

厚生科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

医薬品、医療用具等の無菌性保証の方法  
及びその妥当性に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

棚元憲一

平成 14 年 3 月

厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業

## 医薬品、医療用具等の無菌性保証の方法及び

### その妥当性に関する研究班

#### 平成 13 年度 研究組織

##### 主任研究者

棚元 憲一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 部長

##### 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
大野 悌治	埼玉県	健康福祉部	薬務課長
那須 正夫	大阪大学大学院	薬学研究科	教授
佐々木 学	社団法人北里研究所	薬事部門	GMP 管理室長
曲田 純二	日本ミリポア (株)	バイオ医薬品	事業本部次長
阿部 寛	大塚製薬 (株)	徳島ワジキ工場	GMP 担当課長

##### 協力研究者

見理 剛	国立感染症研究所	安全性研究部
鈴木 順子	埼玉県	健康福祉部薬務課
小林 保志	埼玉県	健康福祉部薬務課
山口 進康	大阪大学大学院	薬学研究科
伊藤 浩三	千葉県血清研究所	製造部
小幡 朗	デンカ生研 (株)	ワクチン製剤部
鈴木 崇宣	財) 阪大微生物病研究会	観音寺研究所品質保証部
高田 光昭	日本ビーシー製造 (株)	製造第一部
鳥居 宏明	明治乳業 (株)	医薬事業部細胞工学センター
長谷川和光	財) 化学及血清療法研究所	薬事部
松本 英男	三菱ウエルファーマ (株)	
山本 浩	財) 日本ポリオ研究所	技術部
渡辺 秀夫	武田薬品工業 (株)	光工場生物製剤部

# 目 次

## I。総括研究報告

医薬品、医療用具等の無菌性保証の方法及びその妥当性に関する研究

棚元憲一 . . . . . 1

## II。分担研究報告

1. 日本薬局方導入を目指す試験法及び手法の科学的妥当性に関する研究

佐々木次雄、見理剛 . . . . . 7

2. 医薬品の無菌性保証に関する行政指導のあり方

大野悌治、鈴木順子、小林保志 . . . . . 115

3. 非無菌水試料における **New Method** による微生物モニタリング

那須正夫、山口進康 . . . . . 135

4. 医薬品製造におけるバイオセーフティ対策に関する研究

佐々木学、佐々木次雄、伊藤浩三、小幡朗、鈴木崇宜、高田光昭、鳥居  
宏明、長谷川和光、松本秀男、山本浩、渡辺秀夫 . . . . . 147

5. ろ過滅菌法に関する研究

曲田純二 . . . . . 183

6. 新技術に関する無菌性評価及びその妥当性に関する研究

－CIP/SIP に関する中間報告－

阿部寛 . . . . . 189

## 厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

### 総括研究報告書

医薬品、医療用具等の無菌性保証の方法及びその妥当性に関する研究

主任研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部長

**研究要旨：**無菌医療用具及び医薬品製造における無菌操作法において、最も重要であるろ過滅菌工程や SIP/CIP の無菌性検証を中心に、付随する微生物管理手法について研究を行った。各種無菌関連試験法、およびガイドラインの作成、さらには微生物モニタリング法の開発等に大きな成果を得た。これらの研究成果は、最終的には日本薬局方への反映や医薬品の無菌性保証に関するガイドライン作成等を通じて、わが国製薬企業における高度な品質の無菌医薬品の供給に貢献するものである。

#### 分担研究者

佐々木次雄	国立感染症研究所 安全性研究部室長
那須正夫	大阪大学大学院薬学研究科 衛生化学・教授
大野 悌治	埼玉県健康福祉部薬務課長
佐々木学	北里研究所生物製剤研究所 薬事部門GMP管理室長
阿部 寛	大塚製薬株式会社 徳島ワジキ工場
曲田純二	日本ミリポア(株)代表 ファーマシューティカル事業本部次長

に初めて感染という形で現れるものであるという避けられない構造上の問題を抱合していることから、重要工程や無菌医薬品製造環境については、徹底的なバリデーションと日常管理が必要となる。本研究事業においては、無菌操作法において最も重要であるろ過滅菌工程や SIP/CIP の無菌性検証を中心に、付随する微生物管理手法について研究を行う。得られた研究成果は、日本薬局方への反映や医薬品の無菌性保証に関するガイドライン作成無菌医薬品の製造と品質保証に関する解説書の出版、論文発表、学会発表等を通じて、わが国製薬企業における高度な無菌医薬品の供給に役立たせたい。

