

厚生労働科学研究費補助金

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 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

棚元憲一

平成 15 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 14 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	細菌第二部	第二室長
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	品質保証部門	部門長補佐
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）	品質保証部	GMP 担当課長

協力研究者

山口 進康	大阪大学大学院	薬学研究科（衛生化学）
見理 剛	国立感染症研究所	細菌第二部
天下井 昭	埼玉県	健康福祉部薬務課
水村 悦子	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	日本ビーシージー製造（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 41

3. 非無菌水試料における微生物モニタリング法の比較

PSA シート法による固体表面の微生物モニタリング

那須正夫、山口進康 63

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 73

5. ろ過滅菌法に関する研究

曲田純二 109

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

—主に SIP に関する報告—

阿部寛 137

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食品添加物部長

研究要旨：医薬品製造における無菌操作法で重要である、ろ過滅菌や 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、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。また製薬用水の現状分析を行い、局方整備及び国際調和の問題点を提示した。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)バイオ ファーマシューティカル事業本部次長

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。さらに医薬品製造の根本であるにも拘わらず、日本薬局方においては対応が大きく遅れている製薬用水に関する研究も行う。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、患者が使用した後に初めて感染という形で現れるものであると

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

製薬企業 11 社の協力により「遺伝子解析による微生物の同定法」ドラフトの評価を行った。「製薬用水の在り方」作業グループを発足させ、日局「製薬用水」の見直しと

「製薬用水の製造及び品質管理」の素案を作成した。「無菌試験法」「微生物限度試験法」の国際調和にあたり、国内意見のまとめと対外交渉に尽力した。

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、ナチュラルミネラルウォーター、医薬品製造用水、河川水の計4試料について、i) メンブランフィルター法、ii) マイクロコロニー計数法、iii) 蛍光活性染色法により生菌数を測定した。培地としてSCD培地およびR2A培地を用いた。蛍光染色剤としてDAPI、細菌細胞内のエステラーゼにより蛍光を発する6CFDAを用い、計数は、直接目視、画像解析モジュール、菌数自動測定装置により得られた結果を比較した。

PSAシートはポリウレタンの基材に不溶性のアクリル製粘着剤を重層した。微生物は研究棟内各所、及び体表表面からPSAシートの粘着面を5回圧着して採取し、蛍光染色剤による微生物の染色（全菌数測定は、核酸結合性の蛍光染色剤SYBR Green II、生菌数は6CFDA）を行った。

3. 医薬品の無菌性保証に関するガイドライン作成

前年度作成の「無菌性保証に関する暫定ガイドライン」について、注射剤製造所の対応状況、査察による、問題点等の整理を行うと共に同暫定ガイドラインの意見を聴取した。

4. ろ過滅菌に関する研究

医薬品の模擬液を用い、フィルターに対するバクテリアチャレンジ試験を実施した。

5. CIP/SIPに関する研究

国内ガイドライン作成を前提として、ISO

ドラフトのSIP、及び「Isolator Technology」の調査を行い、これを基にガイドラインドラフト並びに解説書の作成に努めた。

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

製薬企業11社の評価の結果、「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」ドラフトは細菌及び酵母に対しては良好な結果を得たが、カビについてはPCR段階での問題を見だし、修正を加えた上で日本薬局方フォーラム Vol.12, No.1 (2003年1月)に掲載した。第十四改正日本薬局方第二追補の参考情報に収載予定である。

3局の製薬用水の比較、および製薬企業における製薬用水の製造及び品質管理に関するアンケートを基に、日本の現状分析と問題点の提示した報告書を提出した。

薬局方の国際調和関連では「無菌試験法」がサインオフに至り、微生物限度試験法ではStage 4調和案作成のための3局専門家会議で、多くの日局意見の導入を図った。

2. 非無菌水試料中における微生物検出法の開発

R2A培地により得られた生菌数はSCD培地により得られた値と同等以上であり、非無菌水試料中の生菌数を求めるにはR2A培地が適していること、さらにはメンブランフィルター法は非無菌水試料中の生菌数を過小評価していることが確認できた。また蛍光活性染色法は、マイクロコロニー法と比較して得られた生菌数に差はなかったが、30分以内に結果を得られることから、実用的な手法であることが示された。メンブランフィルター法、マイクロコロニー計数法

では対処できなかった試料についても、蛍光活性染色法では生菌数の測定が可能であった。画像解析装置および自動菌数測定装置で得られた生菌数は、培養法で得られる値の10～100倍を示した。

微生物モニタリング研究で、PSAシート上に捕集された微生物はSYBR Green IIおよび6CFDAによりよく染色され、緑色蛍光を発した。PSAシートの転写回数は5回で充分であった。研究棟内の各部位、類表面等の調査の結果PSAシートで得られた全菌数はスタンプアガー法で得られた値の1,000～10,000倍以上の値となった。

3. 医薬品の無菌性保証に関するガイドライン作成

前年度作成の「無菌性保証に関する暫定ガイドライン」について、注射剤製造所の対応状況、査察の結果及び意見を踏まえ、「無菌性保証に関するガイドライン」(案)及びQ&A(案)を作成した。

