

2014-27027A

厚生労働科学研究費補助金

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
(医薬品等規制調和・評価研究事業)

医薬品の微生物学的品質確保のための
高度試験法導入に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚元 憲一

平成27(2015)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法導入に関する研究	1
棚元 憲一	
(資料)	
添付資料 I-1	18
添付資料 III-1	33
添付資料 III-2	26
添付資料 III-3	38
参考資料	44
II. 分担研究報告	
1. 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の評価	63
棚元 憲一	
(資料)	
添付資料 1	68
2. 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究	83
山口 進康	
3. 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究	91
片山 博仁	
(資料)	
添付資料 1	99
添付資料 2	102
添付資料 3	104
参考資料	110
添付資料 4	112
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	128

医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法導入に関する研究

研究代表者 棚元憲一 武蔵野大学薬学部教授

研究要旨：日本薬局方には医薬品の微生物学的品質確保のためいくつかの微生物試験法が規定されているが、これらの試験法は随時科学の進歩、国際的な変化に歩調を合わせて改善もしくは新規試験法の導入を図らなければならない。そのような観点から本研究では、1. 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン測定用試薬の開発、2. 細菌数迅速測定法のバリデーションにかかる基盤データの構築、3. 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究、の3研究を行った。本年度は組換えエンドトキシン比色試薬を分析法バリデーションに従い、既存エンドトキシン測定試薬との間での同等性を評価し、組換え試薬が薬局方エンドトキシン試験法に適用可能であることを確認した。また、非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコルの作成のために、代表的な非無菌製剤原料（水溶性基剤、油脂製基剤、乳剤性基剤）への細菌数迅速測定法の適用を検討した。また、検討を行った各前処理条件を用いて、非無菌製剤原料の生菌数を蛍光活性化染色法により測定し、従来の培養法により得られた生菌数と比較することにより、蛍光活性化染色法の有用性を確認した。さらに、製薬関連企業15社における共同実験により、「硬質表面キャリアー法」が消毒剤の有効性を的確に評価する方法として実用可能な方法であることが確認し、日本薬局方参考情報「微生物殺滅法」の改訂案を作成した。

研究分担者

元憲一 武蔵野大学薬学部 教授
山口 進康 大阪大学大学院薬学研究科
准教授
片山 博仁 バイエル薬品株式会社
本部長

善もしくは新規試験法の導入を図らなければならない。そのような観点から本研究では、①遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン測定用試薬の開発、②細菌数迅速測定法のバリデーションにかかる基盤データの構築、③無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究、の3研究を行う。

A. 研究目的

日本薬局方には医薬品の微生物学的品質確保のためいくつかの微生物試験法が規定されているが、これらの試験法は随時科学の進歩、国際的な変化に歩調を合わせて改

エンドトキシン試験法の必須資源であるカプトガニの資源確保が危惧されることから、①では、遺伝子組換えにより作成したエンドトキシン活性化経路3因子のカスケ

ード反応を用いた高感度・高精度なエンドトキシン測定試薬の開発を行うが、この手法では単に天然因子を人工的に構築するだけでなく、遺伝子の一部を改変することにより、エンドトキシンに対する感度や熱安定性、自己分解抵抗性の向上させることができるという利点がある。また酵素反応を競合的に阻害する不純物を含まないこと、さらにゲル形成による不均一な濁度上昇も生じないことから、測定感度および精度の向上が期待される。世界をリードする研究である。

医薬品の微生物管理のために高精度な迅速法が期待されており、FDA や PDA でも積極的な動きがある。このような世界的な動向をふまえ、日局においても新手法導入に向けて必要な課題の解決を図る必要がある。重要な課題の一つにバリデーション法の構築がある。現在広く用いられている培養法は微生物の増殖が指標であるのに対し、新手法では核酸含量や酵素活性など生物学的な特徴を指標とするため、培養法と同じ値は得られない。従って様々な検体について培養法と比較し、新手法の基準値を考察する必要がある。②では、まず種々の試料につき培養法と新手法で微生物数を比較し、培養法でのバリデーション条件（菌種、添加量等）をもとに、新手法のバリデーション法を考察するための基盤的データを得る。

「無菌医薬品製造区域における環境モニタリング法」は、関連する欧米のガイダンスと比較すると基準の一部にギャップがあり、日本の業界が実際に行っているモニタリングの実績も考えた上で、グローバルに齟齬のない基準に改定する必要がある。また、ISO14644 の改定の反映や、ICHQ9 で導

入されたリスクベースの考え方の導入、進化する新しい技術の導入も重要と考えられる。また「滅菌法および滅菌指標体」の項では、現在記述されている高圧蒸気滅菌法は従来型の一部の装置の記述でしかないため、現在使用されている各種派生技術をも包括できる内容に改定することが有用と考えられる。また滅菌指標体の使用者と製造者に関する情報もグローバルな視点で日本での情報が不足とならないように整備する必要がある。③ではこれらの無菌医薬品関連の参考情報の充実と再構築を目指すものである。

B. 研究方法

1) 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法

用いた3種のライセート試薬を表 I-1 に示す。ライセート試薬は各メーカーの添付文書または推奨法に従い測定およびエンドトキシン (Et) 測定値の算出を行った。組換え試薬の反応速度法はライセート試薬 1 の操作法に従い、測定および Et 測定値の算出を行った。組換え試薬の反応時間法は波長 405 nm における吸光度を 15 秒間隔で 30 分間または 60 分間測定し、測定開始から吸光度が 0.015 Abs (30 分測定の場合) または 0.150 Abs (60 分測定の場合) 上昇するまでの時間を指標に Et 測定値を算出した (表 I-1)。

組換え試薬およびライセート試薬の各種 Et に対する反応性を検討するため、Et 13 種 (表 I-2) につき USPRSE に対する相対活性 (EU/ng) を求めた。Et は注射用水で溶解し、溶解できなかったものについては 0.1% トリエチルアミン (TEA) で溶解した。これら

