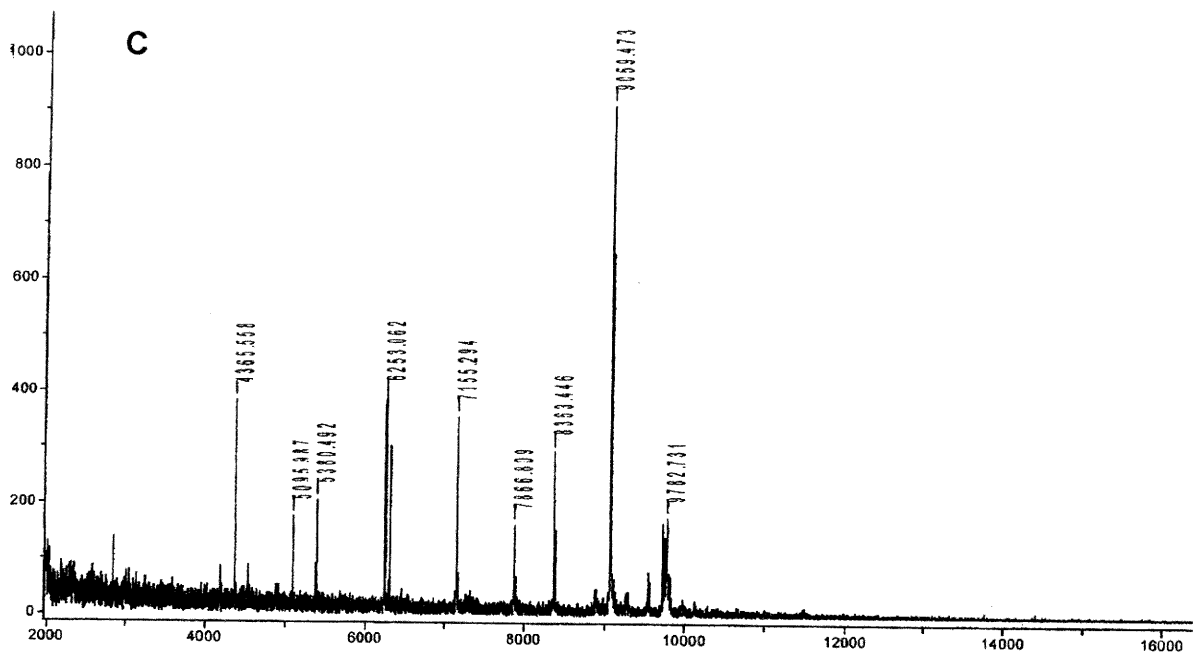
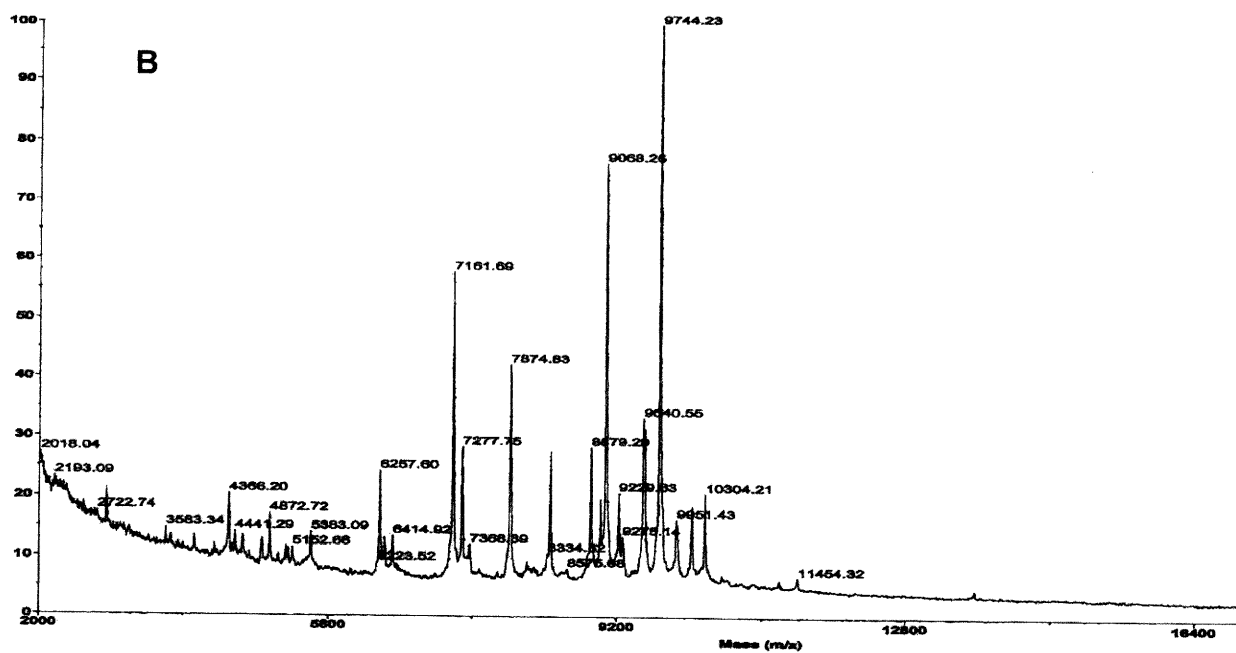
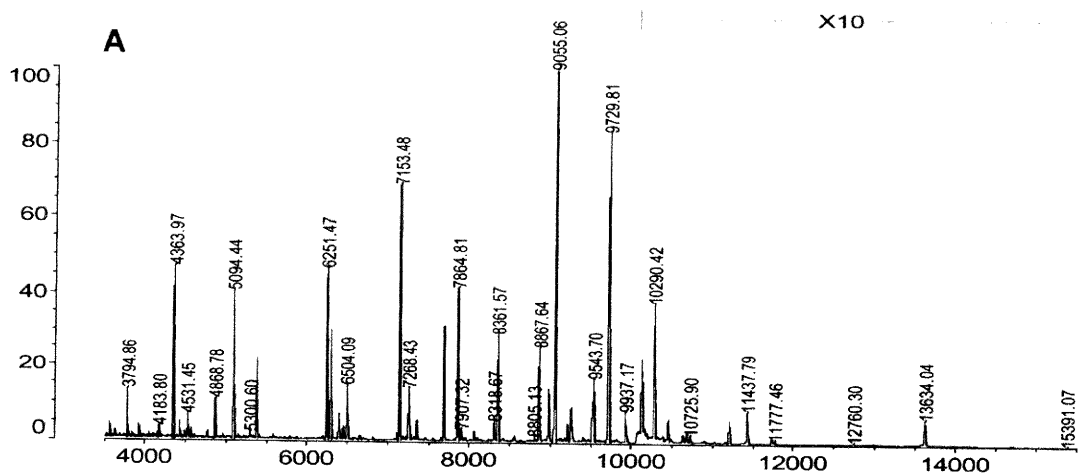