4. ろ過滅菌に関する研究

アイソレーターの導入やバイオ医薬品の増加などに見られるように無菌操作によって製造される無菌医薬品が年々増加するに従い、無菌操作法に関するガイドラインの充実が産業界および規制当局から求められている。今回、ろ過滅菌工程で重要なバリデーション項目である、バクテリアチャレンジ試験について2,3の実験を通し、判断例を作成した。

5. CIP/SIPに関する研究

SIP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)及びその解説書を作成した。アイソレータについては、ISOドラフト調査に

より、その内容をまとめた。

D. 考 察

医薬品の無菌的製造法を示した各種国際規格を見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。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になる。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、もしくは情報を提供することは、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、いずれも日局への導入の基礎となる重要なものである。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、医薬品製造におけるバイオセーフティ対策」共々医薬品品質のレベルアップにつながるものである。

とりわけ現日局の製薬用水関係は、長い間見直しがされなかったため国際的に大きく後れをとり、また製薬用水の品質管理に関する指針がないことから、試験方法及び試験の実施頻度にも問題が多かった。本研究でまとめた「日本薬局方“製薬用水”の在り方に関する研究」報告書にこれらの問題点を指摘している。日局製薬用水モノグラフの改正作業、及びPDG(薬局方検討会議)における製薬用水の国際調和作業のベースとなる貴重な資料である。更に報告書

で提案した「製薬用水の製造及び品質管理」に関する指針案は品質管理の基礎となる重要なものであり、日局参考情報に収載する予定である。

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では、従来の局方微生物試験法とは異なり、培養法によらない生菌数の迅速計測を検討している。生細胞のみを染色する方法と計測機器を組み合わせた生菌数の迅速計測法を開発・検討し、計数の簡便化・標準化のために非常に有用であるとの結論を得た。現在あらゆる分野での微生物管理は有害微生物の迅速・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さ等、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・適確な検出法を確立し、微生物問題を対処する必要がある。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である。

F. 研究発表

1. Muroi M., Ohnishi T. & **Tanamoto K.** Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in *Escherichia coli* lipopolysaccharide preparations. Infect. Immun. in press
2. T. Muroi M., & **Tanamoto K.** N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD-2. Clin, Diagn. Lab. Immunol. In press
3. Sakai A., Kikuchi Y., Muroi M., Masui T., Furuhashi C., Uchida E., Takatori K. & **Tanamoto K.** Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. Biol. Pharm. Bull. 26(3), 347-351, 2003.

E. 結 論

本研究の第二年度においては、以下の成果を得た。1)「遺伝子解析による微生物の同定法」ドラフトの評価、修正を行い、日局フォーラムに収載した。第十四改正日本薬局方第二追補に収載予定である。

2) 局方微生物関連で、微生物回収バリデーション、微生物モニタリング、迅速検出法といった今後の問題点の基となる成果が得られた。

3) 薬局方の国際調和関連では「無菌試験法」がサインオフされた。微生物限度試験法関連では3局専門家会議で多くの日局意見を反映させた Stage 4 調和案作成のために尽力した。

4) 製薬用水に関しては、日本の現状分析と問題点の提示を行い、国際調和への対策と、科学的な問題点の指摘を盛り込んだ報告書を提出した。

5) その他「無菌性保証に関するガイドライン」、SIP の解説書、「インフルエンザワクチン製造施設のバイオセーフティ対策」英語版作成を行った。

4. Muroi M., Ohnishi T.& **Tanamoto K.** Regions of the mouse CD14 molecule required for Toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 227 (44), 42372-42379, 2002
5. Muroi M.& **Tanamoto K.** Polysaccharide regions is indispensable for Salmonella lipopolysaccharide to activate NF- κ B through human Toll-like receptor. *Infect.Immun.* 70(11), 6043-6047, 2002
6. Muroi M., Ohnishi T.& **Tanamoto K.** MD-2, a novel accessory molecule, is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A. *Infect.Immun.* 70(7), 3546-3550, 2002
7. Kikuchi Y., Kakeya T., Yamazaki T., Takekida K., Nakamura N., Matsuda H., Takatori K., Tanimura A., **Tanamoto K.**, Sawada J. G1-dependent prionproteinexrssonin human glioblastoma cell line T98G. *Biol. Pharm. Bull.* 25(6), 728-733, 2002
8. Takaekida,K., Kikuchi Y., Yamazaki T., Horiuchi M., Kakeya T., Shinagawa M., Takatori K., Tanimura A., **Tanamoto K.**, Sawada J. Quantitative analysis of Prion protein by immunoblotting. *J. Health Sci.* 48(3), 288-291, 2002
9. Horino A., Sasaki Y., **Sasaki T.** and Kenri T. Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans*. *J. Bacteriol.* 2003, 185: 231-242.
10. Sasaki Y., Ishikawa J., Yamashita A., Oshima K., Kenri T., Furuya K., Yoshino C., Horino A., Shiba T., **Sasaki T.** and Hattori M. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Achids Research*, 2002. 5293-5300.
11. **Sasaki T.** Sterile product manufacturing in Japan. *PDA J. GMP and Validation.* 2002, 4: 80-84.
12. **Sasaki T.** Parametric release for moist heated pharmaceutical products in Japan. *PDA J. GMP and Validation.* 2002, 4: 7-10.
13. Yamaguchi N., Sasada M., Yamanaka M. and **Nasu M.**: Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry. *Cytometry*, in press.
14. Ogawa M., Tani K., Yamaguchi N. and **Nasu M.**: Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water *J. Appl. Microbiol.*, in press.
15. Yamaguchi N., Ishidoshiro A., Yoshida Y., Saika T., Senda S. and **Nasu M.**: Develpoment of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods*, in press.
16. Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N. and **Nasu M.**: Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003, 43: 111-119.

