。経過時間毎の各種 BI の菌量につき、混合有機物と菌量の一元配置分散分析でみたところ、*P* 値>0.05 となり有意差は認められなかった。

また、有機物ごとに①乾燥直後と 5 時間後、②乾燥直後と 24 時間後の菌量について対応のある t 検定をおこなった。0.3%BSA 混合の BI の *P* 値①0.77、②0.75、0.2%乾燥酵母混合の BI は①0.14、②0.29、ATS 混合の BI は①0.41、②0.20 といずれも *P* 値>0.05 となり有

意差は認められなかった。

2.3 指標菌の熱抵抗性 (D 値) に関する検討

2.3.1 方法

事前におこなった 65℃、70℃の加温実験において、70℃加温では 10 秒後には菌は検出限界以下となったため、指標菌の熱抵抗性 (D 値: decimal reduction value) 検討に関する加温実験は 65℃に設定した。

卓上恒温水槽 (THERMO F-0015[®] Fine 社) をホットプレート (CORNING PC-420D[®] TAITEC 社) の上に設置し、恒温槽中に滅菌精製水 5mL を入れたガラス試験管を 2 本設置し、1 本は菌加温用、他方は精製水の測温用とした。恒温槽内の温度測定と試験管内の精製水中の温度を測定するためにサーモカップルをそれぞれ設置し、データロガーで測温しながら調整して、試験管内の精製水温度が 65℃を維持した状態で、2.2.1 に示した方法で調製した約 10⁹CFU/mL の指標菌精製水懸濁液 25μL を添加し、あらかじめ同温度に加温しておいたピペットで攪拌しながら、菌添加 10 秒後から 90 秒後まで 10 秒毎に試験管内からその 150μL を採取し、室温下のリン酸緩衝液 150μL に添加して加温を停止した。コントロールは、室温下の滅菌精製水 5mL に菌液 25μL を添加後、加温処理することなく以下同様に行った。各加温処理後の検体、およびコントロールの検体は同リン酸緩衝液にて 10 倍段階希釈し、その各 100μL をトリプトソイ寒天培地に塗抹し、30℃で 48 時間および 7 日後の発育コロニーをそれぞれカウントした。

有機物共存下の指標菌の熱抵抗性検討においては乾燥酵母を用い、WD 運転中に噴射水で希釈されることを想定し、1%乾燥酵母液としてその液 5mL を用いて、以下、上述と同様の方法で処理し、コントロールも同様に実施した。

指標菌の精製水中と乾燥酵母中の熱抵抗性につき、それぞれ 6 回の試験を実施し、培養 7 日後の発育コロニー数から各処理後の菌量を算出し、処理時間と菌量の関係から 65℃加温処理における、指標菌の D 値を求めた。精製水中と乾燥酵母共存下の D 値について、Student の t 検定をおこない、有機物共存下の D 値への影響を検討した。

2.3.2 結果

E. faecium JCM 5084 の精製水中ならびに 1%乾燥酵母液中の各培養 7 日後の菌量の対数 (Log₁₀CFU/mL) を Y 軸に、X 軸に加温時間 (秒) をとりプロットしたグラフを元に最少二乗法による近似直線を求めた (図 8)。精製水中の供試菌 *E. faecium* JCM 5084 の生菌数と、加温時間の関係について、以下の一次式が得られ、D₆₅ 値は 25.51 秒と算出された。

$$Y (\text{生菌数の対数}) = -0.0392x (\text{熱処理時間: 秒}) + 6.9475$$

各実験にて得られた D 値とその平均±標準偏差を表 5 に示した。精製水中の D 値の平均±標準偏差は 24.21±1.79 秒、乾燥酵母共存下では 27.39±2.74 秒であった。精製水中と乾燥酵母共存下で求めた D 値について Student の t 検定により P 値 0.03844 が得られ、5%

水準で有意差があった。

加温処理検体の 30℃培養において 7 日まで培養する経過を追ってコロニーカウントする中で、加温処理の程度（処理時間）により供試菌のコロニー数は異なった。表 6 に示したとおり、48 時間後、7 日後ともに、加温処理 10 秒より 20 秒の方がコロニー数は少なく、20 秒より 30 秒の方が少ない、同様に 90 秒にかけてコロニー数は低下し、加温時間に伴いコロニー数が低下した。また、48 時間後のコロニー数は、加温 50 秒以降は検出限界以下であったが、7 日後ではコロニーが検出され、加温 50 秒以降のコロニー発現には遅延が見られ、90 秒のコロニーは 5 回が検出限界以下であった。一方、加熱しないコントロールは、48 時間後にかけて発育し、その後コロニー数の増加はなかった。

2.4 BI 判定の影響因子 1：噴射水の直接接触を考慮した BI の設置位置

使用する WD の噴射ノズルの向きが BI 判定に及ぼす影響を検討するため、BI の設置位置につき図 9 のごとく A) 洗浄・すすぎの噴射水が直接当たる位置 (①③⑦⑧)、B) 噴射ノズルにボトル口を向けて設置したボトル内底 (⑭⑮)、C) 噴射ノズルと反対向きの壁面にむけた位置 (②④⑤⑥⑨⑪⑬⑯)、D) 洗浄機の噴射水が入りにくいように横に向けたボトル内底 (⑩⑫) の 4 条件、計 16 ヲ所を設定し、2%乾燥酵母混合菌液にて作製した BI を用いて 2.5 および 2.6 の検討を行った。

2.5 BI 判定の影響因子 2：熱水消毒工程の有無

2.5.1 方法

2.4 で設定した各位置に BI を設置し、WD の運転工程を 1.1.1 で示したスピーディコースで洗浄・すすぎ工程までの運転、およびそれに 80℃10 分間の熱水消毒工程を追加した洗浄・すすぎ・消毒の工程までの運転について、運転後回収した BI およびコントロール BI の培養、ならびに BI の菌数測定を、2.2.1 に準じて実施した。コントロールおよび菌数測定用 BI は運転毎に 2 個準備し、試験は各 2 回実施し、同時にボトル内 BI 設置付近の温度と庫内空間温度をデータロガーで測定した。ボトル内 BI 設置付近の温度は、図 3 同様にサーモカップルを設置し測定した（以下同様）。

2.5.2 結果

熱水消毒工程有無の BI 培養結果を表 7 に示した。洗浄、すすぎ工程までの運転にて回収した BI 計 32 個のうち、No. ⑧ (A 区分) の 1 個は陰性と判定されたが、残りの 31 個はすべて陽性と判定された。これに対し、洗浄・すすぎに加え熱水消毒工程まで運転して回収した BI は、32 個すべて陰性であった。それぞれの運転時の BI 1 個当たりの菌数は、平均 $7.4 \pm 0.1 \text{Log}_{10}\text{CFU}$ であった。WD の運転中庫内温度は、消毒工程までの運転時は、80℃10 分間を維持しており、その維持時間の平均±標準偏差は 17.4 ± 0.5 分間と 17.2 ± 0.6 分間であった。熱水消毒工程まで運転した後回収した BI 32 個の培養結果はいずれも陰性と判定され、BI の設置条件、すなわち噴射水の当たり方の違いによる判定の相違は認められなかった。

BI 操作中のコンタミネーションについては、回収、培養等一連の操作をキャップ内側に手指が触れることなく実施できた。

2.6 BI 判定の影響因子 3：洗浄剤の影響

2.6.1 方法

2.4 で設定した各位置に BI を設置し、3 種類の洗浄剤、すなわち、低発泡性の酵素洗剤 (deconex[®] POWER ZYME)、WD 向けの強アルカリ洗剤 A (neodisher[®]DuoClean、pH>11) ならびに B (deconex[®]28ALKA ONE-x、pH>10) を用い、それぞれスピーディコースで洗浄・すすぎ工程までの運転を行った。2.5.1 同様、ボトル内 BI 設置付近の温度と庫内空間温度を同時測定し、運転終了後に同様の手技にて培養及び菌数測定を行った。低発泡性の酵素洗剤は 2 回 (BI 計 32 個)、WD 向けの強アルカリ洗剤 A および B は各 1 回 (16 個) の試験を実施し評価した。