添付資料 1





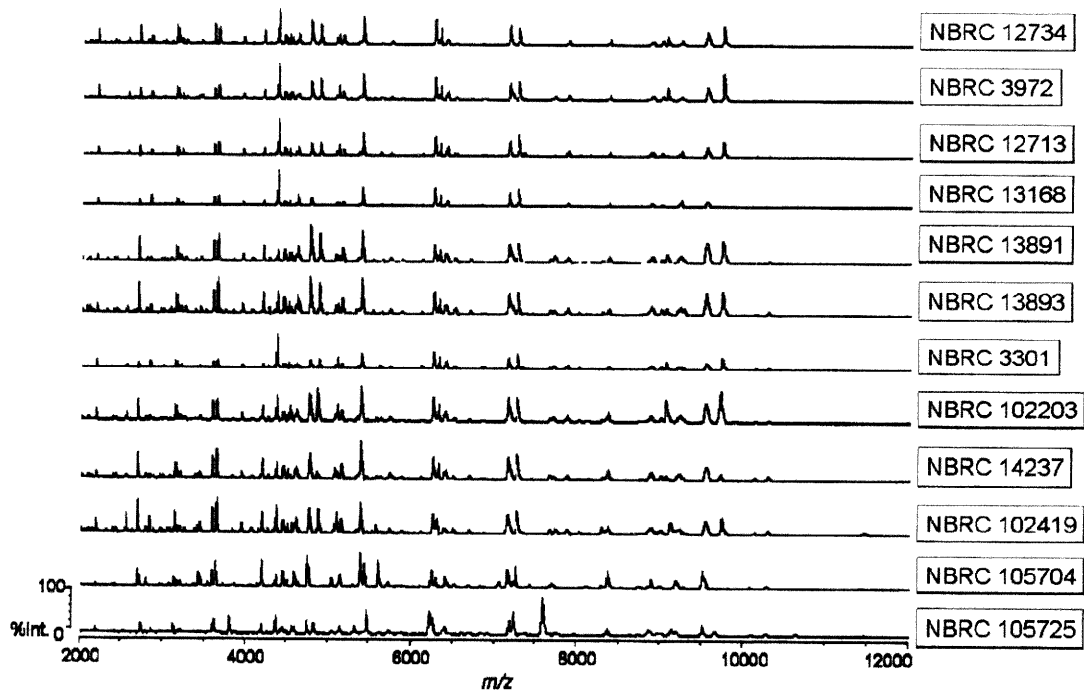


図3 *E. coli* (NBRC 3301, NBRC 3972, NBRC 12713, NBRC 12734, NBRC 13168, NBRC 13891, NBRC 13893, NBRC 14237, NBRC 102203), *E. blattae* (NBRC 105725), *E. fergusonii* (NBRC 102419), および *E. hermanii* (NBRC 105704)から得られたマススペクトルプロファイル。