17. Kawai M., Matsutera E., Kanda H., Yamaguchi N., Tani K. and Nasu M.: 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68: 699-704.
18. 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– *Bokin Bobai* 31(1) 19-25, 2003
19. 佐々木次雄、棚元憲一: 遺伝子解析による微生物の迅速同定法、*医薬研究*, 33: 763-769, 2002.
20. 曲田純二、佐々木次雄: 濾過滅菌について、*Infection Control*, 11: 34-38, 2002.
21. 佐竹元吉、関田節子、佐々木次雄、有本恵子、熊倉秀樹、国定孝夫、川西利昭、新邦夫、清水袈裟光、大橋眞一、谷健次、林三千夫、阪本光男、庄司雄三、久保利之、白鳥誠、宮沢愛夫、杉浦昭夫: 生薬の腸内細菌とその他のグラム陰性菌試験、*防菌防黴*, 30: 525-530, 2002.
22. 「ヘルスケア製品（医薬品・対外診断薬・医療用具）の無菌操作層におけるろ過滅菌」曲田純二: *PDA Journal of GMP and Validation in Japan Vol.4 No.2*, 2002

2. 学会発表

1. 棚元憲一: 局方収載微生物試験法の現状と国際調和、日本防菌防黴学会主催「第18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15年3月7日、東京。
2. 佐々木次雄: 製薬用水の品質管理－国際調和の動向－、日本防菌防黴学会主催「第18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15年3月7日、東京。
3. Tanamoto.K. Microbiological Tests in JP and Pharmacopoeial harmonization. *PDA-USP Joint Conference, 20-22 May, 2002, Florida.*
4. Sasaki T. Sterile product manufacturing in Japan. *PDA-USP Joint Conference, 20-22 May, 2002, Florida.*
5. 佐々木次雄: 無菌製造法に関する ISO 13408 の一般要件と局方との関係について、微生物管理（無菌操作法）に関する ISO/TC198 京都国際会議報告会、日本 PDA、6月5日、東京。
6. 佐々木次雄: 国内製薬企業の製薬用水の実態と JP の課題、第10回日本 PDA 年会、東京、2002年11月。

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

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

分担研究者	佐々木次雄	国立感染所研究所安全性研究部室長
協力研究者	見理 剛	国立感染所研究所安全性研究部研究員

製薬用水の在り方に関する研究

岡田 敏史	国立医薬品食品衛生研究所
小嶋 茂雄	国立医薬品食品衛生研究所
棚元 憲一	国立医薬品食品衛生研究所
加納 一美	栗田工業株式会社
樋口 賢治	オルガノ株式会社
麻薙 幸雄	旭化成工業株式会社
柚木 徹	日本ミリポア株式会社
門脇 奉則	大塚製薬株式会社
水田 泰一	塩野義製薬株式会社
長瀬 安数	持田製薬株式会社
村上大吉郎	堀ガラス株式会社
大場 徹也	日本赤十字社血漿分画センター

遺伝子解析による微生物の同定法評価研究

池内孝之	エーザイ株式会社
岩切昭二、梅北和英	中外製薬株式会社
高橋栄二	田辺製薬株式会社
川井真好	大日本製薬株式会社
室井哲夫、坪井裕一	塩野義製薬株式会社
鳴瀧壮二	小野薬品工業株式会社
田子森賢一、岡島敏広	藤沢薬品工業株式会社
萱原秀信、佐々木祐子	三菱ウェルファーマ株式会社
刑部章子、國定孝夫	明治製菓株式会社
伊藤千鶴子	持田製薬株式会社
山城芳子	富山化学工業株式会社

研究要旨：製薬企業 11 社が参加し、日本薬局方参考情報導入を目指している「遺伝子解析による微生物の同定法」について評価研究を行った。良好な成績が得られたので、日局フォーラム (12.1) に掲載し、意見を求め、第十四改正日本薬局方第二追補に収載予定である薬局方検討会議 (PDG) で製薬用水の国際調和作業を行うことを受けて、製薬用水の在り方について検討し、報告書を作成した。ISO/TC198/WG9 で作成中のヘルスケア製品の無菌製造法に関する一連の国際規格作成に従事した。国際調和作業中の非無菌医薬品に対する試験法と限度値設定に関する国際会議に出席し、調和作業の推進に努めた。

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」ドラフトについて評価を行う。
2. 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」の素案を作成する。
3. ISO/TC198/WG9 で作成中のヘルスケア製品の無菌製造法に関する一連の国際規格作成作業に従事する。
4. 国際調和対象微生物試験法の日局意見の取りまとめ作業に従事する。

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) と同時にドラフト内容について意見を求めた。
2. 「製薬用水の在り方」に関する作業グループを発足させ、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。また、国内製薬企業における製薬用水の製造管理と品質管理の手法及び頻度等についてアンケート調査を行った。
3. 平成 14 年 5 月に京都で開催された

