

法」ドラフト。 本ドラフトに沿って、同定作業を行って下さい。

2. 医薬品製造所から検出される微生物の同定法(鳴瀧壮二著)
3. 遺伝子解析による細菌の同定法(佐々木次雄著)
4. 班員名簿

他:

1. 別途、メールにて検査結果記入書をお送りしますので、結果はそれにご記入願います。
2. PCR 産物をベックス社にお願いする場合には、本研究班員であることを明記の上、冷凍又は冷蔵で下記にお送り下さい(1件、5,000 円)。

株式会社 ベックス シークエンス担当:海老原様・小林様

〒173-0004 東京都板橋区板橋 2-61-14

TEL., 03-5375-1071

FAX., 03-5375-5636

bex@bird.mbird.ne.jp

3. 同封資料を参考に同定作業を行い、技術的疑問点が生じた場合には、下記までご連絡下さい。

佐々木次雄:sasaki@nih.go.jp

鳴瀧壮二:narutaki@ono.co.jp

以上、宜しくお願い致します。

敬具

平成 13 年 12 月 4 日

国立感染症研究所

佐々木次雄

平成 13 年 10 月 10 日

東京医薬品工業協会
大阪医薬品協会
技術(研究)常任委員会

研究協力依頼書

拝啓

秋冷の候、ますますご清祥のこととお喜び申し上げます。

日本薬局方調査会「生物試験法委員会」活動には、日頃より多大のご協力をいただきましてありがとうございます。さて、生物試験法委員会では、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として「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を検討中です。これは、現在までに登録されている約 770 属 5,000 菌種にも及ぶ細菌の同定を、これまでの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で行うには、無理があるためです。そこで、提案ドラフト「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」の評価研究への参加協力をお願いいたします。研究内容は、以下の通りです。

記

- | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 研究実施期間 | 平成 13 年 12 月～平成 14 年 3 月 31 日 |
| 2. 研究参加企業 | 約 10 社を目指しております |
| 3. 研究事業費 | なし |
| 4. 研究発表 | 参加企業名及び実施者連名で「医薬品研究」に発表 |
| 5. 研究方法 | ブラインド方式で細菌 5 種、真菌 5 種を研究参加企業にお送りします。その際には、成績フォーマットも同時にお送りします。 |
| 6. 他 | DNA Sequencer が無くても PCR 産物の Sequence を受託で行ってくれる会社もあります（例えば、KKベックス；Tel: 03-5375-1071, e-mail: bex@bird.mbird.ne.jp ） |

敬具

日本薬局方調査会生物試験法委員
国立感染所研究所安全性研究部
佐々木次雄

(資料1) 評価研究参加企業

企業名	担当者	試料送付住所	電話、e-mail
エーザイ株式会社	池内孝之	〒501-6195 岐阜県羽島郡川島町竹早町1 エーザイ(株)分析研究所 製剤分析室	058689-4709 t-ikeuchi@hhc.eisai.co.jp
中外製薬株式会社	岩切昭二 梅北和英	〒115-8543 東京都北区浮間5-5-1 中外製薬(株)浮間事業所 分析技術研究所	03-3968-6155 iwakirisuj@chugai-pharm.co.jp umekitakzh@chugai-pharm.co.jp
田辺製薬株式会社	高橋栄二	〒532-8505 大阪市淀川区加島3-16-89 田辺製薬(株)製品技術研究所	06-6300-2634 e-taka@tanabe.co.jp
大日本製薬株式会社	川井真好	〒553-0001 大阪市福島区海老江1-5-51 大日本製薬(株)品質管理部微生物管理室	06-6454-8168 mako-kawai@dainippon-pharm.co.jp
塩野義製薬株式会社	室井哲夫	〒660-0813 兵庫県尼崎市杭瀬寺島2-1-3 塩野義製薬(株)生産技術研究所	06-6401-8309 tetsuo.muroi@shionogi.co.jp
小野薬品工業株式会社	鳴瀧壮二	〒618-8585 大阪府三島郡島本町桜井3-1-1 小野薬品工業(株)水無瀬総合研究所製剤研究所	075-961-1151 narutaki@ono.co.jp
藤沢薬品工業株式会社	田子森賢一 岡島敏広	〒532-8514 大阪市淀川区加島2丁目1番6号 藤沢薬品工業(株)物性研究所分析研究4	06-6390-1176 kenichi_tagomori@po.fujisawa.co.jp toshihiro_okajima@po.fujisawa.co.jp
三菱ウェルファーマ株式会社	萱原秀信	〒573-0034 大阪府高槻市大塚町4-1-2-1 三菱ウェルファーマ(株)淀川工場 品質管理部	0726-61-7586 Kayahara.Hidehideo@mg.m-pharma.co.jp

