

201427027B

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24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 棚元 憲一

平成27(2015)年 4月

目 次

I. 総合研究報告	
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	
図表	27
添付資料 I-1	53
添付資料 I-2	58
添付資料 I-3	60
添付資料 II-1	67
添付資料 II-2	70
添付資料 II-3	72
参考資料	78
添付資料 II-4	80
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	96

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。

エンドトキシン測定用ライセート試薬のカスケード反応に関与する3種類の酵素因子を遺伝子組換え技術を利用して作製し、これが日本薬局方収載の分析法バリデーションで求められる全ての分析能パラメータで判定基準に適合することを検証した。また、組換え試薬が、第十六改正日本薬局方の医薬品各条にエンドトキシン規格値が記載され、かつ入手できた注射剤中に添加したエンドトキシンを試料の最大有効希釈倍数以内で測定が可能であることを明らかにした。さらに米国薬局方エンドトキシン標準品とその他13種のエンドトキシンの活性が、組換え試薬とライセート試薬とで良好な相関を示すことを明らかにし、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。

非無菌医薬品の微生物管理における細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への細菌数迅速測定法の適用を検討し、前処理条件を決定した。さらに、検討を行った各前処理条件を用いて、非無菌製剤原料の細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細菌数と比較することにより、非無菌医薬品の微生物管理における蛍光活性染色法の有用性を確認した。

日局参考情報の「無菌医薬品製造管理区域の環境モニタリング」と「滅菌および滅菌指標体」について、無菌医薬品の製造と管理の技術に関する最新の情報およびPIC/Sとの整合性もよく考慮し、意見公募を経て、これら改定案を作成し、日局第16改正案に反映された。また、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

棚元 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

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。

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ので、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

1. 組換え試薬の作製

(1) 組換え酵素因子の作製 (ウイルス法)

C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の 3 種類の各遺伝子配列を、登録データベースを参考に合成後、ウイルストランスファーベクターにサブクローニングした。バキュロウイルスゲノムとの相同組換えを利用して、各酵素因子の遺伝子をもつ 3 種類の組換えバキュロウイルスを作製した。3 種類の組換えバキュロウイルスは個別に昆虫細胞 (Sf9) に感染させ、感染後 48、72、96 時間で経時的に回収、遠心分離とろ過 (0.22 μ m) により、培養上清を調製した。培養上清に含まれる組換え酵素因子は、各因子に対する特異抗体によるウエスタンブロット法により確認した。

(2) 組換え酵素因子の作製 (安定発現細胞法)

C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体の 3 種類の遺伝子配列を、登録データベースを参考に合成後、昆虫細胞用の安定発現細胞用ベクターに、更に C 因子は哺乳類細胞用の発現ベクターにサブクローニングした。Sf9 細胞ゲノムとの相同組換えを利用して、各因子の遺伝子をゲノムに組込んだ 3 種類の Sf9 安定発現細胞株を作製した。また C 因子は、CHO DG44 細胞に導入して安定発現細胞株を取得した。3 種の Sf9 及び C 因子の CHO DG44 安定発現細胞株は個別に浮遊培養をおこない、対数増殖期後期で経時的に回収、遠心分離とろ過 (0.22 μ m) により、

培養上清を調製した。培養上清に含まれる組換え酵素因子は、各因子に対する特異抗体によるウエスタンブロット法により確認した。

(3) カスケード反応の再構成

USPRSE の希釈系列を含む検体溶液 50 μ L をマイクロプレートに分注した。組換え酵素因子を含む 3 種類の培養上清、発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA)、及び緩衝液 (pH8.0) 等を事前に混合し、検体の入ったマイクロプレートの各ウェルに 50 μ L となるように添加して総体積 100 μ L とした。プレートを 37 $^{\circ}$ C で加温し、凝固酵素による切断で合成基質から遊離した p-ニトロアニリン (pNA) の量を求めた。具体的には波長 405nm (参照波長 492nm) における吸光度を 15 秒間隔で 30 分間測定し、開始 2 分から 30 分までの 1 分あたりの吸光度の変化を専用ソフトで算出した (比色法、反応速度法)。

(4) 組換え試薬 (凍結乾燥製剤) の作製

組換え試薬の C 因子は CHO DG44 細胞由来を使用した。C 因子、B 因子および凝固酵素前駆体に発色合成基質および副原料を加え、主原料である 3 因子のロットがそれぞれ異なる 3 ロットの試薬 (#1 ~ #3) を凍結乾燥により作製した (表 I-1)。