#### A. 研究目的

滅菌製造された医療用具及び医薬品の多くが無菌操作法で製造されており、ろ過工程、充填工程、凍結乾燥工程、無菌操作工程等無菌性保証にとっての重要工程については、十分な無菌性バリデーションが求められる（薬発第 158 号、平成 7 年）。特にこれらの無菌製品は、最終製品に対する無菌試験では検出できず、患者が使用した後

#### B. 研究方法

##### 1. 日本薬局方導入へ向けての新規試験法に関する研究

標準株を用いて製薬企業 11 社に菌種同定を依頼し、「遺伝子解析による微生物の同定法」ドラフトを評価を行った。「ろ過滅菌法」は ISO/TC198 AWG9 を反映させ

た新しいモノグラフの素案の作成を目指す。「製薬水の製造及び品質管理」に関しては研究班を発足させ、国際調和を考慮に入れながらの検討を行った。パラメトリックリリースについては国内外の学会等においての考え方の紹介と導入を図った。

## 2. 非無菌水試料中における微生物検出法の開発

存在する微生物の現存量は DNA に特異的に結合する蛍光染色剤 DAPI を、また、生菌数は細胞内のエステラーゼの作用により蛍光を発する 6CFDA、及び呼吸により蛍光を発する CTC をそれぞれ用いて、染色された微生物を蛍光顕微鏡下で直接観察・計数した。

## 3. 医薬品の無菌性保証に関するガイドライン作成

モデルケースとして埼玉県内製薬企業の担当者、県衛生研究所及び薬務課担当者からなる検討会を設置し、製薬企業の現状及び日本薬局方等の公定書を参考に、「ガイドライン」の検討を行った。

## 4. CIP/SIP に関する研究

ISO/TC198/WG9 においてドラフトの作成が進められている CIP/SIP の内容調査を行い、これらの情報収集を基にガイドラインドラフト及び解説書の作成を進めた。

## C. 研究結果

### 1. 日本薬局方導入へ向けての新規試験法に関する研究

医薬品製造において、高度な無菌性を要求される試験や工程で検出された菌については、同定が必要である。そのための新規試験法として「遺伝子解析による微生物の同定法」の作成及び検証を行った。細菌種

については 16SrRNA、カビについては ITS1 の塩基配列の一部を解説し、データベースと照合することによって確率の高い順に菌種を絞り込むことができた。「ろ過滅菌法」は ISO/TC198/WG9 会議で FDIS (Final Draft for International Standard) に格上げされたことから、日局参考情報へ掲載するための素案作成を行った。バクテリアチャレンジ試験時のフィルター選定の厳格化、その試験時の微生物学的バリデーションの実施、ろ過前の製品中のバイオバーデン試験の実施、フィルター変更時の使用者と製造者の同意書の取り交わしなど、要求項目を具体的に示した。日米欧薬局方の国際調和会議 PDG (Pharmacopoeial Discussion Group) で製薬用水を国際調和することになったことを受け、日本製薬団体連合会を通じて製薬企業に依頼し、製薬水の製造及び品質管理に関するアンケートを実施している。また、日局参考情報掲載を目指し「製薬水の製造及び品質管理」に関する素案を作成した。さらに、「高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース」について、日本公定書協会主催「医薬品の品質確保をめぐる諸問題」についての研修会並びにスイスバーゼル市で開催された PDA 国際会議で紹介した。

### 2. 非無菌水試料中における微生物検出法の開発

市販のミネラルウォーターについて、R2A 培地<sup>6)</sup>を用いて生菌数を測定した場合コロニーは検出されなかったが、DAPI 染色では、除菌処理を行っていない場合 1 mL あたり約 10 万個の微生物が確認された。また、CFDA 及び CTC 染色ではいずれも試料 1 mL あたり約 4 万個であり、全菌数の

約 20%を占めていることを明らかにした

### 3. 医薬品の無菌性保証に関するガイドライン作成

注射剤等は、その製剤特性から厳しい製造管理及び品質管理が要求される。しかし、製薬企業における医薬品の無菌性保証に関する取り組みには差がみられる。そこで、医薬品の無菌性保証に関して製薬企業が達成すべき目標水準となる「ガイドライン」を作成し、それに基づく指導を試みた。

### 4. CIP/SIPに関する研究

CIP 国際規格「ISO/WD13408-4 Part1 Cleaning in place」につき、内容調査を行い、CIPプロセス設計からバリデーション及び日常管理に至るまでの管理方法及びその評価方法を考察し、国内ガイドラインドラフト及び解説書を作成した。