の希釈は注射用水で行った。USPRSE は各試薬で推奨される濃度を調製し (表 I-1)、各種 Et は注射用水で 2 または 10 倍希釈し、それぞれ 5 濃度を測定に供した (表 I-2)。組換え試薬は 3 ロットの測定値の平均値、ライセート試薬は 1 ロットの測定値で解析を行った。USPRSE に対する各種 Et の相対活性は USPRSE の検量範囲に含まれる 3 点以上の Et の濃度を使用し、平行線定量法 (Bioassay assist ; 国立感染症研究所頒布ソフト使用) により求めた。つまり、x 軸に USPRSE の用量の対数変換値を、y 軸に反応速度法ではブランク値を差し引いた測定値の対数変換値を、反応時間法では測定値の二重対数変換値をプロットし、解析した。次いで、前述の平行線定量法により算出された組換え試薬とライセート試薬での 13 種の Et の USPRSE に対する相対活性を xy 軸それぞれに両対数プロットし、回帰分析を行なった。

医薬品の反応干渉因子試験は 1 ロットの組換え試薬および表 I-1 に記載の 3 種のライセート試薬を 1 ロットずつ用いた。注射用水を除く入手可能であった代替品を含む 109 品目 (表 I-4-1~I-4-6) について日本薬局方のエンドトキシン試験法記載の反応干渉因子試験を実施した。粉末または凍結乾燥品の医薬品は注射用水または医薬品に添付された溶液で溶解した (原液濃度を表 I-4-1~I-4-6 に示す)。医薬品は必要に応じて注射用水で 2 倍もしくは 10 倍ずつ希釈した。医薬品の原液または希釈液には各試薬の検量線の中点濃度となるよう JPRSE を添加した。検量線の作製に用いる JPRSE 濃度は、各試薬で推奨される濃度に調製した (表 I-1)。それぞれの試薬の操作法に従い、これらの

医薬品、JPRSE を添加した医薬品および JPRSE を測定した。Et 添加試料の Et 濃度 (測定値) から Et 回収率を計算し、反応干渉因子が試料溶液中に存在しない、すなわち Et 回収率が 50% から 200% の範囲となる最小の希釈倍数である Non Interfering Dilution (NID) を求めた。

室間再現精度の評価を検討するため、2 年目で報告した組換え試薬の反応時間法でのプロトコールに従い、USPRSE の検量線の各濃度における測定値を求めた。今年度は武蔵野大学において測定者 1 名、測定機 1 台、測定日 2 日、試薬 3 ロットで合計 6 測定を実施した。今年度の結果に昨年度に得られた結果 (測定者 2 名、測定機 2 台および試薬 3 ロットの計 12 測定を生化学工業株式会社にて実施) を加え、これら 18 回のデータから各 USPRSE 濃度における Et 測定値を求めた。これらの Et 測定値を対数変換し、その絶対値から相対標準偏差 (CV) を算出し、90% 信頼区間を下記の式より求めた。

$$(n-1)SD^2 / \chi^2(n-1, 0.05) \leq \sigma \leq (n-1)SD^2 / \chi^2(n-1, 0.95)$$

判定基準は検量線の Et 濃度が定量下限の場合、Et 測定値の CV の 90% 信頼区間が 20% 以下であり、定量限界より高い Et 濃度の場合、CV の 90% 信頼区間が 15% 以下であることとした。

また、上述の Et 測定値 (対数変換値) を用いて、2 施設 (因子 1) および全てのロットにおける 5 つの Et 濃度 (因子 2) の組合せから、繰り返しのある 2 元配置の分散分析を行った。

2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

標準菌株として、*Escherichia coli* NBRC 3972 の他、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 *Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* NBRC 13276、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、さらに嫌気性菌として *Clostridium sporogenes* NBRC14293 を用いた。各菌株を SCD 液体培地に植菌し、30℃ 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回収した後、ろ過滅菌水で洗浄した。適切な菌量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。

各非無菌製剤原料中の細菌を検出するための前処理条件の検討にあたり、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に記載されている以下の溶解剤および中和剤を用いた。濃度については、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に記載されている溶解剤や中和剤の中で最も高い濃度の溶液とした：

- ジメチルスルホキシド
- グリシン
- チオ硫酸ナトリウム
- ミリスチン酸イソプロピル
- ポリソルベート 80
- ポリソルベート 20
- n-オクタン
- Span80

前述の菌懸濁液に上記の溶解剤や中和剤を添加し、試料とした。微生物試験の操作時間を 30 分間と考え、室温で 30 分間試料溶液と反応させた後、後述の CFDA-DAPI 二重染色法により染色し、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定した。

非無菌製剤原料の前処理条件の検討には、水溶性基剤としてマクロゴール、油脂性基剤として白色ワセリン、乳剤製基材として吸水軟膏を用いた。

また、生菌数の測定にあたっては、水溶性固形原料として乳糖、不溶性固形原料としてタルク、ステアリン酸マグネシウム、色素として黄色 5 号、軟膏基剤としてマクロゴール、白色ワセリン、吸水軟膏を対象とした。

CFDA-DAPI 二重染色は第 16 改正日本薬局方・参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」に従い、蛍光顕微鏡を用いて細菌数を測定した。試料を今回検討した各条件で前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター（黒色、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。蛍光顕微鏡の青色励起光下で CFDA により染色された細菌数（生菌数）、紫外線励起光下で DAPI により染色された細菌数（全菌数）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。

また、同試料について、第 16 改正日本薬局方「微生物限度試験法」に従って、培養法により生菌数を求め、蛍光染色法により得られた値と比較した。

3) 無菌医薬品質確保のための製造と管理の技術に関する研究

共同実験は共通のプロトコルを作成して条件を一定にし、消毒剤ごとに各社で分担して評価を実施した。室内再現性を評価するために、各社で同一条件の実験を複数回行った。また、室間再現性を評

価するために、同じ消毒剤の評価を2つ以上の試験室で実施し、得られた結果を比較することとした。更に、消毒剤の有効性評価法を実用的な内容とするために、共同実験の実施時に得られた操作上の注意点等を抽出し、それらへの対策の提案も実施することとした。