2.6.2 結果

3 種類の洗浄剤を用いて、洗浄・すすぎ工程まで運転後の BI 培養結果を表 8 に示した。酵素洗剤を使用した BI 32 個のうち、No. ⑧ (A 区分) の 1 個は陰性判定となったが、残り 31 個は陽性と判定された。強アルカリ洗剤 A と B では、それぞれ 16 個の培養結果はともにすべて陽性と判定された。それぞれの運転時の BI 1 個当たりの菌数は、平均 $7.5 \pm 0.1 \log_{10} \text{CFU}$ であった。庫内の最高温度は $51.3 \sim 55.9^\circ\text{C}$ であった。

BI 操作中のコンタミネーションについては、回収、培養等一連の操作をキャップ内側に手指が触れることなく実施できた。

2.7 選択培地の検討

2.7.1 方法

WD の熱水消毒で殺滅できない芽胞形成菌が混入した場合の偽陽性判定を避けるために、培養において BI 指標菌は発育させるが、芽胞形成菌の発育は抑制する選択培地の検討を行った。従来のトリプトソイブイヨン (TSB) 培地を対照とし、TSB 培地にアジ化ナトリウムを添加した 0.05%アジ化ナトリウム加 TSB 培地、腸球菌の選択培地であるアザイドブドウ糖ブイヨン (AZB) 培地 (培地組成 1L あたりペプトン 20.0g、ブドウ糖 5.0g、塩化ナトリウム 5.0g、リン酸水素二カリウム 2.7g、リン酸二水素カリウム 2.7g、アジ化ナトリウム 0.2g) を準備した。BI 作製時と同様に *E. faecium* JCM 5084 の約 10^9CFU/mL 菌液を調製後、リン酸緩衝液で 1000 倍に希釈した。芽胞形成菌には市販の *Bacillus atrophaeus* 芽胞液 (枯草菌 ATCC6633 栄研化学、約 10^9CFU/mL) を用い、それぞれの菌液 10 μL を各培地 10mL に添加、攪拌し、 30°C で培養し 24、48 および 72 時間後の培地の混濁有無を目視で観察した。試験は 3 回実施した。

次に、加温処理した指標菌の選択培地における発育について検討した。2.3.1 に示した方法に準じ指標菌 *E. faecium* JCM5804 を精製水中 65°C で 30 秒、60 秒、90 秒、120 秒間加温

処理をおこなった。各時間加温した菌液 100 μ L を TSB 培地、0.05%アジ化ナトリウム加 TSB 培地および AZB 培地各 10mL にそれぞれ添加した。各加温処理時間につきそれぞれの培地本数は 2 本とし 30 $^{\circ}$ C で 7 日間まで培養して培地の混濁有無を観察した。試験は 2 回実施した。同時に、未加温ならびに各時間加温した菌液の菌数を前述の方法に従い測定した。

2.7.2 結果

BI の培養に供した 3 種の培地、指標菌 *E. faecium* JCM 5084 と枯草菌芽胞の培養結果を表 9 に示した。指標菌は、用いた 3 種の培地すべてにおいて発育を認めたが、その混濁の目視認知は対照の TSB 培地では 24 時間後、0.05%アジ化ナトリウム加 TSB 培地と AZB 培地ではともに 48 時間後であった。他方、芽胞形成菌は対照の TSB 培地では培養 24 時間で発育を認めたものの、0.05%アジ化ナトリウム加 TSB ならびに AZB 培地では 72 時間培養後も培地の混濁は認められず、発育は確認できなかった。

各時間加温処理した *E. faecium* JCM 5084 の各培地における培養結果を表 10 に示した。すべての培地において、加温時間に伴い、発育の遅延、あるいは陰性判定の傾向がみられ、30 秒加温では TSB は培養 1 日後にすべて (4/4) 陽性と判定されたものの、アジ化ナトリウム加 TSB 培地ならびに AZB 培地では全てが陽性判定されるまでに培養 3 日間を要した。同様に 60 秒加温では TSB 培地でも全陽性判定には培養 5 日、アジ化ナトリウム加 TSB 培地では培養 5 日でも陽性判定 50% (2/4) にとどまり、AZB 培地に至っては培養 7 日後でも 25% (1/4) の陽性判定であった。

7 日後の菌数が 4.56 Log₁₀CFU 以上では、3 種の培地すべてにおいて陽性判定した。菌数 4.48 Log₁₀CFU では AZB 培地の陽性判定は 50% (1/2) に対し、TSB 培地とアジ化ナトリウム加 TSB 培地はすべて (2/2) 陽性判定された。菌数 4.48 Log₁₀CFU 未満では TSB 培地、アジ化ナトリウム加 TSB 培地がそれぞれ 20% (2/10) 陽性判定され、AZB 培地では陽性判定はなかった。

2.8 考察

BI は、菌の死滅効果を直接的に検証できる唯一のインジケータである^{1,2,16)}。WD に対し微生物を用いて消毒評価をしている報告^{17,18)}はあるが、現在、熱水消毒評価に用いる BI の国際的な標準規格は存在しない。消毒は、微生物の数を減らす処置¹⁹⁾であり、米国の Food & Drug Administration (FDA) は、Washer 及び Washer-Disinfector に関するガイダンスの中で、消毒のレベルを高水準消毒、中水準消毒、低水準消毒の 3 段階に分類し、細菌の対数減少率により定義している。それぞれ抗酸菌や栄養型細菌の混合液に有機物等の負荷をかけて用い、低水準消毒には、栄養型細菌の 6Log の減少を基準としている²⁰⁾。

使用した WD の対象器材であるノンクリティカル器具の処理は、低水準消毒がその適応となる。今回、熱水消毒効果の評価基準について指標菌 6Log の減少を条件とし、自施設で作製する熱水消毒評価用の BI を検討し、キャップ付試験管を利用した、キャップ部の内底に指標菌 *E. faecium* JCM 5084 を付着させ、処理後、培地を分注した試験管と接合させるべく、

BI を試作した。試作 BI の適応可能性について、WD の消毒効果にかかる負荷が最小限となるよう噴射水の当りやすい場所に BI を設置し、また洗浄剤の影響を受けない熱水消毒の評価をみるために、洗浄剤は使用せず検証した。BI 64 個はすべて、熱抵抗性の高い腸球菌 *E. faecium* の $6\text{Log}_{10}\text{CFU}$ の死滅が確認でき、試作 BI の熱水消毒評価の適応可能性が示唆された。

洗浄や消毒評価試験においては実使用を想定した負荷物としてさまざまな有機物が用いられる^{1-3, 21)}。今回は、洗浄評価で疑似汚染物に用いられる BSA^{1, 21)}、消毒薬の効力評価法として用いられる乾燥酵母²²⁾、内視鏡洗浄評価で用いられるヘモグロビンとプロテイン、炭水化物を混合した ATS²³⁻²⁶⁾を使用した。各施設で BI を作製後は 24 時間以内に使用することを想定し、3 種の有機物を負荷し調製後から 24 時間後までの各菌数を比較したところ、BI 調製後の菌数に有意な差はなく、また 3 種とも乾燥直後から 24 時間まで安定していたことが確認された。当該 BI の指標菌に混合する有機物として、3 種のうち扱いやすく、安価な乾燥酵母を選択した。