## D. 考 察

医薬品の無菌的製造法を示した国際規格 (ISO 13408-1)、ICH (医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議) で作成した各種ガイドライン、更に WHO-GMP、EU-GMP、FDA ガイドライン等においても医薬品の製造に関しては、厳しい要件が課せられている。製薬業界における国境を越えた再編成は加速しており、これらの規格を満たせない製薬企業は淘汰されていくことは明らかである。このような背景の中で本研究では、医薬品の無菌的製造法や管理手法に関して研究・調査を行い、その成果を日本薬局方に反映することにより、国内製薬企業の世界水準化維持を目指す。また、日本薬局方への当該試験法を追加することは、医薬品全般の品質を向上し、ひいては、国民に恩恵をもたらすものである。

その意味において本年度の行った「遺伝子解析による微生物の同定法」、「ろ過滅菌法」及び「製薬用水の製造及び品質管理」に関する研究成果は、それぞれ日局への導入に向けて大いなる前進を見たと思われる。同じく医薬品の無菌性保証に関するガイドライン作成や CIP/SIP に関する研究も、無菌性保証の確立に不可欠な研究であり、医薬品品質のレベルアップにつながるものである。

また非無菌水試料中における微生物検出法に関する研究は、ある意味ではこれまでの微生物試験法の革命につながるものである。医薬品のみに限らず食中毒、感染症、さらには食品の安全性確保における微生物問題の対処に際して、有害微生物の迅速・適確・高感度な検出・同定が求められている。しかし従来法は煩雑な操作と長期にわたる培養、さらには科学的な不確定性等、時代に対応できない本質的な欠陥を抱えていて、有害微生物による被害が生じた際に迅速・適確な対応がなされていない。諸分野における科学技術の発展した今日、最新の技術を応用した迅速・適確な検出・同定法を確立し、有害微生物による被害に迅速・適確に対応する必要がある。本研究はその意味において画期的な研究であり、将来のより適切な試験法の開発につながるものと確信している。

## E. 結 論

本研究の第一年度においては、以下の成果を得た。1) 日本薬局方関係：PDG における国際調和作業を反映させ、無菌試験法及び微生物限度試験法の改訂作業を推進させた。微生物の迅速同定法として「遺伝

子解析による微生物の同定法」に関する研究成果を日局に導入する目処がたった。

2) ISO 関係：無菌医薬品の製造に関する国際規格の作成にも貢献した。成果の一つとして「ろ過滅菌法」の日局導入を目指すことにした。

3) 薬局等構造設備規則：生物学的製剤等に対するバイオセーフティ対策として、ワクチンメーカー5社の協力の

もと、インフルエンザワクチン製造におけるバイオセーフティ対策をハード面及びソフト面から検証した。

4) その他：製薬用水の製法及び規格試験法の見直しを開始した。また、高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリースの企業導入に関する調査・研究を行い、その成果を国際会議で発表した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 棚元憲一 第十四局日本薬局方について：一般試験法（生物試験法）について 医薬品研究、Vol.32 (No.11) pp725-733, 2001
2. 棚元憲一 生物試験法の主な改正点 薬局 52(5)、pp29-34、南山堂、2001
3. 佐々木次雄、棚元憲一：「ろ過滅菌法」の日局導入に関する研究、医薬品研究、32 (12): 814-819, 2001.
4. 佐々木次雄：日本薬局方における微生物管理試験法の動向、医薬品研究、32 (6): 453-462, 2001.
5. 佐々木次雄：高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース、医薬品研究、33 (2): 173-182, 2002.
6. 佐々木次雄：無菌性保証と第 14 改正日本薬局方、JAAME News 25 (September): 29-36, 2001.
7. 佐々木次雄：製剤通則（6）パラメトリックリリースについて、（財）日本公定書協会編 JPTI 2001, p.8, 2001.
8. 佐々木次雄：無菌試験法、（財）日本公定書協会編 JPTI 2001, p.224-228, 2001.
9. 佐々木次雄：最終滅菌医薬品の無菌性保証、（財）日本公定書協会編 JPTI 2001, p.270-271, 2001.
10. 佐々木次雄：滅菌法及び無菌操作法、（財）日本公定書協会編 JPTI 2001, p.263, 2001.
11. 佐々木次雄：培地充填試験法、（財）日本公定書協会編 JPTI 2001, p.285-287, 2001.
12. 佐々木次雄：非無菌医薬品の微生物学的品質特性、（財）日本公定書協会編 JPTI 2001, p.297-299, 2001.
13. 佐々木次雄：最終滅菌法及び滅菌指標体、第十四改正日本薬局方解説書、廣川書店、p. F37-F60, 2001.
14. 佐々木次雄：培地充てん試験法、第十四改正日本薬局方解説書、廣川書店、p. F74-F85, 2001.
15. 佐々木次雄：非無菌医薬品の微生物学的品質特性、第十四改正日本薬局方解説書、廣