プロトコルの作成に際しては、事前に以下の①から④の調査・検討を実施し、試験条件を確定した。

① 消毒剤の種類とその濃度

医薬品製造施設で使用されている消毒剤とその濃度を調査した。調査は日本PDA製薬学会無菌製品GMP委員会参加企業に対して聞き取り調査を行い、そこで得られた情報を基に汎用性の高い消毒剤の有効成分と使用されている濃度を集約した。集約結果を表III-1に示す。消毒剤の使用濃度については、消毒剤メーカーが器具や構造設備等へ適用する際に添付文書で推奨しており、医薬品製造施設で汎用されている濃度でもある。共同実験においては、汎用される使用濃度の下限をワーストケースとして採用し、供試することとした。

表 III-1. 医薬品製造施設で汎用されている消毒剤とその濃度

消毒剤	使用濃度
過酸化水素	3%
過酢酸	0.2 ~ 0.3%
次亜塩素酸ナトリウム	0.02 ~ 0.05%
イソプロパノール	50 ~ 70%
エタノール	70%

ベンザルコニウム塩化物	0.05 ~ 0.2%
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05 ~ 0.5%
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05 ~ 0.5%

② 評価対象とする構造設備の材質

医薬品製造施設の清浄区域又は無菌操作区域で使用される各種構造設備の表面の材質を調査した。調査は日本PDA製薬学会無菌製品GMP委員会参加企業に対して聞き取り調査を行い、そこで得られた情報を基に汎用性の高い構造設備の材質を集約した。集約結果を表III-2に示す。共同実験においては、これら材質のテストキャリアーを準備し、供試することとした。

表 III-2 構造設備の材質

材質	適用例
ステンレス	作業台, タンク, 機器類
ガラス	窓, 遮蔽板
ポリカーボネート	遮蔽板, 容器
化粧ケイ酸カルシウム (化粧材質: ポリエステル樹脂, ウレタン樹脂等)	壁, 天井
エポキシ樹脂コート	床
塩化ビニル	床, カーテン, ビニル袋
硬質ウレタンゴム	床
ニトリルゴム	手袋

③ 試験菌の接種と回収方法

硬質表面キャリアー法では、各種表面材質のキャリアー上に既知数の試験菌と

消毒剤を接種、一定時間作用させた後、生残菌数を計測し、菌数減少量を算出することで消毒剤の有効性を評価する。USP、EN 等の海外の公定書に掲載されている方法では、テストキャリアーに試験菌液を接種した後、乾燥を実施することが規定されている。しかし、微生物全般に言える特徴として、「乾燥」によって、微生物の発育が抑制されることや比較的容易に死滅する微生物の存在が知られており、その影響が高いと消毒剤接種前に菌数が減少し、効果の確認に必要な初期菌数が得られなくなる等、正確な消毒剤の効果を判断することが困難となる。そのため、乾燥による微生物の影響を調査した。

ステンレス製キャリアーに表 III-3 に示した試験菌液を接種し、乾燥させた後、滅菌水を用いてキャリアー上の生残菌を回収し、計測した。その結果、細菌 3 種及び酵母の著しい菌数減少を認めた。この情報を基にキャリアーへ接種する菌数の増量、材質による回収率の変動、試験者間の操作誤差等について追加調査を行ったが、効果的な対策を見つけることは困難であった。この条件で実験を実施すると、乾燥だけで消毒効果の判定基準に近い菌数減少が発生することがあり、またその減少量を一定にすることは困難であること、再現性良く消毒剤の効果の評価するために必要な菌数が得られない可能性が高いことから、共同実験においては、試験菌液接種量を 50 μL として、キャリアー上の水分量を必要最低限とすると共に、試験菌を固定させるための放置時間を最短とし、接種菌が乾燥する前に

次の操作に移行することとした。詳細は添付資料 III-1 に示す。

表 III-3. 試験菌

試験菌	状態
<i>Escherichia coli</i>	新鮮培養菌
<i>Staphylococcus aureus</i>	新鮮培養菌
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	新鮮培養菌
<i>Bacillus subtilis</i>	芽胞液
<i>Candida albicans</i>	新鮮培養菌
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	孢子懸濁液

④ 消毒剤の中和方法

硬質表面キャリアー法では、キャリアー上の生残菌に対する消毒剤の作用を中和しながら試験菌を回収する必要がある。そのため、共同実験で採用する消毒剤及びその濃度を対象に、中和剤を含む回収液の組成を検討した。中和剤としては日本薬局方 微生物限度試験法の「阻害物質に対する一般的な中和剤/中和法」の表に記載されている大豆レシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウムの他、L-ヒスチジンや過酸化水素等の分解に汎用されるカタラーゼ等を用い、それらの配分を変動させながら回収液の組成を検討した。

回収液としての組成候補液を数種類調製し、その 10mL 中に消毒剤 100 μL (キャリアー表面の消毒剤を回収する液量は 100 μL であり、それと同量とした) を接種したものを試料溶液として、日本薬局方 一般試験法 微生物限度試験法の「測定法の適合性」と同じ要領で操作を行い、得られた回収率を確認することで回収液組成としての有用性を評価した。

各成分の量を調整しながら評価した結果、表 III-4 に示す組成の回収液により、表 III-1 に示した汎用消毒剤の何れを添加しても、接種した試験菌を 50 ~ 200% の範囲で回収できることが示された。この結果を基に、共同実験で使用する回収率の組成を表 III-4 のとおりとした。回収率の詳細データは添付資料 III-2 に示す。

回収液の組成を検討する過程で、最も中和が困難な消毒剤は過酢酸であった。過酢酸の場合、日本薬局方 微生物限度試験法の「阻害物質に対する一般的な中和剤/中和法」の表に記載されている中和剤のみでは、それらを高濃度で添加しても試験菌の回収は困難であったが、カタラーゼ及びチオ硫酸ナトリウムを併用することで改善することが可能となった。カタラーゼは熱により分解するため、回収液調製時にはろ過操作が必要となることに留意する必要がある。なお、共同実験においては、統一した中和方法を採用することとしたが、消毒剤によっては希釈のみで中和が可能であったり、使用する成分が少なくても中和が可能であったりと最適な中和方法は異なることが想定される。