栄養型細菌の熱抵抗性について D 値による比較がなされ、Pisot ら⁷⁾は、*E. faecium* と *Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*などを、Sorqvist²⁷⁾は、*Enterococcus* spp.、*Listeria* spp.、*Escherichia coli*、*Yersinia enterocolitica*を、Ahmad ら^{9, 28)}は *E. faecium* と *E. faecalis*を検討しており、*E. faecium*の熱抵抗性が高いことが報告されている。そこで、BI に使用する指標菌 *E. faecium* JCM 5084 の熱抵抗性について、加温した滅菌水に菌を添加し加温時間毎の生菌数測定し、微生物の熱抵抗を示す指標となる D 値を求めた。BI の負荷有機物である乾燥酵母は、WD の特に洗浄工程により剥離、除去されることを想定し 1% 乾燥酵母液として実施した。滅菌水での 65℃の D 値の平均±標準偏差が 24.21 ± 1.79 秒に対し、1%乾燥酵母共存下では D_{65} 値 27.39 ± 2.74 秒であった。精製水による加温処理した場合の D 値と、乾燥酵母共存下の D 値を Student の t 検定でみたところ有意差を認めた。これら有機物共存下の菌量、時間経過と菌量変化、D 値を検討し、乾燥酵母を混合した指標菌の安定性が確認できた。

また、65℃にて各時間加温した指標菌の培養観察において、菌に対する熱損傷がその後の菌の発育速度に影響することがわかり、*E. faecium* を使用した BI の培養日数は少なくとも 7 日間とすることが望ましいと考えられた。

BI 開発にあたり、WD の運転条件等のうち温度、洗浄剤、噴射水の当り方が BI の判定にどのように影響を及ぼすのか BI 合計 128 個を用いて検証した。洗浄・すすぎまでの工程と洗浄・すすぎ・熱水消毒までの工程による運転後の BI 培養結果の比較により、洗浄・すすぎ工程では当該 BI は陽性と判定され、80℃10 分間の消毒工程を経た場合に陰性と判定されることを確認した。また洗浄剤を用いた場合と用いない場合のすすぎ工程までの培養結果の比較では、同じ位置の BI 1 個に陰性判定を示し、他はすべて陽性と判定されたことから、当該 BI は洗浄剤には影響されず、熱水消毒による菌の死滅を確認することが可能な BI と考えられた。なお、すすぎまでの工程で陰性判定された 2 個は、いずれも最も噴射水の当

りやすい位置であったこと、消毒工程までの BI の培養結果には関係しなかったが、噴射水の当たりにくい位置に設置した BI は、運転後に添加有機物の残渣が観察された例があったことから、BI 設置には噴射水の当たりにくい位置を含めることが望ましいと考える。本研究の課題として、熱による判定の結果への影響は、すすぎまでの工程と熱水消毒工程までを比較し、熱水消毒工程つまり 80℃10 分間の熱水処理有、無しの条件で検証している。熱抵抗性実験は、65℃加温処理をおこない、70℃加温処理による測定が困難で実験の限界があったことを記しておく。

熱水消毒は、芽胞形成菌を除く微生物に対して殺菌効果が期待できるもので、Alfa ら²⁹⁾は、WD による処理後も芽胞が残存したことを報告していることから、WD に芽胞が混入した場合は熱水消毒後も残存することが予想される。そこで、指標菌は発育させるが芽胞形成菌の発育は抑制する培地、ならびにそれら培地における培養日数を検討した。防腐剤などに使用されるアジ化ナトリウムは、極東 SF 培地[®]（極東製薬、培地組成 1L あたりペプトン 20.0g、ブドウ糖 5.0g、リン酸二水素カリウム 1.5g、リン酸水素二カリウム 4.0g、塩化ナトリウム 5.0g、アジ化ナトリウム 0.5g、ブロムクレゾールパープル 0.032g）や AZB 培地の組成として含まれ、その効果はグラム陰性菌の発育を抑制する。事前におこなった極東 SF 培地と TSB 培地の比較から、極東 SF 培地が芽胞形成菌の発育を抑制することが確認できたため、その組成を参考に TSB 培地に 0.05%アジ化ナトリウムを付加した。その結果、グラム陰性菌の発育を抑制する作用のある 0.05%アジ化ナトリウムを付加した TSB 培地、また腸球菌の選択培地である AZB 培地では、芽胞の発育を認めなかった。しかし、これらの培地では指標菌 *E. faecium* JCM 5084 の発育は TSB 培地に比べ遅延することが確認され、また熱損傷を受けた *E. faecium* JCM 5084 の発育は TSB 培地に比べ 0.05%アジ化ナトリウム加 TSB 培地では陽性判定の割合が低下した。以上のことから、指標菌 *E. faecium* JCM 5084 の発育には TSB 培地が望ましいが、芽胞形成菌混入の対策としては 0.05%アジ化ナトリウム加 TSB 培地を選択し、少なくとも 7 日間の培養が推奨される。

第3章 結語

キャップ付試験管のキャップ部の内底に指標菌を滴下乾燥して付着させ、処理後、試験管本体のねじ部分を使って回収する BI を考案した。指標菌の安定性を確認した上で、2%乾燥酵母を混合した *E. faecium* を用いた BI を推奨する。

本 BI の開発により、WD の管理において温度や洗浄評価など物理的モニタリングではできない熱水消毒の評価を可能にした。下記作製方法と使用手順に沿って各施設が熱水消毒評価を行い、適切な WD 管理をしていくことが望まれる。

<*E. faecium* を使用した推奨 BI の作製方法>

①トリプトソイブイオン培地で 30℃一夜培養した *E. faecium* JCM 5084 を遠心分離し、滅菌精製水で 2 回洗浄した後、滅菌精製水に懸濁させ約 10⁹CFU/mL の菌液を調整する。②滅菌精製水で希釈した乾燥酵母液と菌液を混合し、2%乾燥酵母混合菌液を作成する。③②の菌液をキャップ付試験管のキャップ内底に 25μL を滴下し、安全キャビネット内、室温で約 2 時間乾燥させ BI のキャップ部を作製する。④判定時、試験管部にトリプトソイブイオン培地 10mL を分注し接合させる。

<BI の使用手順>

①BI を任意に設置固定するために、耐熱性両面接着テープをキャップ部外底に貼付する。②①の両面テープで器材に BI を固定し、噴射水の当りにくいところを含め複数個設置する。③WD 運転終了後、試験管本体のねじの部分を使ってキャップ部を回収する。④③の試験管にトリプトソイブイオン培地 10mL を入れ、手動で上下に 30 回攪拌する。⑤30℃のインキュベータで培養し、7 日後まで観察し培地の混濁有無を目視で判定する。⑥BI の使用期間は、BI 作製後室温保管で 24 時間後まで保証できる。