16. 谷佳津治、山口進康、那須正夫：蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌の検出。衛生化学、43: 145-154、1997.
17. 谷佳津治、山口進康、那須正夫：微生物生態学の手法にみる90年代の進展。Microb. Environ., 12: 41-56, 1997.
18. 山口進康、那須正夫：蛍光染色法による特定微生物の迅速・簡便な検出。食品工業、41: 24-32, 1998.
19. Porter, K. G., and Y. S. Feig: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. 25: 943-948, 1980.
20. Yamaguchi, N., T. Kenzaka, and M. Nasu: Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. Microb. Environ., 12: 1-8, 1997.
21. Reasoner, D. J., and E. E. Geldreich: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49:1-7, 1985.
22. Ogawa, M., K. Tani, N. Yamaguchi, and M. Nasu: Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. submitted.
23. 佐々木学、坂口孝廣、藤田弘之：生物学的製剤等GMP基準の現状と対応（ワクチン製剤）、PHARM TECH JAPAN Vol.14(No.12) 臨時増刊号 p101-111,1998

## 2. 学会発表

1. 棚元憲一：局方微生物試験法の現状、国際調和と将来展望—第14改正日本薬局方を中心として—、日本防菌防黴学会主催「第17回GMPとバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム」、平成14年3月8日、東京。
2. Tsuguo Sasaki: Parametric release for moist heated pharmaceutical products in Japan. PDA International Congress. 11 February 2002, Basel.
3. 小林 剛、山口進康、那須正夫：FISH-FCM法による細菌の迅速な定量、日本薬学会第122年会、平成14年3月28日（千葉）。

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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

#### 日本薬局方導入を目指す試験法及び手法の科学的妥当性に関する研究

分担研究者 佐々木次雄

国立感染症研究所安全性研究部室長

協力研究者 見理 剛

国立感染症研究所安全性研究部研究員

**研究要旨：**日本薬局方への導入を目指す、「遺伝子解析による微生物の同定法」、「ろ過滅菌法」及び「製薬用水の製造及び品質管理」の素案を作成した。「遺伝子解析による微生物の同定法」については、製薬企業 11 社参加の評価研究をベースに、「ろ過滅菌法」は国際規格 FDIS 13408-2 を参考に、「製薬用水の製造及び品質管理」は別途研究班を発足させて素案を作成した。更に、高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース導入の推進を図った。

#### A. 研究目的

1. 日本薬局方参考情報に導入予定の「遺伝子解析による微生物の同定法」の妥当性検証。
2. 日本薬局方参考情報に導入予定の「ろ過滅菌法」の素案作成。
3. 製薬用水の国際調和に必要な情報収集と日本薬局方参考情報に導入予定の「製薬用水の製造及び品質管理」の素案作成。
4. 高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリースの推進。

#### B. 研究方法

1. 「遺伝子解析による微生物の同定法」ドラフトを評価するため、製薬企業 11 社に細菌 5 種、真菌 5 種を送り、菌種同定（推定）と同時にドラフトについて意見を求めた。
2. ISO/TC198/WG9 で作成中の「ろ過滅菌法」を反映させた新しいモノグラフの素案を作成した。
3. 「製薬用水の製造及び品質管理」に関する研究班を発足させ、製薬用水の国

際調和を考慮に入れながら、日局「製薬用水」の見直しと日局参考情報に導入予定の「製薬用水の製造及び品質管理」に関する素案を作成した。

4. 国内外の学会等においてパラメトリックリリースの考え方を紹介し、国内製薬企業に対するパラメトリックリリースのスムーズな導入を目指した。

#### C. 研究経過

1. 3月5日現在、11社中5社から解析結果が届いた。細菌及び酵母に対するPCRはポリソルベートを1%添加したTE bufferに被検菌を懸濁したものを100℃で5・10分間処理するだけで問題なくかかり、良好な同定結果が得られた（添付資料1）。しかし、カビの場合は本条件でPCRがかかりにくく改良が必要である。また、カビの同定率は細菌に比べ低いのは、ITS1領域に対するデータベースが十分整備されていないためと考えられる。ただし、「遺伝子解析による微生物の同定法」の日局導入には、回答を寄せた全企業が賛成で