明治製菓株式会社	刑部 章子 國定 孝夫	〒222-8567 横浜市港北区師岡町 760 明治製菓(株) 薬品総合研究所 物性研	045-545-3186 akiko_gyobu@meiji.co.jp takao_kunisada@meiji.co.jp
持田製菓株式会社	伊藤 千鶴子	〒426-8640 静岡県藤枝市源助 342 持田製菓静岡工場 品質管理部	054-636-7039 t_itou@mochida.co.jp
富山化学工業株式会社	山城 芳子	〒930-8508 富山市下奥井 2-4-1 富山化学工業(株) 品質管理部	076-431-8231 Yoshiko_Yamashiro@toyama-chemical.co.jp

企業名	試料送付希望	シーケンス	PCR primer	PCR 用試薬	菌処理液	Dye-terminator
エーザイ(株)	1 2月中旬	KK ベックス	○	○	○	○
中外製薬(株)	1 2月中旬	企業内で実施	○		○	○
田辺製薬(株)	1 2月上旬	企業内で実施	○		○	
大日本製薬(株)	1 2月中旬	KK ベックス	○	○	○	○
塩野義製薬(株)	1 2月上旬	KK ベックス	○			
小野薬品工業(株)	1月下旬	企業内で実施				
藤沢薬品工業(株)	1 2月上旬	企業内で実施	○	○	○	○
三菱ウェルファーマ(株)	1 1月下旬	企業内で実施	○	○	○	
明治製菓(株)	1 1月下旬	企業内で実施	○	○	○	
持田製薬(株)	3月下旬	企業内で実施	○	○	○	
富山化学工業(株)	3月上旬	企業内で実施	○	○		

遺伝子解析による微生物の同定法

— 結果記入用紙 —

企業名: _____

回答者: _____

e-mail: _____

1. 一般質問

- 1) 貴社で、過去3年以内に細菌の同定を行ったことがありましたか？
 - あった
 - なかった

- 2) 細菌の同定を行う必要があった企業にお聞きします。どこで同定を行いましたか？
 - 自社内で行った
 - 外部に委託した

- 3) 自社で同定を行った企業にお聞きします。同定結果に自信はありましたか？
 - 自信あった
 - 自信なかった

- 4) 外部に同定依頼した企業にお聞きします。同定結果は信用できましたか？
 - 信用できた
 - 信用せざるをえなかった
 - 信用できなかった

- 5) 自社で細菌同定を行っている企業にお聞きします。結果を出すまで、通常、どの位の期間が必要ですか？
 - 1週間以内
 - 1～2週間
 - 2～4週間
 - 1ヶ月以上

- 6) グレードAのクリーンルームや無菌試験、培地充填試験等で検出された汚染菌についてはどの程度まで同定又は性状検査を行っていますか？
 - 種レベルまで調べる
 - 属レベルまで調べる

- 近縁属が含まれるグループまで調べる
- グラム染色、コロニー形態、簡単な生化学試験程度
- その他 ()

7) 汚染菌の同定、性状検査に係わっている担当者数についてお聞きします。

- 1～2人
- 3～4人
- 5人以上

2. 遺伝子解析法について

1) 貴社で、細菌の同定に遺伝子解析法を適用したことはありますか？

- ある
- ない

2) 微生物検査部門の方にとって PCR は馴染みのある装置でしたか？

- 馴染みのある装置であった
- 馴染みのない装置であった

3) 今回、微生物遺伝子に対して、PCR はどこで行いましたか？

- 品質管理部門
- 他部門 (研究所等)
- 外部に委託 ()

4) PCR 操作では、どのような感想をお持ちですか？ (複数回答可)