2. 組換え試薬の評価

(1) 測定法の各種分析能パラメータへの適合性の評価

「分析法バリデーションに関するテキスト (実施方法) について」(医薬審第 338 号) に記載されている各分析能パラメータについて日本薬局方予備試験、参考として生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン(薬食審査発 0711 第 1

号)に記載される要求基準ならびに既存のライセート試薬で定められた評価基準への適合性を評価、検証した。本検討は反応速度法および反応時間法で行った。反応速度法は0.00625・0.1 EU/mLの2倍希釈列のJPRSEを、反応時間法は0.005・50 EU/mLの10倍希釈列のUSPRSEを検量線作製用に調製した。希釈した標準品または注射用水を50 μ Lずつ96穴マイクロプレートに分注し、緩衝液(0.2M Tris-HCl, pH=8.0 @ 25 $^{\circ}$ C)で溶解した試薬をそれぞれのウェルに50 μ Lずつ加え、マイクロプレートリーダーで37 $^{\circ}$ C, 30分間測定した。前者は1.(3)の方法に従い測定し、JPRSEの各濃度(x)とそれらの吸光度変化率(y)をxyプロットし検量線を求めた。後者は反応速度法と同じ測定法であるが、解析法は異なり、波長405nmにおける吸光度を15秒間隔で30分間測定し、測定開始から吸光度が0.015Abs上昇するまでの時間(オンセットタイム)を求め、USPRSE濃度(x)とそれらのオンセットタイム(y)を対数変換後xyプロットし検量線を求めた。

分析能パラメータ①から④は測定者(2名)、測定機(2台)をそれぞれ変えて試薬3ロットを用いて、計12回の独立した試験を行った。これらの評価においては、6重測定以上(反応速度法では6重測定、反応時間法では8重測定)を行った。真度は各Et濃度におけるEt回収率として求め、併行精度は各Et濃度におけるそのCV値を求めた。室内再現精度は12回測定したEt測定値を求め、反応速度法はその90%信頼区間を下式により求めた。また反応時間法はその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。

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

また、上記測定に加え反応時間法のみ室内再現精度の評価のため、測定者1名、測定機1台、測定日2日、試薬3ロットの合計6測定を他施設で行った。合計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%信頼区間を室内再現精度と同様に求めた。

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)の組み合わせから、繰り返しのある2元配置の分散分析を行った。

分析能パラメータ⑤の反応速度法は3ロットの試薬を用い同一測定者、測定機で3回繰り返し、合計9回試験した。検量線はブランク(定量限界)に近い0.00125・0.01 EU/mLの2倍希釈列をJPRSEで調製し、これらをn=5、ブランクはn=10で測定した。定量限界はブランク試料の吸光度変化率の標準偏差を10倍し、定量限界付近の検量線の傾きで除して求め(10 σ /slope)、それら定量限界値の平均値の95%信頼区間を算出した。また上で求めた定量限界値付近とブランクの測定値の間に有意差があるかどうか確認するため、9試験で得られたブランクと定量限界値付近のJPRSE溶液(0.00125 EU/mL)のEt測定値を算出し、それらの95%信頼区間を求めた。反応時間法の定量限界は0.005EU/mLにおける真度および併行精度の判定基準への適合性で評価した。

分析能パラメータ⑥は3ロットの試薬を用い同一測定者、測定機および測定日で試験した。0.0125・0.1 EU/mL の2倍希釈列のUSPRSEを調製し、また(1→3)・β・D・グルカン(以下BG)による反応干渉を確認するため、5μg/mLのBGを含むUSPRSEの2倍希釈列も調製し、反応速度法で3重測定した。各分析能パラメータの評価方法は表I-2に示す。

(2)注射剤の反応干渉因子試験

本検討は1ロットの組換え試薬(ロット#1)および表I-3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-6-1~I-6-12)について日本薬局方のエンドトキシン試験法に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注射剤は注射用水または注射剤に添付された溶液で溶解した(原液濃度を表I-6-1~I-6-12に示す)。注射剤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。注射剤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-3)。組換え試薬は2.(1)に示した試験条件により、反応速度法と反応時間法で、またそれぞれのライセート試薬はそれらの操作法に従い、注射剤、JPRSEを添加した注射剤および検量線となるJPRSEを測定し、Et測定値を算出した。また、一部の注射剤について、組換え試薬の反応時間法は60分間測定し、測定開始から吸光度が0.150Abs上昇するまでの時間を指標にEt測定値を算出した(表I-6のアスタリスクを付与したもの)。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。