あった。

2. 2001年12月、ドイツケルン市で開催されたISO/TC198/WG9会議で「ろ過滅菌法」がFDIS (Final Draft for International Standard)に格上げされた。これを踏まえて、日局参考情報へ収載するための素案作成を行った(添付資料2及び分担研究者:曲田純二氏の研究報告書)。
3. 日米欧薬局方の国際調和会議PDG (Pharmacopoeial Discussion Group)で製薬用水を国際調和することになった。そこで、日本製薬団体連合会を通じて製薬企業に、製薬用水の製造及び品質管理に関するアンケートを実施中である。また、日局参考情報収載を目指し「製薬用水の製造及び品質管理」に関する素案を作成した(添付資料3)。
4. 日本公定書協会主催「医薬品の品質確保をめぐる諸問題」についての研修会並びにスイスバーゼル市で開催されたPDA国際会議で「高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース」について紹介した(添付資料4)。

#### D. 考 察

1. 医薬品製造において、高度な無菌性の要求される試験(無菌試験、培地充填試験等)や工程(充填工程、ろ過滅菌工程、凍結乾燥工程等)で検出された菌については、同定が必要である。細菌種については16SrRNA、カビについてはITS1の塩基配列の一部を解読し、データベースと照合することによって確率の高い順に菌種を絞り込むことができた。従来の形質表現法をベースにした同定法では客観性に乏しい結果

であったが、遺伝子解析による同定法は従来法に比べ、客観的かつ短時間に成績の出るのが魅力である。

2. ろ過滅菌フィルターのパフォーマンスに関しては、HIMA (Health Industry Manufacturers Association)、ASTM (American Society for Testing and Materials)、FDA、EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Product)、MCA (Medicine Control Agency)、PDA (Parenteral Drug Association)等、業界や学術団体、欧米の行政当局から多くの指針が出されてきた。何れも歴史的に価値のあるものであるが、国際化、国際調和の流れの中でISO規格が注目されている。ISO/TC198WG9では、現在、ヘルスケア製品(医薬品、医療用具、体外診断薬等の総称)の無菌製造法で重要な工程(ろ過滅菌法、凍結乾燥法、SIP/CIP、アイソレータ/バリアシステム等)について国際規格を作成中である。「ろ過滅菌法」は、これまで5回の会議(バンクーバー、東京、ロンドン、ベルリン、ケルン)を経て、今年FDIS (Final Draft for International Standard)になった。国際規格(ISO)になる目処もついたので、本国際規格の概略を日局参考情報に収載する方向で素案を作成した。
3. 製薬用水の日局モノグラフは過去10年以上改正していない。製薬用水は医薬品の品質に影響を及ぼす最も重要な要素であり、その製造管理手法及び品質規格の見直しが必要である。第一年度研究事業として、日局参考情報に収

載予定の「製薬用水の製造及び品質管理」案を作成した。

4. パラメトリックリリース (PR) 導入に関する製薬企業の腰は重い。オーバーキル法で製した製薬用水に無菌試験を適用し、出荷する姿勢は問題である。今後は、新規に製造承認申請する高圧蒸気滅菌医薬品に対しては、PR申請させること、また既承認医薬品については、5年くらいの間に来るだけPRに移行させるよう行政的にも対応が必要である。

## E. 結 論

「遺伝子解析による微生物の同定法」では、真菌の同定結果は細菌に比し低い、形質表現法による同定法よりは客観性があり、成績の出るのも早い。カビからのDNA抽出法に関して若干修正の上、日局参考情

報への導入を目指したい。「ろ過滅菌法」については、日局参考情報に記載されている「最終滅菌法及び滅菌指標体」から「ろ過滅菌法」を切り離し、新しいモノグラフとして参考情報導入を目指したい。製薬用水に関しては当面、日局「注射用水」の製法が、USP/EPの注射用水の規格に合致するものかどうか、アンケート結果及び専門家の意見を参考に見極め、国際調和作業において日局の考えを示したい。また、日局参考情報に「製薬用水の製造及び品質管理」のモノグラフ導入を目指す。高圧蒸気滅菌医薬品を製造している製薬企業へパラメトリックリリースをスムーズに導入させるための努力を今後とも続けたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 佐々木次雄：日本薬局方における微生物管理試験法の動向、医薬品研究、32 (6): 453-462, 2001.
2. 佐々木次雄、棚元憲一：「ろ過滅菌法」の日局導入に関する研究、医薬品研究、32 (12): 814-819, 2001.
3. 佐々木次雄：高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース、医薬品研究、33 (2): 173-182, 2002.
4. 佐々木次雄：無菌性保証と第14改正日本薬局方、JAAME News 25 (September): 29-36, 2001.
5. 佐々木次雄：製剤通則(6)パラメトリックリリースについて、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.8, 2001.
6. 佐々木次雄：無菌試験法、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.224-228, 2001.
7. 佐々木次雄：最終滅菌医薬品の無菌性保証、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.270-271, 2001.
8. 佐々木次雄：滅菌法及び無菌操作法、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.263, 2001.
9. 佐々木次雄：培地充填試験法、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.285-287, 2001.