表 III-4 回収液の組成 (1000 mL 中)

成分	最終濃度	秤取量
大豆レシチン	0.50%	5.0 g
ポリソルベート 80	4.00%	40.0 g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.50%	5.0 g
L-ヒスチジン	0.20%	2.0 g
リン酸二水素カ	(15 mM)	2.0 g

リウム		
カタラーゼ ^{※1}	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

※1 : カタラーゼは熱により分解するため、ろ過による無菌化を行った上で使用した。

これらの事前調査・検討結果を基に、添付資料 III-3 に示す共通プロトコルを作成し、共同実験を実施した。

C. 研究結果

1) 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の開発

組換え試薬とライセート試薬それぞれの各種 Et の USPRSE に対する相対活性を xy プロットした回帰式から得られた傾きは 0.768 から 1.433、相関係数は 0.757 から 0.947 となり、ライセート試薬により異なった (表 I-3)。測定原理とデータ解析法が同じである表 I-3 の組み合わせ A (組換え試薬とライセート試薬1) および組み合わせ E (組換え試薬とライセート試薬2) では、それらの回帰式から得られた傾きはそれぞれ 0.958 と 1.177、相関係数は 0.935 と 0.947 であった。また、これらの回帰式の傾きおよび y 切片の 95% 信頼区間にはそれぞれ 1 と 0 が含まれていたことより、組み合わせ A および E の 2 試薬での、各種 Et の USPRSE に対する相対活性は同じであると言える (表 I-3)。TEA で溶解した Et のうち、糖鎖の短い R 型の Et である *E. coli* F583 Rd 2、*S. minnesota* R595 Re の相対活性は他の Et と比較して試薬間のばらつきが比較的大きかった (図 I-1)。一方で S 型の Et のうち、JPRSE、*Escherichia coli* O111:B4 ならびに *E. coli* O55:B5 の USPRSE に対する相対

活性は組換え試薬を含めた全ての試薬の結果がよく一致した(図 I-1)。なおデータは載せていないが組換え試薬では、各 Et の EU/ng 値の試薬3ロット間の CV 値は、*Pseudomonas aeruginosa* (12.7%) を除き、いずれも10%未満であった。

医薬品の反応干渉因子試験では、まず、組換え試薬 3 ロットを用いて薬局方予備試験の検量線の信頼性確認試験を反応速度法で行った。測定者および測定機を変えてそれぞれのロットで 4 回測定を行い、作成した検量線の相関係数が全て 0.980 以上であることを確認した(データ示さず)。なお、反応時間法は 2 年目の報告書「分析法バリデーションに従った各種分析能パラメータの評価」において上述の基準に適合している。

組換え試薬で測定した 109 種の医薬品の NID は全て MVD を超えず、医薬品中の Et が測定可能であった(表 I-4-1~ I-4-6)。しかし、同じ組換え試薬でも時間法と速度法で NID が大きく異なるものが認められた。反応時間法におけるアルベカシン硫酸塩注射液の NID は閾値を 0.015Abs とした 30 分測定では 10,000 倍であり、MVD である 5,000 倍を超えた。しかし、測定時間を 60 分に延長し、閾値を 0.150Abs に変更した結果、NID は反応速度法と同じ 4 倍となった(表 I-4-1, I-4-4)。

室間再現精度の評価では、検量線の各濃度における Et 測定値(表 I-5)の CV の 90%信頼区間(表 I-6)は判定基準に適合した。つぎに 2 施設で得られた測定値の分散に 5%の水準で有意差を認めなかった(P=0.46)。

2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法

に関する研究

軟膏剤、クリーム剤等の基剤として、水溶性基剤、油脂性基剤、乳剤性基剤が挙げられる。そこで、それぞれの代表となる基剤に蛍光活性染色法を適用するための前処理法を検討した。

表 II-1 マクログールに添加した細菌の回収

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	1.7X10 ⁶	1.7X10 ⁶	100
<i>B. subtilis</i>	1.1X10 ⁶	9.7X10 ⁵	88
<i>E. coli</i>	1.6X10 ⁶	7.7X10 ⁶	106
<i>P. aeruginosa</i>	1.1X10 ⁶	1.1X10 ⁶	100

表 II-2 白色ワセリンの溶解性

溶媒	溶解性
1%ポリソルベート20	×
1%ポリソルベート80	×
1%DMSO	×
ミリスチン酸イソプロピル	○
n-オクタン	○

指標菌株を添加した白色ワセリンをミリスチン酸イソプロピルに溶解させ、疎水性ポリカーボネートフィルター上に菌体を捕集し、蛍光染色剤で染色を行ったところ、目視では判別不可能な微量な白色ワセリンの残存物がフィルター上に見られ、CFDA 染色試料の顕微鏡観察が困難であった。一方、n-オクタンは白色ワセリンを十分に溶解した。ただし、n-オクタンを指標菌株と接触させると全菌数には変化がないが、CFDA 染色により求められるエステラーゼ活性を有する細菌数が検出限界以下となり、n-オクタンは CFDA 染色に影響を与えるこ

とが明らかとなった。そこでさらに検討を進めたところ、図 II-1 に示した通り 30 秒間の接触では細菌の生理活性に影響を与えないことが分かった。このため、菌体に影響の少ないミリスチン酸イソプロピルに白色ワセリンを 45℃ 付近で加温しながら溶解し、さらに完全に白色ワセリンを溶解させるためにろ過直前に n-オクタンを加えた。これにより、溶け残りの白色ワセリンが蛍光染色の観察を妨げるのを防いだ。

続いて、界面活性剤である 1%ポリソルベート 20 を用いて洗浄し、油分を洗浄して、蛍光染色剤による染色を可能とした。しかしながら、油脂性物質であるため菌体が凝集してフィルター面でのばらつきが大きく計数値の精度が悪かった。この現象を解消するため、油親和性の高い界面活性剤であるソルビタンモノオレエート (span80) を終濃度 2% になるように加え、菌体を分散させた。なお、図 II-2 に示した通り、span80 と指標菌株を 3 分間接触させても、菌体のエステラーゼ活性に変化はなく、CFDA の染色性に影響を与えなかった。