ISO/TC198 国際会議への出席並びに WG9 で検討している国際規格案について国内意見の取りまとめを行った。

4. 「無菌試験法」の国際調和にあたり、日局側の意見の取りまとめを行った。また、平成 15 年 1 月にストラズブルクで開催された PDG 微生物試験法専門家会議に出席し、非無菌医薬品の微生物試験法並びに限度値設定に関して日局の見解を述べ、Stage 4 テキストの作成に努めた。

C. 研究経過

1. 平成 14 年 5 月までに、11 社中 10 社から解析結果が届いた。細菌及び酵母に対しては各社ともに良好な同定結果であったが、カビについては PCR 段階で苦勞したようである。カビの場合は、細菌と違ってごく少量をサンプルとして使うことと、DNA を機械的に抽出する必要があった。各社から寄せられた意見を参考に、修正を加えたドラフトを日本薬局方フォーラム Vol.12, No.1 (2003 年 1 月)に掲載し、意見を求めている。本法は、第十四改正日本薬局方第二追補の参考情報に収載予定である (添付資料 1)。
2. 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した。アンケート結果の解析を行い、更に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、別途、報告書として審査管理課並びに日局関連委員会に提出した（報告書、「日本薬局方“製薬用水”の在り方に関する研究」参照）。

3. 平成 14 年 5 月、京都市で開催された ISO/TC198/WG9 会議で、「定置洗浄、CIP」、「定置滅菌、SIP」、「凍結乾燥」、「アイソレータ」の国際規格案について、各国から寄せられたコメントについて検討した。平成 15 年 2 月にドイツケルン市において中間会議を開催することにし、それまでに修正箇所について各国は更に検討することにした。尚、日本がドラフト作成を担当した「ろ過滅菌法」は FDIS (Final Draft for International Standard)投票を行い、国際規格 (ISO13408-2) になった。
4. 平成 14 年 9 月の PDG で「無菌試験法」の国際調和が確認された。EP より非無菌医薬品の微生物試験法（生菌数試験法、特定微生物試験法）並びに限度値設定に関する Stage 3 ドラフトを Stage 4 に格上げするために、日米欧薬局方の微生物試験法の専門家会議開催提案があり、日局から 3 名が参加した。Face to face 会議は、非常に実り多いものがあり、多くの日局意見が取り入れられた（添付資料 2）。

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。評価研究に参加した企業は、全て本同定法の有用性を述べていた。

2. 第十四改正日本薬局方 (2001) には「常水」、「精製水」、「滅菌精製水」及び「注射用水」の 4 種の水が医薬品各条として規定されている。いずれも製薬用の原水、製剤調製用の水又は製品として、古くから規定されてきたものであり、長い間、それらの規格試験法は大きな見直しがなされないまま現在に引き継がれてきた。そのため、製薬企業の現場では日局製薬用水モノグラフに規定されている試験法を実施せず、USP 及び EP における製薬用水の規格試験法に準拠しているところが多いことが分かった。また製薬用水の品質管理に関する指針がないこともあり、試験方法及び試験の実施頻度にも問題が多かった。そこで、製薬用水の問題点等について、別途、「日本薬局方“製薬用水”の在り方に関する研究」報告書として纏めた。

3. ISO/TC198WG9 では、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、アイソレータシステム)に関する国際規格を作成中である。「ろ過滅菌法」は、FDIS (Final Draft for International Standard)投票の結果、投票国全て賛成で国際規格 (ISO 13408-2) になった。SIP 及び CIP も日本が担当しており、平成15年2月に開催された中間会議を経てCDからDISに格上げされることになった。今後、わが国としてはこれらの国際規格をどのような形で国内に導入すべきか検討しなければならない。

4. 日局では、「微生物限度試験法」及び「非無菌医薬品の微生物学的品質特性」として導入している試験法の国際調和作業が進行中である。EPが担当局方として調和作業を推進しているが、Stage 3 ドラフトについてEP利用国から多くの意見が出たため、Stage 4 に格上げするためには、日米欧薬局方の微生物試験法専門家会議開催が求められた。会議は、非常に有意義なものがあり、相違点の多くが解消し、Stage 4 に格上げすることに日局としても賛

成した。

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。現在、日局フォーラムで意見を求めているところである。第十四改正日本薬局方第二追補に収載予定である。製薬用水に関しては、日局「注射用水」の製法及び規格試験が、USP/EPの注射用水の製法及び規格試験と異なっており、今後、国際調和作業の中で見直す必要がある。また、製薬用水の適切な製造及び品質手法を示した指針が必要であり、本研究班で提案した「製薬用水の製造及び品質管理」を参考情報に速やかに導入することを願っている。ヘルスケア製品の無菌製造法に関する一連の国際規格をどのような形でわが国に導入すべきかについても今後検討すべきである。「無菌試験法」の国際調和には7年の年月を要し、しかも部分調和の感がある。今回の非無菌医薬品微生物試験法の専門家会議は、Stage 2 から Stage 3 に格上げする際の専門家会議に次いで2回目であるが、可能な限り、完全調和にもって行くよう日局も心がけている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaki Y., Ishikawa J., Yamashita A., Oshima K., Kenri T., Furuya K., Yoshino C., Horino A., Shiba T., Sasaki T. and Hattori M. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Research*, 30: 5293-5300, 2002
2. Horino A., Sasaki Y., Sasaki T., and Kenri T. Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans*. *J. Bacteriol.* 185: 231-242, 2003.
3. Sasaki T. Parametric release for moist heated pharmaceutical products in Japan. *PDA J.*

GMP and Validation, 4: 7-10, 2002.

