

様式A(4)

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成12年 4月 5日

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

住 所 〒
 フリカ ナ ミセ カツシ
 研究者 氏 名 三瀬 勝利
 (所属施設) 国立医薬品食品衛生研究所



平成11年度厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) 日本薬局方微生物試験法の国際調和対応のための調査研究(H10- 医薬-032)

国庫補助金精算所要額 : 金 4,000,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
国際規格に準拠した滅菌法及び微生物殺滅法	2000年4月	日本規格協会	佐々木次雄他

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

(作成上の留意事項)

1. 「4. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
2. その他
 - (1) 手書きの場合は、楷書体で記入すること。
 - (2) 氏名は、自署又は記名押印で記入すること。
 - (3) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。

別添1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

(作成上の留意事項)

総括研究報告書概要版は、別紙1「総括研究報告書概要版作成要領」に基づき作成すること。

別添2

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

(作成上の留意事項)

総括研究報告書は、別紙2「研究報告書レイアウト」を参考に作成すること。

別添3

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

(作成上の留意事項)

分担研究報告書は、別紙2「研究報告書レイアウト」を参考に作成すること。

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称＝厚生科学研究費

研究事業名＝医薬安全総合研究事業

研究課題名＝日本薬局方微生物試験法の国際調和対応のための調査研究

国庫補助金精算所要額＝4,000,000

研究期間（年度）＝1998-2000

主任研究者名＝三瀬勝利（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究者名＝佐々木次雄（国立感染症研究所）、小熊恵二（岡山大学）

研究目的＝現在、ICH や PDG で、多くの微生物関連試験法が国際調和の対象となりつつある。そのうち緊急性の高い試験法の原案策定作業を諸外国の試験法と比較・検討することを通じて、日本薬局方に収載・改訂すべく尽力する。また、外国の薬局方微生物試験法の専門家を招聘し、公開シンポジウムを開催し、広く識者の意見を聞き、試験法の国際調和を目指すことを研究目的とする。

研究方法＝試験法の国際調和のための情報は、主として PDG や ICH の場や出版物を介して諸外国の考えを得る。新収載・改訂される予定の試験法についての意見や希望、批判などは生物試験法委員会や各種学会などを通じて集約される。また、公開シンポジウムのための外国人招聘は、日本公定書協会から募集される「外国人招聘旅費」に応募して、これに充てる。

結果と考察＝JP13 第二追補版に、国際調和を受けて改正されつつある「無菌試験法」を、調和の精神を重んじて改訂した。再々試が削除されたり、メンブランフィルター法優先の方向になっているが、これらは国際調和の方向と一致している。また、無菌医薬品のモニタリング手法と基準値を示した「無菌医薬品の製造区域の微生物評価試験法」と最終滅菌医薬品に対するパラメトリック・リリース要件を示した「最終滅菌医薬品の無菌性保証」を参考情報の項に新収載した。更に、非無菌医薬品の微生物限度値を扱った「非無菌医薬品の微生物学的特性」を JP フォーラムに提案した。同時に、JP14 への収載に向けて微生物限度試験法中のクロストリディア試験について、USP や EP 試験法の比較検討を行った。クロストリディア試験では、USP Forum に提案されたものが参考になり、JP14 収載に向けて収載作業を開始する予定である。公開シンポジウムでは 1999 年 11 月に USP の微生物試験担当者である Roger Dabbah 博士を招き、東京と大阪で公開シンポジウムを行った。会場の収容能力を遙かに超えた参会希望者があり、微生物試験の調和に関心を持つ人を多

さには驚かされた。今後、このような催しをする場合は、千人近い収容能力を持つ会場が必要となろう。

結論＝ JP13 第二追補で、新たに2試験法の新収載と「無菌試験法」の大改訂を行った。これにより、これまで質量ともに問題があった日本薬局方微生物試験法も、USP に近いところまで充実したと考えている。新収載や大改訂は国際調和の後押しがなければ、不可能であった。外国人を招聘した公開シンポジウムも盛況であり、各界の微生物試験法の国際調和に関する関心の深さが伺われた。

総括研究報告書

日本薬局方・微生物試験法の国際調和のための調査研究

主任研究者：三瀬勝利 国立医薬品食品衛生研究所・副所長

研究要旨：日本薬局方(JP)・生物試験法について国際調和の観点から以下の研究を行い、多大の成果をあげることが出来た。① JP13 第二追補で「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」と「最終滅菌医薬品の無菌性保証」を新規収載した。また、「無菌試験法」の大改訂を行った；② JP14 収載に向けて「無菌医薬品の微生物学的品質特性」を JP フォーラムに掲載した；③微生物限度試験中にクロストリディア試験を収載すべく、資料調査と研究を行った；④ USP の Roger Dabbah 博士（生物試験担当責任者）を招聘し、東京と大阪で生物試験の国際調和に関するシンポジウムを行い、USP-JP 間の試験法の調和に努力した。