以上の結果より、白色ワセリンの前処理法として、ワセリン 0.25g をミリスチン酸イソプロピルに溶解し 45℃ で加温溶解後、span80 および n-オクタンを加えて攪拌し、手早く疎水性ポリカーボネートフィルターでろ過して菌体をフィルター上に捕集した。その後、1%ポリソルベート 20 でフィルター表面を洗浄し、油分を除去することに決定した。これにより、油脂性基剤に対して蛍光染色法による細菌数測定が可能となった。

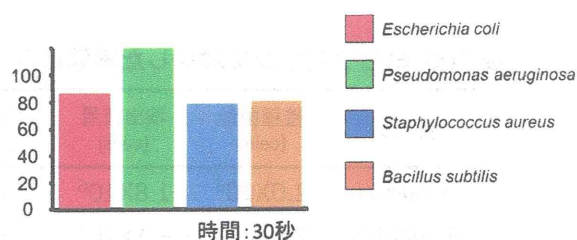


図 II-1 n-オクタンの CFDA 染色へ与える影響

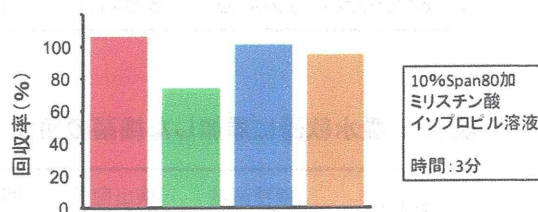


図 II-2 ソルビタンモノオレエート (Span80) が CFDA 染色へ与える影響

本前処理法の妥当性を確認するため、指標菌株の添加回収を行った結果を表 II-3 に示した。その結果、*B. subtilis* は 10% 以下の回収率であったが、その他の指標菌株については 70% 以上の回収率が得られた。また、ワセリンなどの油脂性の試料には嫌気性菌が混入する危険性がある。このため、*Clostridium sporogenes* についても添加回収実験を行った結果、約 50% の回収率を得た。

iii) 乳剤性基剤 (吸水軟膏)

吸水軟膏は油中水型の乳剤性基剤である。このため、油脂性基剤である白色ワセリンの前処理と同様の条件により指標菌株の添加回収実験を行った。その結果、表 II-4 に示した通り、*B. subtilis* 以外の指標菌株に良好な回収率が得られた。

表 II-3 白色ワセリンに添加した細菌の回収

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	2.0X10 ⁶	1.8X10 ⁶	90
<i>B. subtilis</i>	7.9X10 ⁵	5.1X10 ⁴	6
<i>E. coli</i>	1.2X10 ⁶	2.1X10 ⁶	75
<i>P. aeruginosa</i>	3.5X10 ⁶	2.5X10 ⁶	71
<i>C. sporogenes</i>	1.4X10 ⁶	6.8X10 ⁶	49

表 II-4 吸水軟膏に添加した細菌の回収

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	1.7X10 ⁶	1.4X10 ⁶	82
<i>B. subtilis</i>	9.2X10 ⁵	3.8X10 ⁴	4
<i>E. coli</i>	1.2X10 ⁶	8.2X10 ⁵	68
<i>P. aeruginosa</i>	1.2X10 ⁶	1.5X10 ⁶	125

非無菌製剤の賦形剤中の生菌数の測定は、検討した前処理法を用いて、蛍光活性染色法により生菌数を計測した。また、従来の培養による方法についても実施し、結果を比較した（表 II-5）。本結果から、蛍光活性染色法により得られる生菌数は、従来の培養法によって得られた生菌数よりも 10³～10⁷ 倍多くなった。

3) 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究

① 共通プロトコルに基づく実験結果

a. 全般

共同実験により得られた結果を添付資料 III-4-1～III-4-8 に集約した。各社の試験室で実施された結果に基づく室内再現性、同条件の試験を異なる試験室で実施した結果に基づく室間再現性の両者について、概ね良好な結果を得た。これら

の結果から、参考情報改訂案に記載された「硬質表面キャリアー法」は実用可能な評価法であると判断することが出来た。共同実験で採用した消毒剤濃度は低濃度、作用時間も短時間で試験菌が生残しやすいと想定される試験条件を採用したが、全般的な結果として、材質の違いによる消毒効果には大きな差が認められなかった。試験菌に対する評価としては、*B. subtilis* に効果を示す消毒剤は限定されること、*A. brasiliensis* は他菌種に比較して、効果にバラツキの認められることが多かった。消毒剤に対する評価としてはイソプロパノール、エタノールといった即効性を有すると言われる消毒剤は試験結果の再現性が良いことが判明した。

ただし、幾つかの点で結果のバラつく事象が認められた。それらを含めて消毒剤ごとの実験結果を次項に述べる。

b. 消毒剤ごとの結果

1) 3% 過酸化水素

今回採用した条件では *C. albicans*、*A. brasiliensis* に対する消毒効果が低い傾向にあり、*B. subtilis* の菌数減少は認められなかった。*C. albicans*、*A. brasiliensis* の消毒効果については室間再現性が悪く、特に *A. brasiliensis* については室内再現性も悪い結果が得られた。特に、再現性に懸念が認められた *A. brasiliensis* を対象として、接種菌数を一定にすること、キャリアー上の消毒剤をこぼさないように採取すること等、回収操作に注意しながら 3 社目の試験室で追加実験を実施したところ、菌数減少量の安定した結果が得られた。操作方法が結果に影響することは本件に限定されたこ

表 II-5 賦形剤に存在する生菌

① 水溶性固形原料(乳糖)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性細菌	真菌
9L10A	4.4×10^3	<2.5	<2.5
A3A29	3.8×10^3	<2.5	<2.5

②-1 不溶性固形原料(タルク)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
8H07A	3.4×10^6	375	<25
45071	1.1×10^4	275	25

