

表 4-11 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
101	ヘパリンカルシウム	25000 単位/mL	0.003 EU/ヘパリン単位	2000	8000	32	10000	64	
				12000	15000	12000	15000	9600	
102	ヘパリンナトリウム注射液	1000 単位/mL	0.0030 EU/単位	64	128*	2	1000	2	
				480	600	480	600	384	
103	注射用ペプロマイシン硫酸塩	1 mg/mL	1.5 EU/mg(力価)	2	2	4	1	4	
				240	300	240	300	192	
104	注射用ベンジルペニシリンカリウム	100000 単位/mL	0.000125 EU/単位	8	16	8	4	8	
				2000	2500	2000	2500	1600	
105	注射用ホスホマイシンナトリウム	100 mg/mL	0.025 EU/mg(力価)	1	2	2	32	2	
106	注射用マイトマイシン C	2 mg/mL	10 EU/mg(力価)	2	4	2	8	2	
				3200	4000	3200	4000	2520	
107	D-マンニトール注射液	20 %	0.50 EU/mL	1	2	1	1	2	
				80	100	80	100	64	
108	注射用ミノサイクリン塩酸塩	50 mg/mL	1.25 EU/mg(力価)	2000	8000	512	2048	128	
				10000	12500	10000	12500	8000	
109	メピバカイン塩酸塩注射液	20 mg/mL	0.6 EU/mg	8	32	4	8	8	
				1920	2400	1920	2400	1536	
110	注射用メロペネム	50 mg/mL	0.12 EU/mg(力価)	16	16	8	8	16	
				960	1200	960	1200	768	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 4-12 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
111	モルヒネ塩酸塩注射液	10 mg/mL	1.5 EU/mg	2	4	8*	16	4	
				2400	3000	2400	3000	1920	
112	リドカイン注射液	20 mg/mL	1.0 EU/mg	8	32	4	8	4	
				3200	4000	3200	4000	2560	
113	リボフラビンリン酸エステルナトリウム注射液	10 mg/mL	10 EU/mg	16	8	16	32	8	
				16000	20000	16000	20000	12800	
114	硫酸マグネシウム注射液	60.2 mg/mL	0.09 EU/mg	8	32	1	16	2	
				867	1084	867	1084	694	
115	リンゲル液	-----	0.50 EU/mL	1	1	1	2	1	
				80	100	80	100	64	
116	リンコマイシン塩酸塩注射液	300 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	32	128	32	64	32	
				24000	30000	24000	30000	19200	
117	レバロルファン酒石酸塩注射液	1 mg/mL	150 EU/mg	2	8	2	16	2	
				24000	30000	24000	30000	19200	
118	注射用ロキサチジン酢酸エステル塩酸塩	15 mg/mL	4.0 EU/mg	4	32	2	16	4	
				9600	12000	9600	12000	7680	

109 品目を測定 (うち、ID59, 67 の 2 品目は代替品)

注射用水 (製造用水) を含む 網掛けの 8 品目は購入 (入手) 不可であったため、実施しなかった。

表 5 室間再現精度の結果

場所	測定者	測定機	測定日	試薬 ロット	USPRSE 調製濃度 (EU/mL)				
					0.005	0.05	0.5	5	50
					Et 測定値 (EU/mL)				
武蔵野 大学	A	I	X	#1	0.0056	0.044	0.47	5.23	51.5
				#2	0.0053	0.046	0.50	5.30	48.9
				#3	0.0052	0.047	0.49	5.27	49.5
			Y	#1	0.0053	0.046	0.49	5.20	49.9
				#2	0.0052	0.048	0.48	5.24	49.8
				#3	0.0052	0.047	0.49	5.25	49.2
生化学 工業 株式 会社	B	II	Z	#1	0.0050	0.050	0.52	5.01	49.6
				#2	0.0049	0.049	0.54	5.17	47.4
				#3	0.0050	0.049	0.53	5.07	49.0
		III		#1	0.0051	0.049	0.51	5.19	48.7
				#2	0.0047	0.052	0.53	5.40	46.2
				#3	0.0050	0.049	0.51	5.22	48.3
	C	II		#1	0.0052	0.046	0.51	5.47	47.8
				#2	0.0049	0.051	0.51	5.16	48.7
				#3	0.0051	0.049	0.50	5.31	48.4
		III		#1	0.0051	0.048	0.50	5.26	49.1
				#2	0.0049	0.050	0.52	5.28	47.4
				#3	0.0050	0.049	0.51	5.25	48.6

表 6 上記 Et 測定値を対数変換し、その絶対値で解析

		USPRSE 調製濃度 (EU/mL)				
		0.005	0.05	0.5	5	50
平均値		2.293	1.318	0.296	0.719	1.688
SD		0.0169	0.0178	0.0154	0.0087	0.0105
CV (%)		0.7	1.4	5.2	1.2	0.6
CV の 90%信頼区間	下限	0.6	1.1	4.1	0.9	0.5
	上限	1.0	1.9	7.3	1.7	0.9