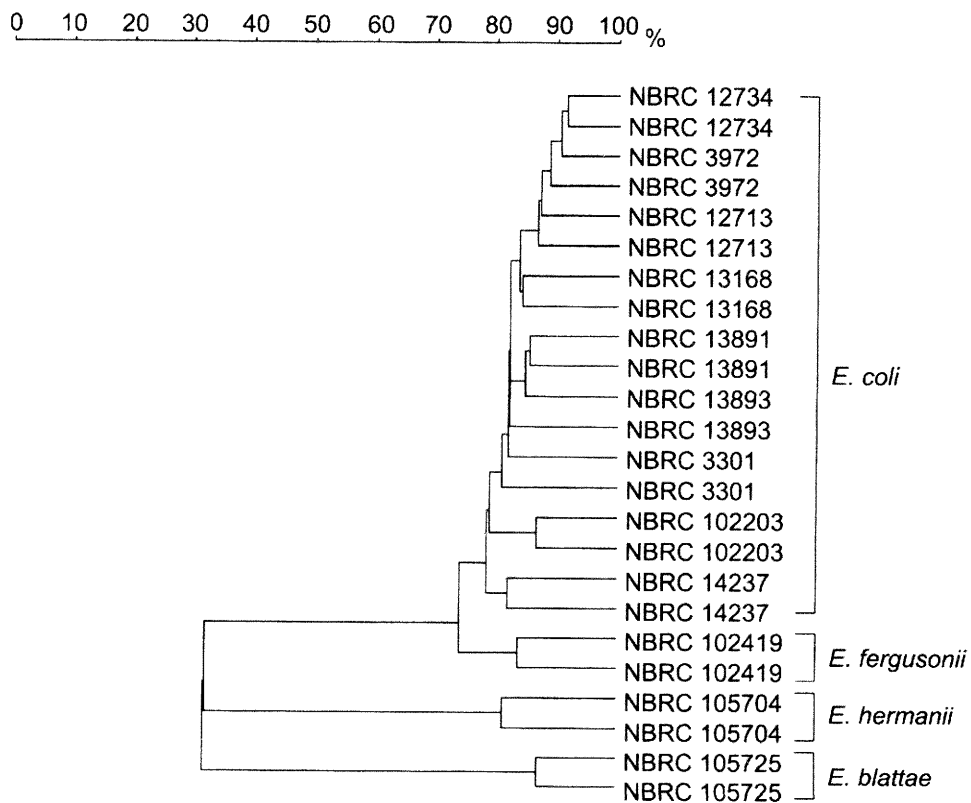


図4 マススペクトルプロファイルのクラスター解析。それぞれの菌株の解析は duplicateで行った。

表 1

MALDI-TOFMS peaks obtained from <i>E. coli</i>				
Peak	A研究所	B研究所	C研究所	D研究所
1	3795.1 ± 0.909			
2	3935.6 ± 0.665			
3	4364.5 ± 0.969	4364.3 ± 1.323	4365.4 ± 0.468	4344.8
4	4438.0 ± 1.267			
5	4531.6 ± 0.433			
6	4774.9 ± 0.560			
7	4868.2 ± 0.536			
8	5095.3 ± 1.038			5073.7
9	5379.3 ± 0.954			5356.8
10				5727.2
11				5847.6
12	6252.8 ± 1.222	6255.6 ± 1.416	6253.9 ± 0.530	6227.5
13	6312.9 ± 1.295		6314.2 ± 0.674	
14	6505.1 ± 0.977			6478.3
15		7125.1 ± 2.616		
16	7154.8 ± 1.557	7160.1 ± 1.307		
17	7269.2 ± 1.077	7275.8 ± 0.977		7241.4
18	7362.2 ± 2.437			
19	7702.6 ± 1.502			
20	7866.0 ± 1.465			
21	8072.9 ± 2.382			
22	8321.7 ± 3.457			8292.7
23	8362.7 ± 1.610	8369.8 ± 1.448		
24	8868.9 ± 1.847	8877.0 ± 1.285		8842.4
25	8985.7 ± 1.945	8994.8 ± 1.950		
26	9056.7 ± 2.044	9066.9 ± 0.906	9059.9 ± 0.517	9022.1
27		9227.9 ± 0.930		9191.4
28	9264.0 ± 1.913	9273.8 ± 1.310		
29	9545.1 ± 2.324	9554.3 ± 2.446		
30	9731.3 ± 1.999	9742.3 ± 1.120		9697.8
31	9939.0 ± 1.979			

Values are mean  $m/z$  values ± S.D.

表 2

MALDI-TOFMS peaks obtained from *B. subtilis*

Peak	A研究所	B研究所	C研究所	D研究所
1				2731.9
2	3144.2 ± 0.319			
3	3215.4 ± 0.918	3323.2 ± 2.158		
4	±			
5	3675.8 ± 0.343			
6	3890.8 ± 0.673			3869.9
7	4022.0 ± 0.829			4001.9
8	4308.0 ± 0.225	4308.8 ± 1.088	4306.4 ± 0.541	4286.7
9	4438.2 ± 1.095			
10	4514.8 ± 0.702			
11	4619.3 ± 0.317			
12	5017.6 ± 1.346			
13	5254.6 ± 0.382	5257.2 ± 0.946	5254.0 ± 0.391	
14	5311.9 ± 0.495			
15	5443.3 ± 0.221			
16	5497.5 ± 0.620			
17	5716.5 ± 1.198			
18	5901.0 ± 0.454	5902.1 ± 3.089	5900.6 ± 0.454	
19				6483.3
20	6597.7 ± 1.243	6601.8 ± 1.202	6596.7 ± 0.493	6567.8
21	6678.6 ± 0.942		6676.7 ± 0.795	6649.7
22	6698.5 ± 1.516	6701.1 ± 2.796	6697.6 ± 0.804	
23	7138.9 ± 1.254			
24	7176.9 ± 1.230			
25	7425.5 ± 1.487	7434.8 ± 1.940		
26		7694.9 ± 2.511		
27		7733.1 ± 1.174		7719.5
28	9232.9 ± 2.945	9210.4 ± 1.220	9202.2 ± 0.866	
29	9440.4 ± 3.922	9444.7 ± 1.351		
30				9840.9
31				9867.5
32				9957.3
33		10449.5 ± 1.720		10413.8
34		11147.2 ± 1.224		

Values are mean  $m/z$  values ± S.D.

表 3

MALDI-TOFMS peaks obtained from <i>P. aeruginosa</i>				
Peak	A研究所	B研究所	C研究所	D研究所
1	3176.2 ± 1.237			
2	3496.9 ± 0.990			
3	3627.4 ± 0.661			
4	4054.2 ± 1.849			
5	4434.0 ± 0.301	4435.4 ± 0.622	4435.3 ± 0.378	4415.8
6	5208.8 ± 0.693	5210.3 ± 1.216	5209.6 ± 0.229	5186.9
7	5720.7 ± 0.899			
8	6043.7 ± 0.884	6047.0 ± 0.867	6044.6 ± 0.333	6021.3
9	6251.0 ± 2.752			
10	6344.9 ± 1.216	6349.2 ± 1.072		6321.2
11	6488.6 ± 0.233			
12	6671.7 ± 0.485	6675.8 ± 1.114	6672.8 ± 0.389	6646.3
13	6853.0 ± 3.517			
14	7194.7 ± 1.886	7204.9 ± 1.703		7171.3
15	7230.2 ± 0.476	7234.9 ± 1.362	7230.6 ± 0.335	7198.0
16	7573.4 ± 0.950			
17	7590.1 ± 0.305		7590.4 ± 0.424	
18	7886.7 ± 0.421	7893.1 ± 1.111	7886.6 ± 0.820	
19	8131.1 ± 0.786			
20	8349.0 ± 0.417	8356.1 ± 0.795	8349.7 ± 0.503	
21	8868.6 ± 1.323			
22	9293.6 ± 0.957			
23		9732.3 ± 1.022		9692.0
24		9987.8 ± 0.618		
25		11437.6 ± 1.060		
26		12307.4 ± 1.216		

Values are mean  $m/z$  values ± S.D.