4. Sasaki T. Sterile product manufacturing in Japan. PDA J. GMP and Validation, 4: 80-84, 2002.

5. 佐々木次雄、棚元憲一：遺伝子解析による微生物の迅速同定法、医薬研究、33: 763-769, 2002.

6. 曲田純二、佐々木次雄：濾過滅菌について、Infection Control, 11: 34-38, 2002.

7. 佐竹元吉、関田節子、佐々木次雄、有本恵子、熊倉秀樹、国定孝夫、川西利昭、新邦夫、清水袈裟光、大橋眞一、谷健次、林三千夫、阪本光男、庄司雄三、久保利之、白鳥誠、宮沢愛夫、杉浦昭夫：生薬の腸内細菌とその他のグラム陰性菌試験、防菌防黴、30: 525-530, 2002.

2. 学会発表

1. Sasaki T. Sterile product manufacturing in Japan. PDA-USP Joint Conference, 20-22 May, 2002, Florida.

2. 佐々木次雄：無菌製造法に関する ISO 13408 の一般要件と局方との関係について、微生物管理（無菌操作法）に関する ISO/TC198 京都国際会議報告会、日本 PDA、6月5日、東京。

3. 佐々木次雄：国内製薬企業の製薬用水の実態と JP の課題、第 10 回日本 PDA 年会、東京、2002 年 11 月。

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

第十四改正日本薬局方第二追補に収載予定の改正案

第十四改正日本薬局方第二追補に収載を予定している改正案です。該当する英訳文は後半に掲載されています。本案についてのご意見は、平成15年3月末日までに、厚生労働省医薬局審査管理課薬局方係まで、書面にてご提出下さるようお願い致します。

1. 一般試験法

(1) 新収載

遺伝子解析による微生物の迅速同定法

本法は、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で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についての知見は、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、分類階級の上位から下位に進めていく表現形質解析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、一般に専門知識が必要な上、結果の判定が客観性に欠ける恐れがある。微生物の進化の歴史はリボゾーム RNA に記録されているとされており、近年の微生物分類学ではこの記録をもとに、系統発生的に区分する手法が採用されている。本法は、細菌については、16S rRNA の高度可変領域の一部、真菌については 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、実施者の経験などによって変更可能である。身近に装置が無い場合には、装置所有者や受託業者に PCR 産物の解析を依頼することもできる。また、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用可能である。

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。

1.2 核酸増幅装置

被検菌の標的 DNA の増幅 (PCR) 及び PCR 産物をシークエンス試薬で標識するための装置。

1.3 比色計

波長 260 nm で PCR 産物の DNA 量を測定する。

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 又は 0.5 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 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 18.6 g を水に溶かし、100 mL とする。

2.2 1 mol/L トリス緩衝液, pH 8.0

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 24.2 g を水に溶かし、0.2 mol/L 塩酸試液で pH を 8.0 に調整した後、水を加えて 200 mL とする。

2.3 TE 緩衝液

pH 8.0 の 1 mol/L トリス緩衝液 1.0 mL 及び 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 0.2 mL に滅菌水 98.8 mL を加える。

2.4 被検菌処理液

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

2.5 核酸増幅 (PCR) 反応液*

10 倍濃縮反応緩衝液	5 μ L (終濃度 1 倍)
1 mmol/L dNTP 混合液	4 μ L (終濃度 80 μ mol/L)
30 μ mol/L センスプライマー	1 μ L (終濃度 0.6 μ mol/L)
30 μ mol/L アンチセンスプライマー	1 μ L (終濃度 0.6 μ mol/L)
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (5 U/ μ L)	0.5 μ L (終濃度 0.05 U/ μ L)

滅菌蒸留水（検体を加えて全量が 50 μ 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。

2.6 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, dNTP 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 自動解析装置やプログラムに合った適切な試薬キットを購入する。

2.7 TAE 緩衝液 (50 倍濃縮液)

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 242 g に酢酸 (100) 57.1 mL, pH 8.0 の 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 100 mL 及び水を加えて溶かし, 1000 mL とする。

2.8 アガロースゲル (PCR 産物の確認用)

アガロース 1.5 g に TAE 緩衝液 (50 倍濃縮液) 2.0 mL, 臭化エチジウム (10 mg/mL) 10 μ L, 水 100 mL を加えて電子レンジなどで溶かした後, 60°C に冷却し, ゲル板を調製する。

2.9 ローディング緩衝液 (6 倍濃縮液)

プロモフェノールブルー 0.25 g, キシレンシアノール 0.25 g, グリセリン 30 mL, エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 1.63 g を水に溶かし, 100 mL とする。

2.10 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。DNA 回収用フィルター付遠心チューブなど, 適当なものを用いる。

2.11 PCR 用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
真菌	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCCTCATCGATG-3'