A. 研究目的

現在、ICH や PDG で、多くの微生物関連試験法が国際調和の対象になりつつある。そのうち緊急性の高い試験法の原案策定作業を諸外国の試験法と比較検討することを通じて、薬局方に、収載・改訂すべく尽力する。また、外国の薬局方・微生物試験法の専門家を我が国に招聘し、公開シンポジウムを開催し、広く多数の識者の意見を聞き、試験法の国際調和を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

1) 試験法の国際調和のための情報は、主として PDG や ICH の場や出版物を介して諸外国の意見等を得る。新収載・改訂される予定の試験法についての意見や批判は生物試験法委員会や各種学会などを通じて集約される。

2) 外国人招聘（公開シンポジウムのため）は日本公定書協会から募集されている「外国人招聘旅費」に応募して、これに充てる。

C. 研究結果

JP13 第二追補に、国際調和を受けて改正されつつある「無菌試験法」を、調和の精

神を重んじて改訂した。同じく、無菌医薬品のモニタリング手法と基準値を示した「無菌医薬品の製造区域の微生物評価試験法」と最終滅菌医薬品に対するパラメトリック・リリース要件を示した「最終滅菌医薬品の無菌性保証」を参考情報の項に新収載した。また、非無菌医薬品の微生物限度値を扱った「非無菌医薬品の微生物学的特性」を JP フォーラム（平成 12 年 4 月号）に提案した。さらに JP14 への収載に向けて微生物限度試験中のクロストリディア試験について、USP や EP 試験法の比較検討を行った。外国人招聘公開シンポジウムでは、1999 年 11 月に USP の Roger Dabbah 博士を招き東京と大阪で講演会を行った（講演要旨集参照）。

D. 考察

公開シンポジウムは、会場に収容できる人員を倍する希望者があり、微生物試験法改訂に関心を持つ人々の多いことに驚かされた。今後、同様の行事を行うときには注意を要する。クロストリディア試験については、USP のものが参考になり、JP14 収載に向けて作業を開始したい。

E. 結論

これまで質量ともに問題があった JP 生物試験法も、USP に近いところまで充実したと考えている。新収載や大改訂は国際調和の後押しが無ければ、不可能であったと思われる。今後は更に優れた試験法収載に向けて努力する必要がある。

F. 研究発表

1. 佐々木次雄他「日本薬局方に準拠した滅菌法及び微生物殺滅法」日本規格協会、1998.

その他多数（詳細は分担研究報告書参照）

別紙2 厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

日本薬局方・微生物試験法の国際調和のための調査研究

分担研究者： 佐々木次雄 国立感染症研究所 安全性研究部無菌性制御室長

研究要旨：JP13 第二追補で「無菌試験法」を改正し、「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」と「最終滅菌医薬品の無菌性保証」を新規収載した。JP14 収載を目指して「非無菌医薬品の微生物学的品質特性」を JP フォーラムに掲載した。「ろ過滅菌法」の国際規格作成に貢献した。

A. 研究目的

日局微生物試験法の見直しと国際調和の推進、新規日局収載微生物試験法の作成、並びに ISO 13408 シリーズ（ヘルスケア製品の無菌的製造法）の国際規格作成への貢献と日局「無菌操作法」への導入に関して検討する。

B. 研究方法

1) 3 薬局方 (USP, EP, JP) の代表者から構成される PDG (Pharmaceutical Discussion Group) や ICH の場で調和を目指している微生物試験法に日局の考えを反映する。2) 日局未収載の微生物試験法を作成し、徹底的議論の上、日局への収載を目指す。3) ISO/TC198/WG9 で「ヘルスケア製品の無菌的製造法」に関連する国際規格を作成しており、分担研究者がプロジェクトリーダーになっている ISO/WD 13408-2 (ろ過滅菌) ドラフトの WD (Working draft) から CD (Committee Draft) 格上げを目指す。ISO 13408 シリーズの幾つかは、「培地充填試験法」同様、日局にも収載される可能性がある。

(倫理面への配慮) 特になし

C. 研究結果

国際調和を受けて改正した「無菌試験法」を JP13 第二追補に収載した。無菌医薬品の環境モニタリング手法と基準値を示した「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」と最終滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース要件を示した「最終滅菌医薬品の無菌性保証」を同じく第二追補に新規収載した。非無菌医薬品に対する微生物限度値を示した「非無菌医薬品の微生物学的品質特性」を作成した (JP フォーラム、平成 12 年 4 月号)。本指針は、PDG 及び ICH で国際調和の対象になった。