表 4

MALDI-TOFMS peaks obtained from <i>S. aureus</i>				
Peak	A研究所	B研究所	C研究所	D研究所
1				3426.0
2		3878.3 ± 1.426		
3	4307.6 ± 1.406	4307.3 ± 0.403		
4	4514.3 ± 1.267			
5				4794.6
6	5032.2 ± 1.060	5032.5 ± 0.878	5031.7 ± 0.639	
7	5238.7 ± 1.307			
8	5303.4 ± 1.243			
9	5418.2 ± 1.337			
10	5437.4 ± 1.319			
11	5523.9 ± 1.052	5525.2 ± 0.869	5524.0 ± 0.240	5503.2
12	5730.8 ± 1.122	5731.4 ± 1.271		
13	5873.2 ± 1.560			
14	5931.6 ± 0.814			
15	6352.0 ± 0.806		6351.4 ± 0.599	
16	6421.3 ± 0.837			
17	6557.0 ± 0.549	6552.5 ± 2.356		6525.1
18	6843.8 ± 1.825			
19	6885.3 ± 0.715	6888.9 ± 1.430	6885.5 ± 0.499	6859.1
20	7018.0 ± 0.718			
21	7092.9 ± 0.591			
22				9585.1

Values are mean  $m/z$  values ± S.D.

表 5

MALDI-TOFMS peaks obtained from <i>S. enterica</i>				
Peak	A研究所	B研究所	C研究所	D研究所
1	3071.6 ± 1.058			
2	3412.1 ± 0.747			
3	3439.7 ± 0.975			
4	4364.5 ± 0.667	4365.5 ± 0.904	4365.1 ± 0.372	
5	4547.7 ± 0.276			
6	4568.3 ± 0.970			
7		4760.9 ± 0.669		
8	4920.5 ± 0.769			
9	4960.8 ± 0.688			
10				
11	5368.5 ± 1.335			
12			5380.0 ± 0.504	
13	5551.7 ± 1.639			
14	5576.2 ± 0.910			
15	5610.8 ± 0.437			
16	6006.4 ± 0.171			
17	6091.4 ± 0.203			
18	6252.9 ± 1.029	6255.2 ± 0.979	6253.5 ± 0.545	
19	6313.3 ± 1.106		6313.9 ± 0.417	
20	6569.9 ± 1.522			
21	7107.6 ± 2.077			
22		7123.2 ± 4.114		
23	7156.8 ± 1.684	7160.8 ± 1.202	7155.8 ± 0.311	
24	7193.6 ± 2.235			
25	7317.4 ± 2.997			
26	7657.1 ± 1.284			
27	7715.4 ± 2.179	7720.9 ± 0.904		
28	8365.4 ± 2.194	8370.1 ± 1.158		
29		8921.5 ± 1.249		
30	9395.5 ± 2.596	9242.5 ± 1.178		
31			9505.3 ± 0.740	
32	9518.5 ± 1.371	9518.9 ± 1.002		
33		9724.9 ± 2.857		
34		10288.6 ± 1.443		
35	10946.8 ± 3.341			

Values are mean  $m/z$  values ± S.D.

表 6

## Percent identity of 16S rRNA gene sequences

Species	Strains	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>E. coli</i>	NBRC 12734	1											
	NBRC 3972	2	99.1										
	NBRC 12713	3	99.7	99.3									
	NBRC 13168	4	99.4	99.5	99.3								
	NBRC 13891	5	99.9	99.3	99.8	99.5							
	NBRC 13893	6	99.7	99.3	100.0	99.3	99.8						
	NBRC 3301	7	99.7	99.0	99.7	99.2	99.5	99.7					
	NBRC 102203	8	99.5	99.0	99.5	99.2	99.7	99.5	99.3				
	NBRC 14237	9	99.7	99.2	99.7	99.3	99.8	99.7	99.4	99.6			
<i>E. fergusonii</i>	NBRC 102419	10	99.6	98.9	99.5	99.3	99.6	99.5	99.7	99.3	99.5		
<i>E. hermanii</i>	NBRC 105704	11	97.4	97.4	97.3	97.5	97.5	97.3	97.1	97.2	97.4	97.1	
<i>E. blattae</i>	NBRC 105725	12	95.9	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	95.8	95.8	95.9	96.0	95.8



医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究

－微生物の迅速検出法の確立－

分担研究者 山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生・微生物学）

協力研究者 川井真好 姫路獨協大学薬学部（衛生・微生物学）

研究要旨：第十六改正日本薬局方に参考情報として収載された蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法を、医薬品の微生物学的品質保証に活用するためには、そのプロトコールの簡便化が重要となる。そこで、非無菌医薬品の微生物管理における細菌数測定プロトコール作成のために、水溶性および不溶性の賦形剤に対する染色法を検討した。

A. 研究目的

環境微生物学分野における多くの研究により、自然環境中の微生物の大部分は通常の方法では培養困難であることが、明らかとなってきている。これにともない、微生物を培養することなく、迅速・簡便、さらには高精度に定量するための手法が検討されている<sup>1-8)</sup>。医薬品製造用水や生薬等においても培養困難な細菌の存在が報告されてきており、このような細菌の計数では、個々の細菌を蛍光試薬で染色し、直接観察する方法が有効である。

培養に依存しない細菌数測定法のうち、蛍光活性染色法は微生物細胞内のエステラーゼ活性を指標として、生菌を検出できる方法である。また、マイクロコロニー法は、フィルター上に捕集した細菌を培地上で短時間培養し、マイクロコロニーを形成させることにより、増殖能をもつ細菌を計数する方法である。

これらの方法の利点としては、操作が容易であり、かつ短時間で結果を得ることが

可能であることが挙げられる。通常、蛍光染色の操作は試料に染色液を添加するのみであり、蛍光活性染色法の染色時間は約30分である。またコロニー形成の初期段階で蛍光染色し、測定するマイクロコロニー法であっても、24時間以内に測定結果を得ることができる。したがって、細菌の検出に数日を要する培養法と比較して、短時間のうちに結果を得ることができる。