操作法

以下, 操作法の一例を示す。

1. 鋳型 DNA の調製

同定対象とする細菌又は真菌は純培養されていることが重要である。被検菌が集落の場合は, 1.5 mL 遠心チューブに被検菌処理液を 0.3 mL 入れ, これに滅菌竹串などで集落の一部 (カビの場合は, 極少量) 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 0.5 mL とり, 10000 rpm で 10 分間遠心後, 上清を除去し, 沈渣に被検菌処理液を 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。細菌, 酵母類は一般に, 加熱処理物でも PCR はかかるが, カビは加熱処理後, 攪拌機や超音波処理で菌体を破壊した上で DNA 抽出を行った方がよい。

2. PCR

PCR 反応液に加熱処理した菌液の上清又は DNA 抽出物を 2 μ 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添加して以下の条件で PCR を行う。94°C, 30 秒 \rightarrow 55°C, 60 秒 \rightarrow 72°C, 60 秒の反応を 30 サイクル。PCR を行う際には, 陰性対照を置くこと。

3. PCR 産物の検出

反応終了後の PCR 液 5 μ L を 1 μ L のローディング緩衝液と混合し, 1.5 w/v% アガロースゲルのウェルに添加し, TAE 緩衝液 (1 倍濃度) を用いて電気泳動する。泳動後, トランスイルミネーター (波長: 312 nm) 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, 標的バンドを切り出し, 適当な市販 DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出を行う。

4. PCR 産物の精製

未反応物 (dNTP やプライマーなど) を除去するための方法としてはいろいろある。採用する方法のプロトコルに従って精製する。

5. 精製 DNA の定量

精製 DNA 量を比色計で測定する場合には, 1 OD_{260 nm} = 50 μ g/mL で換算する。

6. 精製 PCR 産物の標識

DNA 解析装置又はそのプログラムに合った蛍光標識シークエンス試薬を用い, 使用説明書に基づいて PCR 産物を標識する。

7. シークエンス反応物の精製

1.5 mL 遠心チューブに 70% エタノールを 75 μ L 入れ, 反応終了物に移す。氷中に 20 分間放置後, 15000 rpm で 20 分間遠心する。遠心終了後, 上清を除去し, 70% エタノールを 250 μ L 加え, 15000 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。

8. 塩基配列の解析

DNA 解析装置やシークエ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を BLAST データベースに照合する。

判定

一般に, 読み取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 と照合し, 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, ITS1F プライマーで読み取った領域を BLAST と照合し, 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。

Procedure

The measurement of the particle density is carried out between 15 and 30°C, and temperature must not vary by more than 2°C during the course of measurement.

Firstly, weigh the mass of the test cell and record it. After weighing out the amount of the sample as described in the individual monograph and placing it in the test cell, seal the cell in the pycnometer. Secondly, introduce the measurement gas (helium) into the test cell, and remove volatile contaminants in the powder. If necessary, keep the sample powder under reduced pressure to remove the volatile contaminants in advance and use it as the test sample for measurement.

Open the valve which connects the reference cell with the test cell, confirm with the manometer that the pressure inside the system is stable, and then read the system reference pressure (P_r). Secondly, close the valve that connects to the two cells, and introduce the measurement gas into the test cell to achieve positive pressure. Confirm with the manometer that the pressure inside the system is stable, and then read the initial pressure (P_i). Open the valve to connect the test cell with the reference cell. After confirming that the indicator of the manometer is stable, read the final pressure (P_f), and calculate the sample volume (V_s) with the following equation.

$$V_s = V_c - \frac{V_r}{\frac{P_i - P_r}{P_f - P_r} - 1}$$

V_r : Reference cell volume (cm³)

V_c : Test cell volume (cm³)

V_s : Sample volume (cm³)

P_i : Initial pressure (kPa)

P_f : Final pressure (kPa)

P_r : Reference pressure (kPa)

Repeat the measurement sequence for the same powder sample until consecutive measurements of the sample volume agree to within 0.5%, and calculate the mean of sample volume (V_s). Finally, unload the test cell, weigh the mass of test cell, and calculate the final sample mass by deducting the empty cell mass from the test cell mass. The powder particle density ρ is calculated by the following equation.

$$\rho = \frac{m}{V_s}$$

ρ : Powder particle density (g/cm³)

m : Final sample mass (g)

V_s : Sample volume (cm³)

Add the following to (2) Reagents, Test Solutions:

Calibration ball for particle density measurement

Calibration ball with a known volume prepared for measurement of particle density. The volume of the calibration ball must be accurately determined to the nearest 0.001 cm³.