②-2 不溶性固形原料(ステアリン酸マグネシウム)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
1B6009	7.3×10^5	<25	<25
2014G6090	1.1×10^4	50	<25

③ 色素(黄色5号)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
X73FFI	1.0×10^4	<500	<500

④-1 軟膏基剤(マクロゴール)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
864805	3.4×10^3	0.67	<0.33
864930	2.7×10^4	0.33	<0.33

④-2 軟膏基剤(白色ワセリン)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
P1D12	5.1×10^5	<2.5	<2.5
P4I65	6.9×10^5	<2.5	<2.5
P4I66	5.6×10^5	2.5	<2.5

④-3 軟膏基剤(吸水軟膏)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
044711	5.3×10^5	<2.5	<2.5
044924	5.4×10^7	<2.5	<2.5

とでは無いが、回収操作の方法が再現性に影響を及ぼす要因となり得ることが判明した。詳細は添付資料 III-4-1 を参照されたい。

2) 0.2% 過酢酸

いずれの試験菌に対しても高い消毒効果を示し、室内・室間再現性共に良好であった。

3) 0.02% 次亜塩素酸ナトリウム

今回採用した条件では *B. subtilis* に対する菌数減少は認められなかった。

A. brasiliensis とウレタンゴムの組み合わせが他の組み合わせと比較して消毒効果が低い傾向にあった（菌数減少は認められるが、その減少程度が少ない）が室内・室間再現性共に良好であった。

4) 50% イソプロパノール

今回採用した条件では *B. subtilis*、*A. brasiliensis* に対する菌数減少は認められなかったが室内・室間再現性共に良好であった。

5) 70% エタノール

今回採用した条件では *B. subtilis* に対する菌数減少は認められなかったが室内・室間再現性共に良好であった。

作用機序が類似しているイソプロパノールと同等の結果が得られるものと予測していたが、エタノールでは *A. brasiliensis* に対する菌数減少が認められており、これは消毒剤濃度に起因したものであると推測される。

6) 0.05% ベンザルコニウム塩化物

今回採用した条件では *B. subtilis*、*A. brasiliensis* に対する菌数減少は認められなかったが室内・室間再現性共に良好であった。

7) 0.05% アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩

今回採用した条件では *B. subtilis* に対する菌数減少は認められなかった。

A. brasiliensis の室間再現性が悪い結果が得られた。原因調査を行ったところ、各試験室における試験菌の準備方法が異なっていることが室間再現性に影響した可能性が示唆された。本剤を使用した実験において、K 社は自家調製した菌、L 社は調製済の市販されている菌を供試していた。そのため、K 社にて自家調製した菌と調製済の市販されている菌を同時に試験（試薬・試液は同一ロット、試験者は一定）した結果、両社における初回試験の結果をそれぞれ再現した。

A. brasiliensis については、試験菌の準備方法が消毒効果に影響することが明確となった。明確な原因については、不明であるが、菌糸の量、胞子の状態により、消毒効果に影響を与えたと考えられる。詳細は添付資料 III-4-7 を参照されたい。

8) 0.05% クロロヘキシジングルコン酸塩

今回採用した条件では *B. subtilis* に対する菌数減少は認められず、*A. brasiliensis* に対する消毒効果が低い傾向にあった。

室内・室間再現性共に概ね良好であったが *S. aureus* について室内再現性の悪い結果が部分的に得られた。試験菌の準備方法は M 社が調製済の市販されている菌、N 社が自家調製した菌を供試しており、今回室内再現性の悪い結果は、自家調製した菌を使用して得られた結果である。試験菌液中の菌の分散性の影響、も

しくは消毒条件が効果を変動させる境界上であった可能性が推察されたが明確な原因は不明である。

以上、共同実験で得られた全般的な結果と消毒剤ごとの結果を紹介したが、これらは今回の共同実験で採用した消毒剤濃度や作用時間で得られた結果であり、消毒剤の絶対的な効果を示したものではない。例えば、消毒剤の濃度や作用時間等の条件を変更した場合、異なる結果が得られる可能性があることに留意されたい。

② 実験実施時に得られた操作上の注意点等

共同実験の実施において、操作上の懸念事項や操作上の注意点が明確となった。その内容について以下に述べる。硬質表面キャリアー法を採用して消毒効果を評価される場合は、参考にされたい。

a. テストキャリアーの清浄化方法

硬質表面キャリアー法を採用する際、各材質のキャリアーを用いる必要があり、本研究では5 cm×5 cmのキャリアーを使用した。このキャリアーを使用する際には、事前に表面上の汚染菌を除去した上で、試験菌を接種する手順となる。キャリアー表面上の汚染菌の除去には、蒸気滅菌等の方法も想定されたが、材質によっては耐熱性を有せず、劣化が生じるため、今回は消毒剤に浸漬する方法を採用し、キャリアーを清浄化させた。浸漬に使用する消毒剤は、有効成分をキャリアー表面上に残留させないことを考慮し、3%過酸化水素を選定した。過酸化水素に一昼夜浸漬させたことにより、キャリアー表面の汚染菌は除去できたが、繰り返し浸漬を行ったことで塩化ビニル製のキ

ャリアーの反り、ケイ酸カルシウム製キャリアーのベース部の膨張等の変形が発生し、試験における操作性を低下させた。試験遂行上、キャリアー上の汚染菌除去は必要であるが、その手段にはいくつかの方法が考えられる。今回採用したような浸漬を行うのも方法の一つではあるが、変形等が発生すると操作性が低下することもあり、例えば浸漬時間を短くする、消毒剤を使用して繰り返し拭き取る等、材質に応じた清浄化方法を採用する必要がある。