このような特長から、蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法が第十六改正日本薬局方第に参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」として収載され、その活用が期待されている。

非無菌医薬品の微生物管理として、原料、原薬、製剤などの細菌数測定および製造環境モニタリングが重要である。そこで、原料等に対して適切な前処理を行うことにより、蛍光活性染色法やマイクロコロニー法による生菌数測定が可能となる。

本研究では、非無菌製剤の製造に広く

用いられている賦形剤に混入した細菌を検出するためのプロトコールを検討した。

## B. 研究方法

### 1) 試料

標準菌株試料として、日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられている指標細菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276に加えて、*Escherichia coli* NBRC 3972を用いた。賦形剤として、乳糖およびタルクを用いた。試料溶液は各賦形剤1 g を9 mLのろ過滅菌水に溶解あるいは懸濁した。SCD 液体培地を用いて指標菌を30°Cで一晩培養した。菌液をマイクロチューブにとり、遠心分離により菌体を分離した後、ろ過滅菌水で洗浄した。適当な菌濃度になるようにろ過滅菌水に懸濁したものを、菌懸濁液とした。この菌懸濁液を前述の試料溶液に添加し、回収率を求めることにより、蛍光染色法による生菌数測定の妥当性を評価した。

### 2) 蛍光染色

CFDA-DAPI 二重染色法は局方収載の方法により行い、蛍光顕微鏡を用いて生菌数を測定した。試料を前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター（直径 25 mm、孔径 0.2 μm）上に捕集し、蛍光染色剤を添加後、約 3 分間染色を行った。蛍光顕微鏡の紫外線励起光および青色励起光下で細菌数を測定した。計数にあたっては、20 視野を計数し、細菌数の平均値が 2 以下、または細菌数の平均値が 0 となった視野数

が 5 視野以上の場合には、ろ過量を増やして試料を再調製した。

## C. 研究結果および考察

### 1) 水溶性賦形剤に対する蛍光活性染色法の適用

水に溶解可能な賦形剤として乳糖を選び、蛍光活性染色法による生菌数測定方法を検討した。

まず、大腸菌を用いて回収率を求めた。乳糖をろ過滅菌水に溶解し、大腸菌を加えた後、フィルター上に細菌を捕集し、DAPI 染色後に蛍光顕微鏡で計測した。同時に菌懸濁液のみをフィルターろ過し、接種菌量を求めた。その結果、表 1 に示したとおり、98% の良好な回収率を得た。

次に、通常の微生物限度試験の指標菌 (*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276) および大腸菌を乳糖に添加し、CFDA-DAPI 二重染色法によりエステラーゼ活性を有する細菌の回収率を求めた。その結果、いずれも 100% 以上の良好な結果を得た (表 2)。バックグラウンドも上がらず、試験が可能であることがわかった。しかしながら、指標菌として *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 を用いた場合、長桿菌であるために計測が困難であった。接種菌量を下げることにより計測可能であるが、測定誤差が大きくなると思われるため、この検出系における添加回収実験には不向きだと考えた。

以上の結果から、乳糖は 10 g を 90 mL のろ過滅菌水に溶解して試料溶液を調製し、蛍光活性染色法を行うことにより、生菌数が測定可能であるとわかった。

表 1 乳糖水溶液に添加した大腸菌の回収率

接種菌量 (cell)	回収菌量 (cell)	回収率 (%)
$9.7 \times 10^5$	$9.5 \times 10^5$	98

表 2 乳糖に添加した各指標菌（生菌）の回収率（CFDA-DAPI 二重染色法により測定）

指標菌	接種菌量 (cell)	回収菌量 (cell)	回収率 (%)
大腸菌	$8.4 \times 10^5$	$9.7 \times 10^5$	115
黄色ブドウ 球菌	$1.8 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$	106
緑膿菌	—	—	—
枯草菌	$6.0 \times 10^5$	$6.4 \times 10^5$	107

—：測定困難

## 2) 不溶性賦形剤に対する蛍光活性染色法の適用

水に不溶な賦形剤であるタルクを用いて、蛍光活性染色法による生菌数測定法を検討した。鉱物であるタルクには微生物が付着していることもあり、微生物汚染の問題を起こすことが多い。また、タルクは水のみならず、グリセリン、アルコール、酸やアルカリなどにも溶解しない脂質感に富んだ微粉末である。蛍光活性染色法によりタルクの生菌数を計測するためには、フローサイトメトリーや蛍光量を測定するなどの方法もあるが、フィルター上に菌を捕集できることが望ましい。このため、タルクから細菌を回収する方法を検討した。指標菌として大腸菌を用い、検討した。

1 g のタルクを 9 mL のろ過滅菌水に懸濁して試料溶液を調製し、5  $\mu\text{m}$ 、3  $\mu\text{m}$ 、およ

び 1  $\mu\text{m}$  の孔径のセルロース混合エステル製フィルターを用いて試料をプレろ過した。プレろ過した溶液に菌を接種し、蛍光染色法により回収率を測定したところ、5  $\mu\text{m}$  孔径のフィルターではタルク由来のバックグラウンドが高く菌の検出が困難であった（表 3）。一方、3  $\mu\text{m}$  および 1  $\mu\text{m}$  孔径のフィルターでは 100% 以上の良好な回収率が認められた。このため、3  $\mu\text{m}$  および 1  $\mu\text{m}$  孔径のフィルターによるプレろ過を行うことにより、生菌数を測定できる可能性が認められた。

次に、1 g のタルクを 9 mL のろ過滅菌水に懸濁した溶液に菌を添加し、1  $\mu\text{m}$  孔径のフィルターを用いて試料をプレろ過し、さらにろ過滅菌水 10 mL で 3 回洗浄した全ろ液を蛍光染色法により染色した。菌の回収率を求めたところ、0.02% 以下と低い値を示した（表 4）。