(3)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

本検討は3ロットの組換え試薬および表I-3に記載の3種のライセート試薬を1ロットずつ用いた。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Et測定値の算出を行った。組換え試薬は2.(1)に示した試験条件により、反応速度法および反応時間法で13種のEt(表I-6)につきUSPRSEに対する相対活性(EU/ng)を求めた。なおUSPRSEは世界保健機関(WHO)の国際エンドトキシン標準品と同一の原料を用いて、同一の製造場所および工程で製造されており³⁾、実質的に同じと考えられるため、基準品として選択した。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。USPRSEは各試薬で推奨される濃度を調製し(表I-3)、各種Etは注射用水で使用する濃度まで2または10倍希釈し、それぞれ5点を測定に供した(表I-4)。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、前述の平行性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。

2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

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にろ過滅菌水に懸濁したものを、菌懸濁液とした。

2. 前処理条件（溶解剤および中和剤）の検討

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 (DMSO)
グリシン

ポリソルベート 20
ポリソルベート 80
チオ硫酸ナトリウム
ミリスチン酸イソプロピル
レシチン
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。ろ過滅菌水中に懸濁した細菌試料の測定値と比較することにより、各溶解剤や中和剤が蛍光活性染色に与える影響を評価した。

3. 非無菌製剤原料に対する蛍光活性染色法の適用

生菌数の測定にあたっては、以下の非無菌製剤原料を対象とした：

- ①水溶性固形原料－乳糖
- ②不溶性固形原料－タルク、ステアリン酸マグネシウム
- ③色素－黄色 5 号
- ④軟膏基剤－マクロゴール、白色ワセリン、吸水軟膏

これらの非無菌製剤原料に今回の研究で決定した各前処理を行った後、後述の CFDA-DAPI 二重染色法により染色した。

4. 蛍光活性染色法による生菌数測定

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。

5. 培養法による生菌数測定

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) 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究

1. 日局参考情報改定案の作成

本研究では、まず日本PDA製薬学会無菌製品GMP委員会において医薬品製造工場の情報収集、海外の製造所情報、海外のレギュレーション情報を収集し、分析した結果をもとに、日局参考情報の改定案を作成した。

情報収集は、日本PDA製薬学会の会員から無菌医薬品製造に関する業界のエキスパートを募集し、ワーキングチームを結成し、関連する入手可能な海外の局方、ガイドライン、論文、出版物などの収集をおこなった。続いてこれを情報分析して課題整理をおこなった。次にPMDAが主催した無菌関連情報WGにおいて、PMDAおよび大学関係者を交えた検討を行って必要な改定案を作成した。平成24年4月9日に第1回の合同班会議を第10回無菌製剤関連情報WGの中において開催し、平成25年2月7日の第6回合同班会議まで計6回の合同班会議を開催した。

改定案は日局微生物試験法委員会の審議を経て、PMDAよりパブコメを行って、広く意見を集め、(1)は44件、(2)も44件の有意義なコメントをいただいた。これを反映させた最終案を作成した。

2. 消毒剤の有効性評価に関する研究

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。

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。

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 II-1 に示す。

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 II-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。

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

(倫理面への配慮)

本研究は臨床実験等を含まない。各分担

研究者は、所属機関の倫理審査委員会規程を遵守し、機密守秘義務に抵触しないようにする。

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

1. 組換え試薬の作製

(1) 組換え酵素因子の作製 (ウイルス法)

組換え試薬を開発するために、カスケード反応に必要な 3 つの酵素因子 (C 因子、B 因子、凝固酵素前駆体) を遺伝子組換え技術を利用し、組換え酵素因子として作製した。

酵素因子の遺伝子を組込んだバキュロウイルスを培養昆虫細胞株である Sf9 に感染させる方法 (以下、ウイルス法) を利用した場合、感染 48 時間後の培養上清に含まれる C 因子はウエスタンブロットによる確認で分解されていなかった。その後の培養継続 (72、96 時間) に伴い、経時的に C 因子が分解されることが確認された。この分解は各種プロテアーゼ阻害剤を共存させて培養をおこなっても完全には抑えられなかった (図 I-2)。同様の傾向は、他の 2 因子 (B 因子、凝固酵素前駆体) においても確認された (データ示さず)。