- 1 0. 佐々木次雄：非無菌医薬品の微生物学的品質特性、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.297-299, 2001.
  - 1 1. 佐々木次雄：最終滅菌法及び滅菌指標体、第十四改正日本薬局方解説書、廣川書店、p. F37-F60, 2001.
  - 1 2. 佐々木次雄：培地充てん試験法、第十四改正日本薬局方解説書、廣川書店、p. F74-F85, 2001.
  - 1 3. 佐々木次雄：非無菌医薬品の微生物学的品質特性、第十四改正日本薬局方解説書、廣川書店、p. F102-F110, 2001.
2. 学会発表
1. Tsuguo Sasaki: Parametric release for moist heated pharmaceutical products in Japan. PDA International Congress. 11 February 2002, Basel.
  2. 佐々木次雄：高圧蒸気滅菌医薬品に対するパラメトリックリリース、日本公定書協会主催「医薬品の品質確保をめぐる諸問題」、平成 13 年 7 月 24 日（東京）、27 日（大阪）。
  3. 佐々木次雄：パラメトリックリリースの現状と将来について、日本防菌防黴学会主催「第 17 回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム」、平成 14 年 3 月 8 日、東京。

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

添付資料 1

日本薬局方参考情報に導入予定の「遺伝子解析による微生物の同定法」の評価に関する研究

1. 生物試験法委員会で審議中の「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」  
Version 2
2. Version 2 ドラフト評価研究への協力依頼書
3. 評価研究参加企業及び担当者リスト
4. 評価研究成績の記入書
5. 「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」の概略説明スライド

**概要説明：**現在、評価研究参加企業において本法の評価研究を続行中である。  
得られた成績については来年度報告する。

## 遺伝子解析による微生物の迅速同定法

(1<sup>st</sup> version : 2001年6月11日)

(2<sup>nd</sup> version : 2001年12月21日)

医薬品の製造工程管理試験や出荷判定試験において検出される微生物（細菌及び真菌）を遺伝学的に種又は属レベルに同定又は推定する手法を示す。無菌試験や無菌製造工程で検出された汚染微生物の同定は、汚染原因の究明に役立つ。また医薬品製造区域や医薬品原料等から検出される微生物の種類を知っておくことは、微生物学的に安全な医薬品を製造する上で重要である。微生物の同定法は、微生物固有の形態や生理・生化学性状、菌体成分の解析等を組み合わせて、分類階級の上位から下位に進めていく表現形質法が広く用いられてきた。表現形質による微生物同定用キットも数多く市販されているが、医薬品製造原料や環境から検出される微生物の中には、同定できないものも多い。また表現形質による同定法は、一般に術者の専門知識が必要な上、同定結果の客観性に欠ける。微生物の進化の歴史はリボゾーム RNA に記録されており、微生物の分類学においてもこの記録をもとに、系統発生的に区分する手法がとられている。本法は、細菌に対しては、16S rRNA の高度可変領域の一部、真菌に対しては 18S rRNA と 5.8S rRNA 間のスペーサー領域 (ITS1) の遺伝子配列を自動解析し、データベースと照合することによって微生物を迅速に同定又は推定する手法を示す。尚、本法に示した方法は、用いる装置や材料、術者の経験などによって変更可能である。また、本法に示した以外の遺伝子領域も使用可能である。

### 装置及び材料

#### 1. 装置

##### 1.1 DNA 自動解析装置

ゲル板法やキャピラリー法など、種々の機種が汎用されている。身近に装置が無い場合や取り扱いに慣れていない場合には、被検試料の処理を行い、装置所有者に解析をお願いした方がよい。

##### 1.2 核酸増幅装置

被検菌の標的 DNA の増幅 (PCR) 及び PCR 産物をシーケンス試薬で蛍光標識するための装置。

##### 1.3 比色計

260 nm 波長で PCR 産物の DNA 量を測定する。アガロースゲル電気泳動で増幅 DNA 量を推定できる場合は不要。

#### 1.4 アガロースゲル電気泳動装置

PCR 産物の確認に使用。

#### 1.5 マルチヒーター

1.5 mL の遠心チューブを 100°C で加熱できるもの。

## 2. 試液、器具

### 2.1 TE 緩衝液

1M Tris-HCl (pH 8.0) 1.0 mL、0.5 M EDTA-2Na 0.2 mL に滅菌水を 99 mL 加える。

### 2.2 被検菌処理液

Triton X-100 を 1% 含む TE 緩衝液を小分けし、使用時まで凍結保存。

### 2.3 核酸増幅 (PCR) 反応液\*

10 倍濃縮反応緩衝液	5 $\mu$ L
1mM dNTP 混合液	4 $\mu$ L
30 $\mu$ M センスプライマー	1 $\mu$ L
30 $\mu$ M アンチセンスプライマー	1 $\mu$ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (5U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L