- 細菌に関しては、Triton X-100 含 TE 緩衝液での加熱処理で十分であった
- 真菌に関しては、Triton X-100 含 TE 緩衝液での加熱処理で十分であった
- 細菌に関しては、更に DNA 抽出操作が必要であった
- 真菌に関しては、更に DNA 抽出操作が必要であった

5) PCR 産物の確認後、PCR 産物を精製し、DNA 量を測定しましたか？

- OD260 の紫外波長で DNA 量を測定してからシーケンス反応を行った
- 経験的に DNA 量を推定できたので、測定せずシーケンス反応を行った

6) シーケンス反応及びシーケンスはどこで行いましたか？

- 品質管理部門
- 他の部門 (研究部門等)
- 外部に委託 ()

7) シークエンスデータからの菌種推定をどこで行いましたか？

- 品質管理部門
- 他の部門（研究部門等）
- 外部に委託（）

8) 遺伝子解析による微生物同定法についてどのような感想をお持ちですか？（複数回答可）

- 操作が煩雑でついていけない
- データの信頼性に欠ける
- これまでの方法に比べ、1 検体当たりの価格が高すぎて導入が難しい
- 操作に慣れれば簡単な方法である
- これまでの方法に比べ、データの信頼性が高い
- 短時間で結果が出るので魅力のある方法である
- これまでの方法に比べ、1 検体当たりの価格は安いかも知れない

10) 貴社では、本法を微生物の同定法として導入したいと思いますか？

- 導入したい
- 導入したいとは思わない

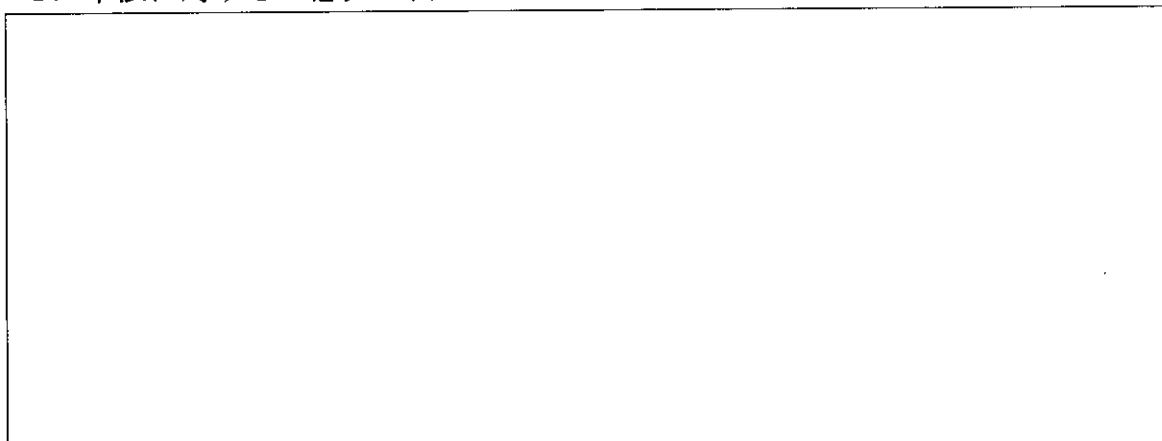
11) 日本薬局方参考情報への本法の導入についてお聞きします。

- 導入に賛成
- 導入に反対
- 分からない

3. 下記表に検査結果をご記入下さい。

番号	第一候補菌種	第二候補菌種	第三候補菌種

4. 本法に対するご意見を何なりとお聞かせ下さい。



研究協力に感謝申し上げます。 研究成果は、医薬研究に発表させていただきます。

工一	中外	田辺	大日	塩野	小野	藤沢	三菱	明治	持田	富山	
68	81	94	107	120	1	14	27	40	53	66	細 1
80	93	106	119	11	13	26	39	52	65	67	細 2
92	105	118	10	12	25	38	51	64	77	79	細 3
104	117	9	22	24	37	50	63	76	78	91	細 4
116	8	21	23	36	49	62	75	88	90	103	細 5
7	20	33	35	48	61	74	87	89	102	115	細 6
19	32	34	47	60	73	86	99	101	114	6	真 1
31	44	46	59	72	85	98	100	113	5	18	真 2
43	45	58	71	84	97	110	112	4	17	30	真 3
55	57	70	83	96	109	111	3	16	29	42	真 4
56	69	82	95	108	121	2	15	28	41	54	細 5