(2) 組換え酵素因子の作製 (安定発現細胞法)

バキュロウイルスを使わず、Sf9 細胞株のゲノム DNA に目的遺伝子を直接組込む方法 (以下、安定発現細胞法) では、ウイルス法と異なり培養時間の経過による C 因子の分解はみられなかった。さらには、ウイルス法 (感染後 48 時間) よりも組換え C 因子の培養上清への回収量が増加すること

が確認された (図 I-3)。同様の傾向は他の 2 因子 (B 因子、凝固酵素前駆体) 及び C 因子遺伝子を組込んだ CHO DG44 細胞株でも確認された (データ示さず)。以上の結果より、安定発現細胞法を利用すると 3 つの酵素因子が組換えタンパク質として安定的に回収できることが示された。

(3) カスケード反応の再構成

Sf9 由来の組換え酵素の 3 因子を材料として、組換え試薬の再構成を試みた。中性付近の緩衝液存在下で、発色合成基質と組換え 3 因子を 37℃で加温すると、Et の共存量に依存して 3 因子が順次活性化され、合成基質の切断に伴う吸光度の上昇が確認された。横軸に Et 濃度 (EU/mL)、縦軸に吸光度変化率 (mAbs/min) をプロットして、再構成系の性能を評価した。その結果、30 分測定において、エンドトキシン濃度が 0.001-0.1EU/mL の範囲で、直線性の良好な (相関係数 0.997) 結果が得られた (図 I-4)。同様な結果は C 因子を CHO DG44 由来の組換え因子に置き換えても確認された (データ示さず)。作製した組換え酵素因子でカスケード反応が再構成できたことから、本原料を用いて凍結乾燥製剤を作製した。

(4) 組換え試薬 (凍結乾燥製剤) の作製

凍結乾燥品の剤型は 3 ロットとも良好であり、水分含量も 5%未満であった。次に本試薬が Et を測定するために必要な基本性能を有しているかを定量的に評価するため、組換え試薬の測定法の有効性および妥当性を分析法バリデーションに従って確認した。

2. 組換え試薬の評価

(1) 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

① 直線性

検量線の相関係数は反応速度法および反応時間法ともに 12 回の測定すべてにおいて、その絶対値が 0.999 以上となり、日本薬局方予備試験に記載の判定基準 ($|r| \geq 0.980$) に適合した (表 I-5-1)。

③ 真度

検量線の各濃度における 6 重測定 (反応速度法) または 8 重測定 (反応時間法) を行った Et 測定値からそれぞれの真度 (Et 回収率) の平均値を求め、条件を変えて 12 回測定を行った結果、反応速度法では 0.00625・0.1 EU/mL におけるそれぞれの真度は 72.7・105.4%の範囲となった。また、反応時間法では 0.005・50 EU/mL におけるそれぞれの真度は 91.6 - 109.4%の範囲となり、薬局方に記載される反応干渉因子試験の基準である 50・200%に適合した (表 I-5-1)。

③ 精度

④ -1. 併行精度

②真度の評価で得られたそれぞれの Et 測定値からその相対標準偏差 (CV) を求めた。条件を変えて 12 回試験を行った反応速度法におけるそれぞれの CV は 0.00625EU/mL において 3.1・11.0%、0.0125・0.1 EU/mL において 0.6・7.2%の範囲となった。また、反応時間法でも 0.005EU/mL において 5.9 - 15.7%、0.05・50 EU/mL において、3.1・14.9% の範囲となり、生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドラインに記載される精度の要求基準、すなわち定量限界の CV 値が 20%以下であり、それ以上の濃度においては 15%以下であることに適合した (表 I-5-1)。

⑤ -2. 室内再現精度

③-1. で得られた 12 測定の結果から検量線の各濃度における Et 測定値の CV の 90%信頼区間 を下式により求めたところ反応速度法において 0.3・15.2%、反応時間法において 0.3・5.8% となり、判定基準に適合した (表 I-5-1)。

③-3. 室間再現精度

③-1. で得られた検量線の各濃度における Et 測定値の 12 回の測定結果に他施設で得られた 6 回の測定結果を加え、18 回の測定結果 (Et 測定値) を用いて(3)-1 と同様、検量線の各濃度における Et 測定値の CV の 90%信頼区間を求めたところ 0.6・7.3% となり、判定基準に適合した(表 I-5-1)。また、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)。