滅菌蒸留水 (検体を加えて全量が 50  $\mu$  L になるようにする)

\* 10 倍濃度反応緩衝液、dNTP 混合液、耐熱性 DNA ポリメラーゼを予め混合したものも市販されている。

### 2.4 シークエンス試薬

シークエンス方式には、プライマーを標識するダイプライマー (dye-primer) 法、ddNTP ターミネーターを標識するダイターミネーター (dye-terminator) 法など、種々の方法がある。DNA 自動解析装置に合った適切な試薬キットを購入する。

### 2.5 TAE 緩衝液 (50 倍濃縮液)

~~Tris base 242 g、酢酸 57.1 mL、0.5M EDTA (pH 8.0) 100 mL、408 g、ホウ酸 55 g、EDTA-2Na 8.3 g~~ に水を加え、全量を 1,000 mL とする。

### 2.6 アガロースゲル (PCR 産物の確認に使用)

Agarose 1.5 g に TAE 緩衝液 (50 倍濃縮液) 2 mL、エチジウムブロマイド (10 mg/mL) 10  $\mu$  L、精製水 100 mL を加えて電子レンジなどで溶解する。溶解後、60°C 位に冷やしてからゲル板を作製する。

### 2.7 ローディング緩衝液 (6 倍濃縮液)

Bromophenol blue 0.25g, xylene cyanol 0.25g, glycerol 30 mL, EDTA-2Na 1.63 g に水を加え、全量を 100 mL とする。

## 2.8 PCR 産物の精製チューブ

未反応のプライマーやヌクレオチドを除くために用いる。PCR 産物の精製には、適当な DNA 回収用フィルター付遠心チューブが便利である。

## 2.9 プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	800R	5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC -3'
真菌	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCCTTCATCGATG-3'

## 操作法

1. 同定しようとする細菌又は真菌は純培養が~~タローニング~~されていることが重要である。被検菌がコロニーの場合は、1.5 mL 遠心チューブに被検菌処理液を約 0.3 mL 入れ、これに滅菌竹串などでコロニーの一部をとり懸濁させる。被検菌が液体培養物の場合は、1.5 mL 遠心チューブに培養物を約 0.5 mL とり、10,000 rpm で 10 分間遠心後、上清を除去し、沈渣に被検菌処理液を約 0.3 mL 入れる。マルチヒーターを用い、100°C で 10 分間加熱する。
2. 核酸増幅反応液に加熱処理した菌液の上清を 2  $\mu$ L 加え、細菌の場合は 10F/800R プライマーセット、真菌の場合は ITS1F/ITS1R プライマーセットを用いて PCR を行う (94°C で 30 秒、55°C で 60 秒、72°C で 60 秒を 30 サイクル)。PCR がかかりにくい場合には、加熱処理した菌液から DNA を抽出した上で、PCR を行った方がよい。
3. PCR 産物の 5  $\mu$ L を 1  $\mu$ L のローディング緩衝液と混合し、1.5%アガロースゲルにアプライし、TAE 緩衝液 (1 倍濃度) を用いて電気泳動する。泳動後、紫外線照射下で観察し、鮮明な 1 本のバンドが得られていることを確認する。複数のバンドが確認された場合には、主要バンドを切り出し、適当な市販 DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出が必要である。
4. PCR 産物から未反応物 (dNTP やプライマーなど) を除去する。PCR 産物に TE 緩衝液を加え、全量を約 350  $\mu$ L にする。これを DNA 回収用フィルター付遠心チューブに入れ、7,000 rpm で約 8 分間遠心する。ろ液を除いた後、フィルターカップに TE 緩衝液を約 350  $\mu$ L 入れ、再度同一条件で遠心する。本操作を更に 1~2 回繰り返す。フィルター膜を 20  $\mu$ L の滅菌蒸留水でよく洗い、PCR 産物を回収する。
5. 精製 DNA 量を比色計で測定する場合には、 $10D_{260\text{ nm}} = \text{33}$  ~~33~~ 50  $\mu$ g/mL で計算す

る。アガロースゲル電気泳動のバンド濃度からも DNA 量を推測できる。

6. DNA 解析装置又はそのプログラムに合った蛍光標識シーケンス試薬を購入し、使用説明書に基づいて PCR 産物を標識する。その一例を示す。

水	9 $\mu$ L
蛍光標識シーケンス試薬	8 $\mu$ L
プライマー*1	1 $\mu$ L
精製 PCR 産物 (DNA 量 : 30-90 ng/2 $\mu$ L)	2 $\mu$ L