- 細 1 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
細 2 : *Serratia marcescens* ATCC 8100
細 3 : *Micrococcus luteus* ATCC 10240
細 4 : *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
細 5 : *Bacillus subtilis* ATCC 6633
細 6 : *Streptococcus faecalis* ATCC 10541
真 1 : *Penicilium expansum* IFO 7604
真 2 : *Syncephalastrum racemosum* IFO 4828
真 3 : *Aspergillus niger* IFO 9455
真 4 : *Candida krusei* IFO 1395
真 5 : *Saccharomyces cerevisiae* IFO 10647

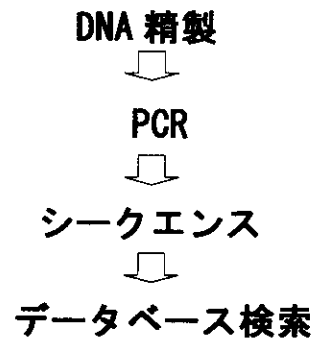
評価研究参加企業と担当者

- エーザイKK: 池内孝之
- 中外製薬KK: 岩切昭二、梅北和英
- 田辺製薬KK: 高橋栄二
- 大日本製薬KK: 川井真好
- 塩野義製薬KK: 室井哲夫
- 小野薬品工業KK: 鳴瀧壮二
- 藤沢薬品工業KK: 田子森賢一、岡島敏広
- 三菱ウエルファーマKK: 萱原秀信
- 明治製菓KK: 刑部章子、国定孝夫
- 持田製薬KK: 伊藤千鶴子
- 富山化学工業KK: 山城芳子

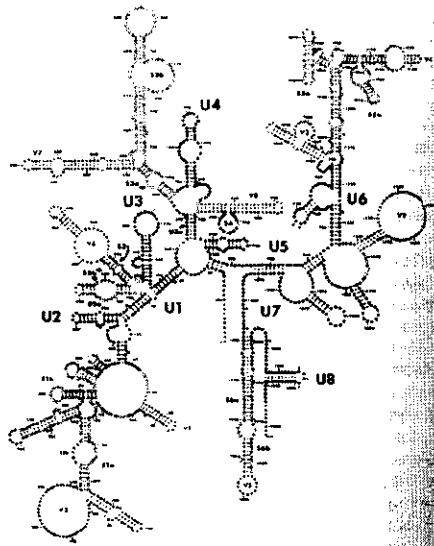
PCR及びSequencingに用いた プライマー

微生物	Primers	塩基配列
細菌	10F 800R	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3' 5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
真菌	ITS1F ITS1R	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3' 5'-CGTTC TTCATCGATG-3'

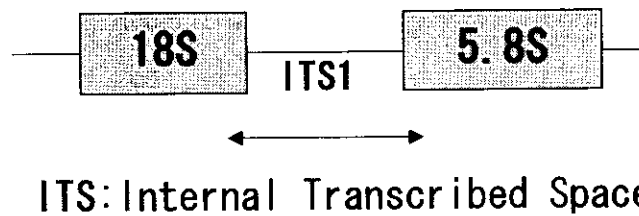
遺伝子配列の相同性による同定



16SrRNA遺伝子の二次構造

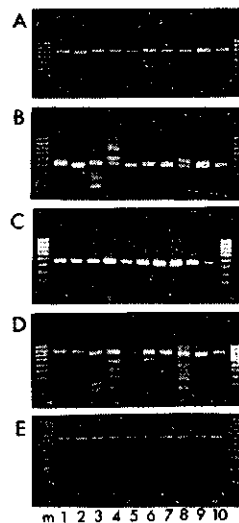


Ribosomal DNA unit amplified and sequenced (Fungi)



細菌種に対するPCR

- PCR primer sets
- A: 10F/800R,
- B: 10F/525R, C: 525F/1050R,
- D: 525F/1500R, E: 800F/1500R
- Lanes
- 1: *Bacillus subtilis*,
- 2: *Clostridium sporogenes*,
- 3: *Escherichia coli*,
- 4: *Klebsiella pneumoniae*,
- 5: *Micrococcus luteus*,
- 6: *Proteus vulgaris*,
- 7: *Salmonella typhimurium*,
- 8: *Serratia marcescens*,
- 9: *Staphylococcus aureus*,
- 10: *Staphylococcus epidermidis*
-