タルクは表面が滑らかで微細な粒子であるが、水を含みこの粒子が集まると粘性を示す。このため、プレろ過時のケーキに付着した菌体を回収できていないものと考えられる。そこで、洗浄液に 0.05% のポリソルベート 80 を加えて洗浄を行ったところ 0.04% と回収率は少し上昇した。また、同様に 3  $\mu\text{m}$  孔径のフィルターを用いてプレろ過し、洗浄液に 0.05% のポリソルベート 80 を加えて洗浄を行ったところ、0.06% と回収率はさらに少し上昇した。しかしながら、いずれも回収率の向上に大きな効果は認められなかった。

洗浄液に 1% までのポリソルベートを加えることは認められている。しかしながら、ポリソルベート 80 は細菌捕集用の黒色フィルターを脱色するため、バックグラウン

ドを上昇させ蛍光の検出を困難にする可能性がある。今後、さらに細かな前処理法の検討を加え、回収率の上昇を試みる予定である。

表3 タルクの生菌数測定におけるプレろ過用フィルターの孔径の検討

プレろ過用 フィルターの 孔径 (μm)	接種菌 量 (cell)	回収菌量 (cell)	回収率 (%)
5	$1.1 \times 10^6$	—	—
3	$1.1 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	100
1	$1.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	109

—：残留物が多く測定困難

表4 タルクの生菌数測定におけるプレろ過での洗浄方法の検討

フィルターの 孔径 (μm)	洗浄液	接種菌 量 (cell)	回収菌 量 (cell)	回収 率 (%)
1	水で3回	$9.9 \times 10^5$	$< 2.1 \times 10^4$	$< 0.02$
1	水で2回、 0.05%P80 1回	$9.9 \times 10^5$	$4.0 \times 10^4$	0.04
3	水で2回、 0.05%P80 1回	$9.9 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$	0.06

P80：ポリソルベート 80

#### D. 結論

今回の研究では、水に溶解可能な賦形剤として乳糖、水に不溶な賦形剤としてタルクを選び、混入した細菌を蛍光活性染色法 (CFDA-DAPI 二重染色法) により検出するためのプロトコールを検討した。その結果、

水溶性の賦形剤では前処理をすること無く高精度な検出が可能であった。一方、不溶性の賦形剤では前処理法の十分な検討が必要であることを確認した。今後、不溶性の賦形剤に対し、プレろ過を中心とする前処理法を検討することにより、医薬品の微生物学的品質保証において蛍光活性染色法を活用できるものと考えられる。また、蛍光活性染色法だけでなく、マイクロコロニー法も検討することにより、より高精度な生菌数測定が可能になり、ヨーロッパ薬局方、米国薬局方に対して、日本からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うことが可能になるものと考えられる。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 山口進康、那須正夫：蛍光染色による細菌数の迅速測定法。じほう, 102-105、日本薬局方 技術情報 2010 (財団法人日本公定書協会 編) (2010)
- 2) Nobuyasu Yamaguchi, Hatsuki Hieda and Masao Nasu.: Simple and reliable swabbing procedure for monitoring microbes in the International Space Station. *Eco-Engineering*, **22**: 27-30 (2010)
- 3) Tomoaki Ichijo, Yoko Izumi, Nobuyasu Yamaguchi and Masao Nasu.: Rapid enumeration of respiratory active mycobacteria with fluorescent double staining. *J. Microbiol. Methods*, **82**: 327-329 (2010)

##### 2. 学会発表

- 1) N. Yamaguchi, Y. Uebayashi, M. Torii

- and M. Nasu: Rapid enumeration of *Legionella pneumophila* in aquatic environment by using a microfluidic device, ASM 2010 General Meeting (2010, 5)
- 2) T. Baba, K. Tani, N. Yamaguchi and M. Nasu: Inactivation of bacteria in aquatic environment by momentary decompression following high pressurization, ASM 2010 General Meeting (2010, 5)
  - 3) T. Ichijo, Y. Izumi, N. Yamaguchi and M. Nasu: Rapid detection of respiratory active *Mycobacteria* by multicolor imaging, ASM 2010 General Meeting (2010, 5)
  - 4) T. Ichijo, Y. Izumi, N. Yamaguchi and Masao Nasu: Rapid enumeration of respiratory active *Mycobacteria* with fluorescent double staining, ISME-13 (2010, 8)
  - 5) T. Ichijo, T. Baba, N. Yamaguchi and M. Nasu: Estimation of abundance of bacteria on Asian dust by quantitative PCR, ISME-13 (2010, 8)
  - 6) N. Yamaguchi, Y. Uebayashi, M. Torii and M. Nasu: Rapid monitoring of *Legionella pneumophila* in aquatic environment by using a microfluidic device, ISME-13 (2010, 8)
  - 7) 一條 知昭, 和泉 陽子, 中本 小百合, 山口 進康, 那須 正夫: Auramine O-CTC 二重染色法の呼吸活性をもつ MAC (*Mycobacterium avium* complex) の迅速検出への応用、フォーラム 2010 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010, 9)
  - 8) 一條 知昭, 馬場 貴志, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂とともに飛来する細菌の現存量、フォーラム 2010 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010, 9)
  - 9) 山口 進康, 石原 理絵, 大野 愛子, 那須 正夫: 粘着集菌シートを用いた国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング、フォーラム 2010 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010, 9)
  - 10) 馬場 貴志, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 連続的な加圧・減圧処理による細菌の不活化、日本温泉科学会第 63 回大会 (2010, 9)
  - 11) 馬場 貴志, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 連続的な加圧・減圧処理による細菌の不活化、第 100 回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010, 9)
  - 12) 山口 進康, 那須 正夫: 細菌迅速検出法の現状と課題、日本防菌防黴学会第 37 回年次大会 (2010, 9)
  - 13) 馬場 貴志, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 連続的な加圧・減圧処理による細菌の不活化、日本防菌防黴学会第 37 回年次大会 (2010, 9)
  - 14) N. Yamaguchi, T. Ichijo, Y. Himesawa, K. Enoki, M. Saraya, T. Baba and M. Nasu: Abundance and population structure of bacteria on Asian dust determined by PCR-based approaches, 4th International Symposium on Environment of Rim of the Japan/East Sea (2010, 10)
  - 15) 山口 進康, 松川 周平, 新留 洋子, 那須 正夫: マイクロチップ電気泳動