- ① PCR に用いたプライマーのうち、通常はセンスプライマー (F) を用い、5'  $\rightarrow$ 3' の方向に蛍光標識する。別途、アンチセンスプライマー (R) も用い、3'  $\leftarrow$ 5' の方向に蛍光標識することもできるが、データベースに照合する場合には、配列を逆転する必要がある。

7. 核酸増幅装置を用いて蛍光標識シーケンス反応を行う。その一例を示す。

96°C	10 秒
50°C	5 秒
60°C	4 分

25 サイクル

8. 1.5 mL 遠心チューブに 70%エタノールを 75  $\mu$ L 入れ、反応終了物を移す。氷中に 20 分間放置後、15,000 rpm で 20 分間遠心する。遠心終了後、上清を除去し、再度、70%エタノールを 250  $\mu$ L 加え、15,000 rpm で 5 分間遠心する。上清を除去し、遠心濃縮器で乾燥させる。遠心濃縮器がない場合には、自然乾燥でもよい。
9. DNA 解析装置やシーケンス試薬に合った方法で処理した試料を DNA 解析装置にセットし、塩基配列を読み取る。読み取った塩基配列の一部をインターネット (例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) で BLAST データベースに照合する。

## 判 定

可能な限り、正確に読みとった塩基配列をデータベースと照合することが望ましいが、読みとれなかった塩基や誤って読みとった塩基があってもよい。一般に、読みとった塩基とデータベースとが 90%以上合致した場合、以下のように判定できる。

1. 細菌の場合は、10F プライマーで読み取った最初から 50~350 領域の約 300 塩基を BLAST 照合し、上位にランクされた菌種を被験菌と同一種又は近縁種と判定する。
2. 真菌の場合は、ITS1 プライマーで読み取った領域を可能な限り BLAST に

照合し、上位にランクされた菌種を被験菌と同一種又は近縁種と判定する。

「遺伝子解析による微生物の同定法」評価研究に参加される皆様へ

担当者：\_\_\_\_\_

企業名：\_\_\_\_\_

試料送付住所：〒\_\_\_\_\_

電 話：\_\_\_\_\_

e-mail：\_\_\_\_\_

1. 菌株送付希望時期（希望時期をお示し下さい。送付前に連絡を入れます）

平成13年11月～平成14年3月の中で

平成\_\_年\_\_月の（上旬、中旬、下旬）

2. 菌株送付時に必要な試料がありましたらお知らせ下さい。

PCR primer

PCR 用試薬

菌処理液（1% TrytonX-100 含 TE buffer）

Dye-terminator（種類をお知らせ下さい）

3. シークエンス実施

所属企業内で行う

外部委託する

▶ KK ベックスに委託する

▶ その他の受託機関に委託する

KK ベックスに委託する場合には、委託件数に関わらず、1 検体 5,000 円とし、差額は厚生科学研究費から支払う方向で検討させていただきます。また、必要でしたら上記第 2 項に掲げました試薬類も厚生科学研究費から支出させていただきます。

国立感染症研究所

佐々木次雄 (sasaki@nih.go.jp)

# NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES

4-7-1 GAKUEN, MUSASHIMURAYAMA

TOKYO 208-0011, JAPAN

Tel. +81-42-561-0771

Fax. +81-42-565-3315

遺伝子解析による微生物の同定法に関する評価研究

参加者各位殿

拝啓

時下、ますます御健勝にてご活躍のこととお慶び申し上げます。

さて、このたびは、標記研究にご参加下さいましてありがとうございました。

以下の試料及び資料をお送りします。

## 試料:

1. 微生物10種類(細菌5種、真菌5種)
2. PCR primer: 10F/800R(細菌用)、ITS1F/ITS1R(真菌用)、各 500  $\mu$  L/tube
3. Taq polymerase(10倍濃縮液、dNTPが既に含まれていますので、以下のようにお使い下さい)。

Taq polymerase            25  $\mu$  L

WFI(水)                    22  $\mu$  L

Primer (Forward)        1  $\mu$  L

Primer (Reverse)        1  $\mu$  L

Template                    1  $\mu$  L

1検体(1チューブ当たり)

4. 被検菌処理液(Triton X-100を1%含むTE緩衝液)

到着後、2-4は凍結保存して下さい。1の菌株は、増殖が不十分な場合には、細菌については30-35°C、真菌については25-30°Cで培養後、適当な方法で保存して下さい。尚、本法で同定する場合には、死菌でも構いません。

## 資料:

1. 日局参考情報への収載を検討している「遺伝子解析による微生物の迅速同定