謝辞

本研究は、研究科長 小林寛伊教授の御指導のもとに東京医療保健大学大学院医療保健学研究科において行われたものであります。研究の遂行にあたり、御指導、御助言賜りました小林寛伊先生に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。実験、論文作成にあたり丁寧な御指導、御教示賜りました医療保健学研究科 梶浦工教授、ご協力いただきました関係者の方々にここに厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 日本医療機器学会, 医療現場における滅菌保証のガイドライン 2010
- 2) 日本規格協会, *ISO/JIS 規格準拠ヘルスケア製品の滅菌及び滅菌保証*, 2011
- 3) 日本医療機器学会 滅菌技士認定委員会 洗浄評価判定の指針を調査・作成するための検討WG, 洗浄評価判定ガイドライン 2012
- 4) Alfa M, FCCM, Olson N. Comparison of washer-disinfector cleaning indicators: Impact of temperature and cleaning cycle parameters. *American Journal of Infection Control* 2014;42:23-26
- 5) Hesp J, Poolman T, Budge C, et al. Thermostable adenylate kinase technology: a new process indicator and its use as a validation tool for the reprocessing of surgical instruments. *J Hosp Infect* 2010;174: 137-143
- 6) ISO 15883-1:2006, Washer-disinfectors—Part 1:General requirements, terms and definitions and tests
- 7) Ayliffe G, Minimal Access Therapy Decontamination Working Group: Decontamination of minimally invasive surgical endoscopes and accessories. *J Hosp Infect* 2000;45:263-277.
- 8) 厚生省健康政策局指導課医療関連サービス室、医療関連サービス研究会：医療機関業務委託関係法令解説集. 行政，東京，2000;139-176
- 9) 小林寛伊，大久保憲，尾家重治：消毒・滅菌の基本. 小林寛伊編集、*消毒と滅菌のガイドライン*. へるす出版，東京，2011;8-43.
- 10) ISO 15883-2:2006, Washer-disinfectors — Part 2:Requirements and tests for washer-disinfectors employing thermal disinfection for surgical instruments, anaesthetic equipment, bowls, dishes, receivers, utensils, glassware, etc.
- 11) ISO 15883-3:2006, Washer-disinfectors — Part 3: Requirements and tests for washer-disinfectors employing thermal disinfection for human waste container
- 12) ISO 15883-6:2011, Washer-disinfectors — Part 6:Requirements and tests for washer-disinfectors employing thermal disinfection for non-invasive, non-critical medical devices and healthcare equipment
- 13) Pisot S, Thumm G, Roth K, et al. Investigations into the role of the Ao value in the inactivation kinetics of bacteria in thermal disinfection. *Zentralsterilisations* 2011;19(1):37-41
- 14) Spinks A, Dunstan R, Harrison T, et al. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Res* 2006;40(6):1, 326-1, 332
- 15) Ahmad M, Smith DG, Mahboob S. Determination of the Heat Shock Response in *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* .*INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE &*

BIOLOGY 2002;4(2):231-233

- 16) CDC. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities 2008
- 17) Ransjo U, Engstrom L, Hakansson P, et al. A test for cleaning and disinfection processes in a washer-disinfector. APMIS 2001;109(4):299-304
- 18) Elizabeth B, Allison L, Leslie F, et al. Bedpan washer disinfectors: An in-use evaluation of cleaning and disinfection. American Journal of Infection Control 2011;39:566-570
- 19) 日本薬局方第十六改正 <http://jpdb.nihs.go.jp/jp16/YAKKYOKUHOU16.pdf> (2014 年 5 月 8 日閲覧)
- 20) Class II Special Controls Guidance Documents Medical Washers and Medical Washer-Disinfectors; Final Guidance for the Medical Device Industry and FDA Review Staff.
<http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm073357.htm> (2014 年 9 月 21 日閲覧)
- 21) ISO/TS 15883-5:2005, Washer-disinfectors—Part 5: Test soils and methods for demonstrating cleaning efficacy
- 22) Kelsey, J. C. et al. An improved(1974)Kelsey-Sykes test for disinfectants. Pharm. Journal 1974;213:528-530
- 23) Alfa MJ, DeGagne P, Olson N. Worst-case soiling levels for patient-used flexible endoscopes before and after cleaning. American Journal of Infection Control 1999;27:392-401
- 24) Alfa MJ, Olson N, DeGagne P. Automated washing with the Reliance Endoscope Processing System and its equivalence to optimal manual cleaning. American Journal of Infection Control 2006;34:561-570
- 25) Alfa MJ, Jackson M. A new hydrogen peroxide-based medical-device detergent with germicidal properties: Comparison with enzymatic cleaners. American Journal of Infection Control 2001;29:168-177
- 26) Draft Guidance for Industry and FDA Staff Processing/Reprocessing Medical Devices in Health Care Settings: Validation Methods and Labeling
<http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm252999.htm> (2014年9月21日閲覧)
- 27) Sorqvist S. Heat Resistance in Liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. And *Campylobacter* spp. Acta Vet Scand. 2003;44(1):1-19
- 28) Ahmad M, Smith DG, Mahboob S. Effect of Heat Treatment on Stationary Phase Cells of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE

& BIOLOGY 2002;4(2):234-236

- 29) Alfa M, Olson N, Buelow-Smith L. Simulated-use testing of bedpan and urinal washer disinfectors: Evaluation of *Clostridium difficile* spore survival and cleaning efficacy. American Journal of Infection Control 2008;36(1):5-11

表1 洗浄消毒装置空運転時の庫内10ヵ所の80℃以上の維持時間とA₀値の平均±標準偏差及び80℃以上の温度

設置場所	n	80℃以上の維持時間 mean±SD	80℃以上の温度 (℃)	A ₀ 値 mean±SD
①	10	17'29"±38"	80.0～86.1	2951±150
②	10	17'25"±45"	80.0～86.1	2991±144
③	10	16'37"±48"	80.0～86.1	2851±127
④	10	16'45"±48"	80.0～86.3	2955±136
⑤	10	17'24"±46"	80.0～86.2	3022±140
⑥	10	17'20"±51"	80.0～86.2	3048±142
⑦	10	16'44"±54"	80.0～86.2	2905±127
⑧	10	16'42"±50"	80.0～86.1	2875±142
⑨	10	16'18"±55"	80.0～86.1	2761±116
⑩	10	16'27"±45"	80.0～86.0	2750±130

設置場所①～⑩は、図1に示したセンサーの位置

表 2 洗浄消毒装置内に器材を設置した場合の 10 ヶ所の 80℃以上の維持時間・A₀ 値の平均
±標準偏差及び 80℃以上の温度

設置場所	n	80℃以上の維持時間 mean±SD	80℃以上の温度 (℃)	A ₀ 値 mean±SD
①	10	17'44"±29"	80.0～86.0	2921±277
②	10	17'37"±27"	80.0～86.1	2960±280
③ *1	10	18'00"±27"	80.0～85.9	3030±284
④ *1	10	18'12"±34"	80.0～86.1	3106±282
⑤ *2	10	18'05"±20"	80.0～86.1	3091±276
⑥ *2	10	18'01"±22"	80.0～86.1	3090±276
⑦ *2	10	18'07"±26"	80.0～86.1	3125±286
⑧ *2	10	18'04"±37"	80.0～85.9	3099±295
⑨ *2	10	18'02"±43"	80.0～86.0	2992±293
⑩ *2	10	17'51"±36"	80.0～86.0	2926±282

設置場所①～⑩は、図 2 に示したセンサーの位置

*1 は図 3 に示したコップ内、*2 は図 3 に示したボトル内

表 3 洗浄剤なしで洗浄・すすぎ・80℃10 分間の熱水消毒工程を運転後、回収した試作生物学的インジケータ（BI）の判定結果

BI No 運転 回数	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	c 1	c 2
1回目	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋
2回目	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋
3回目	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋
4回目	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋

BI No ①～⑯は、図 5 に示した設置位置

BI No c : コントロール

－ : 菌の発育を認めない ＋ : 菌の発育を認める

表 4 生物学的インジケーター乾燥直後から経過時間と各有機物共存下の菌量平均±標準偏差 (Log₁₀CFU/個)

混合有機物	n	乾燥直後 mean±SD	5時間後 mean±SD	24時間後 mean±SD	乾燥直後～24時間後 mean±SD
0.3%BSA	6	7.29±0.08	7.30±0.09	7.31±0.13	7.30±0.10
0.2%乾燥酵母	6	7.32±0.14	7.19±0.12	7.22±0.12	7.24±0.13
ATS	6	7.32±0.12	7.29±0.13	7.34±0.09	7.31±0.11
<i>P</i> 値		0.90	0.20	0.21	

BSA：牛血清アルブミン (Bovine serum albumin)液

ATS：Artificial Test Soil 液

*P*値：各経過時間において一元配置分散分析で求めた値

表 5 精製水による 65℃加温処理と 1%乾燥酵母液による 65℃加温処理した場合の D 値と測定した 6 回の平均±標準偏差（秒）

	精製水	乾燥酵母共存下
1	26.81	25.25
2	24.15	25.32
3	23.53	29.41
4	21.60	25.25
5	23.64	27.25
6	25.51	31.85
mean±SD	24.21±1.79	27.39±2.74