細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

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、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などに対するプロトコルの確立が重要となる。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。

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、明らかとなってきた。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^{1,2)}。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³⁻⁶⁾、このような細菌の計数においては、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^{7,8)}。

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、生菌数を測定できる方法である。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、増殖能をもつ細菌数を

測定する方法である。

これらの方法の利点としては、操作が比較的容易であり、かつ短時間で結果を得ることができる点が挙げられる。蛍光活性染色法の染色時間は数分から約 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、医薬品添加物、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。医薬品原料や医薬品添加物等に対しては、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。

前年度は、蛍光染色による検出が困難であるとされている指標菌株 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 を用いて検討を行った。さらに、抗菌性物質や色素、軟膏基剤などの非無菌製剤原料を対象として、蛍光染色を用いた細菌数測定法を適用するための検討を行った。本年度は、水溶性基剤、油脂性基剤、乳剤製基剤の前処理条件の検討を行った。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（水溶性固形原料、不溶性固形原料、色素、軟膏剤）の生菌数を測定し、従来の培養法により得られた生菌数と比較した。

B. 研究方法

1) 指標菌株

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ろ過滅菌水に懸濁したものを、菌懸濁液とした。

2) 溶解剤および中和剤

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。

3) 非無菌製剤原料

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。

4) 蛍光染色

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。

C. 研究結果および考察

1) 油状基剤への蛍光染色法の適用

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。

i) 水溶性基剤（マクロゴール）

マクロゴールは水溶性基剤であるため、昨年度までに検討を行った水溶性固形剤と同様な方法で指標菌株の添加回収実験を行った。マクロゴール 1 g に指標菌株を加え、滅菌水 200 mL に溶解した。溶解液をろ過し、蛍光染色法により生菌数を求めた（表 1）。その結果、いずれの指標菌株も 80% 以上の良好な回収率が得られた。以上のことから、マクロゴールは滅菌水に懸濁させることにより、蛍光染色法による生菌数測定が可能であるとわかった。

ii) 油脂性基剤（白色ワセリン）

白色ワセリンは石油を精製して製造され

る炭化水素類の混合物であり粘性が高い。蛍光染色法で菌数を測定するために、ろ過により細菌を捕集する必要がある。そこで、菌体に影響を与えない溶解液を検討した結果、表 2 に示した通り、ミリスチン酸イソプロピルと n-オクタンに溶解が可能であるとわかった。なお、ろ過にあたっては、油脂性の物質をろ過するため、親水化処理をしていない疎水性ポリカーボネートフィルターを用いた。

表1 マクロゴ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 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 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。

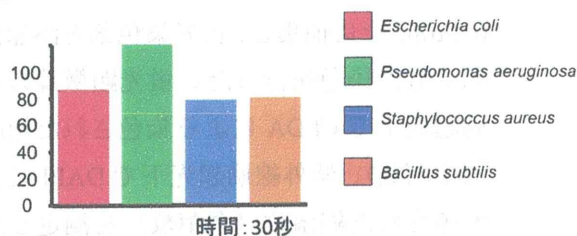


図1 n-オクタンのCFDA染色へ与える影響

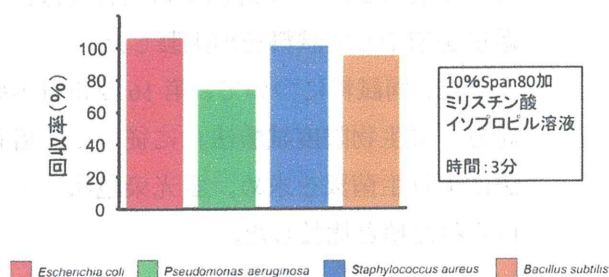


図2 ソルビタンモノオレエート (Span80) が CFDA 染色に与える影響

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 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 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

2) 非無菌製剤の賦形剤中の生菌数の測定
 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。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。

D. 結論

今回の研究では、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、プロトコルを作成した。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。