⑥ 範囲

反応速度法 (0.00625 – 0.1 EU/mL)、反応時間法 (0.005 – 50 EU/mL) とそれぞれ検量範囲において分析能パラメータ①, ②, ③-1 の判定基準を全て満たした (表 I-5-1)。

⑦ 定量限界

反応速度法の定量限界は 0.0012 EU/mL であり、その 95%信頼区間は 0.0008・0.0016 EU/mL であった。また、ブランクと 0.00125 EU/mL のそれぞれの Et 測定値の平均値はそれぞれ、0.00011 EU/mL (外挿値) および 0.00129 EU/mL となった。それらの 95%信頼区間を求めたところ、両者の濃度範囲は重なり合わなかった (表 I-5-2)。

反応時間法の定量限界、すなわち 0.005EU/mL における真度および併行精度は定量限界の判定基準に適合した (表

I-5-1)。

⑧ 特異性

組換え試薬 3 ロットを用いて、ライセート試薬の一部で交差反応を起こす BG を添加した USPRSE による反応性を USPRSE 単独による反応性と比較した。組換え試薬 3 ロットの USPRSE 単独による測定値に対する BG 添加 USPRSE の測定値の xy プロットの回帰直線における切片の 95%信頼区間は-0.133~0.126 の範囲となり 0 を含み、かつ傾きの 95%信頼区間は 0.991~1.029 の範囲となり 1 を含んだことから、BG 添加による Et 測定値への反応干渉は認められず、本試薬は BG に反応しないことが確認できた (表 I-5-1)。

これらのことから組換え試薬は Et の測定に必要な基本的な性能を有することが検証された。つぎに組換え試薬とライセート試薬の同等性を検証するため、本検討でバリデートされた試験法を用いて 2 つの検討を行った。

(2)注射剤の反応干渉因子試験

組換え試薬で測定した109種の注射剤の NID は反応速度法および反応時間法とも全て MVD を超えず、注射剤中の Et が測定可能であった (表 I-6-1~ I-6-12)。一方、同じ組換え試薬でも反応速度法と反応時間法で NID が大きく異なるものが認められたが、測定時間を30分から60分に延長し、閾値を0.150Abs に変更した結果、NID は反応速度法のそれと近くなった (表 I-6 アスタリスクの付与された NID)。よって、組換え試薬はライセート試薬と同様に Et 規格値が設定され、入手可能であった全ての注射剤を測定可能であった。

(3) 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

13 種の Et の USPRSE に対する相対活性 (EU/ng) を組換え試薬および 3 種のライセート試薬を用いて求めた結果を図 I-5 に示す。つぎに組換え試薬とライセート試薬におけるそれぞれの各種 Et の USPRSE に対する相対活性を xy プロットし、回帰分析を行った。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-7)。測定原理とデータ解析法が同じである表 I-7 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 の組換え試薬とライセート試薬の各種 Et の USPRSE に対する相対活性は同じであると言える (表 I-7)。よって各種 Et の USPRSE に対する相対活性は測定原理と解析法が同じである組換え試薬とライセート試薬で同等であった。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-5)。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-5)。なお、データは載せていないが、組換え試薬では各 Et の 3 ロット間の EU/ng 値の CV 値は、*Pseudomonas*

aeruginosa (12.7%) を除き、いずれも 10% 未満であった。

2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

1. 前処理条件 (溶解剤および中和剤) の検討

(1) *S. aureus* (ブドウ球菌)、*B. subtilis* (芽胞形成菌) および *E. coli* (大腸菌) の蛍光染色における溶解剤および中和剤の影響

微生物関連性試験において用いられている溶解剤や中和剤について、高濃度の溶液を調製し試料溶液としたところ、0.1% レシチン溶液では溶解できずに懸濁状態となった。このため、洗浄溶液には適さないと考えられた。そこで、ジメチルスルホキシド (DMSO)、グリシン、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウム、ミリスチン酸イソプロピルが、蛍光染色剤 DAPI および CFDA による染色結果に与える影響を評価した。

まず、各指標菌を用いて各溶解剤や中和剤が DAPI 染色に与える影響を評価したところ、図 II-1 に示した通り、*S. aureus*、*B. subtilis* および *E. coli* のいずれにおいても、80% 以上の検出率を示した。以上のことから、それぞれの溶解剤や中和剤は DAPI の染色性に影響を与えないことがわかった。