異属間でのITS1の相同性比較

```

Aspergillus niger      1:  47
Candida albicans      1:  43
Penicillium aurantiovi 1:  47
Rhizopus oryzae      1:  46

Aspergillus niger      48:  88
Candida albicans      44:  78
Penicillium aurantiovi 48:  86
Rhizopus oryzae      47:  98

Aspergillus niger      89:  137
Candida albicans      79:  109
Penicillium aurantiovi 87:  132
Rhizopus oryzae      99:  140

Aspergillus niger      138:  184
Candida albicans      110:  140
Penicillium aurantiovi 133:  173
Rhizopus oryzae      141:  189

Aspergillus niger      185:  236
Candida albicans      141:  189
Penicillium aurantiovi 174:  226
Rhizopus oryzae      190:  245

Aspergillus niger      237:  249
Candida albicans      190:  203
Penicillium aurantiovi 227:  239
Rhizopus oryzae      246:  257
    
```

アスペルギルス属のITS1相同性比較

```

Aspergillus aculeatus 1:  55
Aspergillus fumigatus 1:  53
Aspergillus niger      1:  53
Aspergillus oryzae    1:  57
Aspergillus wentii    1:  53

Aspergillus aculeatus 56:  102
Aspergillus fumigatus 54:  106
Aspergillus niger      54:  109
Aspergillus oryzae    58:  107
Aspergillus wentii    54:  109

Aspergillus aculeatus 103:  154
Aspergillus fumigatus 107:  163
Aspergillus niger      110:  163
Aspergillus oryzae    108:  159
Aspergillus wentii    110:  163

Aspergillus aculeatus 155:  211
Aspergillus fumigatus 164:  219
Aspergillus niger      164:  220
Aspergillus oryzae    160:  216
Aspergillus wentii    164:  220

Aspergillus aculeatus 212:  219
Aspergillus fumigatus 220:  227
Aspergillus niger      221:  228
Aspergillus oryzae    217:  224
Aspergillus wentii    221:  228
    
```

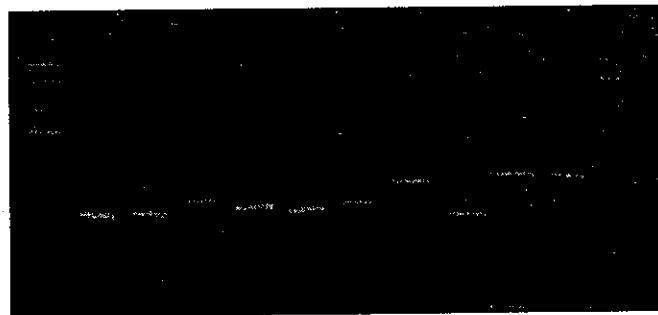
ITS1による候補菌の検索結果例

Candida tropicalis IF01402

<i>Candida tropicalis</i> 18S ribosomal RNA gene, ...	432
<i>Candida tropicalis</i> 18S ribosomal RNA gene, ...	412
<i>Candida tropicalis</i> 18S ribosomal RNA gene, ...	377
<i>C. albicans</i> gene for 5.8S ribosomal RNA and ...	143
<i>Candida albicans</i> 18S rRNA (partial), 5.8S r...	123
<i>Candida albicans</i> 18S ribosomal RNA gene, pa...	123
<i>Candida dubliniensis</i> 18S rRNA (partial), 5...	121
<i>Candida dubliniensis</i> 18S rRNA (partial), 5...	121
<i>Candida albicans</i> genes for 18S rRNA, ITS1, ...	121
<i>Candida albicans</i> genes for 18S rRNA, ITS1, ...	121

PCR産物の確認

500bp →
300bp →
150bp →
50bp →



Lanes; M: 50, 150, 300, 500, 750, 1000, 1500, and 2000bp,
1: *M.ruber*, 2: *P.raistrickii*, 3: *D.dematioidea*, 4: *S.racemosum*,
5: *P.spinulosum*, 6: *R.oryzae*, 7: *K.apiculata*, 8: *C.rugosa*,
9: *S.cerevisiae*, 10: *A.corymbifera*, and M: markers.