表 6 65℃精製水により各時間加温処理した *E. faecium* JCM5084 の 30℃培養における発育コロニー数の時間的变化 (Log₁₀CFU/sample)

熱処理時間	n	48時間後 mean±SD	7日後 mean±SD
0秒	6	6.48±0.17	6.48±0.17
10秒	6	6.58±0.24 ^{*1}	6.56±0.26
20秒	6	5.95±0.28	6.28±0.25
30秒	6	5.42±0.16	5.97±0.10
40秒	6	4.55±0.19	5.44±0.25
50秒	6	<1.48	4.91±0.16
60秒	6	<1.48	4.42±0.18
70秒	6	<1.48	3.85±0.19
80秒	6	<1.48	3.52±0.18
90秒	6	<1.48	3.23 ^{*2}

*1 コロニーカウント 300 以上により 1 回分を除外して算出した

*2 5 回は検出限界以下であった

表 7 洗浄剤なしで洗浄・すすぎ工程を運転及び洗浄・すすぎ・80℃10 分間の熱水消毒工程を運転後、回収した生物学的インジケーター（BI）の判定結果

BI No	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	c 1	c 2
設置区分	A	C	A	C	C	C	A	A	C	D	C	D	C	B	B	C		
すすぎまで運転	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
消毒まで運転	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

BI No ①～⑯は、図 9 に示した設置位置

BI No c : コントロール

設置区分 : A) 洗浄・すすぎの噴射水が当たりやすい噴射側に向けて設置

B) 噴射側にボトル口を向けて設置したボトル内底

C) 噴射側と反対向きの壁面に向けて設置

D) 洗浄機の噴射水が入りにくいように横に向けたボトル内底

- : 菌の発育を認めない + : 菌の発育を認める

表 8 各種洗浄剤を使用して洗浄・すすぎ工程（熱水消毒工程なし）を運転後、回収した生物学的インジケーター（BI）の判定結果

BI No	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫	⑬	⑭	⑮	⑯	c 1	c 2
設置区分	A	C	A	C	C	C	A	A	C	D	C	D	C	B	B	C		
酵素洗剤	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
強アルカリ洗剤	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

BI No ①～⑯は、図 9 に示した設置位置

BI No c : コントロール

設置区分：A) 洗浄・すすぎの噴射水が当たりやすい噴射側に向けて設置

B) 噴射側にボトル口を向けて設置したボトル内底

C) 噴射側と反対向きの壁面に向けて設置

D) 洗浄機の噴射水が入りにくいように横に向けたボトル内底

—：菌の発育を認めない +：菌の発育を認める

表 9 指標菌と芽胞形成菌の各種培地における発育と発育抑制の判定結果

培地の種類		<i>E. faecium</i>			<i>Bacillus atrophaeus</i>		
		24時間後	48時間後	72時間後	24時間後	48時間後	72時間後
TSB培地	1回目	+	+	+	+	+	+
	2回目	+	+	+	+	+	+
	3回目	+	+	+	+	+	+
TSB+0.05%NaN ₃ 培地	1回目	-	+	+	-	-	-
	2回目	+	+	+	-	-	-
	3回目	+	+	+	-	-	-
AZB培地	1回目	-	+	+	-	-	-
	2回目	+	+	+	-	-	-
	3回目	+	+	+	-	-	-

TSB 培地：トリプトソイブイオン培地

TSB+0.05%NaN₃ 培地：0.05%アジ化ナトリウム加トリプトソイブイオン培地

AZB 培地：アザイドブドウ糖ブイオン培地

－：菌の発育を認めない +：菌の発育を認める

表 10 65℃精製水により各時間加温処理した指標菌 *E. faecium* JCM 5084 の各種培地における発育と 30℃7 日培養後の菌数 (Log₁₀CFU/sample)

	1回目								2回目							
30秒加温	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数
TSB	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
TSB +0.05%NaN ₃	-	-	+	+	+	+	+	4.56	-	-	+	+	+	+	+	5.04
	-	-	+	+	+	+	+		-	-	+	+	+	+	+	
AZB	-	-	+	+	+	+	+		-	-	+	+	+	+	+	
	-	-	+	+	+	+	+		-	-	+	+	+	+	+	
60秒加温	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数
TSB	-	-	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
	-	-	-	-	+	+	+		-	+	+	+	+	+	+	
TSB +0.05%NaN ₃	-	-	-	-	-	-	-	<4.48	-	-	-	-	+	+	+	4.48
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	+	+	+	
AZB	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	+	
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
90秒加温	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数
TSB	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
TSB +0.05%NaN ₃	-	-	-	-	-	-	-	<4.48	-	-	-	+	+	+	+	<4.48
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	+	
AZB	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
120秒加温	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数	1日後	2日後	3日後	4日後	5日後	6日後	7日後	菌数
TSB	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
TSB +0.05%NaN ₃	-	-	-	-	-	-	-	<4.48	-	-	-	-	-	-	-	<4.48
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
AZB	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	