次に、各溶解剤や中和剤が CFDA 染色に与える影響を評価した (図 II-2)。ジメチルスルホキシド、グリシン、ポリソルベート 20、チオ硫酸ナトリウムおよびミリスチン酸イソプロピル原液については *S. aureus*、*B. subtilis* および *E. coli* の全ての供試菌株において良好な検出率が得られ、これらの試料は CFDA の染色性に影響を与えないことがわかった。しかしながら、ポリソルベ

ート 80 は、*B. subtilis* に対してのみ平均約 30% の検出率を示し、CFDA の染色性に影響を与えることがわかった。

ポリソルベート 80 が *B. subtilis* に対する CFDA の染色性に与える影響を緩和するため、Glutaraldehyde (GA) を用いた CFDA-DAPI 二重染色法を検討した。なお GA は細胞膜架橋形成を行うため、細胞内で産生された蛍光物質 carboxyfluorescein の細胞外への漏出を防ぐことにより、CFDA の染色性を高めると報告されている⁹⁾。結果として、GA を染色液に添加することにより *B. subtilis* の CFDA 染色における輝度は上がったが、検出菌数の顕著な増加は認められなかった。このため、CFDA 染色性の低下の原因は、細胞膜の損傷による carboxyfluorescein の細胞外への漏出以外の原因によるものが大きいと考えられた。ポリソルベート 80 は非イオン性の界面活性剤でポリソルベート 20 に比べて疎水性が高い。1%ポリソルベート 80 は培養法による生菌数測定に用いられており、菌の増殖には影響を与えないと考えられるため、エステラーゼの失活なども考えられた。

(2) *P. aeruginosa* (緑膿菌) の蛍光染色における溶解剤および中和剤の影響

P. aeruginosa は水まわりなど生活環境中に広く常在する。本菌はグラム陰性好気性桿菌に分類され、日和見感染症の起因菌として知られている。医療機関においては、免疫力の低下した患者に感染し、院内肺炎、複雑性尿路感染症、複雑性腹腔内感染症、複雑性皮膚・皮膚組織感染症などを引き起こす。また、緑膿菌のゲノムには多数の排出ポンプをコードする遺伝子が含まれており、これらの排出ポンプが抗菌性物質に対

する耐性を緑膿菌に付与している。特に医療機関においては、既存の抗菌剤では治療が困難な多剤耐性緑膿菌が問題となっている。このように、緑膿菌は日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられる指標菌の中でも、その的確な検出が重要となっている。しかしながら、蛍光染色により緑膿菌を検出するにあたっては、先述の排出ポンプの作用により、染色性が低下する場合のあることが知られている。そこで、中和剤および溶解剤がその染色性に与える影響を評価した。

その結果、図 II-3 および図 II-4 に示したとおり、いずれの中和剤および溶解剤においても、DAPI および CFDA の両蛍光染色剤は緑膿菌に対して 70% 以上の検出率を示した。これらの結果から、それぞれの溶解剤や中和剤は緑膿菌に対する DAPI および CFDA の染色性に影響を与えないことがわかった。

(3) 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。

① 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、先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 II-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。

② 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 II-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。

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-5 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

光染色試料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ピ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-6 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。

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。

③ 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。

(4) 抗菌性物質への蛍光染色法の適用

抗菌性物質は、水に溶解するとその抗菌活性から、培養法では混入している細菌の検出が難しくなる。混釈法では増殖に影響を与え、メンブランフィルター法で試験を行っても、微量の抗菌性物質がフィルターに吸着するため、細菌数測定が困難となる。しかしながら、製造過程で微生物が混入する可能性もあり、その迅速な検出を行う必要がある。そこで、アンピシリンを用いて、混入した細菌の計数方法について検討した(表 II-5)。

その結果、アンピシリン 0.1g を水に溶解した後、指標菌を添加した試料に対して、ろ過によりフィルター上に細菌を集め、常法通りに染色することで、各指標菌の良好な回収率が得られた。抗菌剤のほとんどが、細菌が増殖するときに作用することもあり、増殖させることなく、短時間の試験操作で混入した細菌を計数できる蛍光染色法が有効であることがわかった。

以上の結果から、抗菌性物質に対しても蛍光染色による細菌数の測定が可能であることがわかった。

(5) 色素に対する蛍光染色法の適用

色素中に混入している細菌を蛍光染色で検出するにあたっては、色素がフィルターに吸着されることにより、バックグラウンドが高くなり、観察しづらくなることが多い。このため、カプセル剤など色素を用いている製剤には本方法の適用が難しいと考