同定精度

方法 同定し ベル	バイオログ ¹			遺伝子配列の相同性		
	属	種	未同定	属	種 ²	未同定
細菌	74% (26/35)	37% (13/35)	11% (4/35)	92% (36/39)	59% (23/39)	3% (1/39)
真菌	—	—	—	67% (2/3)	33% (1/3)	—

¹: 遺伝子配列の相同性の結果と一致したものを正確な同定と判断

²: 1種類の種まで絞れたもの

カッコ内は株数(正確な同定株数/実施株数)

菌種同定結果(中間報告)

各菌種の同定順位

菌種	A社	B社	C社	D社	E社
細菌1	1	2	1	1	1
細菌2	1	1	2	1	2
細菌3	3	4	2	1	4
細菌4	1	1	1	1	2
細菌5	1	1	2	1	1
酵母1	1	1	1		1
カビ1	< 3	< 3	< 3		< 3
カビ2	1	1	1		1
カビ3	2	2	< 3		
カビ4	1	1	1		1

日本薬局方参考情報に導入予定の「ろ過滅菌法」の素案 作成に関する研究

1. 「ろ過滅菌法」の日局導入に関する研究
2. ISO/TC198/WG9 “Aseptic processing of health care products”
(ISO 13408)国際会議報告書
3. ISO/DIS 13408-2 ドラフト

概要説明:平成 13 年 12 月にドイツケルン市で開催された ISO/TC198/WG9 国際会議で修正した「ろ過滅菌法」に関する国際規格ドラフト (ISO/DIS 13408-2) は、現在、FDIS (Final Draft for International Standard) に格上げするための事務的手続きがとられている。平成 14 年度中には ISO 規格として公布される予定である。これを受け、分担研究者の曲田氏と共同で、日本薬局方参考情報に収載されている「最終滅菌法及び滅菌指標体」を見直し、「ろ過滅菌法」を独立したモノグラフとする予定である。

(資料2)

「ろ過滅菌法」の日局導入に関する研究

研究要旨

日本薬局方に滅菌法が導入されたのは昭和7年である。以来、滅菌法は何度か改正されたが、第13改正第1追補(平成9年12月)で、それまで消毒法、殺菌法と混在していた滅菌法(Fig. 1)が大改正され、「最終滅菌法及び滅菌指標体」として独立した(Fig. 2)。滅菌法は微生物を死滅させる方法であるのに対し、ろ過法は微生物を除去する方法であるが、それまでの経緯もあり、ろ過法も「最終滅菌法及び滅菌指標体」中に収載された。「バリデーション基準について(平成7年厚生省薬務局長通知)」でも、無菌操作法で製される医薬品の重要工程としてろ過工程、充填工程、凍結乾燥工程、無菌操作法を掲げており、中でもろ過滅菌工程は医薬品の無菌性を保証する上で最も重要な工程と言える。

メンブレンフィルターによるろ過滅菌は、種々のろ過材の開発やろ過システムの完全性確認の自動化等に伴い、1970年代以降急速に進歩を遂げてきた。しかし、近年、無菌ろ過フィルターとして用いられている0.2/0.22 μm フィルターを通過する微小細菌の存在が確認され、0.1 μm フィルターの使用が望ましいとの議論もあり、日本薬局方としてもろ過滅菌用フィルター及びろ過システムに関する要件を示す必要が出てきた。そこで、日局「最終滅菌法及び滅菌指標体」から「ろ過法」を切り離し、1998年から作成作業が始まったろ過滅菌に関する国際規格(現在はISO/DIS 13408-2)を反映した「ろ過滅菌法」を日本薬局方参考情報に導入するための調査研究を行った。

1. ろ過法に関する行政指針と国際規格

ろ過滅菌フィルターの性能に関しては、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、業界団体、学術団体、欧米の行政当局から多くの指針が出されている(Table 1)。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/TC198は1990年に医療用具の滅菌に関する国際規格を作成するために発足した技術委員会(TC: Technical Committee)であるが、1992年よりヘルスケア製品(医薬品、医療用具、体外診断薬等の総称)の無菌製造法に関する国際規格を作成する作業グループ(WG: Working Group)を発足させ、筆者も1992年から作業グループに参画してきた。ヘルスケア製品の無菌製造法に関する一般要件を示した国際規格ISO 13408-1は、1998年に発行された。この中に示されている「培地充填試験法」は、第13改正日局参考情報(1996年)に導入されている。ISO 13408-1が発行される2年前のことであるが、その内容はISO 13408-1とほぼ同じである。ISO 13408-1は、ヘルスケア製品の無菌製造法に必要な概略しか示しておらず、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）については、それぞれ別個に国際規格を作成することになり、筆者がろ過滅菌法のドラフト作成責任者に指名された。これまで4回の会議（バンクーバー、東京、ロンドン、ベルリン）を経て、現在 DIS (Draft for International Standard)段階にあるが、国際規格 (ISO) になる目処もついてきたので、本国際規格の概略について述べる。