Add the following:

Rapid Identification of Microorganisms Based on Molecular Biological Method

This chapter describes the methods for the identification or estimation of microorganisms (bacteria and fungi), found in in-process control tests or lot release tests of pharmaceutical products, at the species or genus level based on their DNA sequence homology. The identification of isolates found in the sterility test or aseptic processing can be helpful for investigating the causes of contamination. Furthermore, information on microorganisms found in raw materials used for pharmaceutical products, processing areas of pharmaceutical products, and so on is useful in designing measures to control the microbiological quality of drugs. For the identification of microorganisms, phenotypic analysis is widely used, based on morphological, physiological, and biochemical features and analysis of components. Commercial kits based on differences in phenotype patterns have been used for the identification of microorganisms, but are not always applicable to microorganisms found in raw materials used for pharmaceutical products and in processing areas of pharmaceutical products. In general, the identification of microorganisms based on phenotypic analysis needs special knowledge and judgment is often subjective. It is considered that the evolutionary history of microorganisms (bacteria and fungi) is memorized in their ribosomal RNAs, so that systematic classification and identification of microorganisms in recent years have been based on the analysis of these sequences. This chapter presents a rapid method to identify or estimate microorganisms based on partial sequences of divergent regions of the 16S rRNA gene for bacteria and of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region located between 18S rRNA and 5.8S rRNA for fungi, followed by comparison of the sequences with those in the database. Methods described in this chapter can be modified based on the examiner's experience, and on the available equipment or materials. If a sequencer is not available, sequencing of the PCR products can be out-sourced. Furthermore, other gene sequences besides those mentioned in this chapter can be used if appropriate.

Equipment and Materials

1. Equipment

1.1 DNA sequencer

Various types of sequencers used a gel board or capillary can be used.

1.2 DNA amplifier

To amplify target DNA and label amplified (PCR) products with sequencing reagents.

1.3 Spectrophotometer

To determine the DNA content of PCR products at λ 260 nm.

1.4 Agarose gel electrophoresis

To confirm the PCR products.

1.5 Multi-heater

To heat 1.5 mL or 0.5 mL centrifuge tubes at 100°C.

2. Reagents and Materials

2.1 0.5 mol/L Disodium ethylenediamine tetraacetate TS

Dissolve 18.6 g of disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate in water to make 100 mL.

2.2 1 mol/L Tris buffer solution, pH 8.0

Dissolve 24.2 g of 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol in a suitable amount of water, adjust the pH to 8.0 with 0.2 mol/L hydrochloric acid TS, and add water to make 200 mL.

2.3 TE buffer solution

Mix 1.0 mL of 1 mol/L Tris buffer solution, pH 8.0, 0.2 mL of 0.5 mol/L disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate and 98.8 mL of water.

2.4 DNA releasing solution

Divide TE buffer solution containing Triton X-100 (1 in 100) into small amounts and store frozen until use.

2.5 PCR reaction solution*

10-fold buffer solution

5 μ L (Final concentration: 1-fold)

dNTP mixture (each 1 mmol/L)

4 μ L (Final concentration: 80 μ mol/L)

Sense primer (30 μ mol/L)

1 μ L (Final concentration: 0.6 μ mol/L)

Anti-sense primer (30 μ mol/L)

1 μ L (Final concentration: 0.6 μ mol/L)

Heat-resistant DNA polymerase (5 U/ μ L)

0.5 μ L (Final concentration: 0.05 U/ μ L)

Sterile distilled water

37 μ L

* A mixture of 10-fold buffer solution, dNTP mixture and heat-resistant DNA polymerase is commercially available.

2.6 Sequencing reagent

There are many kinds of sequencing methods, such as the dye-primer method for labeling of primer, the dye-terminator method for labeling of dNTP terminator and so on. Purchase

an appropriate sequencing reagent for the apparatus to be used.

2.7 TAE buffer solution (50-fold concentrated)

Dissolve 242 g of 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol in 57.1 mL of acetic acid (100), 100 mL of 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0, and water to make 1000 mL.

2.8 Agarose gel (for confirmation of PCR products)

Mix 1.5 g of agarose, 2.0 mL of 50-fold concentrated TAE buffer solution, 10 μ L of 10 mg/mL ethidium bromide, and water to make 100 mL. After dissolving the materials with the aid of a microwave oven or other means, cool the solution to about 60°C and prepare gels.

2.9 Loading buffer solution (6-fold concentrated)

Mix 0.25 g of bromophenol blue, 0.25 g of xylene cyanol, 30 mL of glycerol, 1.63 g of disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate and water to make 100 mL.

2.10 Purification kit for PCR products

To remove primers and nucleotides in PCR products, use an appropriate DNA purification kit.

2.11 PCR primers

	For	Primer
Bacteria	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
Fungi	ITS1F	5'-GTAACAAGGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTTCCTCATCGATG-3'

Procedures

The following procedures are described as an example.

1. Preparation of template DNA

It is important to use a pure cultivated bacterium or fungus for identification. In the case of colony samples, colonies are picked up with a sterilized toothpick (in the case of fungi, a small fragment of colony sample is picked up), and suspended in 0.3 mL of DNA releasing solution in a 1.5 mL centrifuge tube. In the case of culture fluid, a 0.5 mL portion of fluid is put in a 1.5 mL centrifuge tube and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. After removal of the supernatant, the pellet is suspended in 0.3 mL of DNA releasing solution, and then heated at 100°C for 10 min. In general, PCR can be run for bacteria and yeasts heated in DNA releasing solution. For fungi, DNA extraction after treatment with a mixer or ultrasonic generator may be necessary before PCR.

2. PCR

Add 2 μ L of template DNA in PCR reaction solution. Use 10F/800R primers for bacteria and ITS1F/ITS1R for fungi, and then perform 30 amplification cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 60 sec, and 72°C for 60 sec. Include a negative control in the PCR.