b. キャリアーからの消毒剤の漏れ

硬質表面キャリアー法を採用する際、キャリアー上に消毒剤を添加するが、消毒剤の表面張力によって、キャリアーからこぼれてしまうケースが認められた。キャリアーのサイズ5 cm×5 cmに対して、本共同実験で採用した消毒剤添加量は1 mLである。「1 mL」はキャリアー全体に消毒剤を行き渡らすのに十分な量であり、またエタノール等の揮発性の高い消毒剤を一定時間作用させてもキャリアー上に残存する量として採用したが、消毒剤を添加した後にキャリアーの操作を行うと、キャリアーからこぼれる事象が発生した。消毒剤の添加量は事前に最適化が必要で、作用時間を通じて残存している量、試験菌懸濁液の回収が可能な量といった条件を基に設定することになる。また、試験に使用する安全キャビネットの風量や消毒剤の添加量が少量過ぎるとキャリアー表面全体に行き渡らなくなる等を考慮し、事前に各材質のキャリアーを用いた模擬操作を実施して最適化することが望まれる。

c. 試験菌の回収操作法

本共同実験では、消毒剤作用後にキャリアー表面上の消毒剤の一部をマイクロピペットで回収し、回収液で中和させた後、カンテン平板混釈法により、消毒剤中の菌数を計測した。本共同実験に限定したことなく、試験を実施する際には共通して回収操作に対する訓練が必要である。今回採用した方法は、多検体処理には有用な方法であるが、その一方で試験菌が懸濁された消毒剤の一部を回収するため、試験菌の分散状態の影響を受けやすく、その結果、データをバラつかせたことも想定された。0.3%過酸化水素に対する結果の項でも述べたが、回収操作の内容は結果に影響する。ただし、操作法を繰り返し、習熟することにより、データは安定化するので、どのような回収操作を採用する際にも事前に訓練を十分に行う必要がある。なお、共同実験参加企業から寄せられた回収方法の別案としては、コンタクトプレートキャリアーに接触させ、広範囲の試験菌を回収する方法、キャリアーを回収液に浸漬し、その回収液をメンブランフィルター法でろ過する方法が提示された。

D. 考 察

遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の評価において、測定原理とデータ解析法が同じである表 I-3 の組み合わせ A (比色法、反応速度法) および組み合わせ E (比色法、反応時間法) において、各種 Et の USPRSE に対する相対活性は良好な相関を認めた。その反面、測定原理は同じであるがデータ解析法が

反応速度法と反応時間法とで異なる組み合わせ B および D においては、各種 Et の USPRSE に対する相対活性を xy プロットして得られた回帰式の傾きの 95%信頼区間は 1 を含まなかった (表 3) I。データ解析法が同じであるが測定原理が異なるライセート試薬どうしの組み合わせである I (比色法と比濁法、いずれも反応時間法) でも回帰式の傾きの 95%信頼区間に 1 を含まなかった (表 I-3)。よって、試薬性能を厳密に比較する際には、測定原理と解析法を揃えることが重要である。これらが同じ試薬の組み合わせである A と E の各種 Et の反応性は高い相関かつ 1 に近い傾きを示したことは天然ライセート試薬のカスケード反応を 3 種の組換え因子で再構成できたことを示唆している。

薬局方では「ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその検量線の信頼性を確認しなければならない」とされている。すなわち、試薬のロット間差は医薬品の安定した品質管理に影響を及ぼすと考えられる。組換え試薬の原料は培養細胞により生産されるため、試薬のロット間差は天然の原料を用いた試薬と比較して小さくなるものと推察される。よって、今後、組換え試薬のロット間差を明らかにしていく予定である。

細菌数迅速測定法である蛍光活性染色法 (CFDA-DAPI 二重染色法) では生菌の指標を酵素活性 (エステラーゼ活性) としているのに対し、従来の培養法では増殖能力を生理活性の指標としているため明確な対比は難しいと考えられる。しかしながら、蛍光活性染色による細菌数の測定法は、迅速かつ高精度に生菌数が

測定でき、特に色素などの抗菌性のある物質や軟膏基剤などの嫌気状態になる物質においても特別な操作を必要とせず、高精度に生菌数が測定できるため有効な方法である。蛍光染色法を用いるにあたり、実測値データを積み重ねることにより、非無菌製剤の生菌数の基準となる菌数値を見出すことができると考える。

本研究で得られた蛍光活性染色による各種非無菌製剤原料中の生菌数測定法を、今後、様々な医薬品原料や原薬、医薬品添加物、製剤に対して行うことにより、医薬品に対する迅速かつ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。

硬質表面キャリアー法による消毒剤の有効性評価は、実際に行われる消毒の状態を可能な限りシミュレートした方法で、材質、微生物、消毒剤の三者の相互作用を確認する際に有用であり、医薬品製造施設等で日常的に実施する消毒プログラムを策定するための基礎データを取得する際に有効な方法である。本共同実験で得られた結果は、消毒剤濃度は低濃度、作用時間も短時間で試験菌が生残しやすいと想定される試験条件を採用したものであり、採用する消毒剤濃度や作用時間が異なれば、試験菌に対する効果も異なった結果が得られるのは容易に想像することができる。各企業において、消毒プログラムの策定を目的として硬質表面キャリアー法を実施する場合は、本書の情報を参考にすることで効率的な実施が可能になるものであると考えられる。また、得

られた結果を基に製造施設等の衛生管理の一環として、消毒プログラムをSOPにて標準化することになるため、消毒剤濃度や作用時間は実際の使用条件をよく考慮して、評価を行う必要がある。

アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩に対する消毒効果の項で述べたように、試験菌の準備方法が試験結果に影響する可能性があることも判明したが、常に一定の状態の菌を準備することが、微生物試験においては難しく「菌の状態は変わるもの」という認識を持って評価することも必要である。また硬質表面キャリアー法で得られた結果は、消毒プログラムを策定するためのものであり、実際の製造室の状態を完全に保証するものではない。環境には対数増殖期や定常期の微生物、また多種のストレスにより損傷している微生物等、多種が存在していることが予測される。これらは日常的に実施している環境モニタリングで検出されるが、そこで検出された菌の特徴等も考慮しながら消毒剤を最適な条件で使用し、その継続的な有効性は環境モニタリングの結果等との組み合わせで評価することが有用である。