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。

表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

E. 参考論文

1. 谷佳津治、山口進康、那須正夫：蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌の検出. *衛生化学*, **43**: 145-154 (1997)
2. Yamaguchi, N. and M. Nasu. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 43-52 (1997)
3. Kawai, M., N. Yamaguchi and M. Nasu. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, **86**: 496-504 (1999)
4. Kawai, M., E. Matsutera, H. Kanda, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. 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.*, **68**: 699-704 (2002)
5. Kawai, M., J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, **97**: 1123-1131 (2004)
6. Nakajima, K., K. Nonaka, K. Yamamoto, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**: 128-132 (2005)
7. 山口進康：環境微生物検出のイノベーション. *化学療法領域*, **26**: 2434-2444 (2010)
8. 佐々木次雄、棚元憲一、川村邦夫編：新GMP微生物試験法 第2版. *じほう* (2013)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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) 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)
- 2) 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)
- 3) M. Kawai, J. Yamagishi. Resistance mechanisms of Triclosan in Staphylococci. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
 - 4) 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)
 - 5) 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)
 - 6) 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)
 - 7) 小林宥吾, 更家信, 山岸純一, 川井真好. コアグラマー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)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器・ヘルスケア総合研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者： 片山博仁	バイエル薬品株式会社
研究協力者： 佐々木次雄	武蔵野大学
原田敏和，大西早苗	参天製薬株式会社
内藤貴博，吉田将勇	塩野義製薬株式会社
古賀裕香里，横山悟一，荒木直子	サノフィ株式会社
伊藤千鶴子，石川 岳，浅井悠輔	持田製薬工場株式会社
白木澤治	ライフサイエンティア株式会社
新中浩介	アステラスファーマテック株式会社
三浦正巳	第一三共株式会社
千原裕貴	大日本住友製薬株式会社
岡由子	武田薬品工業株式会社
野口美也子	バイエル薬品株式会社
北村祐士	ファーマパック株式会社
松本泉，和田さと子	メルク株式会社
福田清佳	ロート株式会社
繁野あすか	中外製薬工業株式会社
寺島 佑樹	東和薬品株式会社

研究要旨：無菌医薬品の品質を確保するためには消毒剤の有効性を的確に評価する必要がある。本研究では、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た。その結果、「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。

A. 研究目的

日本薬局方 参考情報「微生物殺滅法」の改訂作業を進めてきた。改訂案では、GMP で要求される医薬品製造施設等を対象とした消毒の要件、消毒剤の有効性

を評価する方法と評価基準を収載し、タイトルも「消毒法及び除染法」に変更予定である。

これまで国内には、消毒剤の微生物に対する有効性を評価するための標準的な

方法がなく、評価を行う際には USP、EN 等の海外の公定書に掲載されている方法を参考にしてきた。今回、消毒剤の有効性評価法を日本薬局方 参考情報改訂案に収載する際もこれら公定書を参考にしながら検討し、「硬質表面キャリアー法」を提案した。本法は、種々の材質で構成されている医薬品製造施設の状況を小スケールで再現しながら消毒剤の有効性を評価する方法である。この「硬質表面キャリアー法」が実用的な評価法であることを調査するため、国内製薬関連会社 15 社による共同実験を実施した。

B. 研究方法

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。

③ 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 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 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%

④ 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を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1に示す。

表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その他、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 μ L（キャリアー表面の消毒剤を回収する液量は 100 μ L 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 4 に示す組成の回収液により、表 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 4 のとおりとした。回収率の詳細データは添付資料 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 4 回収液の組成（1000mL 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
リン酸二水素カリウム	(15 mM)	2.0 g
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 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 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 4-1~4-8 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、参考情報改訂案に収載された「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 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 4-7 を参照されたい。

8) 0.05% クロル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は無い。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 5cm×5cm 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

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場合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

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た。その結果、「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. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

試験菌の接種と回収方法
- 試験菌の乾燥による影響確認 -

13. 概要

消毒剤の有効性を評価する方法として「硬質表面キャリアー法」を採用する場合、医薬品製造施設を構成している材質のテスト用キャリアーに試験菌液を接種した後、菌液を乾燥させる手順が採用されることがある。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。

14. 検討手順

以下の手順で実施した。

22) *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis* の菌液を 5 cm × 5 cm のキャリアーの表面に接種し、菌塊が出来ないようにコンラージ棒を用い、菌液をキャリアー表面上で均一にする。

23) 1) が乾燥するまで安全キャビネット内で放置する。なお、キャリアー材質の撥水性と菌液の表面張力の影響で、キャリアー表面の一部に菌液が集まることから放置時間中は数回、コンラージ棒を用いて菌液を均一にする。また、乾燥による菌への影響を防止するため、乾燥後は次の操作に素早く移行する。

備考：キャリアー上の菌液の乾燥は、キャリアー材質の影響や安全キャビネットの風量等によって変動し、20～40分程度の時間を要した。

24) 各試験菌液を接種したキャリアー1枚に常温の滅菌水 1 mL (表面全体に均一に行き渡る量として設定) を滴下し、コンラージ棒を用いてキャリアー表面全体に滅菌水を行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。

25) この状態で5分間放置する。なお、キャリアー材質の撥水性と滅菌水の表面張力の影響で、キャリアー表面の一部に液が集まることから放置時間中は数回、コンラージ棒を用いて液を均一にする。

26) 5分後にキャリアー表面の各菌液を懸濁した滅菌水 100 μL をとり、回収液 10 mL に移し、よくかき混ぜる。

27) 各回収液を pH7.2 のリン酸緩衝液で段階希釈し、100倍までの希釈液を調製する。

28) 各段階希釈液 1 mL ずつを滅菌済シャーレ 2 枚に添加し、SCD カンテン培地約 20 mL を用い、混釈法により菌数を計測する。

29) 培養条件は 30～35°C で 5 日間とする。コロニーの形成状態により、正確な菌数を計測できなくなる恐れがある場合は 5 日間よりも短い培養日数でコロニーを計測しても差支えない。