TSB：トリプトソイブイオン培地

TSB+0.05%NaN₃：0.05%アジ化ナトリウム加トリプトソイブイオン培地

AZB：アザイドブドウ糖ブイオン培地

－：菌の発育を認めない　＋：菌の発育を認める

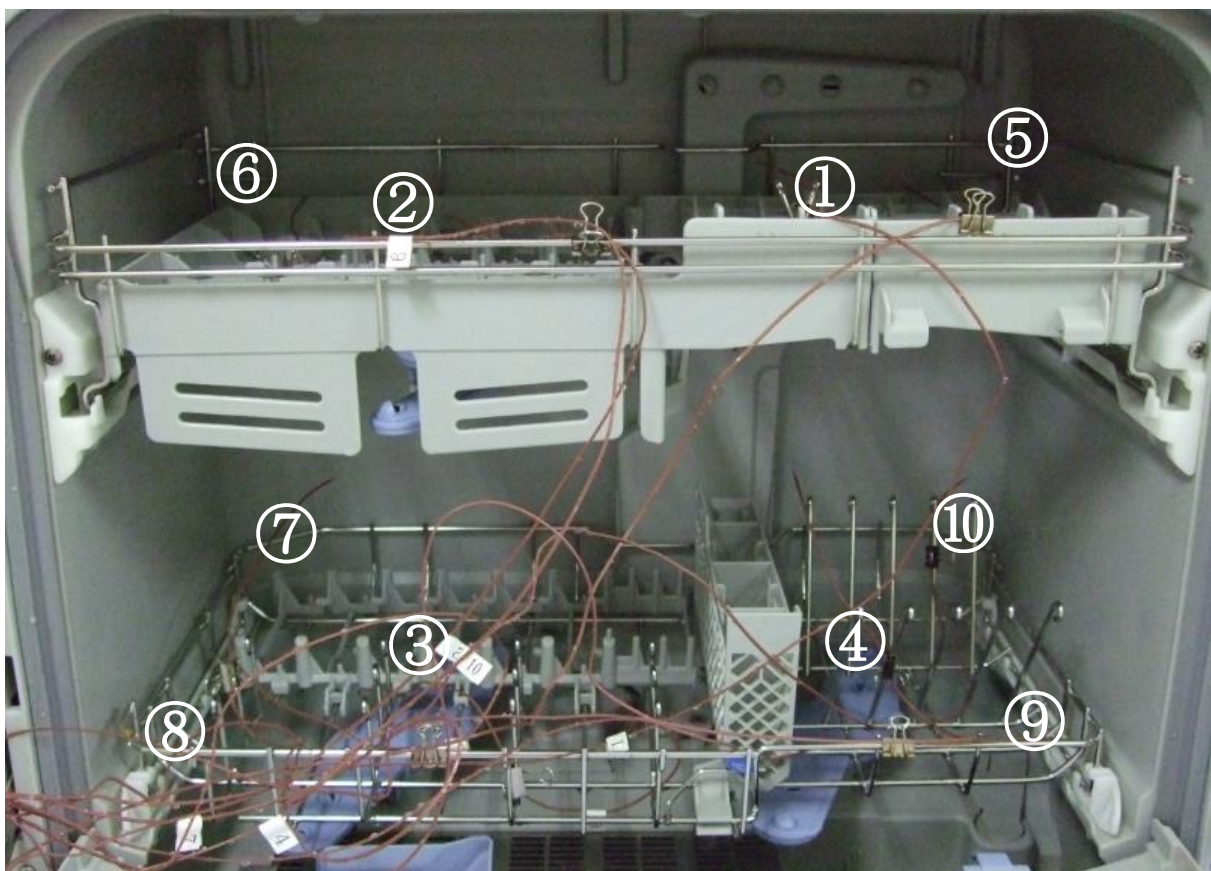


図1 洗浄消毒装置内のサーモカップル設置位置：①～⑩の計10ヵ所

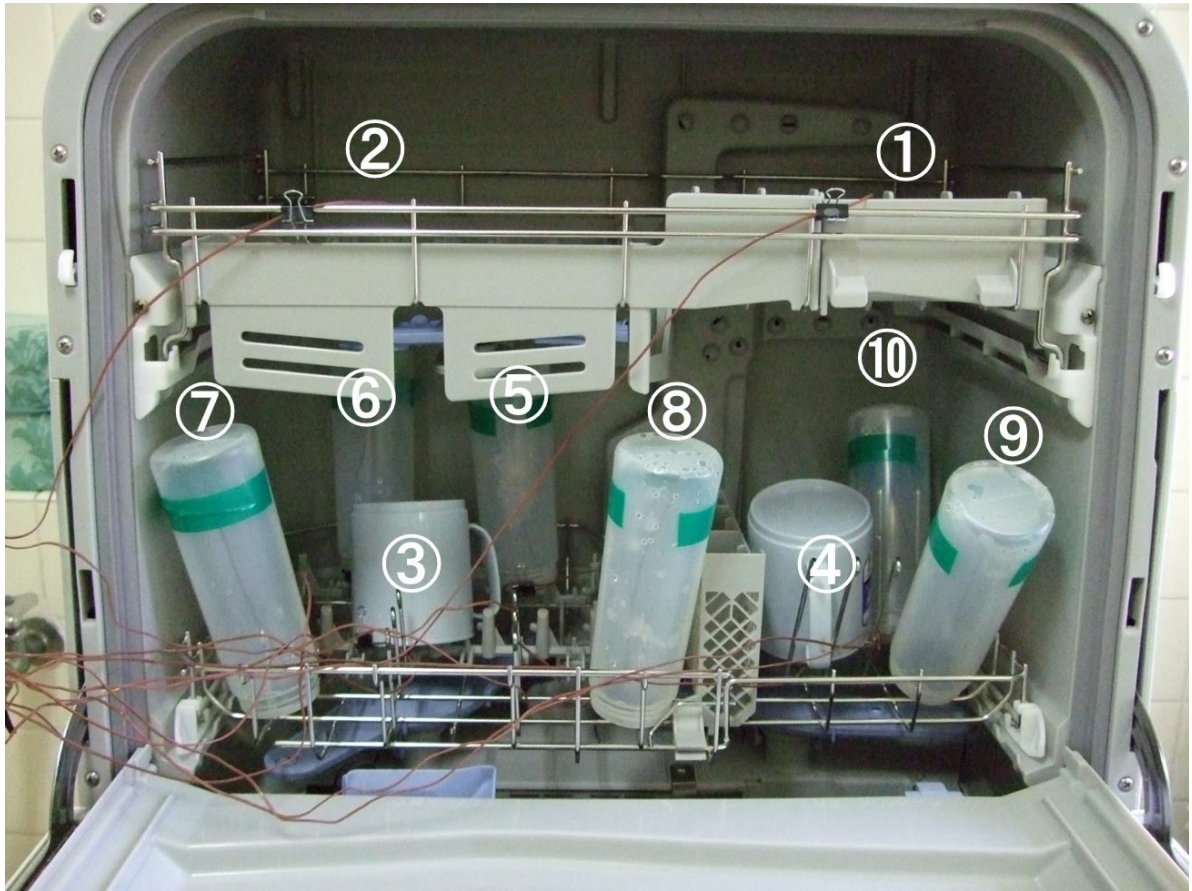


図2 洗浄消毒装置内にコップ2個、ボトル6本及び庫内2ヵ所にサーモカップルを設置



図3 サーモカップル先端が器材底面中央、底面から約1cm離れたところに位置するように固定した

左写真：コップ内

右写真：ボトル内

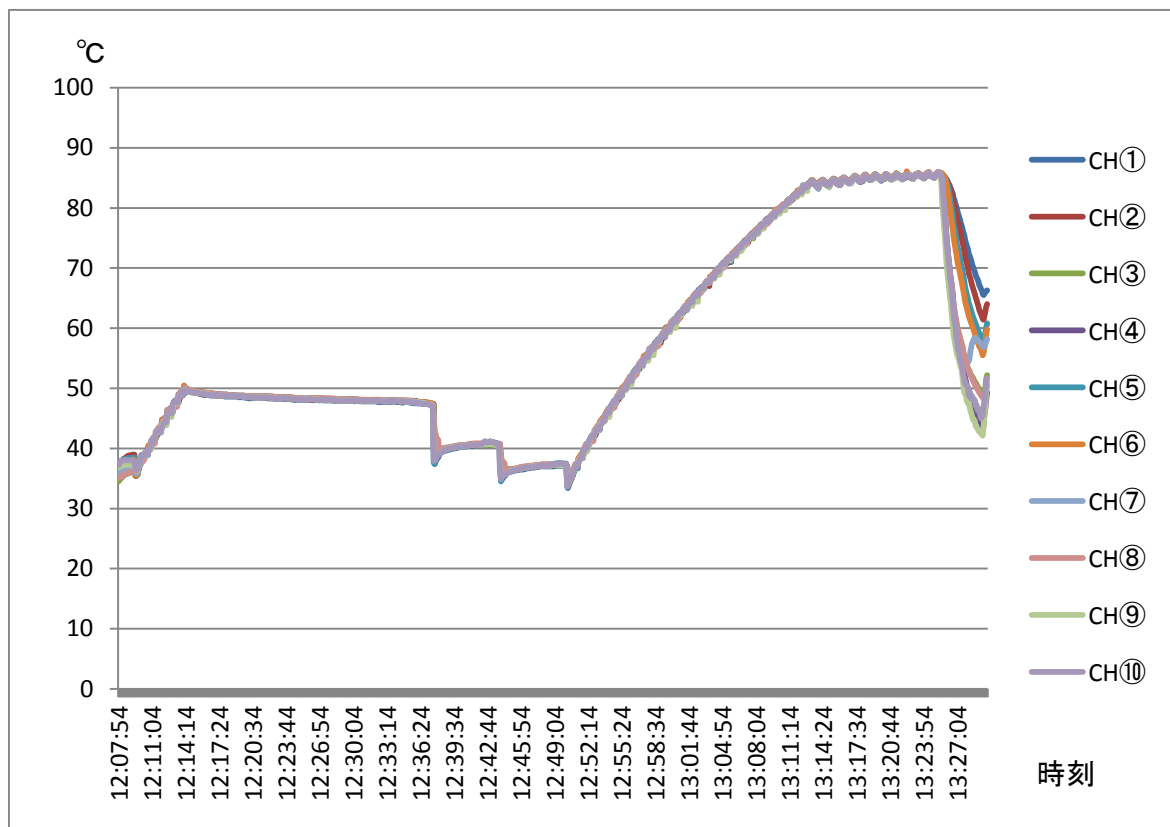


図4 洗浄消毒装置空運転時の庫内10ヵ所の温度推移の一例

CH;サーモカップルのチャンネルで、図1に示した①～⑩に相当するデータロガーを用いて、5秒間隔で測温したデータを記録した

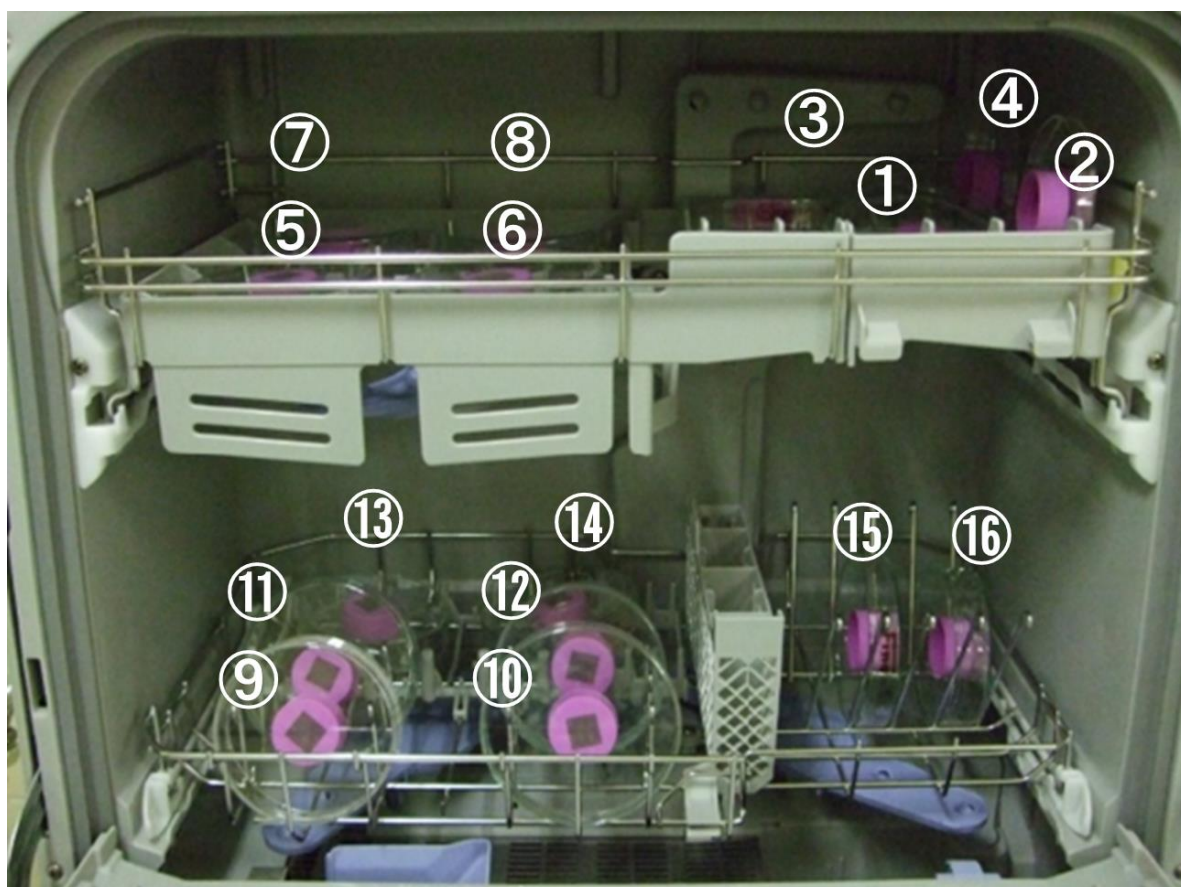


図 5 洗浄消毒装置内の生物学的インジケータ設置位置：①～⑯の計 16 カ所



図 6 生物学的インジケーター回収イメージ

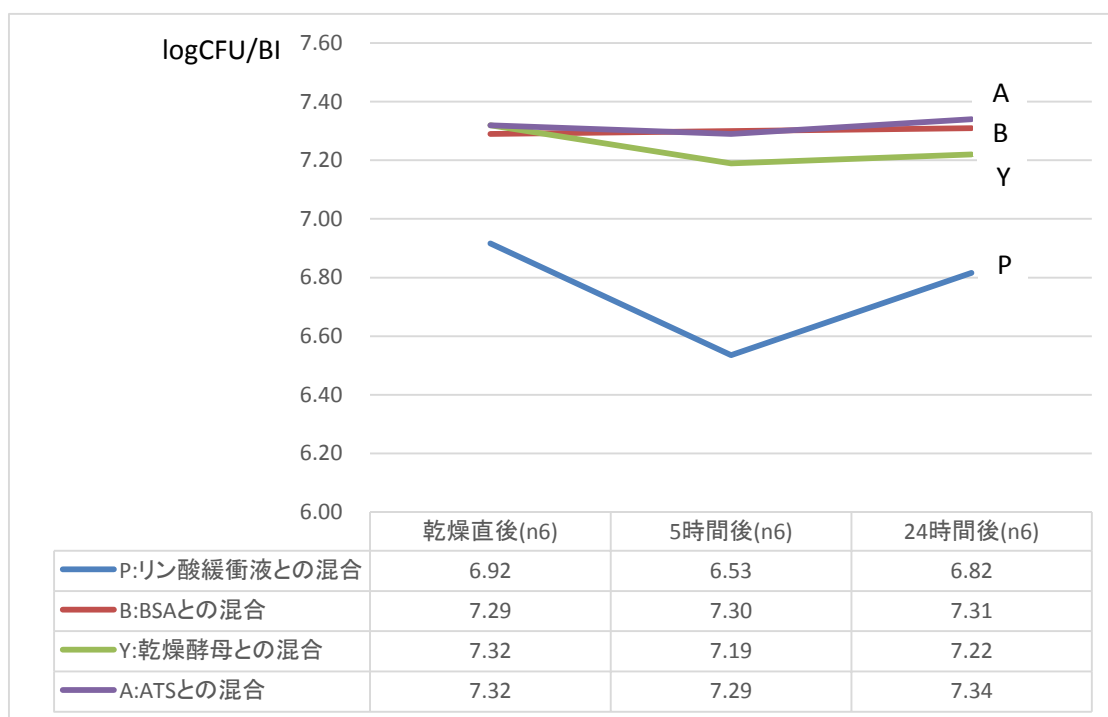


図 7 各種有機物混合の生物学的インジケーター完成後の時間経過と菌量変化

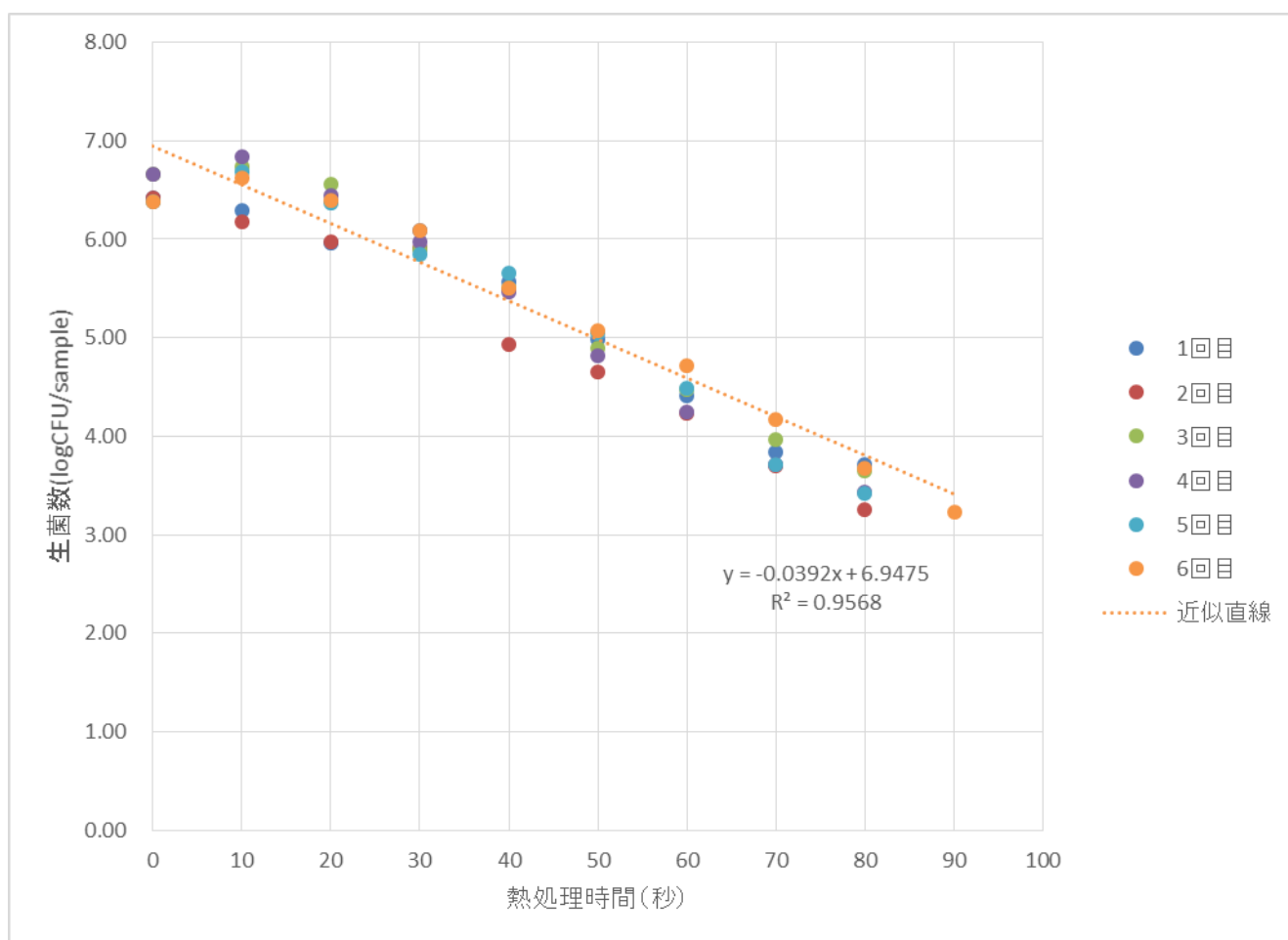


図 8 *E. faecium* JCM5084 の 65℃精製水による加温処理時間と菌量変化（培養 7 日後）

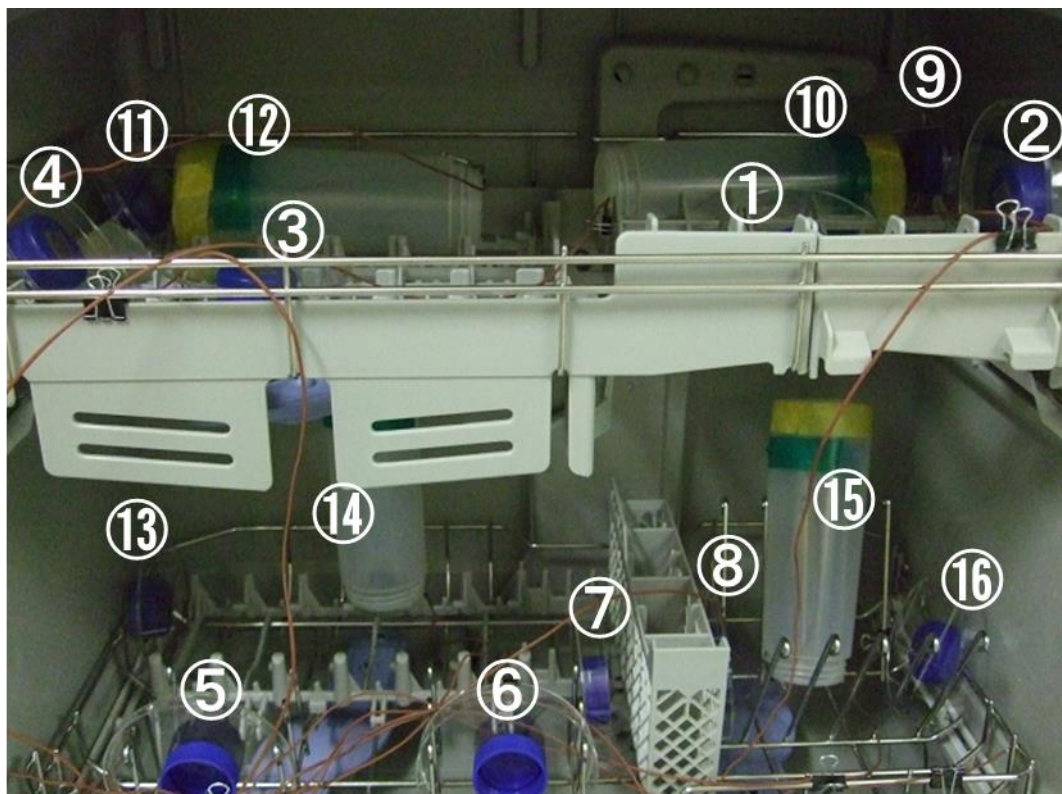


図 9 ボトル内や庫内壁面に向けて生物学的インジケーターを設置した洗浄消毒装置内の状況

Development of biological indicator using *Enterococcus faecium* by washer-disinfector

Etsuko Okazaki

Division of Infection Prevention and Control

Tokyo Healthcare University Postgraduate School Faculty of Healthcare, Department of Healthcare