3. Confirmation of PCR products

Mix 5 μ L of PCR product with 1 μ L of loading buffer solution, place it in a 1.5 w/v% agarose gel well, and carry out electrophoresis with TAE buffer solution (1-fold concentra-

tion). After the electrophoresis, observe PCR products on a trans-illuminator (312 nm) and confirm the presence of a single band. If multiple bands are observed, cut the targeted band out of the gel and extract DNA by using appropriate commercial DNA extraction kit.

4. Purification of PCR products

Remove unincorporated PCR primers and deoxynucleoside triphosphates (dNTP) from PCR products by using appropriate purification methods.

5. Quantification of purified DNA

When purified DNA is measured by spectrophotometer, calculate $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}}$ as $50 \mu\text{g/mL}$.

6. Labeling of PCR products with sequencing reagents

Use an appropriate fluorescence-labeled sequencing reagent suitable for the available DNA sequencer or its program and label the PCR products according to the instructions provided with the reagent.

7. Purification of sequencing reagent-labeled PCR products

Transfer the product in $75 \mu\text{L}$ of 70% ethyl alcohol into a 1.5 mL centrifuge tube, keep in an ice bath for 20 min, and centrifuge at 15,000 rpm for 20 min. After removal of supernatant, add $250 \mu\text{L}$ of 70% ethyl alcohol to the precipitate and centrifuge at 15,000 rpm for 5 min. Remove the supernatant and dry up the precipitate by using centrifugal drier or in air.

8. DNA homology analysis

Place sequencing reagent-labeled PCR products in the DNA sequencer and read the nucleotide sequences of the PCR products. Compare the partial nucleotide sequence with those in the BLAST database.

Judgment

If sequencing data show over 90% identity with a sequence in the database, in general, judgment may be made as follows.

1. In the case of bacteria, compare about 300 nucleotides between positions 50 to 350 in the product obtained with the 10F primer, with the BLAST database. Higher ranked species are judged as identified species or closely related species.
2. In the case of fungi, compare sequencing data for the product obtained with the ITS1F primer, with the BLAST database. Higher ranked species are judged as identified species or closely related species.

(2) Revision

31. Melting Point Determination

Change to read:

The melting point is defined to be the temperature at which a crystalline substance melts during heating, when the solid phase and the liquid phase are in an equilibrium. However, in this Pharmacopoeia it is conventionally defined to be the temperature at which the remaining solid sample melts completely when it is subjected to continuous heating and the change of the sample state that accompanies heating is accurately observed. Since a pure substance has an intrinsic melting point, it is used for the identification and/or confirmation of a substance and also as an indicator of the purity of a substance.

The melting point is determined by the following three procedures: Method 1 is applied to those substances of which the purity is comparably high and which can be pulverized, Method 2 to those substances which are insoluble in water and can not be readily pulverized, and Method 3 to petrolatums.

Unless otherwise specified, measurement is performed by Method 1. In the monographs, melting points indicated in the item of description are provided for information.

Method 1

This method is applied to those substances of which the purity is comparably high and which can be pulverized.

(1) Apparatus

Use the apparatus illustrated in the figure.

[Figure]

- A: Heating vessel of hard glass
- B: Bath fluid
- C: Teflon stopper
- D: Thermometer with an immersion line
- E: Thermometer-fastening spring
- F: Vent for adjustment of the bath fluid volume
- G: Coil spring
- H: Capillary tube
- J: Spring for fastening Teflon stopper

Bath fluid: Usually use clear silicone oil having a viscosity of 50 to 100 mm^2/s at an ordinary temperature.

Thermometer with an immersion line: There are six types of thermometers, Type 1—Type 6, which are specified by an appropriate measuring temperature range. For melting points lower than 50°C , use a thermometer Type 1; for 50°C to 100°C , Type 2; for 100°C to 150°C , Type 3; for 150°C to 200°C , Type 4; for 200°C to 250°C , Type 5; for 250°C to

1. 研究要旨

無菌試験や無菌製造工程で検出された汚染微生物を同定することは、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についての知見は、微生物学的に安全な医薬品を製造する上で重要である。これまで微生物の同定法は、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。1980年代になって微生物の系統進化をリボゾーム RNA の塩基配列を使って調べる研究が進展し、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。そこで、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、日本薬局方「参考情報」に導入する方向で検討を開始した。そこで、ドラフトの評価を行うことを目的に、東京医薬品工業協会技術委員会及び大阪医薬品協会技術研究委員会に協力を求めたところ、11社が評価研究に参画し、成績が得られたので報告する。

2. 材料

2.1 試験菌

細菌 5 種 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923、*Serratia marcescens* ATCC 8100、*Micrococcus luteus* ATCC 10240、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228、*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、真菌 5 種 (*Penicillium italicum* IFO 7886、*Syncephalastrum racemosum* IFO 4828、*Aspergillus niger* IFO 9455、*Candida krusei* IFO 1395、*Saccharomyces cerevisiae* IFO 10647) を評価研究参加者に送付した。送付菌株には、全て別番号を振り、ブラインド方式にした。

2.2 遺伝子解析領域と PCR プライマー

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手法を採用した。本研究に用いた PCR プライマーを表 1 に示す (1, 2)。

表 1. PCR 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'-CGTTCTTCATCGATG-3'