E. 結 論

組換え Et 測定比色試薬の性能を分析法バリデーションに従い評価と行った。各種 Et の USPRSE に対する相対活性はライセート試薬のそれと良く相関した。また、第十六改正日本薬局方の医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品は組換え試薬で全て測定が可能であった。よって組換え技術を用いて作製された原料から調製された組換え試

薬は、カプトガニ由来の原料から調製されたライセート試薬と同様、薬局方のエンドトキシン試験に使用可能と言える。

非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコールの作成のために、代表的な非無菌製剤原料（水溶性基剤、油脂製基剤、乳剤性基剤）への細菌数迅速測定法の適用を検討し、プロトコールを作成した。また、検討を行った各前処理条件を用いて、非無菌製剤原料の生菌数を蛍光活性染色法により測定し、従来の培養法により得られた生菌数と比較することにより、蛍光活性染色法の有用性を確認した。

日本薬局方 参考情報 「微生物殺滅法」の改訂案に消毒剤の有効性を評価する方法として掲載される予定の「硬質表面キャリアー法」が実用可能であることを確認するために製薬関連企業 15 社にて共同実験を実施し、「硬質表面キャリアー法」は実用可能な方法であることが確認できた。また本書において、実施時における懸念事項も紹介し、注意点も含めた対応策を明確にしたことで、更に各社における実施を容易にする材料となることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muroi M, Tanamoto K.: Zinc- and oxidative property-dependent degradation of pro-caspase-1 and NLRP3 by ziram in mouse macrophages. *Toxicol. Lett.*, 235, 199-205 (2015)
 - 2) T. Ichijo, Y. Izumi, S. Nakamoto, N. Yamaguchi, M. Nasu. Distribution and respiratory activity of Mycobacteria in household water of healthy volunteers in Japan. *PLOS ONE*, 9: e110554 (2014)
 - 3) N. Yamaguchi, J. Park, M. Kodama, T. Ichijo, T. Baba, M. Nasu. Change in the airborne bacterial community in outdoor environments following Asian dust events. *Microbes Environ.*, 29: 82-88 (2014)
- ### 2. 学会発表
- 1) 室井 正志、棚元 憲一：Ziram は亜鉛および酸化作用依存的にマクロファージにおける pro-caspase-1 と NLRP3 蛋白を分解する、日本薬学会第 135 年会 (2015, 3)
 - 2) N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. On-site and real-time monitoring for bacterial cells in freshwater with microfluidic system. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
 - 3) T. Ichijo, Y. Izumi, S. Nakamoto, N. Yamaguchi, M. Nasu. Abundance and physiological activity of Mycobacteria in household water of healthy volunteers. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
 - 4) M. Kawai, J. Yamagishi. Resistance mechanisms of Triclosan in Staphylococci. American Society for Microbiology 114th General meeting,

May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)

- 5) 川井真好, 更家信, 山岸純一. ブドウ球菌属のトリクロサン抵抗性メカニズム. 第 62 回日本化学療法学会総会 2014 年 6 月 18 日 - 20 日 (福岡)
- 6) N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. Real-time and on-site monitoring of bacterial cells in aquatic environments by portable microfluidic system. 15th International Symposium on Microbial Ecology, August 24-29, 2014 (Seoul, Korea)
- 7) 更家信, 山口進康, 川井真好. 蛍光染

色による油状基剤からの生菌の迅速検出. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2014 年 10 月 11 日 (京都)

- 8) 小林宥吾, 更家信, 山岸純一, 川井真好. コアグラウゼ陰性ブドウ球菌属のトリクロサン抵抗性メカニズム. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25 - 28 日 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

添付資料 I-1

表 I-1 試験に使用した試薬

No.	名称	測定原理・解析法	測定時間 (分)	閾値	標準品濃度 (EU/mL)
1	組換え試薬	比色法・ 反応速度法 ¹⁾	30		0.00625 – 0.1 (2 倍希釈)
2	ライセート試薬1				
3	組換え試薬	比色法・ 反応時間法 ²⁾	30	0.015 Abs	0.005 – 50 (10 倍希釈)
			60 ⁴⁾	0.150 Abs	
4	ライセート試薬2		最大 100	0.2 Abs	
5	ライセート試薬3	比濁法・ 反応時間法 ³⁾	60	94.9 %	0.0078 – 0.125 (2 倍希釈)

- 1) 測定時間内における吸光度の変化を指標とする。
- 2) 吸光度が測定を開始してから設定した閾値に到達するまでの時間を指標とする。
- 3) 透過光量比を計測し測定を開始してから設定した閾値に達するまでの時間を指標とする。
- 4) 一部の医薬品測定において 60 分測定を実施した。

表 I-2 試験に使用した Et

No.	名称	溶解液	最大測定濃度 (ng/mL)				
			反応速度法 (2 倍希釈)		反応時間法 (10 倍希釈)		L3 (2 倍希釈)
			組換え 試薬	L1	組換え 試薬	L2	
1	JPRSE (<i>Escherichia coli</i> UKTB)	注射 用水	0.0110		5.5556		0.0189
2	<i>E. coli</i> O55:B5		0.0050		2.5000		0.0500
3	<i>E. coli</i> O111:B4		0.0100		20.0000		0.0500
4	<i>E. coli</i> O127:B8		0.0300		10.0000		0.0500
5	<i>E. coli</i> O128:B12		0.0300		10.0000		0.0500
6	<i>E. coli</i> J5		0.0400		10.0000		0.0500
7	<i>E. coli</i> F583 Rd 2	TEA	0.0025		0.2000		0.0100
8	<i>Shigera flexneri</i>	注射 用水	0.0200		2.0000		0.0500
9	<i>Salmonella enterica</i>		0.0200		2.0000		0.0500
10	<i>S. minnesota</i> R595 Re	TEA	0.0025		0.2000		0.0050
11	<i>S. typhimurium</i>		0.0025		0.5000		0.0100
12	<i>S. typhosa</i>		0.0100		2.0000		0.0500
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	注射 用水	0.0019		0.0020		0.0031

ライセート試薬を L と表記する。

USPRSE の検量範囲に入った濃度 (3 点以上) のデータを用い、平行線定量法で解析した。