Background: Many medical facilities have evaluated washing by washer-disinfector (WD) based on temperature control and using an indicator, but these only confirm the operational conditions of the apparatus. To evaluate the effect of thermal disinfection by WD, not only physical monitoring, but also evaluation using microorganisms is necessary.

Objective: A biological indicator (BI) using *Enterococcus faecium* to evaluate thermal disinfection by WD was developed.

Methods: A prototype, BI, was prepared as follow: The indicator bacterium, *E. faecium* JCM5084, was used to internal base of the cap of a test tube, and the cap was applied to a medium-containing test tube. This prototype BI proved the possibility of disinfection evaluation by the compact WD. Three suspensions of the indicator bacterium mixed with an organic substance were prepared, and the time-course and changes in the bacterial level were investigated in all types of BI. The bacterial suspension were treated with heat by combining with sterile water heated at 65°C, and the D value, which is an index of heat resistance, was calculated. BI for recommendation was prepared with 2% dried yeast-mixed *E. faecium* JCM5084, and the influence of heat, detergent, water pressure were evaluated. Growth and selective growth inhibition of the test bacterium were investigated using 3 media.

Results: After the completion of all processes including disinfection, all prototype BIs became negative. The bacterial level in BI combined with organic substances was mostly stable at 24 hours. The D₆₅ value of *E. faecium* JCM5084 was 24.21 seconds, and that in the presence of the organic substances was 27.39 seconds. The BIs for recommendation became negative after disinfection at 80°C for 10 minutes. The growth of biological indicator was quick at the TSB culture medium.

Conclusion: A BI using *E. faecium* was developed to evaluate thermal disinfection by WD. The indicator bacterium was used to inoculate the internal base of the cap of a test tube, and the cap was recovered by screwing down to the test tube not touching inside the cap, followed by culture medium to the test tube, culturing at 30°C for 7 days.