- を用いた水環境中の細菌群集プロファイリング、日本微生物生態学会第26回大会(2010、11)
- 16) 馬場 貴志, 一條 知昭, 更家 信, 榎木 香奈美, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂とともに飛来する細菌の多様性、日本微生物生態学会第26回大会(2010、11)
- 17) 一條 知昭, 馬場 貴志, 姫澤 由佳, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂とともに飛来する細菌の現存量、日本微生物生態学会第26回大会(2010、11)
- 18) 山口進康, 稗田はつき, 一條知昭, 那須正夫: 国際宇宙ステーションから回収した機器における細菌の現存量、第27回宇宙利用シンポジウム(2011、1)
- 19) N. Yamaguchi, T. Ichijo and M. Nasu : A new sampling device, "microbe-collecting adhesive sheet", for sampling microbial cells on solid dry surfaces, *Geobiology in Space Exploration* (2011, 2)
- 20) 高木 達也, 川下 理日人, 白国優子, 平井 啓, 服部 千鶴子, 岡本 晃典, 藤原 拓也, 山口 進康, 那須 正夫: サリドマイド安全使用のための薬剤管理に関する調査 —その2—、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 21) 白国 優子, 藤原 拓也, 須磨 一夫, 平井 啓, 服部 千鶴子, 岡本 晃典, 川下 理日人, 山口 進康, 那須 正夫, 高木 達也: 要管理医薬品の回収・指導に関する調査、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 22) 山口 進康, 石原 理絵, 大野 愛子, 那須 正夫: 粘着集菌シートを用いた国際宇宙ステーション「きぼう」の細菌モニタリング、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 23) 山口 進康, 井口 洋平, 那須 正夫: マイクロ流路システムを用いた水環境中の細菌の迅速モニタリング、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 24) 山口 進康, 稗田 はつき, 一條 知昭, 那須 正夫: 国際宇宙ステーション内で使用されていた画像変換システム内部における細菌現存量、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 25) 一條 知昭, 和泉 陽子, 中本 小百合, 山口 進康, 那須 正夫: 住環境における非結核性抗酸菌の動態解明、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 26) 馬場 貴志, 姫澤 由佳, 一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫: レーザー顕微鏡を用いた黄砂粒子に付着している微生物の可視化、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 27) 一條 知昭, 馬場 貴志, 迫谷 有希子, 谷 佳津治, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂現象に伴って移動する細菌の現存量、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 28) 馬場 貴志, 更家 信, 一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫: 黄砂現象に伴って移動する細菌の多様性、日本薬学会第131年会(2011、3)
- 29) 馬場 貴志, 榎木 香奈美, 一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫: 増殖活性にもとづいた黄砂現象に伴って移動する細菌の系統解析、日本薬学会第131年会(2011、3)

30) 藤村 真穂, 吉岡 靖雄, 山下 浩平,  
東阪 和馬, 森下 裕貴, 藩 慧燕, 小  
椋 健正, 鍋師 裕美, 吉川 友章, 伊  
藤 徳夫, 馬場 貴志, 山口 進康, 那  
須 正夫, 堤 康央: 黄砂の健康リス

ク評価を目指した免疫毒性学的解析、  
日本薬学会第 131 年会 (2011、3)

厚生労働科学研究費補助金  
(厚生労働省医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

日本版「無菌操作法指針」の改正

研究分担者：

佐々木次雄（医薬品医療機器総合機構、品質管理部）

研究協力者：

浦山由巳	千代田化工建設（株）
片山博仁	バイエル製薬（株）
小久保 護	渋谷工業（株）
小暮慶明	東和薬品（株）
小林一幸	日本イーライリリー(株)
佐々木裕子	国立感染症研究所
白木澤 治	ファルマ・ソリューションズ（株）
高橋充博	アステラス富山(株)高岡工場
立石伸男	中外製薬（株）
谷 壽一	シーアンドエス（株）
内藤 貴博	塩野義製薬（株）
西畑利明	参天製薬（株）
原 芳明	ザルトリウス・ステディム・ジャパン株
原田敏和	参天製薬（株）
樋本 勉	参天製薬（株）
平嶋直樹	武田薬品工業（株）
曲田純二	日本ミリポア（株）
村上大吉郎	（株）大気社

（医薬品医療機器総合機構，品質管理部）

加藤博史，齊藤幸夫，櫻井信豪，鈴木 祥悟，鷺見裕，鳴瀬諒子



研究要旨：平成18年7月4日、厚生労働科学研究（医薬品医療技術リスク評価研究事業）「無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究」班で作成した、“無菌操作法による無菌医薬品の製造指針”が監視指導・麻薬対策課より地方庁に事務連絡として発出された。本指針は無菌医薬品製造所においてGMPを補完するものとして、また規制当局にとってはGMP調査時の参考資料として活用されてきた。日本はPIC/S加盟を目指していることもあり、PIC/SのAnnex 1 (Manufacture of sterile medicinal products)との整合性を図りながら改訂作業にあたってきた。計7回の班会議における議論と、日薬連品質委員会を通じ、日薬連傘下団体から250を超えるコメントをいただき、その一つ一つについて検討を加えて最終案を作成し、2011年3月22日、監視指導麻薬対策課に提出し、地方庁への事務連絡通知の発出を待っているところである。

また、平成22年度から“最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針（平成19年6月4日、監視指導・麻薬対策課より事務連絡）”の改正作業に着手し、これまでに2回の班会議を開催し、輸液製剤の低Fo滅菌処理条件について議論してきた。