えられた。そこで、色素が吸着したときのバックグラウンドを下げる検討を行った。黄色 5 号およびサンセットイエロー FCF はアゾ系の食用タール色素に分類される合成着色料である。無毒性量および一日摂取許容量 (ADI) を考慮し、過剰量である 0.25g 中の細菌の検出を試みた。まず色素を水に溶解後、指標菌を添加し、ろ過したフィルターを顕微鏡下で観察した。その結果、バックグラウンドが高くなり、菌体の検出が困難であった。そこで、ろ過したフィルターに対する洗浄用液を検討した結果、1%チオ硫酸ナトリウムおよび 1%ポリソルベート 20 で洗浄することにより、グラム陽性菌である *S. aureus* および *B. subtilis* は良好に検出できるようになった(図 II-7 A)。ところが、「試料色素を水に溶解し、ろ過後、チオ硫酸ナトリウムおよびポリソルベート 20 で洗浄する」という前処理操作ではグラム陰性菌 (*E. coli* および *P. aeruginosa*) の回収率が低くなった。そこで、色素を溶解する液を 1%チオ硫酸ナトリウムに変更することにより、図 II-7 B に示した通り、約 80% の良好な回収率が得られた。アゾ系の色素については、チオ硫酸ナトリウムなどの還元性により、分解することが考えられる。このため、グラム陰性菌の検出を阻害していた黄色 5 号が分解され、試験が可能になったものと考えられる。

以上の結果から適切な前処理を行うことにより、着色性をもつ物質が含まれる製剤中に存在する細菌についても、蛍光染色による細菌数計測が可能であるとわかった。

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 II-6）。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 $10^3\sim 10^7$ 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. 日局参考情報改定案の作成

「無菌医薬品製造管理区域の環境モニタリング」では、多様化する設備や新技術に対応しやすくするため、リスクベースアプローチをコンセプトとして取り入れ、自由度を高めた。また新しい環境モニタリングの手法として迅速法が利用できるように新たな項を追加した。空中浮遊微粒子の基準値には $0.5\mu\text{m}$ に加えて $5\mu\text{m}$ の基準を追加した。空気の清浄度を確認する目的としては $0.5\mu\text{m}$ のみでよいと考えられるが、微生物の存在しやすい大きな粒子の連続的な監視などを意識する PIC/S の基準を参考にした。同様に、連続的なモニタリングの利点を意識し、落下菌の基準値も追加された。また、グレード A における手指、着衣の微生物管理参考基準を、ゼロと明記するのか、その他の器物表面付着菌の中に入れてしまうのが議論になり、この際に測定値に関しては平均値で取り扱うか、最大値で取り扱うかの議論が重要な鍵になった。結論として、微生物のモニタリング測定値を平均値で扱うとする PIC/S の考え方を尊重し、パブコメにおける強い要望と意見も反映させ、グレード A 着衣の微生物管理基準の記載はなくし、また微生物の測定値は平均値で扱う考え方が取り入れられた。本研究は日局参考情報

「無菌医薬品製造管理区域の環境モニタリング」の改正案に反映され、添付資料 I-1 のように日局第 16 改正第一追補に収載され、平成 24 年 9 月 27 日に告示され 10 月 1 日より施行された。

(2) の「滅菌および滅菌指標体」は、これまで日局内に分散していた「最終滅菌法及び

滅菌指標体」「最終滅菌医薬品の無菌性保証」「滅菌法及び無菌操作法」などの再構築を行った（添付資料 I-2）。平成 24 年 11 月 9 日事務連絡「最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針」にある日本で定義される最終滅菌の考え方を基調に、技術情報を整理した。通常多用される湿熱滅菌、乾熱滅菌に加えて、高周波滅菌、電子線滅菌、過酸化水素滅菌なども取り入れた。技術において専門知識が不足したものは、設備の設計者や使用者を訪問して内容を充実させた。滅菌指標体は、ISO、USP との関係も考慮して、国内で使用しやすい記述とした。最終案はパブコメを経て意見の反映を終え、第二追補に収載予定の日局参考情報「滅菌および滅菌指標体」に反映された（添付資料 I-3）。

2. 消毒剤の有効性評価に関する研究

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 II-4-1～II-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 II-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 II-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では無い。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 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