D. 考察

一つの試験法を作成し、日局に収載するまでにはかなりの時間が必要である。「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」中の微生物評価基準値の設定も難しい問題であった。USP と EP でも調和ができていなかったため、JP フォーラムに 2 回掲載し意見を求めた。本指針は、参考情報に収載されたが、監視指導課では本指針に基づいて GMP 査察を行っており、その影響力は大きいものがある。「非無菌医薬品の微生物学的品質特性」も、検討を開始してから 4 年目で JP フォーラム掲載となった。本指針は、国際調和対象試験法だけに早めにフォーラムに掲載し、USP 及び EP に日局の考えを提示する必要があった。

E. 結論

JP12 時代は、質量ともに貧弱を極めていた日局微生物試験法もやっと USP, EP 並みに充実した感がある。これからは、3 薬局方の国際調和に日局も積極的に貢献できるものと確信する。

F. 研究発表

論文発表 (日局試験法関係のみ)

1. 佐々木次雄、三瀬勝利、中村晃忠編「日本薬局方に準拠した滅菌法及び微生物殺滅法」日本規格協会、1998 年。
2. 佐々木次雄、川村邦夫、水田泰一編「国際規格に準拠した無菌医薬品の製造管理と品質保証」日本規格協会、2000 年。
3. 佐々木次雄、医薬品研究 (日本公定書協会)、日局解説書 (広川書店)、他学会発表
シンポジウム、セミナー等で数多く発表

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

日本薬局方・微生物試験法の国際調和対応のための調査・研究

分担研究者： 小熊 恵二 岡山大学医学部教授

研究要旨： 第14改正日本薬局方に向けての微生物限度試験法の全面改定の一環として、生物試験法委員会ではクロストリディア試験法の収載を考えている。これまでの同委員会の議論では、ヨーロッパ連合薬局方(EP)に収載されているクロストリディア否定試験と *C. perfringens* 菌数測定試験の二つの試験を収載することを考えていたが、再検討の結果 USP Forum 25 巻に提案されているように、*C. perfringens* 菌数測定試験は必ずしも必要でないという結論に達した。

A. 研究目的

微生物限度試験法は国際調和の対象試験となっている。PDG では CP 候補として EP と USP が手を挙げている。EP とそのたたき台案、及び最近提案された USP Forum 25 巻では、現在 JP に収載されていないクロストリディア試験が収載されている。薬用蜂蜜や生薬のクロストリディア汚染が問題になっているところから、JP でもクロストリディア試験を収載すべきであるという意見が強い。特にクロストリディアは人に危害を及ぼすボツリヌス菌が含まれる。蜂蜜が原因となる乳児ボツリヌス症は世界中で報告されており、クロストリディア試験の策定は必要と考える。

B. 研究方法

USP Forum 25 巻 2 号に提案されている微生物限度試験法と EP の試験法を比較検討した。また、蜂蜜を希釈後、嫌気培養した溶液中のボツリヌス毒素検出試験をマウスを使って調査した。

C. 研究結果

USP と EP の試験法は以下の点で差異がある：即ち、USP では *C. perfringens* の菌数測定試験が提案されていない。この試験は品質劣化の恐れがある製剤について適用される。またマイナーな差として、① USP ではクロストリディアの性状は表として示されている；②クロストリディア増殖培地の pH の表記が異なる；③コロンビア培地の寒天の量が若干異なる。また、マウスを使った実験から、蜂蜜には最高で5%の割合でボツリヌス菌が検出された。

D. 考察

C. perfringens は芽胞を形成する嫌気性菌であり、この試験法は品質管理の一環として EP では提案されている。しかし、EP、USP 共に好気性芽胞菌である *Bacillus* 属菌試験法は収載していない。上記の理由から *C. perfringens* 試験を含ませる理由はないと考えられる。なお、蜂蜜のボツリヌス試験から、今日でも蜂蜜のボツリヌス汚染率は

最高で5%もある。薬用蜂蜜でも、ボツリヌス菌を完全に除く方策がないところから本試験法の策定は必要と考えられる。

E. 結論

クロストリディア試験法では、乳児ボツリヌス症を制御するためにも否定試験は必要であるが、*C. perfringens* の菌数測定試験は不要ではないかと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Oguma, K. et al. Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. *J. Toxicol*, 18,17-34,1999.

Inoue, K. et al. Characterization of haemagglutinin activity of *Clostridium botulinum* type C and D 16S toxins. *Microbiology*, 145, 2534-2542, 1999