#### A. 研究目的

日本と欧州共同体は、2001年4月に「相互承認に関する日本国と欧州共同体との間の協定（日欧MRA）」に署名し、同協定は2002年1月に発効した。医薬品のGMPに関するMRAには無菌医薬品、バイオ医薬品、原薬は含まれなかった。無菌医薬品が含まれなかった理由の一つとして、当時の日本には無菌医薬品製造に関する指針の無いことがあげられた。そこで、監視指導・麻薬対策課（以下、「監麻」という。）からの要請もあり、「無菌操作法」と「最終滅菌法」に関する指針を作成した。両指針ともに監麻から事務連絡として発出され、無菌医薬品製造所ではGMPを補完する情報として、また規制当局はGMP調査時の参考資料として活用してきた。無菌医薬品製造に関する国際規格や欧米の基準が一部改正されたこともあり、改正事項との整合性を考慮に入れつつ、

全体的な見直しを行うことにした。また、監麻から発出された“事務連絡”の位置づけが曖昧なこともあり、今回の改正版を医薬品医療機器総合機構（品質管理部）のホームページにも掲載し、国内外に日本の規範指針であることを示すことも検討している。

#### B. 研究方法

研究協力者は、GMP調査官である医薬品医療機器総合機構から6名、生物学的製剤の無菌性保証を担当している国立感染症研究所から1名、民間企業から17名で構成されている。21名中11名は、平成18年版「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」作成にも従事した。平成18年版指針をベースに各章毎に見直し担当者を決め、更に見直し担当者を4グループに分けてグループ内で検討の上、コンセンサスの得られた改正案を班会議で検討することによって、作業の効率化を図って

きた。平成 21 年度に 3 回、平成 22 年度に 4 回の計 7 回の班会議を開催した。またパブコメを日薬連品質委員会に求め、日薬連傘下団体から 250 を超える有意義なコメントをいただいた。コメントの多くを反映させ、最終案とし、監麻課に提出した。

### C. 研究結果

現行指針の各項目について、国内基準としては省令 GMP 及び薬局等構造設備規則、国外基準としては ISO 13408-1 (2008)、WHO-GMP (2010)、EU-GMP Annex 1 (2009)、FDA 無菌操作法ガイダンス (2004)、PIC/S Annex 1 (2009) と比較し、これらと相違がある場合には追加もしくは修正案を提案していただき、それらをベースにグループ内で検討した上で、班会議で議論した。

### D. 考察

無菌医薬品は、大別すると「無菌操作法」又は「最終滅菌法」と称する方法で製造される。3 年間の研究班活動の第 1 年度～2 年度で「無菌操作法指針」の見直し、第 2 年度～3 年度で「最終滅菌法指針」を見直す予定である。「無菌操作法指針」は監麻課からの発出後、医薬品医療機器総合機構（品質管理部）のホームページにも掲載する予定である。また、英訳版の作成も行う。本来、無菌医薬品の製造指針は世界共通であることが望ましいが、GMP に対する各国の考え方の違いや文化

的背景の違い等により、要求事項の細部は必ずしも共通ではない。1993 年に培地充てん試験が WHO に導入された頃は、1000 容器以上に充てんし 0.3% の汚染までは許容されていたが、現在では 5000 容器以上に充てんし、許容汚染はゼロである。このように時代とともに無菌医薬品に対する無菌性保証水準は高まり、現在では液剤、乾燥製剤の別を問わず、超高度な無菌性が求められている。そのため、本指針の改正作業においても高度な無菌性保証の観点から見直しを図ってきた。

### E. 結論

「無菌操作法指針」の改正作業を終了し、近々、監麻課から事務連絡として発出予定である。事務連絡の発出後直ちに英訳版の作成に入り、和文、英文ともに医薬品医療機器総合機構のホームページ（GMP）で公開し、広く内外に知っていただくようにする。無菌医薬品に関して、EU との MRA 締結の動きもあり、指針が整備されたので無菌医薬品に対する MRA 締結もスムーズに進むものと期待される。

### F. 健康危険情報

時になし。

### G. 研究発表

なし

### H. 知的所有権の取得状況

なし

【資料 1】

平成22年度厚生労働科学研究(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究

主任研究者: 室井正志(武蔵野大学薬学部, 環境衛生学)

## 無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針

### ●「無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」作成班●

分担研究者:

佐々木次雄 (医薬品医療機器総合機構, 品質管理部)

協力研究者:

浦山由巳 (千代田化工建設株式会社医薬品プロジェクト部)  
片山博仁 (バイエル製薬株式会社)  
小久保護 (澁谷工業株式会社)  
小暮慶明 (東和薬品株式会社)  
小林一幸 (日本イーライリリー株式会社)  
佐々木裕子 (国立感染症研究所細菌第二部)  
白木澤治 (ファルマ・ソリューションズ株式会社)  
高橋充博 (アステラス富山株式会社高岡工場)  
立石伸男 (中外製薬株式会社)  
谷 壽一 (シーアンドエス株式会社)  
内藤 貴博 (塩野義製薬株式会社)  
西畑利明 (参天製薬株式会社研究開発本部)  
原 芳明 (ザルトリウス・ステディム・ジャパン株式会社)  
原田敏和 (参天製薬株式会社信頼性保証本部)  
樋本 勉 (参天製薬株式会社生産物流本部)  
平嶋直樹 (武田薬品工業株式会社)  
曲田純二 (日本ミリポア株式会社バイオフィーマシューティカル事業本部)  
村上大吉郎 (株式会社大気社環境システム事業部)

(医薬品医療機器総合機構, 品質管理部)

加藤博史, 齊藤幸夫, 櫻井信豪, 鈴木 祥悟, 鷺見裕, 鳴瀬諒子

**【初版指針作成者】**

平成17年度厚生労働科学研究(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究

浦山由巳, ○川村邦夫, 小久保護, 小暮慶明, ○佐々木次雄, 佐々木学, 佐々木裕子, 白木澤治, 菅谷真二, ◎棚元憲一, 谷壽一, 西畑利明, 原芳明, 樋本勉, 藤田弘之, 曲田純二, 水田泰一, 村上大吉郎, (◎:主任研究者, ○:分担研究者)