2. フィルターの選択にあたって

フィルター使用者は、ろ過する製品とろ過工程を考慮し、かつ文書化された評価計画に従ってフィルター特性を評価する。一般に、カートリッジフィルターの選択に当たり、フィルターメーカーから入手可能な情報及び ISO/TC198/WG9 に参加しているフィルターメーカー（ミリポア社、ポール社、ザルトリウス社）がほぼ共通してフィルターの各ロットに対する品質保証項目として提供できるデータを Table 2 に示す。

3. 工程特性を考慮したフィルターの選択

フィルター使用者は次にろ過する製品とフィルターとの適合性及び工程の特性を考慮に入れ、使用フィルターを決めなければならない (Table 3)。この際、ろ過による製品の立体構造変化（主に蛋白製剤）やフィルターへの製品の吸着性も考慮にいれなければならない。

4. ろ過滅菌工程の確立と検証

使用フィルターが決まったら、次にろ過滅菌工程パラメータを決め、その条件でろ過滅菌が問題なく行われるかどうかを確認しなければならない (Table 4)。ろ過滅菌工程のパラメータは一般に、フィルターメーカーの推奨条件に沿って決めることが多い。例えば、使用フィルターには酸化物質、有機物、粒子、ファイバー、エンドトキシン、その他の抽出物が含まれている可能性がある。そのため、薬液のろ過前にこれらの物質を取り除かなければならない。それが **Flushing** と呼ばれる操作である。その際、酸化物質の分析手法としては過マンガン酸還元試験、有機物については TOC 試験などを用いて **Flushing** 条件を決めることもできる。また、フィルター使用者は、ろ過システムの滅菌条件（滅菌時間、適用する滅菌条件下での累積滅菌時間）やろ過滅菌工程の種々のパラメータを予め決めておかなければならない。主なパラメータとしては、繰り返し滅菌による影響、調製薬液をろ過するまでの時間、調製薬液中のバイオバーデンの影響、ろ過時間、ろ過流速、ろ過量、ろ過温度、差圧などがある。Table 4 にはろ過滅菌工程のバリデーション時に考慮すべき事項を示す。

5. ろ過滅菌工程の日常管理

ろ過工程の日常管理項目及びバッチ記録に記載すべき事項を Table 5 に、ろ過滅菌に関わる作業員への教育訓練事項を Table 6 に示す。

6. ろ過滅菌工程管理試験：完全性試験

日局「最終滅菌法及び滅菌指標体」では、ろ過滅菌用フィルターとは「一般に、滅菌を目的とした滅菌用フィルターは、膜の有効ろ過面積 (cm²) 当たり、適切な条件下で培養された指標菌 *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146, IFO 14213, JCM2428) 又はこれより小さな適当な菌を 10⁷ 個以上チャレンジして、二次側に無菌のろ液の得られること」と述べている。また、完全性試験とは、「細菌チャレンジ試験によって測定されるフィルターのろ過滅菌性能を非破壊的な方法で予測することをいう」と定義している。すなわち、ろ過滅菌用フィルターとは指標菌 *Brevundimonas diminuta* でその有効性が証明されるものを言うが、細菌チャレンジ試験は破壊試験であるので、非破壊的な方法である「完全性試験」でろ過滅菌用フィルターとしての性能を確認しなければならない。Table 7 には、主な完全性試験法の原理、完全性試験を実施するにあたって必要な SOP 事項、完全性試験の不合格原因として考えられること、完全性試験を実施する段階とそれらの問題点について示す。一般に、完全性試験の湿潤液には水が使用され、薬液のろ過後には水で置換して完全性試験が行われているが、薬液と水との親和性がよくなく、ろ過後、水で十分に置換できない場合には、実液を使って完全性試験を行わざるをえない。しかし、この場合には予めフィルターディスク等を用いて水と実液での完全性試験値を求め、その換算比から試験値の判定を行わなければならない。

7. バクテリアチャレンジ試験

1900 年代初頭から小規模ながら注射剤の企業生産が始まった。当時より、ヘビ毒やジフテリア毒素に対する抗毒素 (抗血清) は加熱滅菌ができず、除菌ろ過が試みられた。しかし、当時用いられた陶土製・珪藻土製ろ材は、有効ろ過面積が小さい上、使用後の洗浄困難と交互汚染の危険性より、1930 年代後半よりザイツ KE Filter として知られるアスベストフィルターに代わった。アスベストフィルターは、約 50 年間、世界の製薬企業で使われたが、1970 年代中期、アスベストと発がん性の因果関係が明るみになるに及んで、米国 FDA はアスベストフィルターを用いての注射剤ろ過を禁じた。以後、1970 年代初頭に開発されたカートリッジタイプのメンブレンフィルターが製薬企業で採用され、今日に及んでいる。1960 年代後半まで孔径 0.45 μm フィルターが滅菌用フィルターとして使用されていたが、1960 年代中期、FDA の Bowman が 0.45 μm フィルターを通過する菌 (*Brevundimonas diminuta* : 当時は *Pseudomonas diminuta* と称した) を見出し、本菌は 0.22 μm フィルターでは効率的に捕集されることを報告した。以後、*B. diminuta* を滅菌用フィルターの捕集性能試験菌として使用してきたが、ろ過条件、フィルターの種類、実液中に含まれる成分等によっては、*B. diminuta* や他の同属微小菌が 0.22 μm フィルターを通過する可能性のあることも分かってきた。そのため、現在、使用フィルター、薬液及び *B. diminuta* を用いてのバクテリアチャレンジ試験が義務付けられている (Table 8)。

8. 結語

ろ過滅菌法の国際規格である ISO/DIS 13408-2 ではまだ解決できていない問題も幾つかある。主なものを列記すると、1) ろ過滅菌フィルターとは、2) ろ過前液に対するバイオバーデン試験、3) 疎水フィルターの規格等がある。1) については、0.20/0.22 μm フィルターを通過する菌が存在するので、0.1 μm フィルターの必要性や 0.20/0.22 μm フィルターを二重に使用すべきとかの意見も出された。孔径を小さくすると微小微生物を除去できることは当然であるが、同時に圧力損失も大きくなりろ過が困難になる製品が出てくる。フィルターメーカーは 0.1 μm フィルターを販売し、フィルター使用者の要求には応じているが、それを使用する必要があるかどうかは、ろ過すべき製剤の特性等に応じてフィルター使用者が考えるべきことであり、行政的に 0.1 μm フィルターの使用を推奨することはないと考えている。また、0.1 μm フィルターに対するバクテリアチャレンジ試験菌株の指定や完全性試験の評価値については、まだ国際的に合意は得られていない。2) については、EU GMP が 10 cfu/100 ml という目標値を設定したことより、この値が世界的に受け入れられつつある。ISO/DIS 13408-2 ではろ過前液中のバイオバーデンをどのような頻度で測定すべきかについて意見が分かれている。ある国からはろ過滅菌バッチ毎に測定すべきとの意見が出されているが、日本からはバイオバーデンの推移を見て決めればよいことであり、滅菌ろ過フィルターの前に 0.45 μm のプレフィルターを設置するとバイオバーデンは著しく減少するが、それでもろ過バッチ毎にバイオバーデンを測定する必要があるのかと反論意見を出している。3) については、今後の議論が必要である。ベントフィルターは、高圧蒸気滅菌機、凍結乾燥機、ファーメンター等のタンクにまた医薬品製造に要する圧縮ガスの滅菌等に広く用いられているが、その管理手法や基準値については今後の検討課題である。更に、沈降性ワクチンや全菌ワクチン製剤、更に高粘性薬剤などのように 0.20/0.22 μm フィルターを使用できない場合の対応についても一定の国際的合意が得られた時点で、必要な要求事項等を整理した上で「ろ過滅菌法」を日本薬局方参考情報に収載する予定である。